

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
16 de Febrero de 2006 (16.02.2006)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2006/015557 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
A61K 39/29 (2006.01) **C07K 14/18** (2006.01)
C12N 15/863 (2006.01)

Alexis [CU/CU]; Calle 128 #7117 entre 71 y 73, Mariel,
La Habana 32100 (CU).

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/CU2005/000004

(74) Mandatario: **VAZQUEZ CASTILLO, Mariela**; Depar-
tamento de Patentes, Ave. 31 entre 158 y 190, Cubanacán,
Playa, Ciudad de La Habana 10600 (CU).

(22) Fecha de presentación internacional:
10 de Agosto de 2005 (10.08.2005)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
CU 2004-0174
11 de Agosto de 2004 (11.08.2004) CU

(81) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(71) Solicitante (*para todos los Estados designados salvo US*): **CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA** [CU/CU]; Ave. 31 entre 158 y 190, Cubanacán, Playa, Ciudad de La Habana 10600 (CU).

(84) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (*para US solamente*): **ALVAREZ-LAJONCHERE PONCE DE LEÓN, Liz** [CU/CU]; San Rafael #1219 entre Mazón y Ronda, Plaza de la Revolución, Ciudad de La Habana 10400 (CU). **DUEÑAS CARRERA, Santiago** [CU/CU]; San Rafael #1219 entre Mazón y Ronda, Plaza de la Revolución, Ciudad de La Habana 10400 (CU). **GUERRA AIZPÚRUA, Ivis** [CU/CU]; 82A, #736, entre Avenida 7ma y 9na, Miramar, Playa, Ciudad de La Habana 10600 (CU). **ACOSTA RIVERO, Nelson** [CU/CU]; General Lee, #20, altos, entre Figueroa y D'strampes, Santos Suárez, 10 de Octubre, Ciudad de La Habana 10500 (CU). **MUSACCHIO LASA,**

Publicada:

- *con informe de búsqueda internacional*
- *antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones*

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

(54) Title: RECOMBINANT LIVE FOWLPOX VIRUS VECTORS AND THEIR USE IN PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS AGAINST HEPATITIS C VIRUS

(54) Título: VECTORES VIVOS RECOMBINANTES Y SU USO EN COMPOSICIONES FARMACEUTICAS CONTRA EL VIRUS DE LA HEPATITIS C

(57) Abstract: The invention relates to recombinant fowlpox viruses for protein combinations based on hepatitis C virus antigens and to the use thereof in pharmaceutical compositions that can induce a cellular immune response against the hepatitis C virus following the administration of a reduced number of doses. According to the invention, said pharmaceutical compositions can be used to prevent and treat infections associated with the hepatitis C virus in mammals.

(57) Resumen: Virus de viruela aviar recombinantes para combinaciones proteicas basadas en antígenos del virus de la hepatitis C y su uso en composiciones farmacéuticas capaces de inducir una respuesta inmune celular contra el virus de la hepatitis C, después de la administración de un número reducido de dosis. Las composiciones farmacéuticas de esta invención son útiles para la prevención y tratamiento de infecciones asociadas con el virus de la hepatitis C en mamíferos.

WO 2006/015557 A1

VECTORES VIVOS RECOMBINANTES Y SU USO EN COMPOSICIONES FARMACEUTICAS CONTRA EL VIRUS DE LA HEPATITIS C

Campo de la técnica

- 5 La presente invención está relacionada con la rama de la inmunología y las vacunas virales, particularmente con el Virus de viruela aviar recombinante para combinaciones proteicas basadas en antígenos del virus de la hepatitis C (VHC) y composiciones farmacéuticas capaces de inducir una respuesta inmune celular contra el VHC.

10

Estado de la técnica anterior

- El VHC es identificado por primera vez en el año 1989, mediante el empleo de técnicas de biología molecular, como el principal agente causal de las hepatitis No-A, No-B postransfusionales (Choo Q-L., Kuo G., et al. (1989) Isolation of a cDNA clone
15 derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*. 244:359-62; EP0318216 Chiron Corp). Actualmente existen en el mundo más de 170 millones de personas infectadas por este agente viral. El 85 % de las infecciones por el VHC son persistentes, causando frecuentemente cirrosis y carcinoma hepatocelular (Caselmann W.H., Alt M. (1996) Hepatitis C virus infection as a major risk factor for
20 hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* 24:61-66). Se ha estimado que el 25 % de los portadores crónicos que viven al menos 20 años después de la infección por el VHC, desarrollan cirrosis y que de ellos, entre 1 y 4 % desarrolla carcinoma hepatocelular anualmente (Prince A.M., Shata M.T. (2001) Immunoprophylaxis of hepatitis C virus infection. *Clin. Liver. Dis.* 5:1091-103).
- 25 En la rama terapéutica, el tratamiento que ha rendido los mejores resultados consiste en la administración combinada de interferón alfa (IFN- α) pegilado y la ribavirina en regímenes intensivos. Sin embargo, este tratamiento es agresivo, costoso y efectivo en menos del 50 % de los casos (Prince A.M., Shata M.T. (2001) Immunoprophylaxis of hepatitis C virus infection. *Clin. Liver. Dis.* 5:1091-103).
- 30 Se han evaluado como alternativas vacunales disímiles variantes de subunidades proteicas, partículas similares a virus, péptidos sintéticos, vectores vivos recombinantes y plasmidios para la inmunización con ADN, basadas en diferentes antígenos del VHC (US6635257, US6387662, US6235888, US6685944, US2003021805, Lechmann M., Liang T.J. (2000) Vaccine development for hepatitis

C. *Semin. Liver. Dis.* 20:211-26). Algunas de estas variantes han demostrado su capacidad para inducir una respuesta inmune específica contra epitopos del VHC, aunque esta respuesta no parece ser aún suficiente. Hasta el momento no se han establecido completamente los parámetros inmunológicos que correlacionan con la protección a la infección por el VHC. Sin embargo, varios estudios sugieren que una respuesta temprana, vigorosa y multiespecífica de células T citotóxicas, caracterizadas por un patrón de citocinas característico de linfocitos T auxiliares de tipo I, favorece la resolución de la enfermedad y la inmunidad contra el virus. Por el contrario, una respuesta de células T tardía se relaciona con el establecimiento de la inmunopatología crónica del hígado (Cerny A., Chisari F.V. (1999) Pathogenesis of chronic hepatitis C: immunological features of hepatic injury and viral persistente. *Hepatology*. 30:595-601; Cooper S., et al. (1999) Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus. *Immunity* 10:439-49; Lechner F., et al. (2000) Why do cytotoxic T lymphocytes fail to eliminate hepatitis C virus? Lessons from studies using major histocompatibility complex class I peptide tetramers. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 355:1085-92; Takaki A., et al. (2000). Cellular immune responses persist and humoral responses decrease two decades after recovery from a single-source outbreak of hepatitis C. *Nat. Med.* 6:578-82).

Los vectores vivos recombinantes son candidatos atractivos para generar una respuesta inmune celular contra el VHC. La inmunización con adenovirus recombinantes para la cápsida y la E1 en ratones indujo una respuesta de tipo T citotóxica específica contra estos antígenos (Bruna-Romero O., et al. (1997) Induction of cytotoxic T-cell response against hepatitis C virus structural antigens using a defective recombinant adenovirus. *Hepatology* 25:470-7). Aunque estos resultados han sido alentadores, los problemas recientes con el uso de adenovirus recombinantes en terapia génica han creado incógnitas sobre su uso en humanos. El empleo de virus recombinantes de tipo vaccinia y virus de viruela de canarios, conteniendo diferentes genes del VHC ha inducido respuestas de tipo T citotóxicas en ratones, de acuerdo al antígeno evaluado, cuando se han combinado con candidatos basados en vacunas de ADN (Pancholi P., et al. (2000) DNA prime-canarypox boost with polycistronic hepatitis C virus (HCV) genes generates potent immune responses to HCV structural and nonstructural proteins. *J. Infect. Dis.* 182:18-27; Pancholi P., et al. (2003) DNA immunization with hepatitis C virus (HCV) polycistronic genes or immunization by HCV DNA priming-recombinant canarypox

virus boosting induces immune responses and protection from recombinant HCV-vaccinia virus infection in HLA-A2.1-transgenic mice. *J. Virol.* 77:382-90). De hecho, no se ha evidenciado hasta el momento que la administración única de virus de viruela de canario recombinantes para antígenos de la región estructural del VHC
5 induzca una respuesta celular *in vivo* efectiva por ejemplo en el modelo de reto con virus vaccinia recombinante. A este grupo de virus pertenece también el virus de viruela aviar (VVA), cuyo empleo para la inducción de respuesta inmune no se ha reportado previamente para antígenos del VHC. El virus de viruela aviar no se replica en células de mamíferos, pero puede infectar y expresar eficientemente las proteínas
10 codificadas por su genoma en el citoplasma. Debido a estas características, los riesgos regulatorios relacionados con el empleo en humanos es muy inferior al de otras variantes virales.

Actualmente no existe ninguna vacuna disponible en el mercado y la mayoría de los estudios se concentran aún en la fase pre-clínica. Por tanto, la urgente necesidad de
15 desarrollar un agente preventivo y/o terapéutico efectivo contra la infección por el VHC es un problema por solucionar.

Explicación de la invención

Esta invención venciendo las limitaciones y el arte previo, resuelve el problema antes
20 mencionado al proporcionar un virus de viruela aviar recombinante el cual contiene fragmentos de ADN derivados del virus de la hepatitis C en una región no esencial del genoma del VVA, capaz de inducir una respuesta celular específica contra el VHC dependiendo de las regiones aminoacídicas provenientes de los antígenos del VHC contenidas en la proteína expresada por el VVA.

25 De acuerdo a la presente invención el virus FPCoE1 expresa una proteína que comprende los aa 79-338 (SEQ ID No: 1) que incluye parte de la proteína de la cápsida y la E1 y el virus FPBS comprende una proteína quimérica (SEQ ID No: 2) que incluye epitopos específicos para linfocitos T tanto CD4+ como CD8+ correspondientes a diferentes antígenos del VHC. En estos virus, la secuencia
30 codificante para los antígenos del VHC procede del ADNc proveniente de un aislamiento cubano del VHC (Morales J, et al. WO 98/25960).

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica para inducir respuesta inmune celular específica contra el VHC en sujetos

vacunados. Dicha composición comprende una cantidad inmunizante efectiva del virus de viruela aviar recombinante y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Los virus de viruela aviar que componen la invención tienen la capacidad de penetrar las células humanas y expresar los antígenos del VHC en el citoplasma de las mismas. La expresión en células humanas está dirigida por la unidad transcripcional, compuesta por un promotor inmediato/temprano sintético para VVA. Estos virus contienen también el gen de la xantina guanosa fosforibosil transferasa bajo el control del promotor 7.5K de vaccinia. Estos virus no tienen capacidad para replicarse en humanos.

Esta composición puede ser administrada por vía intramuscular, intraperitoneal o subcutánea. El método de administración puede ser mediante jeringuillas, pistola de genes, spray u otros dispositivos de administración. Cada individuo recibe una dosis que oscila desde 2.5×10^7 a 1×10^8 UFP/dosis en un volumen determinado. En esta invención se describen también los procedimientos para la inmunización de los VVA en esquemas alternos con plásmidos para la inmunización con ADN. Los VVA también pueden ser administrados en esquemas alternos con proteínas u otros virus recombinantes para antígenos del VHC, o en esquemas paralelos con citocinas y otros compuestos inmunomoduladores. Estas combinaciones permiten la aparición de nuevas especificidades epitópicas o la potenciación de alguna rama de la respuesta inmune en particular.

Las composiciones farmacéuticas compuestas por virus de viruela aviar recombinantes para antígenos del VHC pueden tener las siguientes ventajas:

- Es posible obtener una respuesta celular específica vigorosa.
- Se requiere un reducido número de dosis para lograr el efecto deseado.
- Es posible el empleo de estas formulaciones como núcleo para vacunas combinadas.
- No se requiere adyuvación.
- Pueden ser empleadas en combinación con agentes antivirales.

Dependiendo de las circunstancias, a determinar en cada caso, la composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse para inducir inmunidad contra el VHC antes de, simultáneamente o después de otra terapia o vacuna, igualmente para inducir inmunidad preventiva contra la infección por el VHC y para inducir inmunidad contra el VHC en pacientes con hepatitis C crónica, cirrosis y cáncer de hígado.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Representación esquemática de la región correspondiente a los antígenos del VHC en los virus de viruela aviar recombinantes.

Figura 2: Esquema de inmunización con los diferentes virus de viruela aviar. Respuesta de anticuerpos (A). Respuesta de linfocitos secretores de interferón gamma (B). Respuesta frente al reto con virus vaccinia (C)

Figura 3: Esquema de inmunización con FPCoE1 y FPBS por diferentes vías de inoculación. Respuesta frente al reto con virus vaccinia recombinante para los antígenos de la región estructural del VHC.

10 **Figura: 4:** Esquema de inmunización con FPCoE1 y FPBS con diferentes cantidades. Respuesta frente al reto con virus vaccinia recombinante para los antígenos de la región estructural del VHC.

Figura: 5: Esquema de inmunización basado en combinaciones de FPCoE1 y una formulación de una vacuna de ADN. Respuesta de anticuerpos contra Core, E1 y E2
15 (A). Respuesta frente al reto con virus vaccinia recombinante para los antígenos de la región estructural del VHC (B).

EJEMPLOS DE REALIZACIÓN

Como se entiende en esta invención, los términos Virus de Hepatitis C o VHC
20 describen al virus de una manera genérica, por lo que los términos no son limitantes a una secuencia viral particular del VHC o aislamiento.

A sí mismo por secuencia codificante se entiende una molécula de ácido nucleico la cual es traducida a un polipéptido, usualmente vía ARNm, cuando es colocada bajo control de una secuencia regulatoria apropiada. En este caso una secuencia
25 codificante puede incluir, pero no es limitante para ADNc y secuencias nucleotídicas recombinantes.

La presente invención será descrita más completamente mediante los ejemplos siguientes, los cuales son ilustrativos y no limitan el alcance de la invención.

30 **Ejemplo 1: Evaluación de los virus FPCoE1c, FPCoE1, y el FPBS**

Con el objetivo de evaluar la capacidad de virus de viruela aviar recombinantes para antígenos del VHC de inducir una respuesta inmune celular específica se obtuvieron los virus FPCoE1c, FPCoE1 y FPBS. La Figura 1 muestra una representación esquemática de la secuencia correspondiente a los antígenos del VHC. Los virus

fueron obtenidos de la siguiente forma. Fibroblastos de pollo fueron infectados con VVA y posteriormente fueron transfectados con los plasmidios pFPCoE1c, pFPCoE1 o pFPBS utilizando lipofectamina (Invitrogen, USA). Estos plasmidios son derivados del plasmidio pFP67xgpt (Vázquez-Blomquist D., González S., Duarte C.A. (2002) Effect of promoters on cellular immune response induced by recombinant fowlpox virus expressing multi-epitope polypeptides from HIV-1. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 36:171-9) que contienen la secuencia codificante para las regiones que comprenden los aa 1-338, aa 79-338 (SEQ ID No: 1), o la secuencia codificante para una proteína quimérica basada en epitopos específicos para linfocitos T (SEQ ID No: 2) (plasmidios pFPCoE1c, pFPCoE1 y pFPBS, respectivamente). A continuación se realizaron varios ciclos de purificación viral en medio selectivo con xantina, hipoxantina y ácido micofenólico. Después se amplificó el producto viral de una placa de infección y se confirmó la presencia del inserto correspondiente al VHC mediante reacción en cadena de la polimerasa.

Se analizó la inmunogenicidad de los virus FPCoE1c, FPCoE1 y FPBS en ratones BALB/c hembras de 8 semanas, después de administrar 2 dosis de 2.5×10^7 UFP por vía intraperitoneal con un intervalo de 3 semanas entre ellas. Los grupos de inmunización estuvieron compuestos por 10 animales. La Figura 2A muestra que solo la inmunización con el FPCoE1 fue capaz de inducir niveles detectables de anticuerpos contra Core y E1. Sin embargo, la Figura 2B muestra la inducción de una respuesta positiva de linfocitos secretores de IFN-gamma en los animales inmunizados con el FPCoE1 y el FPBS, estadísticamente superior (Prueba T de Student, $p < 0.05$) a la detectada en los animales inmunizados con el virus negativo (FP9). La inmunización con el FPCoE1c no indujo una respuesta positiva de linfocitos secretores de IFN-gamma. Adicionalmente, como se muestra en la Figura 2C, los animales de los grupos inmunizados con los virus FPCoE1 y FPBS fueron capaces de reducir de manera significativa (Prueba T de Student, $p < 0.05$) la carga viral en ovarios después del reto con 10^6 UFP de un virus vaccinia recombinante (vvRE) para los antígenos de la región estructural del VHC (aa 1-650 de la poliproteína viral) con relación a la observada después del reto con el virus vaccinia no recombinante para antígenos del VHC (WR). Igualmente la carga viral del vvRE en los animales inmunizados con el FPCoE1 y el FPBS fue estadísticamente inferior a la detectada en los animales inmunizados con el virus de viruela aviar negativo FP9 (Prueba T de Student, $p < 0.05$). La inmunización con el FPCoE1c no redujo de forma significativa la

carga viral en ovarios. El reto con virus vaccinia se realizó por vía intraperitoneal, 2 semanas después de la última inmunización con los virus de viruela aviar. La extracción de los ovarios se realizó 5 días después de inoculado el vvRE. El ensayo de reto con virus vaccinia recombinante ha sido ampliamente evaluado para evidenciar la capacidad de un candidato vacunal de inducir una respuesta celular fuerte in vivo. Particularmente, la reducción del título viral en ovarios se relaciona fundamentalmente con la inducción de una fuerte respuesta de linfocitos T CD8+.

Ejemplo 2: Vías de administración de VVA (intraperitoneal, subcutánea e intramuscular)

Con el objetivo de evaluar la influencia de la vía de inoculación sobre la respuesta inmune generada por los virus de viruela aviar recombinantes, se inmunizaron ratones BALB/c hembras de 8 semanas. Los grupos de inmunización estuvieron compuestos por 10 animales. Los virus (2.5×10^7 UFP) fueron administrados por vía intraperitoneal, intramuscular o subcutánea en 2 ocasiones con intervalo de 3 semanas entre ellas. La Figura 3 evidencia que no existió diferencias significativas entre las vías de inmunización en cuanto a la capacidad de los virus de viruela aviar recombinantes FPCoE1 y FPBS para reducir la carga viral del virus vaccinia recombinante vvRE en ovarios. Estos 2 recombinantes indujeron una respuesta positiva de reducción de la carga viral con relación al virus de viruela aviar control negativo FP9 (Prueba T de Student, $p < 0.05$). El reto viral se realizó mediante la inoculación intraperitoneal de 10^6 UFP del vvRE, 2 semanas después de la última dosis con los virus de viruela aviar. La extracción de los ovarios se realizó 5 días después de inoculado el vvRE.

25

Ejemplo 3: Comparación de las dosis (0.9×10^7 , 2.5×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8)

Fueron inmunizados por vía intramuscular, ratones BALB/c hembras en las semanas 0 y 3 con diferentes cantidades de los virus recombinantes. Los grupos de inmunización estuvieron compuestos por 10 animales. Como se aprecia en la Figura 4, los animales inmunizados con 0.9×10^7 UFP no tuvieron diferencias significativas entre la carga viral detectada en ovarios del vvRE después del reto con 10^6 UFP de este virus vaccinia, 2 semanas después de la última inmunización con los virus de viruela aviar. En cambio, la administración de 2.5×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , de FPCoE1 y FPBS redujo de manera significativa el título de vvRE en ovarios con relación al

detectado en animales inmunizados con cantidades similares del virus de viruela aviar control negativo FP9 (Prueba T de Student, $p < 0.05$). En todos los casos, la extracción de los ovarios se realizó 5 días después de inoculado el vvRE.

5 **Ejemplo 4: Esquemas alternos con ADN y VVA**

Con el objetivo de evaluar la respuesta inmune inducida en esquemas que combinaran un candidato vacunal de ADN con un virus de viruela aviar recombinante para antígenos del VHC se inmunizaron ratones BALB/c hembras de 8 semanas. Los grupos de inmunización estuvieron compuestos por 10 animales. Un grupo (Co-pIDKE2) fue inmunizado por vía intramuscular en la semana 0, 3, 7 y 12 con una
10 mezcla de 100 μ g de un plasmidio que expresa los primeros 650 aa de la poliproteína del VHC, pIDKE2 (Dueñas-Carrera S., et al. (2004). Immunization with a DNA vaccine encoding the hepatitis-C-virus structural antigens elicits a specific immune response against the capsid and envelope proteins in rabbits and *Macaca irus* (crab-eating macaque monkeys). *Biotechnol Appl Biochem.* 39:249-55) y 10 μ g de la
15 proteína recombinante de la cápsida del VHC, Co.120 (Alvarez-Obregon J.C., et al. (2001). A truncated HCV core protein elicits a potent immune response with a strong participation of cellular immunity components in mice. *Vaccine* 19:3940-46). Un grupo de animales (pAEC-K6) fue inmunizado en condiciones similares con el plasmidio control negativo pAEC-K6 (Herrera A.M., et al. (2000). A family of compact plasmid
20 vectors for DNA immunization in humans. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 279:548-51). Otro grupo fue inmunizado con 2.5×10^7 UFP del FPCoE1 por vía intramuscular en las semanas 0 y 3. También se inmunizaron animales con el virus de viruela aviar control negativo FP9 en las mismas condiciones. Adicionalmente, un grupo (Co-pIDKE2/FPCoE1) fue inmunizado por vía intramuscular en las semanas 0
25 y 3 con la mezcla Co-pIDKE2 y en las semanas 9 y 12 con el FPCoE1. Otro grupo (Co-pIDKE2/FP9) fue inmunizado de forma similar, pero las dosis de la semana 6 y 9 fueron administradas con el FP9. En la Figura 5 A se aprecia que los mayores niveles de anticuerpos se indujeron en el grupo Co-pIDKE2 (Prueba T de Student, $p < 0.05$).
30 Además, la administración alterna de Co-pIDKE2 y FPCoE1 indujo niveles de anticuerpos superiores a los detectados en el grupo inmunizado con el FPCoE1 solo (Prueba T de Student, $p < 0.05$). En la Figura 5 B se puede apreciar que tanto los grupos inmunizados con FPCoE1, Co-pIDKE2, como los inmunizados con Co-pIDKE2 en las 2 primeras dosis y FPCoE1 en las otras 2, redujeron de forma

significativa (Prueba T de Student, $p < 0.05$) la carga viral del vvRE después del reto con relación a los animales inmunizados con los controles negativos. El valor promedio más bajo de carga viral fue detectado en los animales inmunizados con CopIDKE2 en las 2 primeras dosis y FPCoE1 en las otras 2. El reto viral se realizó mediante la inoculación intraperitoneal de 10^6 UFP del vvRE, 2 semanas después de la última dosis con los virus de viruela aviar. La extracción de los ovarios se realizó 5 días después de inoculado el vvRE.

10

15

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología
- 5 <120> VECTORES VIVOS RECOMBINANTES Y SU USO EN COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS CONTRA EL VIRUS DE LA HEPATITIS C
- 10 <130> Sec VHC
- <140>
<141>
- 15 <150> CU 2004-0174
<151> 2004-08-11
- <160> 2
- 20 <170> PatentIn Ver. 2.1
- <210> 1
<211> 831
<212> ADN
- 25 <213> Fragmento de ADN del VHC del nucleótido 237 al 1014
- <400> 1
- | | | | | | | | |
|----|------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|-----|
| | atgaggcctc | ccgggtaccc | ttggcccctc | tatggtaacg | agggcatggg | atgggcagga | 60 |
| | tggctcctgt | caccccgtagg | ctctcggcct | agttggggcc | ccactgaccc | ccggcgtagg | 120 |
| 30 | tcgcgtaatt | tgggtaaggt | catcgatacc | ctcacatgcg | gcttcgccga | cctcatgggg | 180 |
| | tacattccgc | tcgtcggcgc | ccccctaggg | ggcgctgccg | gggccctggc | gcatggcgctc | 240 |
| | cgggtttctg | aggacggcgt | gaattatgca | acaggggaatc | tgcccgggtt | ctctttctct | 300 |
| | ctcttccttt | tggctttgct | gtcctgtttg | accatcccag | tttcgccta | tgaagtgcgc | 360 |
| | aacgcgtccg | gggtgtacca | tgtcacgaac | gactgctcca | actcaagcat | tgtgtatgag | 420 |
| 35 | gcagacgaca | tgatcatgca | caccccgga | tgcgtgccct | gcgttcggga | ggacaacacc | 480 |
| | tcccgctgct | gggtagcgct | cacccccaca | ctcgcggcca | ggaatgccag | cgtccccacc | 540 |
| | acgacaatac | gacgccacgt | cgatttgctc | gttggggcgg | ctgctctctg | ctccgctatg | 600 |
| | tacgtggggg | atctctgcgg | atctgttttc | ctcgtttccc | agctgttcac | cttctgcct | 660 |
| | cgccggcatg | agacagcaca | ggactgcaac | tgctcaatct | atcccgcca | cgtatcaggt | 720 |
| 40 | caccgcatgg | cctgggatat | gatgatgaac | tggtcacctt | caacagccct | agtggtatcg | 780 |
| | cagttactcc | ggatccgtcg | acctgcagca | tgccatggca | taagtgacta | g | 831 |
- 45 <210> 2
<211> 602
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial que incluye epitopos del VHC
- 50 <400> 2
- | | | | | | | | |
|--|------------|------------|------------|------------|-------------|------------|-----|
| | atgggatcca | cccacgtgac | cggcggcagc | caggcccgcg | ccacccacag | cttcacctcc | 60 |
| | ctgctgcgcc | agggcgccaa | gcagaacgtg | cagctgatcg | gcaaggatgat | cgacaccctg | 120 |
| | accagcggct | tcgccgacct | gatgggctac | atcccactgg | tgggcgcccc | actgggcggc | 180 |
| | gccgcccgcg | ccaagaaggg | ccacgtgagc | ggccaccgca | tggcctggga | catgatgatg | 240 |

aactggggcca gcaagaaggc cgccagccgc gccgccggct tgcaggacag caccatgctg 300
gtgagcgaag gccgcagctg ggcccagcct ggctacccat ggccactgta tggcaacgag 360
ggcatgggca agaagggtc cagcttcagc ctgttcctgt tggccctcct gagcagcttg 420
accatcaaga agatgagcta ctctggacc ggcgccctgg tgacccaag cgccgccgag 480
5 aagaagctgt tgttcaacat cctgggcggc tgggtgaaga agagcatggt gggcaactgg 540
gccaaggtga agaagtacac cggcgacttc gacagcgtga tcgactccag gccttaactg 600
ca 602

10

15

20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un virus de viruela aviar recombinante caracterizado por que contiene fragmentos de ADN derivados del virus de la hepatitis C, en una región no esencial del genoma del VVA, capaz de inducir una respuesta celular específica contra antígenos del VHC.
- 10 2. El virus de viruela aviar recombinante de la reivindicación 1, donde el fragmento de ADN del virus de hepatitis C es la secuencia codificante para una poliproteína cápsida-E1 que comprende los aa 79-338 (SEQ ID No: 1).
- 15 3. El virus de viruela aviar recombinante de la reivindicación 1, donde el fragmento de ADN del virus de hepatitis C es la secuencia codificante para una proteína quimérica basada en epitopos específicos para linfocitos T (SEQ ID No: 2).
- 20 4. Un virus de viruela aviar recombinante como el reivindicado en 1 y 2, el cual es el FPCoE1.
- 5 5. Un virus de viruela aviar recombinante como el reivindicado en 1 y 3, el cual es el FPBS.
- 25 6. Una composición farmacéutica para inducir una respuesta inmune celular específica contra el VHC, que comprende una cantidad inmunizante efectiva del virus de viruela aviar recombinante como el de las reivindicaciones de la 1 a la 5 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 30 7. La composición farmacéutica según la reivindicación 6, donde la dosis inmunizante efectiva es entre 2.5×10^7 y 1×10^8 UFP/ dosis.
8. La composición farmacéutica según las reivindicaciones 6 y 7 para inducir inmunidad preventiva contra la infección por el VHC.
9. La composición farmacéutica según las reivindicaciones 6 y 7 para inducir inmunidad contra el VHC en pacientes con hepatitis C crónica, cirrosis y cáncer de hígado.
10. La composición farmacéutica según las reivindicaciones 6 y 7 para inducir inmunidad contra el VHC antes de, simultáneamente o después de otra terapia o vacuna.

Figura 1:

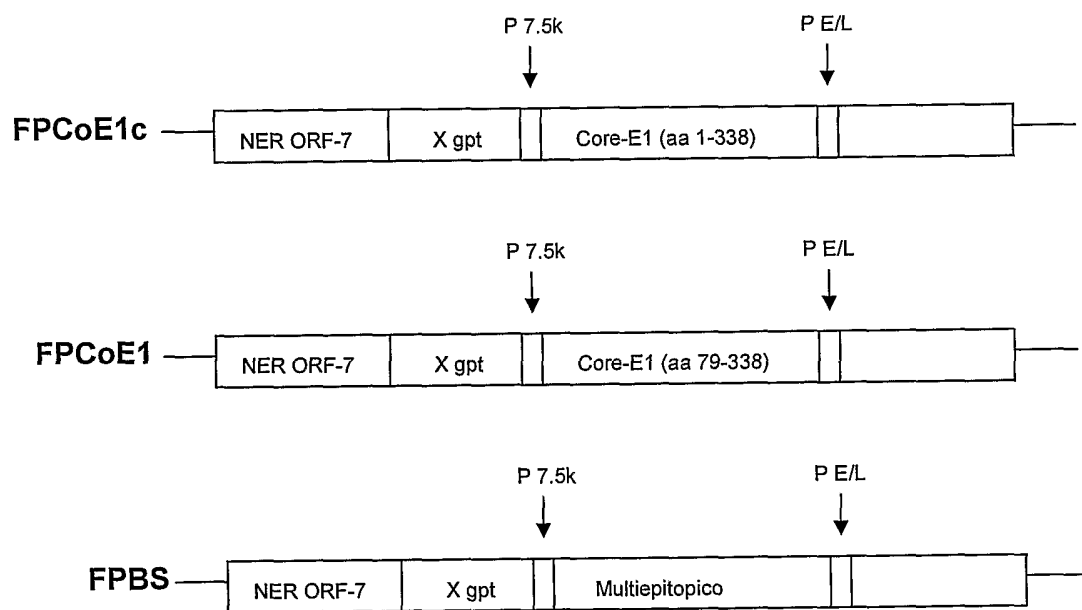


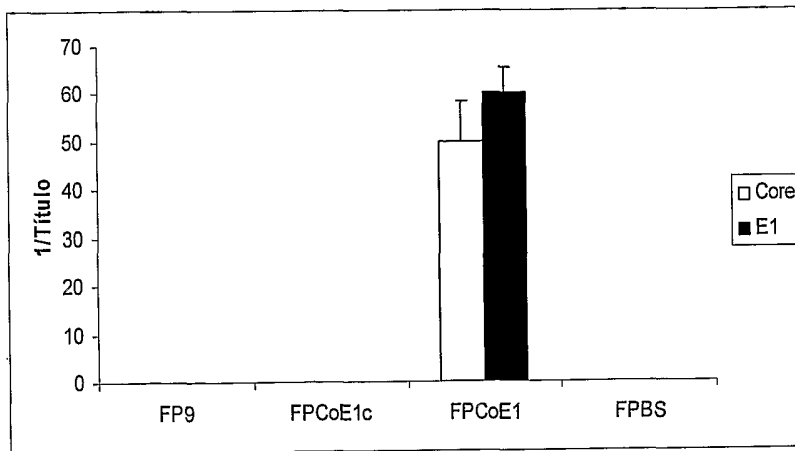
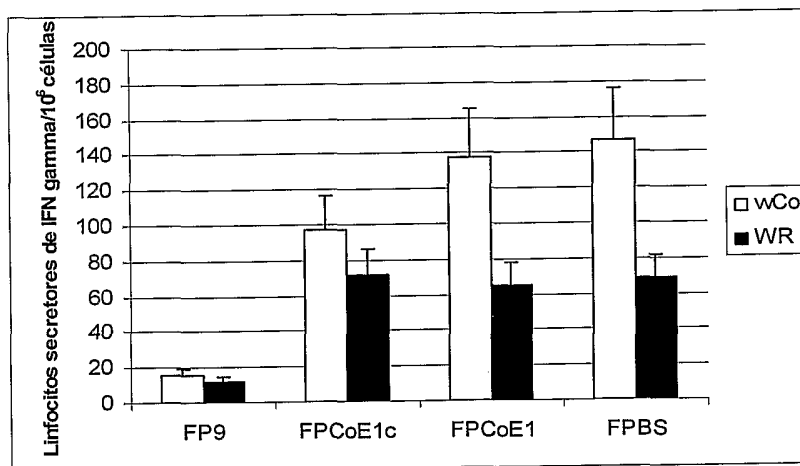
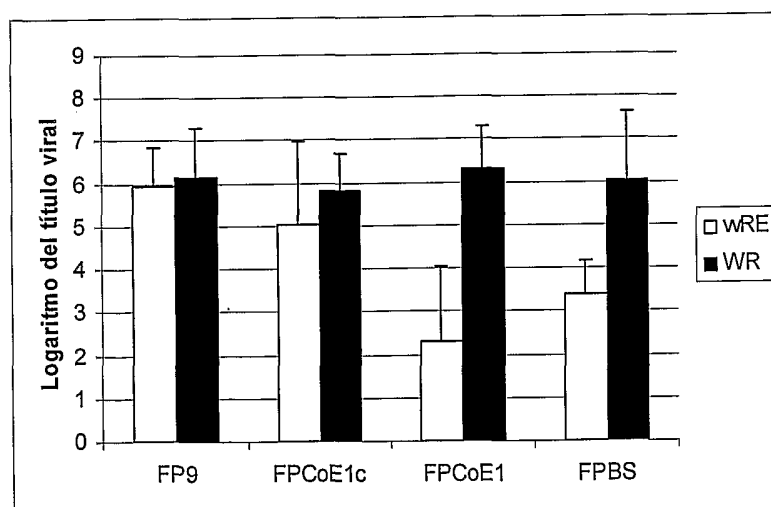
Figura 2:**A****B****C**

Figura 3:

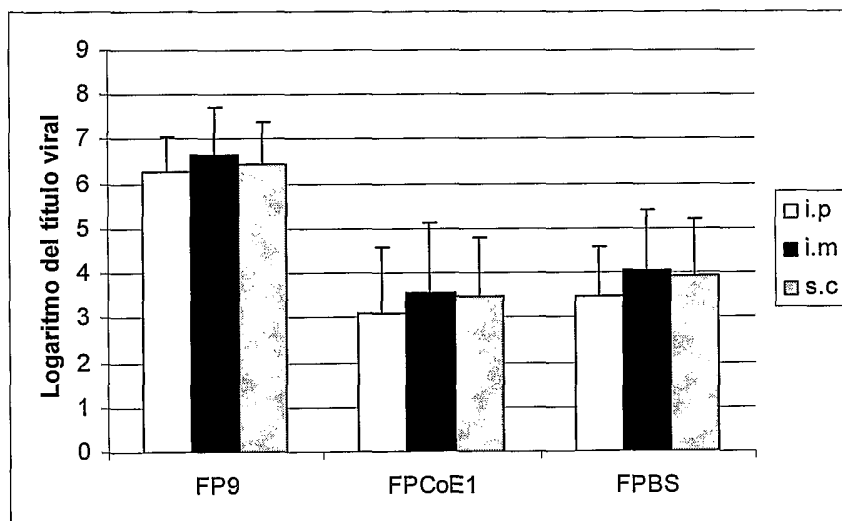


Figura 4:

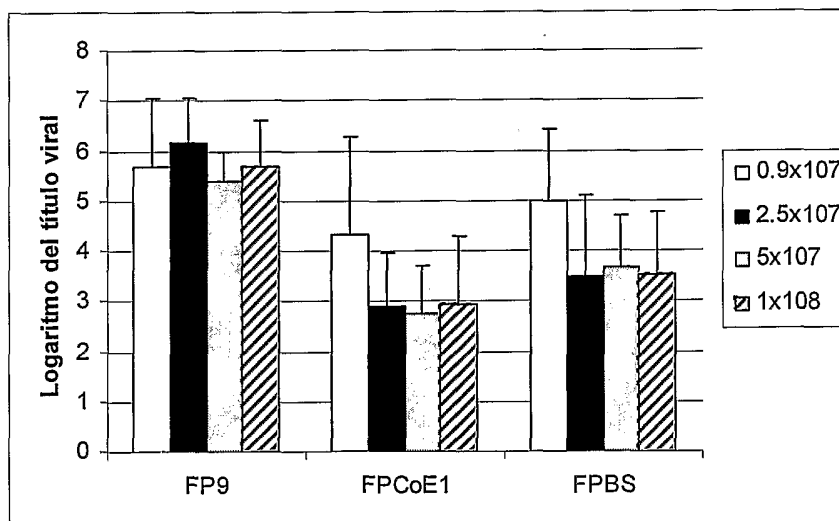
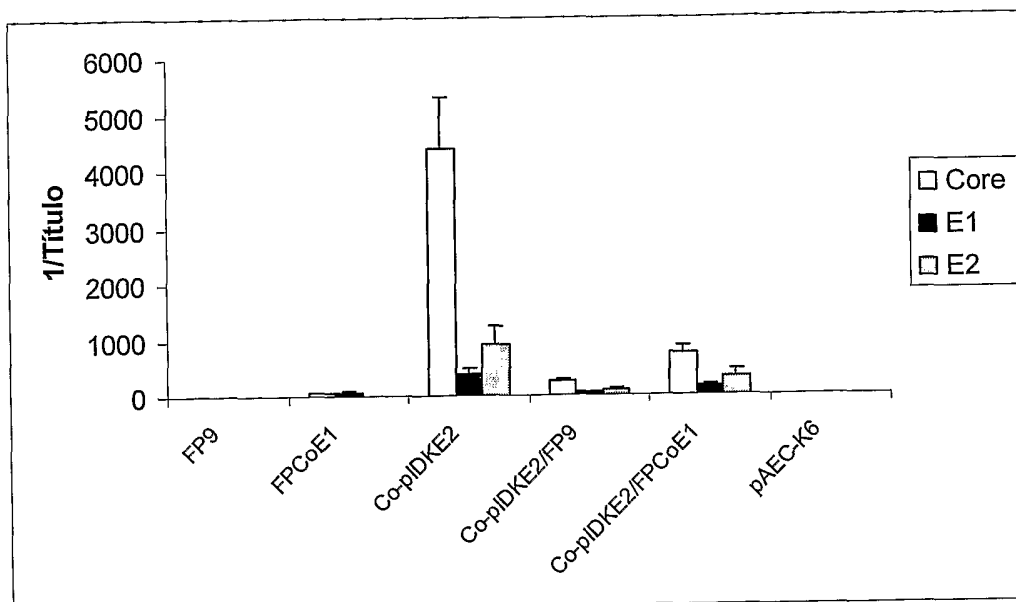
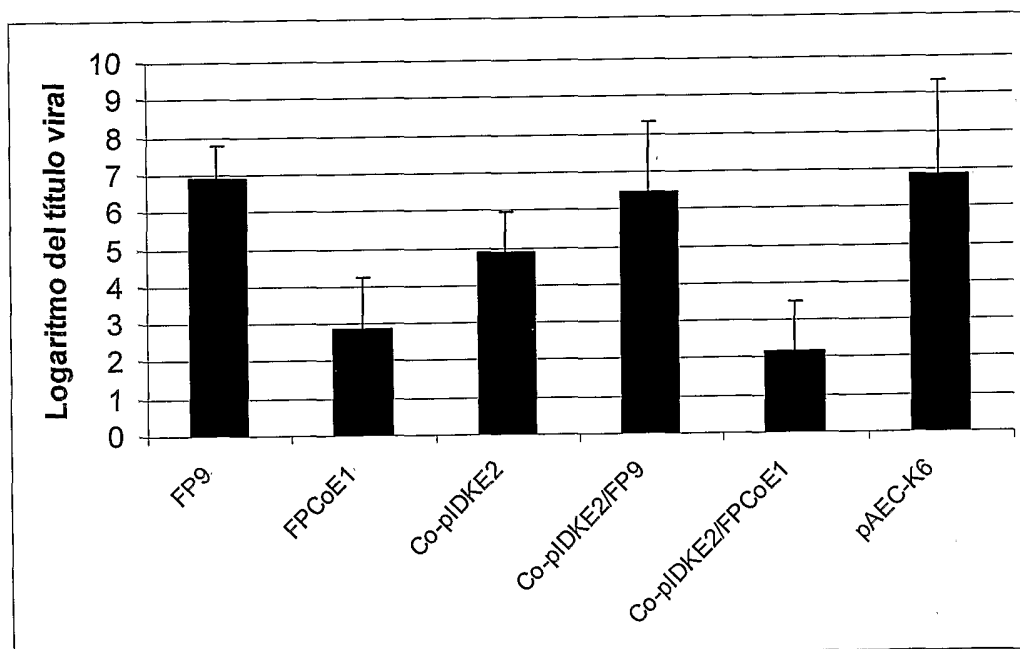


Figura 5:

A



B



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/JP2005/000004

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
A61K39/29 C12N15/863 C07K14/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, PAJ, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	YAP C C ET AL: "Expression of target genes by coinfection with replication-deficient viral vectors." THE JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY. AUG 1998, vol. 79 (Pt 8), August 1998 (1998-08), pages 1879-1888, XP002360316 ISSN: 0022-1317 page 1885, left-hand column, paragraph 2 figure 8 ----- -/--	1

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 December 2005

Date of mailing of the international search report

04/01/2006

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Brouns, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PC 1/ CU2005/000004

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	PANCHOLI P ET AL: "DNA immunization with hepatitis C virus (HCV) polycistronic genes or immunization by HCV DNA priming-recombinant canarypox virus boosting induces immune responses and protection from recombinant HCV-vaccinia virus infection in HLA-A2.1-transgenic mice" JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 77, no. 1, January 2003 (2003-01), pages 382-390, XP002308334 ISSN: 0022-538X cited in the application figure 6 table 2	1,2,4, 6-10
Y	ANONYMOUS: "WHO informal consultation on characterization and quality aspects of vaccines based on live viral vectors" 'Online! December 2003 (2003-12), pages 1-27, XP002360387 Retrieved from the Internet: URL: http://www.who.int/vaccine_research/documents/viral%20vectors%20report%20full.pdf f> 'retrieved on 2005-12-21! page 6	1,2,4, 6-10
Y	LECHMANN M ET AL: "Vaccine development for hepatitis C" SEMINARS IN LIVER DISEASE, STUTTGART, DE, vol. 20, no. 2, 2000, pages 211-226, XP002316999 cited in the application page 218, left-hand column, last paragraph - right-hand column, paragraph 1	1,2,4, 6-10
A	PAOLETTI E ET AL: "HIGHLY ATTENUATED POXVIRUS VECTORS: NYVAC, ALVAC AND TROVAC" DEVELOPMENTS IN BIOLOGICAL STANDARDIZATION, KARGER, BASEL, CH, vol. 84, 1995, pages 159-163, XP002048184 ISSN: 0301-5149 page 161, paragraphs 1,2	1-10
A	WO 92/15672 A (VIROGENETICS CORPORATION) 17 September 1992 (1992-09-17) examples 22,78,106	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/CH2005/000004

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9215672	A	17-09-1992	AT 247163 T 15-08-2003
			AU 1001197 A 15-05-1997
			AU 1001297 A 15-05-1997
			AU 672359 B2 03-10-1996
			AU 1587192 A 06-10-1992
			CA 2105277 A1 08-09-1992
			DE 69233158 D1 18-09-2003
			DE 69233158 T2 13-05-2004
			EP 0575491 A1 29-12-1993
			JP 3602530 B2 15-12-2004
			JP 6505874 T 07-07-1994
			JP 3602844 B2 15-12-2004
			JP 2004000222 A 08-01-2004
			JP 3624911 B2 02-03-2005
			JP 2004105187 A 08-04-2004
			KR 242671 B1 02-03-2000
			US 5494807 A 27-02-1996

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PC17CU2005/000004

A. CLASIFICACION DE LA INVENCION

A61K39/29 C12N15/863 C07K14/18

Según la Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o la clasificación nacional y la IPC

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BUSQUEDA

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07K C12N A61K

Otra documentación consultada además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, cuando sea aplicable, términos de búsqueda utilizados)

EPO-Internal, PAJ, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES

Categoría*	Identificación del documento, con indicación, cuando sea adecuado, de los pasajes pertinentes	N° de las reivindicaciones pertinentes
X	YAP C C ET AL: "Expression of target genes by coinfection with replication-deficient viral vectors." THE JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY. AUG 1998, vol. 79 (Pt 8), Agosto 1998 (1998-08), páginas 1879-1888, XP002360316 ISSN: 0022-1317 página 1885, columna de izquierda, párrafo 2 figura 8 ----- -/--	1

☐ En la continuación del Recuadro C se relacionan documentos adicionales.

☐ Véase el Anexo de la familia de patentes.

* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica que no se considera como particularmente pertinente

"E" documento anterior, publicado en la fecha de presentación internacional o con posterioridad a la misma

"L" documento que puede plantear dudas sobre reivindicación(es) de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la especificada)

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional, pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud, pero que se cita para comprender el principio o la teoría que constituye la base de la invención

"X" documento de particular importancia; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que implique actividad inventiva cuando se considera el documento aisladamente

"Y" documento de especial importancia; no puede considerarse que la invención reivindicada implique actividad inventiva cuando el documento esté combinado con otro u otros documentos, cuya combinación sea evidente para un experto en la materia

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes

Fecha en la que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional

22 Diciembre 2005

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

04/01/2006

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2

NL - 2280 HV Rijswijk

Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,

Fax: (+31-70) 340-3016

Facsímil N°

Funcionario autorizado

Teléfono N°

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PC17CU2005/000004

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES

Categoría*	Identificación del documento, con indicación, cuando sea adecuado, de los pasajes pertinentes	N° de las reivindicaciones pertinentes
Y	PANCHOLI P ET AL: "DNA immunization with hepatitis C virus (HCV) polycistronic genes or immunization by HCV DNA priming-recombinant canarypox virus boosting induces immune responses and protection from recombinant HCV-vaccinia virus infection in HLA-A2.1-transgenic mice" JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 77, no. 1, Enero 2003 (2003-01), páginas 382-390, XP002308334 ISSN: 0022-538X cited in the application figura: 6 tabla 2	1,2,4, 6-10
Y	ANONYMOUS: "WHO informal consultation on characterization and quality aspects of vaccines based on live viral vectors" "Online! Diciembre 2003 (2003-12), páginas 1-27, XP002360387 Recuperado de Internet: URL: http://www.who.int/vaccine_research/documents/viral%20vectors%20report%20full.pdf f> Recuperado el 2005-12-21! página 6	1,2,4, 6-10
Y	LECHMANN M ET AL: "Vaccine development for hepatitis C" SEMINARS IN LIVER DISEASE, STUTTGART, DE, vol. 20, no. 2, 2000, páginas 211-226, XP002316999 cited in the application página 218, columna de izquierda, último párrafo - columna de derecha, párrafo 1	1,2,4, 6-10
A	PAOLETTI E ET AL: "HIGHLY ATTENUATED POXVIRUS VECTORS: NYVAC, ALVAC AND TROVAC" DEVELOPMENTS IN BIOLOGICAL STANDARDIZATION, KARGER, BASEL, CH, vol. 84, 1995, páginas 159-163, XP002048184 ISSN: 0301-5149 página 161, párrafos 1,2	1-10
A	WO 92/15672 A (VIROGENETICS CORPORATION) 17 Septiembre 1992 (1992-09-17) exemplos 22,78,106	1-10

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional n°

PC17CU2005/000004

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
WO 9215672 A	17-09-1992	AT 247163 T	15-08-2003
		AU 1001197 A	15-05-1997
		AU 1001297 A	15-05-1997
		AU 672359 B2	03-10-1996
		AU 1587192 A	06-10-1992
		CA 2105277 A1	08-09-1992
		DE 69233158 D1	18-09-2003
		DE 69233158 T2	13-05-2004
		EP 0575491 A1	29-12-1993
		JP 3602530 B2	15-12-2004
		JP 6505874 T	07-07-1994
		JP 3602844 B2	15-12-2004
		JP 2004000222 A	08-01-2004
		JP 3624911 B2	02-03-2005
		JP 2004105187 A	08-04-2004
		KR 242671 B1	02-03-2000
		US 5494807 A	27-02-1996
