

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 533 345**

51 Int. Cl.:

A61K 39/205 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.06.2010 E 10785628 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.01.2015 EP 2440244**

54 Título: **Diferentes serotipos del virus de la estomatitis vesicular como vectores de expresión para regímenes de inmunización**

30 Prioridad:

08.06.2009 US 184959 P

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

09.04.2015

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF WESTERN ONTARIO
(100.0%)
Gordon Mogenson Building 100 Collip Circle
Suite 105
London, Ontario N6G 4X8, CA**

72 Inventor/es:

**KANG, CHIL-YONG y
KIM, GYOUNG, NYOUN**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 533 345 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

Diferentes serotipos del virus de la estomatitis vesicular como vectores de expresión para regímenes de inmunización

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a una nueva plataforma de vacunas o composiciones inmunogénicas que comprenden dos serotipos diferentes de virus de la estomatitis vesicular recombinantes y al uso de la nueva plataforma en composiciones y métodos para regímenes de vacunación profilácticos y terapéuticos contra agentes patógenos humanos.

Antecedentes de la invención

- 10 A lo largo de esta solicitud se citan diversas referencias entre corchetes para describir con más detalle el estado de la técnica a la cual pertenece esta invención. La descripción de estas referencias se incorpora por referencia a la presente descripción.

15 El mejor modo de sensibilizar primariamente CTL CD8+ es sintetizar los antígenos diana mediante transfección o infección con DNA usando vectores víricos o bacterianos. Los requisitos como vectores víricos de vacunas son una gran variedad de huéspedes y una buena expresión de genes de interés. El virus de la estomatitis vesicular (VSV; del inglés, vesicular stomatitis virus) infecta a la mayoría de las células de mamífero y expresa proteínas víricas en las células infectadas en una cantidad de hasta el 60% de las proteínas totales [G. N. Kim y C. Y. Kang, *Virology* 357: 41, 2007]. En la naturaleza, el VSV infecta a cerdos, ganado vacuno y caballos y causa la enfermedad vesicular alrededor de la boca y el pie. Aunque se ha comunicado la infección de seres humanos por el VSV, el VSV no causa síntomas graves [B. N. Fields y K. Hawkins, *N. Engl. J. Med.* 277: 989, 1967; K. M. Johnson et al., *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 15: 244, 1966].

20 El VSV es un virus de RNA de cadena negativa que codifica cinco proteínas: una proteína de la nucleocápsida (N), una fosfoproteína (P), una proteína matricial (M), una glicoproteína superficial (G) y una RNA polimerasa (L) dependiente de RNA. Se requieren las proteínas N, P y L del VSV para la síntesis de RNAs genómicos de sentido positivo y sentido negativo y mRNA, que son necesarios para la síntesis de proteínas del VSV, así como genes de interés tales como proteínas del virus de la hepatitis C (HCV; del inglés, hepatitis C virus) humana.

25 Desde el desarrollo del sistema de genética inversa para el VSV [N. D. Lawson et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 4477, 1995; S. P. Whelan et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 8388, 1995] para generar VSVs recombinantes a partir de cDNA, el VSV ha sido estudiado como un vector vírico de vacunas para la inmunización con diversos agentes patógenos [J. L. Brandsma et al., *J. Virol.* 81: 5749, 2007; K. M. Daddario-DiCaprio et al., *J. Virol.* 80: 9659, 2006; W. Kohl et al., *J. Gen. Virol.* 88: 157, 2007; S. Kuate et al., *Virology* 362: 26, 2007; A. Palin et al., *Vaccine* 25: 741, 2007; J. A. Schwartz et al., *Virology* 366: 166, 2007].

30 Aunque el VSV es un virus de replicación rápida, se provocarán finalmente respuestas inmunes humorales y celulares contra el VSV en el huésped animal, como con cualesquier otros vectores virales [J. W. Yewdell et al., *J. Exp. Med.* 163: 1529-1538, 1986; L. Puddington et al., *J. Virol.* 60: 708-717, 1986; U. Kalinke et al., *Immunity* 5: 639-652, 1996]. Los animales infectados con el VSV desarrollan respuestas inmunes en una o dos semanas, incluyendo un anticuerpo neutralizante [U. Kalinke et al., *Immunity* 5: 639-652, 1996] que impide la eficacia de las inmunizaciones de refuerzo para la vacunación con el mismo vector. El VSV es neutralizado por anticuerpos específicos del serotipo contra la glicoproteína G de la superficie vírica. Dos serotipos diferentes de VSV, VSV-Indiana (VSV_{Ind}) y VSV-New Jersey (VSV_{NJ}), muestran un 50% de identidad de aminoácidos en la glicoproteína [C. J. Gallione y J. K. Rose, *J. Virol.* 46: 162-169, 1983]. Los anticuerpos generados contra un serotipo de VSV no neutralizan el otro serotipo de VSV [B. Cartwright y F. Brown, *J. Gen. Virol.* 16: 391-398, 1972]. Por lo tanto, otros han empleado VSV_{Ind} como un vector de vacuna en que la glicoproteína ha sido reemplazada por la de VSV_{NJ} para minimizar los problemas que surgen de esta respuesta inmune contra los vectores víricos [N. F. Rose et al., *J. Virol.* 74: 10.903-10.910, 2000; N. F. Rose et al., *Cell* 106: 539-549, 2001].

35 Iyer et al. (*Vaccine*, 5 de febrero de 2009, 27 (6): 893-903) utilizan la columna vertebral del serotipo Indiana de VSV para construir VSVs recombinantes (rVSVs) que especifican la glicoproteína G del virus Indiana o Chandipura y expresan la glicoproteína de la envoltura (E) del virus del Nilo Occidental. Se vacunaron intranasalmente ratones usando una estrategia de inmunización por estimulación primaria (Indiana)-refuerzo (Chandipura). Sin embargo, Iyer et al. no describen la generación de dos rVSVs completamente diferentes.

40 Wu et al. [*Journal of General Virology* (2009), 90, 1135-1140] describen experimentos *in vitro* sobre cómo construir un rVSV New Jersey.

45 En el Documento WO2004/093906 se describe el uso de un rVSV de un serotipo Indiana (rVSV_{Ind}), para crear un

rVSV_{Ind} que tiene un gen G del serotipo New Jersey, y un rVSV_{Ind} que tiene un gen G del serotipo Chadipuri. Sin embargo, en el Documento WO2004/093906 no se describe la generación de dos rVSVs completamente diferentes.

5 Aunque el VSV_{Ind} con proteína G del serotipo VSV_{NJ} es útil para evadir la respuesta inmune humoral, no evitará la respuesta inmune celular que puede ser desencadenada por otras proteínas del VSV, incluyendo las proteínas N, P, M y L. Las respuestas inmunes celulares contra proteínas del VSV distintas de la proteína G pueden dar lugar a respuestas inmunes incompletas contra el antígeno de interés. Por lo tanto, la generación de un VSV recombinante adicional de otro serotipo puede aumentar la eficacia del uso de VSV como un vector vírico vivo de vacuna.

10 Resulta interesante que se haya sugerido previamente que no se intentó la generación de un vector de serotipo rVSV_{NJ} completo a causa de la posibilidad de respuestas de linfocitos T citotóxicos de reactividad cruzada entre los serotipos Indiana y New Jersey [Clarke et al., Springer Semin. Immun. 28: 239, 2006].

En consecuencia, no se ha sugerido en la técnica el empleo de un serotipo rVSV_{NJ} completo junto con el rVSV_{Ind}, como se proporciona en las reivindicaciones adjuntas. En realidad, en ninguna de las referencias citadas de la técnica previa se intentó el uso del rVSV_{Ind} de longitud completa junto con el rVSV_{NJ} de longitud completa en una vacunación por estimulación primaria-refuerzo.

15 A la vista de los antecedentes anteriores, sería ventajoso proporcionar una estrategia para inmunoprofilaxis e inmunoterapia utilizando sistemas inmunes tanto humorales como celulares. De este modo, el Solicitante ha desarrollado un sistema que comprende una combinación de vacunas que provoca una respuesta contra agentes infecciosos.

Sumario de la invención

20 En un aspecto, la invención proporciona una plataforma de inmunización para uso en una estrategia de inmunización por estimulación primaria-refuerzo, en donde dicha plataforma de inmunización comprende:

a. Una vacuna o composición inmunogénica que comprende un serotipo Indiana (rVSV_{Ind}) del virus recombinante de la estomatitis vesicular (rVSV) de longitud completa, y

25 b. Otra vacuna o composición inmunogénica que comprende un serotipo New Jersey (rVSV_{NJ}) de rVSV de longitud completa,

en donde el rVSV_{Ind} expresa una proteína M del serotipo Indiana que tiene una metionina de la posición 51 cambiada por una arginina (sustitución M51R), y el rVSV_{NJ} incluye un gen M mutante que expresa una proteína M del serotipo New Jersey que tiene una metionina de la posición 48 cambiada por una arginina, y una metionina de la posición 51 cambiada por una arginina (sustitución M48R-M51R).

30 En otro aspecto de la presente invención, la plataforma de inmunización se caracteriza por que un serotipo incluye un gen de glicoproteína superficial (G) del otro serotipo.

En otro aspecto de la presente invención, la plataforma de inmunización se caracteriza por que los dos serotipos de rVSV son capaces de expresar una o más proteínas de interés.

35 En otro aspecto de la presente invención, la plataforma de inmunización se caracteriza por que los dos serotipos de rVSV son capaces de expresar una o más proteínas del virus de la hepatitis C (HCV).

40 En un aspecto más, la plataforma de inmunización es para uso en una estrategia de inmunización por estimulación primaria-refuerzo, en donde dicha estrategia de inmunización comprende administrar a un sujeto una dosis de estimulación primaria de una vacuna o composición inmunogénica que comprende un rVSV de un primer serotipo, seguida de una dosis de refuerzo de una vacuna o composición inmunogénica que comprende un rVSV de un segundo serotipo.

En un aspecto, la estrategia de inmunización se caracteriza por que la dosis de refuerzo va seguida de al menos una dosis más de la vacuna o composición inmunogénica que comprende el rVSV del primer serotipo.

En otro aspecto, la estrategia de inmunización se caracteriza por que el primer serotipo es Indiana y el segundo serotipo es New Jersey.

45 En otro aspecto, la estrategia de inmunización se caracteriza por que el primer serotipo es New Jersey y el segundo serotipo es Indiana.

En otro aspecto, la estrategia de inmunización se caracteriza por que los serotipos de rVSV primero y segundo incluyen un gen M mutante.

- En otro aspecto, la estrategia de inmunización se caracteriza por que el segundo serotipo de rVSV incluye el gen G del primer serotipo de rVSV.
- En otro aspecto, la estrategia de inmunización se caracteriza por que los serotipos de rVSV primero y segundo son capaces de expresar una o más proteínas de interés.
- 5 En otro aspecto, la estrategia de inmunización se caracteriza por que dichas una o más proteínas de interés son una o más proteínas de un virus exógeno seleccionado del grupo que comprende: el HCV, el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus del Nilo Occidental, hantavirus, influenzavirus, el virus Ébola, el virus de la fiebre hemorrágica por dengue, el virus de la encefalitis japonesa, y el coronavirus del SARS.
- 10 En otro aspecto, la estrategia de inmunización se caracteriza por que los serotipos de rVSV primero y segundo son capaces de expresar una o más proteínas de HCV.
- En otro aspecto, la estrategia de inmunización se caracteriza por que el primer serotipo es Indiana y el segundo serotipo es New Jersey, en donde tanto el rVSV Indiana como el rVSV New Jersey incluyen un gen M mutante, y en donde el rVSV Indiana y el rVSV New Jersey son capaces de expresar una o más proteínas de un virus exógeno.
- 15 En aún otro aspecto, la presente invención describe un método para inducir una respuesta inmune a un VSV en un mamífero, método caracterizado por que comprende las operaciones siguientes: (a) administrar al mamífero una cantidad eficaz de una primera vacuna o composición inmunogénica, en donde dicha primera vacuna o composición inmunogénica comprende un rVSV de un primer serotipo, y (b) administrar al sujeto una cantidad eficaz de una segunda vacuna o composición inmunogénica, en donde dicha segunda vacuna o composición inmunogénica comprende un rVSV de un segundo serotipo.
- 20 En un aspecto, el método para inducir una respuesta inmune a un VSV en un mamífero se caracteriza por que comprende además: (c) administrar al sujeto una cantidad eficaz de la primera vacuna o composición inmunogénica.
- En otro aspecto, el método para inducir una respuesta inmune a un VSV en un mamífero se caracteriza por que el primer serotipo es Indiana y el segundo serotipo es New Jersey.
- 25 En otro aspecto, el método para inducir una respuesta inmune a un VSV en un mamífero se caracteriza por que el primer serotipo es New Jersey y el segundo serotipo es Indiana.
- En otro aspecto, el método para inducir una respuesta inmune a un VSV en un mamífero se caracteriza por que los serotipos de rVSV primero y segundo incluyen un gen M mutante.
- En otro aspecto, el método para inducir una respuesta inmune a un VSV en un mamífero se caracteriza por que el segundo serotipo de rVSV incluye el gen G del primer serotipo de rVSV.
- 30 En otro aspecto, el método para inducir una respuesta inmune a un VSV en un mamífero se caracteriza por que la respuesta inmune incluye una respuesta inmune humoral y/o celular.
- En otro aspecto, el método para inducir una respuesta inmune a un VSV en un mamífero se caracteriza por que los serotipos de rVSV primero y segundo son capaces de producir partículas de tipo vírico que tienen la capacidad para provocar una respuesta inmune mediada por células y/o humoral.
- 35 En otro aspecto, el método para inducir una respuesta inmune a un VSV en un mamífero se caracteriza por que los serotipos de rVSV primero y segundo son capaces de expresar una o más proteínas de un virus exógeno, y dicha respuesta inmune comprende además una respuesta inmune a las una o más proteínas del virus exógeno, en donde dicho virus exógeno es seleccionado del grupo que comprende: HCV humano, VIH, virus del Nilo Occidental, hantavirus, influenzavirus, virus Ébola, virus de la fiebre hemorrágica por dengue, virus de la encefalitis japonesa, y coronavirus del SARS.
- 40 En otro aspecto, el método para inducir una respuesta inmune a un VSV en un mamífero se caracteriza por que los serotipos de rVSV primero y segundo son capaces de expresar una o más proteínas del HCV, y dicha respuesta inmune comprende además una respuesta inmune a las una o más proteínas del HCV.
- 45 En aún un aspecto más, la presente invención describe un medicamento combinado útil para inducir una respuesta inmune contra un agente patógeno, medicamento combinado que se caracteriza por que comprende: (a) una vacuna o composición inmunogénica que comprende un rVSV de un serotipo que es capaz de expresar una o más proteínas del agente patógeno, y (b) otra vacuna o composición inmunogénica que comprende un rVSV de otro serotipo que es capaz de expresar las una o más proteínas del agente patógeno.
- 50 En un aspecto, el medicamento combinado se caracteriza por que un serotipo es un rVSV Indiana y el otro serotipo es un rVSV New Jersey, en donde el rVSV Indiana y el rVSV New Jersey incluyen un gen M mutante.

5 En un aspecto más de la presente invención, se describe un método para prevenir o tratar una infección causada por un agente patógeno, método caracterizado por que comprende: (a) administrar a un sujeto una cantidad eficaz de una primera vacuna o composición inmunogénica que comprende un rVSV de un primer serotipo que es capaz de expresar una o más proteínas del agente patógeno, y (b) administrar al sujeto una cantidad eficaz de una segunda vacuna o composición inmunogénica que comprende un rVSV de un segundo serotipo que es capaz de expresar las una o más proteínas del agente patógeno.

En un aspecto, el método para prevenir o tratar una infección causada por un agente patógeno se caracteriza por que comprende además: (c) administrar al sujeto una cantidad eficaz de la primera vacuna o composición inmunogénica.

10 En otro aspecto, el método para prevenir o tratar una infección causada por un agente patógeno se caracteriza por que el primer serotipo es un rVSV Indiana y el segundo serotipo es un rVSV New Jersey.

En otro aspecto, el método para prevenir o tratar una infección causada por un agente patógeno se caracteriza por que el primer serotipo es un rVSV New Jersey y el segundo serotipo es un rVSV Indiana.

15 En aún otro aspecto, la invención proporciona un kit que comprende: (a) al menos una dosis de una cantidad eficaz de una vacuna que comprende un virus recombinante de la estomatitis vesicular (rVSV) de longitud completa de un serotipo, y (b) al menos una dosis de una cantidad eficaz de una vacuna que comprende un rVSV de longitud completa de otro serotipo,

20 en donde un serotipo es Indiana (rVSV_{Ind}) y el otro serotipo es New Jersey (rVSV_{NJ}), y en donde el rVSV_{Ind} expresa una proteína M del serotipo Indiana que tiene una metionina de la posición 51 cambiada por una arginina (sustitución M51R), y el rVSV_{NJ} incluye un gen M mutante que expresa una proteína M del serotipo New Jersey que tiene una metionina de la posición 48 cambiada por una arginina, y una metionina de la posición 51 cambiada por una arginina (sustitución M48R-M51R).

En un aspecto, el kit de la presente invención se caracteriza por que (a) y (b) se formulan en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

25 Las ventajas de utilizar VSV y dos serotipos de VSV como vectores de vacunas incluyen:

(1) La utilización de dos serotipos de VSV hace que el VSV sea un vector de vacunas más eficaz porque un serotipo de VSV (la primera vacuna) no neutralizará el otro serotipo de VSV (la segunda vacuna) o matará fácilmente las células infectadas con el otro serotipo de VSV.

30 (2) El VSV no causa ninguna enfermedad grave en los seres humanos, y la mayoría de las personas infectadas son veterinarios que se ocupan de animales enfermos, o científicos que trabajan con el VSV. Por lo tanto, la relación de individuos seropositivos en una población humana general es muy baja, lo que hace que el VSV sea un atractivo vector de vacunas.

(3) El VSV se replica de un modo autolimitante en un individuo infectado pero aún induce potentes respuestas inmunes celulares y humorales.

35 (4) El VSV se replica bien en la mayoría de las células de mamífero en cultivo y produce elevados títulos virales.

Breve descripción de los dibujos

La presente invención será mejor entendida a partir de la descripción detallada proporcionada en esta memoria y a partir de los dibujos adjuntos, que se proporcionan sólo a modo de ilustración y no limitan el pretendido alcance de la invención.

40 En la Figura 1 se ilustra la organización génica del virus de la estomatitis vesicular (VSV), la cepa resistente al calor (HR; del inglés, heat resistant) del serotipo Indiana (Ind) y la cepa Hazlehurst (Haz) del serotipo New Jersey (NJ).

En la Figura 2 se ilustra un sistema de genética inversa para la recuperación de VSV a partir de cDNA.

En la Figura 3 se ilustra la cinética de crecimiento de VSVs recombinantes sin genes de interés.

45 En la Figura 4 se ilustra la expresión de proteínas de VSV en células renales de cría de hámster infectadas con VSVs recombinantes.

La Figura 5 representa respuestas de células T CD8+ específicas de péptidos de VSV en ratones Balb/c que reciben vacunas de VSV programadas en 3 dosis, de un solo virus.

La Figura 6 representa respuestas de células T CD8+ específicas de péptidos de VSV en ratones Balb/c que reciben un programa de administraciones sucesivas de vacunas de VSV en el orden New Jersey-Indiana-New Jersey.

La Figura 7 representa respuestas de células T CD8+ específicas de péptidos de VSV en ratones Balb/c que reciben un programa de administraciones sucesivas de vacunas de VSV en el orden Indiana-New Jersey-Indiana.

5 La Figura 8 A representa las comparaciones de respuestas de células T CD8+ específicas de péptidos de VSV en ratones Balb/c que reciben uno o dos serotipos de vacunas de VSV.

La Figura 8 B representa la comparación de la reactivación de células T CD8+ después de una estimulación *ex vivo* con péptidos del MHC de clase I del HCV en una población de ratones (n = 2) vacunados con VSV_{Ind}-M(M51R) + HCV-CoreΔER y luego con VSV_{NJ}-M(M48/51R) + HCV-CoreΔER, lo que va seguido 3 semanas más tarde de una dosis adicional de VSV_{Ind}-M(M51R) + HCV-CoreΔER (conjunto de barras a la derecha del gráfico).
10

En la Figura 9 se ilustra la clonación de genes del core de HCV con o sin mutaciones por delección en el clon de cDNA de VSV_{NJ}.

En la Figura 10 se ilustra la clonación de genes del core de HCV con o sin mutaciones por delección en el clon de cDNA de VSV_{Ind}.

15 La Figura 11 representa la expresión de proteínas del core de HCV a partir del VSV_{NJ} recombinante con M de tipo silvestre (WT; del inglés, *wild type*) y M mutante (A). También se detectó la expresión de las proteínas de VSV desde las mismas células (B). La expresión se determinó mediante un análisis por transferencia Western usando anticuerpo anti-core o anticuerpo anti-VSV_{NJ}.

La Figura 12 representa la expresión de proteínas del core de HCV a partir del VSV_{Ind} recombinante con M de tipo silvestre y M mutante (A). También se detectó la expresión de las proteínas de VSV desde las mismas células (B). La expresión se determinó mediante un análisis por transferencia Western usando anticuerpo anti-core o anticuerpo anti-VSV_{Ind}.
20

La Figura 13 representa la expresión del core de HCV a partir del rVSV_{NJ} y el rVSV_{Ind} con genes del core de HCV. Las proteínas del core de HCV se detectaron etiquetando la célula infectada durante una hora con ³H-Leu e inmunoprecipitando la proteína del core con un anticuerpo contra el core de HCV.
25

En la Figura 14 se ilustra la clonación de genes NS3 de HCV en el clon de cDNA de rVSV_{NJ}(M_{WT}), rVSV_{NJ}(M_{M48R-M51R}), rVSV_{Ind}(M_{WT}) y rVSV_{Ind}(M_{M51R}).

La Figura 15 representa la recuperación de rVSV_{NJ}(M_{WT}), rVSV_{NJ}(M_{M48R-M51R}), rVSV_{Ind}(M_{WT}) y rVSV_{Ind}(M_{M51R}) que expresan NS3. La expresión de NS3, los serotipos y los fenotipos M del rVSV recuperado se confirmó mediante un análisis por transferencia Western usando el anticuerpo anti-NS3 de HCV y anticuerpos anti-VSV específicos del serotipo.
30

En la Figura 16 se ilustra la clonación de genes NS5A y NS5B de HCV en el clon de cDNA de rVSV_{NJ}(M_{WT}), rVSV_{NJ}(M_{M48R-M51R}), rVSV_{Ind}(M_{WT}) y rVSV_{Ind}(M_{M51R}).

La Figura 17 representa los rVSV_{NJ}(M_{WT}) y rVSV_{NJ}(M_{M48R-M51R}) recuperados, que expresan NS5A. La expresión de NS5A, los serotipos y los fenotipos M del rVSV recuperado fue confirmada mediante un análisis por transferencia Western utilizando el anticuerpo anti-NS5A de HCV y anticuerpos anti-VSV_{NJ} específicos del serotipo.
35

La Figura 18 representa los rVSV_{Ind}(M_{WT}) y rVSV_{Ind}(M_{M51R}) recuperados, que expresan NS5A. La expresión de NS5A, los serotipos y los fenotipos M del rVSV recuperado fue confirmada mediante un análisis por transferencia Western utilizando el anticuerpo anti-NS5A de HCV y anticuerpos anti-VSV_{Ind} específicos del serotipo.

40 La Figura 19 representa los rVSV_{NJ}(M_{WT}) y rVSV_{NJ}(M_{M48R-M51R}) recuperados, que expresan NS5B. La expresión de NS5B, los serotipos y los fenotipos M del rVSV recuperado fue confirmada mediante un análisis por transferencia Western utilizando el anticuerpo anti-NS5B de HCV y anticuerpos anti-VSV_{NJ} específicos del serotipo.

La Figura 20 representa los rVSV_{Ind}(M_{WT}) y rVSV_{Ind}(M_{M51R}) recuperados, que expresan NS5B. La expresión de NS5B, los serotipos y los fenotipos M del rVSV recuperado fue confirmada mediante un análisis por transferencia Western utilizando el anticuerpo anti-NS5B de HCV y anticuerpos anti-VSV_{Ind} específicos del serotipo.
45

Descripción detallada de la invención

1. Definiciones

Por conveniencia, se proporcionan a continuación los significados de ciertos términos y frases empleados en la

memoria descriptiva, los ejemplos y las reivindicaciones adjuntas. A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos empleados en esta memoria tienen los mismos significados que los comúnmente entendidos por quien tiene una experiencia normal en la técnica a la que pertenece esta invención.

5 Los artículos "un" y "una" se emplean en esta memoria para referirse a uno o más de uno (es decir, a al menos uno) del objeto gramatical del artículo.

Los términos "animal" y "sujeto", como se emplean en esta memoria, incluyen todos los miembros del reino animal incluyendo los mamíferos, preferiblemente los seres humanos.

La expresión "cantidad eficaz", como se emplea en esta memoria, significa una cantidad eficaz y en dosis y durante periodos de tiempo necesarios para alcanzar el resultado deseado.

10 Los términos "Indiana" e "IND" se emplean para referirse al serotipo Indiana del VSV (VSV_{Ind}).

"M_{WT}" y "M(WT)" se emplean para referirse a un VSV que tiene un gen M de tipo silvestre. "M51R" se emplea para referirse a un gen M en el VSV_{Ind} que tiene una metionina cambiada por una arginina en la posición 51. "M48R-M51R" se emplea para referirse a un gen M en el VSV_{NJ} que tiene una metionina cambiada por una arginina en las posiciones 48 y 51.

15 Las expresiones "New Jersey" y "NJ" se emplean para referirse al serotipo New Jersey del VSV (VSV_{NJ}).

"Ind-M(M51R)/NJ G" se emplea para referirse a un VSV_{Ind} que tiene un gen M mutante y que expresa una proteína G del serotipo New Jersey de VSV (VSV_{NJ}). "Ind-M(WT)/NJ G" se emplea para referirse a un VSV_{Ind} que tiene una proteína M de tipo silvestre y que expresa una proteína G de VSV_{NJ}.

20 "NJ-M(M48R-M51R)/Ind G" se emplea para referirse a un VSV_{NJ} que tiene un gen M mutante y que expresa una proteína G de VSV_{Ind}. "NJ-M(WT)/Ind G" se emplea para referirse a un VSV_{NJ} que tiene un gen M de tipo silvestre y que expresa una proteína G de VSV_{Ind}.

25 El término "proteína", como se emplea en esta memoria, se define como una cadena de restos de aminoácido, que tiene normalmente una secuencia definida. Como se emplea en esta memoria, el término "proteína" incluye los términos "péptidos" y "proteínas". Los términos también abarcan un polímero de aminoácidos que ha sido modificado.

"rVSV" se emplea para referirse a un virus recombinante de la estomatitis vesicular.

2. Visión de conjunto

30 La presente invención presenta plataformas de inmunización, regímenes de inmunización y medicamentos útiles para inducir una respuesta inmune en un sujeto y prevenir o tratar una infección patógena en un sujeto, en donde dichas plataformas, regímenes y medicamentos comprenden un VSV recombinante de un serotipo y un VSV recombinante de otro serotipo. Antes de la presente invención, otros grupos de investigación emplearon los VSVs con el gen de la glicoproteína superficial (G) cambiado para la segunda inmunización con objeto de evitar la neutralización del virus de refuerzo por los anticuerpos generados por los virus de estimulación primaria. Sin embargo, antes de la presente invención, ningún otro grupo de investigación ha empleado dos serotipos diferentes de rVSV en un esquema o estrategia de inmunización por estimulación primaria y refuerzo.

35 De este modo, en un aspecto, la presente invención proporciona una plataforma de inmunización para uso en una estrategia de inmunización por estimulación primaria y refuerzo, plataforma de inmunización que se caracteriza por que comprende:

40 (a) una vacuna o composición inmunogénica que comprende un virus recombinante de la estomatitis vesicular (rVSV) de un serotipo, y

(b) otra vacuna o composición inmunogénica que comprende un rVSV de otro serotipo.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un medicamento combinado útil para inducir una respuesta inmune contra un agente patógeno, medicamento combinado que se caracteriza por que comprende:

45 (a) una vacuna o composición inmunogénica que comprende un rVSV de un serotipo que es capaz de expresar una o más proteínas del agente patógeno, y

(b) otra vacuna o composición inmunogénica que comprende un rVSV de otro serotipo que es capaz de expresar las una o más proteínas del agente patógeno.

El Solicitante desarrolló un sistema de genética inversa para recuperar VSV_{NJ} a partir de cDNA por vez primera [véanse las Figuras 1 y 2; G. N. Kim y C. Y. Kang, *Virology* 357: 41-53, 2007]. El VSV_{NJ} recombinante es un vector vírico eficaz junto con el VSV_{Ind} para la expresión de genes extraños (es decir, genes de virus exógenos), que se puede emplear para minimizar los problemas asociados con respuestas inmunes preexistentes contra el propio VSV. Además del sistema del vector VSV_{NJ}, el Solicitante también generó un clon de longitud completa de VSV_{Ind} (Figura 1) que puede ser empleado como un vector de expresión para evitar la neutralización de vectores VSV después de la inmunización de refuerzo.

Las características de la plataforma de inmunización con rVSV del Solicitante incluyen, en un aspecto, la utilización de dos serotipos diferentes de VSV y, en otro aspecto, la utilización de VSVs con un gen M de tipo silvestre y un gen M mutante. En aspectos de la invención, los dos serotipos diferentes de VSV son VSV_{Ind} y VSV_{NJ}.

La proteína M de VSV inhibe muy eficazmente la síntesis proteica celular pero, cuando una metionina es cambiada por arginina en la posición 51 de la M de VSV_{Ind} y en las posiciones 48 y 51 de la M de VSV_{NJ}, las proteínas M pierden su efecto inhibitorio sobre la expresión proteica celular del huésped [G. N. Kim y C. Y. Kang, *Virology* 357: 41, 2007; J. M. Petersen et al., *Mol. Cell. Biol.* 20: 8590, 2000; C. von Kobbe et al., *Mol. Cell* 6: 1243, 2000]. Por lo tanto, los rVSV con el gen M mutante pueden ser mejores vectores de expresión que los rVSV con M de tipo silvestre porque no bloquearán la expresión de proteínas relacionadas con el sistema inmune, tales como quimiocinas, en las células presentadoras de antígeno.

3. Vacunas o composiciones inmunogénicas de la invención

La presente invención presenta además vacunas o composiciones inmunogénicas que comprenden un rVSV de un primer serotipo y vacunas o composiciones inmunogénicas que comprenden un rVSV de un segundo serotipo, como se describió anteriormente. Las vacunas o composiciones inmunogénicas de la invención son adecuadas para la administración *in vivo* a sujetos en una forma biológicamente compatible. La expresión "forma biológicamente compatible, adecuada para administración *in vivo*", como se emplea en esta memoria, significa una forma de la sustancia que se va a administrar en la que los efectos terapéuticos pesan más que los efectos tóxicos. Las sustancias pueden ser administradas a cualquier animal o sujeto, preferiblemente a seres humanos. Las vacunas de la presente invención pueden ser proporcionadas como una preparación liofilizada. Las vacunas de la presente invención pueden ser también proporcionadas como una disolución que puede ser congelada para su transporte. Además, las vacunas pueden contener conservantes adecuados, tal como glicerol, o pueden ser formuladas sin conservantes. Si es apropiado (es decir, sin daño para el VSV en la vacuna), las vacunas también pueden contener diluyentes, agentes adyuvantes y/o vehículos adecuados.

La dosis de la vacuna puede variar de acuerdo con factores tales como el estado morbozo, la edad, el sexo y el peso del individuo y la capacidad del anticuerpo para provocar una respuesta deseada en el individuo. El régimen de administración puede ser ajustado para obtener la respuesta terapéutica óptima. La dosis de la vacuna puede ser también variada para obtener una respuesta óptima de dosis preventiva dependiendo de las circunstancias.

4. Métodos de uso

La presente invención también presenta métodos para inducir una respuesta inmune en un sujeto y prevenir o tratar una infección patógena en un sujeto, que comprenden administrar al sujeto una cantidad eficaz de una combinación de vacunas o composiciones inmunogénicas.

De tal modo, en un aspecto, la presente invención proporciona un método para inducir una respuesta inmune a un VSV en un mamífero, método caracterizado por que comprende las operaciones siguientes:

(a) administrar al mamífero una cantidad eficaz de una primera vacuna o composición inmunogénica, en donde dicha primera vacuna o composición inmunogénica comprende un rVSV de un primer serotipo, y

(b) administrar al sujeto una cantidad eficaz de una segunda vacuna o composición inmunogénica, en donde dicha segunda vacuna o composición inmunogénica comprende un rVSV de un segundo serotipo.

En otro aspecto, la presente invención también proporciona un método para prevenir o tratar una infección causada por un agente patógeno, método caracterizado por que comprende: (a) administrar a un sujeto una cantidad eficaz de una primera vacuna o composición inmunogénica que comprende un rVSV de un primer serotipo que es capaz de expresar una o más proteínas del agente patógeno, y (b) administrar al sujeto una cantidad eficaz de una segunda vacuna o composición inmunogénica que comprende un rVSV de un segundo serotipo que es capaz de expresar las una o más proteínas del agente patógeno.

En aspectos de la invención, los métodos para inducir una respuesta inmune a un VSV en un mamífero y los métodos para prevenir o tratar una infección causada por un agente patógeno pueden comprender además la operación: (c) administrar al sujeto una cantidad eficaz de la primera vacuna o composición inmunogénica. La

operación (c) puede ser administrada al sujeto más de una vez a lo largo del curso de la inducción de una respuesta inmune, la prevención o el tratamiento.

La descripción anterior describe de forma general la presente invención. Se puede obtener una comprensión más completa por referencia a los ejemplos específicos siguientes. Estos ejemplos se describen únicamente con fines de ilustración y con ellos no se pretende limitar el alcance de la invención. Los cambios en la forma y la sustitución de equivalentes se consideran circunstancias que pueden sugerir o representar conveniencia. Aunque en esta memoria se han empleado términos específicos, dichos términos están pensados en sentido descriptivo y no con fines de limitación.

Ejemplos

Los ejemplos se describen con fines de ilustración y con ellos no se pretende limitar el alcance de la invención.

Ejemplo 1 – Recuperación de VSV por genética inversa

El Solicitante generó VSVs recombinantes a partir de cDNA mediante un sistema de genética inversa que antes fue establecido separadamente por Rose y Wertz [N. D. Lawson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 4477, 1995; S. P. Whelan et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 8388, 1995]. Células renales de cría de hámster que expresaban RNA polimerasa de bacteriófago T7, es decir, células BHK-T7 [U. J. Buchholz et al., J. Virol. 73: 251, 1999], fueron transfectadas con un DNA plasmídico que codificaba el genoma de longitud completa de VSV, el serotipo Indiana o el serotipo New Jersey, y plásmidos que codificaban genes N, P y L de VSV. El medio de cultivo celular que contenía el virus recién generado fue recogido 48-72 horas después de la transfección, dependiendo del grado de los efectos citopáticos por el VSV recombinante. En la Figura 2 se ilustra el sistema de genética inversa para la recuperación de VSV a partir de cDNA.

En la Figura 1 se ilustran los clones de cDNA de VSV_{Ind} y VSV_{NJ} generados por el Solicitante. En el diagrama de la Figura 1 se describe el orden génico (N, P, M, G y L) y sitios para enzimas de restricción (Pac I, Not I, Kpn I, y Spe I) en el clon de DNA de longitud completa del genoma de VSV, que se pueden utilizar para clonar genes de interés (genes extraños) en el genoma de VSV. También se muestran las mutaciones introducidas en el gen M (M51R en el VSV_{Ind} y M48R-M51R en el VSV_{NJ}) de VSV.

Con referencia a la Figura 3, los VSVs recombinantes fueron purificados mediante 3 recolecciones de placas consecutivas y fueron multiplicados en células renales de cría de hámster. Con objeto de determinar la cinética de replicación de los VSVs recombinantes, se infectaron células BHK con una multiplicidad de infección (MOI; del inglés, *multiplicity of infection*) de 3 y se recogió el medio de cultivo celular de las células infectadas cada 2 horas hasta 10 horas después de la infección. El título vírico en el medio de cultivo recogido fue determinado mediante un ensayo de placas.

Ejemplo 2 – Expresión de proteínas de VSV en células renales de cría de hámster infectadas con VSVs recombinantes

La expresión de proteínas de los VSVs recombinantes (dos serotipos, VSV_{Ind} y VSV_{NJ}, VSVs con M de tipo silvestre y M mutante, y VSVs con el gen G cambiado) fue examinada mediante un análisis por transferencia Western usando anticuerpos contra VSV_{Ind} y VSV_{NJ}. Nuestros anticuerpos contra VSV_{Ind} o VSV_{NJ} permiten detectar cuatro proteínas de VSV (N, P, M y G). En la Figura 4 se muestran 3 bandas de proteínas porque la proteína N y la proteína P migran como proteínas de igual tamaño en el gel de la SDS-PAGE. El anticuerpo contra VSV_{Ind} o VSV_{NJ} permitió detectar las cuatro proteínas de VSV, N, P, M y G, que se expresaron de un solo serotipo. El intercambio del gen G en el VSV_{Ind} NJG fue confirmado por la falta de detección de proteína G por el anticuerpo anti-VSV_{Ind} porque el anticuerpo anti-VSV_{Ind} no presenta reacción cruzada con la proteína G de VSV_{NJ} (carriles 2 y 4). El intercambio del gen G en el VSV_{NJ} IG fue confirmado por las diferencias de tamaño entre la G de VSV_{Ind} y la G de VSV_{NJ}. La G de VSV_{Ind} migra algo más lentamente que la G de VSV_{NJ}, lo que se muestra en los carriles 6 y 8. La mutación en el gen M (M51R en la proteína M de VSV_{Ind} y M48R-M51R en la proteína M de VSV_{NJ}) hace que las proteínas M migren algo más rápidamente que las proteínas M de tipo silvestre de ambos serotipos, lo que se demuestra en los carriles 3, 4, 7 y 8. El patrón de migración de las proteínas M permite confirmar la mutación en los VSVs mutantes.

Ejemplo 3 – Regímenes o esquemas de vacunaciones para hallar la mejor combinación de inoculaciones víricas

Con referencia a las Figuras 5-8 y la Tabla 1, puesto que un objetivo del Solicitante es utilizar un régimen de estimulación primaria y refuerzo para inmunizar animales, el Solicitante determinó el mejor orden de los serotipos recombinantes de VSV para el esquema de inmunización por estimulación primaria y refuerzo. El Solicitante estudió si la vacunación con 1) vectores basados en dos serotipos diferentes (VSV_{Ind} o VSV_{NJ}), 2) vectores de VSV que expresan la proteína G del serotipo alterno, o 3) la proteína M de tipo silvestre citotóxica o la proteína M mutante no citopática de VSV proporcionaba alguna ventaja a la generación de células T CD8+ específicas de VSV. En la Tabla 1 se ilustran todas las posibles combinaciones de serotipos.

Se vacunaron grupos de ratones con rVSVs en un programa de vacunación de tres dosis. En este estudio de vacunación consistente en 13 grupos de ratones, el objetivo fue determinar la(s) construcción(es) de vacuna(s) de VSV recombinante que generaba(n) el mayor porcentaje de células T CD8+ específicas de la nucleocápsida de VSV, basándose en la producción de interferón gamma (IFN γ) después de una estimulación con un péptido N de VSV, N275 de VSV (péptido específico de H2d del MHC I, dirigido a una secuencia de aminoácidos en N de VSV). En particular, estudiamos si la vacunación con (1) vectores basados en 2 cepas diferentes (VSV_{Ind} o VSV_{NJ}), (2)

- 5 N275 de VSV (péptido específico de H2d del MHC I, dirigido a una secuencia de aminoácidos en N de VSV). En particular, estudiamos si la vacunación con (1) vectores basados en 2 cepas diferentes (VSV_{Ind} o VSV_{NJ}), (2) vectores que expresan la proteína G del serotipo alterno, o 3) la proteína M de tipo silvestre citotóxica o la proteína M mutante no citopática de VSV proporcionaba alguna ventaja a la generación de células T CD8+ específicas de N de VSV.
- 10 Seis hembras de ratón Balb/c (tipo H2d del MHC) de 6 semanas de edad por grupo recibieron 1 x 10⁶ unidades formadoras de placa (pfu; del inglés, plaque forming units) de rVSV en la dosis 1, administradas por inyección intramuscular en el músculo del muslo posterior y diluidas en un volumen total de 50 μ l de PBS. Los ratones recibieron 1 x 10⁶ pfu de rVSV en la dosis 2, y 5 x 10⁶ pfu de rVSV en la dosis 3. Un periodo de tiempo de 4 semanas separaba las dosis 1 y 2, y 10 semanas adicionales separaban las dosis 2 y 3. Se sacrificaron los ratones
- 15 7 días después de la tercera dosis y se recogieron esplenocitos para la detección de células T CD8+ específicas para un péptido de la nucleocápsida de VSV (N275 de VSV).

Se preparó una sola suspensión celular de esplenocitos en medio RPMI completo y luego se transfirieron 1 x 10⁶ células a los apropiados pocillos de una placa de 96 pocillos con fondo en U. Se añadieron mezclas del péptido VSV N275 específico de N de VSV, NH₂-MPYLIDFGL-COOH (GenScript Corporation, Piscataway, New Jersey, EE.UU.), y anticuerpo anti-CD28 coestimulante (clon 37.51, BD Biosciences, San José, California, EE.UU.) y se incubaron las mezclas durante 2 horas. Se añadió brefeldina A (BD Biosciences) según las instrucciones del fabricante para bloquear la secreción de citocinas y se incubaron las células durante 3 horas adicionales. Las células fueron teñidas con anticuerpos que reconocían CD8 murino (FITC-CD8a, BD Biosciences, clon 53-6.7) o los apropiados anticuerpos testigos de isotipo. Las células fueron lavadas y luego permeabilizadas con reactivos del kit Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) según las instrucciones del fabricante y fueron luego teñidas para IFN γ (APC-IFN γ , BD Biosciences, clon XMG1.2). Las células teñidas fueron identificadas utilizando un citómetro de flujo FACS Calibur (BD Biosciences) y el software FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, Oregón, EE.UU.). Los datos se expresan como el porcentaje medio de esplenocitos CD8+IFN γ + en 4-6 ratones por grupo [+/- el error estándar de la media (SEM; del inglés, standard error of the mean)] para cada vacuna. La significación estadística se determinó utilizando un análisis ANOVA de un factor con una corrección de Bonferroni (software Prism 4.0, GraphPad Software Inc., San Diego, California, EE.UU.).

- 20 y anticuerpo anti-CD28 coestimulante (clon 37.51, BD Biosciences, San José, California, EE.UU.) y se incubaron las mezclas durante 2 horas. Se añadió brefeldina A (BD Biosciences) según las instrucciones del fabricante para bloquear la secreción de citocinas y se incubaron las células durante 3 horas adicionales. Las células fueron teñidas con anticuerpos que reconocían CD8 murino (FITC-CD8a, BD Biosciences, clon 53-6.7) o los apropiados anticuerpos testigos de isotipo. Las células fueron lavadas y luego permeabilizadas con reactivos del kit
- 25 Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) según las instrucciones del fabricante y fueron luego teñidas para IFN γ (APC-IFN γ , BD Biosciences, clon XMG1.2). Las células teñidas fueron identificadas utilizando un citómetro de flujo FACS Calibur (BD Biosciences) y el software FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, Oregón, EE.UU.). Los datos se expresan como el porcentaje medio de esplenocitos CD8+IFN γ + en 4-6 ratones por grupo [+/- el error estándar de la media (SEM; del inglés, standard error of the mean)] para cada vacuna. La significación estadística se determinó utilizando un análisis ANOVA de un factor con una corrección de Bonferroni (software Prism 4.0, GraphPad Software Inc., San
- 30 Diego, California, EE.UU.).

Resultados

Los resultados muestran claramente que, para la generación de células T CD8+ específicas de N de VSV, alternar los serotipos de VSV para la segunda dosis es mejor que proporcionar tres dosis de un solo serotipo de VSV. A la vista de los resultados presentados en esta memoria, una estrategia para inducir células T CD8+ específicas de N de VSV es una primera dosis de VSV_{Ind}-M mutante seguida de una dosis de VSV_{NJ}-M mutante y finalmente una dosis de VSV_{Ind}-M mutante (Figura 8A).

- 35 Los resultados muestran claramente que, para la generación de células T CD8+ específicas de N de VSV, alternar los serotipos de VSV para la segunda dosis es mejor que proporcionar tres dosis de un solo serotipo de VSV. A la vista de los resultados presentados en esta memoria, una estrategia para inducir células T CD8+ específicas de N de VSV es una primera dosis de VSV_{Ind}-M mutante seguida de una dosis de VSV_{NJ}-M mutante y finalmente una dosis de VSV_{Ind}-M mutante (Figura 8A).

Ejemplo 4 – Estudios de inmunización con VSV recombinante que expresa proteínas de HCV

Antecedentes

- 40 El virus de la hepatitis C (HCV) es el agente causativo de la hepatitis C en los seres humanos. Se estima que el número de casos de hepatitis C en el mundo es alrededor de 170 millones. Aproximadamente el 3% de la población mundial está crónicamente infectada por el virus. Se estima que aproximadamente 3 millones de personas están crónicamente infectadas por HCV en los Estados Unidos, produciéndose la mayoría de las infecciones en personas de 30 a 50 años de edad.
- 45 La infección por HCV puede ser sumamente grave. La infección inicial puede no causar enfermedad o puede dar lugar a una hepatitis acompañada de ictericia; la insuficiencia hepática fulminante es rara. Sin embargo, la mayoría de las infecciones por HCV se vuelven crónicas. Esta infección crónica, aunque tolerada por algunos, conduce a enfermedad hepática, cirrosis y carcinoma hepatocelular. Estos pacientes crónicamente infectados son la fuente de casi todas las nuevas infecciones.
- 50 Aunque el genoma del HCV ha sido aislado y secuenciado hace más de un decenio, no se ha desarrollado una vacuna eficaz para evitar la infección por HCV ni para tratar la infección por HCV aguda o crónica.

La vacuna o estrategia de vacunación ideal contra el HCV será una que induzca respuestas inmunes tanto humorales como celulares. En consecuencia, la nueva estrategia de inmunización con VSV recombinante desarrollada por el Solicitante, en la que se utilizan dos serotipos de VSV diferentes, proporciona una plataforma

55 para obtener un sistema de vacunas contra el HCV.

Generación de VSV recombinante que expresa proteínas de HCV

Con referencia a las Figuras 9 a 20, se clonaron primero los genes core, NS3, NS5A y NS5B de HCV en el vector pBluescript II KS (Stratagene) con objeto de introducir secuencias de juntas intergénicas de VSV, que están implicadas en la terminación transcripcional en el gen cadena arriba y la reiniciación transcripcional en el gen cadena abajo de VSV. Se clonaron en el vector pBluescript II KS el gen core de longitud completa y cuatro genes core de HCV con deleciones en las regiones implicadas en la localización nuclear y el anclaje a la membrana del ER. Se clonó el gen NS3 de longitud completa en el vector pBluescript II sin modificaciones. Se clonaron en el vector pBluescript II KS los NS5A y NS5B completos, y el NS5A y el NS5B con deleciones en la región de anclaje a la membrana del ER. Después de la confirmación de las secuencias correctas en cada clon, los genes de HCV con secuencias de juntas intergénicas de VSV, salvo el NS5B completo, fueron cortados con la enzima de restricción Kpn I y fueron clonados en pVSV_{NJ}-M(WT) y pVSV_{NJ}-M(M48R-M51R) entre el gen G y el gen L. Los cortes por Pac I de los genes de HCV con secuencias de juntas intergénicas de VSV fueron clonados en el sitio Pac I entre los genes G y L del pVSV_{Ind}-M(WT) y el pVSV_{Ind}-M(M51R). El NS5B completo fue cortado del vector pBluescript II con Spe I, dejado con extremos romos mediante el fragmento Klenow y ligado a pVSV_{NJ}, que fue cortado con Kpn I y dejado con extremos romos mediante el fragmento Klenow. La inserción de NS5B en pVSV_{NJ} fue confirmada por digestión del plásmido con Pac I, sitio que fue introducido en ambos extremos del clon de NS5B. Los genes core de HCV fueron parcialmente digeridos con Kpn I a causa de la presencia de un sitio Kpn I adicional en el gen core. Los mismos clones en el vector pBluescript II fueron cortados con la enzima de restricción Pac I con objeto de clonar los genes core, NS3, NS5A y NS5B de HCV en pVSV_{Ind}-M(WT) y pVSV_{Ind}-M(M51R). Las inserciones de los genes de HCV en los pVSVs fueron confirmadas por digestión de los plásmidos con Kpn I o Pac I y por secuenciación de DNA.

Los VSV_{Ind} y VSV_{NJ} recombinantes que expresan core (Figuras 11, 12 y 13), NS3 (Figura 15), NS5A (Figuras 17 y 18) y NS5B (Figuras 19 y 20) de HCV fueron recuperados de clones de cDNA mediante genética inversa para VSV. Los virus recombinantes fueron purificados mediante tres recolecciones consecutivas de placas y fueron multiplicados infectando células BHK con una multiplicidad de infección (MOI) de 0,1. La expresión de proteínas de HCV de los virus fue determinada mediante un análisis por transferencia Western usando lisados de células infectadas con virus, y antisueros contra cada proteína de HCV. El análisis por transferencia Western de los mismos lisados celulares usando antisueros contra VSV_{Ind} y VSV_{NJ} permitió determinar el serotipo y el fenotipo del gen M del vector VSV que expresa cada proteína de HCV. Las proteínas M mutadas de VSV_{Ind}(M_{M51R}) y VSV_{NJ}(M_{M48R-M51R}) migran algo más rápidamente que las proteínas M de tipo silvestre en el gel de la SDS-PAGE.

Resultados

Con referencia a la Figura 8B, se observó una enérgica reactivación de células T CD8+ después de la estimulación *ex vivo* con péptidos del MHC de clase I de HCV en una población de ratones (n = 2) vacunados con VSV_{Ind}-M_{M51R} + HCV-CoreΔER y luego con VSV_{NJ}-M_{M48/51R} + HCV-CoreΔER, vacunación que fue seguida 3 semanas más tarde por una dosis adicional de VSV_{Ind}-M_{M51R} + HCV-CoreΔER. Se mostró que esta reactivación era específica para péptidos de HCV ya que un ratón testigo inmunizado con el vector VSV solo no presentaba células T CD8+ específicas para péptidos de HCV (conjunto de barras a la izquierda del gráfico). La reactivación de células T CD8+ específicas para 2 epitopos de la nucleocápsida de VSV fue utilizada como testigo positivo en todos los ratones.

Tabla 1: Vacunaciones para encontrar las mejores combinaciones de inoculaciones víricas para inducir las respuestas inmunes más potentes en ratones

Nº de Id. del Grupo	Dosis 1 (1x10 ⁶ pfu/ratón, IM)	Dosis 2 (4 sem después de la Dosis 1, 1x10 ⁶ pfu/ratón, IM)	Dosis 3 (10 sem después de la Dosis 2, 5x10 ⁶ pfu/ratón, IM)	Nº de animales
1-0	PBS	PBS	PBS	6
1-1	rVSVNJ-M(WT)	rVSVNJ-M(WT)	rVSVNJ-M(WT)	6
1-2	rVSVNJ-M(M48R-M51R)	rVSVNJ-M(M48R-M51R)	rVSVNJ-M(M48R-M51R)	6
1-3	rVSVInd-M(WT)	rVSVInd-M(WT)	rVSVInd-M(WT)	6
1-4	rVSVInd-M(M51R)	rVSVInd-M(M51R)	rVSVInd-M(M51R)	6
1-5	rVSVNJ-M(WT)	rVSVInd-M(WT)	rVSVNJ-M(WT)	6

ES 2 533 345 T3

Nº de Id. del Grupo	Dosis 1 (1×10^6 pfu/ratón, IM)	Dosis 2 (4 sem después de la Dosis 1, 1×10^6 pfu/ratón, IM)	Dosis 3 (10 sem después de la Dosis 2, 5×10^6 pfu/ratón, IM)	Nº de animales
1-6	rVSVNJ-M(M48R-M51R)	rVSVInd-M(M51R)	rVSVNJ-M(M48R-M51R)	2+6
1-7	rVSVInd-M(WT)	rVSVNJ-M(WT)	rVSVInd-M(WT)	6
1-8	rVSVInd-M(M51R)	rVSVNJ-M(M48R-M51R)	rVSVInd-M(M51R)	6
1-9	rVSVNJ-M(WT)	rVSVNJ-M(WT)/Ind G	rVSVNJ-M(WT)	6
1-10	rVSVNJ-M(M48R-M51R)	rVSVNJ-M(M48R-M51R)/Ind G	rVSVNJ-M(M48R-M51R)	6
1-11	rVSVInd-M(WT)	rVSVInd-M(WT)/NJ G	rVSVInd-M(WT)	6
1-12	rVSVInd-M(M51R)	rVSVInd-M(M51R)/NJ G	rVSVInd-M(M51R)	6

IM: intramuscularmente; pfu: unidades formadoras de placa; sem: semanas.

REIVINDICACIONES

1. Una plataforma de inmunización para uso en una estrategia de inmunización por estimulación primaria y refuerzo, en donde dicha plataforma de inmunización comprende:
- 5 a. una vacuna o composición inmunogénica que comprende un serotipo Indiana (rVSV_{Ind}) de virus recombinante de la estomatitis vesicular (rVSV) de longitud completa, y
- b. otra vacuna o composición inmunogénica que comprende un serotipo New Jersey (rVSV_{NJ}) de rVSV de longitud completa,
- 10 en donde el rVSV_{Ind} expresa una proteína M del serotipo Indiana que tiene una metionina de la posición 51 cambiada por una arginina (sustitución M51R), y el rVSV_{NJ} incluye un gen M mutante que expresa una proteína M del serotipo New Jersey que tiene una metionina de la posición 48 cambiada por una arginina, y una metionina de la posición 51 cambiada por una arginina (sustitución M48R-M51R).
2. La plataforma de inmunización para uso según la Reivindicación 1, en donde los dos serotipos de rVSV expresan una o más proteínas de interés.
3. La plataforma de inmunización para uso según la Reivindicación 1, en donde los dos serotipos de rVSV expresan una o más proteínas del virus de la hepatitis C (HCV).
- 15 4. La plataforma de inmunización para uso según la Reivindicación 1, en donde la vacuna que comprende el serotipo Indiana de rVSV se usa como una vacuna de estimulación primaria y la vacuna que comprende el serotipo New Jersey de rVSV se utiliza como una vacuna de refuerzo, o viceversa.
5. La plataforma de inmunización para uso según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 4, en donde las vacunas o composiciones inmunogénicas incluyen además un diluyente adecuado, un agente adyuvante, un vehículo farmacéuticamente aceptable o una combinación de los mismos.
- 20 6. La plataforma de inmunización para uso según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 5, en donde dicha plataforma de inmunización es para uso en la prevención o el tratamiento de una infección causada por un agente patógeno.
7. La plataforma de inmunización para uso según la Reivindicación 6, en donde el agente patógeno es seleccionado de entre el virus de la hepatitis C humana, el virus de la inmunodeficiencia humana, el virus del Nilo Occidental, hantavirus, influenza virus, el virus Ébola, el virus de la fiebre hemorrágica por dengue, el virus de la encefalitis japonesa, y el coronavirus del SARS.
- 25 8. La plataforma de inmunización para uso según la Reivindicación 3, en donde dicha plataforma de inmunización es para prevenir o tratar la hepatitis C.
- 30 9. Un kit que comprende: (a) al menos una dosis de una cantidad eficaz de una vacuna que comprende un virus recombinante de la estomatitis vesicular (rVSV) de longitud completa de un serotipo, y (b) al menos una dosis de una cantidad eficaz de una vacuna que comprende un rVSV de longitud completa de otro serotipo,
- 35 en donde un serotipo es Indiana (rVSV_{Ind}) y el otro serotipo es New Jersey (rVSV_{NJ}), y en donde el rVSV_{Ind} expresa una proteína M del serotipo Indiana que tiene una metionina de la posición 51 cambiada por una arginina (sustitución M51R), y el rVSV_{NJ} incluye un gen M mutante que expresa una proteína M del serotipo New Jersey que tiene una metionina de la posición 48 cambiada por una arginina, y una metionina de la posición 51 cambiada por una arginina (sustitución M48R-M51R).

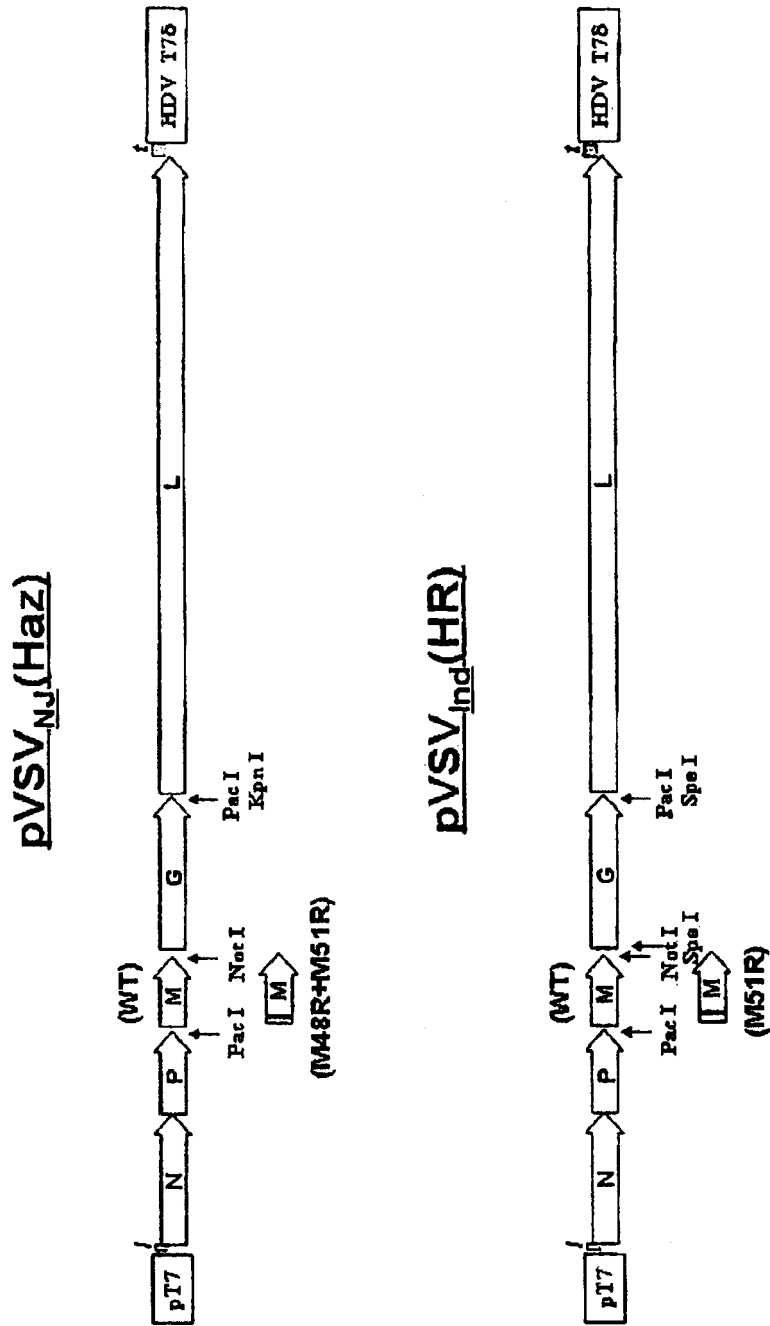


Figura 1

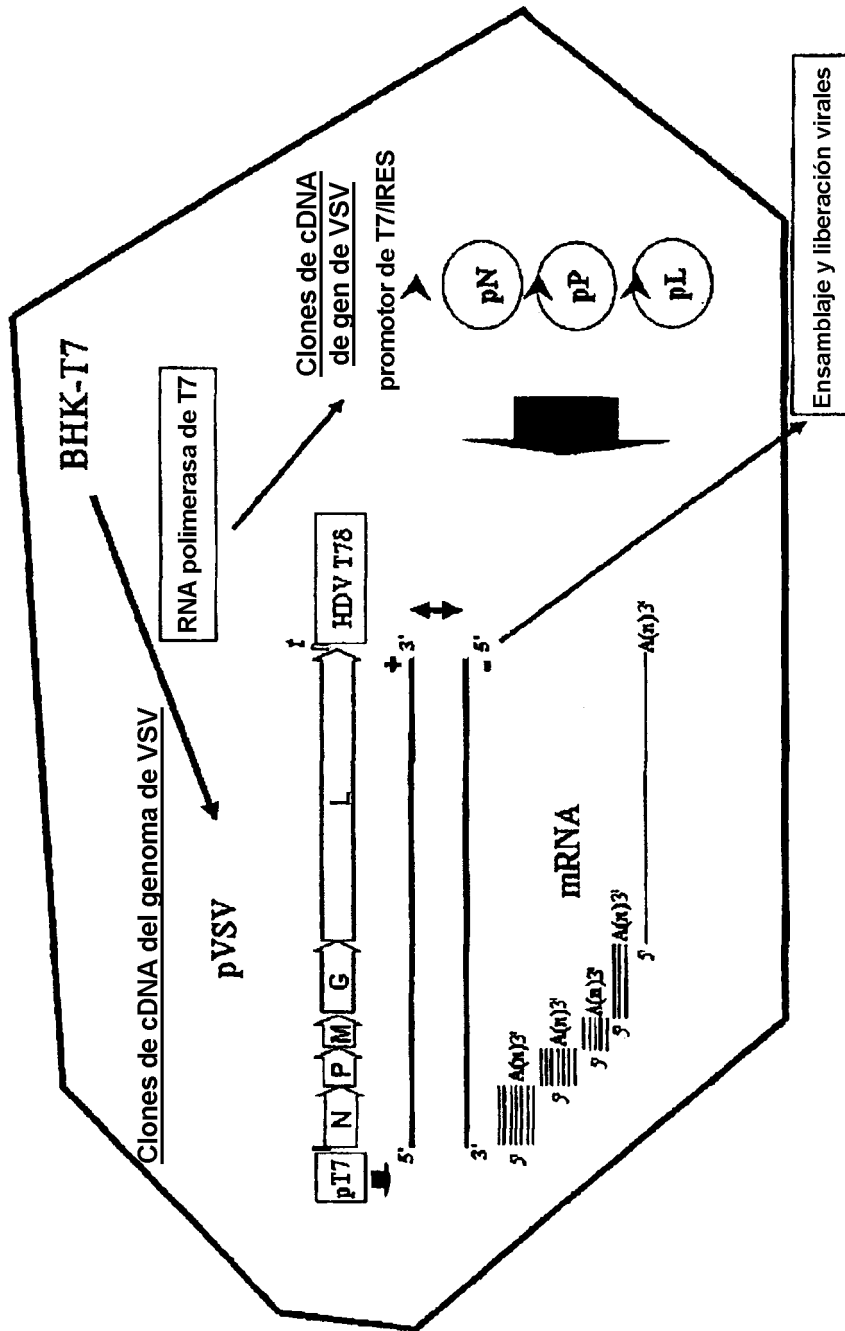


Figura 2

Cinética de crecimiento de genes W/O de rVSV de interés

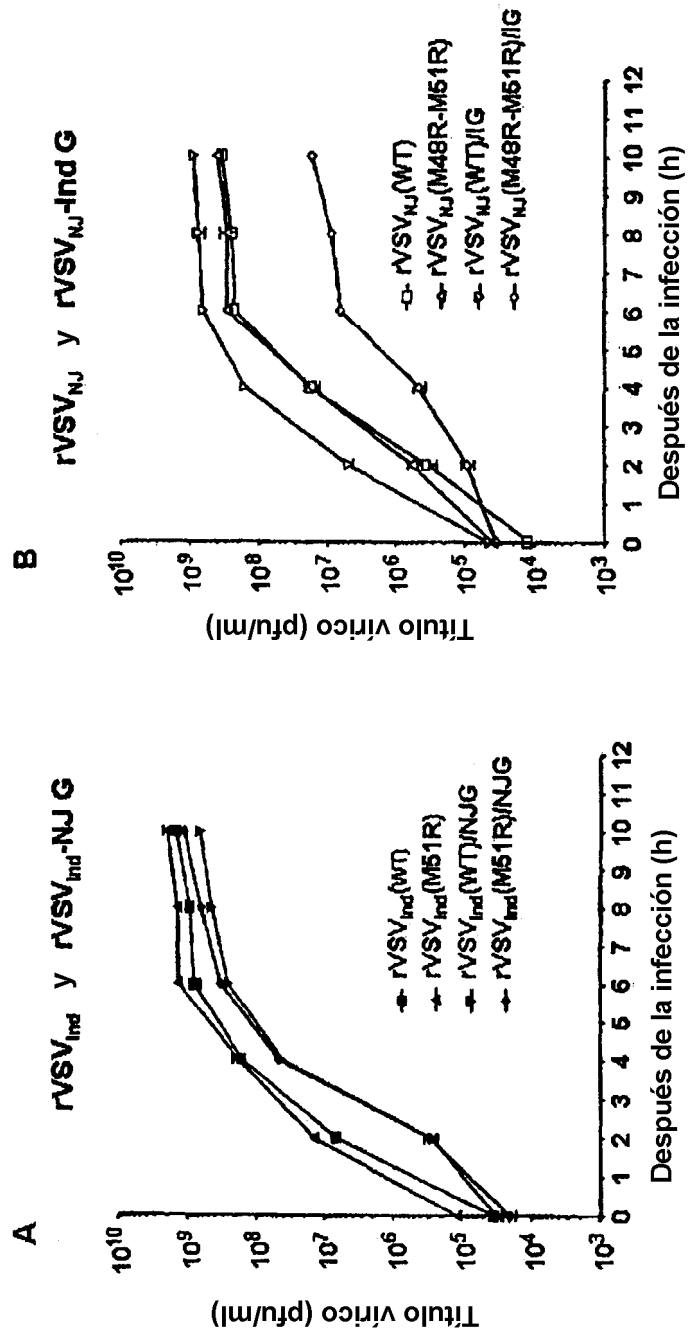


Figura 3

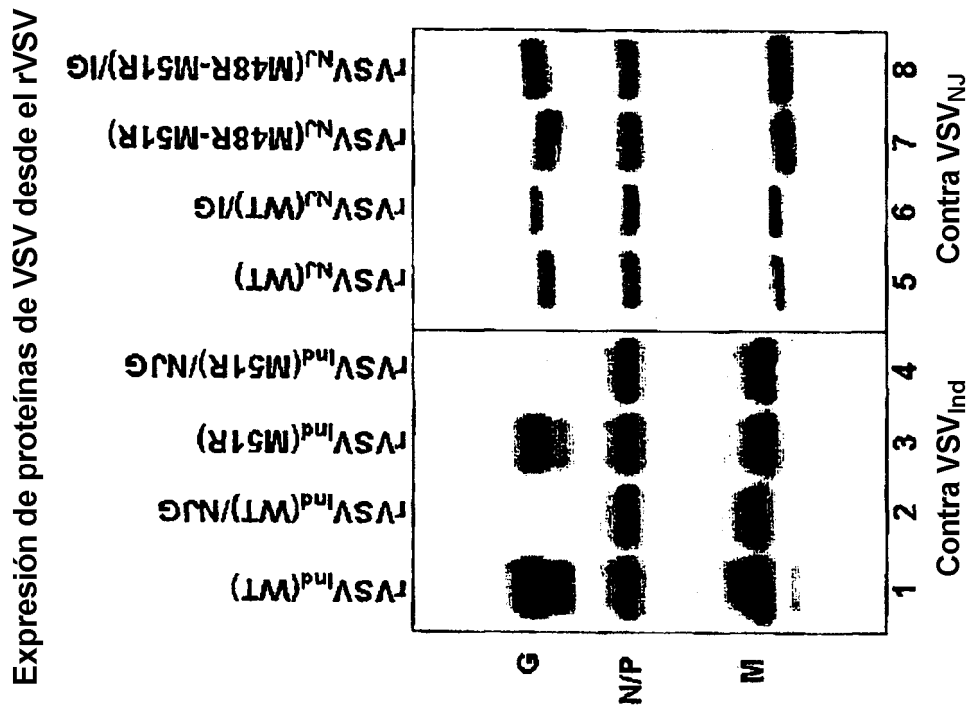


Figura 4

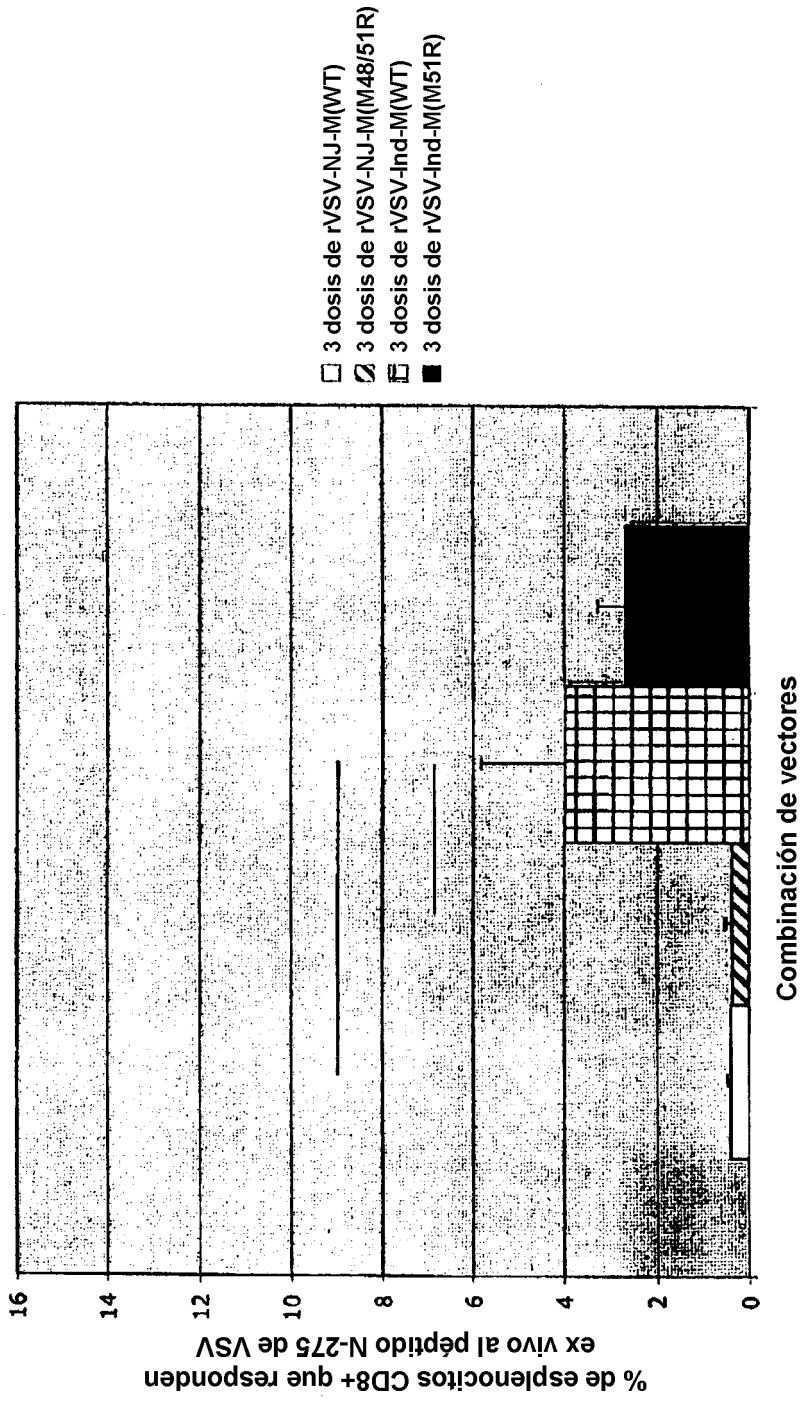


Figura 5

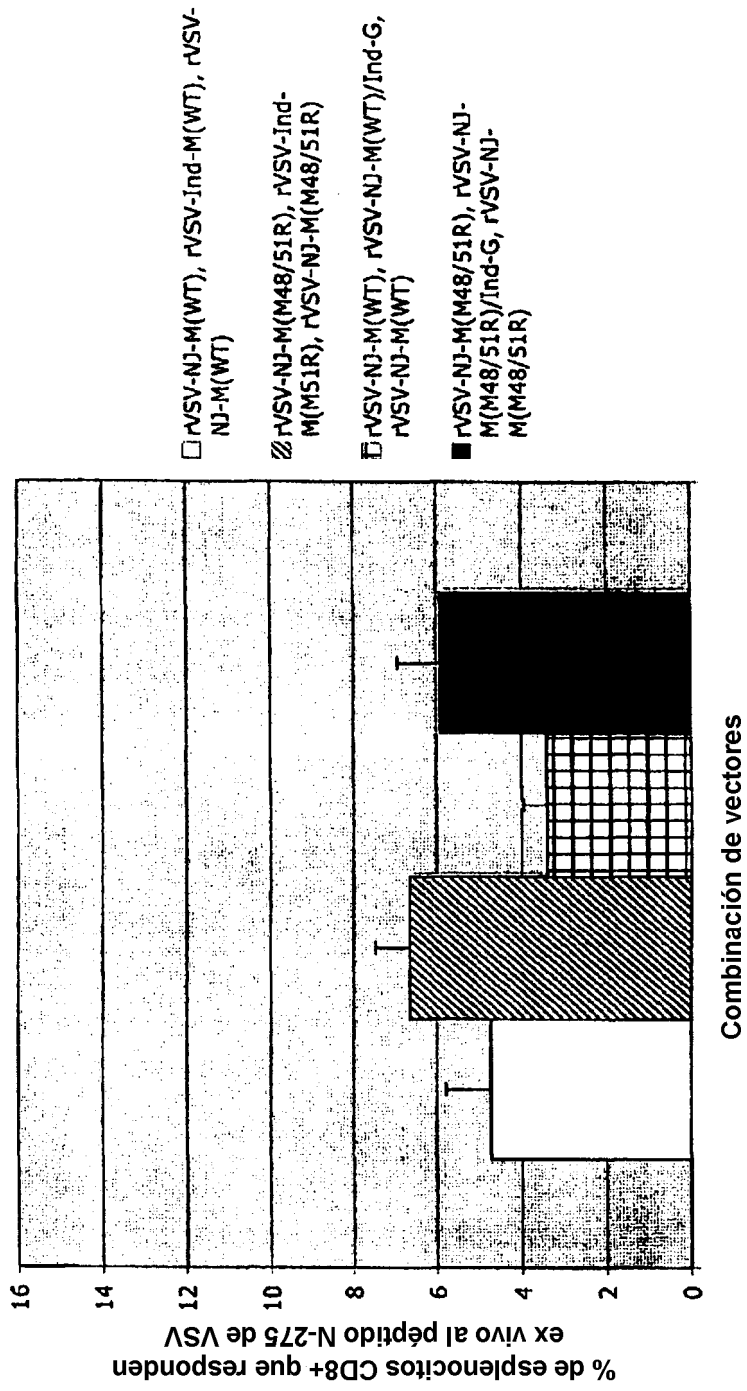


Figura 6

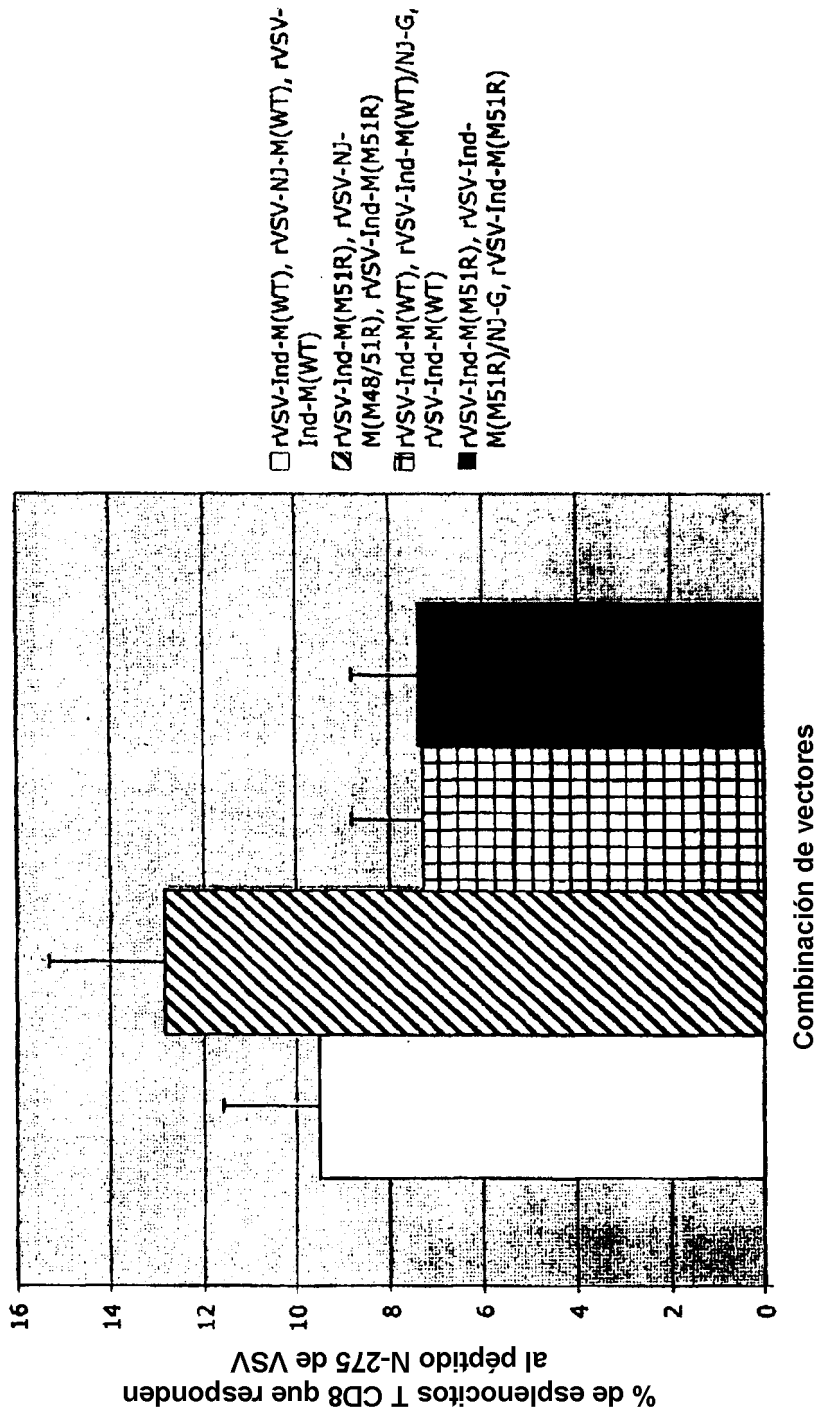


Figura 7

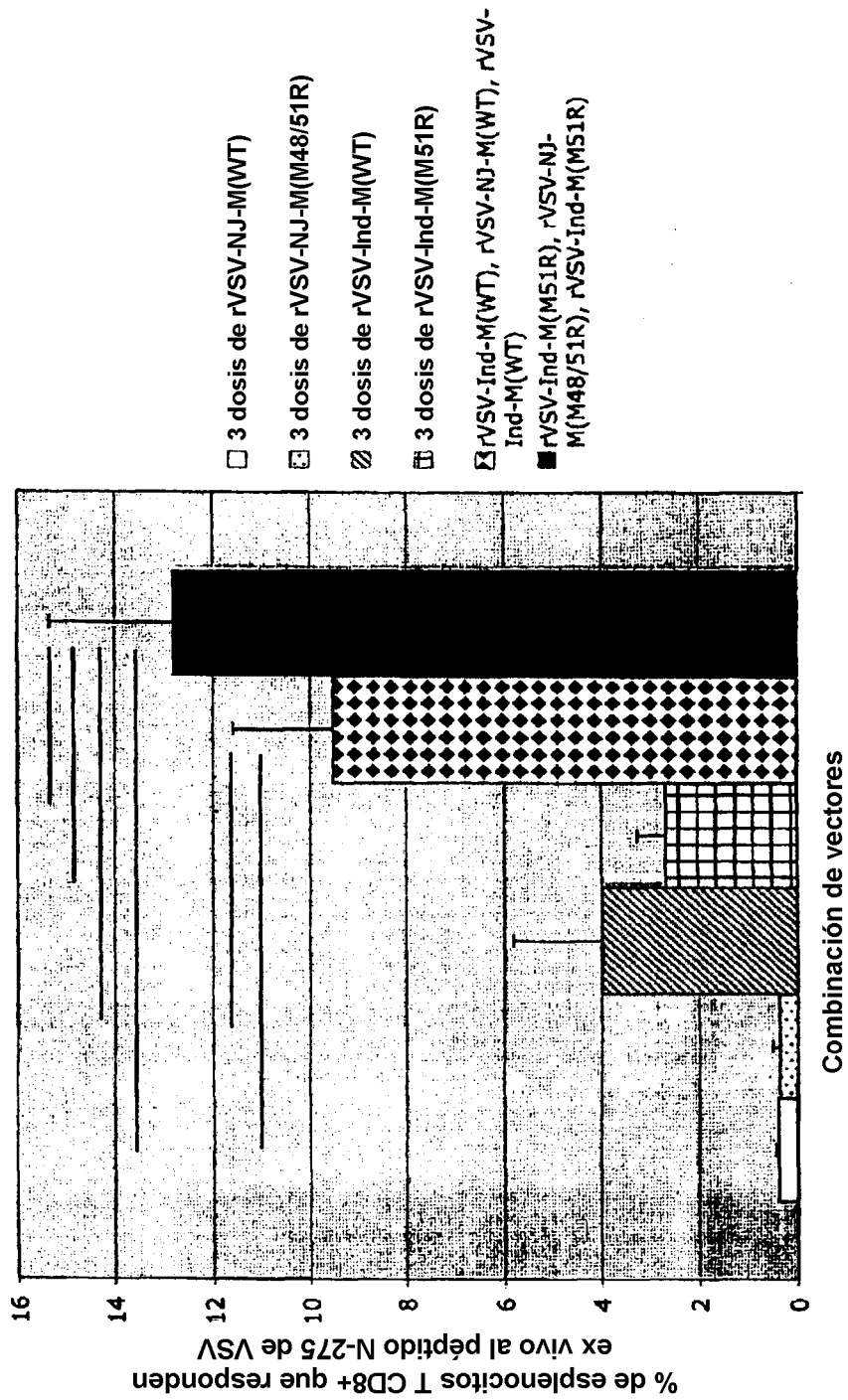


Figura 8A

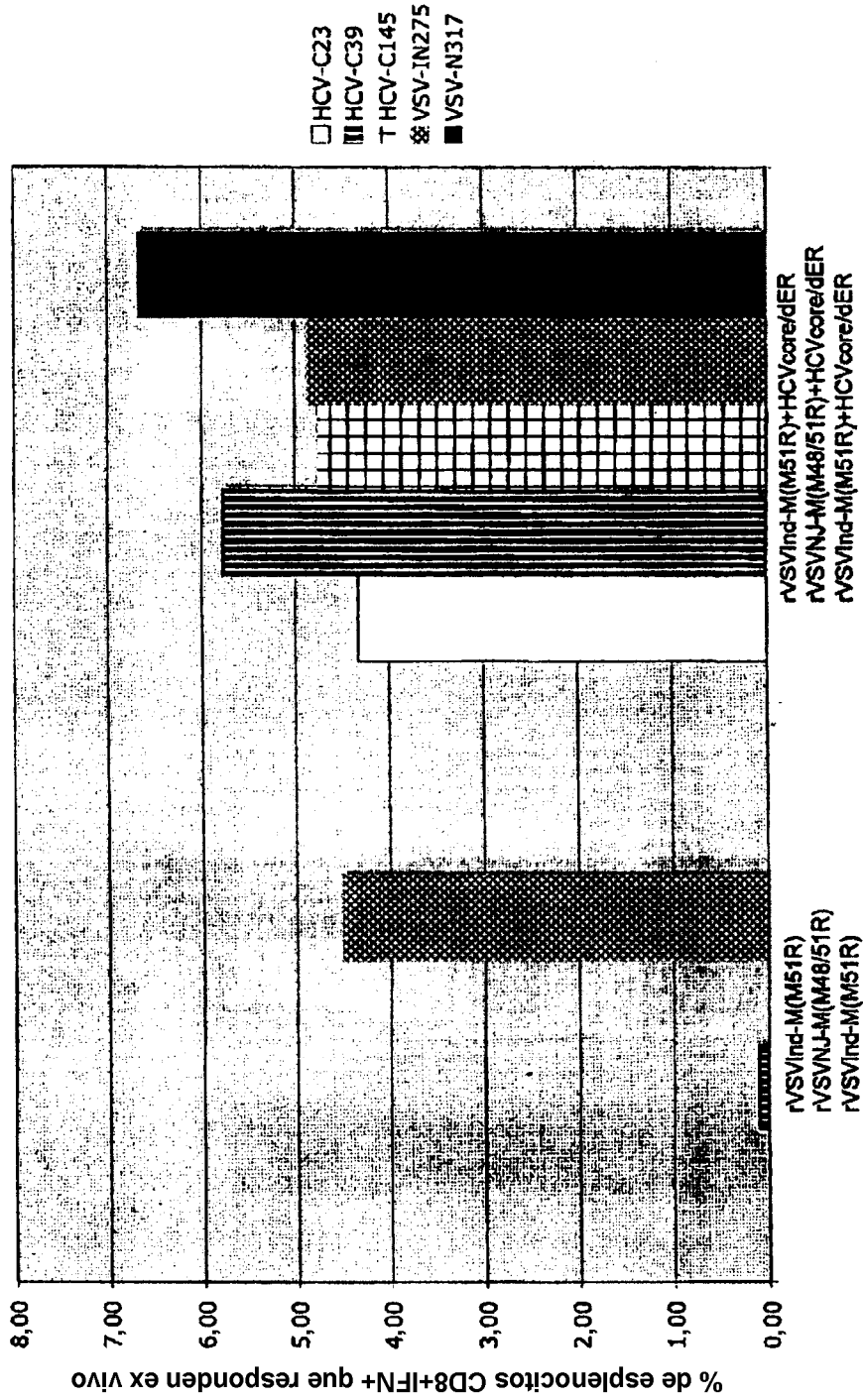


Figura 8B

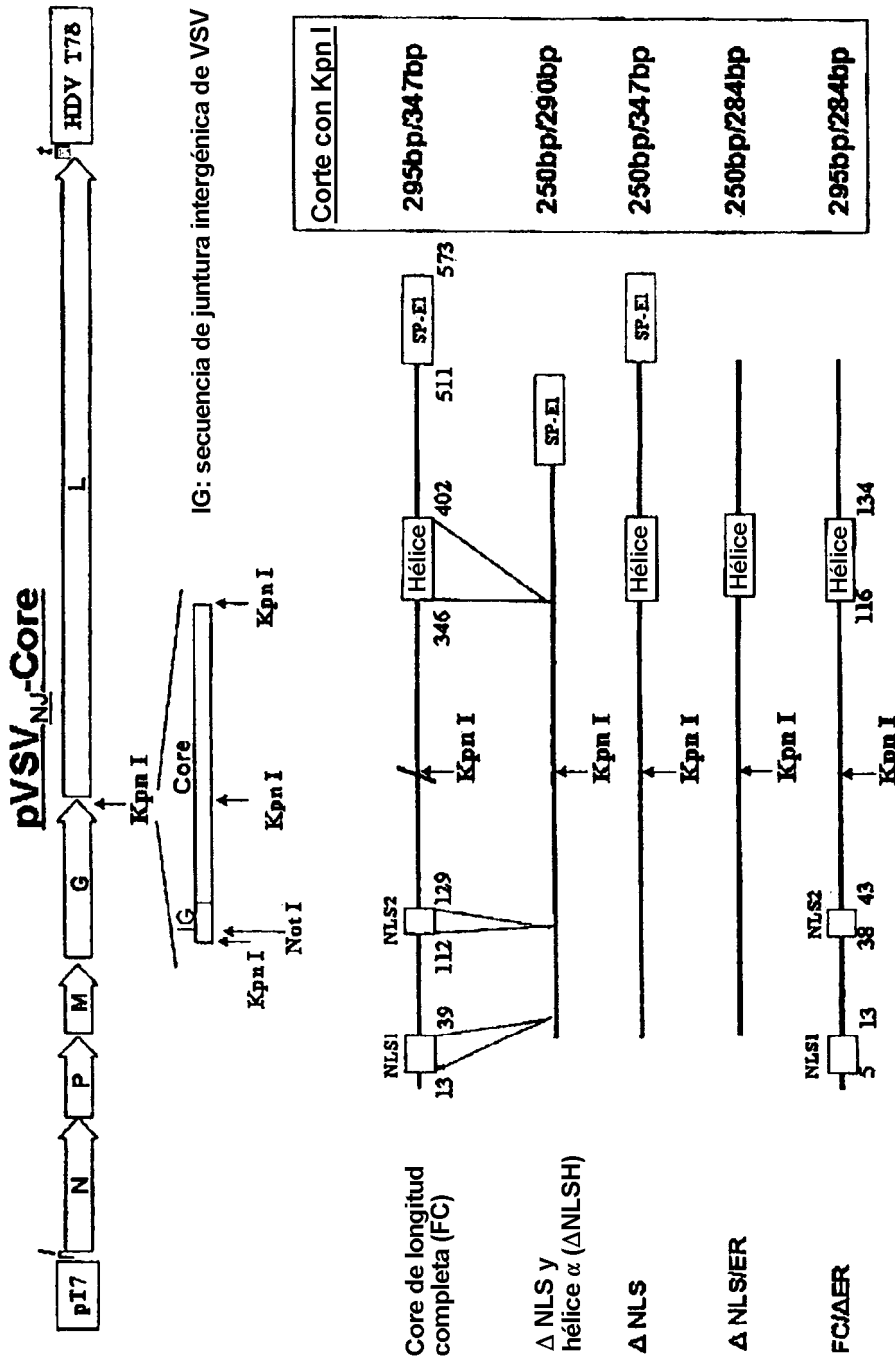


Figura 9

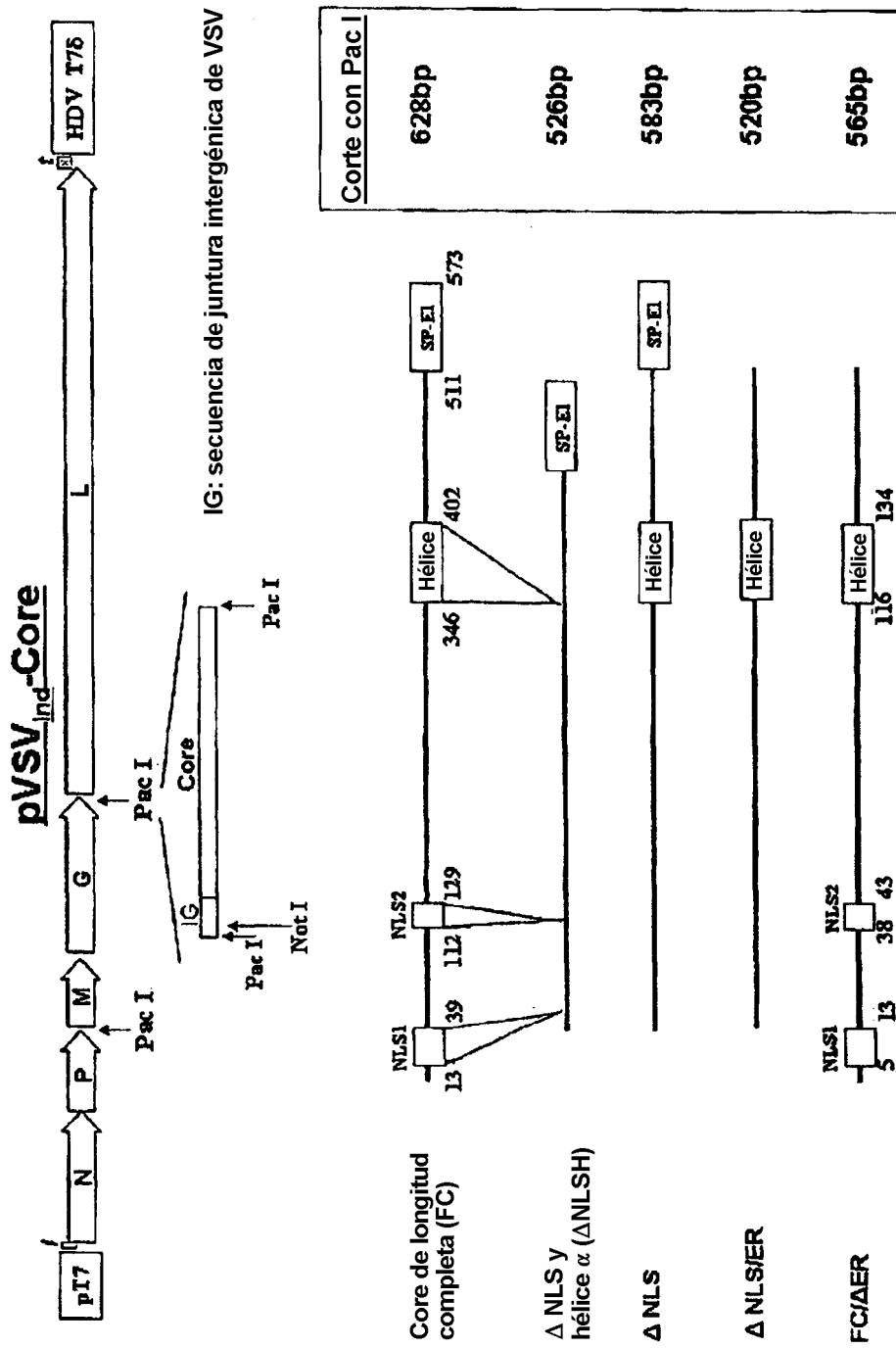


Figura 10

rVSV_{NJ}-Core de HCV

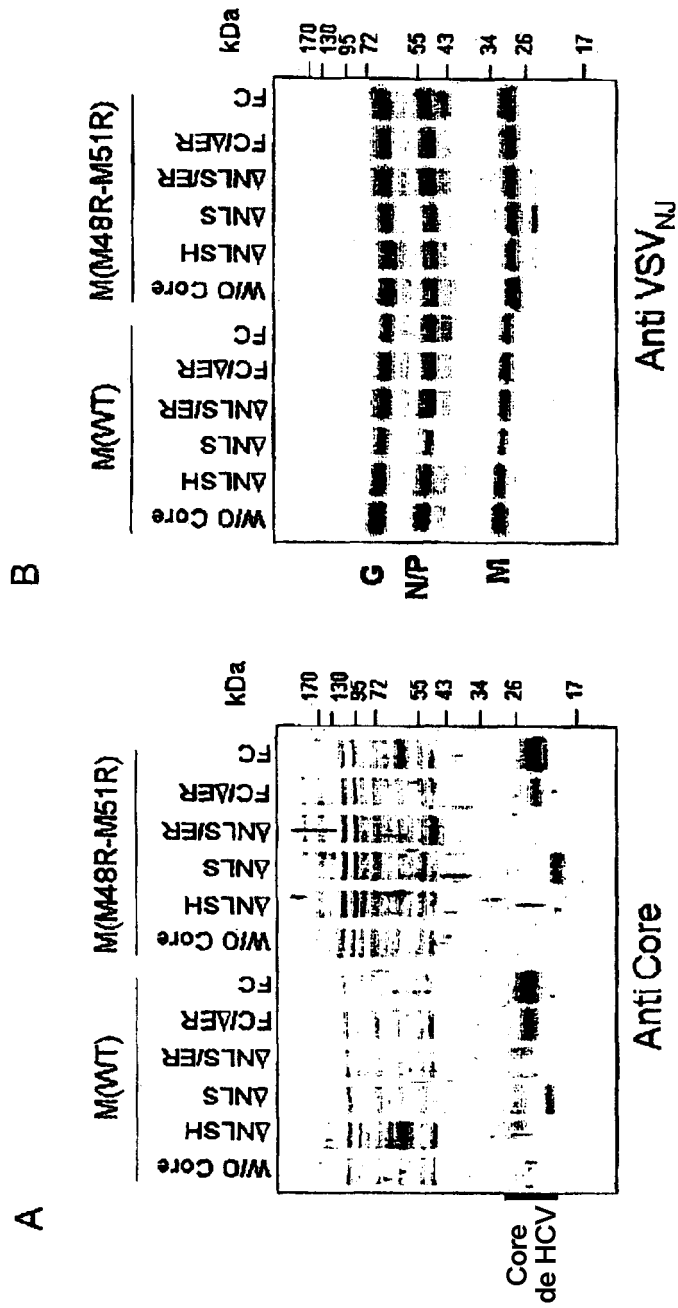


Figura 11

rVSV_{Ind}-Core de HCV

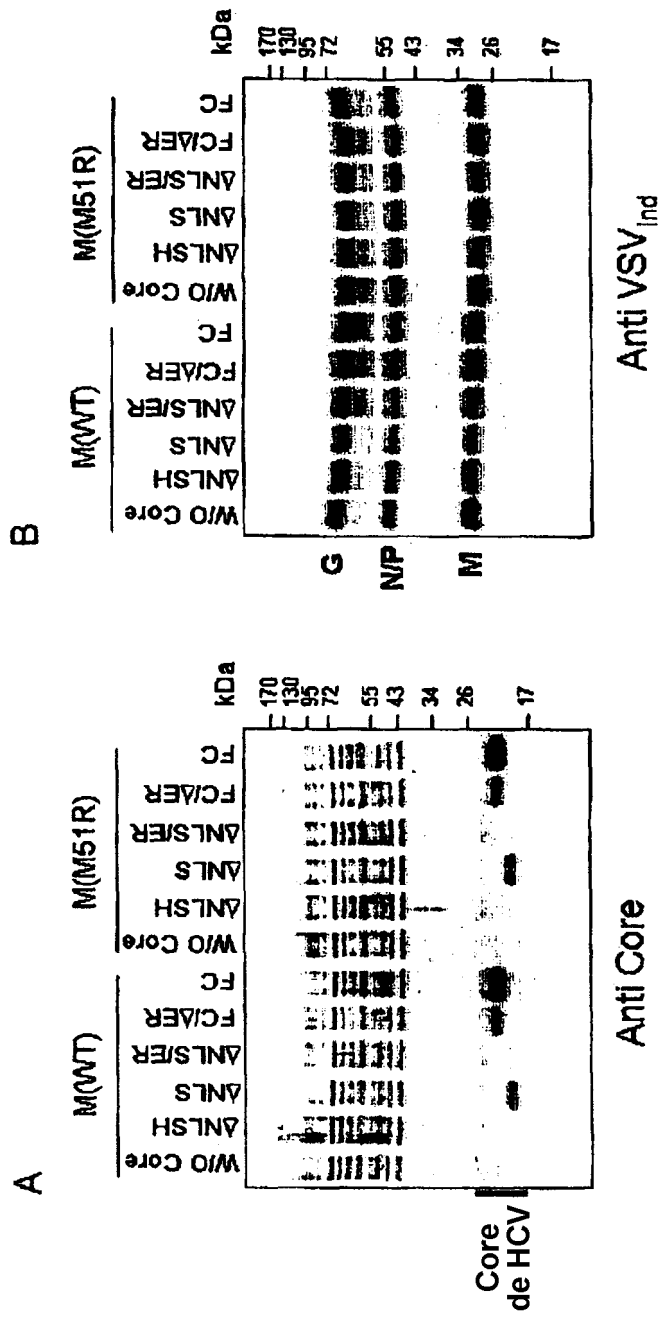


Figura 12

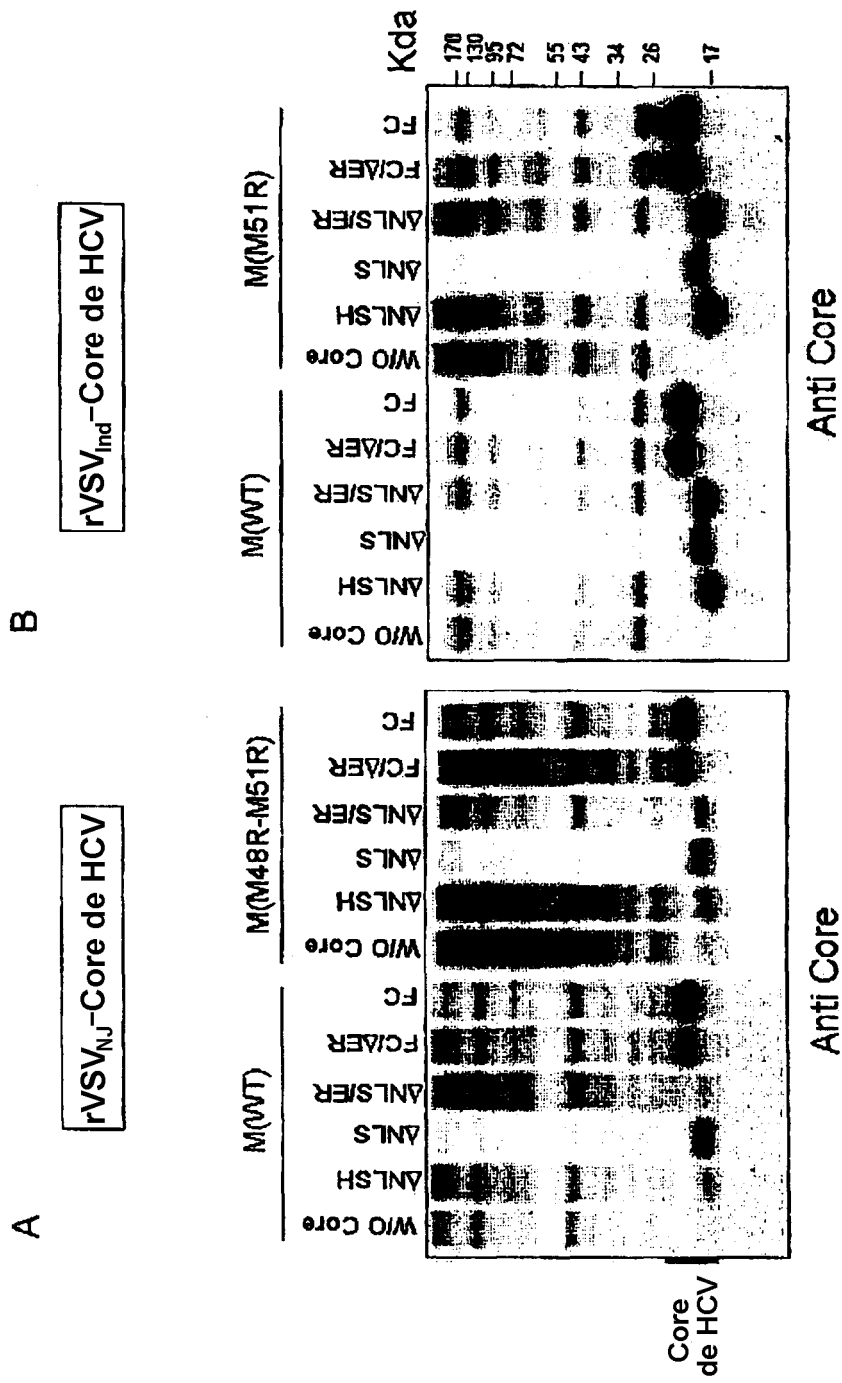


Figura 13

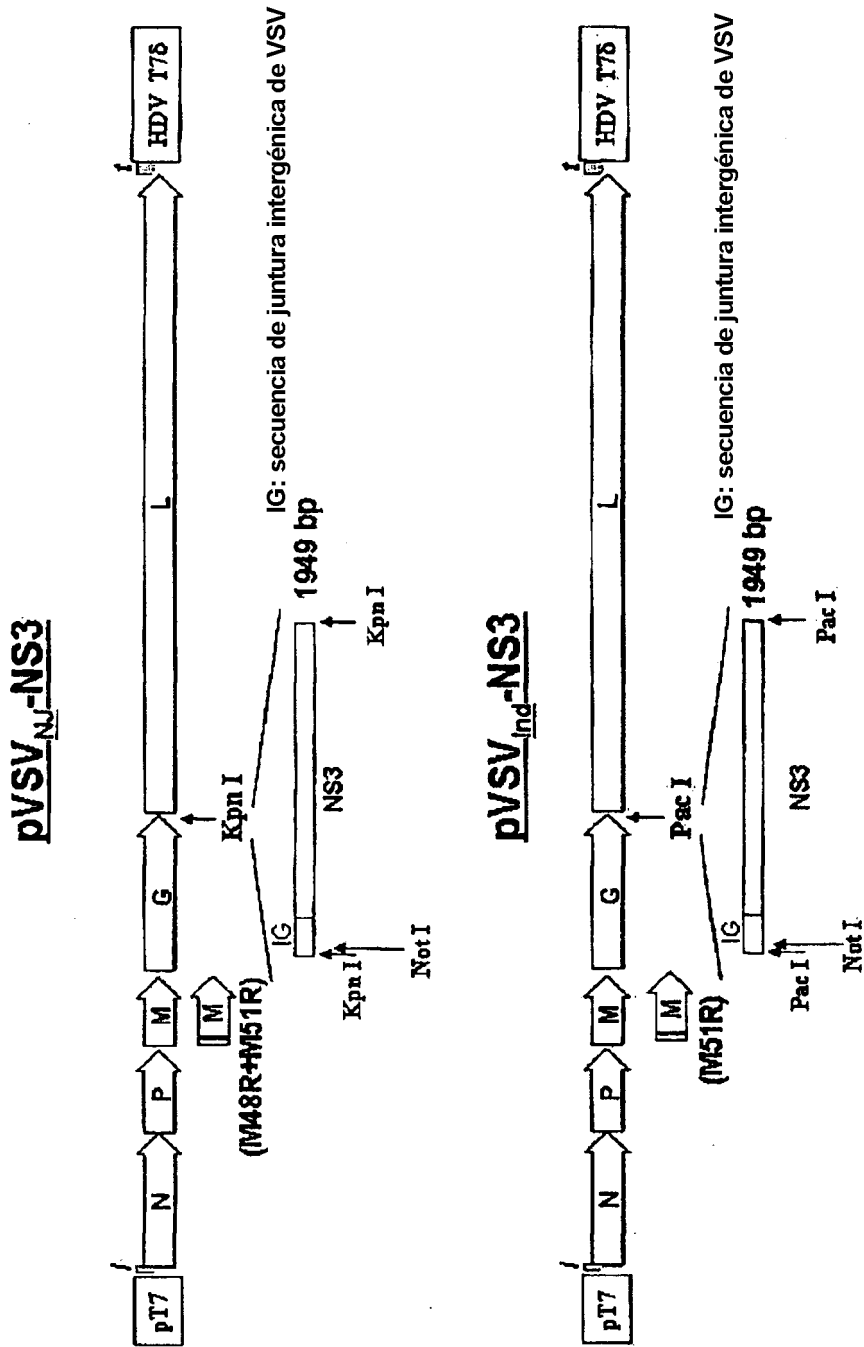


Figura 14

rVSV_{NJ}-NS3 y rVSV_{Ind}-NS3

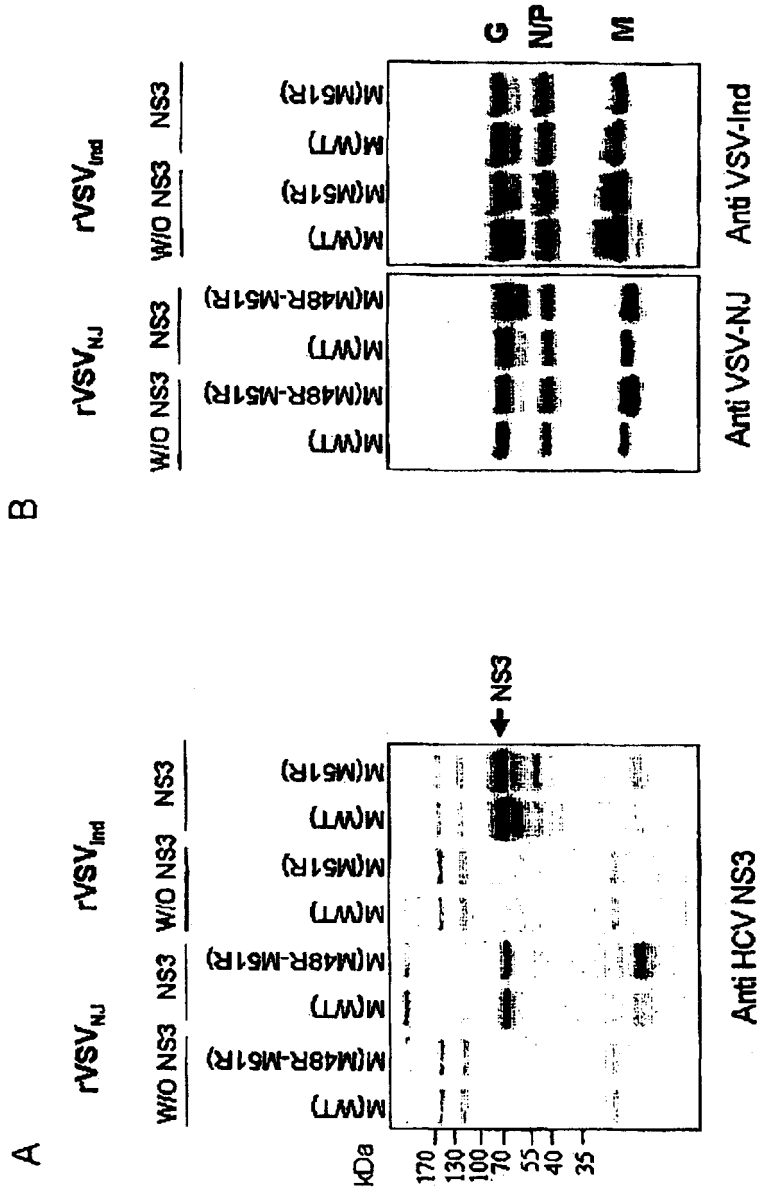


Figura 15

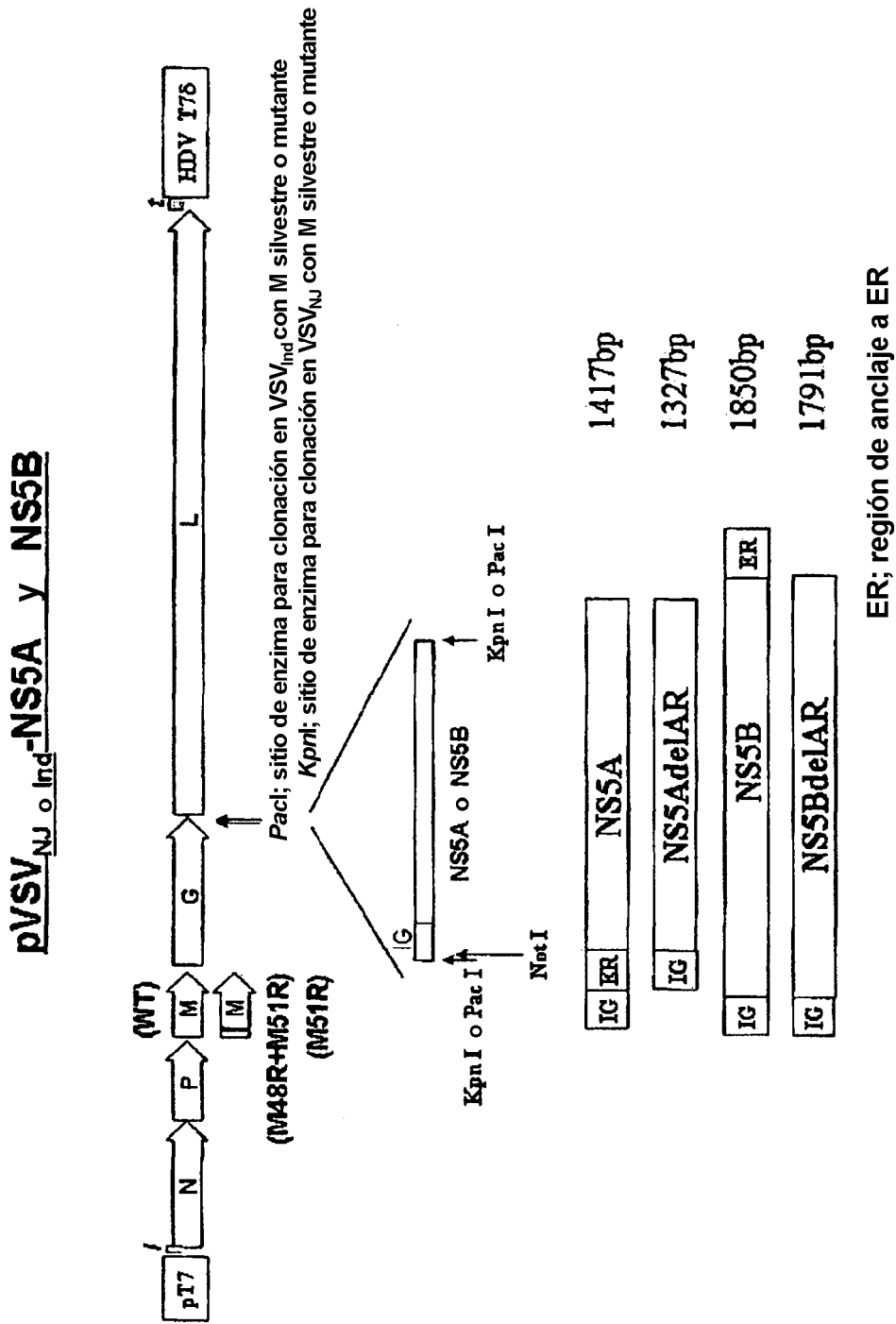


Figura 16

rVSV_{NT}-NS5A

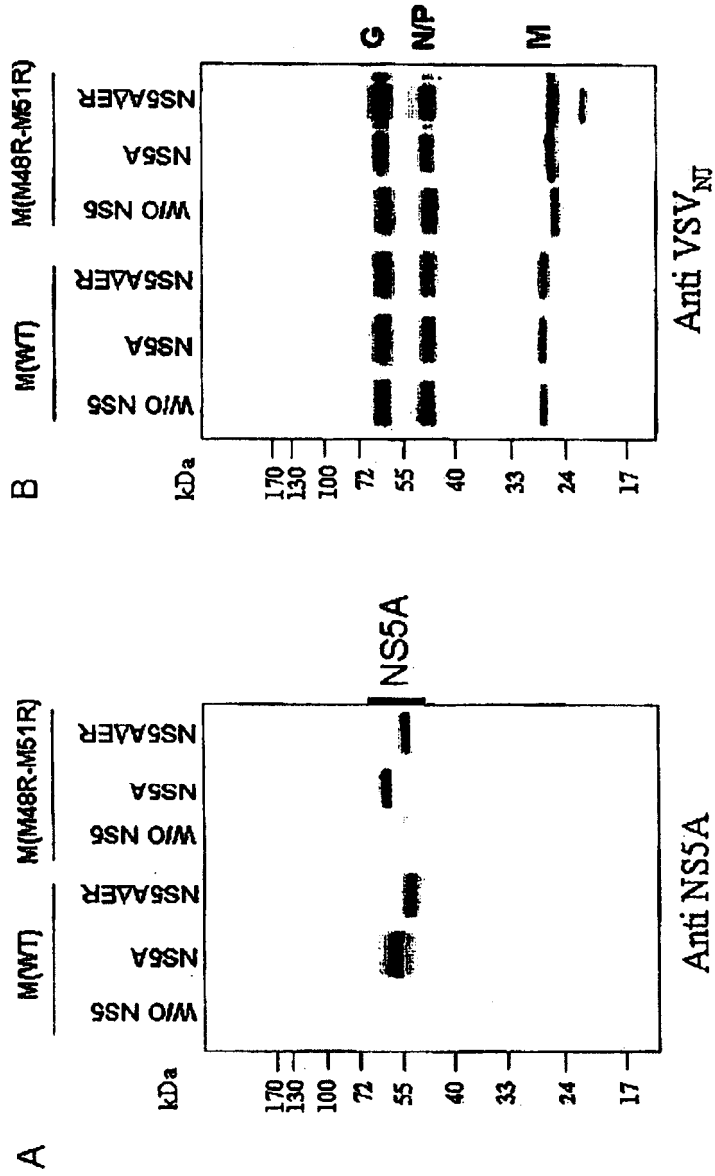


Figura 17

rVSV_{Ind}-NS5A

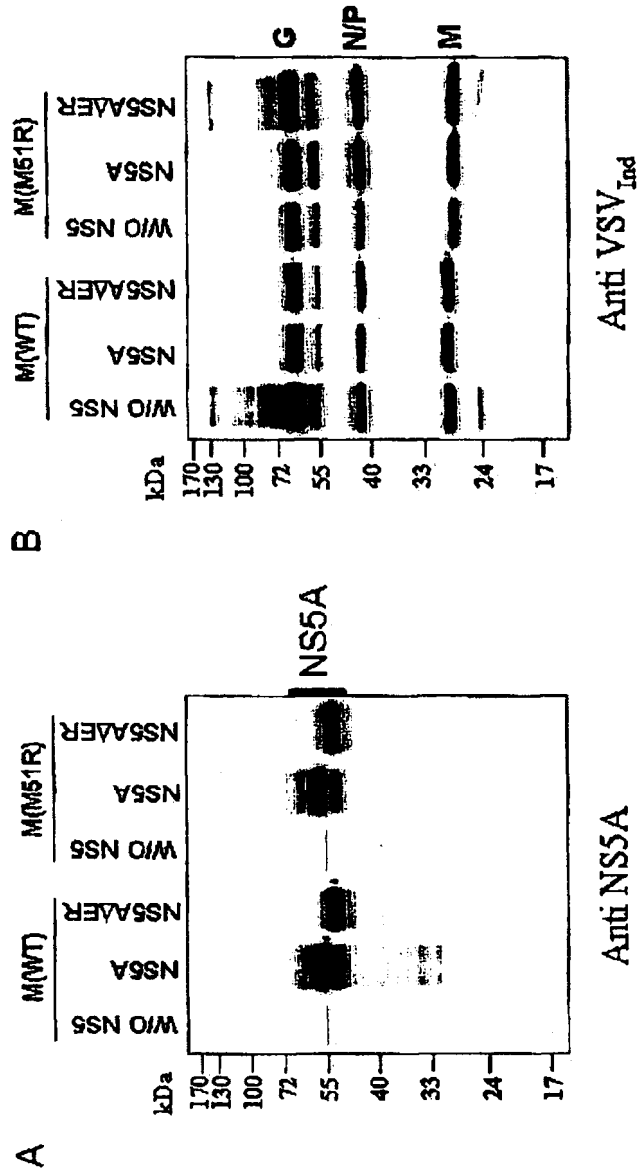


Figura 18

rVSV_{NP}-NS5B

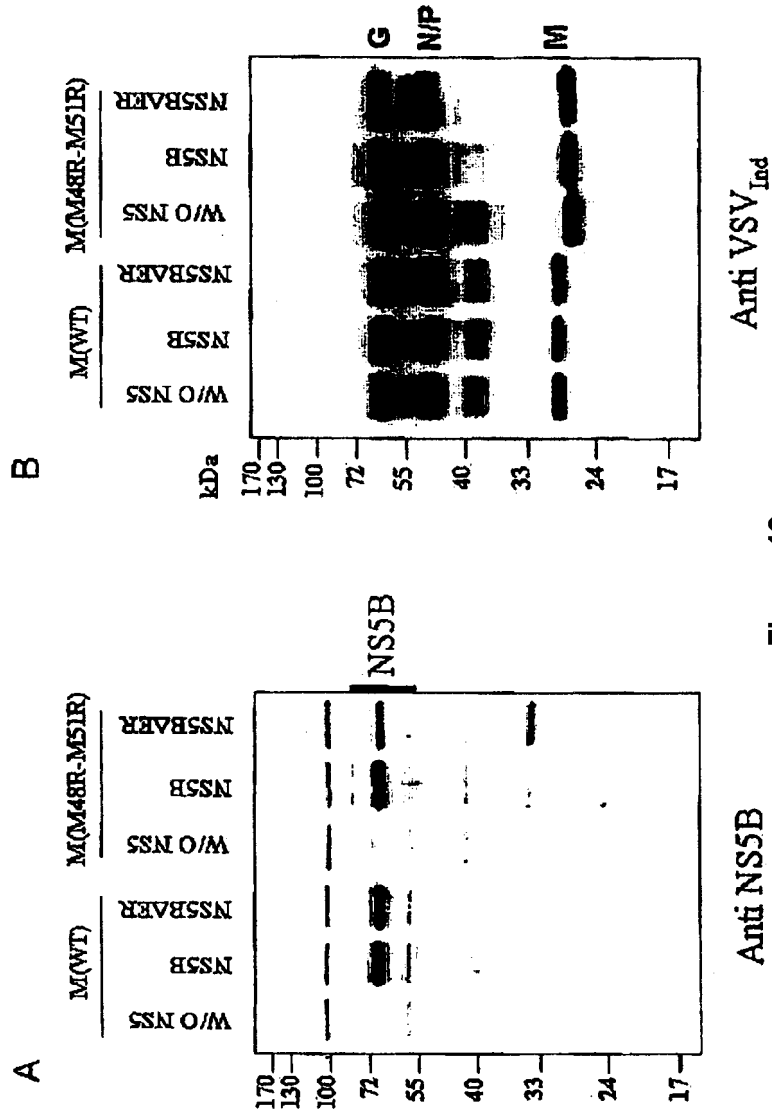


Figura 19

rVSV_{Ind}-NS5B

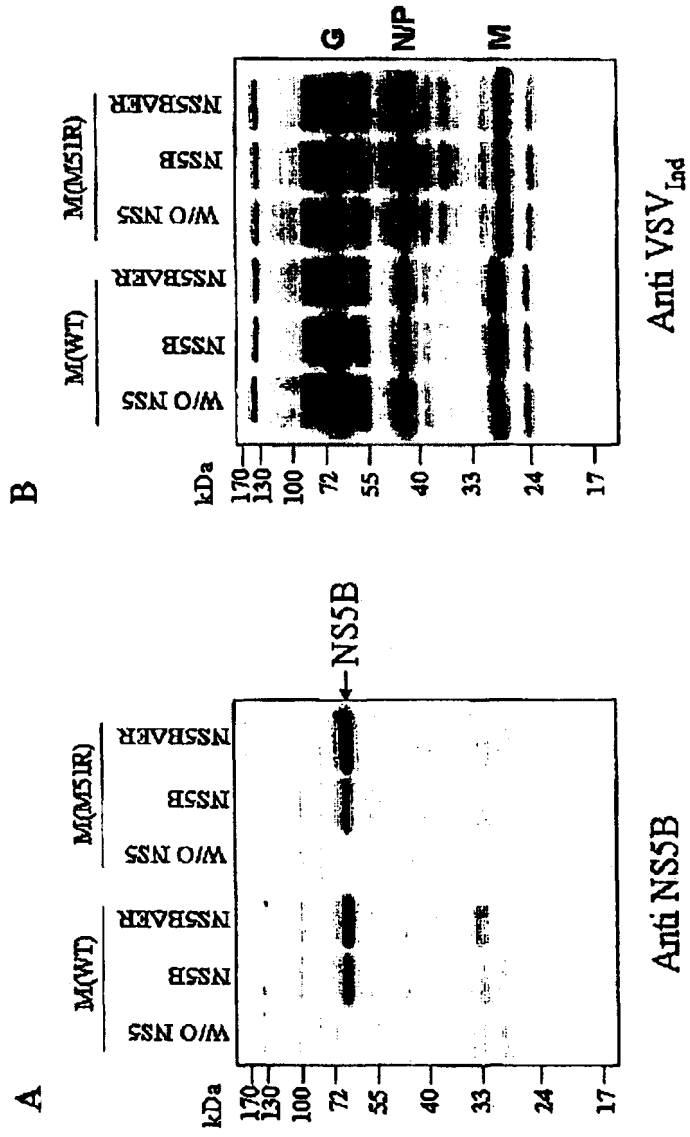


Figura 20