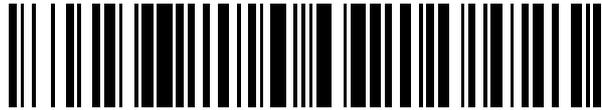


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 685 922**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/00** (2006.01)

**C07K 14/705** (2006.01)

**C07K 14/74** (2006.01)

**C07K 14/005** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2014 PCT/IB2014/059802**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014 WO14141176**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2014 E 14723475 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.06.2018 EP 2968493**

54 Título: **Vacunas poxvirales mejoradas**

30 Prioridad:

**15.03.2013 WO PCT/EP2013/055409**

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

**15.10.2018**

73 Titular/es:

**GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA (100.0%)  
Rue de l'Institut 89  
1330 Rixensart, BE**

72 Inventor/es:

**COLLOCA, STEFANO;  
CORTESE, RICCARDO;  
FOLGORI, ANTONELLA y  
NICOSIA, ALFREDO**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 685 922 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

Vacunas poxvirales mejoradas

La presente solicitud se refiere a vacunas Vaccinia Ankara Modificada (MVA) mejoradas que comprenden construcciones de ácido nucleico que codifican proteínas antigénicas y cadenas invariantes, y nuevos regímenes de administración para tales vectores MVA. En particular, se describe el uso de dichos vectores MVA para cebar ("priming") o reforzar ("boosting") una respuesta inmunológica.

## Antecedentes de la invención

Las enfermedades infecciosas siguen siendo una importante amenaza para la humanidad. Una forma de prevenir o tratar enfermedades infecciosas es la inducción artificial de una respuesta inmunitaria mediante vacunación, que es la administración de un material antigénico a un individuo, de manera que se desarrolle una respuesta inmunitaria adaptativa contra el antígeno correspondiente. El material antigénico puede ser agentes patógenos (por ejemplo, microorganismos o virus) que están estructuralmente intactos pero inactivados (es decir, no infecciosos) o que están atenuados (es decir, con infectividad reducida), o componentes purificados del agente patógeno que se ha encontrado que son altamente inmunogénicos. Otro planteamiento para inducir una respuesta inmunitaria contra un agente patógeno es proporcionar sistemas de expresión que comprenden uno o más vectores que codifican proteínas o péptidos inmunogénicos del agente patógeno. Tal vector puede estar en forma de ADN de plásmido desnudo, o las proteínas o péptidos inmunogénicos pueden suministrarse usando vectores virales, por ejemplo sobre la base de virus vaccinia modificados (por ejemplo, Vaccinia Ankara Modificado, MVA) o vectores adenovirales. Tales sistemas de expresión tienen la ventaja de comprender componentes bien caracterizados que tienen una baja sensibilidad frente a las condiciones ambientales.

Es un objetivo particular, cuando se desarrollan sistemas de expresión basados en vectores, que la aplicación de estos sistemas de expresión a un paciente provoque una respuesta inmunitaria que es protectora contra la infección por el agente patógeno correspondiente. Sin embargo, aunque inducen una respuesta inmunogénica contra el patógeno, algunos sistemas de expresión no son capaces de provocar una respuesta inmunitaria que sea lo suficientemente fuerte para proteger completamente contra las infecciones por el agente patógeno. Por consiguiente, todavía existe la necesidad de sistemas de expresión mejorados que sean capaces de inducir una respuesta inmunitaria protectora contra un agente patógeno, así como de nuevos regímenes de administración de sistemas de expresión conocidos que provocan respuestas inmunitarias potenciadas.

Los antígenos son fragmentos de péptidos presentados en la superficie de células presentadoras de antígeno por moléculas del MHC. Los antígenos pueden ser de origen extraño, es decir patógenos, de origen o procedentes del propio organismo; estos últimos se denominan autoantígenos. Hay dos clases de moléculas de MHC, MHC de clase I (MHC-I) y MHC de clase II (MHC-II). Las moléculas de MHC-I presentan fragmentos de péptidos que se sintetizan dentro de la célula correspondiente. Las moléculas de MHC-II presentan fragmentos de péptidos que fueron absorbidos por fagocitosis y posteriormente digeridos en el endosoma. Típicamente, las moléculas de MHC-II solo son expresadas por células presentadoras de antígeno "profesionales", tales como macrófagos o células dendríticas. Los antígenos unidos a las moléculas del MHC-II son reconocidos por las células T cooperadoras. La unión del receptor de células T de una célula T-colaboradora a un antígeno presentado por una molécula MHC-II, junto con las citoquinas secretadas por las células presentadoras de antígeno, induce la maduración de una célula T colaboradora inmadura del fenotipo TH<sub>0</sub> en varios tipos de células efectoras.

Las moléculas del MHC-II son receptores unidos a la membrana que se sintetizan en el retículo endoplasmático y dejan el retículo endoplasmático en un compartimento de MHC clase II. Con el fin de evitar que los péptidos endógenos, es decir los autoantígenos, se unan a la molécula del MHC-II, la molécula del MHC-II naciente se combina con otra proteína, la cadena invariante, que bloquea la hendidura de unión a péptido de la molécula de MHC-II. Cuando el compartimento MHC clase II se fusiona con un endosoma tardío que contiene proteínas fagocitadas y degradadas, la cadena invariante se escinde para dejar solo la región CLIP unida a la molécula MHC-II. En una segunda fase, CLIP es eliminada por una molécula de HLA-DM que deja la molécula de MHC-II libre para unirse a fragmentos del antígeno extraño. Dichos fragmentos se presentan en la superficie de la célula presentadora de antígeno una vez que el compartimento MHC clase II se fusiona con la membrana plasmática, presentando así los antígenos extraños a otras células, principalmente células T cooperadoras.

Se ha encontrado previamente (documento WO 2007/062656, que fue publicado como US 2011/0293704 y describe secuencias de la cadena invariante) que la fusión de la cadena invariante con un antígeno que está formado por un sistema de expresión utilizado para la vacunación hace aumentar la respuesta inmunitaria contra dicho antígeno, si se administra con un adenovirus. Además, dicha construcción adenoviral demostró ser útil para preparar una respuesta inmunitaria en el contexto de un régimen de vacunación *prime boosting* o de "cebado-refuerzo" (documento WO 2010/057501, que fue publicado como US 2010/0278904 y describe vectores adenovirales que codifican secuencias de cadena invariante). Los autores de la presente invención han descubierto sorprendentemente que puede potenciarse incluso más la respuesta inmunitaria contra un antígeno dado, si en lugar de un adenovirus se usa un MVA para suministrar la fusión de antígeno de cadena invariante. De esta forma, se puede generar una respuesta inmunitaria. Es particularmente sorprendente que los vectores MVA produzcan este efecto también cuando se usan

para cebar una respuesta inmunitaria.

### **Compendio de la invención**

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un vector MVA que comprende una construcción de ácido nucleico, comprendiendo la construcción de ácido nucleico:

- 5 (i) una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una proteína antigénica o un fragmento antigénico de la misma unida operativamente a
- (ii) un ácido nucleico que codifica al menos una cadena invariante

10 en donde la al menos una cadena invariante tiene al menos un 85% de identidad de secuencia con una de las isoformas humanas p35 de SEQ ID NO:1, p43 de SEQ ID NO: 5, o c de SEQ ID NO: 9 o una de las isoformas murinas p31 de SEQ ID NO: 3 o p41 de SEQ ID NO: 7.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una combinación de vacuna que comprende:

- (a) un vector MVA que comprende una construcción de ácido nucleico, comprendiendo la construcción de ácido nucleico
- 15 (i) una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una primera proteína antigénica o un fragmento antigénico de la misma, unida operativamente a
- (ii) un ácido nucleico que codifica al menos una cadena invariante

en donde la cadena invariante tiene al menos un 85% de identidad de secuencia con una de las isoformas humanas p35 de SEQ ID NO:1, p43 de SEQ ID NO: 5 o c de SEQ ID NO: 9 o una de las isoformas murinas p31 de SEQ ID NO: 3 o p41 de SEQ ID NO: 7

20 y

- (b) un vector adenoviral que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica al menos una segunda proteína antigénica o un fragmento antigénico de la misma,

en donde al menos un epítipo de la primera proteína antigénica o del fragmento antigénico de la misma es reconocido por el mismo anticuerpo, célula T o célula B para la segunda proteína antigénica o fragmento de la misma.

25 En otro aspecto más, la presente invención se refiere al vector MVA descrito anteriormente, para uso en régimen de vacunación *prime boosting*. También se describen métodos que usan tales vectores poxvirales y sus combinaciones.

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

A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente texto tienen los mismos significados que entienden comúnmente los profesionales con una experiencia normal en la técnica.

30 Por ejemplo, los términos utilizados en este documento se definen como se describe en "A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)" [Un glosario multilingüe de términos biotecnológicos: (Recomendaciones de la IUPAC)], Leuenberger, H.G.W, Nagel, B. y Kibl, H. eds. (1995), Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basilea, Suiza).

35 A lo largo de esta memoria y las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera otra cosa debe entenderse que la palabra "comprenden" y variaciones tales como "comprende" y "que comprende", implican la inclusión de un número entero expresado o etapa o grupo de enteros o etapas, pero no la exclusión de ningún otro entero o etapa o grupo de enteros o etapas.

40 Nada en este documento debe considerarse como una admisión de que la invención no está legitimada para anteceder a dicha descripción en virtud de la invención anterior. Todas las definiciones proporcionadas en el presente documento en el contexto de un aspecto de la invención son también válidas para los otros aspectos de la invención.

El problema subyacente a la presente invención se resuelve mediante las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones y en la descripción que sigue.

En un primer aspecto, el presente invención se refiere a un vector MVA que comprende una construcción de ácido nucleico, comprendiendo la construcción de ácido nucleico:

- 45 (i) una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una proteína antigénica o un fragmento antigénico de la misma, unida operativamente a
- (ii) un ácido nucleico que codifica al menos una cadena invariante

en donde la al menos una cadena invariante tiene al menos un 85% de identidad de secuencia con una de las isoformas humanas p35 de SEQ ID NO:1, p43 de SEQ ID NO: 5 o c de SEQ ID NO: 9 o una de las isoformas murinas p31 de SEQ ID NO: 3 o p41 de SEQ ID NO: 7.

5 Como se usa en el presente documento, la expresión "vector poxviral" se refiere a un miembro de la familia poxviridae de origen natural o un vector viral derivado del mismo, que es capaz de introducir la construcción de ácido nucleico en una célula de un individuo. En el contexto de la presente invención, se contempla que el antígeno y la cadena invariante codificada por la construcción de ácido nucleico introducida se expresan dentro de dicha célula en la introducción por el vector MVA.

10 Una descripción del MVA puede encontrarse en Mayr A., Stickl H., H. K. Müller, Danner K., Singer H. "The smallpox vaccination strain MVA: marker, genetic structure, experience gained with the parenteral vaccination and behavior in organisms with a debilitated defense mechanism ("Cepa de vacunación de la viruela MVA: marcador, estructura genética, experiencia adquirida con la vacunación parenteral y comportamiento en organismos con un mecanismo de defensa debilitado"). "Abstammung, Eigenschaften und Verwendung des attenuierten Vaccinia-Stammes MVA (Cepa, propiedades y empleo de la cepa de vaccinia atenuada MVA)". Zentralbl Bakteriol B. 1978 Dic; 167(5 - 6): 375 - 90 y en Mayr, A., Hochstein-Mintzel, V. & Stickl, H. (1975). *Infection* 3, 6 - 14.

15 MVA es una cepa muy atenuada de virus vaccinia que ha experimentado delecciones múltiples completamente caracterizadas durante más de 570 pases en células de fibroblastos de embriones de pollo. Estos incluyen genes con rango de hospedadores y genes que codifican receptores de citocina. El virus es incapaz de replicarse eficientemente en seres humanos y en la mayor parte de otras células de mamífero, pero el defecto de replicación ocurre en una etapa tardía del ensamblaje del virión de modo que la expresión génica viral y recombinante está intacta, haciendo al MVA un vector de expresión redondo único eficiente incapaz de causar infección en mamíferos.

20 En una realización, MVA se deriva del lote de siembra de virus 460 MG obtenido del 571º paso de Vaccinia Virus en células CEF. En otra realización, MVA se deriva del lote de siembra de virus MVA 476 MG/14/78. En otra realización más, MVA se realiza o se produce antes del 31 de diciembre de 1978 y está libre de contaminación priónica.

25 La expresión "ácido nucleico" se refiere a una macromolécula polimérica hecha de monómeros de nucleótidos. Los monómeros de nucleótidos están compuestos por una base nucleica, un azúcar de cinco átomos de carbono (tal como, pero sin limitarse a ellos, ribosa o 2'-desoxirribosa) y de uno a tres grupos fosfato. Típicamente, se forma un polinucleótido a través de enlaces fosfodiéster entre los monómeros de nucleótidos individuales. En el contexto de la presente invención, las moléculas de ácido nucleico preferidas incluyen, pero sin limitarse a ellas, ácido ribonucleico (ARN) y ácido desoxirribonucleico (ADN). Además, el término "polinucleótido" también incluye análogos artificiales de ADN o ARN, como ácido nucleico peptídico (PNA).

30 La expresión "construcción de ácido nucleico" se refiere a un ácido nucleico que codifica al menos una proteína antigénica y al menos una cadena invariante. Adecuadamente, dicho ácido nucleico comprende adicionalmente elementos que dirigen la transcripción y la traducción de los polipéptidos codificados por la construcción de ácido nucleico. Dichos elementos incluyen elementos promotores y potenciadores para dirigir la transcripción del RNAm en un sistema libre de células o basado en células, por ejemplo un sistema basado en células. Adecuadamente, tal promotor y/o potenciador es un promotor y/o potenciador endógeno del vector MVA. Si la construcción de ácido se proporciona como ARN traducible, se prevé que la construcción de ácido nucleico comprenda aquellos elementos que son necesarios para la traducción y/o estabilización del ARN que codifican el al menos un polipéptido inmunogénico, p. ej. estructuras polyA-tail, IRES, cap, etc.

35 La expresión "sustancialmente similar", si se usa en relación con secuencias de ácidos nucleicos o secuencias de aminoácidos, se refiere a un grado de identidad de secuencia de más del 85%, más del 90%, más del 95%, más del 98% o más del 99% de la secuencia de nucleótidos o aminoácidos de referencia indicada respectivamente.

40 Se dice que los restos en dos o más polipéptidos se "corresponden" entre sí cuando los restos o grupo de restos ocupan posiciones análogas en las estructuras polipeptídicas. Como es bien sabido en la técnica, las posiciones análogas se pueden determinar en dos o más polipéptidos alineando las secuencias polipeptídicas basándose en la secuencia de aminoácidos o similitudes estructurales. Dichas herramientas de alineación son bien conocidas por los expertos en la técnica y pueden obtenerse, por ejemplo, en la World Wide Web, por ejemplo, ClustalW ([www.ebi.ac.uk/clustalw](http://www.ebi.ac.uk/clustalw)) o Align ([www.ebi.ac.uk/emboss/align/index.html](http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/index.html)) usando ajustes estándar, por ejemplo para Align EMBOSS :: needle, Matrix: Blosum62, Gap Open 10.0, Gap Extend 0.5. Los expertos en la técnica entienden que puede ser necesario introducir huecos en cualquier secuencia para producir una alineación satisfactoria. Se dice que los restos "se corresponden" si los restos están alineados en la mejor alineación de la secuencia. La "mejor alineación de secuencia" entre dos polipéptidos se define como la alineación que produce el mayor número de restos idénticos alineados. La "región de la mejor alineación de secuencia" finaliza y, por tanto, determina los límites y enlaces de la longitud de la secuencia de comparación para el propósito de la determinación de la puntuación de similitud, si la similitud de secuencia o identidad entre dos secuencias alineadas cae a menos del 30%, menos del 20%, menos del 10% sobre una longitud de 10, 20 o 30 aminoácidos.

45 Como se perfila anteriormente, se contempla que el vector de la presente invención es un vector MVA. Así pues, si

dicho vector MVA es competente para la replicación, la construcción de ácido nucleico está compuesta por una molécula de ácido nucleico más grande que adicionalmente incluye secuencias de ácido nucleico que son necesarias para la replicación del vector viral y/o elementos reguladores que dirigen la expresión del polipéptido codificado por la construcción de ácido nucleico.

- 5 En una realización preferida de la presente invención la proteína antigénica o fragmento antigénico de la misma y la cadena invariante están formadas por un solo marco de lectura abierto de manera que la transcripción y la traducción de dicho marco de lectura abierto da como resultado una proteína de fusión que comprende la proteína antigénica, o fragmento antigénico de la misma, y la cadena invariante.

10 La expresión "marco de lectura abierto" (ORF) se refiere a una secuencia de nucleótidos, que se puede traducir en aminoácidos. Típicamente, dicho ORF contiene un codón de inicio, una región subsiguiente que tiene generalmente una longitud que es un múltiplo de 3 nucleótidos, pero que no contiene un codón de terminación (TAG, TAA, TGA, UAG, UAA o UGA) en el marco de lectura dado. Típicamente, los ORF se producen naturalmente o se construyen artificialmente, es decir, por medios de tecnología genética. Un ORF codifica una proteína en la que los aminoácidos a los que se puede traducir forman una cadena ligada a péptidos.

- 15 Los términos "proteína", "polipéptido" y "péptido" se usan indistintamente en la presente memoria y se refieren a cualquier cadena de aminoácidos ligada a péptidos, independientemente de la longitud, y la modificación co-traducciona l o post-traducciona l.

20 El término "post-traducciona l" usado en en el presente texto se refiere a eventos que ocurren después de la traducción de un triplete de nucleótidos a un aminoácido y la formación de un enlace peptídico con el aminoácido precedente en la secuencia. Tales eventos post-traduccionales pueden ocurrir después de haberse formado el polipéptido completo o ya durante el proceso de traducción en aquellas partes del polipéptido que han sido ya traducidas. Los eventos post-traduccionales típicamente alteran o modifican las propiedades químicas o estructurales del polipéptido resultante. Los ejemplos de eventos post-traduccionales incluyen, pero sin limitarse a ellos, eventos tales como glicosilación o fosforilación de aminoácidos, o escisión de la cadena peptídica, p. ej. por una endopeptidasa.

25 El término "co-traducciona l" usado en el presente texto se refiere a eventos que ocurren durante el proceso de traducción de un triplete de nucleótidos a una cadena de aminoácidos. Esos eventos típicamente alteran o modifican las propiedades químicas o estructurales de la cadena de aminoácidos resultante. Los ejemplos de eventos co-traduccionales incluyen, pero sin limitarse a ellos, eventos que pueden detener completamente el proceso de traducción o interrumpir la formación del enlace peptídico dando como resultado dos productos de traducción discretos.

30 Las proteínas utilizables en la presente invención (incluyendo derivados de proteínas, variantes de proteínas, fragmentos de proteínas, segmentos de proteínas, epítomos de proteínas y dominios de proteínas) pueden modificarse más por modificación química. Por tanto, tal polipéptido modificado químicamente puede comprender grupos químicos distintos de los restos encontrados en los 20 aminoácidos naturales. Los ejemplos de dichos otros grupos químicos incluyen, sin ser limitación, aminoácidos glucosilados y aminoácidos fosforilados. Las modificaciones químicas de un polipéptido pueden proporcionar propiedades ventajosas en comparación con el polipéptido original, p. ej. una propiedad o más de mayor estabilidad, mayor vida biológica mitad o mayor solubilidad en agua. Las modificaciones químicas aplicables a las variantes utilizables en la presente invención incluyen, sin limitación: PEGilación, glicosilación de polipéptidos parentales no glucosilados, o la modificación del patrón de glicosilación presente en el polipéptido original. Tales modificaciones químicas aplicables a las variantes utilizables en la presente invención pueden producirse de forma co- o post-traducciona l.

35 Una "proteína antigénica" como se menciona en la presente solicitud es un polipéptido como se definió anteriormente que contiene al menos un epítomo. Un "fragmento antigénico" de una proteína antigénica es una secuencia parcial de dicha proteína antigénica que comprende al menos un epítomo. Para fines de inmunización, solo son relevantes aquellas partes de una proteína que provocan una respuesta inmunitaria. Por tanto, la construcción de ácido nucleico no necesita codificar la proteína antigénica de longitud completa ya que se encuentra en un agente patógeno o una célula cancerosa. Un fragmento acortado de dicha proteína es suficiente siempre y cuando su secuencia de aminoácidos comprenda el epítomo o epítomos responsables del reconocimiento de la proteína antigénica por el sistema inmunitario.

40 El término "epítomo", también conocido como determinante antigénico, y tal como se utiliza en el contexto de la presente invención, es esa parte de un polipéptido que es reconocida por el sistema inmunitario. Adecuadamente, este reconocimiento está mediado por la unión de anticuerpos, células B o células T al epítomo en cuestión. Los epítomos unidos por anticuerpos o células B se denominan "epítomos de células B" y los epítomos unidos por células T se denominan "epítomos de células T". En este contexto, el término "unión" se refiere a una unión específica, que se define como una unión con una constante de asociación entre el anticuerpo o receptor de células T (TCR) y el correspondiente epítomo, de  $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  o superior, preferiblemente de  $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ,  $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ ,  $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$  o superior. El experto en la técnica sabe cómo determinar la constante de asociación (véase, por ejemplo, Caoili, S. E. (2012) *Advances in Bioinformatics* Vol. 2012). Adecuadamente, la unión específica de anticuerpos a un epítomo está mediada por la región Fab (fragmento, unión a antígeno) del anticuerpo, la unión específica de una célula B está mediada por la región Fab del anticuerpo comprendido por el receptor de célula B y la unión específica de una célula T está mediada

por la región variable (V) del receptor de célula T. Los epítomos de células T se presentan en la superficie de una célula presentadora del antígeno, donde están unidos a moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC). Existen al menos tres clases diferentes de moléculas MHC denominadas moléculas MHC de clase I, II y III, respectivamente. Los epítomos presentados a través de la ruta MHC-I desencadenan una respuesta por linfocitos T citotóxicos (células CD8<sup>+</sup>), mientras que los epítomos presentados a través de la ruta MHC-II provocan una respuesta por células T colaboradoras (células CD4<sup>+</sup>). Los epítomos de células T presentados por moléculas de MHC de Clase I son típicamente péptidos de entre 8 y 11 aminoácidos de longitud y los epítomos de células T presentados por moléculas MHC de Clase II son típicamente péptidos de entre 13 y 17 aminoácidos de longitud. Las moléculas MHC de Clase III presentan también epítomos no peptídicos como glicolípidos. Por consiguiente, el término "epítomo de células T" se refiere preferentemente a un péptido de una longitud de 8 a 11 o de 13 a 17 aminoácidos que puede presentarse mediante una molécula MHC de Clase I o MHC de Clase II.

Los epítomos consisten normalmente en agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar, y generalmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. El término "epítomo" se refiere a epítomos conformacionales así como no conformacionales. Los epítomos conformacionales y no conformacionales se distinguen porque la unión al primero, pero no al último, se pierde en presencia de disolventes desnaturizantes. Los epítomos de células T son no conformacionales, es decir, son lineales, mientras que los epítomos de células B pueden ser conformacionales o no conformacionales. Los epítomos de células B lineales varían típicamente entre 5 y 20 aminoácidos de longitud.

Una proteína antigénica de acuerdo con la presente invención se deriva de un agente patógeno seleccionado entre el grupo que consiste en virus, bacterias, protozoos y parásitos multicelulares. En una realización alternativa de la presente invención, la proteína antigénica es un polipéptido o un fragmento de un polipéptido expresado por una célula cancerosa.

Las proteínas antigénicas o los fragmentos antigénicos de las mismas inducen una respuesta de las células B o una respuesta de las células T, o una respuesta de las células B y una respuesta de las células T. En consecuencia, se prefiere que las proteínas antigénicas o los fragmentos antigénicos comprendan al menos un epítomo de células T y/o al menos un epítomo de células B.

En cierto ejemplo de realización de la presente invención, la proteína antigénica codificada por el vector se deriva del virus de la hepatitis C (HCV). El genoma del HCV consiste en una única cadena de ARN de aproximadamente 9,5 kb de longitud que codifica una poliproteína precursora de aproximadamente 3000 aminoácidos. (Choo et al. (1989) Science 244, 362 - 364; Choo et al. (1989) Science 244, 359 - 362; Takamizawa et al. (1991) J. Virol. 65, 1105 - 1113). La poliproteína del HCV contiene las proteínas virales por el orden: C-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B. Las proteínas virales individuales se producen por proteólisis de la poliproteína del HCV. Las proteasas de células hospedadoras liberan las proteínas estructurales putativas C, E1, E2 y p7, y crean el término N de NS2 en el aminoácido 810. (Mizushima et al. (1994) J. Virol. 65, 2731 - 2734; Hijikata et al. (1993) P.N.A.S. USA 90, 10773 - 10777).

Las proteínas no estructurales NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B forman presumiblemente la maquinaria de replicación del virus y son liberadas de la poliproteína. Una proteasa dependiente de zinc asociada con NS2 y el término N de NS3 es responsable de la escisión entre NS2 y NS3. (Grakoui et al. (1993) J. Virol. 67, 1385 - 1395, Hijikata et al. (1993) P.N.A.S. USA 90, 10773 - 10777). Una proteasa de serina distinta localizada en el dominio N - terminal de NS3 es responsable de las escisiones proteolíticas en las uniones NS3/NS4A, NS4A/NS4B, NS4B/NS5A y NS5A/NS5B. (Bartenschlager et al. (1993) J. Virol. 67, 3835 - 3844; Grakoui et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 10583 - 10587, Tomei et al. (1993) Virol. 67, 4017 - 4026) NS4A proporciona un cofactor para la actividad de NS3. (Failla et al. (1994) J. Virol. 68, 3753 - 3760, De Francesco y col., Patente de Estados Unidos N° 5.739.002). NS5A es una proteína altamente fosforilada que confiere resistencia al interferón. (De Francesco et al. (2000) Semin. Liver Dis., 20 (1), 69 - 83; Pawlotsky (1999) Viral Hepat. Suppl. 1, 47 - 48). NS5B proporciona una ARN polimerasa dependiente de ARN. (De Francesco et al., International Publication número WO 96/37619, Behrens y col., EMBO 15, 12 - 22, 1996, Lohmann et al., Virology 249, 108-118, 1998).

En un ejemplo de realización no limitante, la proteína antigénica es un polipéptido Met-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B que contiene una región de ARN polimerasa dependiente de ARN inactiva NS5B. Por ejemplo, dicha proteína antigénica tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente similar a la secuencia definida por la SEQ ID NO: 11 y tiene actividad de proteasa suficiente para procesarse a sí misma para producir al menos un polipéptido sustancialmente similar a la región NS5B presente en SEQ ID NO: 11. La secuencia de esta proteína antigénica se ha publicado en el documento WO 2003/031588, que fue publicado como US 2004/0247615 y describe polipéptidos HCV. El polipéptido producido que corresponde a NS5B es enzimáticamente inactivo. En otra realización más, el polipéptido del HCV tiene suficiente actividad de proteasa para producir polipéptidos sustancialmente similares a las regiones NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B presentes en la SEQ ID NO: 11.

En una realización, el grado de identidad de secuencia con la secuencia según SEQ ID NO: 11 es más del 80%, más del 85%, más del 90%, más del 95% o más del 98% de la secuencia definida por SEQ ID NO: 11. Sin embargo, en algunas realizaciones la secuencia de la proteína antigénica tiene más del 99% de identidad de secuencia con la secuencia definida por SEQ ID NO: 11 o es idéntica a esta.

La expresión "cadena invariante", también conocida como "Ii" o "CD74", se refiere a una proteína de membrana integral de tipo II no polimórfica. La proteína tiene múltiples funciones en la maduración de linfocitos y respuestas inmunitarias adaptativas; en particular, la Ii asegura la orientación del MCH II recién sintetizado a la ruta endocítica, donde el complejo puede reunirse con péptidos antigénicos. (Pieters J. (1997) Curr. Opin. Immunol, 9: 8996). Además, se ha demostrado que Ii funciona como una chaperona de MHC de clase I (Morris et al. (2004) Immunol. Res., 30: 171 - 179) y, por su secuencia de direccionamiento endosomal, facilita la estimulación de células T CD4<sup>+</sup>, pero no CD8<sup>+</sup>, dirigidas contra el antígeno ligado covalentemente (Diebold et al. (2001) Gene Ther. 8: 487 - 493).

Para la cadena invariante humana se conocen cuatro isoformas diferentes, llamadas generalmente p33, p35, p41 y p43 (Strubin y col., 1986, EMBO Journal, 5: 3483 - 3488). SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 corresponden a la secuencia de aminoácidos y a la secuencia de ácidos nucleicos de la isoforma p35 de la cadena invariante humana. Con respecto a p33 y p41 humanas, las isoformas p35 y p43 humanas contienen 16 restos adicionales en el término N debido a la iniciación alternativa de la traducción. En comparación con las p33 y p35 humanas, las isoformas p41 y p43 humanas comprenden un dominio adicional (corte y empalme alternativo del exón 6b) insertado en el marco en la región C-terminal de la cadena invariante. Las SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6 corresponden a la secuencia de aminoácidos y a la secuencia de ácidos nucleicos de la isoforma p43 de la cadena invariante humana. La secuencia de una isoforma humana adicional c que carece de dos exones en relación con p33 y p35 humanos está disponible en Genbank (registro BC024272). SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10 corresponden a la secuencia de aminoácidos y a la secuencia de ácidos nucleicos de la isoforma c de la cadena invariante humana.

Tabla 1: Resumen sobre las variantes de la cadena invariante humana

| Isoforma | 16 AA en el término N | Dominio adicional | SEQ ID NO:<br>(péptido, ácido nucleico) |
|----------|-----------------------|-------------------|---|
| P33      | -                     | -                 | -                                       |
| P35      | +                     | -                 | 1, 2                                    |
| P41      | -                     | +                 | -                                       |
| P43      | +                     | +                 | 5, 6                                    |
| c        | +                     | -                 | 9, 10                                   |

Para la cadena invariante murina, solo se conocen dos isoformas (p31 y p41) correspondientes a las isoformas de la cadena invariante humana p33 y p41. SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 corresponden a la secuencia de aminoácidos y a la secuencia de ácidos nucleicos de la isoforma p31 de la cadena invariante murina. Las SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8 corresponden a la secuencia de aminoácidos y a la secuencia de ácidos nucleicos de la isoforma p41 de la cadena invariante murina. Una visión general esquemática de las diferentes isoformas se muestra en la Figura 4.

En una realización, la cadena invariante usada en la presente invención es sustancialmente similar a la cadena invariante de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 o 3.

La cadena invariante comprende varios dominios: un dominio citosólico que incluye un péptido de clasificación (direccionamiento) (también conocido como secuencia de direccionamiento lisosomal) (posiciones 17 a 46 en la cadena invariante humana SEQ ID NO: 1, posiciones 1 a 29 en la cadena invariante murina SEQ ID NO: 3) precedida por una señal de retención ER en las variantes p35 y p43 de la cadena invariante humana (posiciones 1 a 16 en la cadena invariante humana SEQ ID NO: 1), un dominio transmembrana (anclaje de señal, posiciones 47 a 72 en la cadena invariante humana SEQ ID NO: 1, posiciones 30 a 55 en la cadena invariante murina SEQ ID NO: 3), y un dominio luminal que en sí mismo comprende una región KEY (posiciones 93 a 96 en la cadena invariante humana SEQ ID NO: 1, posiciones 76 a 79 en la cadena invariante murina SEQ ID NO: 3), una región CLIP adyacente (posiciones 97 a 120 en la cadena invariante humana SEQ ID NO 1, posiciones 80 a 103 en la cadena invariante murina SEQ ID NO: 3). La región CLIP comprende un péptido CLIP nuclear (posiciones 103 a 117 en la cadena invariante humana SEQ ID NO: 1, posiciones 86 a 100 en la cadena invariante murina SEQ ID NO: 3) y un dominio de trimerización (posiciones 134 a 208 en la cadena invariante humana SEQ ID NO: 1, posiciones 117 a 191 en la cadena invariante murina SEQ ID NO: 3; Mittendorf et al. (2009) Expert Opin. Biol. Ther., 9: 71 - 78; Strumptner-Cuvelette y Benaroch, 2002, Biochem. Biophys. Acta, 1542: 1 - 13). El resto del dominio luminal comprende dos regiones altamente flexibles situadas entre la región transmembrana y KEY (posiciones 73 a 92 en la cadena invariante humana SEQ ID NO: 1, posiciones 56 a 75 en la cadena invariante murina SEQ ID NO: 3) o aguas abajo del dominio de trimerización (posiciones 209 a 232 en la cadena invariante humana SEQ ID NO: 1, posiciones 192 a 215 en la cadena invariante murina SEQ ID NO: 3). La cadena invariante se ha caracterizado en varios organismos tales como pollo, vaca, perro, ratón, rata y ser humano.

En una realización, la cadena invariante es de origen vertebrado, de origen aviar o mamífero, o también se selecciona

entre el grupo que consiste en cadenas invariantes derivadas de pollo, vaca, perro, ratón, rata, primate no humano y humano. En otra realización, es de origen humano o murino, por ejemplo la cadena invariante humana tiene una secuencia de aminoácidos como se define en la SEQ ID NO: 1. Dicho polipéptido está codificado en una realización por una secuencia de ácidos nucleicos como se da en SEQ ID NO: 2. En otra realización, la cadena invariante murina tiene una secuencia de aminoácidos según se define en SEQ ID NO: 3. En una realización, dicho polipéptido está codificado por una secuencia de ácidos nucleicos como se da en SEQ ID NO: 4.

La expresión "cadena invariante" comprende también variantes de los polipéptidos descritos anteriormente caracterizados por deleciones de partes de las secuencias de aminoácidos de cadenas invariantes de origen natural o de cadenas invariantes sustancialmente similares a las cadenas invariantes naturales o por su sustitución con otras secuencias. Se dan a continuación variantes preferidas.

En una variante particular de la cadena invariante, la región KEY endógena que consiste en los restos de aminoácidos LRMK está borrada o está sustituida por una secuencia de aminoácidos diferente. Preferiblemente, los restos de aminoácidos de LRMK o los restos correspondientes se borran. La deleción de los restos de aminoácidos de LRMK puede ser completa (implicando todos los restos de aminoácidos de LRMK) o parcial (implicando al menos un resto de aminoácidos de LRMK). Se prefiere la deleción completa de todos los restos de aminoácidos LRMK. También, al menos uno o, más preferiblemente, todos los restos de aminoácidos de LRMK están sustituidos por diferentes restos de aminoácidos.

En otro ejemplo más de variante, las metioninas en las posiciones 107 y 115 de la cadena invariante humana de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 o las metioninas en las posiciones 90 y 98 de la cadena invariante murina de acuerdo con la SEQ ID NO: 3 o las metioninas correspondientes a estas posiciones en otras cadenas invariantes, son sustituidas por otros aminoácidos. Adecuadamente, se sustituye la metionina.

En otro ejemplo de variante, la cadena invariante está truncada en el extremo N, por ejemplo en una extensión tal que se elimina el extremo N hasta la región transmembrana. En consecuencia, en otra realización, la cadena invariante de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, 46 aminoácidos o menos del extremo N terminal están truncados, 41 aminoácidos o menos están truncados, o 36 aminoácidos o menos están truncados. Por consiguiente, también se contempla que para la cadena invariante de acuerdo con la SEQ ID NO: 3, 30 aminoácidos o menos del extremo N estén truncados, más preferiblemente 25 aminoácidos o menos estén truncados, o 20 aminoácidos o menos estén truncados. Para una realización de la cadena invariante de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, los primeros 16 restos de aminoácidos de la cadena invariante humana son borrados. También es posible que se borre al menos uno, pero no todos los primeros 16 restos de aminoácidos. Además, es posible que al menos uno, o todos los primeros 16 restos de aminoácidos de la cadena invariante humana (SEQ ID NO: 1) estén sustituidos por otros restos de aminoácidos.

En otra variante más, se añade al menos un péptido señal para la expresión en el lumen del retículo endoplasmático al extremo N-terminal de la cadena invariante, por ejemplo a una versión truncada N-terminalmente de la cadena invariante que, debido al truncamiento N-terminal, carece de la región transmembrana.

En otra variante más de la cadena invariante se añade al menos una región CLIP o reemplaza a la región CLIP endógena de la correspondiente cadena invariante. En la cadena invariante humana de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, la región CLIP abarca las posiciones 97 a 120 y en la cadena invariante murina de acuerdo con SEQ ID NO 3 abarca las posiciones 80 a 103. Por tanto, un profesional experto puede determinar fácilmente los restos de aminoácidos correspondientes a la región CLIP en la cadena invariante de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 y 3. En otra realización más, la región CLIP endógena completa es borrada o reemplazada. Sin embargo, también se considera la deleción o la sustitución de al menos un resto de aminoácido perteneciente a la región CLIP endógena.

La expresión "cadena invariante" se refiere también a las variantes de la cadena invariante descritas anteriormente, por ejemplo las cadenas invariantes que tienen secuencias de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 1 o 3 o codificadas por secuencias de ácido nucleico de acuerdo con SEQ ID NO: 2 o 4. Se ha de entender que debido a la naturaleza degenerada del código genético, un aminoácido puede ser codificado por más de un codón. Por ejemplo, el aminoácido isoleucina puede estar codificado por los codones AUU, AUC o AUA. Por consiguiente, la presente invención abarca también todas las variantes de las secuencias de ácido nucleico antes mencionadas que codifican las secuencias de aminoácidos definidas por las SEQ ID NO: 1 o 3 al margen de la secuencia de ácido nucleico específica. Dado que diferentes organismos utilizan diferentes codones con diferente eficacia, puede ser ventajoso adaptar el uso de codones en una secuencia de nucleótidos al organismo hospedador pretendido.

Además, la expresión "cadena invariante" se refiere a polipéptidos que tienen al menos 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,8% o 99,9% de identidad de secuencia con isoformas humanas p35 de SEQ ID NO: 1, p43 de SEQ ID NO: 5 o c de SEQ ID NO: 9, o una de las isoformas murinas p31 de SEQ ID NO: 3 o p41 de SEQ ID NO: 7.

Los métodos para determinar la identidad de secuencias entre dos polipéptidos diferentes son bien conocidos en la técnica. La similitud de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos, es decir, el porcentaje de identidad de secuencias, puede determinarse mediante alineaciones de secuencia. Tales alineaciones pueden llevarse a cabo con varios algoritmos conocidos en la técnica, por ejemplo con el algoritmo matemático de Karlin y Altschul (Karlin y

Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873 - 5877), con hmalign (paquete HMMER, <http://hmmer.wustl.edu/>) o con el algoritmo CLUSTAL (Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994) Nucleic Acids Res. 22, 4673 - 80) disponible, p. ej., en <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/> o en <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html> o en <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>. Los parámetros preferidos utilizados son los parámetros por defecto, ya que están ajustados en <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/> o <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>. El grado de identidad de secuencia (coincidencia de secuencias) puede calcularse usando, p. ej., BLAST, BLAT o BlastZ (o BlastX). Un algoritmo similar se incorpora a los programas BLASTN y BLASTP de Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403 - 410.

Para obtener alineamientos con huecos con fines comparativos, se utiliza Gapped BLAST como se describe en Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3389 - 3402. Al utilizar los programas BLAST y Gapped BLAST, se utilizan los parámetros por defecto de los programas correspondientes. El análisis de coincidencia de secuencias se puede suplementar mediante técnicas de mapeo de homología establecidas como Shuffle-LAGAN (Brudno M., Bioinformatics 2003b, 19 Suppl 1: 154 - 162) o campos aleatorios de Markov. Cuando se mencionan porcentajes de identidad de secuencias en la presente solicitud, estos porcentajes se calculan en relación con la longitud completa de la secuencia más larga, si no se indica específicamente otra cosa.

La expresión "sensibilización de una respuesta inmunitaria" se refiere al primer encuentro del sistema inmunitario con al menos una proteína antigénica o un fragmento antigénico de la misma, y la posterior inducción de una respuesta inmunitaria específica del antígeno dentro de un período de tiempo definido. Dicho período de tiempo es, por ejemplo, al menos 1 año, al menos 2 años, al menos 3 años, al menos 5 años o al menos 10 años antes del cebado. En una realización, los encuentros del sistema inmunitario del individuo con la proteína antigénica o el fragmento antigénico de la misma del que no induce una respuesta inmunitaria específica del antígeno no se consideran como "cebado de una respuesta inmunitaria". Por ejemplo, los encuentros del sistema inmunitario del individuo con la proteína antigénica o fragmento antigénico de la misma que no inducen una inmunidad duradera, no se consideran como "cebado de una respuesta inmunitaria" de acuerdo con la presente invención. En otra realización, la inducción de inmunidad duradera está mediada por la generación de células B de memoria y/o células T de memoria. En el caso del cáncer, por ejemplo, un antígeno específico puede ser expresado por las células cancerosas sin provocar una respuesta inmunitaria. La mera presencia de este antígeno no es una "sensibilización de una respuesta inmunitaria" contra dicho antígeno, como se entiende por la presente solicitud. En una realización, el individuo o sujeto no ha sido inmunizado deliberadamente con la proteína antigénica o el fragmento antigénico de la misma o un vector que comprende un ácido nucleico que codifica dicha proteína o fragmento con el objetivo de tratar o prevenir una enfermedad en el período de tiempo dado anteriormente.

Sin embargo, la expresión "sensibilización de una respuesta inmunitaria" se refiere a cualquier contacto previo del individuo con un agente patógeno que comprende de forma natural dicha proteína antigénica o fragmento antigénico de la misma, con la condición de que dicho contacto no se haya inducido artificialmente con fines médicos. En particular, mediante la presente solicitud se prevé que el individuo puede haber sido ya infectado con el agente patógeno mencionado anteriormente, con la condición de que dicha infección no haya sido inducida artificialmente con fines médicos. En el momento en que tiene lugar la sensibilización de la respuesta inmunitaria, la infección del individuo puede estar ya presente o puede haber sido ya eliminada. De forma similar, en el caso del cáncer, se prevé que el individuo que va a inmunizarse con el vector MVA de la presente invención ya padece el cáncer que expresa la proteína antigénica o el fragmento antigénico de la misma que está comprendido por la construcción de ácido nucleico de la presente invención.

El paciente o sujeto a inmunizar con un vector MVA según la presente invención es, por ejemplo, un mamífero o un ave, más específicamente un primate, ratón, rata, oveja, cabra, vaca, cerdo, caballo, ganso, pollo, pato o pavo y, más específicamente, un ser humano.

El vector MVA que comprende una construcción de ácido nucleico como se define anteriormente se usa, por ejemplo, en un régimen de vacunación *prime boosting*.

En muchos casos, una única administración de una vacuna no es suficiente para generar el número de células inmunes de larga duración que se requieren para una protección eficaz en caso de infección futura del agente patógeno en cuestión, proteger contra enfermedades que incluyen enfermedades tumorales o para tratar terapéuticamente una enfermedad, como una enfermedad tumoral. Consecuentemente, se requiere una provocación repetida con un preparado biológico específico para un agente patógeno o una enfermedad específica a fin de establecer una inmunidad duradera y protectora contra dicho agente patógeno o enfermedad o para curar una enfermedad dada. Se menciona en la presente solicitud un régimen de administración que comprende la administración repetida de una vacuna dirigida contra el mismo agente patógeno o enfermedad como "régimen de vacunación *prime boosting*". En una realización, un régimen de vacunación *prime boosting* implica al menos dos administraciones de una vacuna o composición de vacuna dirigida contra un agente patógeno específico, grupo de agentes patógenos o enfermedades. La primera administración de la vacuna se denomina "*priming*" (cebado o sensibilización) y cualquier administración subsiguiente de la misma vacuna o de una vacuna dirigida contra el mismo agente patógeno que la primera vacuna se denomina "*boosting*" (refuerzo). Así pues, en otra realización de la presente invención el régimen de vacunación *prime boosting* implica una administración de la vacuna para cebar la respuesta inmunitaria y al menos una administración subsiguiente para reforzar la respuesta inmunitaria. Se ha de entender que la presente invención

también contempla 2, 3, 4 o incluso 5 administraciones para reforzar la respuesta inmunitaria.

5 El período de tiempo entre el cebado y el refuerzo es, opcionalmente, 1 semana, 2 semanas, 4 semanas, 6 semanas u 8 semanas. Más en particular, es de 4 semanas o de 8 semanas. Si se realiza más de un refuerzo, el refuerzo subsiguiente se administra preferiblemente 1 semana, 2 semanas, 4 semanas, 6 semanas u 8 semanas después del refuerzo anterior. Por ejemplo, el intervalo entre dos refuerzos cualesquiera es de 4 semanas o de 8 semanas.

10 Los regímenes de vacunación *prime boost* pueden ser homólogos o heterólogos. En regímenes de *prime boost* homólogos, tanto el cebado como el al menos un refuerzo se realizan usando los mismos medios de administración de la proteína antigénica o fragmento antigénico de la misma, es decir, el cebado y el refuerzo se realizan usando un polipéptido, o el cebado y el refuerzo se llevan a cabo usando una construcción de ácido nucleico comprendida por el mismo vector. En el contexto de la presente invención, un régimen de vacunación *prime boost* homólogo comprendería el uso del vector MVA de la invención tanto para el cebado como para el refuerzo de la respuesta inmunitaria. Un régimen heterólogo de *prime boosting* implica el uso de diferentes medios para cebar y para reforzar la respuesta inmunitaria. En el contexto de la presente invención, un régimen heterólogo de *prime boosting* comprendería un vector MVA como se describió anteriormente para el cebado de una respuesta inmunitaria y un vector diferente o una vacuna peptídica para el refuerzo de la respuesta inmunitaria.

15 Alternativamente, un régimen heterólogo de *prime boosting* comprendería un vector diferente o una vacuna peptídica para el cebado de una respuesta inmunitaria y un vector MVA como se describió anteriormente para reforzar la respuesta inmunitaria.

En una realización de la presente invención, el régimen de vacunación *prime boosting* es homólogo.

20 En otra realización de la presente invención, el régimen de vacunación *prime boosting* es heterólogo.

En un régimen heterólogo de *prime boosting* se usa un vector MVA como se describió anteriormente para el refuerzo de la respuesta inmunitaria y se usa un vector o una vacuna peptídica diferentes para el cebado de la respuesta inmunitaria. En otra realización, régimen heterólogo de *prime boosting*, se usa un vector MVA como se describió anteriormente para el cebado de la respuesta inmunitaria y se usa un vector diferente o una vacuna peptídica para reforzar la respuesta inmunitaria.

25 En otra realización, el régimen heterólogo de *prime boosting* comprendería un vector de adenovirus para el cebado de una respuesta inmunitaria y un vector MVA como se describió anteriormente para reforzar la respuesta inmunitaria.

30 En otra realización más, el régimen heterólogo de *prime boosting* comprendería un vector MVA como se describió anteriormente para el cebado de una respuesta inmunitaria y un vector adenoviral para el refuerzo de la respuesta inmunitaria.

35 Para todos los regímenes de vacunación *prime boosting*, se prevé que las proteínas antigénicas o péptidos antigénicos utilizados para reforzar la respuesta inmunitaria sean inmunológicamente idénticas a la proteína antigénica o fragmento antigénico de la misma usada para cebar la respuesta inmunitaria. Debe entenderse que la proteína antigénica o fragmento antigénico de la misma puede administrarse como un polipéptido ("vacuna peptídica") o que puede estar codificada por una molécula de ácido nucleico administrada al individuo en cuestión. En este último caso, la proteína antigénica o el polipéptido antigénico que provocan la respuesta inmunitaria deseada se expresan en las células del individuo inmunizado.

40 Dos o más proteínas antigénicas o fragmentos antigénicos de las mismas son "inmunológicamente idénticas" si son reconocidas por el mismo anticuerpo, célula T o célula B. El reconocimiento de dos o más polipéptidos inmunogénicos por el mismo anticuerpo, célula T o célula B también se conoce como "reactividad cruzada" de dicho anticuerpo, célula T o célula B. En una realización, el reconocimiento de dos o más polipéptidos inmunológicamente idénticos por el mismo anticuerpo, célula T o célula B se debe a la presencia de epítomos idénticos o similares en todos los polipéptidos. Los epítomos similares comparten suficientes características estructurales y/o de carga para ser ligados por la región Fab del mismo anticuerpo o receptor de células B o por la región V del mismo receptor de células T. Las características de unión de un anticuerpo, receptor de células T o receptor de células B se definen, por ejemplo, por la afinidad de unión del receptor al epítomo en cuestión. Dos polipéptidos inmunogénicos son "inmunológicamente idénticos", como se entiende por la presente solicitud, si la constante de afinidad del polipéptido que tiene la constante de afinidad más baja es al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95% o al menos 98% de la constante de afinidad del polipéptido que tiene la constante de afinidad más alta.

50 Los métodos para determinar la afinidad de unión de un polipéptido a un receptor, tal como la diálisis en equilibrio o el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) son bien conocidos en la técnica.

En una realización, dos o más polipéptidos "inmunológicamente idénticos" comprenden al menos un epítomo idéntico. Los efectos de vacunación más fuertes se pueden obtener normalmente si los polipéptidos inmunogénicos comprenden epítomos idénticos o si tienen una secuencia de aminoácidos idéntica.

55 En una realización, el uso del vector MVA como se describió anteriormente para el cebado de una respuesta inmunitaria establecerá inmunidad protectora contra un agente patógeno o una enfermedad, o dará lugar a la

erradicación de la enfermedad.

En una realización, el vector MVA se administra por las vías intranasal, intramuscular, subcutánea, intradérmica, intragástrica, oral y tópica.

5 Una "administración intranasal" es la administración de un vector de la presente invención a la mucosa del tracto respiratorio completo, incluyendo el pulmón. Más en particular, la composición se administra a la mucosa de la nariz. En una realización, se consigue una administración intranasal por medio de instilación, pulverización o aerosol. En otra realización, dicha administración no implica la perforación de la mucosa por medios mecánicos tales como una aguja.

10 La expresión "administración intramuscular" se refiere a la inyección de un vector en cualquier músculo de un individuo. Las inyecciones intramusculares de ejemplo se administran en las áreas deltoides, vasto lateral o ventrogluteal y dorsogluteal.

La expresión "administración subcutánea" se refiere a la inyección de un vector en la hipodermis.

La expresión "administración intradérmica" se refiere a la inyección de un vector en la dermis entre las capas de la piel.

15 La expresión "administración oral" se refiere a la administración de un vector a través de la boca al sistema gástrico.

Una "administración tópica" es la administración del vector a cualquier parte de la piel sin penetrar en la piel con una aguja o un dispositivo comparable. El vector también se puede administrar tópicamente a la mucosa de la boca, la nariz, la región genital y el recto.

20 El término "vacuna" se refiere a un preparado biológico que induce o mejora la inmunidad contra una enfermedad específica. Dicho preparado puede comprender un agente patógeno muerto o atenuado. También puede comprender uno o más compuestos derivados de un agente patógeno adecuado para provocar una respuesta inmunitaria. En una realización, dicho compuesto es un polipéptido que es sustancialmente idéntico o inmunológicamente idéntico a un polipéptido de dicho agente patógeno. En otra realización, la vacuna comprende una construcción de ácido nucleico que codifica un polipéptido inmunogénico que es sustancialmente idéntico o inmunológicamente idéntico a un polipéptido de dicho patógeno. En este último caso, se contempla también que el polipéptido se exprese en el individuo tratado con la vacuna. El principio subyacente a la vacunación es la generación de una "memoria" inmunológica. El desafío del sistema inmunitario de un individuo con una vacuna induce la formación y/o propagación de células inmunitarias que reconocen específicamente el compuesto comprendido por la vacuna. Al menos una parte de dichas células inmunitarias se mantienen viables durante un período de tiempo que puede extenderse a 10, 20 o 30 años después de la vacunación. Si el sistema inmunitario del individuo encuentra el agente patógeno a partir del cual se derivó el compuesto capaz de provocar una respuesta inmunitaria dentro del período de tiempo mencionado anteriormente, las células inmunitarias generadas por la vacunación se reactivan y potencian la respuesta inmunitaria contra el agente patógeno en comparación con la respuesta inmunitaria de un individuo que no ha sido desafiado con la vacuna y encuentra por primera vez compuestos inmunogénicos del agente patógeno.

35 Como se usa en el presente documento, el término "vector" se refiere a al menos un polinucleótido o a una mezcla de al menos un polinucleótido y al menos una proteína que es capaz de introducir el polinucleótido comprendido en el mismo en una célula. Además, el término "vector" se refiere a al menos un polinucleótido formulado con un preparado de liposomas o nanopartículas de lípidos que es capaz de transfectar una célula con al menos un polinucleótido como se describe, p. ej., por Geall et al., 2012, PNAS, 109: 14604 - 14609.

40 Al menos un polinucleótido comprendido por el vector consiste en, o comprende, al menos una construcción de ácido nucleico, que codifica al menos una proteína inmunogénica. Además del polinucleótido que consiste en o comprende la construcción de ácido nucleico de la presente invención, se pueden introducir polinucleótidos y/o polipéptidos adicionales en la célula. La adición de polinucleótidos y/o polipéptidos adicionales está también contemplada si dichos polinucleótidos y/o polipéptidos adicionales se requieren para introducir la construcción de ácido nucleico de la presente invención en la célula o si la introducción de polinucleótidos y/o polipéptidos adicionales aumenta la expresión del polipéptido inmunogénico codificado por la construcción de ácido nucleico de la presente invención.

45 En el contexto de la presente invención, se prevé que la proteína antigénica o el fragmento antigénico de la misma codificado por la construcción de ácido nucleico introducida se expresen dentro de la célula tras la introducción del vector o vectores. Los ejemplos de vectores adecuados incluyen, pero sin limitarse a ellos, plásmidos, cósmidos, fagos, vectores virales, nanopartículas de lípidos o cromosomas artificiales.

50 En otra realización, se derivan vectores adenovirales de humanos y grandes simios no humanos. Ejemplos de grandes simios de los que se derivan los adenovirus son chimpancé (*Pan*), gorila (*Gorilla*) y orangutanes (*Pongo*), por ejemplo Bonobo (*Pan paniscus*) y chimpancé común (*Pan troglodytes*). Típicamente, se aíslan adenovirus de gran simio no humano de origen natural a partir de muestras de heces del gran simio correspondiente. Específicamente, los vectores son vectores adenovirales no replicantes basados en vectores hAd5, hAd11, hAd26, hAd35, hAd49, ChAd3, ChAd4, ChAd5, ChAd6, ChAd7, ChAd8, ChAd9, ChAd10, ChAd11, ChAd16, ChAd17, ChAd19, ChAd20, ChAd22, ChAd24,

5 ChAd26, ChAd30, ChAd31, ChAd37, ChAd38, ChAd44, ChAd55, ChAd63, ChAd73, ChAd82, ChAd83, ChAd146, ChAd147, PanAd1, PanAd2, y PanAd3, o los vectores Ad4 y Ad7 competentes para la replicación. Los adenovirus humanos hAd4, hAd5, hAd7, hAd1, hAd26, hAd35 y hAd49 son bien conocidos en la técnica. Vectores basados en ChAd3 de origen natural, ChAd4, ChAd5, ChAd6, ChAd7, ChAd8, ChAd9, ChAd10, ChAd11, ChAd16, ChAd17, ChAd19, ChAd20, ChAd22, ChAd24, ChAd26, ChAd30, ChAd31, ChAd37, ChAd38, ChAd44, ChAd63 y ChAd82 se describen con detalle en el documento WO 2005/ 071093, que fue publicado como US 20110217332 y concierne a los vectores adenovirales descritos en el presente texto. Los vectores basados en los de origen natural PanAd1, PanAd2, PanAd3, ChAd55, ChAd73, ChAd83, ChAd146 y ChAd147 se describen en detalle en el documento WO 2010/086189 que se ha publicado como US 20120027788 y concierne a los vectores adenovirales descritos en dicho documento.

10 En otra realización, la segunda proteína antigénica o fragmento antigénico de la misma es inmunológicamente idéntica a la proteína antigénica o al fragmento antigénico de la misma codificada por la construcción de ácido nucleico comprendida por el vector MVA.

15 En otra realización de la presente invención, el vector está presente como ADN desnudo. La expresión "ADN desnudo" se refiere a cualquier molécula de ácido nucleico, ADN o ARN, que no codifica proteínas de un vector viral pero codifica al menos una proteína antigénica o un fragmento de la misma. Se contempla que el ADN desnudo no esté asociado con ningún polipéptido, en particular que no lo esté con polipéptidos de origen viral. Por ejemplo, el ADN desnudo está presente como plásmido, cósmido o como cromosoma artificial. En otra realización, el ADN desnudo codifica un polipéptido que es inmunológicamente idéntico a la proteína antigénica o fragmento antigénico de la misma codificado por la construcción de ácido nucleico comprendida por el vector MVA.

20 La expresión "partícula similar a viral" (VLP) se refiere a conjuntos que comprenden proteínas virales pero no ácido nucleico. Las VLPs pueden producirse expresando proteínas de superficie virales en líneas celulares productoras adecuadas. La falta de ácido nucleico, y por tanto de información genética, hace a la VLP no infecciosa, creando así una vacuna segura. Por ejemplo, la VLP comprende un polipéptido que es inmunológicamente idéntico a la proteína antigénica o al fragmento antigénico de la misma codificada por la construcción de ácido nucleico comprendida por el vector MVA.

25 En cierta realización de la presente invención, la combinación de vacuna descrita anteriormente se usa en un régimen de vacunación *prime-boost*. En una primera realización de este régimen de vacunación *prime-boost*, el vector MVA se usa para cebar la respuesta inmunitaria y el vector adenoviral o proteína antigénica o fragmento antigénico de la misma se usa para reforzar la respuesta inmunitaria. En otra realización preferida del régimen de vacunación *prime-boost*, el vector viral o proteína antigénica o fragmento antigénico de la misma se usa para cebar la respuesta inmunitaria y el vector MVA se usa para reforzar la respuesta inmunitaria.

30 En una realización preferida de la presente invención, la respuesta inmunitaria se ceba por administración intranasal y la respuesta inmunitaria se refuerza mediante al menos una administración intramuscular;

35 la respuesta inmunitaria se ceba por administración intranasal y la respuesta inmunitaria se refuerza mediante al menos una administración subcutánea;

la respuesta inmunitaria se ceba por administración intranasal y la respuesta inmunitaria se refuerza mediante al menos una administración intradérmica;

40 la respuesta inmunitaria se ceba por administración intranasal y la respuesta inmunitaria se refuerza mediante al menos una administración intragástrica;

la respuesta inmunitaria se ceba por administración intranasal y la respuesta inmunitaria se refuerza mediante al menos una administración oral;

45 la respuesta inmunitaria se ceba por administración intranasal y la respuesta inmunitaria se refuerza mediante al menos una administración tópica;

la respuesta inmunitaria se ceba por administración intranasal y la respuesta inmunitaria se refuerza mediante al menos una administración intranasal;

la respuesta inmunitaria se ceba por administración intramuscular y la respuesta inmunitaria se refuerza mediante al menos una administración intramuscular;

50 la respuesta inmunitaria se ceba por administración intramuscular y la respuesta inmunitaria se refuerza mediante al menos una administración subcutánea;

la respuesta inmunitaria se ceba por administración intramuscular y la respuesta inmunitaria se refuerza mediante al menos una administración intradérmica;



menos una administración tópica;

la respuesta inmunitaria se ceba por administración intragástrica y la respuesta inmunitaria se refuerza mediante al menos una administración intranasal;

5 la respuesta inmunitaria se ceba por administración oral y la respuesta inmunitaria se refuerza mediante al menos una administración intramuscular;

la respuesta inmunitaria se ceba por administración oral y la respuesta inmunitaria se refuerza mediante al menos una administración subcutánea;

la respuesta inmunitaria se ceba por administración oral y la respuesta inmunitaria se refuerza mediante al menos una administración intradérmica;

10 la respuesta inmunitaria se ceba por administración oral y la respuesta inmunitaria se refuerza mediante al menos una administración intragástrica;

la respuesta inmunitaria se ceba por administración oral y la respuesta inmunitaria se refuerza mediante al menos una administración oral;

15 la respuesta inmunitaria se ceba por administración oral y la respuesta inmunitaria se refuerza mediante al menos una administración tópica;

la respuesta inmunitaria se ceba por administración oral y la respuesta inmunitaria se refuerza mediante al menos una administración intranasal;

la respuesta inmunitaria es cebada por administración tópica y la respuesta inmunitaria se refuerza mediante al menos una administración intramuscular;

20 la respuesta inmunitaria se ceba por administración tópica y la respuesta inmunitaria se refuerza mediante al menos una administración subcutánea:

la respuesta inmunitaria se ceba con la administración tópica y la respuesta inmunitaria se refuerza mediante al menos una administración intradérmica;

25 la respuesta inmunitaria se ceba por administración tópica y la respuesta inmunitaria se refuerza mediante al menos una administración intragástrica;

la respuesta inmunitaria se ceba por administración tópica y la respuesta inmunitaria se refuerza mediante al menos una administración oral;

la respuesta inmunitaria se ceba mediante administración tópica y la respuesta inmunitaria se refuerza mediante al menos una administración tópica;

30 la respuesta inmunitaria se ceba mediante administración tópica y la respuesta inmunitaria se refuerza mediante al menos una administración intranasal.

En una realización, la respuesta inmunitaria es cebada por administración intranasal y la respuesta inmunitaria se refuerza mediante al menos una administración intramuscular.

35 En otra realización, la respuesta inmunitaria se ceba por administración intranasal y la respuesta inmunitaria se refuerza mediante al menos una administración intranasal.

En otra realización más, la respuesta inmunitaria se ceba mediante administración intramuscular y la respuesta inmunitaria se refuerza mediante al menos una administración intramuscular.

40 En otro aspecto más, la presente invención se refiere a una composición de vacuna que comprende un vector MVA como se definió antes o una combinación de vacuna que comprende un vector MVA y un vector adenoviral que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica al menos una segunda proteína antigénica o un fragmento antigénico de la misma.

45 El término "composición" se refiere a la combinación que comprende una proteína antigénica o un fragmento antigénico de la misma, o una partícula o vector similar al vector viral que comprende una construcción de ácido nucleico y al menos otro compuesto elegido entre el grupo que consiste en vehículos aceptables farmacéuticamente, excipientes farmacéuticos y coadyuvantes.

"Farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o del estado, o listado en la farmacopea de los Estados Unidos, u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales, y más en particular en humanos.

El término "portador", como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia farmacológicamente inactiva tal como, sin limitarse a ellos, un diluyente, excipiente o vehículo con el cual se administra el ingrediente terapéuticamente activo. Tales portadores farmacéuticos pueden ser líquidos o sólidos. El portador líquido incluye, pero no se limita a ellos, líquidos estériles tales como soluciones salinas en agua y aceites, incluidos los de origen petrolífero, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Las soluciones salinas y las soluciones acuosas de dextrosa y glicerol también se pueden emplear como portadores líquidos, en particular para soluciones inyectables. Una solución salina es un portador preferido cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa o intranasal mediante un nebulizador.

Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, creta, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada seca, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares.

Se describen ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E. W. Martin.

El término "coadyuvante" se refiere a agentes que aumentan, estimulan, activan, potencian o modulan la respuesta inmunitaria al ingrediente activo de la composición a nivel celular o bien humoral, p. ej. los coadyuvantes inmunológicos estimulan la respuesta del sistema inmunitario al antígeno real, pero no tienen ellos mismos ningún efecto inmunológico. Los ejemplos de tales adyuvantes incluyen, pero no se limitan a ellos, coadyuvantes inorgánicos (por ejemplo, sales metálicas inorgánicas tales como fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio), coadyuvantes orgánicos (por ejemplo, saponinas o escualeno), coadyuvantes basados en aceite (por ejemplo, coadyuvante completo de Freund y coadyuvante incompleto de Freund), coadyuvantes en partículas de citoquinas (p. ej. IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-7, IL-12, IL-18, GM-CSF y INF- $\gamma$ ) (p. ej. complejos inmunoestimuladores (ISCOMS), liposomas o microesferas biodegradables), virosomas, coadyuvantes bacterianos (p. ej. monofosforil lípido A, o péptidos de muramilo), coadyuvantes sintéticos (p. ej. copolímeros de bloques no iónicos, análogos de péptido de muramilo o lípido sintético A), o coadyuvantes de polinucleótidos sintéticos (por ejemplo, poliarginina o polilisina).

## Breve descripción de las figuras

Fig. 1: El MVA que codifica el antígeno de cadena invariante (II)-NS induce una respuesta de las células T más fuerte en ratones. Dos grupos de ratones se inmunizaron con  $2 \times 10^5$  unidades formadoras de placa (pfu) de MVA que comprende antígeno NS (panel izquierdo) y con MVA que comprende NS ligada a la cadena invariante (panel derecho). La respuesta total de células T al antígeno NS se midió mediante IFN $\gamma$  ELISpot y los números en el eje Y representan las células formadoras de manchas (SFC)/millón de esplenocitos.

Fig. 2: El MVA que codifica el antígeno de cadena invariante (II)-NS induce una respuesta de las células T más fuerte que el Adeno correspondiente en ratones. Dos grupos de ratones fueron inmunizados con MVA que codifica NS (MVA wt) o NS unida a cadena invariante humana (MVAli). Se inmunizaron dos grupos adicionales de ratones con una dosis comparable de ChAd3 que codifica NS (ChAd3 wt) o NS unida a la cadena invariante humana (ChAd3li). La respuesta total de las células T al antígeno NS se midió mediante IFN $\gamma$  ELISpot y los números en el eje Y representan las células formadoras de manchas (SFC)/millón de esplenocitos.

Fig. 3: El refuerzo con MVA que comprende NS unida a la cadena invariante aumenta la generación de células T específicas de HCV-NS en macacos. Dos grupos de 4 macacos fueron cebados con ChAd3liNS y 50 semanas después se reforzaron con MVA-NS (barras grises) o con MVA-liNS (barras negras). El panel A muestra la respuesta por IFN $\gamma$  ELISpot una semana (refuerzo pico) o 3 meses después del refuerzo (memoria). Los números en el eje Y representan células formadoras de manchas (SFC)/millón de PBMC. El panel B muestra frecuencia de CD8 más alta por IFN $\gamma$  ICS una semana después del refuerzo con MVAliNS (barras negras). Los números en el eje Y representan el porcentaje de células T CD8 específicas del antígeno que producen IFN $\gamma$ .

Fig. 4: Diagrama esquemático que muestra las cuatro isoformas de la cadena invariante humana (p33, p35, p41, p43, isoforma c) y las dos isoformas de la cadena invariante murina (p31, p41). En p35 y p43 humanos están presentes 16 restos adicionales en el extremo N debido a la iniciación alternativa de la traducción. En las isoformas p41 y p43 humanas y la isoforma p41 murina, está presente un dominio adicional debido al corte y empalme alternativo. La isoforma c humana carece de dos exones en relación con p33 y p35 humanos (tres exones en relación con p41 y p43 humano) que conducen a un desplazamiento de marco.

## Ejemplos

Ejemplo 1: El cebado con MVA que comprende NS unida a la cadena invariante (MVA-hli NS) aumenta la generación de células T específicas de HCV-NS en ratones.

Se inmunizaron dos grupos de ratones Balb/c por vía intramuscular con  $2 \times 10^5$  pfu (unidades formadoras de placas) de MVA que codifica NS o con la misma dosis de MVA que comprende NS unida a la cadena invariante humana. La región NS abarca aproximadamente dos tercios del genoma de HCV y codifica cinco proteínas distintas (NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B) que resultan de la escisión proteolítica de la poliproteína de HCV por la proteasa NS3 codificada. Diez días después de la inmunización, se recogieron los esplenocitos y se evaluó la respuesta de las células T

específicas de VHC-NS mediante IFN $\gamma$  ELISpot usando agrupamientos de péptidos que abarcan NS. La respuesta se evaluó sumando reactividades contra los seis grupos de péptidos individuales y restando el fondo (manchas contadas en pocillos testigo sin péptido). El nivel de células T específicas dirigidas a NS fue mayor en ratones cebados con la vacuna MVA basada en li (Figura 1).

- 5 Ejemplo 2: El cebado con MVA que comprende NS unida a la cadena invariante (MVA-hli NS) induce en ratones una respuesta de las células T más fuerte que el correspondiente vector adenoviral.

Se inmunizaron dos grupos de ratones Balb/c por vía intramuscular con  $2 \times 10^5$  pfu de MVA que codifica NS o con la misma dosis de MVA que comprende NS unida a la cadena invariante humana. Se inmunizaron dos grupos más de ratones con  $2 \times 10^5$  iu (unidades infecciosas) de ChAd3 que codifica NS o con la misma dosis de ChAd3 que comprende NS unida a la cadena invariante humana. La respuesta inmunitaria pico se evaluó en esplenocitos recogidos 10 y 21 días después de la inmunización con vacunas MVA y ChAd3 vectorizadas, respectivamente. La respuesta de las células T se evaluó mediante IFN $\gamma$  ELISpot usando grupos de péptidos que abarcaban NS. Los resultados (Figura 2) muestran que la vacuna MVA basada en li induce una respuesta más alta que la correspondiente vacuna CbAd3 basada en li.

- 15 Ejemplo 3: El refuerzo con MVA que comprende NS ligada a la cadena invariante (MVA-hli NS) aumenta la generación de células T específicas de HCV-NS en macacos.

Dos grupos de 4 macacos fueron cebados con ChAd3liNS y 50 semanas después fueron reforzados con MVA-NS (barras grises) o con MVA-liNS (barras negras). La dosis inyectada fue  $1 \times 10^{10}$  vp para vectores adenovirales, y  $2 \times 10^8$  pfu para vectores MVA. La respuesta inmunitaria se evaluó en PBMC recogida 1 semana (respuesta de pico) y 3 meses (respuesta de memoria) después del cebado mediante tinción IFN $\gamma$  ELISpot e IFN $\gamma$  intracelular (ICS) usando grupos de péptidos que abarcaban NS. Como se muestra en la Figura 3, se indujo una mayor respuesta de ELISpot en el grupo que recibió MVAliNS en ambos valores del tiempo (barras negras). El Panel A muestra la respuesta de IFN $\gamma$  ELISpot una semana o 3 meses después del refuerzo. El panel B muestra una frecuencia más alta de células T CD8 que producen IFN $\gamma$  mediante ICS una semana después del refuerzo con MVAliNS (barras negras).

- 25 Materiales y métodos.

Vectores Adenoviral y MVA.

El vector ChAd3 que expresa toda la región NS3-5B (NS) de HCV del genotipo 1b, cepa bk, ha sido descrito anteriormente (*Colloca et al. Sci Transl Med* 4 (115), 115rall2, 2012). El vector MVA que expresa el mismo casete se derivó y se preparó como se describió previamente (*Cottingham, M.G. et al. PLoS ONE* 3, e!638, 2008; *Di Lullo, G. et al., Virol. Methods* 156, 37 - 43, 2009). El inserto li humano (p35, NCBI Secuencia de Referencia: NM\_004355) fue sintetizado por GeneArt (Life Technologies, Paisley, RU) y luego clonado en el extremo N del transgén NS bajo el control de HCMV y BGHpA.

Animales y vacunaciones.

Todos los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo con las leyes y políticas nacionales e internacionales (Directiva del Consejo de la CEE 86/609, Decreto Legislativo Italiano 116/92). El comité de ética del Ministerio de Salud italiano aprobó esta investigación. Los procedimientos de manejo de animales se realizaron bajo anestesia y se hicieron todos los esfuerzos para minimizar el sufrimiento y reducir el número de animales. Se adquirieron ratones Balb/c o C57B1/6 de 6 semanas de edad de Charles River (Como, Italia), y se establecieron grupos experimentales de 5 ratones cada uno. Los vectores ChAd3 y MVA se administraron por vía intramuscular en el cuádriceps administrando un volumen de 50  $\mu$ l por sitio (100  $\mu$ l de volumen final).

Macacos naïve *Cynomolgus* (*macaca fascicularis*), hembras, de 11 a 19 años (intervalo de peso 3,2 a 6,5 Kg) de una colonia criada a propósito ubicada en el Instituto de Biología Celular y Neurobiología (Consejo Nacional de Investigación de Italia, Roma), fueron asignados a grupos experimentales de cuatro animales cada uno. Todas las inmunizaciones se suministraron por vía intramuscular en el músculo deltoides inyectando 0,5 ml de virus diluido en tampón de estabilización. La dosis inyectada fue  $1 \times 10^{10}$  vp para vectores adenovirales, y  $2 \times 10^8$  pfu para vectores MVA. Durante la manipulación, los animales fueron anestesiados mediante inyección i. m. de 10 mg/kg de hidrocloreuro de ketamina.

Péptidos.

Un conjunto de 494 péptidos, 15 aminoácidos de longitud, solapándose en 11 aminoácidos y que abarcan el marco de lectura abierto de NS3-NS5B (1985 a. a.) de la cepa BK del genotipo 1b del VHC, se obtuvieron de BEI Resources (Manassas, VA).

IFN $\gamma$  ELISpot *ex vivo* con muestras de ratón y macaco.

Se recubrieron placas MSIP S4510 (Millipore) con 10  $\mu$ g/ml de anticuerpo IFN $\gamma$  anti-ratón o anti-mono (ambos de U-CyTech Utrecht, Países Bajos) durante la noche a 4 °C. Después del lavado y el bloqueo, se sembraron en placa

- esplenocitos de ratón o células mononucleares de sangre periférica de macaco (PBMC) por duplicado, a dos densidades diferentes ( $2 \times 10^5$  y  $4 \times 10^5$  células/pocillo) y se estimularon durante la noche con *pools* o agrupamientos de péptidos 15meros superpuestos a una concentración final de 4  $\mu\text{g/ml}$  de cada péptido individual. Los diluyentes de péptidos DMSO (Sigma-Aldrich, Milán, Italia) y ConA (Sigma-Aldrich, Milán, Italia) se usaron respectivamente como
- 5 controles negativos y positivos. Las placas se desarrollaron mediante incubaciones posteriores con anticuerpo IFN $\gamma$  anti-ratón o anti-mono biotinilado (ambos de U-CyTech Utrecht, Holanda), conjugado con estreptavidina-fosfatasa alcalina (BD Biosciences, NJ) y finalmente con solución de 1 paso BCIP/NBT (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL). Las placas se adquirieron y se analizaron mediante un lector de placas automatizado A.EL.VIS. La respuesta de
- 10 ELISpot se consideró positiva cuando se cumplieron la totalidad de las condiciones siguientes: producción de IFN $\gamma$  presente en pocillos estimulados con Con-A; al menos 50 manchas específicas/millón de esplenocitos o PBMC a al menos un agrupamiento de péptidos; el número de manchas vistas en pozos positivos fue tres veces el número detectado en los pozos de control imitados (DMSO); y que las respuestas disminuyeron con las diluciones celulares. Los datos de ELISpot se expresaron como células formadoras de manchas IFN $\gamma$  (SFC) por millón de esplenocitos o PBMC.
- 15 Tinción intracelular (ICS) de citoquina y análisis FACS con muestras de macaco.
- Brevemente, se estimularon  $2 \times 10^6$  PBMCs de mono a 37 °C en CO $_2$  al 5% durante 15 - 20 horas usando agrupamientos de péptidos como antígeno a 2  $\mu\text{g/ml}$  de concentración final de cada péptido en presencia de anticuerpos coestimuladores CD28/CD49d antihumanos (BD Biosciences, NJ) y Brefeldin A (Sigma-Aldrich, Milán, Italia). Se usó DMSO (Sigma-Aldrich, Milán, Italia) como control negativo, y se usó enterotoxina B estafilocócica (SEB, Sigma-Aldrich, Milán, Italia) como control positivo. Después de la estimulación durante la noche, las PBMCs se tiñeron con los siguientes anticuerpos de superficie: APC anti-mono CD3, clon SP34-2; PerCp-Cy5.5 anti-mono CD4, clon L200; PE antihumano CD8, clon RPA-T8 (todos de BD Biosciences, NJ). La tinción intracelular se realizó después del
- 20 tratamiento con Cytotfix/Cytoperm y en presencia de Perm Wash (BD Biosciences, NJ) usando IFN $\gamma$  anti-humano FITC, clon MD-1 (U-CyTech Utrecht, Países Bajos). Las células teñidas se adquirieron en un citómetro de flujo FACS Canto, y se analizaron usando el software DIVA (BD Biosciences, NJ). Se adquirieron al menos 30.000 eventos cerrados CD8+, CD3+ para cada muestra.
- 25

#### Listado de secuencias

- <110> Okairos AG
- <120> Vacunas poxvirales mejoradas
- 30 <150> PCT/EP2013/055409  
<151> 15-Mar-2013
- <160> 11
- <170> BISSAP 1.0
- <210> 1
- 35 <211> 232  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens
- <220>
- <221> FUENTE
- 40 <222> 1..232  
<223> /tipo\_mol="proteína"  
/organismo="Homo sapiens"
- <400> 1

ES 2 685 922 T3

Met His Arg Arg Arg Ser Arg Ser Cys Arg Glu Asp Gln Lys Pro Val  
 1 5 10 15  
 Met Asp Asp Gln Arg Asp Leu Ile Ser Asn Asn Glu Gln Leu Pro Met  
 20 25 30  
 Leu Gly Arg Arg Pro Gly Ala Pro Glu Ser Lys Cys Ser Arg Gly Ala  
 35 40 45  
 Leu Tyr Thr Gly Phe Ser Ile Leu Val Thr Leu Leu Leu Ala Gly Gln  
 50 55 60  
 Ala Thr Thr Ala Tyr Phe Leu Tyr Gln Gln Gln Gly Arg Leu Asp Lys  
 65 70 75 80  
 Leu Thr Val Thr Ser Gln Asn Leu Gln Leu Glu Asn Leu Arg Met Lys  
 85 90 95  
 Leu Pro Lys Pro Pro Lys Pro Val Ser Lys Met Arg Met Ala Thr Pro  
 100 105 110  
 Leu Leu Met Gln Ala Leu Pro Met Gly Ala Leu Pro Gln Gly Pro Met  
 115 120 125  
 Gln Asn Ala Thr Lys Tyr Gly Asn Met Thr Glu Asp His Val Met His  
 130 135 140  
 Leu Leu Gln Asn Ala Asp Pro Leu Lys Val Tyr Pro Pro Leu Lys Gly  
 145 150 155 160  
 Ser Phe Pro Glu Asn Leu Arg His Leu Lys Asn Thr Met Glu Thr Ile  
 165 170 175  
 Asp Trp Lys Val Phe Glu Ser Trp Met His His Trp Leu Leu Phe Glu  
 180 185 190  
 Met Ser Arg His Ser Leu Glu Gln Lys Pro Thr Asp Ala Pro Pro Lys  
 195 200 205  
 Glu Ser Leu Glu Leu Glu Asp Pro Ser Ser Gly Leu Gly Val Thr Lys  
 210 215 220  
 Gln Asp Leu Gly Pro Val Pro Met  
 225 230

<210> 2  
 <211> 699  
 <212> ADN  
 5 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> FUENTE  
 <222> 1..699  
 <223> /tipo\_mol="ADN"  
 10 /organismo="Homo sapiens"

<400> 2  
 atgcacagga ggagaagcag gagctgtcgg gaagatcaga agccagtcac ggatgaccag 60  
 cgcgacctta tctccaacaa tgagcaactg cccatgctgg gccggcgccc tggggccccg 120  
 gagagcaagt gcagccgcgg agccctgtac acaggctttt ccatcctggt gactctgctc 180  
 ctcgctggcc aggccaccac cgcctacttc ctgtaccagc agcagggccg gctggacaaa 240  
 ctgacagtca cctcccagaa cctgcagctg gagaacctgc gcatgaagct tccaagcct 300  
 cccaagcctg tgagcaagat gcgcatggcc accccgctgc tgatgcaggc gctgcccattg 360  
 ggagccctgc cccaggggcc catgcagaat gccaccaagt atggcaacat gacagaggac 420  
 catgtgatgc acctgctcca gaatgctgac cccctgaagg tgtaccgcc actgaagggg 480  
 agcttcccgg agaacctgag acaccttaag aacaccatgg agaccataga ctggaaggtc 540  
 tttgagagct ggatgcacca ttggctcctg tttgaaatga gcaggcactc cttggagcaa 600  
 aagcccactg acgctccacc gaaagagtca ctggaactgg aggaccctgc ttctgggctg 660  
 ggtgtgacca agcaggatct gggcccagtc cccatgtga 699

<210> 3  
 <211> 215  
 15 <212> PRT  
 <213> Mus <ratón, género>

<220>  
 <221> FUENTE  
 <222> 1..215  
 <223> /tipo\_mol="proteina"  
 /organismo="Mus <ratón, género>"

5

<400> 3  
 Met Asp Asp Gln Arg Asp Leu Ile Ser Asn His Glu Gln Leu Pro Ile  
 1 5 10 15  
 Leu Gly Asn Arg Pro Arg Glu Pro Glu Arg Cys Ser Arg Gly Ala Leu  
 20 25 30  
 Tyr Thr Gly Val Ser Val Leu Val Ala Leu Leu Leu Ala Gly Gln Ala  
 35 40 45  
 Thr Thr Ala Tyr Phe Leu Tyr Gln Gln Gln Gly Arg Leu Asp Lys Leu  
 50 55 60  
 Thr Ile Thr Ser Gln Asn Leu Gln Leu Glu Ser Leu Arg Met Lys Leu  
 65 70 75 80  
 Pro Lys Ser Ala Lys Pro Val Ser Gln Met Arg Met Ala Thr Pro Leu  
 85 90 95  
 Leu Met Arg Pro Met Ser Met Asp Asn Met Leu Leu Gly Pro Val Lys  
 100 105 110  
 Asn Val Thr Lys Tyr Gly Asn Met Thr Gln Asp His Val Met His Leu  
 115 120 125  
 Leu Thr Arg Ser Gly Pro Leu Glu Tyr Pro Gln Leu Lys Gly Thr Phe  
 130 135 140  
 Pro Glu Asn Leu Lys His Leu Lys Asn Ser Met Asp Gly Val Asn Trp  
 145 150 155 160  
 Lys Ile Phe Glu Ser Trp Met Lys Gln Trp Leu Leu Phe Glu Met Ser  
 165 170 175  
 Lys Asn Ser Leu Glu Glu Lys Lys Pro Thr Glu Ala Pro Pro Lys Glu  
 180 185 190  
 Pro Leu Asp Met Glu Asp Leu Ser Ser Gly Leu Gly Val Thr Arg Gln  
 195 200 205  
 Glu Leu Gly Gln Val Thr Leu  
 210 215

10 <210> 4  
 <211> 648  
 <212> ADN  
 <213> Mus <ratón, género>

15 <220>  
 <221> FUENTE  
 <222> 1..648  
 <223> /tipo\_mol="ADN"  
 /organismo="Mus <ratón, género>"

<400> 4  
 atggatgacc aacgcgacct catctctaac catgaacagt tgcccatact gggcaaccgc 60  
 cctagagagc cagaaaggtg cagccgtgga gctctgtaca ccggtgtctc tgtcctggtg 120  
 gctctgctct tggctgggca ggccaccact gcttacttcc tgtaccagca acagggccgc 180  
 ctagacaagc tgaccatcac ctcccagaac ctgcaactgg agagccttcg catgaagctt 240  
 ccgaaatctg ccaaacctgt gagccagatg cggatggcta ctcccttgct gatgcgtcca 300  
 atgtccatgg ataacatgct ccttgggcct gtgaagaacg ttaccaagta cggcaacatg 360  
 acccaggacc atgtgatgca tctgctcacg aggtctggac ccctggagta cccgcagctg 420  
 aaggggaact tcccagagaa tctgaagcat cttagaact ccatggatgg cgtgaactgg 480  
 aagatcttcg agagctggat gaagcagtgg ctcttgtttg agatgagcaa gaactccctg 540  
 gaggagaaga agcccaccga ggctccacct aaagagccac tggacatgga agacctatct 600  
 20 tctggcctgg gagtgaccag gcaggaactg ggtcaagtca ccctgtga 648

ES 2 685 922 T3

<210> 5  
 <211> 296  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5 <220>  
 <221> FUENTE  
 <222> 1..296  
 <223> /tipo\_mol="proteina"  
 /organismo="Homo sapiens"

10 <400> 5  
 Met His Arg Arg Arg Ser Arg Ser Cys Arg Glu Asp Gln Lys Pro Val  
 1 5 10 15  
 Met Asp Asp Gln Arg Asp Leu Ile Ser Asn Asn Glu Gln Leu Pro Met  
 20 25 30  
 Leu Gly Arg Arg Pro Gly Ala Pro Glu Ser Lys Cys Ser Arg Gly Ala  
 35 40 45  
 Leu Tyr Thr Gly Phe Ser Ile Leu Val Thr Leu Leu Leu Ala Gly Gln  
 50 55 60  
  
 Ala Thr Thr Ala Tyr Phe Leu Tyr Gln Gln Gln Gly Arg Leu Asp Lys  
 65 70 75 80  
 Leu Thr Val Thr Ser Gln Asn Leu Gln Leu Glu Asn Leu Arg Met Lys  
 85 90 95  
 Leu Pro Lys Pro Pro Lys Pro Val Ser Lys Met Arg Met Ala Thr Pro  
 100 105 110  
 Leu Leu Met Gln Ala Leu Pro Met Gly Ala Leu Pro Gln Gly Pro Met  
 115 120 125  
 Gln Asn Ala Thr Lys Tyr Gly Asn Met Thr Glu Asp His Val Met His  
 130 135 140  
 Leu Leu Gln Asn Ala Asp Pro Leu Lys Val Tyr Pro Pro Leu Lys Gly  
 145 150 155 160  
 Ser Phe Pro Glu Asn Leu Arg His Leu Lys Asn Thr Met Glu Thr Ile  
 165 170 175  
 Asp Trp Lys Val Phe Glu Ser Trp Met His His Trp Leu Leu Phe Glu  
 180 185 190  
 Met Ser Arg His Ser Leu Glu Gln Lys Pro Thr Asp Ala Pro Pro Lys  
 195 200 205  
 Val Leu Thr Lys Cys Gln Glu Val Ser His Ile Pro Ala Val His  
 210 215 220  
 Pro Gly Ser Phe Arg Pro Lys Cys Asp Glu Asn Gly Asn Tyr Leu Pro  
 225 230 235 240  
 Leu Gln Cys Tyr Gly Ser Ile Gly Tyr Cys Trp Cys Val Phe Pro Asn  
 245 250 255  
 Gly Thr Glu Val Pro Asn Thr Arg Ser Arg Gly His His Asn Cys Ser  
 260 265 270  
 Glu Ser Leu Glu Leu Glu Asp Pro Ser Ser Gly Leu Gly Val Thr Lys  
 275 280 285  
 Gln Asp Leu Gly Pro Val Pro Met  
 290 295

15 <210> 6  
 <211> 891  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

20 <220>  
 <221> FUENTE  
 <222> 1..891  
 <223> /tipo\_mol="ADN"  
 /organismo="Homo sapiens"

<400> 6

ES 2 685 922 T3

atgcacagga ggagaagcag gagctgtcgg gaagatcaga agccagtcat ggatgaccag 60  
 cgcgacctta tctccaacaa tgagcaactg cccatgctgg gccggcgccc tggggccccg 120  
 gagagcaagt gcagccgcgg agccctgtac acaggctttt ccatcctggt gactctgctc 180  
 ctgctggcc aggccaccac cgcctacttc ctgtaccagc agcagggccg gctggacaaa 240  
 ctgacagtca cctcccagaa cctgcagctg gagaacctgc gcatgaagct tccaagcct 300  
 cccaagcctg tgagcaagat gcgcatggcc accccgctgc tgatgcaggc gctgcccag 360  
 ggagccctgc cccaggggcc catgcagaat gccaccaagt atggcaacat gacagaggac 420  
 catgtgatgc acctgctcca gaatgctgac cccctgaagg tgtaccgcc actgaagggg 480  
 agcttcccg agaacctgag acaccttaag aacaccatgg agaccataga ctggaaggtc 540  
 tttgagagct ggatgcacca ttggctcctg tttgaaatga gcaggcactc cttggagcaa 600  
 aagcccactg acgctccacc gaaagtactg accaagtgcc aggaagaggt cagccacatc 660  
 cctgctgtcc acccgggttc attcaggccc aagtgcgacg agaacggcaa ctatctgcca 720  
 ctccagtgct atgggagcat cggctactgc tgggtgtgtct tcccacacgg cacggaggtc 780  
 cccaacacca gaagccgcgg gcaccataac tgcagtgagt cactggaact ggaggacccg 840  
 tcttctgggc tgggtgtgac caagcaggat ctgggccag tcccctgtg a 891

5 <210> 7  
 <211> 279  
 <212> PRT  
 <213> Mus <ratón, género>

10 <220>  
 <221> FUENTE  
 <222> 1..279  
 <223> /tipo\_mol="proteína"  
 /organismo="Mus <ratón, género>"

<400> 7

ES 2 685 922 T3

Met Asp Asp Gln Arg Asp Leu Ile Ser Asn His Glu Gln Leu Pro Ile  
 1 5 10 15  
 Leu Gly Asn Arg Pro Arg Glu Pro Glu Arg Cys Ser Arg Gly Ala Leu  
 20 25 30  
 Tyr Thr Gly Val Ser Val Leu Val Ala Leu Leu Ala Gly Gln Ala  
 35 40 45  
 Thr Thr Ala Tyr Phe Leu Tyr Gln Gln Gln Gly Arg Leu Asp Lys Leu  
 50 55 60  
 Thr Ile Thr Ser Gln Asn Leu Gln Leu Glu Ser Leu Arg Met Lys Leu  
 65 70 75 80  
 Pro Lys Ser Ala Lys Pro Val Ser Gln Met Arg Met Ala Thr Pro Leu  
 85 90 95  
 Leu Met Arg Pro Met Ser Met Asp Asn Met Leu Leu Gly Pro Val Lys  
 100 105 110  
 Asn Val Thr Lys Tyr Gly Asn Met Thr Gln Asp His Val Met His Leu  
 115 120 125  
 Leu Thr Arg Ser Gly Pro Leu Glu Tyr Pro Gln Leu Lys Gly Thr Phe  
 130 135 140  
 Pro Glu Asn Leu Lys His Leu Lys Asn Ser Met Asp Gly Val Asn Trp  
 145 150 155 160  
 Lys Ile Phe Glu Ser Trp Met Lys Gln Trp Leu Leu Phe Glu Met Ser  
 165 170 175  
 Lys Asn Ser Leu Glu Glu Lys Lys Pro Thr Glu Ala Pro Pro Lys Val  
 180 185 190  
 Leu Thr Lys Cys Gln Glu Glu Val Ser His Ile Pro Ala Val Tyr Pro  
 195 200 205  
 Gly Ala Phe Arg Pro Lys Cys Asp Glu Asn Gly Asn Tyr Leu Pro Leu  
 210 215 220  
 Gln Cys His Gly Ser Thr Gly Tyr Cys Trp Cys Val Phe Pro Asn Gly  
 225 230 235 240  
 Thr Glu Val Pro His Thr Lys Ser Arg Gly Arg His Asn Cys Ser Glu  
 245 250 255  
 Pro Leu Asp Met Glu Asp Leu Ser Ser Gly Leu Gly Val Thr Arg Gln  
 260 265 270  
 Glu Leu Gly Gln Val Thr Leu  
 275

<210> 8

<211> 840

<212> ADN

5 <213> Mus <ratón, género>

<220>

<221> FUENTE

<222> 1..840

<223> /tipo\_mol="ADN"

10 /organismo="Mus <ratón, género>"

<400> 8

ES 2 685 922 T3

```

atggatgacc aacgcgacct catctctaac catgaacagt tgccataact gggcaaccgc      60
cctagagagc cagaaagggtg cagccgtgga gctctgtaca ccgggtgtctc tgtcctgggtg    120
gctctgctct tggctgggca ggccaccact gcttacttcc tgtaccagca acagggccgc      180
ctagacaagc tgaccatcac ctcccagaac ctgcaactgg agagccttcg catgaagctt      240
ccgaaatctg ccaaacctgt gagccagatg cggatggcta ctcccttgct gatgctgcca      300
atgtccatgg ataacatgct ccttgggcct gtgaagaacg ttaccaagta cggcaacatg      360
accagggacc atgtgatgca tctgctcacg aggtctggac ccctggagta cccgcagctg      420
aaggggacct tcccagagaa tctgaagcat cttaagaact ccatggatgg cgtgaactgg      480
aagatcttcg agagctggat gaagcagtgg ctcttgttg agatgagcaa gaactccctg      540
gaggagaaga agcccaccga ggctccacct aaagtactga ccaagtgcca ggaagaagtc      600
agccacatcc ctgcogtcta cccgggtgog ttccgtccca agtgcgacga gaacggtaac      660
tatttgccac tccagtgcc a ggggagcact ggctactgct ggtgtgtgtt ccccaacggc      720
actgaggttc ctcacaccaa gagccgcggg cgcataact gcagtgagcc actggacatg      780
gaagacctat cttctggcct gggagtgacc aggcaggaac tgggtcaagt caccctgtga      840

```

<210> 9

<211> 160

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> FUENTE

<222> 1..160

10 <223> /tipo\_mol="proteina"  
/organismo="Homo sapiens"

<400> 9

```

Met His Arg Arg Arg Ser Arg Ser Cys Arg Glu Asp Gln Lys Pro Val
 1                    5                10                15
Met Asp Asp Gln Arg Asp Leu Ile Ser Asn Asn Glu Gln Leu Pro Met
 20                25                30
Leu Gly Arg Arg Pro Gly Ala Pro Glu Ser Lys Cys Ser Arg Gly Ala
 35                40                45
Leu Tyr Thr Gly Phe Ser Ile Leu Val Thr Leu Leu Leu Ala Gly Gln
 50                55                60
Ala Thr Thr Ala Tyr Phe Leu Tyr Gln Gln Gln Gly Arg Leu Asp Lys
 65                70                75                80
Leu Thr Val Thr Ser Gln Asn Leu Gln Leu Glu Asn Leu Arg Met Lys
 85                90                95
Leu Pro Lys Pro Pro Lys Pro Val Ser Lys Met Arg Met Ala Thr Pro

          100                105                110
Leu Leu Met Gln Ala Leu Pro Met Gly Ala Leu Pro Gln Gly Pro Met
          115                120                125
Gln Asn Ala Thr Lys Tyr Gly Asn Met Thr Glu Asp His Val Met His
          130                135                140
Leu Leu Gln Ser His Trp Asn Trp Arg Thr Arg Leu Leu Gly Trp Val
          145                150                155                160

```

15 <210> 10

<211> 483

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

20 <221> FUENTE

<222> 1..483

<223> /tipo\_mol="ADN"

ES 2 685 922 T3

/organismo="Homo sapiens"

<400> 10  
 atgcacagga ggagaagcag gagctgtcgg gaagatcaga agccagtcac ggatgaccag 60  
 cgcgacctta tctccaacaa tgagcaactg cccatgctgg gccggcgccc tggggccccg 120  
 gagagcaagt gcagccgcgg agccctgtac acaggctttt ccatcctggt gactctgctc 180  
 ctcgctggcc aggccaccac cgcctacttc ctgtaccagc agcagggccg gctggacaaa 240  
 ctgacagtca cctcccagaa cctgcagctg gagaacctgc gcatgaagct tcccaagcct 300  
 cccaagcctg tgagcaagat gcgcatggcc accccgctgc tgatgcagge gctgcccatg 360  
 ggagccctgc cccaggggcc catgcagaat gccaccaagt atggcaacat gacagaggac 420  
 catgtgatgc acctgctcca gagtactgga aactggagga cccgtcttct gggctgggtg 480  
 tga 483

5 <210> 11  
 <211> 1985  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <221> FUENTE  
 <222> 1..1985  
 <223> /tipo\_mol="proteina" /nota="polipéptido Met-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B"  
 /organismo="Secuencia artificial"

<400> 11  
 Met Ala Pro Ile Thr Ala Tyr Ser Gln Gln Thr Arg Gly Leu Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Cys Ile Ile Thr Ser Leu Thr Gly Arg Asp Lys Asn Gln Val Glu Gly  
 20 25 30  
 Glu Val Gln Val Val Ser Thr Ala Thr Gln Ser Phe Leu Ala Thr Cys  
 35 40 45  
 Val Asn Gly Val Cys Trp Thr Val Tyr His Gly Ala Gly Ser Lys Thr  
 50 55 60  
 Leu Ala Gly Pro Lys Gly Pro Ile Thr Gln Met Tyr Thr Asn Val Asp  
 65 70 75 80  
 Gln Asp Leu Val Gly Trp Gln Ala Pro Pro Gly Ala Arg Ser Leu Thr

15

ES 2 685 922 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| Pro | Cys | Thr | Cys | Gly | Ser | Ser | Asp | Leu | Tyr | Leu | Val | Thr | Arg | His | Ala |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |
| Asp | Val | Ile | Pro | Val | Arg | Arg | Arg | Gly | Asp | Ser | Arg | Gly | Ser | Leu | Leu |
|     |     | 115 |     |     |     |     |     | 120 |     |     |     | 125 |     |     |     |
| Ser | Pro | Arg | Pro | Val | Ser | Tyr | Leu | Lys | Gly | Ser | Ser | Gly | Gly | Pro | Leu |
|     |     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     | 140 |     |     |     |     |
| Leu | Cys | Pro | Ser | Gly | His | Ala | Val | Gly | Ile | Phe | Arg | Ala | Ala | Val | Cys |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |
| Thr | Arg | Gly | Val | Ala | Lys | Ala | Val | Asp | Phe | Val | Pro | Val | Glu | Ser | Met |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |
| Glu | Thr | Thr | Met | Arg | Ser | Pro | Val | Phe | Thr | Asp | Asn | Ser | Ser | Pro | Pro |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |
| Ala | Val | Pro | Gln | Ser | Phe | Gln | Val | Ala | His | Leu | His | Ala | Pro | Thr | Gly |
|     |     | 195 |     |     |     |     |     | 200 |     |     |     | 205 |     |     |     |
| Ser | Gly | Lys | Ser | Thr | Lys | Val | Pro | Ala | Ala | Tyr | Ala | Ala | Gln | Gly | Tyr |
|     |     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
| Lys | Val | Leu | Val | Leu | Asn | Pro | Ser | Val | Ala | Ala | Thr | Leu | Gly | Phe | Gly |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |
| Ala | Tyr | Met | Ser | Lys | Ala | His | Gly | Ile | Asp | Pro | Asn | Ile | Arg | Thr | Gly |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |
| Val | Arg | Thr | Ile | Thr | Thr | Gly | Ala | Pro | Val | Thr | Tyr | Ser | Thr | Tyr | Gly |
|     |     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |
| Lys | Phe | Leu | Ala | Asp | Gly | Gly | Cys | Ser | Gly | Gly | Ala | Tyr | Asp | Ile | Ile |
|     |     | 275 |     |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |
| Ile | Cys | Asp | Glu | Cys | His | Ser | Thr | Asp | Ser | Thr | Thr | Ile | Leu | Gly | Ile |
|     |     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |
| Gly | Thr | Val | Leu | Asp | Gln | Ala | Glu | Thr | Ala | Gly | Ala | Arg | Leu | Val | Val |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |
| Leu | Ala | Thr | Ala | Thr | Pro | Pro | Gly | Ser | Val | Thr | Val | Pro | His | Pro | Asn |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     |     | 330 |     |     |     | 335 |     |
| Ile | Glu | Glu | Val | Ala | Leu | Ser | Asn | Thr | Gly | Glu | Ile | Pro | Phe | Tyr | Gly |
|     |     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |
| Lys | Ala | Ile | Pro | Ile | Glu | Ala | Ile | Arg | Gly | Gly | Arg | His | Leu | Ile | Phe |
|     |     | 355 |     |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |
| Cys | His | Ser | Lys | Lys | Lys | Cys | Asp | Glu | Leu | Ala | Ala | Lys | Leu | Ser | Gly |
|     |     | 370 |     |     |     |     | 375 |     |     |     | 380 |     |     |     |     |
| Leu | Gly | Ile | Asn | Ala | Val | Ala | Tyr | Tyr | Arg | Gly | Leu | Asp | Val | Ser | Val |
| 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |
| Ile | Pro | Thr | Ile | Gly | Asp | Val | Val | Val | Val | Ala | Thr | Asp | Ala | Leu | Met |
|     |     |     |     | 405 |     |     |     |     |     | 410 |     |     |     | 415 |     |
| Thr | Gly | Tyr | Thr | Gly | Asp | Phe | Asp | Ser | Val | Ile | Asp | Cys | Asn | Thr | Cys |
|     |     |     |     | 420 |     |     |     |     | 425 |     |     |     |     | 430 |     |
| Val | Thr | Gln | Thr | Val | Asp | Phe | Ser | Leu | Asp | Pro | Thr | Phe | Thr | Ile | Glu |
|     |     |     |     | 435 |     |     |     |     | 440 |     |     |     |     | 445 |     |
| Thr | Thr | Thr | Val | Pro | Gln | Asp | Ala | Val | Ser | Arg | Ser | Gln | Arg | Arg | Gly |
|     |     |     |     | 450 |     |     | 455 |     |     |     | 460 |     |     |     |     |
| Arg | Thr | Gly | Arg | Gly | Arg | Arg | Gly | Ile | Tyr | Arg | Phe | Val | Thr | Pro | Gly |
| 465 |     |     |     |     | 470 |     |     |     |     | 475 |     |     |     |     | 480 |
| Glu | Arg | Pro | Ser | Gly | Met | Phe | Asp | Ser | Ser | Val | Leu | Cys | Glu | Cys | Tyr |
|     |     |     |     | 485 |     |     |     |     |     | 490 |     |     |     | 495 |     |
| Asp | Ala | Gly | Cys | Ala | Trp | Tyr | Glu | Leu | Thr | Pro | Ala | Glu | Thr | Ser | Val |
|     |     |     |     | 500 |     |     |     |     | 505 |     |     |     |     | 510 |     |
| Arg | Leu | Arg | Ala | Tyr | Leu | Asn | Thr | Pro | Gly | Leu | Pro | Val | Cys | Gln | Asp |
|     |     |     |     | 515 |     |     |     | 520 |     |     |     |     | 525 |     |     |
| His | Leu | Glu | Phe | Trp | Glu | Ser | Val | Phe | Thr | Gly | Leu | Thr | His | Ile | Asp |
|     |     |     |     | 530 |     |     |     | 535 |     |     |     | 540 |     |     |     |
| Ala | His | Phe | Leu | Ser | Gln | Thr | Lys | Gln | Ala | Gly | Asp | Asn | Phe | Pro | Tyr |
| 545 |     |     |     |     | 550 |     |     |     |     | 555 |     |     |     |     | 560 |
| Leu | Val | Ala | Tyr | Gln | Ala | Thr | Val | Cys | Ala | Arg | Ala | Gln | Ala | Pro | Pro |
|     |     |     |     | 565 |     |     |     |     |     | 570 |     |     |     | 575 |     |
| Pro | Ser | Trp | Asp | Gln | Met | Trp | Lys | Cys | Leu | Ile | Arg | Leu | Lys | Pro | Thr |
|     |     |     |     | 580 |     |     |     |     | 585 |     |     |     |     | 590 |     |

ES 2 685 922 T3

Leu His Gly Pro Thr Pro Leu Leu Tyr Arg Leu Gly Ala Val Gln Asn  
 595 600 605  
 Glu Val Thr Leu Thr His Pro Ile Thr Lys Tyr Ile Met Ala Cys Met  
 610 615 620  
 Ser Ala Asp Leu Glu Val Val Thr Ser Thr Trp Val Leu Val Gly Gly  
 625 630 635 640  
 Val Leu Ala Ala Leu Ala Ala Tyr Cys Leu Thr Thr Gly Ser Val Val  
 645 650 655  
 Ile Val Gly Arg Ile Ile Leu Ser Gly Arg Pro Ala Ile Val Pro Asp  
 660 665 670  
 Arg Glu Phe Leu Tyr Gln Glu Phe Asp Glu Met Glu Glu Cys Ala Ser  
 675 680 685  
 His Leu Pro Tyr Ile Glu Gln Gly Met Gln Leu Ala Glu Gln Phe Lys  
 690 695 700  
 Gln Lys Ala Leu Gly Leu Leu Gln Thr Ala Thr Lys Gln Ala Glu Ala  
 705 710 715 720  
 Ala Ala Pro Val Val Glu Ser Lys Trp Arg Ala Leu Glu Thr Phe Trp  
 725 730 735  
 Ala Lys His Met Trp Asn Phe Ile Ser Gly Ile Gln Tyr Leu Ala Gly  
 740 745 750  
 Leu Ser Thr Leu Pro Gly Asn Pro Ala Ile Ala Ser Leu Met Ala Phe  
 755 760 765  
 Thr Ala Ser Ile Thr Ser Pro Leu Thr Thr Gln Ser Thr Leu Leu Phe  
 770 775 780  
 Asn Ile Leu Gly Gly Trp Val Ala Ala Gln Leu Ala Pro Pro Ser Ala  
 785 790 795 800  
 Ala Ser Ala Phe Val Gly Ala Gly Ile Ala Gly Ala Ala Val Gly Ser  
 805 810 815  
 Ile Gly Leu Gly Lys Val Leu Val Asp Ile Leu Ala Gly Tyr Gly Ala  
 820 825 830  
 Gly Val Ala Gly Ala Leu Val Ala Phe Lys Val Met Ser Gly Glu Met  
 835 840 845  
 Pro Ser Thr Glu Asp Leu Val Asn Leu Leu Pro Ala Ile Leu Ser Pro  
 850 855 860  
 Gly Ala Leu Val Val Gly Val Val Cys Ala Ala Ile Leu Arg Arg His  
 865 870 875 880  
 Val Gly Pro Gly Glu Gly Ala Val Gln Trp Met Asn Arg Leu Ile Ala  
 885 890 895  
 Phe Ala Ser Arg Gly Asn His Val Ser Pro Thr His Tyr Val Pro Glu  
 900 905 910  
 Ser Asp Ala Ala Ala Arg Val Thr Gln Ile Leu Ser Ser Leu Thr Ile  
 915 920 925  
 Thr Gln Leu Leu Lys Arg Leu His Gln Trp Ile Asn Glu Asp Cys Ser  
 930 935 940  
 Thr Pro Cys Ser Gly Ser Trp Leu Arg Asp Val Trp Asp Trp Ile Cys  
 945 950 955 960  
 Thr Val Leu Thr Asp Phe Lys Thr Trp Leu Gln Ser Lys Leu Leu Pro  
 965 970 975  
 Gln Leu Pro Gly Val Pro Phe Phe Ser Cys Gln Arg Gly Tyr Lys Gly  
 980 985 990  
 Val Trp Arg Gly Asp Gly Ile Met Gln Thr Thr Cys Pro Cys Gly Ala  
 995 1000 1005  
 Gln Ile Thr Gly His Val Lys Asn Gly Ser Met Arg Ile Val Gly Pro  
 1010 1015 1020  
 Lys Thr Cys Ser Asn Thr Trp His Gly Thr Phe Pro Ile Asn Ala Tyr  
 1025 1030 1035 1040  
 Thr Thr Gly Pro Cys Thr Pro Ser Pro Ala Pro Asn Tyr Ser Arg Ala  
 1045 1050 1055  
 Leu Trp Arg Val Ala Ala Glu Glu Tyr Val Glu Val Thr Arg Val Gly  
 1060 1065 1070  
 Asp Phe His Tyr Val Thr Gly Met Thr Thr Asp Asn Val Lys Cys Pro  
 1075 1080 1085  
 Cys Gln Val Pro Ala Pro Glu Phe Phe Thr Glu Val Asp Gly Val Arg



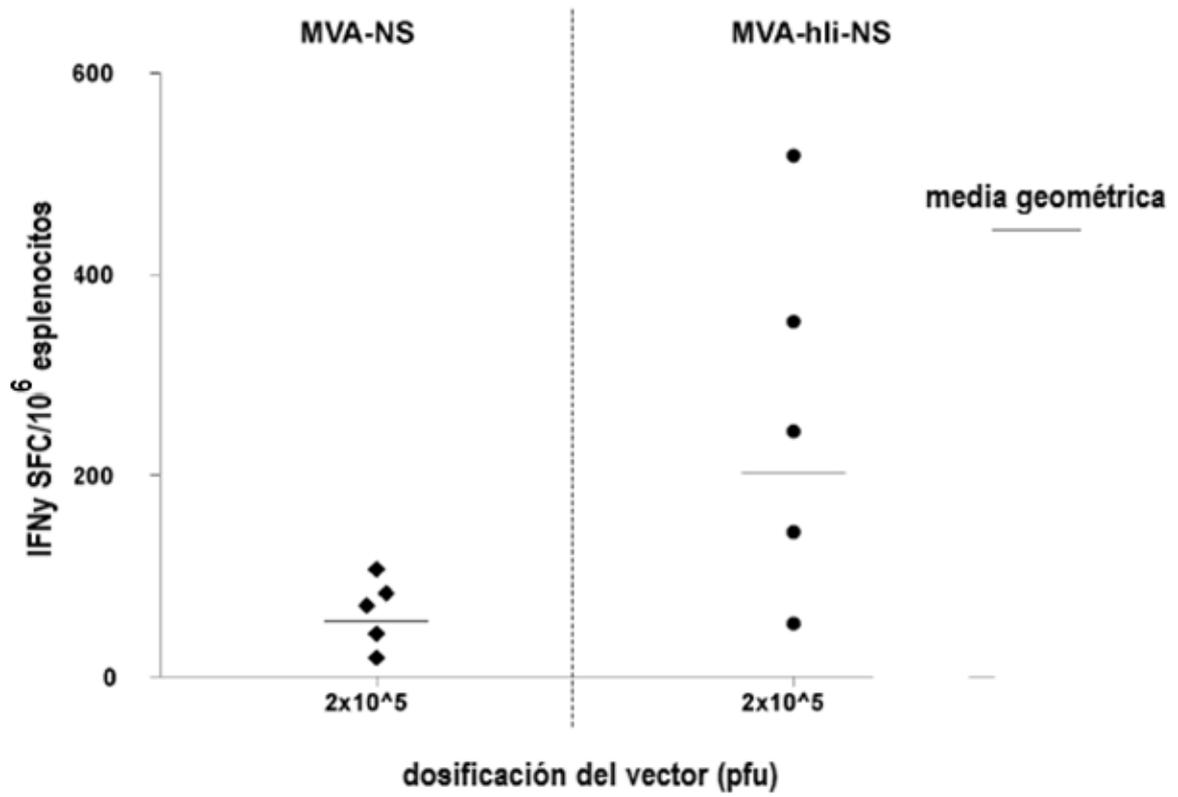
ES 2 685 922 T3

Thr Trp Lys Ser Lys Lys Asn Pro Met Gly Phe Ser Tyr Asp Thr Arg  
 1605 1610 1615  
 Cys Phe Asp Ser Thr Val Thr Glu Asn Asp Ile Arg Val Glu Glu Ser  
 1620 1625 1630  
 Ile Tyr Gln Cys Cys Asp Leu Ala Pro Glu Ala Arg Gln Ala Ile Lys  
 1635 1640 1645  
 Ser Leu Thr Glu Arg Leu Tyr Ile Gly Gly Pro Leu Thr Asn Ser Lys  
 1650 1655 1660  
 Gly Gln Asn Cys Gly Tyr Arg Arg Cys Arg Ala Ser Gly Val Leu Thr  
 1665 1670 1675 1680  
 Thr Ser Cys Gly Asn Thr Leu Thr Cys Tyr Leu Lys Ala Ser Ala Ala  
 1685 1690 1695  
 Cys Arg Ala Ala Lys Leu Gln Asp Cys Thr Met Leu Val Asn Ala Ala  
 1700 1705 1710  
 Gly Leu Val Val Ile Cys Glu Ser Ala Gly Thr Gln Glu Asp Ala Ala  
 1715 1720 1725  
 Ser Leu Arg Val Phe Thr Glu Ala Met Thr Arg Tyr Ser Ala Pro Pro  
 1730 1735 1740  
 Gly Asp Pro Pro Gln Pro Glu Tyr Asp Leu Glu Leu Ile Thr Ser Cys  
 1745 1750 1755 1760  
 Ser Ser Asn Val Ser Val Ala His Asp Ala Ser Gly Lys Arg Val Tyr  
 1765 1770 1775  
 Tyr Leu Thr Arg Asp Pro Thr Thr Pro Leu Ala Arg Ala Ala Trp Glu  
 1780 1785 1790  
 Thr Ala Arg His Thr Pro Val Asn Ser Trp Leu Gly Asn Ile Ile Met  
 1795 1800 1805  
 Tyr Ala Pro Thr Leu Trp Ala Arg Met Ile Leu Met Thr His Phe Phe  
 1810 1815 1820  
 Ser Ile Leu Leu Ala Gln Glu Gln Leu Glu Lys Ala Leu Asp Cys Gln  
 1825 1830 1835 1840  
 Ile Tyr Gly Ala Cys Tyr Ser Ile Glu Pro Leu Asp Leu Pro Gln Ile  
 1845 1850 1855  
 Ile Glu Arg Leu His Gly Leu Ser Ala Phe Ser Leu His Ser Tyr Ser  
 1860 1865 1870  
 Pro Gly Glu Ile Asn Arg Val Ala Ser Cys Leu Arg Lys Leu Gly Val  
 1875 1880 1885  
 Pro Pro Leu Arg Val Trp Arg His Arg Ala Arg Ser Val Arg Ala Arg  
 1890 1895 1900  
 Leu Leu Ser Gln Gly Gly Arg Ala Ala Thr Cys Gly Lys Tyr Leu Phe  
 1905 1910 1915 1920  
 Asn Trp Ala Val Lys Thr Lys Leu Lys Leu Thr Pro Ile Pro Ala Ala  
 1925 1930 1935  
 Ser Gln Leu Asp Leu Ser Gly Trp Phe Val Ala Gly Tyr Ser Gly Gly  
 1940 1945 1950  
 Asp Ile Tyr His Ser Leu Ser Arg Ala Arg Pro Arg Trp Phe Met Leu  
 1955 1960 1965  
 Cys Leu Leu Leu Ser Val Gly Val Gly Ile Tyr Leu Leu Pro Asn  
 1970 1975 1980  
 Arg  
 1985

**REIVINDICACIONES**

1. Un vector Vaccinia Ankara Modificado (MVA) que comprende una construcción de ácido nucleico, comprendiendo la construcción de ácido nucleico:
- 5 (i) una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una proteína antigénica o un fragmento antigénico de la misma, unida operativamente a
- (ii) un ácido nucleico que codifica al menos una cadena invariante;
- en donde la al menos una cadena invariante tiene al menos un 85% de identidad de secuencia con una de las isoformas humanas p35 de SEQ ID NO:1, p43 de SEQ ID NO: 5 o c de SEQ ID NO: 9 o una de las isoformas murinas p31 de SEQ ID NO: 3 o p41 de SEQ ID NO: 7.
- 10 2. El vector MVA según la reivindicación 1, en donde la al menos una cadena variante codificada es de origen mamífero.
3. El vector MVA según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde la al menos una cadena invariante codificada es la isoforma humana p35 de SEQ ID NO:1, p43 de SEQ ID NO: 5 o c de SEQ ID NO: 9 o una de las isoformas murinas p31 de SEQ ID NO: 3 o p41 de SEQ ID NO: 7.
- 15 4. El vector MVA según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la al menos una cadena invariante codificada tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con SEQ ID NO 1 o SEQ ID NO 3.
5. El vector MVA según la reivindicación 4, en el que la al menos una cadena invariante codificada tiene al menos un 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO 1 o SEQ ID NO 3.
- 20 6. El vector MVA según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la al menos una proteína antigénica es una proteína de un virus, una bacteria, un protista o un parásito multicelular.
7. El vector MVA según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para su uso en el cebado o el refuerzo de una respuesta inmunitaria.
8. El vector MVA según el uso de la reivindicación 7, en el que el cebado de la respuesta inmunitaria es parte de un régimen de vacunación *prime-boost* (cebado-refuerzo) homólogo.
- 25 9. El vector MVA según el uso de la reivindicación 7, en el que el cebado de la respuesta inmunitaria es parte de un régimen de vacunación *prime-boost* (cebado-refuerzo) heterólogo.
10. Una combinación de vacuna que comprende
- (a) un vector MVA que comprende una construcción de ácido nucleico, comprendiendo la construcción de ácido nucleico
- 30 (i) una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una primera proteína antigénica o un fragmento antigénico de la misma, unida operativamente a
- (ii) un ácido nucleico que codifica al menos una cadena invariante
- en donde la al menos una cadena invariante tiene al menos un 85% de identidad de secuencia con la isoforma humana p35 de SEQ ID NO:1, p43 de SEQ ID NO: 5 o c de SEQ ID NO: 9 o una de las isoformas murinas p31 de SEQ ID NO: 3 o p41 de SEQ ID NO: 7
- 35 y
- (b) un vector adenoviral que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica al menos una segunda proteína antigénica o fragmento antigénico de la misma,
- en donde al menos un epítipo de la primera proteína antigénica o fragmento antigénico de la misma es reconocido por el mismo anticuerpo, célula T o célula B para la segunda proteína antigénica o fragmento de la misma.
- 40 11. La combinación de vacuna según la reivindicación 10, en la que la cadena es la isoforma humana p35 de SEQ ID NO:1, p43 de SEQ ID NO: 5 o c de SEQ ID NO: 9 o una de las isoformas murinas p31 de SEQ ID NO: 3 o p41 de SEQ ID NO: 7.
12. La combinación de vacuna según la reivindicación 10, en la que la cadena invariante tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con SEQ ID NO 1 o SEQ ID NO 3.
- 45 13. La combinación de vacuna según la reivindicación 12, en la que la cadena invariante tiene al menos un 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO 1 o SEQ ID NO 3.

14. La combinación de vacuna según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, en la que el vector adenoviral es un vector adenoviral derivado de los grandes simios no humanos, preferiblemente un vector adenoviral de chimpancé o de bonobo.
- 5 15. La combinación de vacuna según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, para su uso en un régimen de vacunación *prime-boost*.
16. El vector MVA según la reivindicación 1 para su uso como medicamento.
17. El vector MVA según la reivindicación 1 para su uso en la estimulación de una respuesta inmunitaria en un sujeto.



**Figura 1**

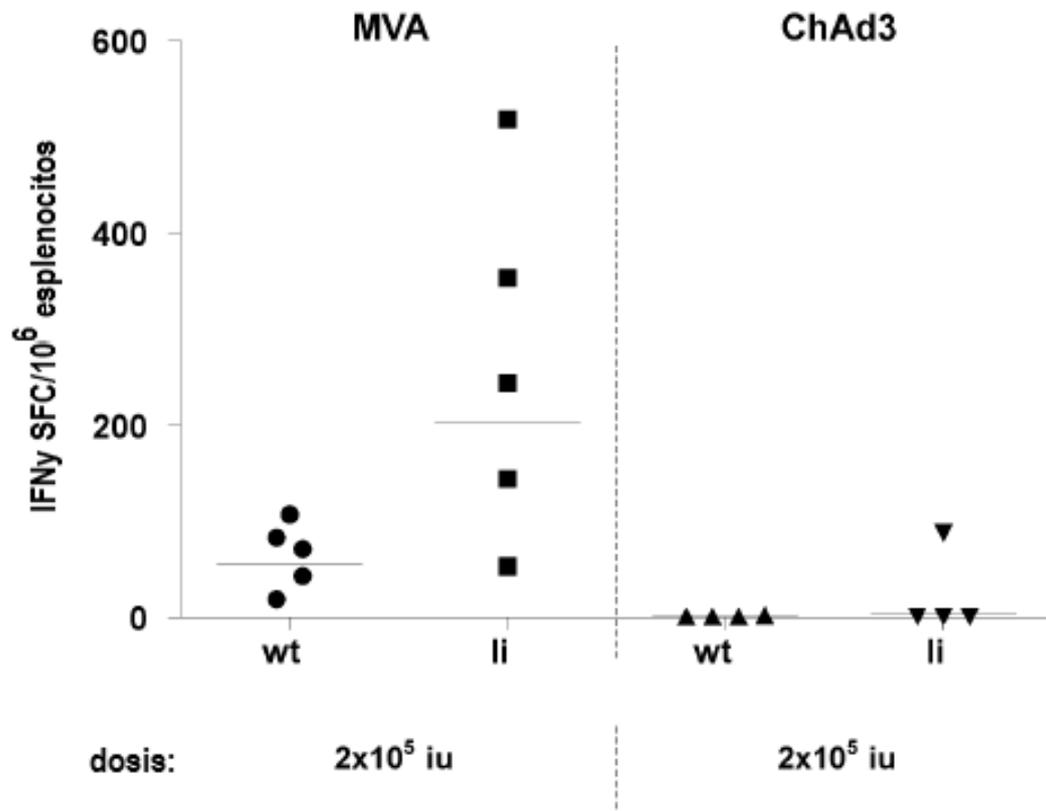


Figura 2

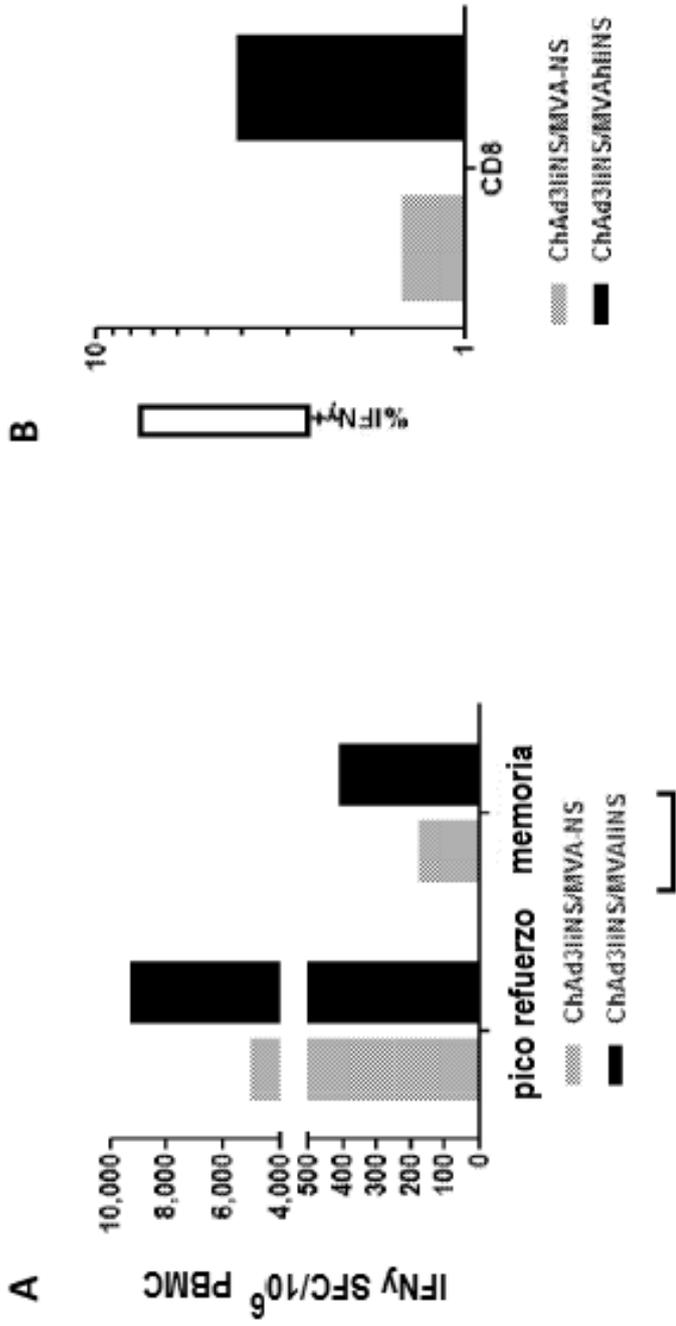
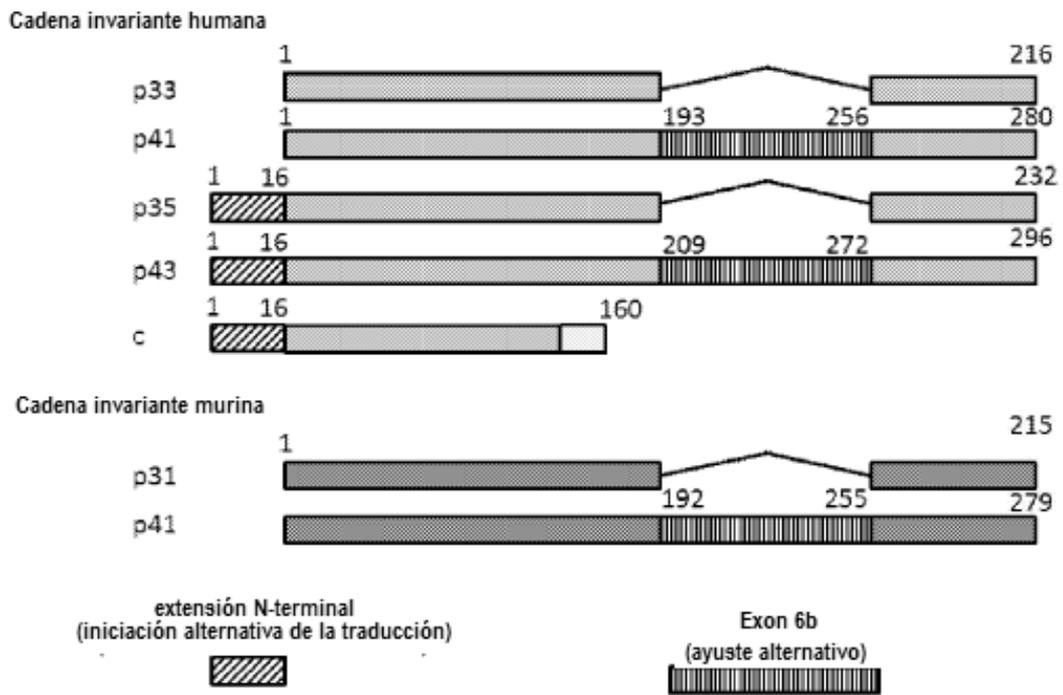


Figura 3



**Figura 4**