

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 806 263**

51 Int. Cl.:

A61P 31/20

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.02.2012** **PCT/US2012/024905**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.08.2012** **WO12109668**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.02.2012** **E 12744961 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2020** **EP 2672992**

54 Título: **Molécula de ácido nucleico que codifica la proteína del núcleo del virus de la hepatitis B y vacuna que comprende la misma**

30 Prioridad:

11.02.2011 US 201161442162 P

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

17.02.2021

73 Titular/es:

**THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF
PENNSYLVANIA (100.0%)
3160 Chestnut Street, Suite 200
Philadelphia, PA 19104-6283, US**

72 Inventor/es:

**WEINER, DAVID B;
YAN, JIAN y
OBENG-ADJEI, NYAMEKYE**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones:

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

ES 2 806 263 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

Molécula de ácido nucleico que codifica la proteína del núcleo del virus de la hepatitis B y vacuna que comprende la misma

Campo de la invención

La presente invención se refiere a secuencias de ácidos nucleicos que codifican proteínas del núcleo del virus de la hepatitis B (HBV, por sus siglas en inglés), para vacunas mejoradas contra el HBV y ácidos nucleicos o vacunas de la invención para su uso en métodos mejorados para inducir respuestas inmunitarias contra el HBV, y para su uso en métodos mejorados para inmunizar profiláctica y/o terapéuticamente individuos contra el HBV. La divulgación se refiere a fragmentos de secuencias de ácidos nucleicos que codifican proteínas del núcleo del virus de la hepatitis B (HBV); a las proteínas del núcleo del virus de la hepatitis B (HBV) y fragmentos de las mismas, métodos mejorados para inducir respuestas inmunitarias contra el HBV, y métodos mejorados para inmunizar profiláctica y/o terapéuticamente a individuos contra el HBV

Antecedentes de la invención

La hepatitis B es una infección común frecuente en todo el mundo que conduce al desarrollo de cirrosis, insuficiencia hepática y carcinoma hepatocelular. Un número significativo de casos de hepatitis no se informa debido a la naturaleza asintomática de la enfermedad. No obstante, se informan aproximadamente 350 millones de casos de hepatitis B crónica cada año. La mayoría de la población infectada con hepatitis se encuentra en países subdesarrollados o en desarrollo.

El virus se divide en cuatro serotipos principales (adr, adw, ayr, ayw) basándose en epítomos antigénicos presentes en sus proteínas de envoltura. Hay al menos ocho genotipos (A-H) de HBV de acuerdo con la variación de las secuencias genómicas. Los genotipos alternativos del HBV tienen una distribución geográfica predominante.

Tabla 1 la distribución geográfica de los genotipos del HBV.

Tabla 1 - Distribución Geográfica del HBV

Genotipo del HBV	Genosubtipo de HBV	Subtipo de HBsAg	Frecuencia	Distribución Geográfica Principal
A	A2	adw2	Alta	Europa, Norteamérica, Australia
	A1	aywl, adw2	Alta	África
B	B1 B2, B3	adw2	Alta	Lejano Oriente
	B4	ayw1	Alta	Lejano Oriente
	B2	adw3	Baja	Lejano Oriente
C	C1, C2, C4	adr	Alta	Lejano Oriente
	C3	adrq-	Alta	Nueva Guinea., Pacífico
	C1, C2	ayr	Alta	Lejano Oriente
	C1, C3	adw2	Baja	Lejano Oriente
	C4	ayw3	Baja	Lejano Oriente, Pacífico
D	D1, D3, D4	ayw2	Alta	Asia occidental, Europa del Este, Mediterráneo
	D2, D3	ayw3	Alta	Mundial
	No identificado	adw3	Baja	Europa del Este, España
	D2	ayw4	Baja	Europa del Este, España, Estados Unidos
E	-	ayw4	Alta	África
F	F1, F2	adw4q-	Alta	Latinoamérica, Alaska, Pacífico
	F1, F2	ayw4	Baja	América latina
G	-	adw2	Baja	Europa, Norteamérica
H	-	ayw4	Baja	Centroamérica

El genoma del HBV es una molécula de ADN circular que es principalmente bicatenaria pero que tiene una región monocatenaria que surge de una cadena que es más larga que la otra. La región bicatenaria surge de la hibridación de una cadena de una cadena más corta de aproximadamente 3020 nucleótidos con un cadena más larga de aproximadamente 3320 nucleótidos. La región monocatenaria en los nucleótidos no hibridados de la cadena más larga está asociada con la ADN polimerasa del HBV. El ADN genómico del HBV y la ADN polimerasa del HBV se encuentran dentro de una nucleocápside formada por múltiples moléculas de la proteína del núcleo del HBV (HBcAg). La proteína del núcleo del HBV está envuelta por la proteína de superficie del HBV (HBsAgs) y moléculas de lípidos.

El genoma del HBV contiene cuatro marcos abiertos de lectura (ORF, por sus siglas en inglés): 1) un ORF que codifica la ADN polimerasa del HBV, 2) un ORF que tiene dos codones de inicio, en donde la secuencia unida al segundo codón de inicio codifica la proteína del núcleo y la secuencia que incluye el codón de inicio adicional

cadena arriba codifica una secuencia denominada pre-C; 3) un ORF que tiene tres codones de inicio, en donde uno codifica la proteína de superficie (gp27), uno incluye un codón de inicio cadena arriba que codifica una secuencia denominada pre-S2 (gp36) y otro que incluye un codón de inicio adicional cadena arriba que codifica una secuencia denominada pre-S 1 (gp42); y 4) un ORF que codifica HBxAg, una proteína cuya función se entiende menos.

Las vacunas y terapias profilácticas para la infección por HBV implican la inyección de partículas subvíricas purificadas del plasma de portadores crónicos, o partículas subvíricas producidas como proteínas recombinantes en líneas celulares eucariotas transfectadas de manera estable. Las partículas subvíricas son proteínas víricas y tales vacunas a menudo se denominan vacunas de subunidades. Las proteínas del HBV se administran a un individuo y se convierten en dianas para el sistema inmunitario del individuo. En individuos no infectados, una respuesta inmunitaria contra la vacunas de subunidades protege al individuo no infectado de la infección por el HBV. En individuos infectados, la respuesta inmunitaria inducida por la vacuna puede tener efectos terapéuticos.

Chisari F.V., Am J Pathol., 2000. 156:1117-1132 y Pompeus P. *et al.* Intervirology 2001;44:98-114 divulgan la organización genómica del HBV. Deny P. y F. Zoulim, Pathologie Biologie 2010, Agosto, 58 (4): 245-53 analizan el diagnóstico y el tratamiento del virus de la hepatitis B. Michel M.L. y P. Tiollais, Pathologie Biologie 2010, Agosto, 58 (4):288-95 analizan las vacunas contra la hepatitis B y su eficacia protectora y potencial terapéutico. La publicación PCT WO2004026899 divulga el uso de secuencias polipeptídicas que contienen inmunógenos con secuencias de aminoácidos del HBV. La solicitud PCT publicada WO2008093976 divulga secuencias codificantes de HBV, proteínas y vacunas que incluyen una vacuna que comprende un antígeno de superficie de HBV recombinante de longitud completa y un antígeno del núcleo de HBV. Todo el antígeno de superficie del HBV consta de tres tipos de proteína de superficie (proteína L, proteína M y proteína S). La solicitud PCT publicada WO2009130588 divulga secuencias codificantes de HBV, proteínas y vacunas que incluyen un ácido nucleico que codifica un antígeno del núcleo del virus de la hepatitis B que es un codón optimizado para la expresión en seres humanos. La publicación PCT WO2010127115 divulga el suministro de secuencias de HBV usando vectores recombinantes.

Las vacunas contra el HBV disponibles han mostrado cierta eficacia, pero son costosas de producir. Además, las vacunas de subunidades derivadas de plasma también tienen preocupaciones sobre la seguridad. Se han explorado varios enfoques de vacunas, incluidos los basados en vectores vivos recombinantes, péptidos sintéticos y vacunas de ADN que comprenden secuencias codificantes con codones optimizados de proteínas de HBV. Estos otros enfoques han tenido hasta ahora una eficacia limitada variable. Adicionalmente, debido a diferencias genómicas, algunas vacunas contra el HBV han mostrado una eficacia positiva en algunas áreas geográficas y una eficacia limitada en otras áreas.

Se ha estudiado la administración directa de secuencias de ácidos nucleicos para vacunar contra enfermedades animales y humanas, y se han centrado muchos esfuerzos en medios efectivos y eficaces de suministro de ácidos nucleicos para producir la expresión necesaria de los antígenos deseados, dando como resultado una respuesta inmunogénica y, en última instancia, el éxito de esta técnica.

Las vacunas de ADN permiten la síntesis de antígenos endógenos, que induce el complejo histocompatible CD8+, linfocitos T citotóxicos restringidos de clase I que rara vez se obtienen con vacunas de subunidades. Además, la síntesis de antígenos que se produce durante un período sostenido puede ayudar a superar la baja capacidad de respuesta y eliminar o reducir la necesidad de inyecciones de refuerzo. Además, las vacunas de ADN parecen ser muy estables y fáciles de producir. Por otra parte, se pueden inducir respuestas inmunitarias celulares más amplias combinando estrategias como la optimización de codones, optimización de ARN y añadiendo secuencias líder de inmunoglobulinas.

Las vacunas de ADN son seguras, estables, fácilmente producidas y bien toleradas en seres humanos con ensayos preclínicos que indican poca evidencia de integración de plásmidos [Martin, T., *et al.*, Plasmid DNA malaria vaccine: the potential for genomic integration after intramuscular injection. Hum Gene Ther, 1999. 10(5): p. 759-68; Nichols, W.W., *et al.*, Potential DNA vaccine integration into host cell genome. Ann N Y Acad Sci, 1995. 772: págs. 30-9]. Además, las vacunas de ADN son muy adecuadas para la administración repetida debido al hecho de que la eficacia de la vacuna no está influenciada por títulos de anticuerpos preexistentes al vector [Chattergoon, M., J. Boyer y D.B. Weiner, Genetic immunization: a new era in vaccines and immune therapeutics. FASEB J, 1997. 11(10): págs. 753-63]. Sin embargo, un obstáculo importante para la adopción clínica de las vacunas de ADN ha sido una disminución en la inmunogenicidad de la plataforma cuando se traslada a animales más grandes [Liu, M.A. y J.B. Ulmer, Human clinical trials of plasmid DNA vaccines. Adv Genet, 2005. 55: págs. 25-40].

Los recientes avances tecnológicos en la modificación por ingeniería del inmunógeno de las vacunas de ADN han mejorado la expresión y la inmunogenicidad de las vacunas de ADN, ya que tienen optimización de codones, optimización de ARN y adición de secuencias líder de inmunoglobulinas [Andre, S., *et al.*, Increased immune response elicited by DNA vaccination with a synthetic gp120 sequence with optimized codon usage. J Virol, 1998.

72(2): p. 1497-503; Deml, L., *et al.*, Multiple effects of codon usage optimization on expression and immunogenicity of DNA candidate vaccines encoding the human immunodeficiency virus type 1 Gag protein. *J Virol*, 2001, 75(22): p. 10991-1001; Laddy, D.J., *et al.*, Immunogenicity of novel consensus-based DNA vaccines against avian influenza. *Vaccine*, 2007. 25(16): p. 2984-9; Frelin, L., *et al.*, Codon optimization and mRNA amplification effectively enhances the immunogenicity of the hepatitis C virus nonstructural 3/4A gene. *Gene Ther*, 2004. 11(6): págs. 522-33], así como, la tecnología desarrollada recientemente en sistemas de suministro de plásmidos tal como electroporación [Hirao, L.A., *et al.*, Intradermal/subcutaneous immunization by electroporation improves plasmid vaccine delivery and potency in pigs and rhesus macaques. *Vaccine*, 2008. 26(3): p. 440-8; Luckay, A., *et al.*, Effect of plasmid DNA vaccine design and *in vivo* electroporation on the resulting vaccine-specific immune responses in rhesus macaques. *J Virol*, 2007. 81(10): p. 5257-69; Ahlen, G., *et al.*, *In vivo* electroporation enhances the immunogenicity of hepatitis C virus nonstructural 3/4A DNA by increased local DNA uptake, protein expression, inflammation, and infiltration of CD3+ T cells. *J Immunol*, 2007. 179(7): págs. 4741-53]. La técnica de electroporación *in vivo* se ha utilizado en ensayos clínicos en humanos para suministrar fármacos contra el cáncer, tal como bleomicina, y en muchos estudios preclínicos en una gran cantidad de especies animales. Además, los estudios han sugerido que el uso de inmunógenos consenso puede aumentar la amplitud de la respuesta inmunitaria celular en comparación con los antígenos naturales solos [Yan, J., *et al.*, Enhanced cellular immune responses elicited by an engineered HIV-1 subtype B consensus-based envelope DNA vaccine. *Mol Ther*, 2007. 15(2): p. 411-21; Rolland, M., *et al.*, Reconstruction and function of ancestral center-of-tree human immunodeficiency virus type 1 proteins. *J Virol*, 2007. 81(16): págs. 8507-14].

Jessica Nystrom *et al.*, *The Journal of Infectious Diseases*, vol. 201, n.º 12, 15 de junio de 2010 (2010-06-15), páginas 1867-1879, divulga la mejora de la capacidad del antígeno del núcleo de la hepatitis B endógeno para cebar linfocitos T citotóxicos. Yi-Ping Xing *et al.*, *World J Gastroenterol.*, 1 de enero de 2005 (2005-01-01), páginas 4583-4586, divulga una nueva vacuna de ADN basada en el gen del núcleo del virus de la hepatitis B que induce una respuesta inmunitaria específica en ratones Balb/c. Nader Shahrokhi *et al.*, *Iranian Biomedical Journal*, 1 de abril de 2006, páginas 61-68, divulga un inmunógeno para estimular la inmunidad multivalente contra el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) y el antígeno del núcleo de la hepatitis B (HBcAg). El documento US 2004/156863 divulga un método para tratar la hepatitis B crónica que comprende administrar una cantidad estimulante de linfocitos T de una vacuna a un paciente. El documento WO 00/26385 divulga moléculas de ácidos nucleicos recombinantes. El documento WO 02/14478 divulga partículas quiméricas de HBc inmógenicas que tienen una estabilidad potenciada.

Sigue existiendo la necesidad de construcciones de ácidos nucleicos que codifiquen los antígenos del HBV y de composiciones útiles para inducir respuestas inmunitarias contra el HBV. Sigue existiendo la necesidad de vacunas eficaces contra el HBV que sean económicas y eficaces. Sigue existiendo la necesidad de vacunas eficaces que aumenten los niveles de anticuerpos neutralizantes y produzcan un componente de linfocitos T. Sigue existiendo la necesidad de vacunas eficaces contra el HBV, incluidas aquellas que son eficaces contra cepas de HBV que tienen una amplia gama de genotipos, y preferentemente, una vacuna universal que sea globalmente eficaz.

Sumario de la invención

La materia objeto para la que se solicita protección es como se define en las reivindicaciones.

La invención proporciona una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia codificante que codifica una proteína con la SEQ ID NO: 2. La invención también proporciona un ácido nucleico de la invención para su uso en un método para inducir una respuesta inmunitaria contra un antígeno de HBV.

La invención también proporciona un ácido nucleico de la invención para su uso en un método para proteger a un individuo de la infección por HBV. La invención también proporciona una vacuna útil para generar una respuesta inmunitaria contra el HBV en un sujeto que comprende: una molécula de ácido nucleico de la invención; y una molécula adyuvante.

Un aspecto de la presente invención incluye vacunas útiles para inducir una respuesta inmunitaria contra el HBV. El desarrollo de una vacuna terapéutica inmunitaria contra el HBV con una amplia eficacia contra una multitud de genotipos se puede proporcionar utilizando una vacuna terapéutica de ADN para la infección por HBV basándose en el direccionamiento de los antígenos específicos del núcleo de HBV universalmente conservados. La utilización de inmunógenos consenso del HBV induce respuestas inmunitarias celulares más amplias y puede ser útil para minimizar el grado de disimilitud de secuencias entre diferentes cepas de virus.

En el presente documento se divulgan proteínas seleccionadas del grupo que consiste en: proteínas que comprenden la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 6.

También se proporcionan moléculas de ácidos nucleicos que comprenden secuencias que codifican una o más moléculas de proteínas establecidas anteriormente. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:3; y SEQ ID NO: 5.

Algunos aspectos de la invención proporcionan las moléculas de ácidos nucleicos de la invención para su uso en la inducción de una respuesta inmunitaria contra el antígeno del núcleo de uno o más genotipos del HBV.

Aspectos adicionales de la invención proporcionan las moléculas de ácidos nucleicos de la invención para su uso en métodos de protección de un individuo contra la infección por HBV. Los métodos comprenden las etapas de: administrar a dicho individuo una cantidad profilácticamente eficaz de una molécula de ácido nucleico que comprende dicha secuencia o composiciones de ácido nucleico; en donde la secuencia de ácido nucleico se expresa en células de dicho individuo y se induce una respuesta inmunitaria protectora contra una proteína codificada por dicha secuencia de ácido nucleico.

En algunos aspectos de la invención, se proporcionan moléculas de ácidos nucleicos de la invención para su uso en métodos de tratamiento de un individuo que ha sido infectado por HBV. Los métodos comprenden las etapas de: administrar a dicho individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de tales moléculas y/o composición de ácidos nucleicos.

Los aspectos de la invención se relacionan además con vacunas que comprenden ácidos nucleicos que codifican proteínas seleccionadas del grupo que consiste en: SEQ ID NO:2, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 6. La vacuna puede comprender adicionalmente una proteína adyuvante o una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína adyuvante. En algunas realizaciones, el adyuvante es IL-12, IL-15, IL-28 o RANTES.

Las vacunas que comprenden moléculas de ácidos nucleicos pueden comprender moléculas de ácidos nucleicos que comprenden secuencias de ácidos nucleicos seleccionadas del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:5. La vacuna puede comprender adicionalmente una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína adyuvante. En algunas realizaciones, el adyuvante es IL-12, IL-15, IL-28 o RANTES.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es un mapa que muestra la organización del genoma del HBV que consta de cuatro ORF solapantes. Las Figuras 2A y 2B muestran resultados de experimentos de expresión del pM-Core. La Figura 3A muestra los resultados del protocolo de traducción *in vitro*. La Figura 3B muestra los resultados de una transferencia Western.

Las Figuras 3A y 3B muestran la magnitud potenciada de la secreción de IFN- γ en linfocitos T CD8+ y CD4+ a partir de los bazo de ratones C57BL/6 vacunados con pM-Core.

Las Figuras 4A y 4B muestran la magnitud potenciada de la secreción de TNF- α en linfocitos T CD8+ y CD4+ de los bazo de ratones C57BL/6 vacunados con pM-Core.

Las Figuras 5A y 5B muestran la magnitud potenciada de la secreción de CD 107a en linfocitos T CD8+ y CD4+ a partir de los bazo de ratones C57BL/6 vacunados con pM-Core.

Las Figuras 6A y 6B muestran la respuesta de los linfocitos T de interferón-gamma en el hígado de ratones C57BL/6 vacunados con pM-Core.

Las Figuras 7A y 7B muestran la respuesta de los linfocitos T del factor de necrosis tumoral- α en el hígado de ratones C57BL/6 vacunados con pM-Core.

La Figura 8 muestra datos de ensayos ELISPOT.

La Figura 9 muestra datos de experimentos que usan células marcadas con CFSE para comparar la eliminación de células diana tratadas con péptidos *in vivo* por linfocitos T CD8 en animales vacunados y no vacunados.

La Figura 10 muestra una comparación del porcentaje de proliferación de células CD3+ CD4+ y CD3+ CD8+ tratadas con el vector pVax (control) o con el plásmido pMCore que expresa el núcleo M del HBV.

Las Figuras 11A y 11B muestran una comparación del anticuerpo antinúcleo del HBV en la dilución en serie de sueros de animales tratados con el vector pVax (control) o con el plásmido pMCore que expresa el núcleo M del HBV.

La Figura 12 muestra el porcentaje de TNF- α e IFN- γ de células CD4+ y CD8+ de bazo y de hígado.

La Figura 13 muestra datos de experimentos para determinar si el aclaramiento inducido por los ratones inmunizados tuvo efectos en el hígado midiendo los niveles de ALT en suero.

Descripción detallada

1. Definiciones.

La terminología utilizada en el presente documento tiene el propósito de describir realizaciones particulares solamente y no pretende ser limitante. Como se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una" y "el" o "la" incluyen los referentes en plural salvo que el contexto indique claramente lo contrario.

Para la recitación de intervalos numéricos en el presente documento, se contempla de manera explícita cada número intermedio entre ellos con el mismo grado de precisión. Por ejemplo, para el intervalo de 6-9, se contemplan los números 7 y 8 además de 6 y 9, y para el intervalo 6,0-7,0, se contemplan de manera explícita los números 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 y 7,0.

a. Adyuvante

"Adyuvante" como se usa en el presente documento, significa cualquier molécula añadida a las vacunas de plásmido de ADN descritas en el presente documento, para potenciar la inmunogenicidad de los antígenos codificados por los plásmidos de ADN y las secuencias de los ácidos nucleicos que se describen en lo sucesivo en el presente documento.

B. Anticuerpo

"Anticuerpo" como se usa en el presente documento significa un anticuerpo de clases IgG, IgM, IgA, IgD o IgE, o fragmentos, fragmentos o derivados de los mismos, incluyendo Fab, F(ab')₂, Fd y anticuerpos de cadena sencilla, diacuerpos, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos bifuncionales y derivados de los mismos. El anticuerpo puede ser un anticuerpo aislado de la muestra de suero de mamífero, un anticuerpo policlonal, anticuerpo purificado por afinidad, o mezclas de los mismos que muestran suficiente especificidad de unión a un epítipo deseado o una secuencia derivada del mismo.

C. Secuencia Codificante

"Secuencia codificante" o "ácido nucleico codificante" como se usa en el presente documento significa los ácidos nucleicos (molécula de ARN o ADN) que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína. La secuencia codificante puede incluir además señales de inicio y terminación operativamente unidas a elementos reguladores que incluyen un promotor y una señal de poliadenilación capaz de dirigir la expresión en las células de un individuo o mamífero al que se administra el ácido nucleico.

d. Complemento

"Complemento" o "complementario", como se usa en el presente documento, significa un ácido nucleico que puede indicar un emparejamiento de bases Watson-Crick (por ejemplo, A-T/U y C-G) o Hoogsteen entre nucleótidos o análogos de nucleótidos de moléculas de ácidos nucleicos.

e. Consenso o Secuencia Consenso

"Consenso" o "secuencia consenso" como se usa en el presente documento significa una secuencia de polipéptidos basada en el análisis de una alineación de múltiples subtipos de un antígeno de HBV particular. Se pueden preparar secuencias de ácidos nucleicos que codifican una secuencia polipeptídica consenso. Pueden usarse vacunas que comprenden proteínas que comprenden secuencia consenso y/o moléculas de ácidos nucleicos que codifican dichas proteínas para inducir una inmunidad amplia contra múltiples subtipos o serotipos de un antígeno de HBV particular.

f. Electroporación

"Electroporación", "electropermeabilización" o "potenciación electrocinética" ("EP, por sus siglas en inglés") como se usa indistintamente en el presente documento significa el uso de un pulso de campo eléctrico transmembrana para inducir vías microscópicas (poros) en una biomembrana; su presencia permite a las biomoléculas tal como plásmidos, oligonucleótidos, ARNip, fármacos, iones y agua para pasar de un lado de la membrana celular al otro.

g. Fragmento

"Fragmento" como se usa en el presente documento con respecto a las secuencias de los ácidos nucleicos significa una secuencia de un ácido nucleico o una porción de la misma, que codifica un polipéptido capaz de provocar una respuesta inmunitaria en un mamífero que reacciona de forma cruzada con un antígeno de HBV de cepa de tipo silvestre de longitud completa. Los fragmentos pueden ser fragmentos de ADN seleccionados de al menos una de las diversas secuencias de nucleótidos que codifican los fragmentos de proteínas expuestos a continuación.

"Fragmento" o "fragmento inmunogénico" con respecto a las secuencias polipeptídicas significa un polipéptido capaz de provocar una respuesta inmunitaria en un mamífero que reacciona de forma cruzada con un antígeno de HBV de cepa de tipo silvestre de longitud completa. Los fragmentos de proteínas consenso pueden comprender al menos el 10 %, al menos el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 % o al menos el 95 % de una proteína consenso. En algunas realizaciones, los fragmentos de proteínas consenso pueden comprender al menos 20 aminoácidos o más, al menos 30 aminoácidos o más, al menos 40 aminoácidos o más, al menos 50 aminoácidos o más, al menos 60 aminoácidos o más, al menos 70 aminoácidos o más, al menos 80 aminoácidos o más, al menos 90 aminoácidos o más, al menos 100 aminoácidos o más, al menos 110 aminoácidos o más, al menos 120 aminoácidos o más, al menos 130 aminoácidos o más, al menos 140 aminoácidos o más, al menos 150 aminoácidos o más, al menos 160 aminoácidos o más, al menos 170 aminoácidos o más, al menos 180 aminoácidos o más de una proteína consenso.

h. Construcción genética

Como se usa en el presente documento, la expresión "construcción genética" se refiere a las moléculas de ADN o ARN que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica proteína. La secuencia codificante incluye señales de iniciación y terminación operativamente unidas a elementos reguladores que incluyen un promotor y una señal de poliadenilación capaces de dirigir la expresión en las células del individuo al que se administra la molécula de ácido nucleico. Como se usa en el presente documento, la expresión "forma expresable" se refiere a construcciones génicas que contienen los elementos reguladores necesarios operativamente unidos a una secuencia codificante que codifica una proteína de forma que cuando está presente en la célula del individuo, se expresará la secuencia codificante.

i. Idéntico

"Idéntico" o "identidad" como se usa en el presente documento en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias polipeptídicas, significa que las secuencias tienen un porcentaje especificado de restos que son iguales en una región específica. El porcentaje se puede calcular alineando de manera óptima las dos secuencias, comparando las dos secuencias sobre la región especificada, determinando el número de posiciones en las que se produce el resto idéntico en ambas secuencias para producir el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes entre el número total de posiciones en la región especificada y multiplicando el resultado por 100 para producir el porcentaje de identidad de secuencia. En los casos en que las dos secuencias son de diferentes longitudes o la alineación produce uno o más extremos escalonados y la región de comparación especificada incluye solo una secuencia, los restos de secuencia sencilla se incluyen en el denominador pero no en el numerador del cálculo. Al comparar ADN y ARN, timina (T) y uracilo (U) pueden considerarse equivalentes. La identidad se puede realizar manualmente o utilizando un algoritmo de secuencia por ordenador como BLAST o BLAST 2.0.

j. Respuesta inmunitaria

"Respuesta inmunitaria" como se usa en el presente documento significa la activación del sistema inmunitario de un hospedador, p.ej., el de un mamífero, en respuesta a la introducción de antígeno, tal como un antígeno consenso de HBV. La respuesta inmunitaria puede ser en forma de una respuesta celular o humoral, o ambas.

k. Ácido nucleico

"Ácido nucleico" u "oligonucleótido" o "polinucleótido" como se usa en el presente documento significan al menos dos nucleótidos unidos covalentemente entre sí. La representación de una cadena sencilla también define la secuencia de la cadena complementaria. De este modo, un ácido nucleico también abarca la cadena complementaria de una cadena sencilla representada. Se pueden usar muchas variantes de un ácido nucleico para el mismo propósito que un ácido nucleico dado. De este modo, un ácido nucleico también abarca ácidos nucleicos sustancialmente idénticos y complementos de los mismos. Una cadena sencilla proporciona una sonda que puede hibridar con una secuencia diana en condiciones de hibridación rigurosas. De este modo, un ácido nucleico también abarca una sonda que hibrida en condiciones de hibridación rigurosas.

Los ácidos nucleicos pueden ser monocatenarios o bicatenarios, o pueden contener porciones de secuencias tanto bicatenarias como monocatenarias. El ácido nucleico puede ser ADN, tanto genómico como ADNc, ARN o un híbrido, donde el ácido nucleico puede contener combinaciones de desoxirribosa y ribonucleótidos y combinaciones de bases que incluyen uracilo, adenina, timina, citosina, guanina, inosina, xantina hipoxantina, isocitosina e isoguanina. Los ácidos nucleicos pueden obtenerse por métodos de síntesis química o por métodos recombinantes.

l. Operativamente Unido

"Operativamente Unido" como se usa en el presente documento significa que la expresión de un gen está bajo el control de un promotor con el que está conectado espacialmente. Un promotor puede colocarse 5' (cadena arriba) o 3' (cadena abajo) de un gen bajo su control. La distancia entre el promotor y un gen puede ser aproximadamente la misma que la distancia entre ese promotor y el gen que controla en el gen del que deriva el promotor. Como se conoce en la técnica, la variación en esta distancia se puede satisfacer sin pérdida de la función del promotor.

m. Promotor

"Promotor", como se usa en el presente documento, significa una molécula sintética o derivada de forma natural que es capaz de conferir, activar o potenciar la expresión de un ácido nucleico en una célula. Un promotor puede comprender una o más secuencias reguladoras de la transcripción específicas para potenciar adicionalmente la expresión y/o alterar la expresión espacial y/o la expresión temporal de la misma. Un promotor también puede comprender elementos potenciadores o represores distales, que pueden ubicarse hasta a varios miles de pares de bases del sitio de inicio de la transcripción. Un promotor puede derivar de fuentes que incluyen virus, bacterias, hongos, plantas, insectos y animales. Un promotor puede regular la expresión de un componente génico de manera constitutiva o diferencial con respecto a la célula, el tejido u órgano en donde se produce la expresión o, con respecto a la etapa de desarrollo en la que se produce la expresión, o en respuesta a estímulos externos como el

estrés fisiológico, patógenos, iones metálicos o agentes inductores. Ejemplos representativos de promotores incluyen el promotor del bacteriófago T7, promotor del bacteriófago T3, Promotor SP6, operador-promotor lac, promotor tac, promotor tardío de SV40, promotor temprano de SV40, promotor RSV-LTR, promotor IE del CMV, promotor temprano de SV40 o promotor tardío de SV40 y el promotor IE de CMV.

n. Péptido señal

"Péptido señal" y "secuencia líder" se usan indistintamente en el presente documento y se refieren a una secuencia de aminoácidos que se puede unir en el extremo amino de una proteína de HBV expuesta en el presente documento. Los péptidos señal/secuencias líder generalmente dirigen la localización de una proteína. Los péptidos señal/secuencias líder usadas en el presente documento preferentemente facilitan la secreción de la proteína desde la célula en la que se produce. Los péptidos señal/secuencias líder con frecuencia se escinden del resto de la proteína, con frecuencia denominados como la proteína madura, tras la secreción de la célula. Los péptidos señal/secuencias líder están unidos en el extremo N de la proteína. Como se menciona en el presente documento con respecto a la unión de un péptido señal o secuencia líder al extremo N de una proteína, el péptido señal/secuencia líder reemplaza la metionina N terminal de una proteína que está codificada por el codón de inicio de la secuencia del ácido nucleico que codifica la proteína sin secuencias codificantes del péptido señal. De este modo, por ejemplo, la SEQ ID NO: 4 es la SEQ ID NO: 2 con el péptido señal/secuencia líder unido en el extremo N de la SEQ ID NO: 2, es decir, la SEQ ID NO: 4 es una proteína que comprende un péptido señal unido al extremo N de la SEQ ID NO: 2. El primer resto en la SEQ ID NO: 2, "Xaa", es generalmente metionina cuando no hay péptido señal presente. Sin embargo, proteínas que comprenden péptidos señal unidos a la SEQ ID NO: 2, tal como la SEQ ID NO: 4, reemplazan el resto metionina 1 en Xaa con el resto que une el péptido señal a la proteína. Por consiguiente, el resto N terminal de la SEQ ID NO: 2 puede ser cualquiera, pero si está codificado por una secuencia de iniciación es metionina. El enlace del péptido señal/secuencia líder en el extremo N de la SEQ ID NO: 2 generalmente elimina la metionina N terminal. Como se usa en el presente documento, se pretende que la SEQ ID NO: 4 comprenda la SEQ ID NO: 2 con un péptido señal/secuencia líder unidos en el extremo N de la SEQ ID NO: 2 a pesar de la eliminación del resto Xaa del extremo N de la SEQ ID NO: 2. De manera similar, las secuencias codificantes para la SEQ ID NO: 4 comprenden secuencias codificantes para la SEQ ID NO: 2 con secuencias codificantes para un péptido señal/secuencia líder unidos al extremo 5' de las secuencias codificantes que codifican la SEQ ID NO: 2. El codón de iniciación puede ser el "nnn" en las secuencias codificantes para la SEQ ID NO: 2, pero se elimina cuando las secuencias codificantes para un péptido señal/secuencia líder se unen al extremo 5' de las secuencias codificantes que codifican la SEQ ID NO: 2. Como se usa en el presente documento, se pretende que las secuencias codificantes para la SEQ ID NO: 4 comprendan secuencias codificantes para la SEQ ID NO: 2 con secuencias codificantes para un péptido señal/secuencia líder unido en el extremo 5' de la secuencia codificante de la SEQ ID NO: 2 donde se produce nnn. De este modo, por ejemplo, se pretende que la SEQ ID NO: 3 comprenda la SEQ ID NO: 1 con secuencias codificantes para un péptido señal/secuencia líder unidos en el extremo 5' de la SEQ ID NO: 1, en lugar del nnn. En algunas realizaciones, el nnn es un codón de iniciación en el extremo 5' de la SEQ ID NO: 1.

o. Condiciones de Hibridación Rigurosas

"Condiciones de hibridación rigurosas", como se usa en el presente documento, significa condiciones en las cuales una primera secuencia de un ácido nucleico (por ejemplo, sonda) hibridará con una segunda secuencia de un ácido nucleico (por ejemplo, diana), tal como en una mezcla compleja de ácidos nucleicos. Las condiciones rigurosas dependen de la secuencia y serán distintas en circunstancias distintas. Las condiciones rigurosas se pueden seleccionar para que sean aproximadamente 5-10 °C más bajas que el punto de fusión térmica (T_m) para la secuencia específica a un pH de fuerza iónica definido. La T_m puede ser la temperatura (bajo fuerza iónica, pH y concentración nucleica definidos) a la que el 50 % de las sondas complementarias a la diana hibridan con la secuencia diana en equilibrio (ya que las secuencias diana están presentes en exceso, en T_m , el 50 % de las sondas están ocupadas en equilibrio). Las condiciones rigurosas serán aquellas en que la concentración salina sea inferior a aproximadamente 1,0 M de iones sodio, tal como aproximadamente una concentración de iones sodio de 0,01-1,0 M (u otras sales) a pH de 7,0 a 8,3 y la temperatura es de al menos aproximadamente 30 °C para sondas cortas (por ejemplo, aproximadamente 10-50 nucleótidos) y al menos aproximadamente 60 °C para sondas largas (por ejemplo, más de aproximadamente 50 nucleótidos). También pueden lograrse condiciones rigurosas con la adición de agentes desestabilizantes, tales como formamida. Para hibridación selectiva o específica, una señal positiva puede ser al menos 2 a 10 veces la hibridación de fondo. Las condiciones de hibridación rigurosas ejemplares incluyen las siguientes: formamida al 50 %, 5x SSC, y SDS al 1 %, incubación a 42 °C, o, 5x SSC, SDS al 1 %, incubación a 65 °C, con lavado en 0,2x SSC, y SDS al 0,1 % a 65 °C.

p. Sustancialmente Complementario

"Sustancialmente complementario" como se usa en el presente documento significa que una primera secuencia es al menos un 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica al complemento de una segunda secuencia sobre una región de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 180, 270, 360, 450, 540 o más nucleótidos o aminoácidos, o que las dos secuencias hibridan en condiciones de hibridación rigurosas.

q. Sustancialmente Idéntica

"Sustancialmente idéntica" como se usa en el presente documento significa que una primera y segunda secuencia son al menos un 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticas sobre una región de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 180, 270, 360, 450, 540 o más nucleótidos o aminoácidos, o con respecto a los ácidos nucleicos, si la primera secuencia es sustancialmente complementaria al complemento de la segunda secuencia.

r. Subtipo o Serotipo

"Subtipo" o "serotipo": como se usa en el presente documento, indistintamente, y en referencia al HBV, significa variantes genéticas de un HBV de tal manera que un subtipo es reconocido por un sistema inmunitario a partir de un subtipo diferente.

s. Variante

"Variante" usada en el presente documento con respecto a un ácido nucleico significa (i) una porción o fragmento de una secuencia de nucleótidos de referencia; (ii) el complemento de una secuencia de nucleótidos de referencia o una porción de la misma; (iii) un ácido nucleico que es sustancialmente idéntico a un ácido nucleico de referencia o al complemento del mismo; o (iv) un ácido nucleico que hibrida en condiciones rigurosas con el ácido nucleico de referencia, complemento del mismo, o una secuencia sustancialmente idéntica a la misma.

"Variante" con respecto a un péptido o polipéptido que difiere en la secuencia de aminoácidos por la inserción, eliminación o sustitución conservativa de aminoácidos, pero conserva al menos una actividad biológica. Variante también puede significar una proteína con una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica a una proteína de referencia con una secuencia de aminoácidos que conserva al menos una actividad biológica. Una sustitución conservativa de un aminoácido, es decir, reemplazar un aminoácido con un aminoácido diferente de propiedades similares (por ejemplo, hidrofilia, grado y distribución de las regiones cargadas) se reconoce en la técnica como que implica generalmente un cambio menor. Estos cambios menores se pueden identificar, en parte, considerando el índice hidropático de los aminoácidos, como se entiende en la técnica. Kyte *et al.*, J. Mol. Biol. 157:105-132 (1982). El índice hidropático de un aminoácido se basa en una consideración de su hidrofobia y carga. Se sabe en la técnica que los aminoácidos de índices hidropáticos similares pueden sustituirse y aún conservar la función proteica. En un aspecto, están sustituidos los aminoácidos que tienen índices hidropáticos de ± 2 . La hidrofilia de los aminoácidos también se puede usar para revelar sustituciones que darían como resultado proteínas que conservan la función biológica. Una consideración de la hidrofilia de los aminoácidos en el contexto de un péptido permite el cálculo de la mayor hidrofilia media local de ese péptido, una medida útil que se ha informado que se correlaciona bien con la antigenicidad y la inmunogenicidad. Patente de Estados Unidos N.º 4.554.101. La sustitución de aminoácidos que tiene valores de hidrofilia similares puede dar como resultado péptidos que conservan actividad biológica, por ejemplo, inmunogenicidad, como se entiende en la técnica. Las sustituciones se pueden realizar con aminoácidos que tienen valores de hidrofilia dentro de ± 2 entre sí. Tanto el índice de hidrofobia como el valor de hidrofilia de los aminoácidos están influenciados por la cadena lateral particular de ese aminoácido. De acuerdo con esa observación, se entiende que las sustituciones de aminoácidos que son compatibles con la función biológica dependen de la similitud relativa de los aminoácidos, y particularmente de las cadenas laterales de esos aminoácidos, como lo revela la hidrofobia, hidrofilia, carga, tamaño y otras propiedades.

t. Vector

"Vector" como se usa en el presente documento significa una secuencia de un ácido nucleico que contiene un origen de replicación. Un vector puede ser un vector vírico, bacteriófago, cromosoma artificial bacteriano o cromosoma artificial de levadura. Un vector puede ser un vector de ADN o ARN. Un vector puede ser un vector extracromosómico autorreplicante y, preferentemente, es un plásmido de ADN.

2. Antígeno del núcleo del HBV

La proteína del núcleo del HBV representa una diana importante para el aclaramiento vírico mediado por el sistema inmunitario al inducir 1) respuestas de linfocitos T citotóxicos (CTL), 2) respuestas de linfocitos T auxiliares y/o 3) respuestas de linfocitos B, o preferentemente todas las mencionadas anteriormente, para presentación cruzada.

La Tabla 2 muestra las similitudes entre genotipos para el antígeno del núcleo de los genotipos HBV-A, HBV-B, HBV-C, HBV-D y HBV-E con las proteínas consenso del núcleo del HBV, denominado en la tabla "HBV-M-core". Para algunas realizaciones, la construcción del núcleo M del HBV se diseñó para tener homologías aumentadas para dianas de núcleos de HBV amplias. Similitudes entre los genotipos para el antígeno del núcleo con la construcción del núcleo M diseñada: homologías aumentadas para dianas de núcleos de HBV amplias. Todos los genotipos deben estar representados en una vacuna inmunoterapéutica universal para el HBV

Tabla 2

Porcentaje de Identidad								
Divergencia	1		96,2	96,2	97,8	95,6	98,4	1 - HBV-A-ConCore
	2	3,9		100	95,6	93,4	96,7	2 - HBV-B-ConCore
	3	3,9	0		95,6	93,4	96,7	3 - HBV-C-ConCore
	4	2,2	4,5	4,5		97,8	97,8	4 - HBV-D-ConCore
	5	4,5	6,9	6,9	2,2		95,6	5 - HBV-E-ConCore
	6	1,7	3,4	3,4	2,2	4,5		6 - HBV-M-Core
		1	2	3	4	5	6	

En el presente documento se proporcionan antígenos capaces de provocar una respuesta inmunitaria en un mamífero contra uno o más serotipos de HBV. El antígeno puede comprender epítomos de proteínas del núcleo que los hacen particularmente eficaces como inmunógenos contra los cuales se pueden inducir respuestas inmunitarias anti-HBV. El antígeno HBV puede comprender el producto de traducción de longitud completa, una variante del mismo, un fragmento del mismo o una combinación de los mismos.

Se proporciona una proteína de núcleo de HBV consenso (SEQ ID NO: 2). Se generó una secuencia de aminoácidos que comprendía la líder de IgE en el extremo N de las secuencias consenso de la proteína del núcleo del HBV. De este modo, también se proporciona una proteína con una líder de IgE (SEQ ID NO: 7) unida a la proteína del núcleo del HBV consenso (SEQ ID NO: 2) para proporcionar una líder de IgE-proteína del núcleo del HBV consenso (SEQ ID NO: 4). Algunas realizaciones proporcionadas también comprenden una etiqueta HA (SEQ ID NO: 8) unida en el extremo C de la secuencia consenso de la proteína del núcleo del HBV. Por consiguiente, se proporciona una proteína consenso de la proteína del núcleo del HBV (SEQ ID NO: 6) que comprende una líder de IgE (SEQ ID NO: 7) unida a la secuencia consenso de la proteína del núcleo del HBV (SEQ ID NO: 2) y una etiqueta HA (SEQ ID NO: 8) unida al extremo C de las secuencias consenso de la proteína del núcleo del HBV.

Las proteínas pueden ser homólogas a la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO:4 y SEQ ID NO:6. En el presente documento se divulgan proteínas inmunogénicas que tienen un 95 % de homología con las secuencias de proteínas consenso del presente documento. En el presente documento se divulgan proteínas inmunogénicas que tienen un 96 % de homología con las secuencias de proteínas consenso del presente documento. En el presente documento se divulgan proteínas inmunogénicas que tienen un 97 % de homología con las secuencias de proteínas consenso del presente documento. En el presente documento se divulgan proteínas inmunogénicas que tienen un 98 % de homología con las secuencias de proteínas consenso del presente documento. En el presente documento se divulgan proteínas inmunogénicas que tienen un 99 % de homología con las secuencias de proteínas consenso del presente documento.

En algunas realizaciones, la proteína está libre de una secuencia líder. En algunas realizaciones, la proteína está libre de la líder de IgE.

Los fragmentos de proteínas consenso divulgadas en el presente documento pueden comprender al menos el 10 %, al menos el 15 %, al menos el 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 35 %, al menos el 40 %, al menos el 45 %, al menos el 50 % o al menos el 55 % al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de una proteína consenso. Se divulgan fragmentos inmunogénicos de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 6. Los fragmentos inmunogénicos pueden comprender al menos el 10 %, al menos el 15 %, al menos el 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 35 %, al menos el 40 %, al menos el 45 %, al menos el 50 % o al menos el 55 % al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO:4 y SEQ ID NO:6. Como se divulga en el presente documento, los fragmentos incluyen una secuencia líder, tal como por ejemplo una líder de inmunoglobulina, tal como la líder de IgE. Como se divulga en el presente documento, los fragmentos están libres de una secuencia líder. Como se divulga en el presente documento, los fragmentos están libres de una secuencia líder, la líder de IgE.

Se divulgan fragmentos inmunogénicos de proteínas con secuencias de aminoácidos homólogas a los fragmentos inmunogénicos de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 6. Dichos fragmentos inmunogénicos pueden comprender al menos el 10 %, al menos el 15 %, al menos el 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 35 %, al menos el 40 %, al menos el 45 %, al menos el 50 % o al menos el 55 % al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de proteínas que son un 95 % homólogas a la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO:4 y SEQ ID NO:6. En el presente documento se divulgan fragmentos inmunogénicos que tienen un 96 % de homología con los fragmentos inmunogénicos de secuencias de proteínas consenso del

presente documento. En el presente documento se divulgan fragmentos inmunogénicos que tienen un 97 % de homología con los fragmentos inmunogénicos de secuencias de proteínas consenso del presente documento. En el presente documento se divulgan fragmentos inmunogénicos que tienen un 98 % de homología con los fragmentos inmunogénicos de secuencias de proteínas consenso del presente documento. En el presente documento se divulgan fragmentos inmunogénicos que tienen un 99 % de homología con los fragmentos inmunogénicos de secuencias de proteínas consenso del presente documento. Como se divulga en el presente documento, los fragmentos pueden incluir una secuencia líder, tal como por ejemplo una líder de inmunoglobulina, tal como la líder de IgE. Como se divulga en el presente documento, los fragmentos pueden estar libres de una secuencia líder. Como se divulga en el presente documento, los fragmentos pueden estar libres de una secuencia líder, la líder de IgE.

3. Secuencias Genéticas, Construcciones y Plásmidos

Se pueden generar de manera habitual secuencias de ácidos nucleicos que codifican la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 6, así como proteínas homólogas, fragmentos inmunogénicos y fragmentos inmunogénicos de proteínas homólogas. De este modo, se pueden proporcionar moléculas de ácidos nucleicos que codifican proteínas inmunogénicas que tienen hasta un 95 % de homología con una secuencia consenso, hasta un 96 % de homología con una secuencia consenso, hasta un 96 % de homología con una secuencia consenso, hasta un 97 % de homología con una secuencia consenso, hasta un 98 % de homología con una secuencia consenso y hasta un 99 %. Asimismo, también se proporcionan secuencias de ácidos nucleicos que codifican los fragmentos inmunogénicos expuestos en el presente documento y los fragmentos inmunogénicos de la proteína homóloga a las proteínas expuestas en el presente documento.

Se generaron moléculas de ácidos nucleicos que codifican las secuencias de aminoácidos consenso. Las vacunas pueden comprender una o más secuencias de los ácidos nucleicos que codifican una o más de las versiones consenso de las proteínas inmunogénicas seleccionadas de este grupo de secuencias generadas para optimizar la estabilidad y la expresión en seres humanos. Secuencia del ácido nucleico (SEQ ID NO: 1) que codifica la proteína consenso de la proteína del núcleo del HBV (SEQ ID NO: 2), secuencia del ácido nucleico (SEQ ID NO: 3) que codifica la líder de IgE-proteína consenso de la proteína del núcleo del HBV (SEQ ID NO: 4), y la secuencia del ácido nucleico (SEQ ID NO: 5) que codifica la líder de IgE-proteína consenso de la proteína del núcleo del HBV-etiqueta HA (SEQ ID NO: 6). En el presente documento se divulgan moléculas de ácidos nucleicos que codifican proteínas inmunogénicas que tienen un 95 % de homología con las secuencias codificantes de los ácidos nucleicos en el presente documento. En el presente documento se divulgan moléculas de ácidos nucleicos que codifican proteínas inmunogénicas que tienen un 96 % de homología con las secuencias codificantes de los ácidos nucleicos en el presente documento. En el presente documento se divulgan moléculas de ácidos nucleicos que codifican proteínas inmunogénicas que tienen un 97 % de homología con las secuencias codificantes de los ácidos nucleicos en el presente documento. En el presente documento se divulgan moléculas de ácidos nucleicos que codifican proteínas inmunogénicas que tienen un 98 % de homología con las secuencias codificantes de los ácidos nucleicos en el presente documento. En el presente documento se divulgan moléculas de ácidos nucleicos que codifican proteínas inmunogénicas que tienen un 99 % de homología con las secuencias codificantes de los ácidos nucleicos en el presente documento. Como se divulga en el presente documento, las moléculas de ácidos nucleicos con secuencias codificantes divulgadas en el presente documento que son homólogas a una secuencia codificante de una proteína consenso divulgada pueden incluir secuencias que codifican una secuencia líder de IgE unida al extremo 5' de la secuencia codificante que codifica las secuencias de proteínas homólogas divulgadas en el presente documento.

En algunas realizaciones, la secuencia del ácido nucleico está libre de la secuencia codificante que codifica una secuencia líder. En algunas realizaciones, la secuencia del ácido nucleico está libre de la secuencia codificante que codifica la líder IgE.

La divulgación también proporciona fragmentos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:5. Los fragmentos pueden ser al menos el 10 %, al menos el 15 %, al menos el 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 35 %, al menos el 40 %, al menos el 45 %, al menos el 50 % o al menos el 55 % al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:5. Los fragmentos pueden ser al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % homólogos a los fragmentos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:5. Los fragmentos pueden incluir secuencias que codifican una secuencia líder, tal como por ejemplo una líder de inmunoglobulina, tal como la líder de IgE. En el presente documento se divulga que los fragmentos pueden estar libres de secuencias codificantes que codifican una secuencia líder. En el presente documento se divulga que los fragmentos pueden estar libres de secuencias codificantes que codifican una secuencia líder, la líder de IgE.

En el presente documento se proporcionan construcciones genéticas que pueden comprender una secuencia del ácido nucleico que codifica el antígeno del núcleo del HBV divulgada en el presente documento, incluidas las secuencias de proteínas consenso, secuencias homólogas a secuencias de proteínas consenso, fragmentos de secuencias de proteínas consenso y secuencias homólogas a fragmentos de secuencias de proteínas consenso. La construcción genética puede estar presente en la célula como una molécula extracromosómica funcional. La

construcción genética puede ser un minicromosoma lineal que incluye centrómero, telómeros o plásmidos o cósmidos.

La construcción genética también puede ser parte de un genoma de un vector vírico recombinante, incluyendo adenovirus recombinante, virus asociados a adenovirus recombinantes y vaccinia recombinante. La construcción genética puede ser parte del material genético en microorganismos vivos atenuados o vectores microbianos recombinantes que viven en las células.

Las construcciones genéticas pueden comprender elementos reguladores para la expresión génica de las secuencias codificantes del ácido nucleico. Los elementos reguladores pueden ser un promotor, un potenciador, un codón de iniciación, un codón de parada o una señal de poliadenilación.

Las secuencias de los ácidos nucleicos pueden formar una construcción genética que puede ser un vector. El vector puede ser capaz de expresar un antígeno en la célula de un mamífero en una cantidad eficaz para provocar una respuesta inmunitaria en el mamífero. El vector puede ser recombinante. El vector puede comprender ácido nucleico heterólogo que codifica el antígeno. El vector puede ser un plásmido. El vector puede ser útil para transfectar células con ácido nucleico que codifica un antígeno, en el que la célula huésped transformada se cultiva y mantiene en condiciones en donde tiene lugar la expresión del antígeno.

Las secuencias codificantes pueden optimizarse para estabilidad y altos niveles de expresión. En algunos casos, los codones se seleccionan para reducir la formación de la estructura secundaria del ARN, como la que se forma debido al enlace intramolecular.

El vector puede comprender ácido nucleico heterólogo que codifica un antígeno y puede comprender además un codón de iniciación, que puede estar cadena arriba de la secuencia codificante de antígeno, y un codón de parada, que puede estar cadena abajo de la secuencia codificante de antígeno. Los codones de iniciación y terminación pueden estar en fase con la secuencia codificante. El vector también puede comprender un promotor que está operativamente unido a la secuencia codificante de antígeno. El promotor operativamente unido a la secuencia codificante de antígeno puede ser un promotor del virus simio 40 (SV40), un promotor del virus del tumor mamario de ratón (MMTV, por sus siglas en inglés), un promotor del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) tal como el promotor de la repetición terminal larga (LTR) del virus de la inmunodeficiencia bovina (BIV, por sus siglas en inglés), un promotor del virus de Moloney, un promotor del virus de la leucosis aviar (ALV, por sus siglas en inglés), un promotor de citomegalovirus (CMV) tal como el promotor temprano inmediato del CMV, el promotor del virus de Epstein Barr (EBV, por sus siglas en inglés) o un promotor del virus del sarcoma de Rous (RSV, por sus siglas en inglés). El promotor también puede ser un promotor de un gen humano como actina humana, miosina humana, hemoglobina humana, creatina muscular humana o metalotioneína humana. El promotor también puede ser un promotor específico de tejido, tal como un promotor específico de músculo o piel, natural o sintético. Se describen ejemplos de tales promotores en la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos N.º US20040175727.

El vector también puede comprender una señal de poliadenilación, que puede estar cadena abajo de la secuencia codificante de la proteína del núcleo del HBV. La señal de poliadenilación puede ser una señal de poliadenilación de SV40, señal de poliadenilación de LTR, señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (bGH, por sus siglas en inglés), señal de poliadenilación de la hormona del crecimiento humana (hGH, por sus siglas en inglés) y señal de poliadenilación de la β -globina humana. La señal de poliadenilación de SV40 puede ser una señal de poliadenilación de un vector pCEP4 (Invitrogen, San Diego, CA).

El vector también puede comprender un potenciador cadena arriba de la secuencia codificante de la proteína del núcleo del HBV consenso. El potenciador puede ser necesario para la expresión del ADN. El potenciador puede ser actina humana, miosina humana, hemoglobina humana, creatina muscular humana o un potenciador vírico tal como el de CMV, HA, RSV o EBV. Los potenciadores de la función polinucleotídica se describen en las patentes de los Estados Unidos N.º 5.593.972, 5.962.428 y en el documento WO94/016737.

El vector también puede comprender un origen de replicación de mamífero para mantener el vector extracromosómicamente y producir múltiples copias del vector en una célula. El vector puede ser pVAX1, pCEP4 o pREP4 de Invitrogen (San Diego, CA), que puede comprender el origen de replicación del virus de Epstein Barr y la región codificante del antígeno nuclear EBNA-1, que puede producir replicación episómica de alta copia sin integración. El vector puede ser pVAX1 o una variante pVax1 con cambios tales como el plásmido variante descrito en el presente documento. La variante del plásmido pVax1 es una variante de 2998 pares de bases de la cadena principal del plásmido pVAX1 vector (Invitrogen, Carlsbad CA). El promotor de CMV está ubicado en las bases 137-724. El promotor/sitio de cebado de T7 está en las bases 664-683. Múltiples sitios de clonación están en las bases 696-811. La señal de poliadenilación de GH bovina está en las bases 829-1053. El gen de resistencia a kanamicina está en las bases 1226-2020. El origen pUC está en las bases 2320-2993.

Basándose en la secuencia de pVAX1 disponible de Invitrogen, se encontraron las siguientes mutaciones en la secuencia de pVAX1 que se usó como cadena principal para los plásmidos 1-6 expuestos en el presente documento:

C> G 241 en el promotor de CMV

C>T 1942 en la cadena principal, cadena abajo de la señal de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovina (bGH_{poliA})

A> - 2876 en la cadena principal, cadena abajo del gen de la Kanamicina

C> T 3277 mutación de alto número de copias en el origen de replicación (Ori) de pUC (véase Nucleic Acid Research 1985)

G> C 3753 al final del Ori de pUC cadena arriba del sitio RNaseH

Los pares de bases 2, 3 y 4 se cambian de ACT a CTG en la cadena principal, cadena arriba del promotor de CMV.

La cadena vertebral del vector puede ser pAV0242. El vector puede ser un vector de adenovirus de tipo 5 (Ad5) de replicación defectuosa.

El vector también puede comprender una secuencia reguladora, que puede ser muy adecuada para la expresión génica en una célula de mamífero o humana en la que se administra el vector. La secuencia codificante del HBV consenso puede comprender un codón, que puede permitir una transcripción más eficaz de la secuencia codificante en la célula hospedadora.

El vector puede ser pSE420 (Invitrogen, San Diego, Calif.), que se puede usar para la producción de proteínas en *Escherichia coli* (E. coli). El vector también puede ser pYES2 (Invitrogen, San Diego, Calif.), que puede usarse para la producción de proteínas en cepas de levadura *Saccharomyces cerevisiae*. El vector también puede ser del sistema de expresión de baculovirus completo MAXBAC™ (Invitrogen, San Diego, Calif.), que puede usarse para la producción de proteínas en células de insectos. El vector también puede ser pcDNA I o pcDNA3 (Invitrogen, San Diego, Calif.), que puede usarse para la producción de proteínas en células de mamíferos tales como células de ovario de hámster chino (CHO). El vector puede ser vectores o sistemas de expresión para producir proteínas mediante técnicas habituales y materiales de partida fácilmente disponibles, incluido Sambrook *et al.*, Molecular Cloning and Laboratory Manual, Segunda Edición, Cold Spring Harbor (1989).

4. Composiciones farmacéuticas

En el presente documento se proporcionan composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención que comprenden de aproximadamente 1 nanogramo a aproximadamente 10 mg de ADN. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención comprenden desde entre: 1) al menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 nanogramos, o al menos 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 205, 210, 215, 220, 225, 230, 235, 240, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275, 280, 285, 290, 295, 300, 305, 310, 315, 320, 325, 330, 335, 340, 345, 350, 355, 360, 365, 370, 375, 380, 385, 390, 395, 400, 405, 410, 415, 420, 425, 430, 435, 440, 445, 450, 455, 460, 465, 470, 475, 480, 485, 490, 495, 500, 605, 610, 615, 620, 625, 630, 635, 640, 645, 650, 655, 660, 665, 670, 675, 680, 685, 690, 695, 700, 705, 710, 715, 720, 725, 730, 735, 740, 745, 750, 755, 760, 765, 770, 775, 780, 785, 790, 795, 800, 805, 810, 815, 820, 825, 830, 835, 840, 845, 850, 855, 860, 865, 870, 875, 880, 885, 890, 895, 900, 905, 910, 915, 920, 925, 930, 935, 940, 945, 950, 955, 960, 965, 970, 975, 980, 985, 990, 995 o 1000 microgramos, o al menos 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5 o 10 mg o más; y 2) hasta e inclusive 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 nanogramos inclusive, o hasta e inclusive 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 205, 210, 215, 220, 225, 230, 235, 240, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275, 280, 285, 290, 295, 300, 305, 310, 315, 320, 325, 330, 335, 340, 345, 350, 355, 360, 365, 370, 375, 380, 385, 390, 395, 400, 405, 410, 415, 420, 425, 430, 435, 440, 445, 450, 455, 460, 465, 470, 475, 480, 485, 490, 495, 500, 605, 610, 615, 620, 625, 630, 635, 640, 645, 650, 655, 660, 665, 670, 675, 680, 685, 690, 695, 700, 705, 710, 715, 720, 725, 730, 735, 740, 745, 750, 755, 760, 765, 770, 775, 780, 785, 790, 795, 800, 805, 810, 815, 820, 825, 830, 835, 840, 845, 850, 855, 860, 865, 870, 875, 880, 885, 890, 895, 900, 905, 910, 915, 920, 925, 930, 935, 940, 945, 950, 955, 960, 965, 970, 975, 980, 985, 990, 995 o 1000 microgramos, o hasta e inclusive 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5 o 10 mg. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención comprenden aproximadamente 5 nanogramos a aproximadamente 10 mg de ADN. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención comprenden de aproximadamente 25 nanogramos a aproximadamente 5 mg de ADN. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas contienen aproximadamente 50 nanogramos a aproximadamente 1 mg de ADN. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas contienen aproximadamente 0,1 a aproximadamente 500 microgramos de ADN. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas contienen aproximadamente 1 a aproximadamente 350 microgramos de ADN. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas contienen aproximadamente 5 a aproximadamente 250 microgramos de ADN. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas contienen aproximadamente 10 a aproximadamente 200 microgramos de ADN. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas contienen aproximadamente 15 a aproximadamente 150 microgramos de ADN. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas contienen aproximadamente 20 a aproximadamente 100 microgramos de ADN. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas contienen aproximadamente 25 a

aproximadamente 75 microgramos de ADN. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas contienen aproximadamente 30 a aproximadamente 50 microgramos de ADN. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas contienen aproximadamente 35 a aproximadamente 40 microgramos de ADN. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas contienen aproximadamente 100 a aproximadamente 200 microgramos de ADN. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden aproximadamente 10 microgramos a aproximadamente 100 microgramos de ADN. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden aproximadamente 20 microgramos a aproximadamente 80 microgramos de ADN. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden aproximadamente 25 microgramos a aproximadamente 60 microgramos de ADN. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden aproximadamente 30 nanogramos a aproximadamente 50 microgramos de ADN. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden aproximadamente 35 nanogramos a aproximadamente 45 microgramos de ADN. En algunas realizaciones preferidas, las composiciones farmacéuticas contienen aproximadamente 0,1 a aproximadamente 500 microgramos de ADN. En algunas realizaciones preferidas, las composiciones farmacéuticas contienen aproximadamente 1 a aproximadamente 350 microgramos de ADN. En algunas realizaciones preferidas, las composiciones farmacéuticas contienen aproximadamente 25 a aproximadamente 250 microgramos de ADN. En algunas realizaciones preferidas, las composiciones farmacéuticas contienen aproximadamente 100 a aproximadamente 200 microgramos de ADN.

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención se formulan de acuerdo con el modo de administración a utilizar. En los casos en que las composiciones farmacéuticas son composiciones farmacéuticas inyectables, estas son estériles, sin pirógenos y sin partículas. Se usa preferentemente una formulación isotónica. Por lo general, los aditivos para la isotonicidad pueden incluir cloruro de sodio, dextrosa, manitol, sorbitol y lactosa. En algunos casos, se prefieren soluciones isotónicas tales como solución salina tamponada con fosfato. Los estabilizantes incluyen gelatina o albúmina. En algunas realizaciones, se añade a la formulación un agente para la vasoconstricción.

Preferentemente, la composición farmacéutica es una vacuna, y más preferentemente una vacuna de ADN.

En el presente documento se proporciona una vacuna capaz de generar en un mamífero una respuesta inmunitaria contra uno o más genotipos de HBV. La vacuna puede comprender la construcción genética analizada anteriormente.

Aunque sin pretender quedar ligado a una teoría científica, la vacuna puede usarse para provocar una respuesta inmunitaria (humoral, celular, o ambas) ampliamente contra uno o más genotipos de HBV. Las vacunas pueden comprender secuencias codificantes para la secuencia de la proteína del núcleo del HBV consenso (SEQ ID NO: 2); líder de IgE unida a la secuencia de proteína del núcleo del HBV consenso (SEQ ID NO: 4); y la líder de IgE unida a la proteína del núcleo del HBV consenso unida a la secuencia de la etiqueta HA (SEQ ID NO: 6). Las vacunas pueden comprender secuencias codificantes específicas para la secuencia de proteína del núcleo del HBV consenso (SEQ ID NO: 2) tal como (SEQ ID NO: 1); líder de IgE unida a la secuencia de la proteína del núcleo del HBV consenso (SEQ ID NO: 4) tal como (SEQ ID NO: 3) y líder de IgE unida a la proteína del núcleo del HBV consenso unida a la secuencia de la etiqueta HA (SEQ ID NO: 6) tal como (SEQ ID NO: 5).

Algunas realizaciones alternativas incluyen aquellas que comprenden secuencias de los ácidos nucleicos que codifican fragmentos inmunogénicos de proteína del núcleo del HBV consenso, una o más proteínas homólogas a la proteína del núcleo del HBV consenso y fragmentos inmunogénicos de una o más proteínas homólogas a la proteína del núcleo del HBV consenso.

Algunas realizaciones proporcionan las composiciones descritas en el presente documento para su uso en métodos de generación de respuestas inmunitarias contra proteínas del núcleo del HBV que comprenden administrar a un individuo una o más composiciones descritas en el presente documento. Algunas realizaciones proporcionan las composiciones descritas en el presente documento para su uso en métodos de vacunación profiláctica de un individuo contra la infección por el HBV que comprenden administrar una o más composiciones descritas en el presente documento. Algunas realizaciones proporcionan las composiciones descritas en el presente documento para su uso en métodos de vacunación terapéutica de un individuo que se ha infectado con HBV que comprende administrar una o más composiciones descritas en el presente documento. El diagnóstico de la infección por el HBV antes de la administración se puede realizar de forma habitual.

La vacuna puede ser una vacuna de ADN. La vacuna de ADN puede comprender una pluralidad de los mismos o diferentes plásmidos que comprenden secuencias de los ácidos nucleicos que codifican la proteína del núcleo del HBV consenso.

Las vacunas de ADN se divulgan en las patentes de Estados Unidos números 5.593.972, 5.739.118, 5.817.637, 5.830.876, 5.962.428, 5.981.505, 5.580.859, 5.703.055 y 5.676.594. La vacuna de ADN puede comprender además elementos o reactivos que inhiben su integración en el cromosoma. La vacuna puede ser un ARN de la proteína del núcleo del HBV. La vacuna de ARN se puede introducir en la célula.

La vacuna puede ser una vacuna recombinante que comprende la construcción genética o el antígeno descritos anteriormente. La vacuna también puede comprender una o más proteínas del núcleo del HBV consenso en forma de una o más subunidades de proteínas, una o más partículas víricas inactivadas que comprenden una o más proteínas del núcleo del HBV consenso o una o más partículas víricas atenuadas que comprenden una o más proteínas del núcleo del HBV consenso. La vacuna atenuada puede ser vacunas vivas atenuadas, vacunas inactivas y vacunas que usan vectores recombinantes para suministrar genes extraños que codifican una o más proteínas del núcleo del HBV consenso y también vacunas de subunidades y glicoproteínas. Se describen ejemplos de vacunas vivas atenuadas, aquellas que usan vectores recombinantes para suministrar antígenos extraños, vacunas de subunidades y vacunas de glicoproteínas en las patentes de EE. UU. N.º 4.510.245; 4.797.368; 4.722.848; 4.790.987; 4.920.209; 5.017.487; 5.077.044; 5.110.587; 5.112.749; 5.174.993; 5.223.424; 5.225.336; 5.240.703; 5.242.829; 5.294.441; 5.294.548; 5.310.668; 5.387.744; 5.389.368; 5.424.065; 5.451.499; 5.453.364; 5.462.734; 5.470.734; 5.474.935; 5.482.713; 5.591.439; 5.643.579; 5.650.309; 5.698.202; 5.955.088; 6.034.298; 6.042.836; 6.156.319 y 6.589.529.

La vacuna puede comprender vectores y/o proteínas dirigidas a múltiples genotipos de HBV de múltiples regiones particulares en el mundo. La vacuna proporcionada se puede usar para inducir respuestas inmunitarias, incluyendo respuestas inmunitarias terapéuticas o profilácticas. Se pueden generar anticuerpos y/o linfocitos T citotóxicos que se dirigen a la proteína del núcleo del HBV consenso y también en general a través de múltiples genotipos de virus del HBV. Dichos anticuerpos y células pueden aislarse.

La vacuna puede comprender además un excipiente farmacéuticamente aceptable. El excipiente farmacéuticamente aceptable puede ser moléculas funcionales como vehículos, adyuvantes, transportadores o diluyentes. El excipiente farmacéuticamente aceptable es un agente que facilita la transfección, que pueden incluir agentes tensioactivos, tales como complejos inmunoestimulantes (ISCOMS), adyuvante incompleto de Freund, análogo de LPS incluyendo monofosforil lípido A, muramil péptidos, análogos de quinona, vesículas tales como escualano y escualeno, ácido hialurónico, lípidos, liposomas, iones de calcio, proteínas víricas, polianiones, policationes o nanopartículas, u otros agentes que facilitan la transfección.

El agente que facilita la transfección es un polianión, policación, incluyendo poli-L-glutamato (LGS) o un lípido. El agente que facilita la transfección es poli-L-glutamato, y más preferentemente, el poli-L-glutamato está presente en la vacuna a una concentración de menos de 6 mg/ml. El agente que facilita la transfección también puede incluir agentes tensioactivos tales como complejos inmunoestimulantes (ISCOMS), adyuvante incompleto de Freund, análogo de LPS incluyendo monofosforil lípido A, muramil péptidos, análogos de quinona y vesículas tales como escualano y escualeno, y también se puede usar ácido hialurónico administrado junto con la construcción genética.

En algunas realizaciones, las vacunas de vector de ADN también pueden incluir un agente que facilita la transfección tal como lípidos, liposomas, incluyendo liposomas de lecitina u otros liposomas conocidos en la técnica, como una mezcla de ADN-liposoma (véase, por ejemplo, el documento WO9324640), iones de calcio, proteínas víricas, polianiones, policationes o nanopartículas, u otros agentes que facilitan la transfección. Preferentemente, el agente que facilita la transfección es un polianión, policación, incluyendo poli-L-glutamato (LGS) o un lípido. La concentración del agente de transfección en la vacuna es inferior a 4 mg/ml, inferior a 2 mg/ml, inferior a 1 mg/ml, inferior a 0,750 mg/ml, inferior a 0,500 mg/ml, inferior a 0,250 mg/ml, inferior a 0,100 mg/ml, inferior a 0,050 mg/ml o inferior a 0,010 mg/ml.

El excipiente farmacéuticamente aceptable puede ser un adyuvante. El adyuvante puede ser otros genes que se expresan en un plásmido alternativo o se suministran como proteínas en combinación con el plásmido anterior en la vacuna. El adyuvante puede seleccionarse del grupo que consiste en: interferón α (IFN- α), interferón β (IFN- β), interferón γ , factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), TNF α , TNF β , GM-CSF, factor de crecimiento epidérmico (EGF), quimiocina atrayente de linfocitos T cutáneos (CTACK), quimiocina epitelial expresada en timo (TECK), quimiocina epitelial asociada a mucosas (MEC), IL-12, IL-15, MHC, CD80, CD86, incluyendo IL-15, que tiene la secuencia señal eliminada e incluyendo opcionalmente el péptido señal de IgE. El adyuvante puede ser IL-12, IL-15, IL-28, CTACK, TECK, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), TNF α , TNF β , GM-CSF, factor de crecimiento epidérmico (EGF), IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, o una combinación de los mismos.

Otros genes que pueden ser adyuvantes útiles incluyen aquellos que codifican: MCP-1, MIP-1a, MIP-1p, IL-8, RANTES, L-selectina, P-selectina, E-selectina, CD34, GlyCAM-1, MadCAM-1, LFA-1, VLA-1, Mac-1, p50.95, PECAM, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, CD2, LFA-3, M-CSF, G-CSF, IL-4, formas mutantes de IL-18, CD40, CD40L, factor de crecimiento vascular, factor de crecimiento de fibroblastos, IL-7, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento endotelial vascular, Fas, receptor de TNF, Flt, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2, DR6, Caspasa ICE, Fos, c-jun, Sp-1, Ap-1, Ap-2, p38, p65Rel, MyD88, IRAK, TRAF6, Ikb, NIK inactiva, SAP K, SAP-1, JNK, genes de respuesta al interferón, NFkB, Bax, TRAIL, TRAILrec, TRAILrecDRC5, TRAIL-R3, TRAIL-R4, RANK, LIGANDO DE RANK, Ox40, LIGANDO DE Ox40, NKG2D, MICA, MICB, NKG2A, NKG2B, NKG2C, NKG2E, NKG2F, TAP1, TAP2 y fragmentos funcionales de los mismos.

5. Métodos de Suministro

En el presente documento se proporciona el suministro de las formulaciones farmacéuticas, preferentemente

vacunas, para proporcionar construcciones genéticas y proteínas de la proteína del núcleo del HBV que comprenden epítomos que las hacen inmunógenos particularmente eficaces contra los cuales se puede inducir una respuesta inmunitaria a las infecciones víricas por HBV. El suministro de la vacuna, o vacunación, puede proporcionarse para inducir una respuesta inmunitaria terapéutica y/o profiláctica. El proceso de vacunación puede generar en el mamífero una respuesta inmunitaria contra una pluralidad de genotipos del HBV. La vacuna puede administrarse a un individuo para modular la actividad del sistema inmunitario del mamífero y potenciar la respuesta inmunitaria. La administración de la vacuna puede ser la transfección del antígeno HA como una molécula de ácido nucleico que se expresa en la célula y se suministra a la superficie de la célula sobre la cual el sistema inmunitario reconoce e induce una respuesta celular, humoral o celular y humoral. El suministro de la vacuna se puede usar para inducir o provocar una respuesta inmunitaria en mamíferos contra una pluralidad de virus del HBV administrando a los mamíferos la vacuna como se analiza en el presente documento.

Tras el suministro de la vacuna al mamífero, y a continuación del vector en las células del mamífero, las células transfectadas expresarán y secretarán la proteína del núcleo del HBV consenso. Estas proteínas secretadas, o antígenos sintéticos, será reconocido como extraño por el sistema inmunitario, que generará una respuesta inmunitaria que puede incluir: anticuerpos producidos contra los antígenos, y la respuesta de linfocitos T específicamente contra el antígeno. En algunos ejemplos, un mamífero vacunado con las vacunas analizadas en el presente documento tendrá un sistema inmunitario preparado y cuando se exponga con una cepa vírica del HBV, el sistema inmunitario preparado permitirá el aclaramiento rápido de los virus del HBV posteriores, ya sea a través de respuesta humoral, celular, o ambas. La vacuna puede ser para el suministro a un individuo para modular la actividad del sistema inmunitario del individuo, potenciando, de este modo, la respuesta inmunitaria.

La vacuna puede ser para el suministro en forma de una vacuna de ADN y los métodos para suministrar las vacunas de ADN se describen en las patentes de Estados Unidos números 4.945.050 y 5.036.006.

La vacuna puede ser para administración a un mamífero para provocar una respuesta inmunitaria en un mamífero. El mamífero puede ser un ser humano, primate no humano, vaca, cerdo, oveja, cabra, antílope, bisonte, búfalo acuático, bóvidos, ciervo, erizos, elefantes, llama, alpaca, ratones, ratas o pollos, y preferentemente ser humano, vaca, cerdo o pollo.

a. Tratamientos de Combinación

Las composiciones farmacéuticas, preferentemente las vacunas descritas en el presente documento, pueden ser para administración en combinación con proteínas o genes que codifican adyuvantes, que pueden incluir: interferón α (IFN- α), interferón β (IFN- β), interferón γ , IL-12, IL-15, IL-28, CTACK, TECK, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), TNF α , TNF β , GM-CSF, factor de crecimiento epidérmico (EGF), IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, MCP-1, MIP-1a, MIP-1p, IL-8, RANTES, L-selectina, P-selectina, E-selectina, CD34, GlyCAM-1, MadCAM-1, LFA-1, VLA-1, Mac-1, p150.95, PECAM, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, CD2, LFA-3, M-CSF, G-CSF, IL-4, formas mutantes de IL-18, CD40, CD40L, factor de crecimiento vascular, factor de crecimiento de fibroblastos, IL-7, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento endotelial vascular, Fas, receptor de TNF, Flt, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2, DR6, Caspasa ICE, Fos, c-jun, Sp-1, Ap-1, Ap-2, p38, p65Rel, MyD88, IRAK, TRAF6, I κ B, NIK inactiva, SAP K, SAP-1, JNK, genes de respuesta al interferón, NF κ B, Bax, TRAIL, TRAILrec, TRAILrecDRC5, TRAIL-R3, TRAIL-R4, RANK, LIGANDO DE RANK, Ox40, LIGANDO DE Ox40, NKG2D, MICA, MICB, NKG2A, NKG2B, NKG2C, NKG2E, NKG2F, TAP1, o TAP2, o fragmentos funcionales de los mismos.

b. Vías de administración

La vacuna puede ser para administración por diferentes vías, incluso por vía oral, parenteral, sublingual, transdérmica, rectal, transmucosa, tópica, a través de inhalación, a través de administración bucal, intrapleural, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, intranasal intratecal e intraarticular o combinaciones de las mismas. Para uso veterinario, la composición puede ser para administración como una formulación adecuadamente aceptable de acuerdo con la práctica veterinaria normal. El veterinario puede determinar fácilmente el régimen de dosificación y la vía de administración que es más apropiada para un animal en particular. La vacuna puede ser para administración por jeringas tradicionales, dispositivos de inyección sin aguja, "pistolas de genes para el bombardeo de microproyectiles" u otros métodos físicos tales como la electroporación ("EP"), el "método hidrodinámico" o ultrasonido.

El vector de la vacuna se puede suministrar al mamífero por varias tecnologías bien conocidas, incluida la inyección de ADN (también conocida como vacuna de ADN) con y sin electroporación *in vivo*, las mediadas por liposomas, las facilitadas por partículas, vectores recombinantes tales como adenovirus recombinantes, virus asociados a adenovirus recombinantes y vaccinia recombinante. El antígeno del HBV puede ser para suministro a través de inyección de ADN y junto con electroporación *in vivo*.

c. Electroporación

La administración de la vacuna a través de electroporación de los plásmidos de la vacuna se puede lograr usando dispositivos de electroporación que se pueden configurar para suministrar a un tejido deseado de un mamífero un pulso de energía eficaz para hacer que se formen poros reversibles en las membranas celulares, y preferentemente el pulso de energía es una corriente constante similar a una entrada de corriente preestablecida por un usuario. El dispositivo de electroporación puede comprender un componente de electroporación y un conjunto de electrodos o conjunto de mango. El componente de electroporación puede incluir e incorporar uno o más de los diversos elementos de los dispositivos de electroporación, incluyendo: un controlador, un generador de la forma de onda de corriente, un evaluador de la impedancia, un registrador de la forma de onda, un elemento de entrada, un elemento de informe de estado, un puerto de comunicación, un componente de memoria, una fuente de alimentación y un interruptor de encendido. La electroporación se puede lograr usando un dispositivo de electroporación *in vivo*, por ejemplo el sistema CELLECTRA® EP (Inovio Pharmaceuticals, Inc., Blue Bell, PA) o el electroporador Elgen (Inovio Pharmaceuticals, Inc.) para facilitar la transfección de las células por el plásmido.

Ejemplos de dispositivos de electroporación y métodos de electroporación preferentes que puedan facilitar la administración de las vacunas de ADN de la presente invención, incluyen los descritos en la Patente de Estados Unidos n.º 7,245,963 de Draghia-Akli, *et al.*, la publicación de patente de Estados Unidos 2005/0052630 presentada por Smith, *et al.* Otros dispositivos de electroporación y métodos de electroporación que se pueden usar para facilitar el suministro de las vacunas de ADN incluyen los que se proporcionan en trámite junto con y del mismo propietario que la presente la Solicitud de Patente de EE. UU., Número de serie US2008091135.

La Patente de Estados Unidos N.º 7.245.963 de Draghia-Akli, *et al.* describe sistemas de electrodos modulares y su uso para facilitar la introducción de una biomolécula en células de un tejido seleccionado en un cuerpo o planta. Los sistemas de electrodos modulares pueden comprender una pluralidad de electrodos de aguja; una aguja hipodérmica; un conector eléctrico que proporciona un enlace conductor desde un controlador de pulsos de corriente constante programable hasta la pluralidad de electrodos de aguja; y una fuente de alimentación. Un operario puede sujetar la pluralidad de electrodos de aguja que están montados en una estructura de soporte e insertarlos firmemente en el tejido seleccionado en un cuerpo o planta. Después, las biomoléculas se suministran a través de la aguja hipodérmica en el tejido seleccionado. El controlador de pulsos de corriente constante programable se activa y el pulso eléctrico de corriente constante se aplica a la pluralidad de electrodos de aguja. El pulso eléctrico de corriente constante aplicado facilita la introducción de la biomolécula en la célula entre la pluralidad de electrodos.

La publicación de patente de Estados Unidos 2005/0052630 presentada por Smith, *et al.* describe un dispositivo de electroporación que puede usarse para facilitar de forma eficaz la introducción de una biomolécula en las células de un tejido seleccionado en un cuerpo o planta. El dispositivo de electroporación comprende un dispositivo electrocinético ("dispositivo EKD") cuyo funcionamiento se especifica mediante un programa informático o soporte lógico incorporado. El dispositivo EKD produce una serie de patrones de pulsos programables de corriente constante entre los electrodos de una matriz, basado en el control del usuario, y de la entrada de los parámetros del pulso, y permite el almacenamiento y la adquisición de datos en forma de onda de corriente. El dispositivo de electroporación también comprende un disco de electrodo reemplazable que tiene una matriz de electrodos de aguja, un canal de inyección central para una aguja de inyección, y un disco de guía extraíble.

Las matrices de electrodos y los métodos descritos en la patente de Estados Unidos N.º 7,245,963 y la publicación de patente de Estados Unidos 2005/0052630 están adaptados para la penetración profunda no solo en tejidos tales como los músculos, sino también en otros tejidos u órganos. Debido a la configuración de la matriz de electrodos, la aguja de inyección (para suministrar la biomolécula de elección) también se inserta completamente en el órgano diana y la inyección se administra de forma perpendicular a la diana, en el área predelineada por los electrodos. Los electrodos descritos en la Patente de Estados Unidos N.º 7.245.963 y la Publicación de Patente de Estados Unidos 2005/005263 son preferentemente de 20 mm de largo y de calibre 21.

Adicionalmente, contemplados en algunas realizaciones que incorporan dispositivos de electroporación y usos de los mismos, existen dispositivos de electroporación que son los descritos en las siguientes patentes: Patente de Estados Unidos 5.273.525 emitida el 28 de diciembre de 1993, Patentes de Estados Unidos 6.110.161 emitidas el 29 de agosto de 2000, 6.261.281 emitidas el 17 de julio de 2001 y 6.958.060 emitidas el 25 de octubre de 2005, y la patente de Estados Unidos 6.939.862 emitida el 6 de septiembre de 2005. Asimismo, se contemplan en el presente documento, patentes que cubren el tema provisto en la patente de Estados Unidos 6.697.669 emitida el 24 de febrero de 2004, que se refiere a el suministro de ADN utilizando cualquiera de una variedad de dispositivos, y la patente de Estados Unidos 7.328.064 emitida el 5 de febrero de 2008, que se refiere al método de inyección de ADN.

d. Método de Preparación de la Vacuna

En el presente documento se proporcionan métodos para preparar los plásmidos de ADN que comprenden las vacunas de ADN analizadas en el presente documento. Los plásmidos de ADN, después de la etapa final de subclonación en el plásmido de expresión de mamíferos, puede usarse para inocular un cultivo celular en un tanque de fermentación a gran escala, utilizando métodos conocidos en la técnica.

Los plásmidos de ADN para su uso con los dispositivos de EP de la presente invención se pueden formular o fabricar usando una combinación de dispositivos y técnicas conocidos, pero preferentemente se fabrican usando una técnica optimizada de fabricación de plásmidos que se describe en una solicitud publicada en los Estados Unidos n.º 20090004716, que se presentó el 23 de mayo de 2007. En algunos ejemplos, los plásmidos de ADN utilizados en estos estudios pueden formularse a concentraciones mayores o iguales que 10 mg/ml. Las técnicas de fabricación también incluyen o incorporan diversos dispositivos y protocolos que son habitualmente conocidos por los expertos en la materia, además de los descritos en el número de serie de Estados Unidos 60/939792, incluidos los descritos en una patente con licencia, la Patente de Estados Unidos N.º 7.238.522, que se presentó el 3 de julio de 2007.

Ejemplo

La presente invención se ilustra adicionalmente en los siguientes ejemplos. Debe entenderse que estos ejemplos, aunque indican realizaciones preferidas de la invención, se proporcionan solamente a modo de ilustración. A partir del análisis anterior y los ejemplos, un experto en la materia puede determinar las características esenciales de la presente invención y, sin apartarse del alcance de la misma, puede realizar diversos cambios y modificaciones de la invención para adaptarla a diversos usos y condiciones. De este modo, gracias a la descripción anterior, para los expertos en la materia serán evidentes diversas modificaciones de la invención, más allá de las mostradas y descritas en el presente documento. La materia objeto para la que se solicita protección es como se establece en las reivindicaciones.

Una proteína del núcleo del HBV consenso, también conocida como HBV modificado o construcción del núcleo M, se diseñó a partir de secuencias de epítomos de genotipos de HBV A, B, C, D y E. Las secuencias de proteínas del núcleo del HBV de estos genotipos se seleccionaron para su inclusión en una construcción de un núcleo consenso que induciría inmunidad contra una amplia gama de genotipos, proporcionando, de este modo, una vacuna universal para el HBV. En algunas realizaciones, las modificaciones de la construcción del núcleo M incluyeron la adición de una secuencia líder de IgE. En algunas realizaciones, la proteína del núcleo M se codifica utilizando la optimización de codones y la optimización de ARN para potenciar la expresión.

Una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia del núcleo M con líder de IgE y etiqueta HA (SEQ ID NO: 5) se clonó en el vector de expresión pVAX para producir la construcción pM-core. Las pruebas de expresión *in vitro* se realizaron utilizando la construcción pM y pVAX y se utilizó como control. Los resultados que muestran una expresión positiva se representan en las imágenes de gel que se muestran en las Figuras 2A y 2B.

Los ratones transgénicos C57BL/6 se separaron en dos grupos de cuatro ratones cada uno y usando electroporación se inmunizaron tres veces con 20 µg de ADN a intervalos quincenales (grupo 1 - control de vector pVAX; grupo 2 pM-core). Los ratones se inmunizaron el día 0, Día 14, Día 28 y se sacrificaron el día 35. Se cosecharon los bazo, hígado y sueros de los animales sacrificados.

Los estudios *in vivo* de cepas de ratones C57BL/6 indican una potenciación en la magnitud de la secreción del factor de necrosis tumoral (TNF-α), interferón gamma (IFN-γ) en linfocitos T y el CD107a en las linfocitos T CD8 y CD4 tomados del bazo. Las Figuras 3A y 3B muestran que la vacunación de ratones C57BL/6 con pM-Core potenció la magnitud de la secreción de IFN-γ en los linfocitos T CD8+ y CD4+ de los bazo. Las Figuras 4A y 4B muestran que la vacunación de ratones C57BL/6 con pM-Core potenció la magnitud de la secreción de TNF-α en los linfocitos T CD8+ y CD4+ de los bazo. Las Figuras 5A y 5B muestran que la vacunación de ratones C57BL/6 con pM-Core potenció la magnitud de la secreción de CD 107a en linfocitos T CD8+ y CD4+ de los bazo.

La migración de linfocitos T específicos de HBV al hígado también se demostró en animales a los que se les administró la vacuna de ADN pM-Core. El direccionamiento a los linfocitos T específicos del antígeno del núcleo del HBV con alta frecuencia y función efectora al hígado es un objetivo importante para el desarrollo de una terapia inmunitaria contra el HBV. Después de la inmunización, se sacrificaron los animales y se extrajeron sus hígados y se determinó la migración de linfocitos T efectores específicos del HBV al hígado. Los resultados muestran que la vacuna pM-Core lleva los linfocitos T efectores al hígado *in vivo*. Las Figuras 6A y 6B muestran la respuesta hepática de los linfocitos T de interferón-γ, las Figuras 7A y 7B muestran la respuesta inmunitaria hepática del Factor de Necrosis Tumoral α y la elevada respuesta que da como resultado la vacunación con pM-Core.

El inmunógeno consenso del núcleo M codificado por la construcción de ADN pM-core impulsa respuestas inmunitarias de linfocitos T CD4+/CD8+ fuertemente equilibradas. los linfocitos T inducidos circulan al hígado a alta frecuencia y muestran el fenotipo efector correcto para el aclaramiento inmunitario después de la infección por HBV.

La Figura 8 muestra las respuestas inmunitarias celulares inducidas por pM-Core utilizando un ensayo de puntos inmunoabsorbentes ligado a enzimas (ELISPOT). Los esplenocitos se estimularon con dos grupos de péptidos de 15 meros que abarcaban toda la longitud de pMCore y se solapaban por 8 aminoácidos. Se colocaron en placa 200.000 esplenocitos en medio R10 en una placa de 96 pocillos recubierta con anticuerpo de captura de IFN-γ (R&D system) y se estimularon durante la noche en presencia de un grupo de péptidos específicos a 37 °C en CO₂ al 5 %. Las células se lavaron y las placas se incubaron durante la noche con anticuerpo de detección anti-IFN-γ de ratón biotinilado (R&D system). La estreptavidina-fosfatasa alcalina y la sal de p-toluidina 5-bromo-4-cloro-3'-indolilfosfato

y el cloruro de tetrazolio azul nitro se usaron posteriormente para desarrollar puntos. Los puntos se contaron usando un lector ELISPOT automatizado (CTL Limited). Como se muestra en la Figura 8, la inmunización con pMCore podría inducir fuertes respuestas inmunitarias celulares. Los datos mostraron que los epítomos dominantes estaban sesgados hacia el grupo de péptidos 2. Las respuestas promedio de linfocitos T de IFN- γ específicos de HBcAg fueron de aproximadamente 2000 ($\pm$ 210) SFU por millón de esplenocitos.

Los estudios de ensayos de citotoxicidad *in vivo* se realizaron utilizando marcado con diacetato de carboxifluoresceína succinimidil éster (CFSE) combinado con citometría de flujo. Se evaluó la división celular entre las células de las poblaciones celulares. Los esplenocitos se aislaron de ratones no tratados y se dividieron en dos poblaciones. Una población, marcada con alto contenido de CFSE, se pulsó con péptido relevante (por ejemplo, péptidos del núcleo de HBV). La otra población, etiquetada con bajo contenido de CFSE, se pulsó con péptido irrelevante (por ejemplo, péptidos NS3 de HCV). Las células marcadas, tratadas con péptidos se combinaron y usaron en experimentos de transferencia adoptiva en los que se realizó un análisis de flujo. Las poblaciones combinadas de células diana tratadas y marcadas se administraron a dos grupos de ratones, un grupo control y un grupo inmunizado. Se aislaron esplenocitos de cada grupo de ratones y las muestras se procesaron en un citómetro de flujo. Se midió la cantidad de CFSE. Generalmente, en tales experimentos, se forman dos máximos, siendo el primero el péptido irrelevante; siendo el segundo el péptido inmunizante en el máximo que indica mayor CFSE.

La Figura 9 muestra que los linfocitos T CD8 inducidos por la vacunación pueden eliminar específicamente las células diana *in vivo*. Los resultados muestran que las muestras de bazo e hígado de ratones no tratados contenían cantidades casi iguales de células que estaban en los máximos de péptido irrelevante y de péptido relevante, mientras que los resultados muestran claramente que entre los grupos inmunizados, los máximos para las células derivadas de aquellas pulsadas con el péptido relevante fueron significativamente menores que los del péptido irrelevante. Estos datos muestran que las células diana tratadas con el péptido del HBV se eliminaron específicamente en ratones inmunizados con la vacuna contra el HBV, pero no en los ratones no inmunizados. Cualquier eliminación de células diana tratadas con el péptido irrelevante, si se produjo, fue igual en ratones inmunizados con la vacuna contra el HBV y en los ratones no inmunizados y significativamente menor que la eliminación de las células diana tratadas con el péptido del HBV.

La Figura 10 muestra los datos recogidos del Ensayo de Proliferación de Linfocitos T usando marcado con CFSE. Se comparó el porcentaje de proliferación de células CD3+ CD4+ y CD3+ CD8+ tratadas con el vector pVax (control) o con el plásmido pMCore que expresa el núcleo M de HBV. En resumen, los esplenocitos aislados se tiñeron con el Kit de rastreo celular (Invitrogen) de diacetato de carboxifluoresceína, succinimidil éster (CFDA-SE) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células teñidas se lavaron tres veces con solución salina y se estimularon con los péptidos solapantes específicos de pMCore. Las células se incubaron a 37 °C durante 96 horas. Después de 48 horas, el 50 % de los medios de cultivo se eliminaron y se reemplazaron con R10 nuevo. En el día 4, las células se recogieron y se tiñeron anticuerpos monoclonales específicos de CD3, CD4 y CD8 (BD Pharmingen). Las células se fijaron con PBS con Paraformaldehído al 1 % (PFA) y se adquirieron en un FACScalibur (Becton Dickinson). Los datos se analizaron utilizando el programa FlowJo. La población con bajo contenido en CFSE y medio contenido en CFSE se consideró como células proliferadas. Como se muestra en la Figura 10, los linfocitos T CD3+ CD8+ aislados del bazo proliferaron más en comparación con los linfocitos T CD3+ CD4+.

Las Figuras 11A y 11B son datos de ELISA que muestran una comparación del anticuerpo antinúcleo del HBV en la dilución en serie de sueros de animales tratados con el vector pVax (control) o con el plásmido pMCore que expresa el núcleo M del HBV. En resumen, las placas ELISA de alta unión (Costar, Corning, NY) se recubrieron con 1 μ g/ml de proteína HBcAg en PBS, a 4 °C durante 24 h y después se lavaron con PBS-Tween y se bloquearon con PBS que contenía BSA al 1 % durante 2 h a temperatura ambiente. Se añadieron muestras de suero diluidas en serie a los pocillos y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Después del lavado, el anticuerpo sérico unido se reveló mediante anti-IgG (Figura 11A) o anti-IgA (Figura 11B) de ratón de cabra marcado con HRP. Los Ac conjugados con peroxidasa se detectaron usando tetrametilbencidina (Sigma-Aldrich) como sustrato, y se midió la DO a 450 nm con el lector de placas ELISA Multiscan. Se observó la respuesta humoral específica de antígeno en sueros recogidos de ratones inmunizados.

La Figura 12 muestra el porcentaje de TNF- α e IFN- γ de células de bazo y de hígado CD4+ y CD8+.

En ausencia de un modelo animal pequeño para el HBV, se usó HBcAg para transfectar transitoriamente el hígado de ratones mediante inyección hidrodinámica. El hígado de ratones inmunizados se transfectó con pMCore o NS3/4A de HCV. La tinción inmunohistoquímica tres días después de la transfección mostró el aclaramiento de los hepatocitos transfectados con HBcAg en comparación con los transfectados con NS3/4A. Los niveles de ALT en suero se midieron para asegurar que el aclaramiento inducido por los ratones inmunizados no causara ningún daño hepático. Los resultados en la Figura 13 muestran que el aclaramiento inducido por los ratones inmunizados no causó ningún daño hepático.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA

WEINER, David
YAN, Jian
NYAMEKYE, Obeng-Adjei

5 <120> MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO QUE CODIFICA LA PROTEÍNA DEL NÚCLEO DEL VIRUS DE LA
HEPATITIS B

<130> 130694,09500 UPVG0037 X5786

10 <150> 61/442.162
<151> 11/02/2011

<160> 8

15 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 552
<212> ADN
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia de ácido nucleico del núcleo M

25 <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(3)
<223> n es a, c, g o t

30 <400> 1

nnngacatcg acccctacaa agaattcggc gccaccgtgg aactgctgag cttcctgccc	60
agcgacttct tcccctccgt gcgggacctg ctggataccg ccagcgccct gtacagagag	120
gccctggaaa gccccgagca ctgcagccct caccacacag ccctgcggca ggccatcctg	180
tgctggggcg agctgatgac cctggccacc tgggtcggaa gcaacctgga agatcccgcc	240
agccgggacc tgggtggtgtc ctacgtgaac accaacatgg gcctgaagat ccggcagctg	300
ctgtggttcc acatctcctg cctgaccttc ggccgggaaa ccgtgctgga atacctggtg	360
tccttcggcg tgtggatcag aacccccct gcctacagac cccccaacgc ccctatcctg	420
agcacccctgc ccgagacaac cgtggtccgc agacggggca gaagccccag aagaagaacc	480
cccagcccta gacggcggag atctcagagc cccaggcgga gaagatcca gagccgcgag	540
agccagtgct ga	552

35 <210> 2
<211> 183
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos del núcleo M

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
45 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 2

ES 2 806 263 T3

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

- 5 <210> 3
 <211> 603
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
 <223> secuencia del ácido nucleico líder de IgE - Núcleo M
- <400> 3

```

atggactgga cctggattct gttcctggtg gccgctgcc caaggggtgca cagcgacatc      60
gaccctaca aagaattcgg cgccaccgtg gaactgctga gcttcctgcc cagcgacttc      120
ttccctccg tgcgggacct gctggatacc gccagcgccc tgtacagaga ggccctggaa      180
agccccgagc actgcagccc tcaccacaca gccctgcggc aggccatcct gtgctggggc      240
gagctgatga ccctggccac ctgggtcgga agcaacctgg aagatcccgc cagccgggac      300
ctggtggtgt cctacgtgaa caccaacatg ggctgaaga tccggcagct gctgtggttc      360
cacatctcct gcctgacctt cgcccgggaa accgtgctgg aatacctggt gtccttcggc      420
gtgtggatca gaaccccccc tgcctacaga ccccccaacg cccctatcct gagcaccctg      480
cccgagacaa ccgtggtccg cagacggggc agaagcccca gaagaagaac cccagccct      540
agacggcgga gatctcagag cccagggcgg agaagatccc agagccgcga gagccagtgc      600
tga                                                                           603

```

<210> 4

<211> 200

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de líder de IgE - núcleo M

<400> 4

```

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val
1           5           10           15

```

```

His Ser Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Thr Val Glu Leu
20           25           30

```

```

Leu Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val Arg Asp Leu Leu
35           40           45

```

```

Asp Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His
50           55           60

```

```

Cys Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly
65           70           75           80

```

```

Glu Leu Met Thr Leu Ala Thr Trp Val Gly Ser Asn Leu Glu Asp Pro
85           90           95

```

```

Ala Ser Arg Asp Leu Val Val Ser Tyr Val Asn Thr Asn Met Gly Leu
100          105          110

```

```

Lys Ile Arg Gln Leu Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly

```

ES 2 806 263 T3

115

120

125

Arg Glu Thr Val Leu Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg
130 135 140

Thr Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu
145 150 155 160

Pro Glu Thr Thr Val Val Arg Arg Arg Gly Arg Ser Pro Arg Arg Arg
165 170 175

Thr Pro Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg Arg
180 185 190

Ser Gln Ser Arg Glu Ser Gln Cys
195 200

<210> 5

<211> 630

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia del ácido nucleico líder de IgE - Núcleo M +etiqueta HA

<400> 5

atggactgga cctggattct gttcctggtg gccgctgcca caaggggtgca cagcgacatc 60
gaccctaca aagaattcgg cgccaccgtg gaactgctga gcttcctgcc cagcgacttc 120
ttccctccg tgcgggacct gctggatacc gccagcgccc tgtacagaga ggccctggaa 180
agccccgagc actgcagccc tcaccacaca gccctgcggc aggccatcct gtgctggggc 240
gagctgatga ccctggccac ctgggtcgga agcaacctgg aagatcccgc cagccgggac 300
ctggtggtgt cctacgtgaa caccaacatg ggcctgaaga tccggcagct gctgtggttc 360
cacatctcct gcctgacctt cggccgggaa accgtgctgg aatacctggt gtccttcggc 420
gtgtggatca gaaccccccc tgcctacaga ccccccaacg cccctatcct gagcaccctg 480
cccgagacaa ccgtggtccg cagacggggc agaagcccca gaagaagaac cccagccct 540
agacggcgga gatctcagag cccagggcgg agaagatccc agagccgcga gagccagtgc 600
taccctacg acgtgcccga ctacgcctga 630

<210> 6

<211> 209

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de líder de IgE - Núcleo M+ etiqueta HA

<400> 6

ES 2 806 263 T3

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val
1 5 10 15

His Ser Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Thr Val Glu Leu
20 25 30

Leu Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val Arg Asp Leu Leu
35 40 45

Asp Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His
50 55 60

Cys Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly
65 70 75 80

Glu Leu Met Thr Leu Ala Thr Trp Val Gly Ser Asn Leu Glu Asp Pro
85 90 95

Ala Ser Arg Asp Leu Val Val Ser Tyr Val Asn Thr Asn Met Gly Leu
100 105 110

Lys Ile Arg Gln Leu Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly
115 120 125

Arg Glu Thr Val Leu Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg
130 135 140

Thr Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu
145 150 155 160

Pro Glu Thr Thr Val Val Arg Arg Arg Gly Arg Ser Pro Arg Arg Arg
165 170 175

Thr Pro Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg Arg
180 185 190

Ser Gln Ser Arg Glu Ser Gln Cys Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr
195 200 205

Ala

<210> 7
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos de líder de IgE

ES 2 806 263 T3

<400> 7

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val
1 5 10 15

His Ser

5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de etiqueta HA

<400> 8

15

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
1 5

REIVINDICACIONES

- 5 1. Molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia codificante que codifica una proteína con la SEQ ID NO: 2.
2. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 que comprende además una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido señal unido al extremo 5' de la secuencia del ácido nucleico que codifica la proteína con la SEQ ID NO: 2.
- 10 3. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 que codifica una o más proteínas seleccionadas del grupo que consiste en: SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 y SEQ ID NO:6.
4. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 que comprende una o más secuencias de nucleótidos seleccionadas del grupo que consiste en: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 5.
- 15 5. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1, en donde la molécula de ácido nucleico es un plásmido o en donde la molécula de ácido nucleico se incorpora a una partícula vírica.
6. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 en donde la molécula de ácido nucleico es un vector de expresión y la secuencia que codifica dicha proteína está operativamente unida a elementos reguladores.
- 20 7. Un ácido nucleico de la reivindicación 1 para su uso en un método para inducir una respuesta inmunitaria contra un antígeno del HBV.
- 25 8. Un ácido nucleico de la reivindicación 1 para su uso en un método para proteger a un individuo de la infección por HBV.
9. Una vacuna útil para generar una respuesta inmunitaria contra el HBV en un sujeto que comprende:
- 30 una construcción de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1; y
una molécula adyuvante.
10. La vacuna de la reivindicación 9, en donde dicho adyuvante es IL-12, IL-15, IL-28 o RANTES.

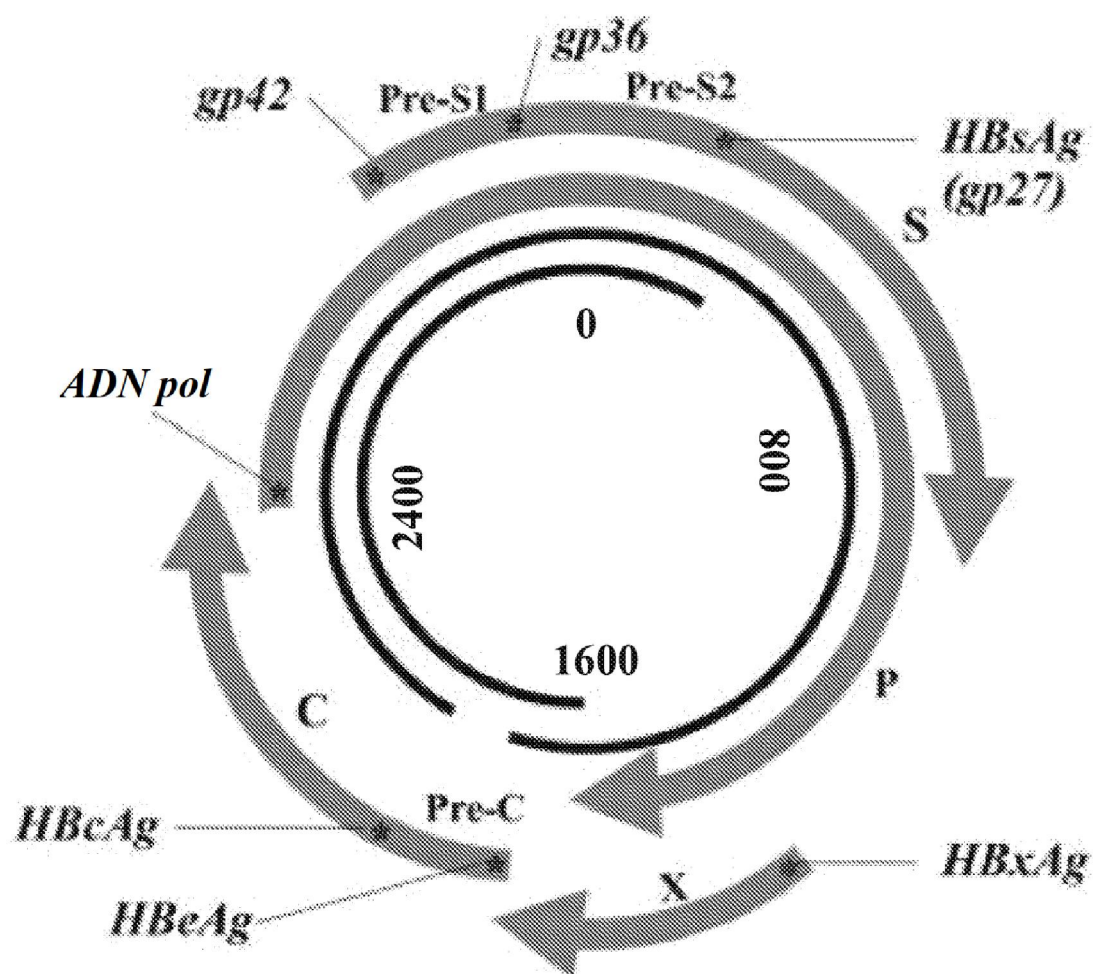
FIGURA 1

FIGURA 2A

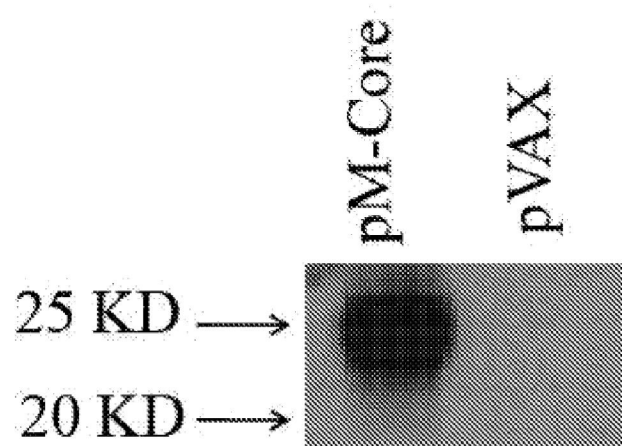


FIGURA 2B

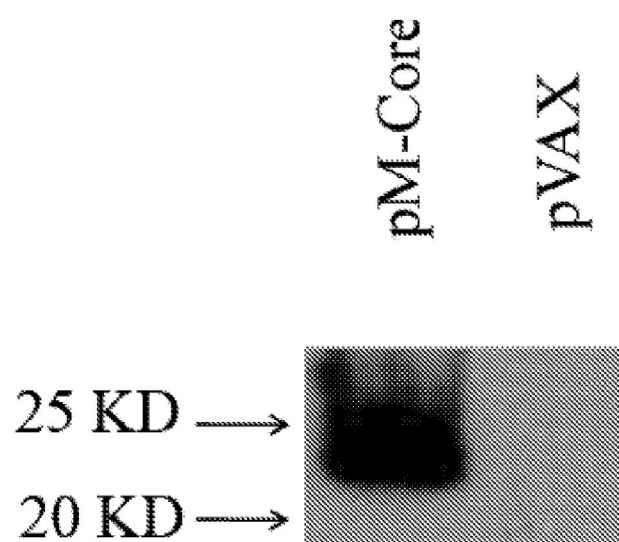


FIGURA 3A
(página 1 de 2)

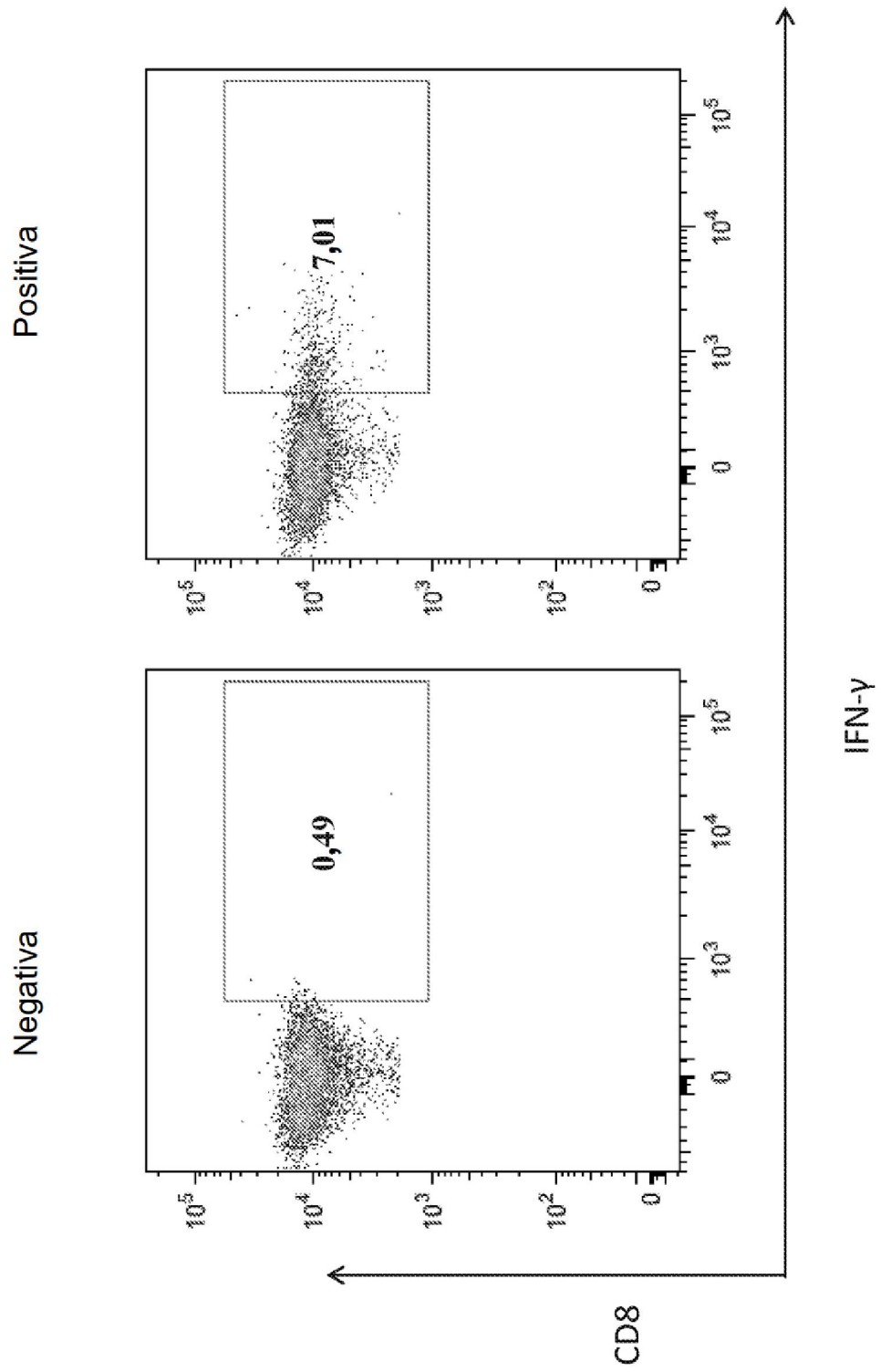


FIGURA 3A (continuación)
(Página 2 de 2)

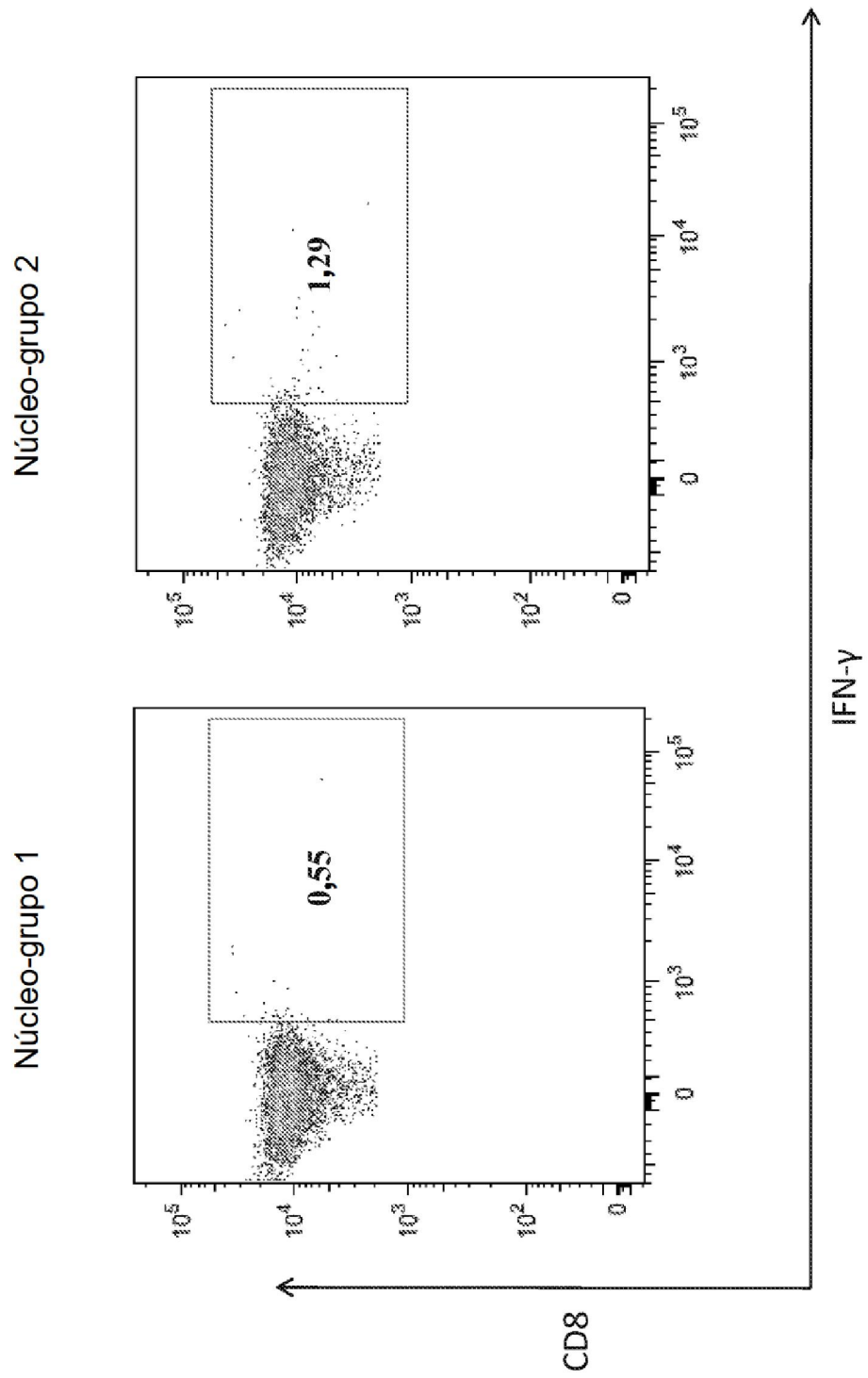


FIGURA 3B

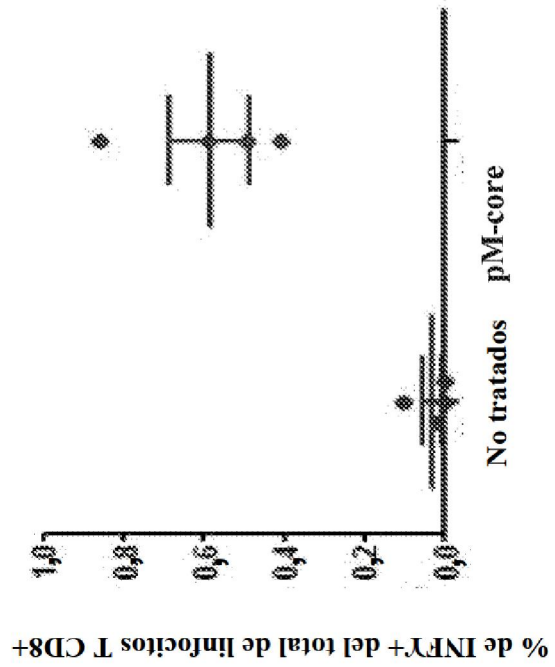
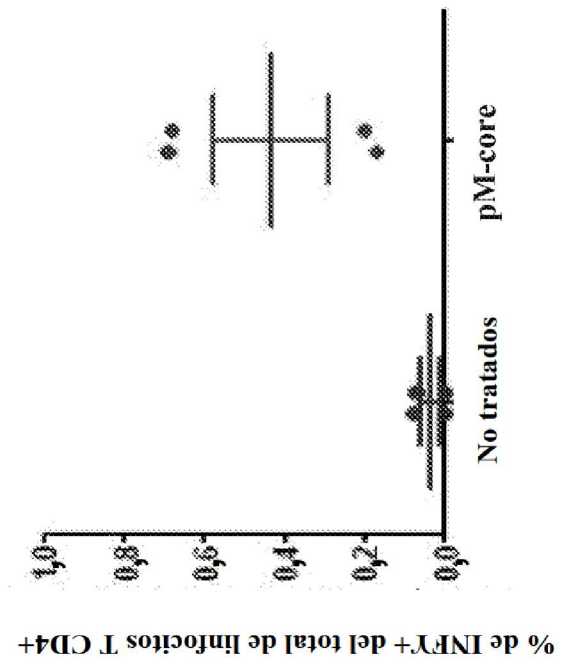


FIGURA 4A
(Página 1 de 2)

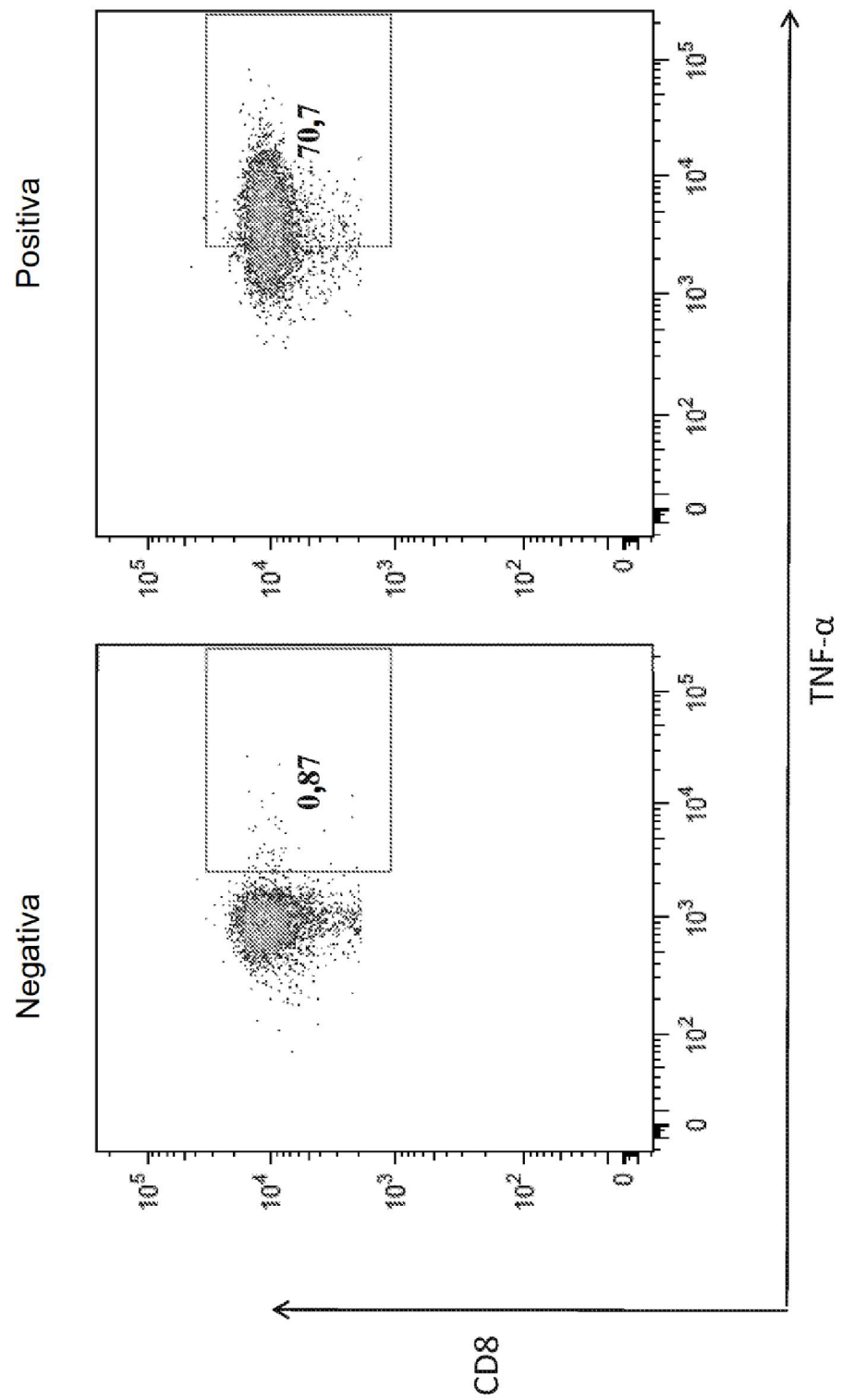


FIGURA 4A (continuación)
(Página 2 de 2)

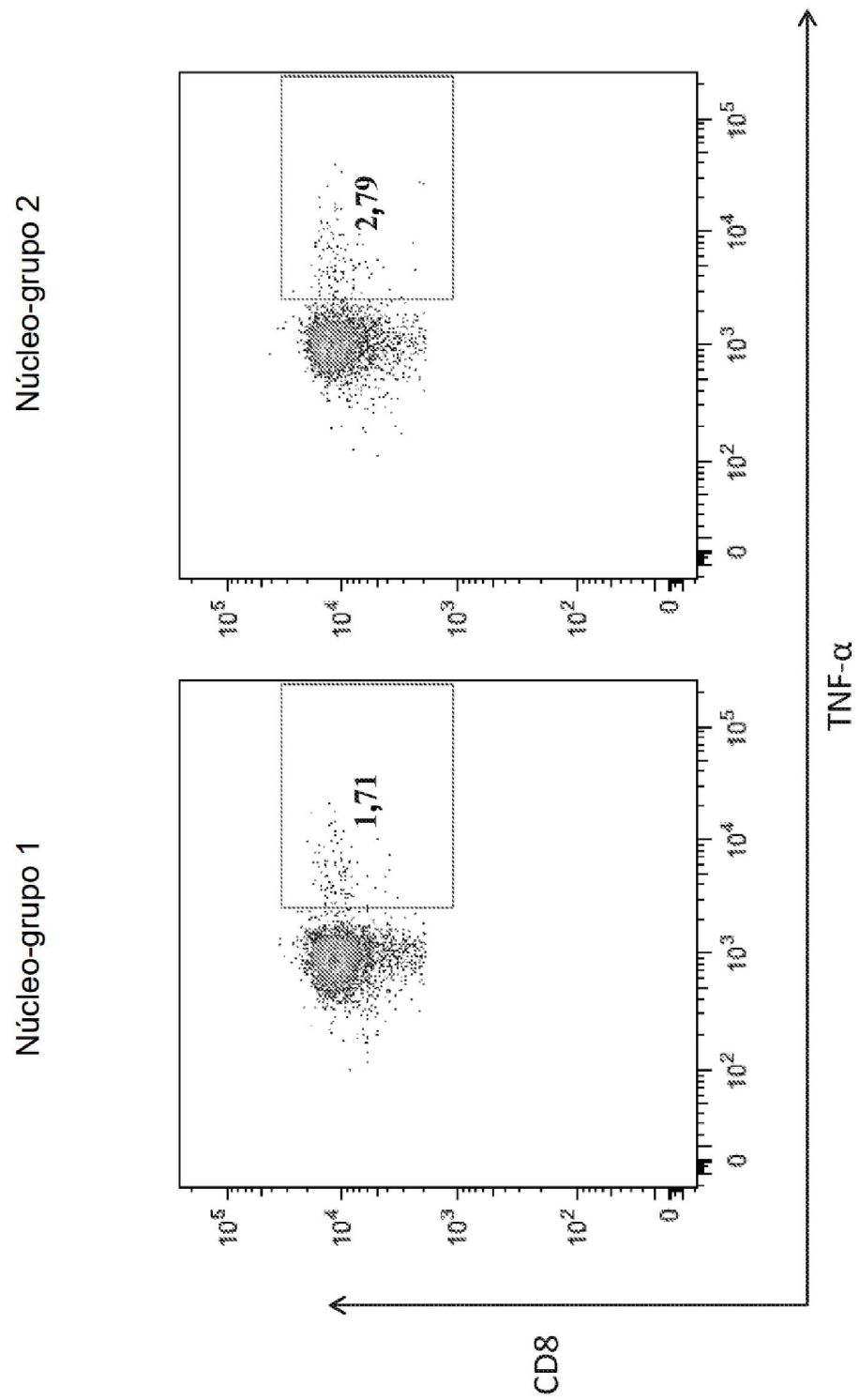


FIGURA 4B

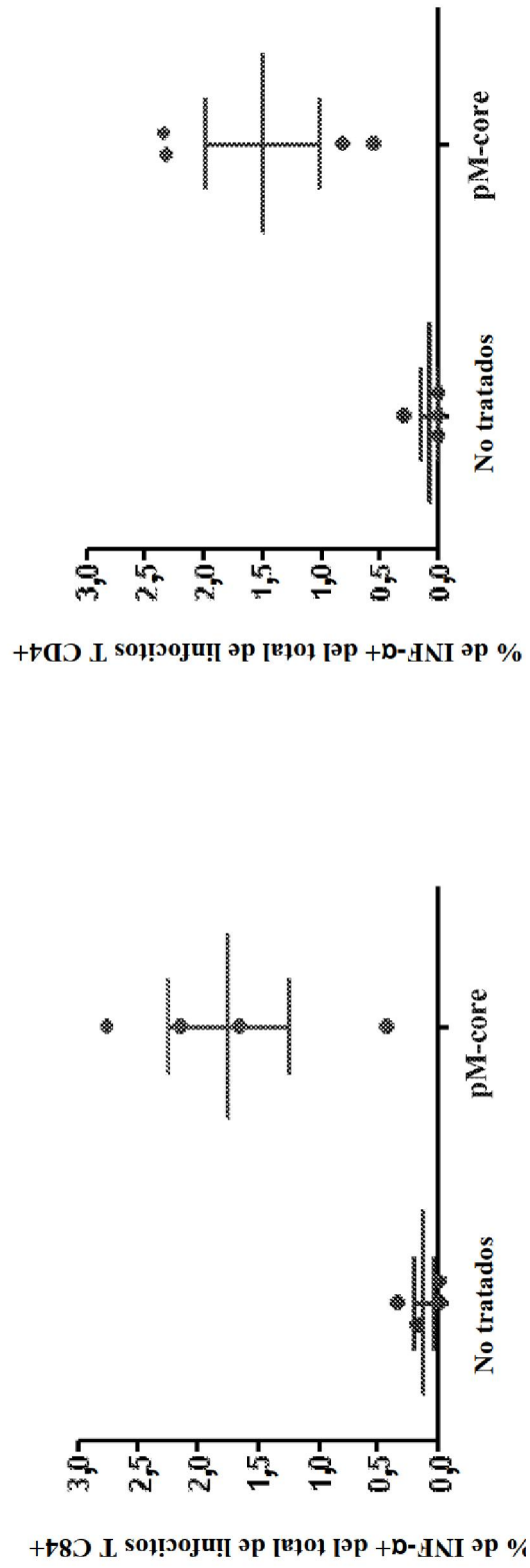


FIGURA 5A
Página 1 de 2

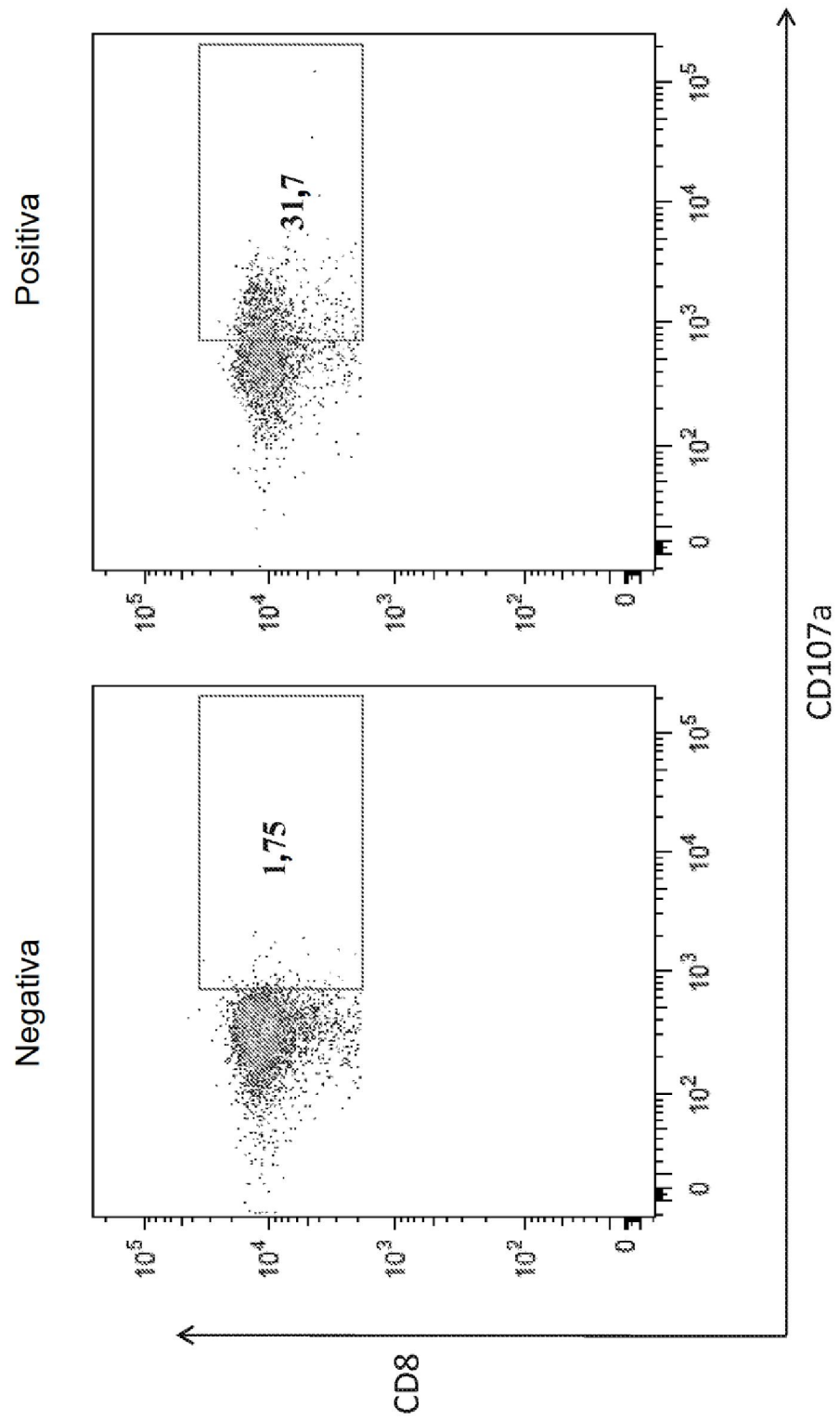


FIGURA 5A, continuación
(Página 2 de 2)

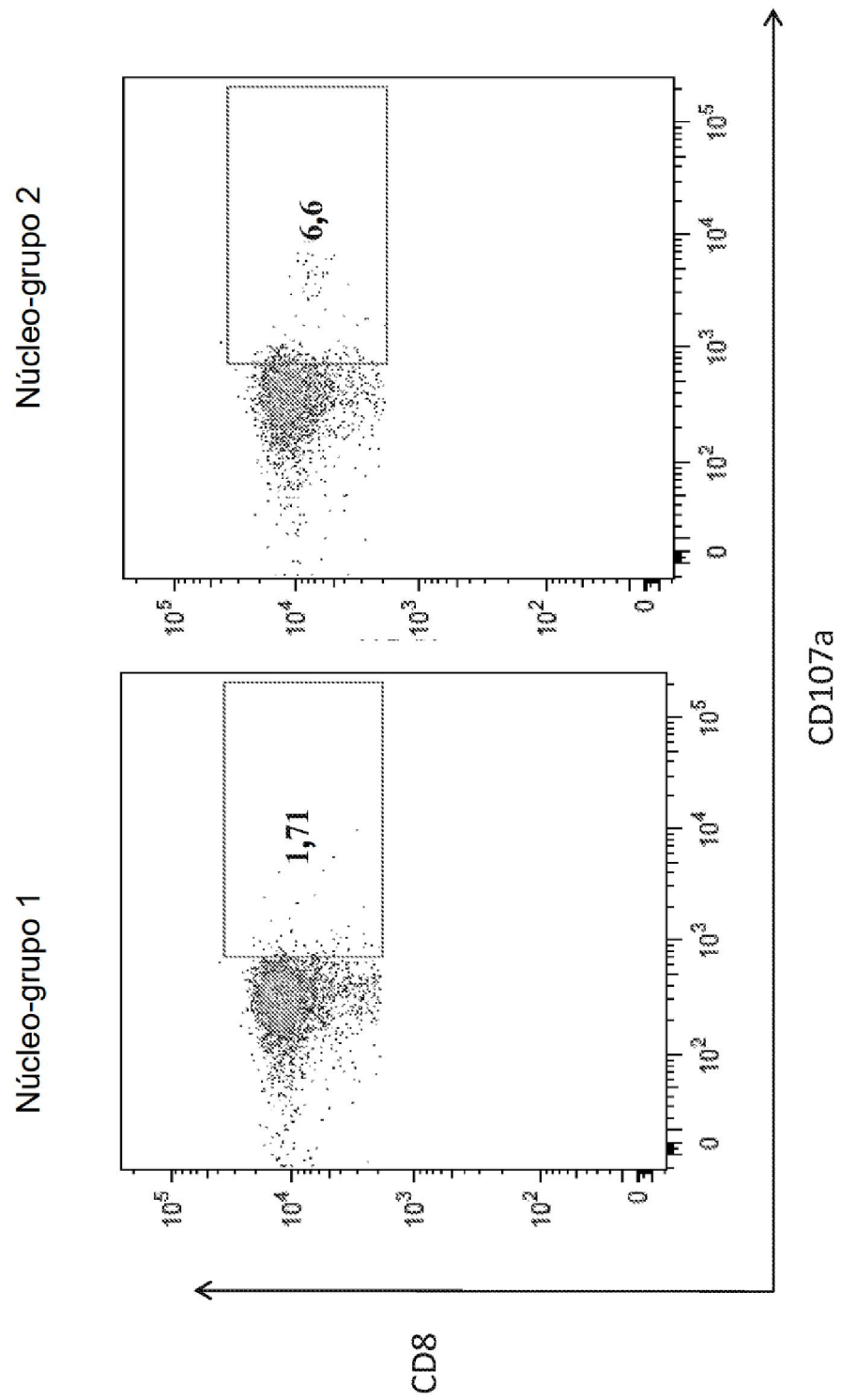


FIGURA 5B

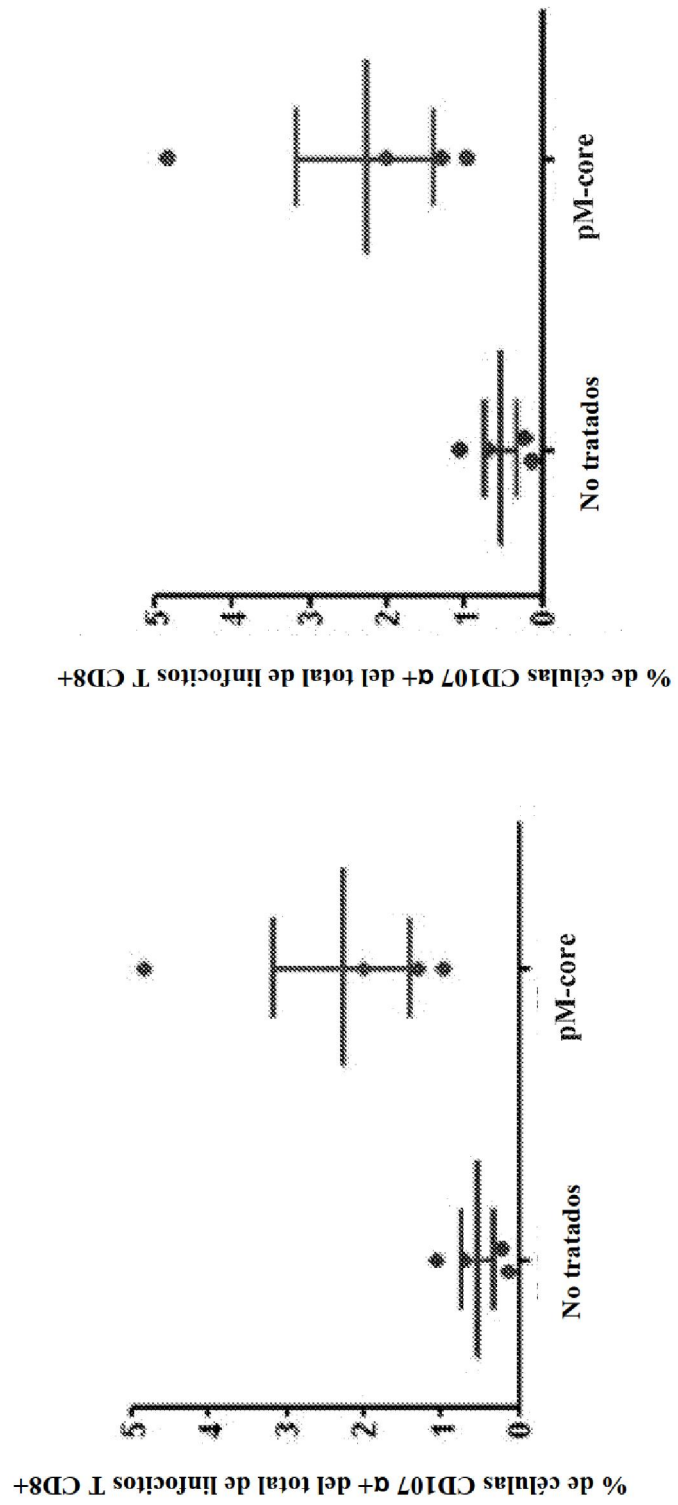


FIGURA 6A
(Página 1 de 3)

pVAX

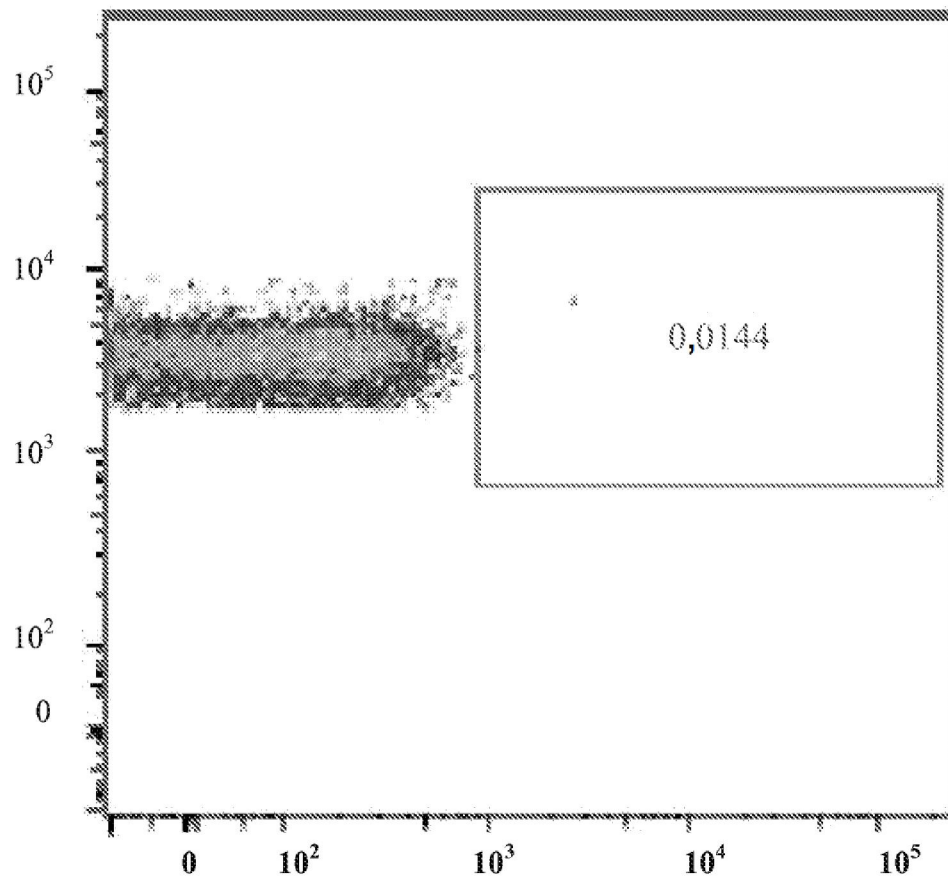
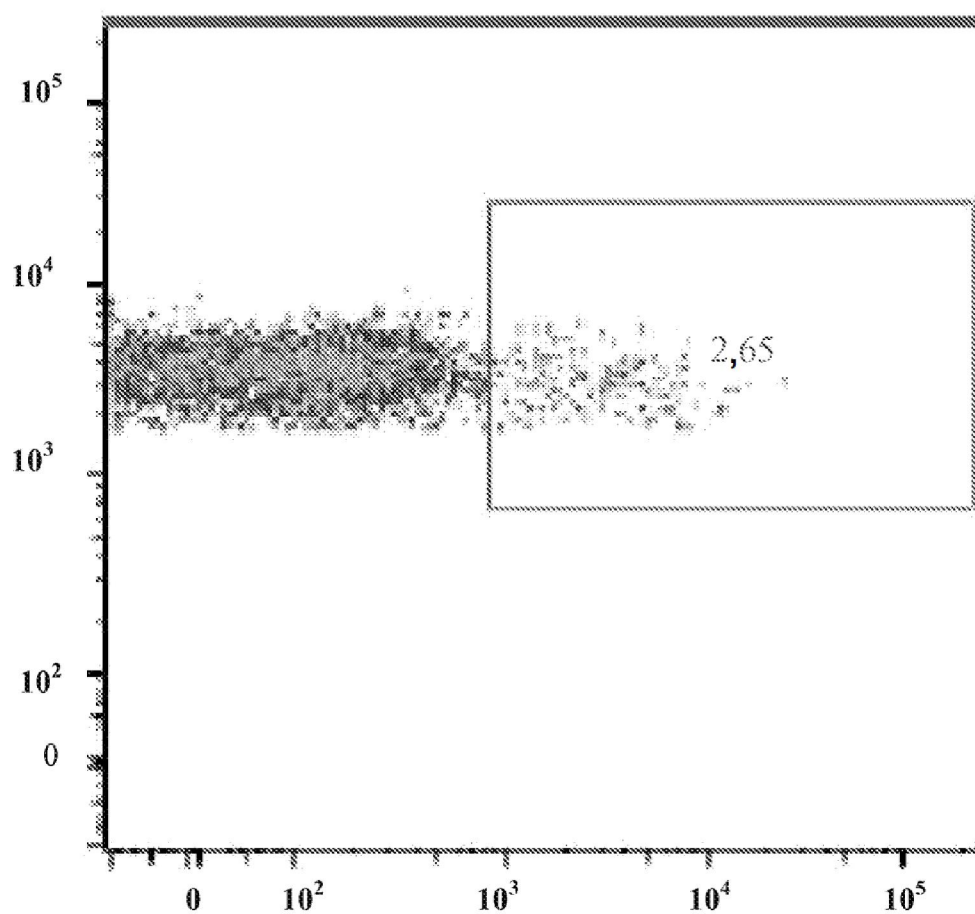


FIGURA 6A, continuación
(Página 2 de 3)

pMCore



**FIGURA 6A, continuación
(Página 3 de 3)**

Control pos.

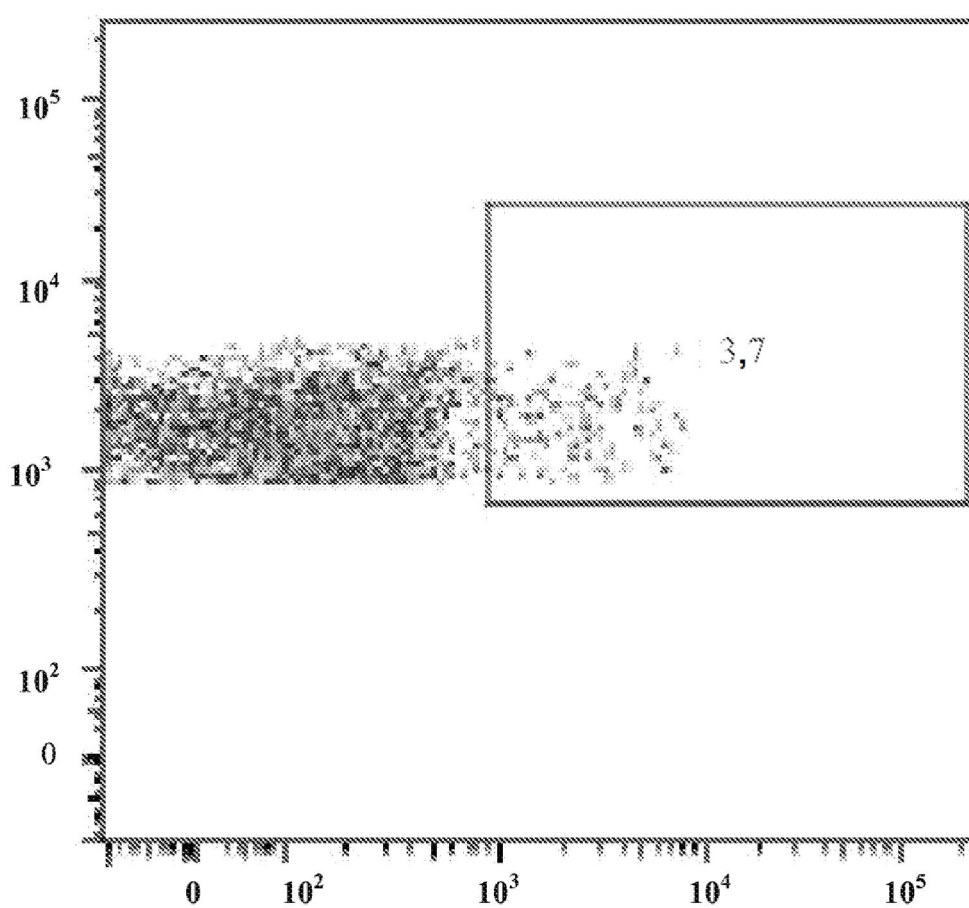


FIGURA 6B

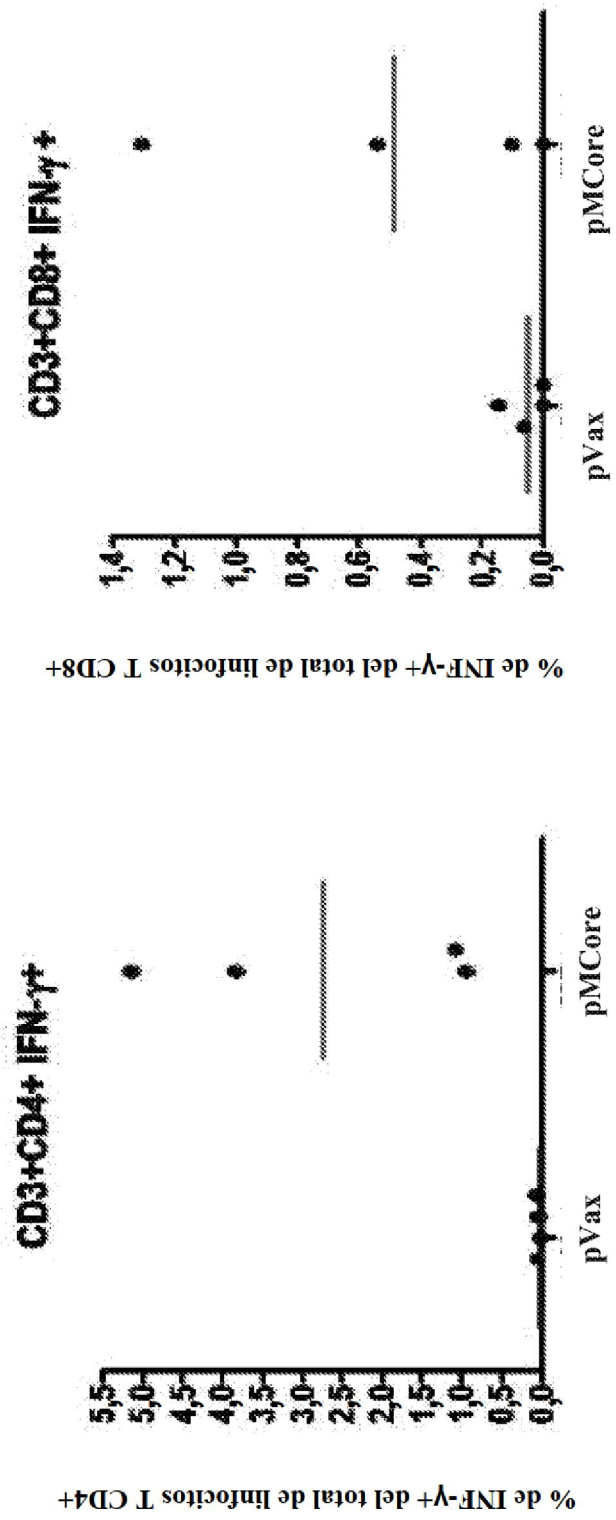


FIGURA 7A
(Página 1 de 3)

pVAX

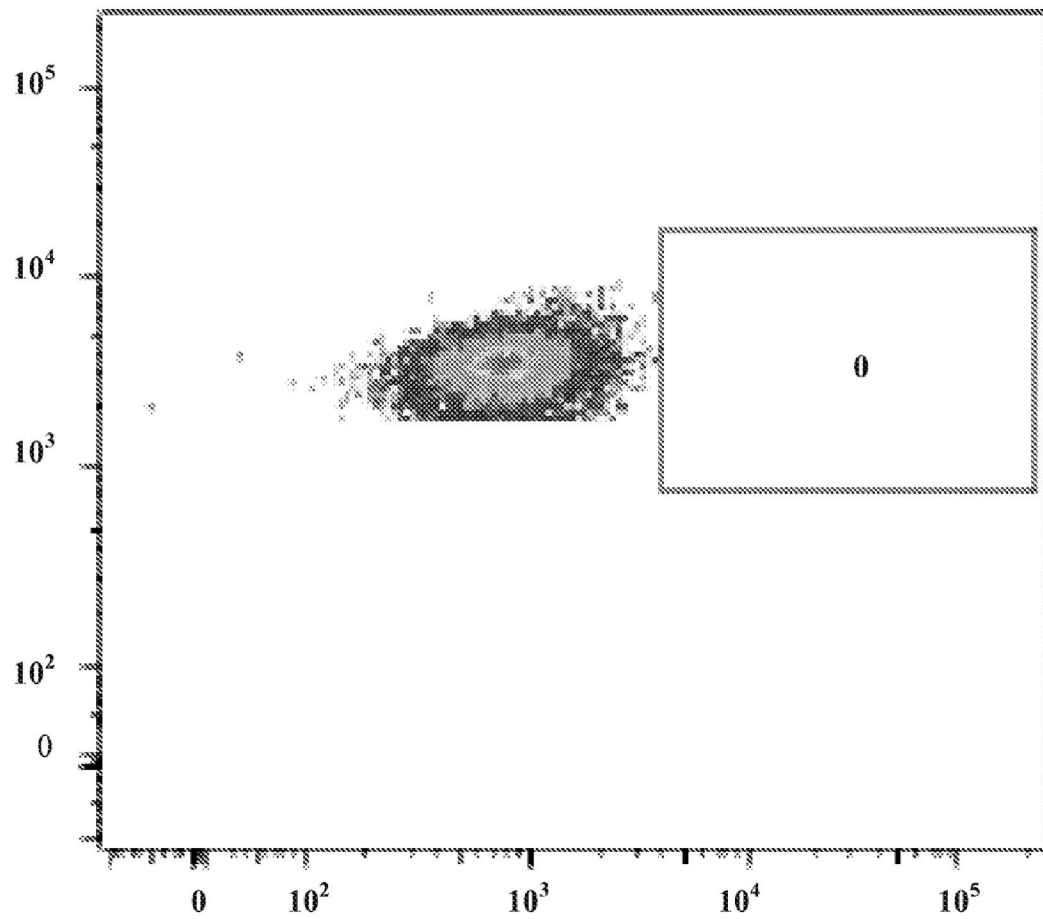


FIGURA 7A, continuación
(Página 2 de 3)

pMCore

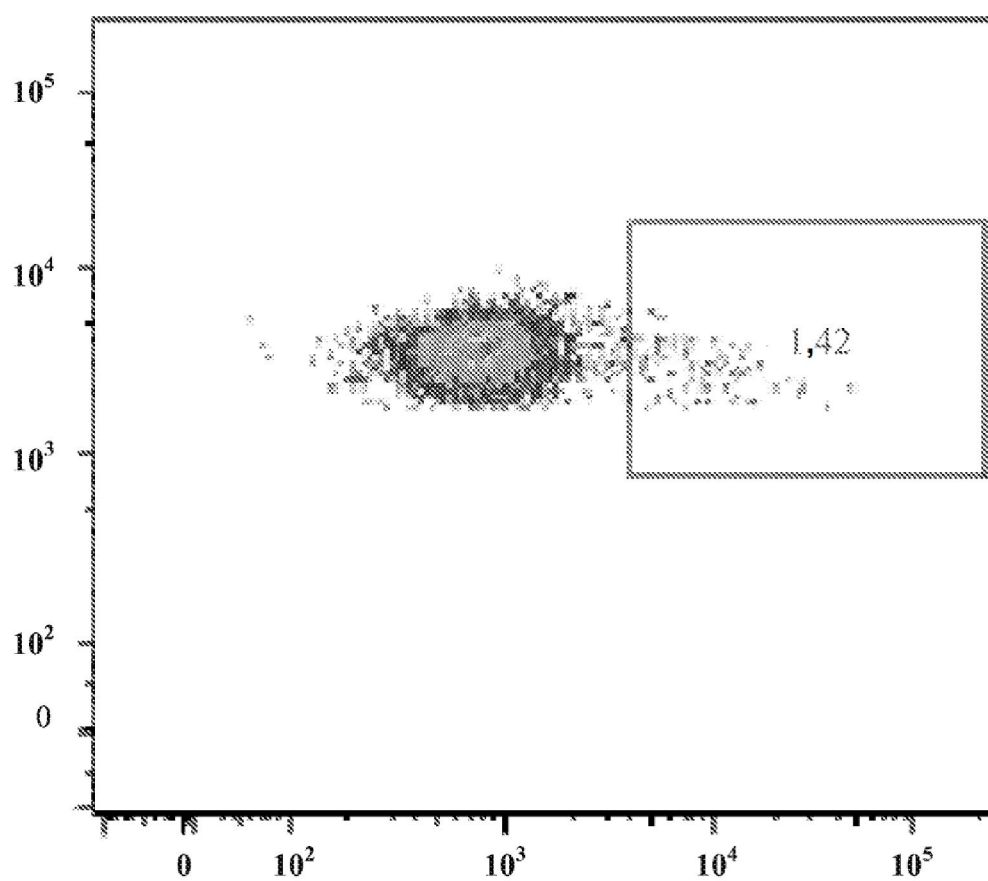


FIGURA 7A, continuación
(Página 3 de 3)

Control pos.

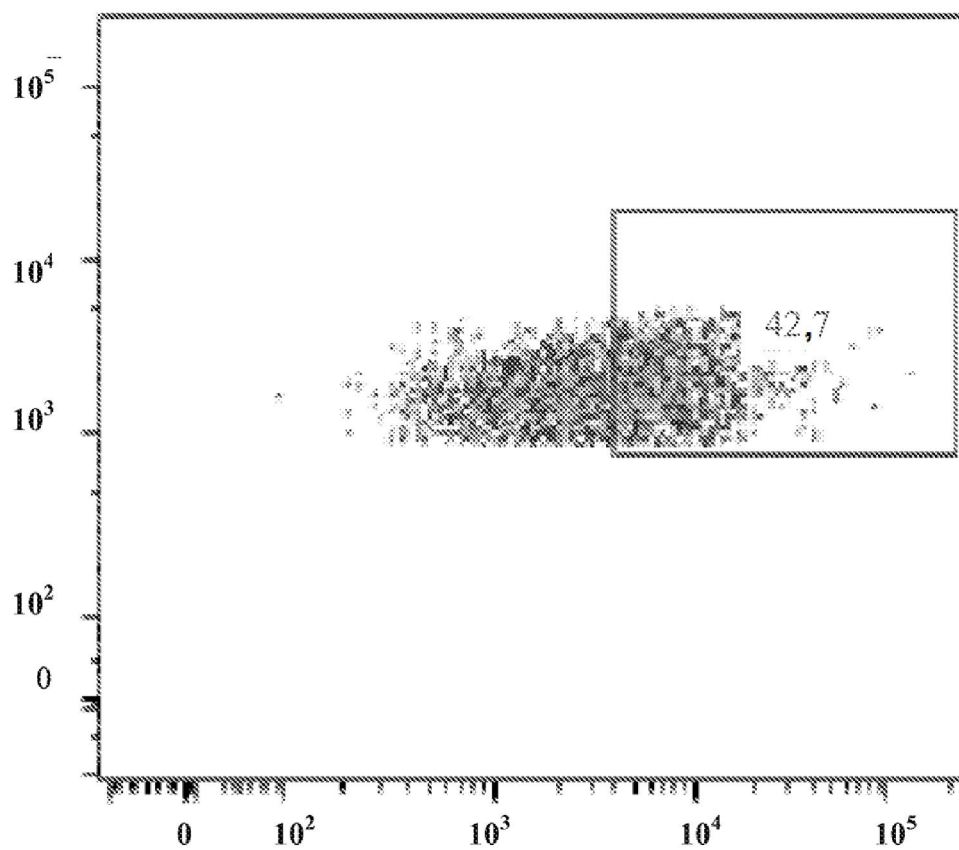


FIGURA 7B

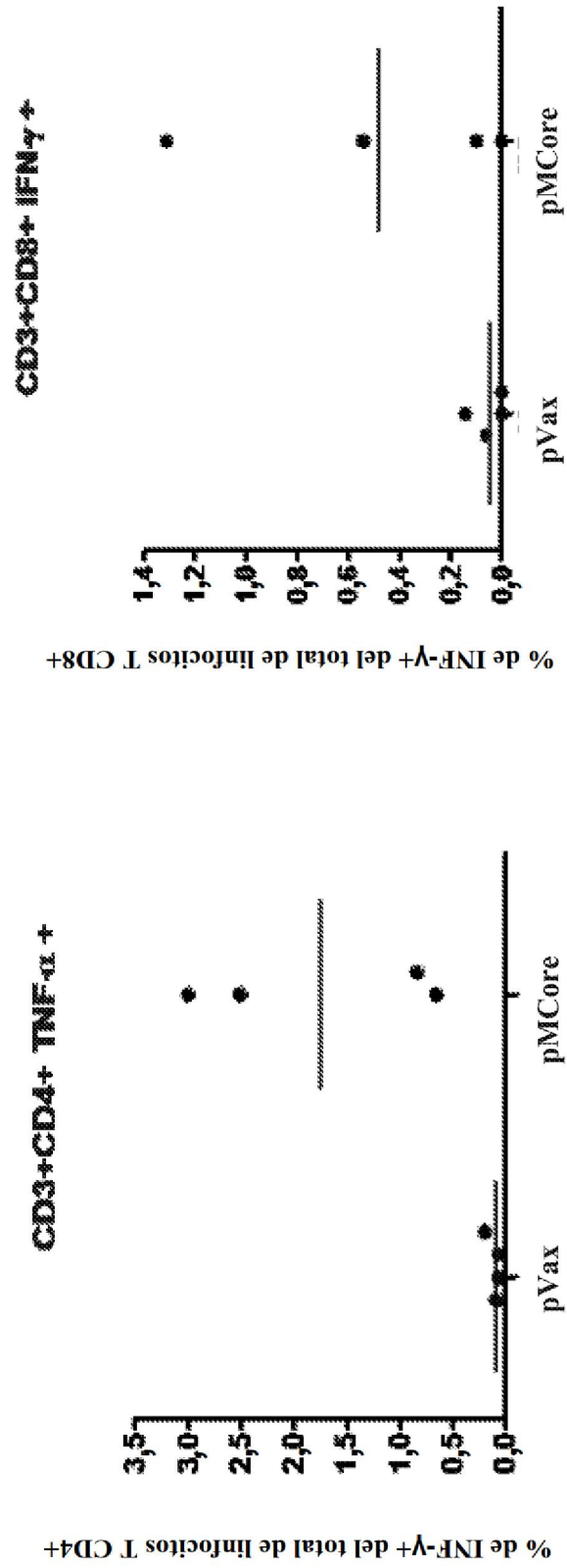


FIGURA 8

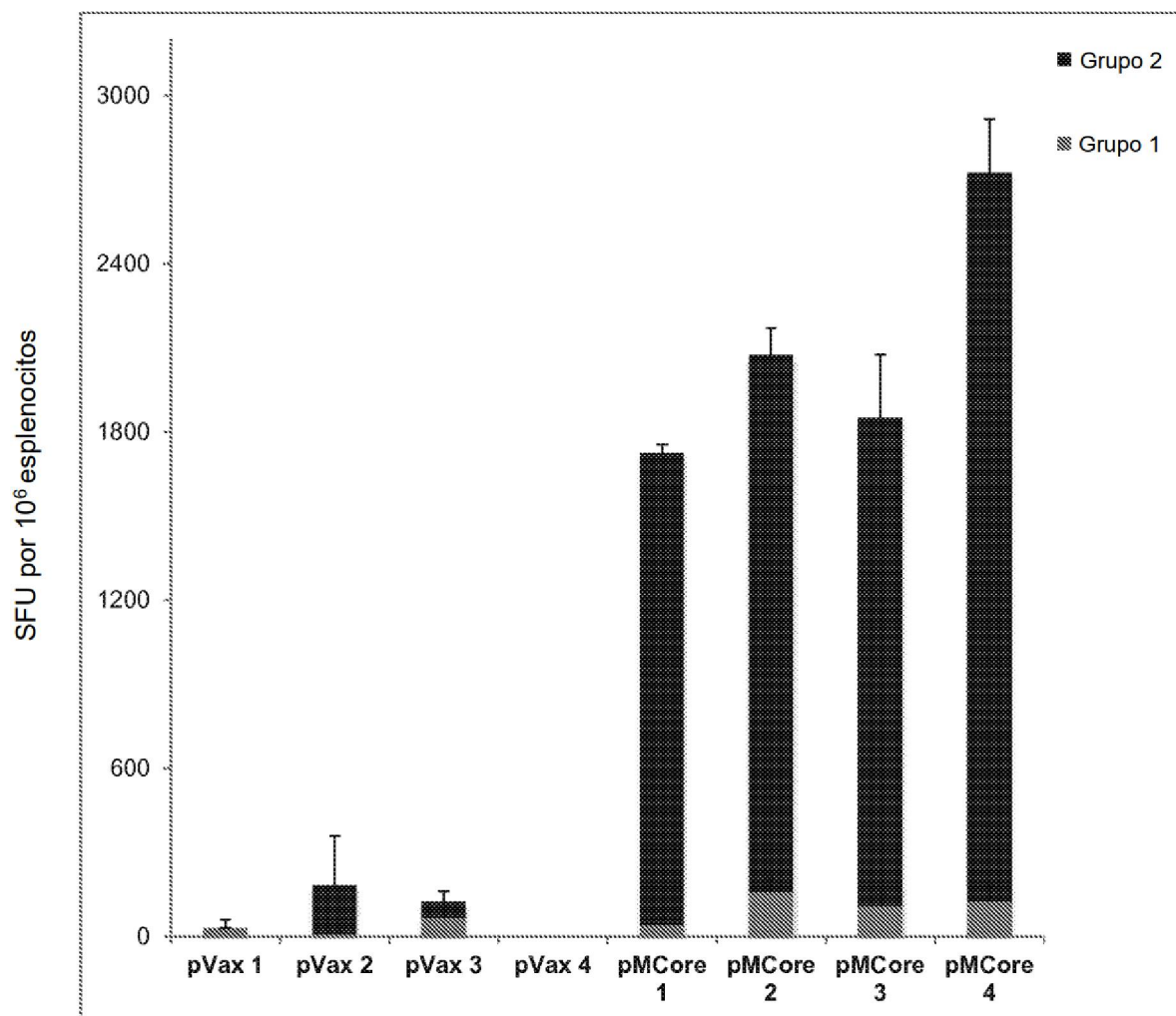


FIGURA 9

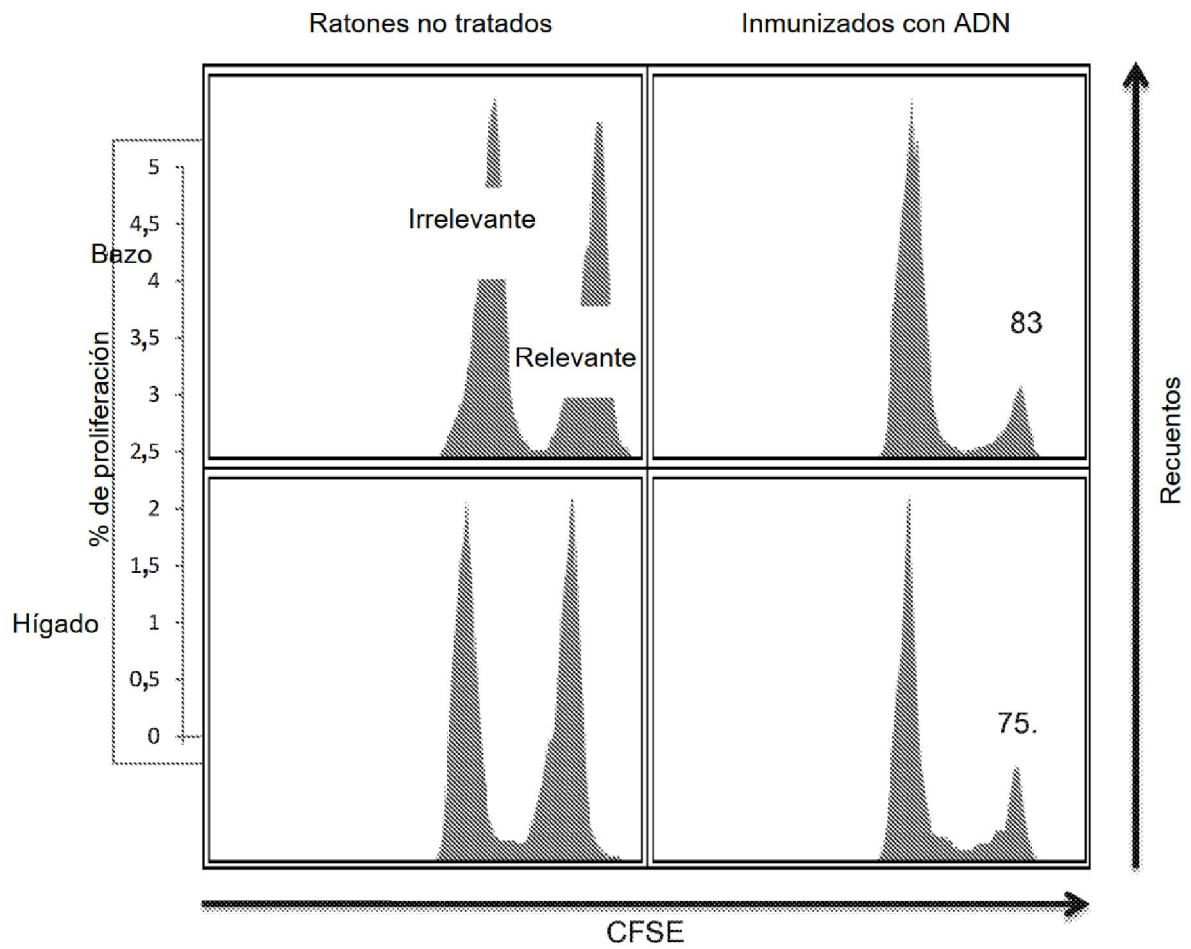


FIGURA 10

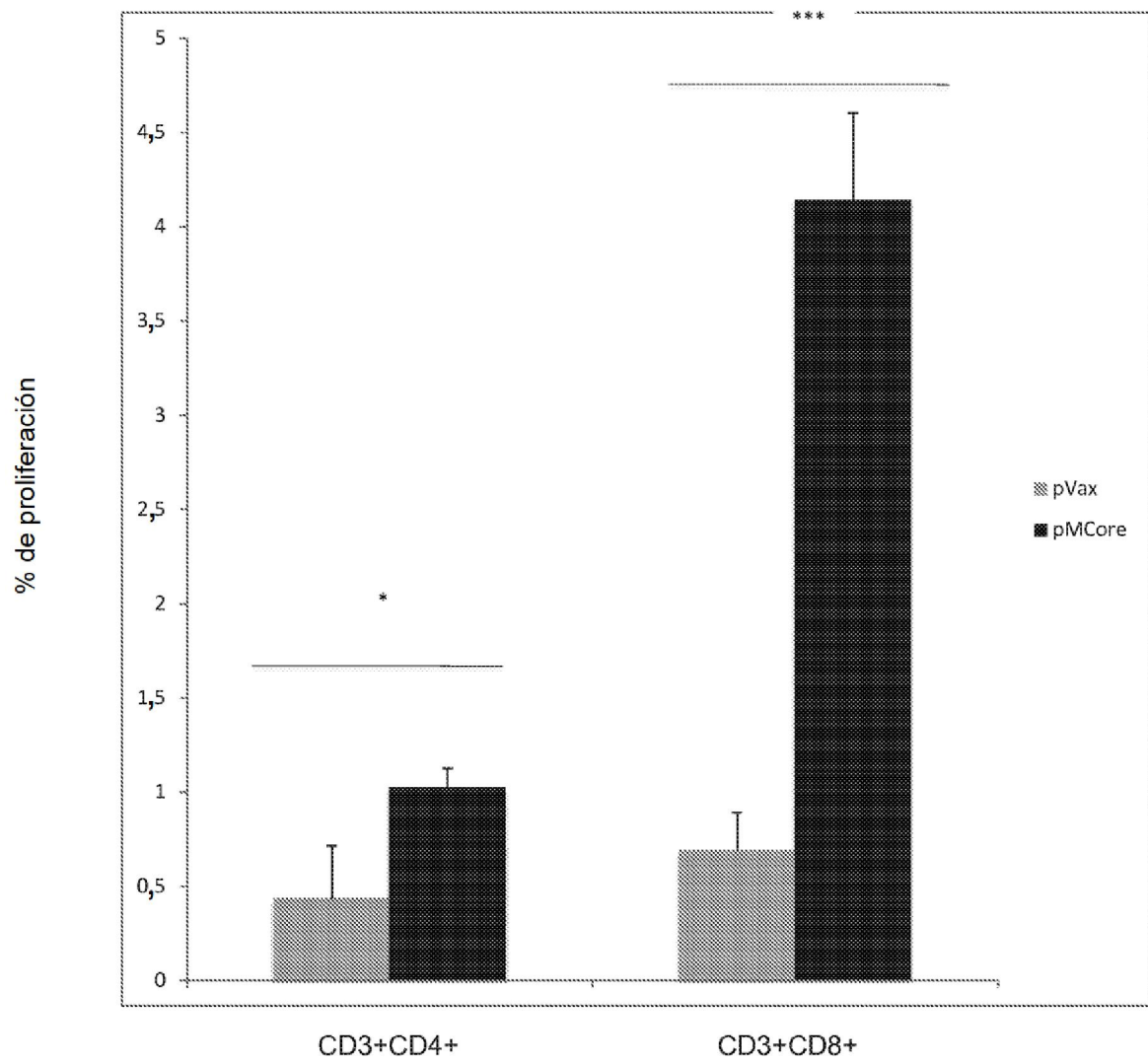


FIGURA 11A

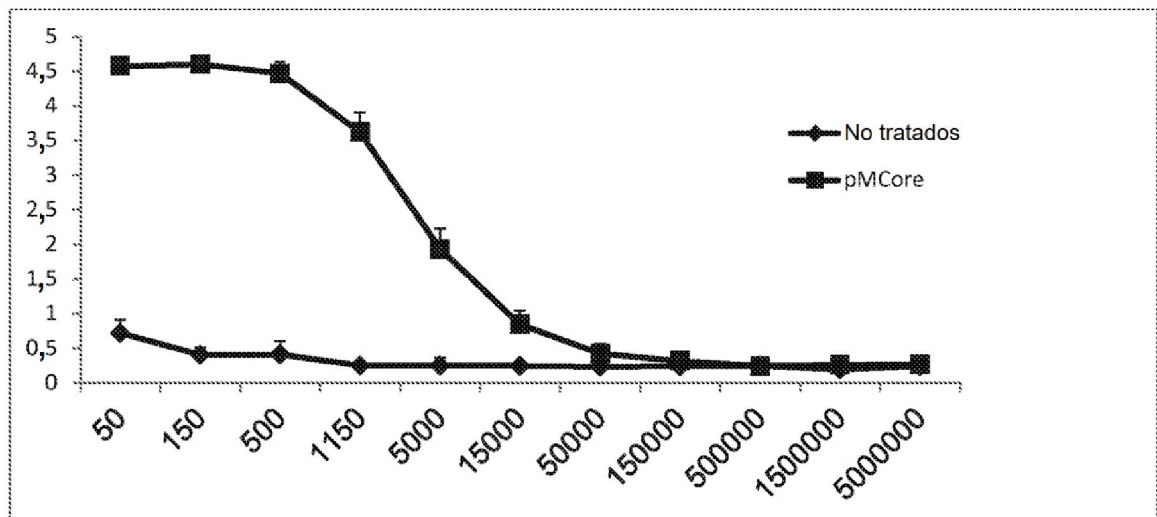


FIGURA 11B

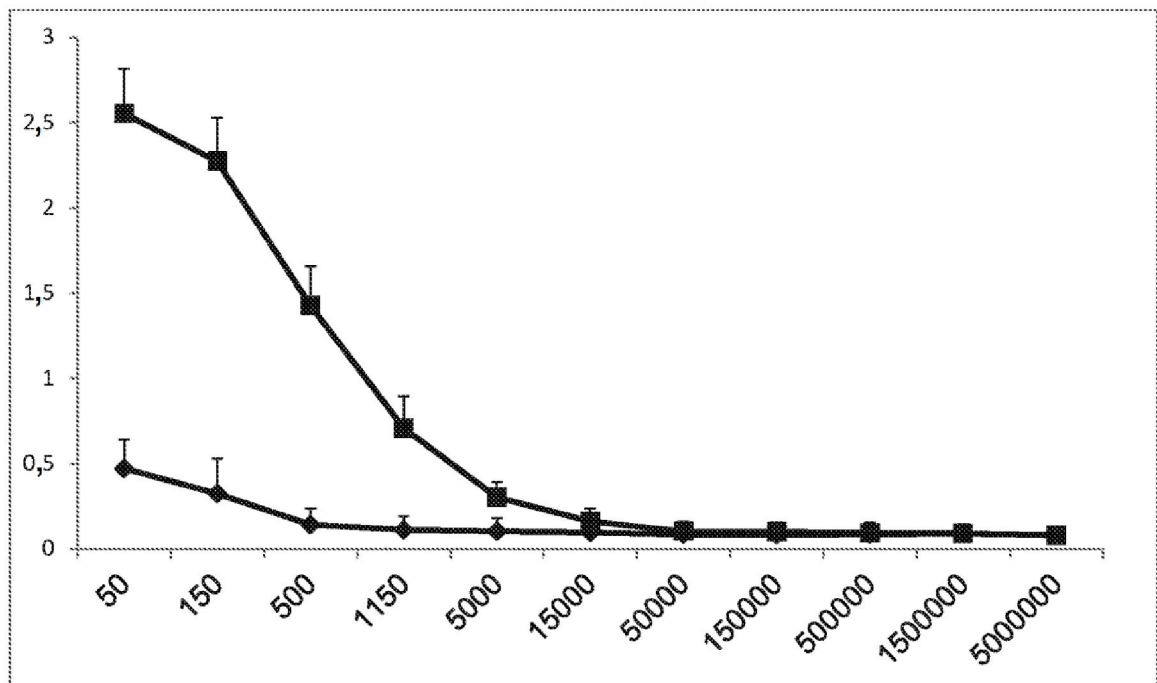


FIGURA 12

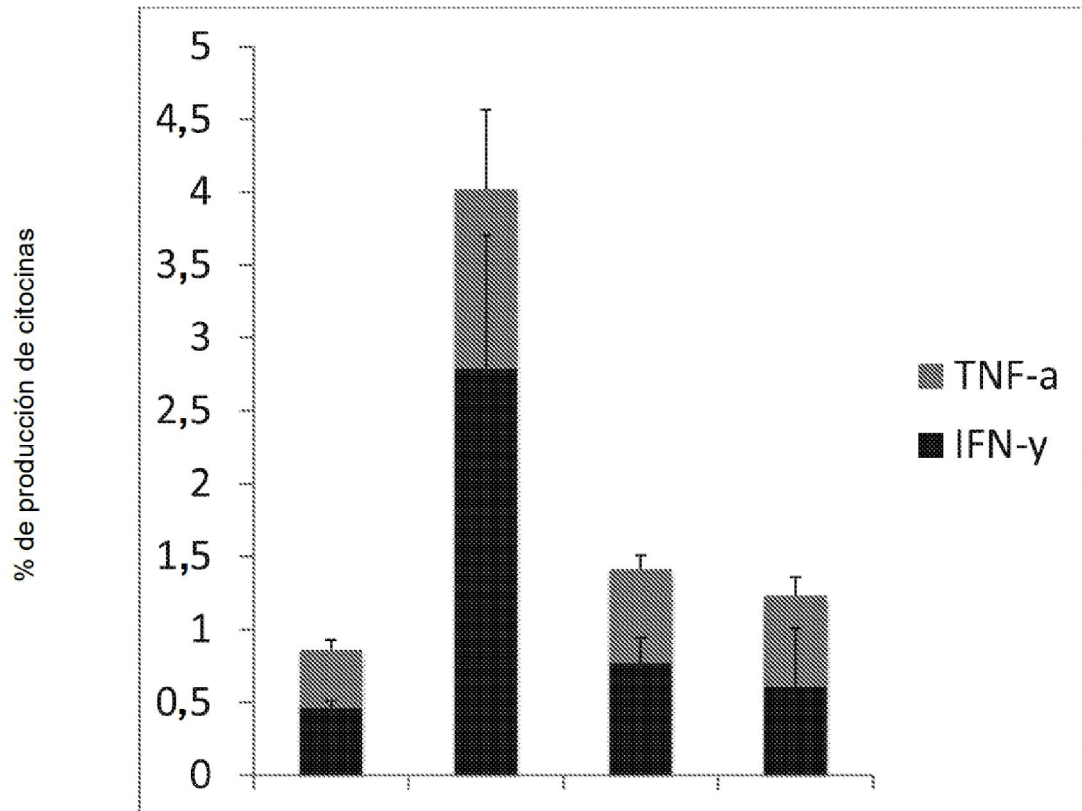


FIGURA 13

