

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 671 381**

(51) Int. Cl.:

**A61K 38/21** (2006.01)  
**A61K 36/06** (2006.01)  
**C07K 14/02** (2006.01)  
**A61K 39/29** (2006.01)  
**C07K 14/005** (2006.01)  
**C12N 15/81** (2006.01)  
**A61K 39/00** (2006.01)  
**A61K 39/12** (2006.01)  
**A61K 45/06** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.06.2012 PCT/US2012/042426**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **20.12.2012 WO12174220**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.06.2012 E 12800096 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.03.2018 EP 2720716**

(54) Título: **Composiciones immunoterapéuticas para el tratamiento o prevención de infección por virus de hepatitis delta**

(30) Prioridad:

**14.06.2011 US 201161497039 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**06.06.2018**

(73) Titular/es:

**GLOBEIMMUNE, INC. (100.0%)  
1450 Infinite Drive  
Louisville, CO 80027, US**

(72) Inventor/es:

**KING, THOMAS, H. y  
APELIAN, DAVID**

(74) Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**ES 2 671 381 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**

Composiciones inmunoterapéuticas para el tratamiento o prevención de infección por virus de hepatitis delta

**5 Campo de la invención**

La presente invención se refiere en líneas generales a composiciones inmunoterapéuticas y métodos para prevenir y/o tratar infección por virus de hepatitis delta (VHD).

**10 Antecedentes de la invención**

La hepatitis D es una enfermedad causada por infección con un virus de ARN con envuelta circular y pequeño conocido como virus de hepatitis delta (VHD). El VHD se descubrió por primera vez en 1977 (Rizzetto *et al.*, Gut 1977; 18: 997-1003) y posteriormente demostró ser el agente infeccioso de un nueva forma de hepatitis (Rizzetto *et al.*, J Infect Dis 1980; 141: 590-602; Rizzetto *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 1980; 77: 6124-8; Wang *et al.*, Nature 1986; 323: 508-14; Mason *et al.*, en: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA, eds. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Londres: Elsevier/Academic Press, 2005; 735-8). Recientemente se ha estimado que 15-20 millones de personas se infectan con VHD, lo que requiere una infección simultánea con virus de hepatitis B (VHB) para su ciclo vital, aunque esta cantidad puede estar subrepresentada debido en parte a la ausencia de cribado sistemático de infección de VHD en individuos infectados por VHB (Pascarella y Negro, Liver International 2011, 31: 7-21).

Los virus de hepatitis D son partículas esféricas que contienen una estructura central formada por un ARN genómico de VHD que forma complejos con aproximadamente 70 moléculas de AgHD (en ambas formas, la pequeña y la grande) (Ryu *et al.*, J Virol 1993; 67:3281-7). Se cree que el VHD entra en la célula usando el mismo receptor que VHB, utilizando las proteínas de envuelta de VHB como su recubierta externa. La envuelta está compuesta de aproximadamente 100 copias de proteínas de antígeno superficial de VHB (AgHB pequeños, intermedios y grandes). El AgHD grande y los AgHB son suficientes para formar partículas víricas, que no son infecciosas salvo que incluya ARN de VHD, y el AgHD pequeño aumenta la eficacia de empaquetado del virus (Chen *et al.*, J Virol 1992; 66: 2853-9; Wang *et al.*, J Virol 1994; 68: 6363-71).

Una vez dentro de la célula, el VHD usa ARN polimerasas de la célula hospedadora. Se acumulan tres ARN durante los procesos de replicación del virus. El genoma de VHD es un ARN monocatenario negativo circular de aproximadamente 1672-1697 nucleótidos (Radjef *et al.*, J Virol 2004; 78:2537-44) y contiene un dominio de ribozima, que abarca los nucleótidos 680-780 y un sitio promotor putativo para el ARN de AgHD (Beard *et al.*, J Virol 1996; 70: 4986-95). El antigenoma, que contiene la fase de lectura abierta que codifica el AgHD y un dominio de ribozima (Sharmeen *et al.*, J Virol 1988; 62: 2674-9; Ferre-D'amare *et al.*, Nature 1998; 395:567-74) es el complemento perfecto del genoma y su replicación se produce a través de síntesis de ARN dirigida por ARN sin ningún intermedio de ADN (Chen *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 1986; 83: 8774-8). El ARNm dirige la síntesis de AgHD.

Existe únicamente una proteína conocida codificada por el genoma de VHD y consiste en dos formas, un AgHD grande (L) de 27 kDa (AgHD-L o L-AgHD) (214 aminoácidos) y un AgHD pequeño (S) de 24 kDa (AgHD-S o S-AgHD) (195 aminoácidos). Las proteínas difieren en aproximadamente 19 aminoácidos en el extremo C del AgHD grande. El extremo N del antígeno de VHD es responsable de la señalización de localización nuclear, el dominio central del antígeno de VHD es responsable de la unión del ARN y el extremo C está implicado en el ensamblaje del virión y la inhibición del ensamblaje del ARN. AgHD-S se produce en las fases tempranas de la infección vírica y mantiene la replicación del virus. AgHD-L se produce posteriormente en la infección vírica, inhibe la infección vírica y es necesario para el ensamblaje de las partículas víricas.

La infección por VHD se produce únicamente en individuos que se coinfectan con un virus diferente, el virus de la hepatitis B (VHB) y, más específicamente, únicamente en individuos positivos para el antígeno de superficie de VHB (AgHB). Como se analiza anteriormente, el VHD requiere el AgHB de VHB para la formación de partículas y la transmisión, y por tanto VHB es esencial para el ensamblaje y liberación de los viriones de VHD. Hay dos rutas principales conocidas en que VHD infecta a un individuo. En la primera, llamada coinfección, el VHD y el VHB pueden coinfectar de forma simultánea un individuo como una infección aguda, y este tipo de infección provoca aproximadamente un 95 % de recuperación de la mayoría de las personas, similar a las tasas de recuperación para infección por VHB aguda en solitario. El segundo tipo de infección de VHD, que es más común, es "superinfección", donde el VHD infecta de forma aguda a un individuo que ya tiene infección crónica por VHB. En este caso, la infección por VHD progresará hasta infección crónica por VHD en aproximadamente un 80-90 % de individuos, y es esta infección crónica por VHD la que es la forma más grave de la enfermedad. Por lo tanto, la superinfección puede clasificarse como la superinfección aguda prematura por VHD de un portador crónico de VHD o la posterior infección crónica por VHD. Una tercera forma, pero controvertida, de infección potencial por VHD, llamada infección latente independiente de auxiliar, se presentó inicialmente en 1991, y se describió como produciéndose durante el trasplante de hígado (Ottobrelli *et al.*, Gastroenterology 1991; 101: 1649-55). En esta forma de infección, los hepatocitos de un paciente podrían infectarse con VHD en solitario (por ejemplo, durante el trasplante de hígado cuando se previene la transmisión de VHB por administración de inmunoglobulinas de hepatitis B), pero si una parte residual de VHB

escapa a la neutralización, o el paciente queda expuesto de otra manera a VHB posteriormente, las células infectadas por VHD pueden verse "rescatadas". Esta forma se ha demostrado en modelos animales, pero dicha infección de hepatocitos humanos sigue siendo controvertida.

- 5 La hepatitis D crónica ahora se considera la forma más grave de hepatitis vírica, en seres humanos (para una revisión detallada de la enfermedad y el VHD asociado, véase, Grabowski y Wedemeyer, 2010, *Dig. Disease* 28:133-138; o Pascarella y Negro, *Liver International* 2011, 31: 7-21). Los individuos infectados de forma crónica con VHD tienen una progresión acelerada a fibrosis, riesgo aumentado de carcinoma hepatocelular y una descompensación temprana en el contexto de cirrosis. La enfermedad puede ser asintomática o estar presente con síntomas no específicos, y el diagnóstico puede producirse únicamente una vez aparecen las complicaciones en la fase de cirrosis de la enfermedad. Los niveles de alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) están elevados de forma persistente en la mayoría de los pacientes y pueden usarse para controlar la enfermedad. En 5-10 años, como mucho un 70-80 % de los pacientes con hepatitis D crónica pueden desarrollar cirrosis (Rizzetto et al., *Ann Intern Med* 1983; 98: 437-41; Govindarajan et al., *Hepatology* 1986; 6: 640-4) y un 15 % en 1-2 años (Saracco et al., *J Hepatol* 1987; 5: 274-81). La infección por VHD también puede acelerar el desarrollo de carcinoma hepatocelular (HCC).

La infección por VHD es mucho más prevalente en la cuenca Mediterránea, el Medio Oriente, Asia Central y del Norte, África Occidental y Central, la cuenca del Amazonas, Venezuela, Colombia y determinadas islas del Pacífico, 20 aunque el virus está presente y/o emergente en todo el mundo (por ejemplo, Rusia, Norte de India, Sur de Albania, China continental y algunas islas del Pacífico). La infección por VHD se transmite por vía parenteral, muy típicamente a través del uso de fármacos o exposición a sangre o productos sanguíneos. La transmisión sexual del VHD es menos común y es infrecuente la transmisión perinatal de virus.

- 25 Independientemente del modo de infección de VHD, actualmente no existe una buena opción para el tratamiento o prevención de infección por VHD. Los fármacos antiviricos usados para tratar otros virus que infectan los hepatocitos (por ejemplo, fármacos antiviricos para VHB o VHC), no son eficaces contra el VHD. Los fármacos inmunomoduladores tales como corticosteroides o lemivasol no han sido eficaces (Rizzetto et al., *Ann Intern Med* 1983; 98: 437-41; Arrigoni et al., *Ann Intern Med* 1983; 98:1024), ni tampoco los péptidos derivados del timo (Rosina et al., *Dig Liver Dis* 2002; 34: 285-9; Zavaglia et al., *J Clin Gastroenterol* 1996; 23: 162-3). Esto deja el tratamiento con interferón (por ejemplo, interferón- $\alpha$  pegilado; pegIFN- $\alpha$ ) como el único tratamiento actualmente aprobado para a 30 infección por VHD. Sin embargo, se sabe que el VHD puede interferir con la señalización de IFN- $\alpha$  *in vitro* y, de hecho, el tratamiento del VHD con pegIFN- $\alpha$  tiene fallos de tratamiento y bajas tasa de respuesta. En un ensayo prospectivo, únicamente un 21 % de los pacientes consiguieron negatividad del ARN de VHD y únicamente un 26 % obtuvo una respuesta bioquímica (Niro et al., *Hepatology* 2006; 44:713-20), y se han obtenido resultados similares 35 en otros ensayos, donde la respuesta mantenida al tratamiento (cura) sigue siendo muy baja. Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de nuevas estrategias profilácticas y terapéuticas para la infección por VHD.

Chou et al, *J. of Virol.* 1998 3684-3690 describen que el antígeno de la hepatitis delta media la importación nuclear 40 del ARN del virus de hepatitis delta.

El documento WO 98/28004 describe una composición inmunogénica que comprende un fragmento de LAgHD de VHD fusionado a un polipéptido antigénico contra la hepatitis B.

- 45 Los documentos WO 2011/032119, WO 2007/092792, WO 2006/044923, WO 2010/121180 y WO 2007/008780 se refieren todos a composiciones inmunoterapéuticas basadas en levaduras que pueden usarse en el tratamiento o prevención de una diversidad de enfermedades incluyendo enfermedad vírica y cáncer.

### Sumario de la invención

- 50 Se describe una composición inmunoterapéutica que comprende: (a) un vehículo de levadura; y (b) una proteína de fusión que comprende antígenos de VHD. La composición provoca una respuesta inmunitaria específica de VHD cuando se administra a un sujeto.
- 55 En un aspecto de esta divulgación, los antígenos de VHD consisten en al menos un dominio inmunogénico de un antígeno grande de VHD (AgHD-L) o un antígeno pequeño de VHD (AgHD-S), donde la secuencia de localización nuclear (SLN) se ha inactivado por sustitución o eliminación de uno o más aminoácidos de la SLN. Por ejemplo, una SLN puede inactivarse por la eliminación de la SLN completa, aunque la invención no está limitada a este ejemplo.
- 60 En un aspecto de la divulgación, el antígeno de VHD consiste en al menos un AgHD-L o AgHD-S de longitud completa, excepto que la secuencia de localización nuclear (SLN) del AgHD-L o AgHD-S se ha inactivado por sustitución o eliminación de uno o más aminoácidos de uno o más aminoácidos de la SLN.
- 65 En otro aspecto de esta divulgación, el antígeno de VHD consiste en una fusión de dos o más AgHD-L o AgHD-S de longitud completa, excepto que la secuencia de localización nuclear (SLN) de cada uno del AgHD-L o AgHD-S se ha inactivado por sustitución o eliminación de uno o más aminoácidos de la SLN. Por ejemplo, en un aspecto, la SLN

está eliminada. En un aspecto, cada uno del AgHD-L o AgHD-S es de un genotipo de VHD diferente.

- En otro aspecto más de esta divulgación, el antígeno de VHD consiste en una fusión de tres AgHD-L o AgHD-S de longitud completa, excepto que la secuencia de localización nuclear (SLN) de cada uno del AgHD-L o AgHD-S se ha inactivado por sustitución o eliminación de uno o más aminoácidos de la SLN. En un aspecto de esta divulgación, cada uno del AgHD-L o AgHD-S es de un genotipo de VHD diferente. En un ejemplo de dicho antígeno de VHD, una secuencia de AgHD-L de genotipo 1 de longitud completa representada por la SEQ ID NO: 2 (o una secuencia correspondiente de otra cepa de VHD) con una eliminación de las posiciones 66-75 (la SLN) está ligada a una secuencia de AgHD-L de genotipo 2 de longitud completa representada por la SEQ ID NO: 5 (o una secuencia correspondiente de otra cepa de VHD) con una eliminación de las posiciones 66-75 (la SLN) que está ligada a una secuencia de AgHD-L de genotipo 3 de longitud completa representada por la SEQ ID NO: 8 (o una secuencia correspondiente de otra cepa de VHD) con una eliminación de las posiciones 66-75 (la SLN). La disposición de estos tres AgHD en la proteína de fusión puede modificarse a cualquier orden además del anterior. En un aspecto, los tres AgHD son de diferentes genotipos o subgenotipos de VHD que los enumerados anteriormente.
- De acuerdo con la presente invención, se proporciona una composición inmunoterapéutica que comprende: a) un vehículo de levadura; y b) una proteína de fusión que comprende antígenos de VHD, donde el antígeno de VHD se selecciona de la SEQ ID NO: 34 o SEQ ID NO: 28; y donde la composición provoca una respuesta inmunitaria específica de VHD cuando se administra a un sujeto.
- En un aspecto de esta realización de la invención, la proteína de fusión tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEQ ID NO: 36 o SEQ ID NO: 30 o una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 36 o SEQ ID NO: 30, respectivamente.
- En cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente relacionadas con una composición inmunoterapéutica de la invención, en un aspecto, el antígeno de VHD se expresa por el vehículo de levadura. En un aspecto, el vehículo de levadura es una levadura completa. En un aspecto, la levadura completa está inactivada. En un aspecto, la levadura completa está inactivada por calor. En un aspecto, el vehículo de levadura es de un género de levadura seleccionado del grupo que consiste en: *Saccharomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Schizosaccharomyces* y *Yarrowia*. En un aspecto, el vehículo de levadura es de *Saccharomyces cerevisiae*.
- En cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente relacionadas con una composición inmunoterapéutica de la invención, en un aspecto, la composición se formula en un excipiente farmacéuticamente aceptable adecuado para administración a un sujeto.
- En cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente relacionadas con una composición inmunoterapéutica de la invención, en un aspecto, la composición contiene más de un 90 % de proteína de levadura.
- También se describe un método para tratar infección por virus de hepatitis D (VHD) o al menos un síntoma provocado por infección por VHD en un sujeto o para mejorar la supervivencia de un sujeto que está infectado con VHD. El método incluye una etapa de administración a un sujeto que se ha infectado con VHD de al menos una composición inmunoterapéutica como se describe anteriormente o en otra parte en este documento, donde la administración de la composición al sujeto reduce la infección por VHD o al menos un síntoma provocado por infección por VHD en un sujeto. En un aspecto, el método incluye además administrar al sujeto uno o más agentes adicionales útiles para tratar o mejorar un síntoma de infección por VHD. Por ejemplo, dicho agente puede incluir, aunque sin limitación, un interferón. Los interferones incluyen, aunque sin limitación, interferón- $\alpha$ , incluyendo, aunque sin limitación, interferón- $\alpha$ 2a pegilado. En un aspecto, el interferón es un interferón- $\lambda$ .
- En un aspecto de esta divulgación, el sujeto está infectado de forma crónica con virus de hepatitis B (VHB). En un aspecto, el método incluye además una etapa de administración al sujeto de un compuesto antivírico para tratar la infección por VHB. Dicho compuesto antivírico puede incluir, aunque sin limitación: tenofovir, lamivudina, adefovir, telbivudina, entecavir y combinaciones de los mismos.
- Otra divulgación más se refiere a un método para provocar una respuesta inmunitaria específica de antígeno, mediada por células contra un antígeno de VHD, que comprende administrar a un sujeto al menos una composición inmunoterapéutica como se describe anteriormente o en otra parte en este documento.
- Otro aspecto de la divulgación se refiere a un método para prevenir la infección por VHD en un sujeto, que comprende administrar a un sujeto que no se ha infectado con VHD, al menos una composición inmunoterapéutica como se describe anteriormente o en otra parte en este documento. En un aspecto de esta realización, el sujeto está infectado de forma crónica con virus de hepatitis B (VHB). En un aspecto, el método incluye además administrar al sujeto un compuesto antivírico para tratar la infección por VHD.
- Otro aspecto más de la divulgación se refiere a un método para inmunizar una población de individuos contra VHD, que comprende administrar a la población de individuos al menos una composición inmunoterapéutica como se

describe anteriormente o en otra parte en este documento. En un aspecto de esta divulgación, la población de individuos está infectada de forma crónica con VHB.

5 Otra realización de la invención se refiere a una composición inmunoterapéutica como se describe anteriormente o en otra parte en este documento, para su uso para tratar infección por VHD.

Otra realización más de la invención se refiere a una composición inmunoterapéutica como se describe anteriormente o en otra parte en este documento, para su uso para prevenir infección por VHD en un sujeto. En un aspecto, el sujeto está infectado de forma crónica con VHB.

10 Otra realización de la invención se refiere al uso de al menos una composición inmunoterapéutica como se describe anteriormente o en otra parte en este documento en la preparación de un medicamento para tratar infección por VHD.

15 Otra realización más de la invención se refiere al uso de al menos una composición inmunoterapéutica como se describe anteriormente o en otra parte en este documento en la preparación de un medicamento para prevenir infección VHD.

#### Breve descripción de los dibujos de la invención

20 La figura 1 es una alineación de secuencias que muestra las partes del AgHD usadas en la construcción representada por la SEQ ID NO: 16 alineada, para ilustrar la homología entre genotipos usados en esta proteína de fusión (la secuencia del "genotipo1" en la línea 1 es las posiciones 1-140 de la SEQ ID NO: 16; la secuencia del "genotipo2" en la línea 2 es las posiciones 141-280 de la SEQ ID NO: 16; la secuencia del "genotipo3" en la línea 3 es las posiciones 281-420 de la SEQ ID NO: 16).

25 La figura 2 es una imagen digitalizada que muestra la expresión del agente inmunoterapéutico basado en levadura conocido como VHD1 (que expresa la SEQ ID NO: 30) y VHD2 (que expresa la SEQ ID NO: 33), cultivado en medio U2 y UL2, y comparado con un conjunto de patrones de NS3-His.

30 La figura 3 es una imagen digitalizada que muestra la expresión del agente inmunoterapéutico basado en levadura conocido como VHD1 (que expresa la SEQ ID NO: 30) y VHD2 (que expresa la SEQ ID NO: 33), cultivado en medio U2 y UL2, y comparado con un segundo conjunto de patrones de NS3-His.

35 La figura 4 es una imagen digitalizada que muestra la expresión del agente inmunoterapéutico basado en levadura conocido como VHD3 (que expresa la SEQ ID NO: 36) cultivado en medio U2 y UL2.

La figura 5A es un gráfico que muestra un ELISpot de interferón-γ (IFNy) de ratones C57BL/6 vacunados con las 40 composiciones inmunoterapéuticas de VHD basadas en levadura VHD1 y VHD3 usando el péptido VHD-P2 (OVAX = levadura de control que expresa antígeno irrelevante).

La figura 5B es un gráfico que muestra los mismos resultados de ELISpot que en la figura 5A, con el fondo del medio sustraído.

45 La figura 6A es un gráfico que muestra un ELISpot de interleucina-2 (IL-2) de ratones C57BL/6 vacunados con la composición inmunoterapéutica de VHD basada en levadura VHD-1 usando el péptido VHD-P1 (OVAX = levadura de control que expresa antígeno irrelevante).

La figura 6B es un gráfico que muestra los mismos resultados de ELISpot que en la figura 6A, con el fondo del medio sustraído.

#### 45 Descripción detallada de la invención

Esta invención se refiere en líneas generales a composiciones y métodos para prevenir y/o tratar la infección por virus de hepatitis delta (VHD). La invención incluye una composición inmunoterapéutica basada en levadura (también mencionada como inmunoterapia de VHD basada en levadura) que comprende un vehículo de levadura y uno o más antígenos de VHD que se han diseñado para provocar una respuesta inmunitaria profiláctica y/o terapéutica contra infección por VHD en un sujeto, y el uso de dichas composiciones para prevenir y/o tratar la infección por VHD. La invención también incluye las moléculas de ácido nucleico recombinante usadas en las composiciones basadas en levadura de la invención, así como las proteínas codificadas por las mismas, para sus uso en cualquier composición inmunoterapéutica y/o cualquier protocolo terapéutico o profiláctico para VHD, 55 incluyendo cualquier protocolo terapéutico o profiláctico que combine las composiciones basadas en levadura específicas de VHD de la invención con una cualquiera o más composiciones terapéuticas o profilácticas diferentes, agentes, fármacos, compuestos y/o protocolos para infección por VHD y/o coinfecciones relacionadas.

60 Las composiciones inmunoterapéuticas basadas en levadura se administran como agentes biológicos o composiciones farmacéuticamente aceptables. Por consiguiente, en lugar de usar levadura como sistema de producción de antígeno seguido por purificación del antígeno de la levadura, el vehículo de levadura completo como se describe en este documento debe ser adecuado para, y formularse para, administración a un paciente. Esto es contrario al uso de levadura para producir proteínas recombinantes para vacunas de subunidad, donde las proteínas, una vez expresadas, se liberan posteriormente de la levadura por alteración y se purifican de la levadura de modo que la vacuna final combinada con un adyuvante no contenga ADN de levadura detectable y contenga no más de un 1-5 % de proteína de levadura. Las composiciones inmunoterapéuticas basadas en levadura contra VHD de la

invención, por otro lado, contienen ADN de levadura fácilmente detectable y contienen sustancialmente más de un 5 % de proteína de levadura (es decir más de un 5 % de la proteína total en la vacuna es la que pertenece a o a la que ha contribuido la levadura); en general, los agentes inmunoterapéuticos basados en levadura de la invención contienen más un 70 %, más de un 80 % o en general más de un 90 % de proteína de levadura.

5 Las composiciones inmunoterapéuticas basadas en levadura se administran a un paciente para inmunizar al paciente con fines terapéuticos y/o profilácticos. En una realización de la invención, las composiciones basadas en levadura se formulan para administración en un excipiente farmacéuticamente aceptable o formulación. La composición debe formularse, en un aspecto, para que sea adecuada para su administración a un sujeto humano  
10 (por ejemplo, las condiciones de fabricación deben ser adecuadas para su uso en seres humanos y debe usarse cualquier excipiente o formulación para acabar la composición y/o preparar la dosis del agente inmunoterapéutico para su administración que es adecuada para uso en seres humanos). En un aspecto de la invención, las composiciones inmunoterapéuticas basadas en levadura se formulan para administración por inyección al paciente o sujeto, tal como por vía parenteral (por ejemplo, por inyección subcutánea, intraperitoneal, intramuscular o  
15 intradérmica, u otra vía parenteral adecuada).

En una realización, la levadura expresa el antígeno (por ejemplo, detectable por transferencia de Western) y el antígeno no se agrega en la levadura, el antígeno no forma cuerpos de inclusión en la levadura y/o no forma partículas de tipo virus (VLP) u otras partículas antigénicas grandes en la levadura. En una realización, el antígeno se produce como una proteína soluble en la levadura y/o no se secreta de la levadura o no se secreta sustancial o principalmente de la levadura. Los agentes inmunoterapéuticos basados en levadura deben fagocitarse fácilmente por las células dendríticas del sistema inmunitario, y la levadura y los antígenos deben procesarse fácilmente por dichas células dendríticas, para provocar una respuesta inmunitaria eficaz contra VHD.

25 Antígenos del virus de hepatitis D, construcciones y composiciones de la invención

Una realización de la presente invención se refiere a una composición inmunoterapéutica basada en levadura que puede usarse para prevenir y/o tratar una infección por VHD y/o para aliviar al menos un síntoma provocado por la infección por VHD. La composición comprende: (a) un vehículo de levadura; y (b) uno o más antígenos de VHD que comprenden una o más proteínas de VHD y/o uno o más dominios inmunogénicos de las mismas, como se describe en detalle en este documento. Junto con el vehículo de levadura, los antígenos de VHD se expresan muy típicamente como proteínas recombinantes por vehículo de levadura (por ejemplo, por una levadura intacta o esferoplasto de levadura, que opcionalmente puede procesarse además a un citoplasma de levadura, célula vacía de levadura o extracto de membrana de levadura o fracción de la misma), aunque es una realización de la invención que se carguen uno o más de dichos antígenos de VHD en un vehículo de levadura o formen complejos de otra manera con, se adhieran a, se mezclen con o se administren con un vehículo de levadura como se describe en el este documento para formar una composición de la presente invención. De acuerdo con la presente invención, una referencia a una proteína "heteróloga" o antígeno "heterólogo", incluyendo una proteína de fusión heteróloga, en relación a un vehículo de levadura de la invención, significa que la proteína o antígeno no es una proteína o antígeno que se expresa de forma natural por la levadura, aunque una proteína de fusión que incluye antígeno heterólogo o proteína heteróloga también puede incluir secuencias o proteínas de levadura o partes de las mismas que no se expresan de forma natural por la levadura (por ejemplo, una preprosecuencia de factor alta como se describe en este documento).

45 Un aspecto de la divulgación se refiere a antígenos de VHD útiles en una composición inmunoterapéutica y en un aspecto, en una composición inmunoterapéutica basada en levadura. Como se analiza anteriormente, existe únicamente una proteína conocida codificada por el genoma de VHD, y consiste en dos formas, un AgHD grande (L) de 27 kDa (AgHD-L o L-AgHD) (214 aminoácidos) y un AgHD pequeño (S) de 24 kDa (AgHD-S o S-AgHD) (195 aminoácidos). Las proteínas difieren en aproximadamente 19 aminoácidos en el extremo C del AgHD grande.

50 Aunque actualmente se sabe que hay al menos ocho genotipos distintos de VHD (Le Gal *et al.*, Emerg Infect Dis 2006; 12:1447-50), tres genotipos son los más prevalentes, conocidos como 1 (o I), 2 (o II) y 3 (o III). El genotipo o genotipos pueden determinarse en un individuo por métodos rutinarios (por ejemplo, análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) de productos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), secuenciación y/o tinción inmunohistoquímica). Los dominios altamente conservados entre los genotipos de VHD están localizados alrededor de los sitios de escisión autocatalítica del ARN genómico y antigenómico y el dominio de unión a ARN de AgHD (Chao *et al.*, Virology 1990; 178: 384-92; Wu *et al.*, Hepatology 1995; 22: 1656-60).

60 El genotipo 1 es actualmente el genotipo de VHD más dominante y se encuentra en todo el mundo, pero particularmente en Europa, Norteamérica, África y algunas regiones de Asia. Un ejemplo de un genoma de VHD de genotipo 1 está representado por el n.º de acceso de la base de datos AF104263 o GI:11022740, también representado en este documento por la SEQ ID NO: 1. La SEQ ID NO: 1 codifica un AgHD-L representado por la SEQ ID NO: 2 (también con el n.º de acceso AAG26087.1 o GI:11022742) y un AgHD-S representado por la SEQ ID NO: 3. El genotipo 2 se encuentra en Japón, Taiwán y Rusia. Un ejemplo de un genoma parcial de VHD de genotipo 2 está representado por el n.º de acceso de la base de datos AJ309880 o GI:15212076, también representado en este documento por la SEQ ID NO: 4. La SEQ ID NO: 4 codifica un AgHD-L representado por la SEQ ID NO: 5

- (también con el n.º de acceso CAC51366.1 o GI:15212077) y un AgHD-S representado por la SEQ ID NO: 6. El genotipo 3 se encuentra en Sudamérica (por ejemplo, Perú, Colombia, Venezuela). Un ejemplo de un genoma de VHD de genotipo 3 está representado por el n.º de acceso de la base de datos L22063.1 o GI:410182, también representado en este documento por la SEQ ID NO: 7. La SEQ ID NO: 7 codifica un AgHD-L representado por la SEQ ID NO: 8 (también con el n.º de acceso POC6M3.1 o GI:226737601) y un AgHD-S representado por la SEQ ID NO: 9. El genotipo 4 se encuentra en Japón y Taiwán, y los genotipos 5-8 se encuentran en África. Se han descritos diversas secuencias de AgHD para estos genotipos y pueden encontrarse en bases de datos públicas. Múltiples genotipos pueden infectar a un único paciente, aunque un genotipo típicamente domina.
- 5 10 La secuencia de ácido nucleico y de aminoácidos para muchos genomas de VHD y las proteínas AgHD (grande y pequeña) codificadas por los mismos son conocidas en la técnica para cada uno de los genotipos conocidos. Las secuencias descritas anteriormente son ejemplares (representativas). Se aprecia que pueden producirse variaciones pequeñas en la secuencia de aminoácidos entre diferentes aislados víricos de la misma proteína o dominio del mismo genotipo de VHD. Sin embargo, en antígeno AgHD tiene esencialmente la misma estructura global entre 15 diferentes cepas y genotipos, de modo que un experto en la materia puede determinar fácilmente a partir de una secuencia dada de un AgHD la secuencia correspondiente del AgHD de una cepa/aislado o genotipo de VHD diferente. Por lo tanto, usando las directrices proporcionadas en este documento y las referencias a las secuencias de VHD ejemplares, un experto en la materia podrá fácilmente producir una diversidad de proteínas basadas en VHD, incluyendo proteínas de fusión, de cualquier cepa (aislado) o genotipo de VHD, para su uso en las 20 composiciones y métodos de la presente invención y, por lo tanto, la invención no está limitada a las secuencias específicas divulgadas en este documento. Una referencia a una proteína de VHD o antígeno de VHD en cualquier parte de esta divulgación, o a cualquier dominio funcional, estructural o inmunogénico de la misma, por consiguiente, puede hacerse por referencia a una secuencia particular de una o más de las secuencias presentadas en esta 25 divulgación, o por referencia a la misma secuencia, similar o correspondiente de un aislado (cepa) de VHD diferente, incluyendo de un genotipo o subgenotipo diferente al aislado/cepa de referencia.
- Aunque la utilización de cualquier antígeno de VHD de longitud completa o de casi longitud completa (AgHD-L o AgHD-S) descrito en este documento está dentro del alcance de la invención, se describen antígenos de VHD adicionales, particularmente para optimizar o potenciar la utilidad de los antígenos de VHD como productos clínicos, 30 incluyendo en el contexto de una composición inmunoterapéutica basada en levadura. Los antígenos de VHD que son útiles en la presente invención se han diseñado para producir un producto inmunoterapéutico basado en levadura contra VHD que consigue uno o más de los siguientes objetivos: (1) inclusión de una cantidad maximizada de epítopos de linfocitos-T conocidos (MHC de clase I y MHC de clase II); (2) maximización o priorización de la inclusión de dominios inmunogénicos, y más particularmente epítopos de linfocitos-T (epítopos CD4+ y CD8+, y 35 epítopos dominantes y/o subdominantes), que son los más conservados entre los genotipos y/o subgenotipos de VHD, o que pueden modificarse fácilmente a una secuencia consenso o incluirse en dos o más formas para cubrir las diferencias de secuencia más importantes entre los genotipos diana; (3) minimización de la cantidad de uniones no naturales dentro de la secuencia del antígeno de VHD en el producto; (4) minimización o eliminación de las secuencias que pueden interferir con expresión de la proteína por la levadura (por ejemplo, dominios hidrófobos); y/o 40 (5) minimización o eliminación de secuencias que pueden ser esenciales para la función vírica (la secuencia de localización nuclear), por ejemplo, modificaciones para desactivar el virus. En una realización, los antígenos de VHD pueden diseñarse para que cumplan las directrices del Recombinant DNA Advisory Committee (RAC) del National Institutes of Health (NIH).
- 45 En un aspecto de la divulgación, un antígeno de VHD útil en la invención consiste en AgHD que está codificado por menos de aproximadamente: 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 94 %, 93 %, 92 %, 91 %, 90 %, 85 %, 80 %, 75 %, 70 %, o 66,67 % de un genoma de VHD, aunque pueden proporcionarse varias copias del mismo AgHD que cumple este parámetro, o dos o más AgHD diferentes que cumplen el parámetro, pero que proviene cada uno de un genotipo, subgenotipo o cepa/aislado de VHD diferente, en forma de una proteína de fusión en la presente 50 divulgación.
- 55 En un aspecto de la divulgación, un antígeno de VHD descrito en este documento consiste en AgHD que contiene una mutación suficiente para desactivar o eliminar la secuencia de localización nuclear (SLN; representada, por ejemplo, por la secuencia publicada de AGAPPAKRAR (SEQ ID NO: 27) o por EGAPPAKRAR que corresponde a las posiciones 66-75 de la SEQ ID NO: 2, o la secuencia correspondiente de un genotipo de VHD o cepa/aislado de VHD diferente). Dicha mutación puede consistir en una eliminación o sustitución de uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o los diez restos de aminoácido que comprenden la SLN. Los aminoácidos adicionales que flanquean la SLN también pueden eliminarse o sustituirse, aunque esto típicamente no es necesario, y es más preferible retener los restos de aminoácido de los epítopos de linfocitos-T naturales en el antígeno de VHD. La 60 eliminación de la SLN es útil por al menos dos razones. En primer lugar, se obvian las cuestiones respecto a la actividad biológica potencial del antígeno de VHD usado en la invención (el virus está inactivado) y en segundo lugar, los autores de la presente invención han descubierto que la eliminación de este sitio funcional mejora la expresión de la proteína o proteína de fusión resultante en levadura, mejorando al mismo tiempo la tasa de crecimiento y eliminando una morfología de agrupación anómala por la levadura adquirida cuando se expresa el 65 antígeno de VHD que contiene la secuencia SLN.

La tabla 1 muestra varios epítopos de linfocitos-T publicados de VHD (posiciones dadas con respecto a la proteína AgHD-L), uno cualquiera o más de los cuales puede usarse en un antígeno de VHD de acuerdo con la presente divulgación. En un aspecto de la divulgación, un antígeno de VHD incluye al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco o más de estos epítopos u otros epítopos de linfocitos-T.

5

Tabla 1

Epítopo	Identificador de secuencia	Posición de AgHD	Preferencia de HLA
<sup>1</sup> KLEDENPWL	SEQ ID NO: 19	43-51	Clase I A2
<sup>1</sup> KLEDLERDL	SEQ ID NO: 20	26-34	Clase I A2
<sup>2</sup> KLEDLERDLRKIKKKI	SEQ ID NO: 21	26-41	Clase II
<sup>2</sup> WLGNIKGILGKKDKDG	SEQ ID NO: 22	50-65	Clase II
<sup>2</sup> AGAPPAKRARTDQMEI	SEQ ID NO: 23	66-81	Clase II
<sup>2</sup> ARTDQMEIDSGPGKRP	SEQ ID NO: 24	74-89	Clase II
<sup>2</sup> KALENKRKQLAAGGKH	SEQ ID NO: 25	106-121	Clase II
<sup>2</sup> LSKEEEELKRLTEEDERRERRTAGPSVGGVN	SEQ ID NO: 26	122-153 (122-137, 130-145, y 138-153)	Clase II (3 epítopos solapantes)

<sup>1</sup>Huang *et al.*, 2004, J Gen Virol 85:3089-3098

<sup>2</sup>Nisini *et al.*, 1997, J. Virol. 71(3):2241-2251

De acuerdo con la presente invención, el uso general en este documento del término "antígeno" se refiere: a cualquier parte de una proteína (péptido, proteína parcial, proteína de longitud completa), donde la proteína es de origen natural o se ha derivado sintéticamente, a una composición celular (célula completa, lisado celular o células alteradas), a un organismo (organismo completo, lisado o células alteradas) o a un carbohidrato, u otra molécula o una parte de la misma. Un antígeno puede provocar una respuesta inmunitaria específica de antígeno (por ejemplo, una respuesta inmunitaria humoral y/o mediada por células) contra antígenos iguales o similares que encuentra un elemento del sistema inmunitario (por ejemplo, linfocitos-T, anticuerpos).

10

Un antígeno puede ser tan pequeño como un único epítopo, un único dominio inmunogénico o más grande, y puede incluir múltiples epítopos o dominios inmunogénicos. Por tanto, el tamaño de un antígeno puede ser tan pequeño como de aproximadamente 8-12 aminoácidos (es decir, un péptido) y tan grande como: una proteína de longitud completa, un multímero, una proteína de fusión, una proteína química, una célula completa, un microorganismo completo o cualquier parte de los mismos (por ejemplo, lisados de células completas o extractos de microorganismos). Además, los antígenos pueden incluir carbohidratos, que pueden cargarse en un vehículo de levadura o en una composición de la invención. Se apreciará que, en algunas realizaciones (por ejemplo, cuando el antígeno se expresa por el vehículo de levadura a partir de una molécula de ácido nucleico recombinante), el antígeno es una proteína, proteína de fusión, proteína química o fragmento de la misma, en lugar de una célula completa o microorganismo.

15

20

25

Cuando el antígeno tiene que expresarse en levadura, un antígeno es de un tamaño mínimo que puede expresarse de forma recombinante en levadura, y es típicamente de al menos o mayor de 25 aminoácidos de longitud, o de al menos o mayor de 26, al menos o mayor de 27, al menos o mayor de 28, al menos o mayor de 29, al menos o mayor de 30, al menos o mayor de 31, al menos o mayor de 32, al menos o mayor de 33, al menos o mayor de 34, al menos o mayor de 35, al menos o mayor de 36, al menos o mayor de 37, al menos o mayor de 38, al menos o mayor de 39, al menos o mayor de 40, al menos o mayor de 41, al menos o mayor de 42, al menos o mayor de 43, al menos o mayor de 44, al menos o mayor de 45, al menos o mayor de 46, al menos o mayor de 47, al menos o mayor de 48, al menos o mayor de 49, o de al menos o mayor de 50 aminoácidos de longitud, o es de al menos 25-50 aminoácidos de longitud, al menos 30-50 aminoácidos de longitud, o al menos 35-50 aminoácidos de longitud, o de al menos 40-50 aminoácidos, de longitud, o al menos 45-50 aminoácidos de longitud. Pueden expresarse proteínas más pequeñas, y pueden expresarse proteínas considerablemente más grandes (por ejemplo, cientos de aminoácidos de longitud o incluso unos pocos miles de aminoácidos de longitud). En un aspecto, puede expresarse una proteína de longitud completa, o un dominio estructural o funcional de la misma, o un dominio inmunogénico de

la misma, que carece de uno o más aminoácidos del extremo N y/o C (por ejemplo, que carece entre aproximadamente 1 y aproximadamente 20 aminoácidos del extremo N y/o C). Las proteínas de fusión y proteínas químéricas también son antígenos que pueden expresarse en la invención. Un "antígeno diana" es un antígeno que aborda específicamente una composición inmunoterapéutica de la invención (es decir, un antígeno contra el que se desea provocar una respuesta inmunitaria). Un "antígeno de VHD" es un antígeno derivado, diseñado o producido a partir de una o más proteínas de VHD de modo que aborda el antígeno también aborda el virus de la hepatitis D.

Cuando se hace referencia a la estimulación de una respuesta inmunitaria, el término "inmunógeno" es un subconjunto del término "antígeno" y, por lo tanto, en algunos casos, puede usarse indistintamente con el término "antígeno". Un inmunógeno, como se usa en este documento, describe un antígeno que provoca una respuesta inmunitaria humoral y/o mediada por células (es decir, es inmunogénica), de modo que la administración del inmunógeno a un individuo genera una respuesta inmunitaria específica de antígeno contra antígenos iguales o similares que encuentra el sistema inmunitario del individuo. En una realización, un inmunógeno provoca una respuesta inmunitaria mediada por células, incluyendo una respuesta de linfocitos-T CD4<sup>+</sup> (por ejemplo, TH1, TH2 y/o TH17) y/o una respuesta de linfocito T CD8<sup>+</sup> (por ejemplo una respuesta de CTL).

Un "dominio inmunogénico" de un antígeno dado puede ser cualquier parte, fragmento o epítopo de un antígeno (por ejemplo, un fragmento peptídico o subunidad o un epítopo de anticuerpo u otro epítopo conformacional) que contiene al menos un epítopo que actúa como inmunógeno cuando se administra a un animal. Por lo tanto, un dominio inmunogénico es más grande que un único aminoácido y es de al menos un tamaño suficiente para contener al menos un epítopo que pueda actuar como inmunógeno. Por ejemplo, una única proteína puede contener múltiples dominios inmunogénicos diferentes. Los dominios inmunogénicos no tienen que ser secuencias lineales dentro de una proteína, tal como en el caso de una respuesta inmunitaria humoral, donde se contemplan dominios conformacionales.

Un "dominio funcional" de una proteína dada es una parte o unidad funcional de la proteína que incluye estructura o secuencia que es directa o indirectamente responsable de al menos una función biológica o química asociada con, atribuida a o realizada por la proteína. Por ejemplo, un dominio funcional puede incluir un sitio activo para actividad enzimática, un sitio de unión a ligando, un sitio de unión a receptor, un sitio de unión para una molécula o resto tal como calcio, un sitio de fosforilación o un dominio de transactivación. Los ejemplos de dominios funcionales de VHD incluyen, aunque sin limitación, la secuencia de localización nuclear (SLN), dominio de unión a ARN y dominios implicados en el ensamblaje de viriones y la inhibición del ensamblaje de ARN.

Un "dominio estructural" de una proteína dada es una parte de la proteína o un elemento en la estructura global de la proteína que tiene una estructura identificable (por ejemplo, puede ser una estructura primaria o terciaria que pertenece a y es indicativa de varias proteínas dentro de una clase o familia de proteínas), es autoestabilizante y/o puede plegarse independientemente del resto de la proteína. Un dominio estructural está frecuentemente asociado con o tiene características prominentes en la función biológica de la proteína a la que pertenece.

Un epítopo se define en este documento como un único sitio inmunogénico dentro de un antígeno dado que es suficiente para provocar una respuesta inmunitaria cuando se proporciona al sistema inmunitario en el contexto de señales coestimuladoras apropiadas y/o células activadas del sistema inmunitario. En otras palabras, un epítopo es la parte de un antígeno que se reconoce realmente por componentes del sistema inmunitario, y también puede mencionarse como determinante antigenético. Los expertos en la materia reconocerán que los epítopos de linfocitos-T son de tamaño y composición diferentes de los epítopos de linfocitos-B o anticuerpos, y que los epítopos presentados a través de la ruta de MHC de clase I difieren en tamaño y atributos estructurales de los epítopos presentados a través de la ruta de MHC de clase II. Por ejemplo, los epítopos de linfocitos-T presentados por moléculas MHC de clase I típicamente son de una longitud entre 8 y 11 aminoácidos, mientras que los epítopos presentados por moléculas MHC de clase II están menos restringidos en la longitud y pueden ser de 8 aminoácidos hasta 25 aminoácidos o más largos. Además, los epítopos de linfocitos-T tienen características estructurales predichas que dependen de las moléculas MHC específicas unidas por el epítopo. Algunos epítopos de linfocitos-T se han identificado en cepas de VHD y se identifican en la tabla 1. Los epítopos pueden ser epítopos de secuencia lineal o epítopos conformacionales (regiones de unión conservadas). La mayoría de los anticuerpos reconocen epítopos conformacionales.

En cualquiera de los antígenos de VHD descritos en este documento, incluyendo cualquiera de las proteínas de fusión, pueden aplicarse las siguientes realizaciones adicionales. En primer lugar, la secuencia de expresión del extremo N y la marca del extremo C incluidas en algunas de las construcciones de antígeno son opcionales y, si se usan, pueden seleccionarse de varias secuencias diferentes descritas en otra parte en este documento para conferir resistencia a la degradación por el proteasoma y/o para estabilizar o mejorar la expresión, estabilidad y/o permitir la identificación y/o purificación de la proteína. Como alternativa, se omiten una o ambas secuencias de extremo N y C conjuntamente. Además, se conocen en la técnica muchos promotores diferentes adecuados para su uso en levadura y están abarcados para su uso para expresar antígenos de VHD de acuerdo con la presente invención. Los promotores adecuados incluyen, aunque sin limitación, *CUP1* y *TEF2*. Además, pueden introducirse secuencias conectoras intermedias cortas (por ejemplo, péptidos de 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos o más grandes) entre partes de la proteína de fusión por una diversidad de razones, incluyendo la introducción de sitios de enzimas de restricción para

facilitar la clonación y la futura manipulación de las construcciones. Finalmente, como se analiza en detalle en otra parte en este documento, las secuencias descritas en este documento son ejemplares y pueden modificarse como se describe en detalle en otra parte en este documento para sustituir, añadir o eliminar secuencias para acomodar preferencias para genotipo de VHD, la cepa o aislado de VHD, o secuencias consenso y la inclusión de epítopos de linfocitos-T preferidos, incluyendo epítopos de linfocitos-T dominantes y/o subdominantes. A continuación se proporciona una descripción de varios antígenos de VHD ejemplares diferentes útiles en la divulgación.

En un aspecto de la divulgación, el antígeno o antígenos de VHD para su uso en una composición o método de la divulgación es una proteína o proteína de fusión que comprende antígenos de VHD, donde los antígenos de VHD comprenden o consisten en todo de al menos una proteína AgHD-L o AgHD-S, y/o al menos un dominio inmunogénico de los mismos. En un aspecto, la proteína AgHD-L o AgHD-S es de longitud completa o de casi longitud completa. De acuerdo con cualquier aspecto de la presente divulgación, una referencia a una proteína "de longitud completa" (o un dominio funcional de longitud completa o dominio inmunológico de longitud completa) incluye la secuencia de longitud completa de aminoácidos de la proteína o dominio funcional o dominio inmunológico, como se describe en este documento o se sabe de otro modo o se describe en una secuencia disponible al público. Una proteína o dominio que es "casi de longitud completa", que también es un tipo homólogo de una proteína, difiere de una proteína de longitud completa o dominio, por la adición o eliminación u omisión de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos del extremo N y/o C de dicha proteína de longitud completa o dominio de longitud completa. Una referencia general a una proteína o dominio puede incluir proteínas de longitud completa y de casi longitud completa, así como otros homólogos de la misma.

Las secuencias de VHD usadas para diseñar estas construcciones y las otras descritas y/o exemplificadas en este documento se basan en aislados o cepas de un genotipo de VHD particular. Sin embargo, es un aspecto de la divulgación añadir a o sustituir en cualquier parte de un antígeno de VHD descrito en este documento que se base en o derive de un genotipo particular, subgenotipo o cepa/aislado, una secuencia correspondiente, o incluso una única o pequeña sustitución, inserción o eliminación de aminoácido, que se produce en una secuencia correspondiente, de cualquier otro u otros tipos de genotipos, subgenotipos o cepas de VHD. En una realización, un antígeno de VHD puede producirse sustituyendo una o más secuencias completas de un antígeno de VHD descrito en este documento con la secuencia o secuencias correspondientes de uno o más diferentes genotipos, subgenotipos o cepas/aislados de VHD. Añadir o sustituir una secuencia de un genotipo o subgenotipo de VHD por otro, por ejemplo, permite la personalización de la composición inmunoterapéutica para un individuo o población de individuos particular (por ejemplo, una población de individuos dentro de un país dado o región de un país, para abordar el genotipo o genotipos de VHD que es más prevalente en ese país o región del país). Asimismo, también es un aspecto de la divulgación usar todo o una parte de una secuencia consenso derivada, determinada o publicada para, una cepa, genotipo o subtipo de VHD dado para hacer cambios en la secuencia de un antígeno de VHD dado para que se corresponda más estrechamente o exactamente a la secuencia consenso. De acuerdo con la presente divulgación y como se entiende en líneas generales en la técnica, una "secuencia consenso" es típicamente una secuencia basada en el nucleótido o aminoácido más común en una posición particular de una secuencia dada después de alinear múltiples secuencias.

Como un ejemplo particular de los tipos mencionados anteriormente de modificaciones, un antígeno de VHD puede modificarse para cambiar un epítopo de linfocitos-T en una secuencia dada de un aislado para que se corresponda más estrechamente o exactamente con un epítopo de linfocitos-T de un aislado diferente, o para que corresponda más estrechamente o exactamente con una secuencia consenso para el epítopo de linfocitos-T. De hecho, de acuerdo con la invención, pueden diseñarse antígenos de VHD que incorporan secuencias consenso de una diversidad de genotipos y/o subtipos de VHD, o mezclas de secuencias de diferencias genotipos y/o subtipos de VHD. Las alineaciones de AgHD de VHD entre las secuencias ejemplares de cada uno de los genotipos conocidos principales pueden generarse fácilmente usando un programa informático disponible al público, que informará de la generación de secuencias consenso, por ejemplo. Los ejemplos de dichas modificaciones se ilustran y exemplifican en este documento.

Un aspecto ejemplar de la divulgación se refiere a un antígeno de VHD que tiene la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 10, que es un AgHD-L de VHD de genotipo 1 truncado (menos de la longitud completa). Este antígeno incluye la secuencia KLEDLERDL o la SEQ ID NO: 20 (posiciones 5-13 de la SEQ ID NO: 10) que es un epítopo de linfocitos-T de MHC de clase I; y la secuencia KLEDENPWL o la SEQ ID NO: 19 (posiciones 22-30) que es otro epítopo de linfocitos-T de MHC de clase I (véase la tabla 1 anterior). Las posiciones 22-140 de la SEQ ID NO: 10 son regiones ricas en epítopos de unión a MHC de clase II (véase la tabla 2). Este antígeno puede producirse usando la secuencia correspondiente de cualquier genotipo, subgenotipo o cepa de VHD (es decir, se pueden usar las mismas posiciones de aminoácido del AgHD-L de una cepa de VHD diferente en el lugar de las seleccionadas para la SEQ ID NO: 10). Para su uso en la producción de una composición inmunoterapéutica basada en levadura, se genomanipula la levadura (por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae*) para que exprese el antígeno de VHD bajo el control de un promotor adecuado. La construcción y la producción de productos inmunoterapéuticos basados en levadura se describen en más detalle a continuación.

Como se analiza en líneas generales anteriormente y se describe adicionalmente en más detalle a continuación, el antígeno representado por la SEQ ID NO: 10, y cualquier otro antígeno de VHD descrito en este documento, también

puede anexarse al extremo N para añadir una secuencia que confiera resistencia a degradación en el proteasoma y/o estabilice la expresión de la proteína, tal como la siguiente proteína: MADEAP (SEQ ID NO: 11). Las secuencias del extremo N adecuadas adicionales se analizan a continuación. Opcionalmente, este antígeno y cualquier antígeno de VHD descrito en este documento puede modificarse para incluir una secuencia del extremo C que pueda ayudar con la estabilización, identificación y/o aislamiento de la proteína, tal como una secuencia de hexahistidina, que es útil para identificar una proteína. A modo de ejemplo, una proteína de fusión que comprende la secuencia del extremo N de la SEQ ID NO: 11 y una hexahistidina del extremo C se representa por la SEQ ID NO: 12, donde las posiciones 1-6 de la SEQ ID NO: 12 corresponden a la SEQ ID NO: 11, las posiciones 7-146 de la SEQ ID NO: 12 corresponden a la SEQ ID NO: 10 y las posiciones 147-152 de la SEQ ID NO: 12 es una marca de hexahistidina.

El antígeno de la SEQ ID NO: 10, que puede sustituirse con la secuencia correspondiente de un genotipo, subgenotipo o cepa de VHD diferente, también puede anexarse al extremo N para añadir una preprosecuencia de factor alfa para estabilizar la expresión (representada en este documento por la SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 14, ambas cuales son preprosecuencias de factor alfa ejemplares) y de nuevo puede anexarse opcionalmente al extremo C para añadir una secuencia de hexahistidina, si se desea. Una de dichas proteínas de fusión está representada en esta ocasión por la SEQ ID NO: 15, que puede sustituirse con la secuencia correspondiente de una cepa de VHD diferente (que incorpora la SEQ ID NO: 10 y la SEQ ID NO: 13, así como una marca de hexahistidina). Las posiciones 1-89 de la SEQ ID NO: 15 corresponden a la SEQ ID NO: 13, las posiciones 90-229 de la SEQ ID NO: 15 corresponden a la SEQ ID NO: 10 y las posiciones 230-235 de la SEQ ID NO: 15 es una marca de hexahistidina.

Otro antígeno de VHD útil en la divulgación está representado por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16. En este antígeno, se proporciona una copia de un AgHD truncado (seleccionado para maximizar los epítopos de linfocitos-T) de una cepa de cada uno de los tres genotipos diferentes conocidos como genotipos 1, 2 y 3, como una única proteína de fusión para producir una construcción más universal. Este antígeno puede producirse usando la secuencia correspondiente de cualquier genotipo o genotipos o cepa o cepas de VHD y, además, puede usarse cualquier parte del AgHD para crear dicha fusión (es decir, las partes de AgHD usadas en la SEQ ID NO: 16 son ejemplares, pero podrían usarse partes más pequeñas o partes más grandes, de hasta la longitud completo de AgHD). En esta construcción, una parte de un AgHD de una cepa de VHD de genotipo 1 ("genotipo1" a continuación) corresponde a las posiciones 1-140 de la SEQ ID NO: 16; una parte de un AgHD de una cepa de genotipo 2 ("genotipo2" a continuación) corresponde a las posiciones 141-280 de la SEQ ID NO: 16; y una parte de un AgHD de una cepa de genotipo 3 ("genotipo3" a continuación) corresponde a las posiciones 281-420 de la SEQ ID NO: 16.

Otra construcción similar que puede producirse que está relacionada con la secuencia representada por la SEQ ID NO: 16 es una fusión de tres o más proteínas AgHD-L de longitud completa, donde cada una de las proteínas AgHD-L es de un genotipo de VHD diferente (por ejemplo, genotipos 1, 2 y 3, o diferentes combinaciones de genotipo), excepto que, en comparación con las secuencias de longitud completa, cada una de las proteínas AgHD-L se ha modificado para inactivar la región SLN, como se describe anteriormente (por ejemplo, por sustitución y/o eliminación de restos dentro de este sitio). En un ejemplo de dicha construcción, una secuencia de AgHD-L de genotipo 1 de longitud completa representada por la SEQ ID NO: 2 (o una secuencia correspondiente de otra cepa de VHD) con una eliminación de las posiciones 66-75 (la SLN) está ligada a una secuencia de AgHD-L de genotipo 2 de longitud completa representada por la SEQ ID NO: 5 (o una secuencia correspondiente de otra cepa de VHD) con una eliminación de las posiciones 66-75 (la SLN) que está ligada a una secuencia de AgHD-L de genotipo 3 de longitud completa representada por la SEQ ID NO: 8 (o una secuencia correspondiente de otra cepa de VHD) con una eliminación de las posiciones 66-75 (la SLN). Estas secuencias también pueden fusionarse juntas en un orden diferente, o pueden añadirse genotipos o subgenotipos de VHD diferentes o adicionales a la fusión, para producirse una composición inmunoterapéutica "universal". Además, Pueden modificarse diversos restos de cualquiera de las secuencias de genotipo individuales (por ejemplo, por sustitución de aminoácidos) para que correspondan más estrechamente a una secuencia consenso para un genotipo dado, y/o pueden modificarse diversos restos (por ejemplo, por sustitución de aminoácido) para que corresponda más estrechamente a epítopos de linfocitos-T consenso conocidos que se han asociado con respuestas inmunitarias contra VHD.

La figura 1 muestra una alineación de las partes del AgHD usado en la construcción de la SEQ ID NO: 16, para ilustrar la homología entre genotipos usados en esta proteína de fusión de la SEQ ID NO: 16. Esta alineación también ilustra que es directo identificar la secuencia correspondiente entre diferentes genotipos, subgenotipo o cepas/aislados de VHD, ya que cada una de las secuencias en la SEQ ID NO: 16 es una parte truncada de un AgHD-L de VHD de longitud completa.

Como con los antígenos de VHD analizados en otra parte en este documento, los extremos N y/o C de la SEQ ID NO: 16 o una proteína de fusión similar pueden anexarse para incluir diversas secuencias (por ejemplo, la SEQ ID NO: 11, 13 o 14). Por ejemplo, usando un péptido del extremo N de la SEQ ID NO: 11 y una secuencia de hexahistidina del extremo C junto con la SEQ ID NO: 16, se produce la proteína de fusión representada por la SEQ ID NO: 17. Las posiciones 1-6 de la SEQ ID NO: 17 corresponden a la SEQ ID NO: 11; las posiciones 7-426 de la SEQ ID NO: 17 corresponden a la SEQ ID NO: 16 y las posiciones 427-432 de la SEQ ID NO: 17 corresponden a una marca de hexahistidina. Usando la secuencia del extremo N de la SEQ ID NO: 13 junto con la SEQ ID NO: 16 y

anexando al extremo C como anteriormente, se produce la proteína de fusión representada por la SEQ ID NO: 18, donde las posiciones 1-89 de la SEQ ID NO: 18 corresponden a la SEQ ID NO: 13, las posiciones 90-509 de la SEQ ID NO: 18 corresponden a la SEQ ID NO: 16 y las posiciones 510-515 de la SEQ ID NO: 18 corresponden a una marca de hexahistidina.

- 5 Se describen antígenos de VHD adicionales, incluyendo proteínas de fusión y composiciones que comprenden antígenos de VHD en el ejemplo 1. En una construcción, se genomanipuló la levadura (por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae*) para que expresara un antígeno de VHD bajo el control del promotor inducible por cobre, *CUP1* (un promotor opcional puede incluir, aunque sin limitación, el promotor *TEF2*). Este antígeno de VHD comprende una única copia de un AgHD-L de VHD de genotipo 1. El antígeno se construyó usando una única copia del AgHD representado en este documento como la SEQ ID NO: 2 como el molde estructural, aunque podría usarse una secuencia correspondiente de cualquier otra cepa/aislado de VHD, o cualquier otro genotipo o subgenotipo de VHD, en lugar del incluido en esta construcción. En esta construcción, el antígeno de VHD representado por la SEQ ID NO: 2 se modificó para eliminar la secuencia de localización nuclear de 10 restos de aminoácido (es decir, EGAPPAKRAR o las posiciones 66-75 de la SEQ ID NO: 2) para potenciar el perfil de seguridad potencial de la construcción resultante y del agente inmunoterapéutico basado en levadura que expresa este antígeno, y para potenciar potencialmente la expresión de esta construcción en levadura. Este aislado de VHD (SEQ ID NO: 2) contiene varios epítopes de linfocitos-T que se prevé que provoquen una respuesta inmunitaria contra VHD. La proteína resultante no contenía dominios transmembranarios conocidos y estaba libre de elementos extremadamente hidrófobos y, por tanto, no se consideró que modificaciones adicionales para justificar la hidrofobicidad fueran un factor importante en el diseño de este antígeno de VHD. La secuencia de aminoácidos del antígeno resultante está representada en esta ocasión por la SEQ ID NO: 28, que puede sustituirse con la secuencia correspondiente de una cepa, genotipo o subgenotipo de VHD diferente. Una secuencia del extremo N correspondiente a la SEQ ID NO: 11 y una secuencia del extremo C de una marca de hexahistidina se añadieron a la SEQ ID NO: 28 para mejorar la expresión del antígeno en levadura (secuencia del extremo N) y para facilitar la identificación del antígeno (secuencia del extremo C). Se insertó un conector de dos aminoácidos (Thr-Ser) que introduce un sitio de la enzima de restricción *SpeI* entre la SEQ ID NO: 11 y la SEQ ID NO: 28 para facilitar la clonación de la construcción. La proteína de fusión resultante tiene la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 30, donde las posiciones 1-6 de la SEQ ID NO: 30 son el péptido del extremo N de la SEQ ID NO: 11; las posiciones 7-8 de la SEQ ID NO: 30 son el conector de dos aminoácidos; las posiciones 9-212 de la SEQ ID NO: 30 son el antígeno de VHD de la SEQ ID NO: 28; y las posiciones 213-218 de la SEQ ID NO: 30 son la marca de hexahistidina. La SEQ ID NO: 30 está codificada por una secuencia de ácido nucleico representada en este documento por la SEQ ID No. 29, que está optimizada para su expresión en levadura.
- 35 En una segunda construcción basada en el AgHD de VHD de la SEQ ID NO: 2 y descrita en el ejemplo 1, la secuencia SLN se retuvo, para evaluar el antígeno resultante con respecto a la biología de la levadura y la expresión del antígeno por la levadura. La secuencia de aminoácidos del antígeno resultante está representada en esta ocasión por la SEQ ID NO: 31, que puede sustituirse con la secuencia correspondiente de una cepa, genotipo o subgenotipo de VHD diferente. Una secuencia del extremo N correspondiente a la SEQ ID NO: 11 y una secuencia del extremo C de una marca de hexahistidina se añadieron a la SEQ ID NO: 31 para mejorar la expresión del antígeno en levadura (secuencia del extremo N) y para facilitar la identificación del antígeno (secuencia del extremo C). Se insertó un conector de dos aminoácidos (Thr-Ser) entre la SEQ ID NO: 11 y la SEQ ID NO: 31 para facilitar la clonación de la construcción. La proteína de fusión resultante tiene la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 33, donde las posiciones 1-6 de la SEQ ID NO: 33 son el péptido del extremo N de la SEQ ID NO: 11; las posiciones 7-8 de la SEQ ID NO: 33 son el conector de dos aminoácidos; las posiciones 9-222 de la SEQ ID NO: 33 son el antígeno de VHD de la SEQ ID NO: 31; y las posiciones 223-228 de la SEQ ID NO: 33 son la marca de hexahistidina. La SEQ ID NO: 33 está codificada por una secuencia de ácido nucleico representada en este documento por la SEQ ID No. 32, que está optimizada para su expresión en levadura.
- 40 En una tercera construcción descrita en el ejemplo 1, se genomanipuló la levadura (por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae*) para que expresara un antígeno de VHD bajo el control del promotor inducible por cobre, *CUP1*. Se considera que este antígeno es un agente inmunoterapéutico o vacuna más "universal", y es una única proteína de fusión que comprende AgHD-L modificado de dos genotipos de VHD diferentes, en este caso los genotipos 1 y 2. Este genotipo de VHD se construyó usando una única copia del AgHD representado en este documento como la SEQ ID NO: 2 (genotipo 1) como un molde estructural, y una única copia del AgHD representado en este documento como la SEQ ID NO: 5 (genotipo 2) como un segundo molde estructural. Podría usarse una secuencia correspondiente de cualquier otra cepa/aislado de VHD, o cualquier otro genotipo o subgenotipo de VHD, en lugar de una o las dos secuencias incluidas en esta construcción, y pueden hacerse fusiones similares usando un tercer, cuarto, quinto o adicional genotipo, subgenotipo o cepa. En esta proteína de fusión, el antígeno de VHD representado por la SEQ ID NO: 2 se modificó para eliminar la secuencia de localización nuclear de 10 restos (es decir, EGAPPAKRAR, o las posiciones 66-75 de la SEQ ID NO: 2) para potenciar el perfil de seguridad potencial de la construcción resultante y del agente inmunoterapéutico basado en levadura que expresa este antígeno. Asimismo, el antígeno de VHD representado por la SEQ ID NO: 5 se modificó para eliminar la secuencia de localización nuclear de 10 restos (EGAPPAKRAR, o las posiciones 66-75 de la SEQ ID NO: 5), también para potenciar el perfil de seguridad de la construcción resultante y del agente inmunoterapéutico basado en levadura que expresa este antígeno. Esta proteína de fusión contiene varios epítopes de linfocitos-T en cada una de las secuencias de los
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

moldes de aislado de VHD (SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 5) que se prevé que provoquen una respuesta inmunitaria contra VHD. La secuencia de aminoácidos del antígeno resultante está representada en esta ocasión por la SEQ ID NO: 34, que puede sustituirse con la secuencia correspondiente de una o más cepas, genotipos o subgenotipos de VHD diferentes. En la SEQ ID NO: 34, la secuencia del antígeno de VHD del genotipo 1 está representada por las

5 posiciones 1-204 de la SEQ ID NO: 34 y la secuencia del antígeno de VHD del genotipo 2 está representada por las posiciones 205-408 de la SEQ ID NO: 34.

Una secuencia del extremo N correspondiente a la SEQ ID NO: 11 y una secuencia del extremo C de una marca de hexahistidina se añadieron a la SEQ ID NO: 34 para mejorar la expresión del antígeno en levadura (secuencia del extremo N) y para facilitar la identificación del antígeno (secuencia del extremo C). Se insertó un conector de dos aminoácidos (Thr-Ser) entre la SEQ ID NO: 11 y la SEQ ID NO: 34 para facilitar la clonación de la construcción. La proteína de fusión resultante tiene la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 36, donde las posiciones 1-6 de la SEQ ID NO: 36 son el péptido del extremo N de la SEQ ID NO: 11; las posiciones 7-8 de la SEQ ID NO: 36 son el conector de dos aminoácidos; las posiciones 9-212 de la SEQ ID NO: 36 son el antígeno de VHD

10 del genotipo 1 la SEQ ID NO: 34; las posiciones 213-416 de la SEQ ID NO: 36 son el antígeno del genotipo 2 de la SEQ ID NO: 34, y las posiciones 417-422 de la SEQ ID NO: 36 son la marca de hexahistidina. La SEQ ID NO: 36

15 está codificada por una secuencia de ácido nucleico representada en este documento por la SEQ ID No. 35, que

está optimizada para su expresión en levadura.

20 Una divulgación también incluye homólogos de cualquiera de los antígenos de VHD descritos anteriormente y proteínas de fusión, así como el uso de homólogos, variantes o mutantes de las proteínas de VHD individuales o partes de las mismas (incluyendo cualquier dominio funcional y/o inmunogénico) que son parte de dichas proteínas de fusión. En un aspecto, un antígeno de VHD útil en la presente divulgación (incluyendo cualquiera de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12,

25 SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34 o SEQ ID NO: 36) comprende al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de la secuencia lineal de un antígeno de VHD de longitud completa (AgHD-L o AgHD-S) o de un antígeno de VHD que se ha modificado para eliminar o sustituir entre 1 y 10 aminoácidos del dominio SLN, o de una parte de la proteína AgHD-L o AgHD-S que comprende al menos un dominio inmunogénico

30 de AgHD-L o AgHD-S. En un aspecto, el antígeno de VHD (incluyendo cualquiera de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34 o SEQ ID NO: 36) es al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %,

35 98 % o 99 % idéntico a un antígeno de VHD de longitud completa (AgHD-L o AgHD-S) o a un antígeno de VHD que se ha modificado para eliminar o sustituir entre 1 y 10 aminoácidos del dominio SLN, o a una parte de la proteína AgHD-L o AgHD-S que comprende al menos un dominio inmunogénico de AgHD-L o AgHD-S. La adición de una secuencia de expresión del extremo N y la marca del extremo C es opcional, y pueden seleccionarse de varias secuencias diferentes descritas en otra parte en este documento para mejorar la expresión, estabilidad y/o permitir la identificación y/o purificación de la proteína, o una o las dos secuencias del extremo N o C se omiten conjuntamente.

40 Además, se conocen en la técnica muchos promotores diferentes adecuados para su uso en levadura. Además, pueden introducirse secuencias conectoras intermedias cortas (por ejemplo, péptidos de 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos o más grandes) entre las partes de una proteína de fusión por una diversidad de razones, incluyendo la introducción de sitios de enzimas de restricción para facilitar la clonación y la futura manipulación de las construcciones.

45 En algunos aspectos de la divulgación, pueden hacerse inserciones, eliminaciones y/o sustituciones de aminoácidos para uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más aminoácidos de una proteína de VHD de tipo silvestre o de referencia o dominio inmunogénico de la misma, con la condición de que la proteína de VHD resultante, cuando se use como antígeno en una composición inmunoterapéutica de levadura contra VHD de la divulgación, provoque una respuesta inmunitaria contra la proteína de VHD diana o de tipo silvestre o de referencia, 50 que puede incluir una respuesta inmunitaria potenciada, una respuesta inmunitaria disminuida o una respuesta inmunitaria sustancialmente similar. Por ejemplo, la divulgación incluye el uso de antígenos agonistas de VHD, que pueden incluir uno o más epítopos de linfocitos-T que se han mutado para potenciar la respuesta de linfocitos-T contra el agonista de VHD, tal como mejorando la avidez o afinidad del epítopo por la molécula MHC o por el receptor de linfocitos-T que reconoce el epítopo en el contexto de la presentación de MHC. Los agonistas de proteína de VHD, por lo tanto, pueden mejorar la potencia o eficacia de una respuesta de linfocitos-T contra proteínas de VHD nativas que infectan un hospedador.

60 Las moléculas de ácido nucleico recombinantes y las proteínas codificadas por las mismas, incluyendo cualquier antígeno de VHD descrito en este documento, como un aspecto de la divulgación, pueden usarse en composiciones de inmunoterapia basada en levadura, o en otros aspectos, para cualquier otro fin adecuado para uno o más antígenos de VHD, incluyendo en un ensayo *in vitro*, para la producción de anticuerpos o en otra composición de inmunoterapia, incluyendo otra vacuna que no esté basada en la inmunoterapia basada en levadura descrita en este documento (por ejemplo, una vacuna de vector vírico, una vacuna de células dendríticas o como un componente de una fusión o unión a otro resto inmunoterapéutico). La expresión de las proteínas por levadura es una realización preferida, aunque pueden usarse otros sistemas de expresión para producir las proteínas para aplicaciones diferentes a una composición de inmunoterapia basada en levadura.

- Composiciones de inmunoterapia basada en levadura.* En diversas realizaciones de la invención, la invención incluye el uso de al menos una "composición inmunoterapéutica basada en levadura" (que es una expresión que puede usarse indistintamente con "producto de inmunoterapia basado en levadura", "composición de inmunoterapia basada en levadura", "composición basada en levadura", "agente inmunoterapéutico basado en levadura", "vacuna basada en levadura" o derivados de estas expresiones). Una "composición inmunoterapéutica" es una composición que provoca una respuesta inmunitaria suficiente para conseguir al menos un beneficio terapéutico en un sujeto. Como se usa en este documento, la composición inmunoterapéutica basada en levadura se refiere a una composición que incluye un componente de vehículo de levadura y que provoca una respuesta inmunitaria suficiente para conseguir al menos un beneficio terapéutico en un sujeto. Más particularmente, una composición inmunoterapéutica basada en levadura es una composición que incluye un componente de vehículo de levadura y puede provocar e inducir una respuesta inmunitaria, tal como una respuesta inmunitaria celular incluyendo, sin limitación, una respuesta inmunitaria celular mediada por linfocitos-T. En un aspecto, una composición inmunoterapéutica basada en levadura útil en la invención puede inducir una respuesta inmunitaria mediada por linfocitos-T CD8+ y/o CD4+ y, en un aspecto, una respuesta inmunitaria mediada por linfocitos-T CD8+ y CD4+. Opcionalmente, una composición inmunoterapéutica basada en levadura puede provocar una respuesta inmunitaria humoral. Una composición inmunoterapéutica basada en levadura útil en la presente invención puede provocar, por ejemplo, una respuesta inmunitaria en un individuo de modo que el individuo esté protegido de infección por VHD y/o se trate para infección por VHD o para los síntomas resultantes de infección por VHD.
- Las composiciones de inmunoterapia basada en levadura de la invención pueden ser "profilácticas" o "terapéuticas". Cuando se proporcionan de forma profiláctica, las composiciones de la presente invención se proporcionan por anticipado a la detección u observación de cualquier identificador o síntoma de infección por VHD. Dicha composición podría administrarse al nacimiento, en la infancia temprana o adultos, y puede ser útil en una realización, para inmunizar poblaciones de individuos en los que hay riesgo de infección por VHD, o en los que hay riesgo de infección por VHB. La administración profiláctica de las composiciones de inmunoterapia sirve para prevenir la posterior infección por VHD, para resolver una infección más rápidamente o más completamente si sobreviene posteriormente infección por VHD y/o para mejorar los síntomas de infección por VHD si posteriormente sobreviene la infección. Cuando se proporcionan terapéuticamente, las composiciones de inmunoterapia se proporcionan en o después de la aparición de la infección por VHD, con el objetivo de mejorar al menos un síntoma de la infección y, preferiblemente, con el objetivo de eliminar la infección, proporcionando una remisión de larga duración de la infección, y/o proporcionando inmunidad a largo plazo contra posteriores infecciones o reactivaciones del virus.
- Típicamente, una composición de inmunoterapia basada en levadura incluye un vehículo de levadura y al menos un antígeno o dominio inmunogénico del mismo expresado, adherido a o mezclado con el vehículo de levadura, donde el antígeno es heterólogo a la levadura, y donde el antígeno comprende uno o más antígenos de VHD. En algunas realizaciones, el antígeno de VHD se proporciona como una proteína de fusión. Se han descrito anteriormente varias proteínas de fusión de VHD adecuadas para su uso en las composiciones y métodos de la invención. En un aspecto de la invención, la proteína de fusión puede incluir dos o más antígenos, tales como una repetición del mismo antígeno o dos o más AgHD donde cada antígeno es de un genotipo, subgenotipo o cepa diferente. En un aspecto, la proteína de fusión puede incluir dos o más dominios inmunogénicos de uno o más antígenos, o dos o más epitopos de uno o más antígenos.
- En cualquiera de las composiciones de inmunoterapia basada en levadura usadas en la presente invención, se incluyen en la invención los siguientes aspectos relacionados con el vehículo de levadura. De acuerdo con la presente invención, un vehículo de levadura es cualquier célula de levadura (por ejemplo, una célula completa o intacta) o un derivado de la misma (véase a continuación) que puede usarse junto con uno o más antígenos, dominios inmunogénicos de los mismos o epitopos de los mismos en una composición terapéutica de la invención, o en un aspecto, el vehículo de levadura puede usarse en solitario o como un adyuvante. El vehículo de levadura, por lo tanto, puede incluir, aunque sin limitación, un microorganismo de levadura vivo, intacto (completo) (es decir, una célula de levadura que tiene todos sus componentes incluyendo una pared celular), un microorganismo de levadura inactivado (muerto) o intacto inactivado (completo), o derivados de levadura intacta (completa) incluyendo: esferoplasto de levadura (es decir, una célula de levadura que carece de una pared celular), un citoplasma de levadura (es decir, una célula de levadura que carece de una pared celular y el núcleo), una célula vacía de levadura (es decir, una célula de levadura que carece de una pared celular, el núcleo y el citoplasma), un extracto de membrana de levadura subcelular o fracción del mismo (también mencionado como partícula de membrana de levadura y previamente como una partícula de levadura subcelular), cualquier otra partícula de levadura o una preparación de pared celular de levadura.
- Los esferoplastos de levadura típicamente se producen por digestión enzimática de la pared celular de la levadura. Dicho método se describe, por ejemplo, en Franzusoff *et al.*, 1991, Meth. Enzymol. 194, 662-674.

Los citoplastos de levadura se producen típicamente por enucleación de células de levadura. Dicho método se describe, por ejemplo, en Coon, 1978, Natl. Cancer Inst. Monogr. 48, 45-55.

Las células vacías de levadura se producen típicamente resellando una célula permeabilizada o lisada y puede contener, pero no necesariamente, al menos algunos de los orgánulos de esa célula. Dicho método se describe, por ejemplo, en Franzusoff *et al.*, 1983, J. Biol. Chem. 258, 3608-3614 y Bussey *et al.*, 1979, Biochim. Biophys. Acta 553, 185-196.

- 5 Una partícula de membrana de levadura (extracto de membrana de levadura subcelular o fracción del mismo) se refiere a una membrana de levadura que carece de un núcleo o citoplasma natural. La partícula puede ser de cualquier tamaño, incluyendo tamaños que varían desde el tamaño de una membrana de levadura natural a micropartículas producidas por sonicación u otros métodos de alteración de membrana conocidos para los expertos  
10 en la materia, seguido por resellado. Un método para producir extractos de membrana de levadura subcelular se describe, por ejemplo, en Franzusoff *et al.*, 1991, Meth. Enzymol. 194, 662-674. También se pueden usar fracciones de partículas de membrana de levadura que contienen partes de membrana de levadura y, cuando el antígeno u otra proteína se expresa de forma recombinante por la levadura antes de la preparación de las partículas de membrana  
15 de levadura, el antígeno u otra proteína de interés. Los antígenos u otras proteínas de interés pueden transportarse dentro de la membrana, sobre cualquier superficie de la membrana o combinaciones de las mismas (es decir, la proteína puede estar tanto dentro como fuera de la membrana y/o abarcando la membrana de la partícula de membrana de levadura). En una realización, una partícula de membrana de levadura es una partícula de membrana  
20 de levadura recombinante que puede ser una membrana de levadura intacta, alterada o interrumpida y resellada que incluye al menos un antígeno deseado u otra proteína de interés sobre la superficie de la membrana o al menos incluida parcialmente dentro de la membrana.

Un ejemplo de una preparación de pared celular de levadura es una preparación de paredes celulares de levadura aisladas que transportan un antígeno sobre su superficie o al menos parcialmente incluido dentro de la pared celular de modo que la preparación de pared celular de levadura, cuando se administra a un animal, estimula una respuesta inmunitaria deseada contra una diana de enfermedad.  
25

Puede usarse cualquier cepa de levadura para producir un vehículo de levadura de la presente invención. Las levaduras son microorganismos unicelulares que pertenecen a una de tres clases: ascomicetos, basidiomicetos y hongos imperfectos. Una consideración para la selección de un tipo de levadura para su uso en un modulador  
30 inmunitario es la patogenicidad de la levadura. En una realización, la levadura es una cepa no patógena tal como *Saccharomyces cerevisiae*. La selección de una cepa de levadura no patógena minimiza cualquier efecto adverso al individuo al que se administra el vehículo de levadura. Sin embargo, puede usarse levadura patógena si puede anularse la patogenicidad de la levadura por cualquier medio conocido para un experto en la materia (por ejemplo, cepas mutantes). De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se usan cepas de levadura no patógenas.  
35

Los géneros de cepas de levadura que pueden usarse en la invención incluyen, aunque sin limitación, *Saccharomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Schizosaccharomyces* y *Yarrowia*. En un aspecto, los géneros de levadura se seleccionan de *Saccharomyces*, *Candida*, *Hansenula*, *Pichia* o *Schizosaccharomyces*, y en un aspecto, los géneros de levadura se seleccionan de *Saccharomyces*, *Hansenula*, y  
40 *Pichia*, y en un aspecto, se usa *Saccharomyces*. Las especies de cepas de levadura que pueden usarse en la invención incluyen, aunque sin limitación, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Candida albicans*, *Candida kefyr*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus neoformans*, *Hansenula anomala*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis*, *Pichia pastoris*, *Rhodotorula rubra*, *Schizosaccharomyces pombe*, y *Yarrowia lipolytica*. Debe apreciarse que varias de estas especies incluyen una diversidad de subespecies, tipos, subtipos, etc. que se pretende que estén incluidos dentro de las especies mencionadas anteriormente. En un aspecto, la especie de levadura usada en la invención incluye *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *H. polymorpha*, *P. pastoris* y *S. pombe*. *S. cerevisiae* es útil ya que es relativamente fácil de manipular y es "generalmente reconocida como segura" o "GRAS" para su uso como aditivos alimenticios (GRAS, norma 62FR18938 propuesta por la FDA, 17 de abril de 1997). Una realización de la presente invención es una cepa de levadura que puede replicar plásmidos a un número de copia particularmente alto, tal como una cepa cirº de *S. cerevisiae*. La cepa de *S. cerevisiae* es una de dichas cepas que puede mantener vectores de expresión que permite expresar uno o más antígenos diana y/o una o más proteínas de fusión de antígeno y/u otras proteínas a altos niveles. Además, puede usarse cualquier cepa de levadura mutante en la presente invención, incluyendo aquellas que muestran modificaciones postraduccionales reducidas de los antígenos diana expresados u otras proteínas, tales como mutaciones en las enzimas que amplían la glucosilación ligada a N.  
55

La composición de inmunoterapia basada en levadura incluye al menos un antígeno, dominio inmunogénico del mismo o epítopo del mismo. Los antígenos contemplados para su uso en esta divulgación incluyen cualquier antígeno de VHD o dominio inmunogénico del mismo, incluyendo mutantes, variantes o agonistas de proteínas de VHD o dominios de las mismas, contra las que se desea provocar una respuesta inmunitaria con el fin de inmunizar profiláctica o terapéuticamente un hospedador contra infección por VHD. Los antígenos de VHD que son útiles en diversos aspectos de la divulgación se han descrito en detalle anteriormente.  
60

Como se analiza anteriormente, las composiciones de la divulgación incluyen al menos un antígeno de VHD y/o al menos un dominio inmunogénico de al menos un antígeno de VHD para inmunizar a un sujeto. En algunas realizaciones, el antígeno es una proteína de fusión, varios ejemplos de la cual se han descrito anteriormente.  
65

Opcionalmente, las proteínas, incluyendo proteínas de fusión, que se usan como componente de la composición inmunoterapéutica basada en levadura de la divulgación se producen usando construcciones que son particularmente útiles para mejorar o potenciar la expresión, o la estabilidad de expresión, de antígenos recombinantes en levadura. Típicamente, la proteína o proteínas o péptido o péptidos antigenicos deseados se fusionan en su extremo amino a: (a) un péptido sintético específico que estabiliza la expresión de la proteína de fusión en el vehículo de levadura o evita la modificación postraduccional de la proteína de fusión expresada (dichos péptidos se describen en detalle, por ejemplo, en la publicación de patente de Estados Unidos n.º 2004-0156858 A1, publicada el 12 de agosto de 2004, (b) al menos una parte de una proteína de levadura endógena incluyendo, aunque sin limitación, factor alfa, donde cada compañero de fusión proporciona estabilidad mejorada de la expresión de la proteína en la levadura y/o evita la modificación postraduccional de las proteínas por las células de levadura (dichas proteínas también se describen en detalle, por ejemplo, en la publicación de patente de Estados Unidos n.º 2004-0156858 A1, *supra*); y/o (c) al menos una parte de una proteína de levadura que causa que la proteína de fusión se exprese sobre la superficie de la levadura (por ejemplo, una proteína Aga, descrita en más detalle en este documento). Además, la presente invención incluye opcionalmente el uso de péptidos que se fusionan al extremo C de la construcción que codifica el antígeno, particularmente para su uso en la selección e identificación de la proteína. Dichos péptidos incluyen, aunque sin limitación, cualquier péptido sintético o natural, tal como una marca peptídica (por ejemplo, 6X His) o cualquier otra marca epitópica corta. Los péptidos adheridos al extremo C de un antígeno de acuerdo con la invención pueden usarse con o sin la adición de los péptidos del extremo N analizados anteriormente.

En una realización, un péptido sintético útil en una proteína de fusión se une al extremo N del antígeno, consistiendo el péptido en al menos dos restos de aminoácido que son heterólogos para el antígeno, donde el péptido estabiliza la expresión de la proteína de fusión en el vehículo de levadura o evita la modificación postraduccional de la proteína de fusión expresada. El péptido sintético y la parte del extremo N del antígeno juntos forman una proteína de fusión que tiene las siguientes necesidades: (1) el resto de aminoácido en la posición uno de la proteína de fusión es una metionina (es decir, el primer aminoácido en el péptido sintético es una metionina); (2) el resto de aminoácido en la posición dos de la proteína de fusión no es una glicina o una prolina (es decir, el segundo aminoácido en el péptido sintético no es una glicina o una prolina); (3) ninguno de los restos de aminoácido en las posiciones 2-6 de la proteína de fusión es una metionina (es decir, los aminoácidos en las posiciones 2-6, sean parte del péptido sintético o de la proteína, si el péptido sintético es más corto de 6 aminoácidos, no incluyen una metionina); y (4) ninguno de los aminoácidos en las posiciones 2-6 de la proteína de fusión es una lisina o una arginina (es decir, los aminoácidos en las posiciones 2-6, sean parte del péptido sintético o de la proteína, si el péptido sintético es más corto de 5 aminoácidos, no incluyen una lisina o una arginina). El péptido sintético puede ser tan corto como de dos aminoácidos, pero en un aspecto, es de 2-6 aminoácidos (incluyendo 3, 4, 5 aminoácidos), y puede ser más largo de 6 aminoácidos, en números enteros, hasta aproximadamente 200 aminoácidos, 300 aminoácidos, 400 aminoácidos, 500 aminoácidos o más.

En una realización, una proteína de fusión comprende una secuencia de aminoácidos de M-X2-X3-X4-X5-X6, donde M es metionina; donde X2 es cualquier aminoácido excepto glicina, prolina, lisina o arginina; donde X3 es cualquier aminoácido excepto metionina, lisina o arginina; donde X4 es cualquier aminoácido excepto metionina, lisina o arginina; donde X5 es cualquier aminoácido excepto metionina, lisina o arginina; y donde X6 es cualquier aminoácido excepto metionina, lisina o arginina. En una realización, el resto X6 es una prolina. Una secuencia sintética exemplar que potencia la estabilidad de expresión de un antígeno en una célula de levadura y/o evita la modificación postraduccional de la proteína en la levadura incluye la secuencia M-A-D-E-A-P (SEQ ID NO: 11). Otra secuencia sintética exemplar con las mismas propiedades es M-V. Además de la estabilidad potenciada del producto de expresión, estos compañeros de fusión no parecen afectar de forma negativa a la respuesta inmunitaria contra el antígeno inmunizante de la construcción. Además, los péptidos de fusión sintéticos pueden diseñarse para proporcionar un epitopo que pueda reconocerse por un agente de selección, tal como un anticuerpo.

En una realización, el antígeno de VHD se une en extremo N a una proteína de levadura, tal como una preprosecuencia de factor alfa (también mencionada como la secuencia líder señal del factor alfa, cuya secuencia de aminoácidos se exemplifica en este documento por la SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 14. Otras secuencias para la preprosecuencia de factor alfa de levadura son conocidas en la técnica y están abarcadas para su uso en la presente invención.

En un aspecto de la invención, el vehículo de levadura se manipula de modo que el antígeno se exprese o se proporcione por suministro o translocación de un producto proteínico expresado, parcial o completamente, sobre la superficie del vehículo de levadura (expresión extracelular). Un método para conseguir este aspecto de la invención es usar un brazo espaciador para colocar una o más proteínas sobre la superficie del vehículo de levadura. Por ejemplo, se puede usar un brazo espaciador para crear una proteína de fusión del antígeno o antígenos u otra proteína de interés con una proteína que dirija el antígeno o antígenos u otra proteína de interés a la pared celular de levadura. Por ejemplo, una de dichas proteínas que puede usarse para dirigir otras proteínas es una proteína de levadura (por ejemplo, la proteína 2 de pared celular (cwp2), Aga2, Pir4 o la proteína Flo1) que posibilita que el antígeno o antígenos u otra proteína se dirija a la pared celular de levadura de modo que el antígeno u otra proteína esté ubicado sobre la superficie de la levadura. Pueden usarse proteínas diferentes de proteínas de levadura para el brazo espaciador; sin embargo, para cualquier proteína del brazo espaciador, es mucho más deseable que la

respuesta inmunogénica se dirija contra el antígeno diana en lugar de la proteína del brazo espaciador. Por tanto, si se usan otras proteínas para el brazo espaciador, entonces la proteína del brazo espaciador que se usa no debe generar una gran respuesta inmunitaria contra la propia proteína del brazo espaciador de modo que la respuesta inmunitaria contra el antígeno o antígenos diana se sobreponga. Un experto en la materia debe enfocarse a una respuesta inmunitaria pequeña contra la proteína del brazo espaciador respecto a la respuesta inmunitaria para el antígeno o antígenos diana. Los bazos espaciadores pueden construirse para que tengan sitios de escisión (por ejemplo, sitios de escisión por proteasa) que permitan que el antígeno se elimine fácilmente o se procese de la levadura, si se desea. Puede usarse cualquier método conocido de determinación de la magnitud de las respuestas inmunitarias (por ejemplo, producción de anticuerpos, ensayos líticos, etc.) y son fácilmente conocidos para los expertos en la materia.

Otro método para ubicar el antígeno o antígenos diana u otras proteínas a exponer sobre la superficie de la levadura es usar secuencias señal tales como glucosilfosfatidil inositol (GPI) para anclar la diana a la pared celular de levadura. Como alternativa, la ubicación puede conseguirse anexando secuencias señal que dirijan el antígeno o antígenos u otras proteínas de interés a la ruta de secreción mediante translocación al retículo endoplasmático (RE) de modo que el antígeno se une a una proteína que se une a la pared celular (por ejemplo, cwp).

En un aspecto, la proteína del brazo espaciador es una proteína de levadura. La proteína de levadura puede consistir entre aproximadamente dos y aproximadamente 800 aminoácidos de una proteína de levadura. En una realización, la proteína de levadura es de aproximadamente 10 a 700 aminoácidos. En otra realización, la proteína de levadura es de aproximadamente 40 a 600 aminoácidos. Otras realizaciones de la invención incluyen la proteína de levadura que es de al menos 250 aminoácidos, al menos 300 aminoácidos, al menos 350 aminoácidos, al menos 400 aminoácidos, al menos 450 aminoácidos, al menos 500 aminoácidos, al menos 550 aminoácidos, al menos 600 aminoácidos o al menos 650 aminoácidos. En una realización, la proteína de levadura es de al menos 450 aminoácidos de longitud. Otra consideración para optimizar la expresión en superficie del antígeno, si se desea, es si la combinación del antígeno y el brazo espaciador debe expresarse como monómero o como dímero o como trímero, o incluso más unidades conectadas juntas. Este uso de monómeros, dímeros, trímeros, etc. permite un espaciado o plegamiento apropiado del antígeno que modo que alguna parte, si no todo, el antígeno se presenta sobre la superficie del vehículo de levadura de una manera que lo hace más inmunogénico.

El uso de proteínas de levadura puede estabilizar la expresión de las proteínas de fusión en el vehículo de levadura, evita la modificación postraduccional de la proteína de fusión expresada y/o dirige la proteína de fusión a un compartimento particular en la levadura (por ejemplo, a expresarse sobre la superficie celular de la levadura). Para el suministro en la ruta de secreción de la levadura, las proteínas de levadura ejemplares para su uso incluyen, aunque sin limitación: Aga (incluyendo, aunque sin limitación, Aga1 y/o Aga2); SUC2 (invertasa de levadura); secuencia líder señal de factor alfa; CPY; CWp2p para su localización y retención en la pared celular; genes BUD para la localización en la gema celular de levadura durante la fase inicial de la formación de células hijas; Flo1p; Pir2p; y Pir4p.

Pueden usarse otras secuencias para dirigir, retener y/o estabilizar la proteína a otras partes del vehículo de levadura, por ejemplo, en el citosol o la mitocondria o el retículo endoplasmático o el núcleo. Los ejemplos de proteína de levadura que pueden usarse para cualquiera de las realizaciones anteriores incluyen, aunque sin limitación, TK, AF, SEC7; productos génicos de fosfoenolpiruvato carboxicinasa PCK1, fosfoglicerocinasa PGK y triosa fosfato isomerasa TPI para su expresión reprimible en glucosa y localización citosólica; las proteínas de choque térmico SSA1, SSA3, SSA4, SSC1, cuya expresión se induce y cuyas proteínas son más termoestables tras exposición de las células a tratamiento por calor; la proteína mitocondrial CYC1 para su importación a la mitocondria; ACT1.

Los métodos de producción de vehículos de levadura y expresión, combinación y/o asociación de vehículos de levadura con antígenos y/u otras proteínas y/o agentes de interés para producir composiciones de inmunoterapia basada en levadura están contemplados por la invención.

De acuerdo con la presente invención, la expresión "complejo de vehículo de levadura-antígeno" o "complejo de levadura-antígeno" se usa de forma genérica para describir cualquier asociación de un vehículo de levadura con un antígeno, y puede usarse de forma intercambiable con "composición de inmunoterapia basada en levadura" cuando dicha composición se usa para provocar una respuesta inmunitaria como se describe anteriormente. Dicha asociación incluye la expresión del antígeno por la levadura (una levadura recombinante), la introducción de un antígeno en una levadura, la adhesión física del antígeno a la levadura, y mezcla de la levadura y el antígeno juntos, tal como en un tampón u otra solución o formulación. Estos tipos de complejos se describen en detalle a continuación.

En una realización, una célula de levadura usada para preparar el vehículo de levadura se transfecta con una molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica una proteína (por ejemplo, el antígeno) de modo que la proteína se exprese por la célula de levadura. Dicha levadura también se menciona en este documento como levadura recombinante o un vehículo de levadura recombinante. La célula de levadura entonces puede cargarse en la célula dendrítica como una célula intacta, o la célula de levadura puede inactivarse, o puede derivatizarse tal como por

- formación de esferoplastos, citoplastos, células vacías o partículas subcelulares de levadura, cualquiera de las cuales va seguida por carga del derivado en la célula dendrítica. Los esferoplastos de levadura también pueden transfectarse directamente con una molécula de ácido nucleico recombinante (por ejemplo, el esferoplasto se produce a partir de una levadura completa y después se transfecta) para producir una esferoplasto recombinante que expresa un antígeno u otra proteína.
- En general, el vehículo de levadura y el antígeno o antígenos y/u otros agentes pueden asociarse por cualquier técnica descrita en este documento. En un aspecto, el vehículo de levadura se cargó de forma intracelular con el antígeno o antígenos y/o agente o agentes. En otro aspecto, el antígeno o antígenos y/o el agente o agentes se adhirieron covalente o no covalentemente al vehículo de levadura. En otro aspecto más, el vehículo de levadura y el antígeno o antígenos y/o el agente o agentes se asociaron por mezcla. En otro aspecto, y en una realización, el antígeno o antígenos y/o el agente o agentes se expresan de forma recombinante por el vehículo de levadura o por la célula de levadura o esferoplasto de levadura del que derivaba el vehículo de levadura.
- Varios antígenos y/u otras proteínas a producir por un vehículo de levadura de la presente invención es cualquiera de varios antígenos y/u otras proteínas que pueden producirse de forma razonable por un vehículo de levadura, y típicamente varía de al menos uno a al menos aproximadamente 6 o más, incluyendo de aproximadamente 2 a aproximadamente 6 antígenos heterólogos y/u otras proteínas.
- La expresión de un antígeno u otra proteína en un vehículo de levadura de la presente invención se consigue usando técnicas conocidas para los expertos en la materia. En resumen, una molécula de ácido nucleico que codifica al menos un antígeno deseado u otra proteína se inserta en un vector de expresión de tal manera que la molécula de ácido nucleico se une de forma funcional a una secuencia de control de la transcripción para que pueda logar la expresión constitutiva o regulada de la molécula de ácido nucleico cuando se transforma en una célula de levadura hospedadora. Las moléculas de ácido nucleico que codifican uno o más antígenos y/u otras proteínas pueden ser uno o más vectores de expresión unidos de forma funcional a una o más secuencias de control de la expresión. Las secuencias de control de la expresión particularmente importantes son aquellas que controlan el inicio de la transcripción, tal como el promotor y secuencias de activación en dirección 5'. Cualquier promotor de levadura adecuado puede usarse en la presente invención y los expertos en la materia conocen una diversidad de dichos promotores. Los promotores para la expresión en *Saccharomyces cerevisiae* incluyen, aunque sin limitación, promotores de genes que codifican las siguientes proteínas de levadura: alcohol deshidrogenasa I (ADH1) o II (ADH2), CUP1, fosfoglicerato cinasa (PGK), triosa fosfato isomerasa (TPI), factor de elongación traduccional EF-1 alfa (TEF2), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, (GAPDH; también mencionada como TDH3, para triosa fosfato deshidrogenasa), galactocinasa (GAL1), galactosa-1-fosfato uridil-transferasa (GAL7), UDP-galactosa epimerasa (GAL10), citocromo c1 (CYC1), proteína Sec7 (SEC7) y fosfatasa ácida (PGO5), incluyendo promotores híbridos tales como los promotores ADH2/GAPDH y CYC1/GAL10, e incluyendo el promotor ADH2/GAPDH, que se induce cuando las concentraciones de glucosa en la célula son bajas (por ejemplo, de aproximadamente un 0,1 a aproximadamente un 0,2 por ciento), así como el promotor de CUP1 y el promotor de TEF2. Asimismo, se conocen varias secuencias de activación en dirección 5' (UAS), también mencionadas como potenciadores. Las secuencias de activación en dirección 5' para la expresión en *Saccharomyces cerevisiae* incluyen, aunque sin limitación, las UAS de genes que codifican las siguientes proteínas: PCK1, TPI, TDH3, CYC1, ADH2, SUC2, GAL1, GAL7 y GAL10, así como otras UAS activadas por el producto génico GAL4, usándose la UAS ADH2 en un aspecto. Como la UAS de ADH2 se activa por el producto génico ADR1, puede ser preferible sobreexpresar el gen de ADR1 cuando un gen heterólogo se une de forma funcional a la UAS ADH2. Las secuencias de terminación de la transcripción para la expresión en *Saccharomyces cerevisiae* incluyen las secuencias de terminación de los genes de factor- $\alpha$ , GAPDH y CYC1.
- Las secuencias de control de la transcripción para expresar genes en levaduras metiltróficas incluyen las regiones de control de la transcripción de los genes que codifican la alcohol oxidasa y la formiato deshidrogenasa.
- La transfección de una molécula de ácido nucleico en una célula de levadura de acuerdo con la presente invención puede conseguirse por cualquier método por el que pueda introducirse una molécula de ácido nucleico en la célula e incluye, aunque sin limitación, difusión, transporte activo, sonicación en baño, electroporación, microinyección, lipofección, adsorción y fusión de protoplastos. Las moléculas de ácido nucleico transfectadas pueden integrarse en un cromosoma de levadura o mantenerse en vectores extracromosómicos usando técnicas conocidas para los expertos en la materia. Los ejemplos de vehículos de levadura que portan dichas moléculas de ácido nucleico se divulan en detalle en este documento. Como se analiza anteriormente, también pueden producirse citoplastos de levadura, células vacías de levadura y partículas de membrana de levadura o preparaciones de pared celular de forma recombinante transfectando microorganismos de levadura intactos o esferoplastos de levadura con moléculas de ácido nucleico deseadas, que producen el antígeno en los mismos, y después manipulan adicionalmente los microorganismos o esferoplastos usando técnicas conocidas para los expertos en la materia para producir citoplastos, células vacías o extracto de membrana de levadura subcelular o fracciones de los mismos que contienen antígenos deseados u otras proteínas.
- Las condiciones eficaces para la producción de vehículos de levadura recombinantes y la expresión del antígeno y/u otra proteína por el vehículo de levadura incluyen un medio eficaz en que puede cultivarse una cepa de levadura. Un

- medio eficaz es típicamente un medio acuoso que comprende fuentes asimilables de carbohidrato, nitrógeno y fosfato, así como sales, minerales, metales y otros nutrientes apropiados, tales como vitaminas y factores de crecimiento. El medio puede comprender nutrientes complejos o puede ser un medio mínimo definido. Las cepas de levadura de la presente invención pueden cultivarse en una diversidad de recipientes, incluyendo, aunque sin limitación, biorreactores, matraces de Erlenmeyer, tubos de ensayo, placas de microvaloración y placas de Petri. El cultivo se realiza a una temperatura, pH y contenido de oxígeno apropiados para la cepa de levadura. Dichas condiciones de cultivo pertenecen a la experiencia de los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Guthrie *et al.* (eds.), 1991, *Methods in Enzymology*, vol. 194, Academic Press, San Diego).
- En algunas realizaciones de la invención, las levaduras se cultivan en condiciones de pH neutro. Como se usa en este documento, el uso general de la expresión "pH neutro" se refiere a un intervalo de pH entre aproximadamente pH 5,5 y aproximadamente pH 8 y, en un aspecto, entre aproximadamente pH 6 y aproximadamente pH 8. Un experto en la materia apreciará que pueden producirse fluctuaciones mínimas (por ejemplo, décimas o centésimas) cuando se mide con un pehachímetro. Por tanto, el uso de pH neutro para cultivar células de levadura significa que las células de levadura se cultivan en pH neutro durante la mayoría del tiempo que están en cultivo. En una realización, las levaduras se cultivan en un medio mantenido a un nivel de pH de al menos 5,5 (es decir, no se permite que el pH del medio de cultivo descienda por debajo de pH 5,5). En otro aspecto, las levaduras se cultivan a un nivel de pH mantenido a aproximadamente 6, 6,5, 7, 7,5 u 8. El uso de un pH neutro en el cultivo de levaduras promueve varios efectos biológicos que son características deseables para usar la levadura como vehículos para inmunomodulación. Por ejemplo, el cultivo de la levadura en pH neutro permite un buen crecimiento de la levadura sin efecto negativo sobre el tiempo de generación celular (por ejemplo, ralentización del tiempo de duplicación). La levadura puede continuar creciendo hasta altas densidades sin perder su elasticidad de pared celular. El uso de un pH neutro permite la producción de levadura con paredes celulares elásticas y/o levaduras que son más sensibles a enzimas de digestión de la pared celular (por ejemplo, glucanasa) a todas las densidades de recolección. Este rasgo es deseable porque levaduras con paredes celulares flexibles pueden inducir respuestas inmunitarias diferentes o mejoradas en comparación con el crecimiento de levaduras en condiciones más ácidas, por ejemplo, promoviendo la secreción de citocinas por células presentadoras de antígeno que han fagocitado la levadura (por ejemplo, citocinas de tipo TH1 incluyendo, aunque sin limitación, IFN- $\gamma$ , interleucina-12 (IL-12), e IL-2., así como citocinas proinflamatorias como IL-6). Además, se produce mayor accesibilidad a los antígenos localizados en la pared celular por dichos métodos de cultivo. En otro aspecto, el uso de pH neutro para algunos antígenos permite liberar el antígeno unido por disulfuro por tratamiento con ditiotreitol (DTT) que no es posible cuando dicha levadura presentadora de antígeno se cultiva en medio a pH inferior (por ejemplo, pH 5).
- En una realización, el control de la cantidad de glucosilación de la levadura se usa para controlar la expresión de antígenos por la levadura, particularmente en la superficie. La cantidad de glucosilación de la levadura puede afectar a la inmunogenicidad y antigenicidad del antígeno expresado en la superficie, ya que los restos de azúcar tienden a ser voluminosos. Por tanto, la existencia de restos de azúcar sobre la superficie de levadura y su impacto sobre el espacio tridimensional alrededor del antígeno o antígenos diana debe considerarse en la modulación de la levadura de acuerdo con la invención. Puede usarse cualquier método para la reducir la cantidad de glucosilación de la levadura (o aumentarla, si se desea). Por ejemplo, podría usarse una cepa mutante de levadura que se ha seleccionado para que tenga baja glucosilación (por ejemplo, mutantes mnn1, och1 y mnn9), o podría eliminarse por mutación las secuencias aceptadoras de glucosilación en el antígeno diana. Como alternativa, se podría usar una levadura con patrones de glucosilación abreviados, por ejemplo, *Pichia*. También se puede tratar la levadura usando métodos para reducir o alterar la glucosilación.
- En una realización de la presente invención, como alternativa a la expresión de un antígeno u otra proteína de forma recombinante en el vehículo de levadura, se carga el vehículo de levadura de forma intracelular con la proteína o péptido, o con carbohidratos u otras moléculas que sirven como antígeno y/u son útiles como agentes inmunomoduladores o modificadores de la respuesta biológica de acuerdo con la invención. Posteriormente, el vehículo de levadura, que ahora contiene el antígeno y/u otras proteínas de forma intracelular, puede administrarse a un individuo o cargarse en un vehículo tal como una célula dendrítica. Los péptidos y proteínas pueden insertarse directamente en vehículos de levadura de la presente invención por técnica conocidas para los expertos en la materia, tales como por difusión, transporte activo, fusión de liposomas, electroporación, fagocitosis, ciclos de congelación-descongelación y sonicación en baño. Los vehículos de levadura que pueden cargarse directamente con péptidos, proteínas, carbohidratos u otras moléculas incluyen levaduras intactas, así como esferoplastos, células vacías o citoplasma, que pueden cargarse con antígenos y otros agentes después de la producción. Como alternativa, la levadura intacta puede cargarse con el antígeno y/u agente, y después pueden prepararse a partir de la misma esferoplastos, células vacías, citoplasma o partículas subcelulares. Cualquiera de varios agentes y/u otros agentes puede cargarse en un vehículo de levadura en esta realización, de al menos 1, 2, 3, 4 o cualquier número entero hasta cientos o miles de antígenos y/u otros agentes, tal como se proporcionaría por la carga de un microorganismo o partes del mismo, por ejemplo.
- En otra realización de la presente invención, un antígeno y/u otro agente se adhiere físicamente al vehículo de levadura. La adhesión física del antígeno y/u otro agente al vehículo de levadura puede conseguirse por cualquier método adecuado en la técnica, incluyendo métodos de asociación covalente y no covalente que incluyen, aunque sin limitación, reticulación química del antígeno y/u otro agente a la superficie exterior del vehículo de levadura o

unión biológica del antígeno y/u otro agente a la superficie exterior del vehículo de levadura, tal como usando un anticuerpo u otro compañero de unión. La reticulación química puede conseguirse, por ejemplo, por métodos que incluyen unión de glutaraldehído, marcaje de fotoafinidad, tratamiento con carbodiimidas, tratamiento con agentes químicos que pueden unir enlaces disulfuro y tratamiento con otros agentes químicos reticulantes convencionales en la técnica. Como alternativa, un agente químico puede ponerse en contacto con el vehículo de levadura que altera la caga de la bicapa lipídica de la membrana de levadura o la composición de la pared celular de modo que la superficie exterior de la levadura tiene mayor probabilidad de fusionarse o unirse a antígenos y/u otro agente que tenga características de carga particulares. También pueden incorporarse agentes de dirección tales como anticuerpos, péptidos de unión, receptores solubles y otros ligandos a un antígeno como una proteína de fusión o asociarse de otro modo con el antígeno para la unión del antígeno al vehículo de levadura.

Cuando el antígeno u otra proteína se expresa en o se adhiere físicamente a la superficie de la levadura, pueden seleccionarse cuidadosamente, en un aspecto, brazos espaciadores, para optimizar el antígeno u otra expresión de la proteína o contenido sobre la superficie. El tamaño del brazo o brazos espaciadores puede afectar a la cantidad de antígeno u otra proteína que se expone para la unión en la superficie de la levadura. Por tanto, dependiendo del antígeno o antígenos u otra proteína o proteínas que se estén usando, un experto en la materia seleccionará un brazo espaciador que logre el espaciado apropiado para el antígeno u otra proteína en la superficie de levadura. En una realización, el brazo espaciador es una proteína de levadura de al menos 450 aminoácidos. Los brazos espaciadores se han analizado en detalle anteriormente.

En otra realización más, el vehículo de levadura y el antígeno u otra proteína se asocian entre sí por un mecanismo de unión no específico o no covalente más pasivo, tal como por mezcla suave del vehículo de levadura y el antígeno u otra proteína juntos en un tampón u otra formulación adecuada (por ejemplo, mezcla).

En una realización de la invención, el vehículo de levadura y el antígeno u otra proteína se cargan ambos de forma intracelular en un vehículo tal como una célula dendrítica o macrófago para formar la composición terapéutica o vacuna de la presente invención. Como alternativa, puede cargarse un antígeno u otra proteína en una célula dendrítica en ausencia del vehículo de levadura.

En una realización, la levadura intacta (con o sin expresión de antígenos heterólogos u otras proteínas) puede molerse o procesarse de una manera que produzca preparaciones de pared celular de levadura, partículas de membrana de levadura o fragmentos de levadura (es decir, no intactos) y los fragmentos de levadura pueden, en algunas realizaciones, proporcionarse o administrarse con otras composiciones que incluyen antígenos (por ejemplo, vacunas de ADN, vacunas de subunidad de proteína, patógenos muertos o inactivados) para potenciar las respuesta inmunitarias. Por ejemplo, puede usarse tratamiento enzimático, tratamiento químico o fuerza física (por ejemplo, corte mecánico o sonicación) para descomponer la levadura en partes que se usan como adyuvante.

En una realización de la invención, los vehículos de levadura útiles en la invención incluyen vehículos de levadura que se han eliminado o inactivado. La eliminación o inactivación de la levadura puede conseguirse por cualquiera de una diversidad de métodos adecuados conocidos en la técnica. Por ejemplo, la inactivación por calor de una levadura es una manera convencional de inactivar la levadura, y un experto en la materia puede controlar los cambios estructurales del antígeno diana, si se desea, por métodos convencionales conocidos en la técnica. Como alternativa, pueden usarse otros métodos de inactivación de la levadura, tales como métodos químicos, eléctricos, radiactivos o de UV. Véase, por ejemplo, la metodología analizada en libros de texto convencionales de cultivo de levadura tales como *Methods of Enzymology*, Vol. 194, Cold Spring Harbor Publishing (1990). Cualquiera de las estrategias de inactivación usadas debe tener en cuenta la estructura secundaria, terciaria o cuaternaria del antígeno diana y conservar dicha estructura para optimizar su inmunogenicidad.

Los vehículos de levadura pueden formularse en composiciones de inmunoterapia basada en levadura o productos de la presente invención, incluyendo preparaciones a administrar a un sujeto directamente o cargados en primer lugar en un vehículo tal como una célula dendrítica, usando varias técnicas conocidas para los expertos en la materia. Por ejemplo, los vehículos de levadura pueden secarse por liofilización. Las formulaciones que comprenden vehículos de levadura también pueden presentarse empaquetando la levadura en una torta o un comprimido, tal como se hace para la levadura usada en operaciones de panadería o cervecería. Además, los vehículos de levadura pueden mezclarse con un excipiente farmacéuticamente aceptable, tal como un tampón isotónico que se tolera por un hospedador o célula hospedadora. Los ejemplos de dichos excipientes incluyen agua, solución salina, solución de Ringer, solución de dextrosa, solución de Hank y otras soluciones salinas fisiológicamente equilibradas acuosas. Los vehículos no acuosos, tales como aceites fijos, aceite de sésamo, oleato de etilo o triglicéridos también pueden usarse. Otras formulaciones útiles incluyen suspensiones que contienen agentes potenciadores de la viscosidad, tales como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol, glicerol o dextrano. Los excipientes también pueden contener cantidades mínimas de aditivos, tales como sustancias que potencian la isotonicidad y la estabilidad química. Los ejemplos de tampones incluyen tampón fosfato, tampón bicarbonato y tampón Tris, mientras que los ejemplos de conservantes incluyen timerosal, m- u o-cresol, formalina y alcohol bencílico. Las formulaciones convencionales pueden ser soluciones inyectables líquidas o sólidas que pueden recogerse en un líquido adecuado como una suspensión o líquido para inyección. Por tanto, en una formulación que no es líquida, el excipiente puede comprender, por ejemplo, dextrosa, seroalbúmina humana y/o conservantes a los que puede añadirse agua o

solución salina antes de la administración.

En una realización de la presente invención, una composición puede incluir agentes adicionales, que también pueden mencionarse como compuestos modificadores de la respuesta biológica, o la capacidad para producir dichos agentes/modificadores. Por ejemplo, un vehículo de levadura puede transfectarse o cargarse con al menos un

5 antígeno y al menos un agente/compuesto modificador de la respuesta biológica, o una composición de la invención puede administrarse junto con al menos un agente/modificar de la respuesta biológica. Los modificadores de la respuesta biológica incluyen adyuvantes y otros compuestos que pueden modular las respuestas inmunitarias, que  
10 pueden mencionarse como compuestos inmunomoduladores, así como compuestos que modifican la actividad biológica de otro compuesto o agente, tal como un agente inmunoterapéutico basado en levadura, sin estar limitada dicha actividad biológica a los efectos del sistema inmunitario. Determinados compuestos inmunomoduladores  
15 pueden estimular una respuesta inmunitaria protectora mientras que otros pueden suprimir una respuesta inmunitaria dañina, y que un inmunomodulador sea útil en combinación con un agente inmunoterapéutico basado en levadura dado puede depender, al menos en parte, de la patología o afección a tratar o prevenir, y/o del individuo  
20 que se está tratando. Determinados modificadores de la respuesta biológica potencian preferentemente una respuesta inmunitaria mediada por células mientras que otros potencian preferentemente una respuesta inmunitaria humoral (es decir, pueden estimular una respuesta inmunitaria en que hay un nivel aumentado de inmunidad mediada por células en comparación con la inmunidad humoral, o viceversa). Determinados modificadores de la respuesta biológica tienen una o más propiedades en común con las propiedades biológicas de los agentes  
25 inmunoterapéuticos basados en levadura o potencian o complementan las propiedades biológicas de los agentes inmunoterapéuticos basados en levadura. Hay varias técnicas conocidas para los expertos en la materia para medir la estimulación o supresión de las respuestas inmunitarias, así como para diferenciar las respuestas inmunitarias mediadas por células de las respuestas inmunitarias humorales, y para diferenciar un tipo de respuesta mediada por células de otra (por ejemplo, una respuesta TH17 frente a una respuesta TH1).

25 Los agentes/modificadores de la respuesta biológica útiles en la invención pueden incluir, aunque sin limitación, citocinas, quimiocinas, hormonas, derivados lipídicos, péptidos, proteínas, polisacáridos, fármacos de molécula pequeña, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos (incluyendo, aunque sin limitación, anticuerpos anticitocina, anticuerpos antirreceptor de citocina, anticuerpos antiquimiocina), vitaminas, polinucleótidos, restos de unión a ácido nucleico, aptámeros y modulares del crecimiento. Algunos agentes adecuados incluyen, aunque sin limitación, IL-1 o agonistas de IL-1 o de IL-1R, anti-IL-1 u otros antagonistas de IL-1; IL-6 o agonistas de IL-6 o de IL-6R, anti-IL-6 u otros antagonistas de IL-6; IL-12 o agonistas de IL-12 o de IL-12R, anti-IL-12 u otros antagonistas de IL-12; IL-17 o agonistas de IL-17 o de IL-17R, anti-IL-17 u otros antagonistas de IL-17; IL-21 o agonistas de IL-21 o de IL-21R, anti-IL-21 u otros antagonistas de IL-21; IL-22 o agonistas de IL-22 o de IL-22R, anti-IL-22 u otros antagonistas de IL-22; IL-23 o agonistas de IL-23 o de IL-23R, anti-IL-23 u otros antagonistas de IL-23; IL-25 o agonistas de IL-25 o de IL-25R, anti-IL-25 u otros antagonistas de IL-25; IL-27 o agonistas de IL-27 o de IL-27R, anti-IL-27 u otros antagonistas de IL-27; interferón de tipo I (incluyendo IFN- $\alpha$ ) o agonistas o antagonistas de interferón de tipo I o un receptor del mismo; interferón de tipo II (incluyendo IFN- $\gamma$ ) o agonistas o antagonistas de interferón de tipo II o un receptor del mismo; anti-CD40, CD40L, anticuerpo anti-CTLA-4 (por ejemplo, para liberar linfocitos-T anárgicos); coestimuladores de linfocitos-T (por ejemplo, anti-CD137, anti-CD28, anti-CD40); alemtuzumab (por ejemplo CamPath®), denileukin diftitox (por ejemplo, ONTAK®); anti-CD4; anti-CD25; anti-PD-1, anti-PD-L1, anti-PD-L2; agente que bloquean FOXP3 (por ejemplo, para anular la actividad/eliminar células reguladoras T CD4+/CD25+); ligando de Flt3, imiquimod (Aldara™), factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF); factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), sargramostim (Leukine®); hormonas incluyendo, sin limitación, prolactina y hormona del crecimiento; agonistas del receptor de tipo Toll (TLR), incluyendo aunque sin limitación agonistas de TLR-2, agonistas de TLR-4, agonistas de TLR-7 y agonistas de TLR-9; antagonistas de TLR, incluyendo aunque sin limitación antagonistas de TLR-2, antagonistas de TLR-4, antagonistas de TLR-7 y antagonistas de TLR-9; agentes antiinflamatorios e inmunomoduladores, incluyendo aunque sin limitación, inhibidores de COX-2 (por ejemplo, Celecoxib, AINE), glucocorticoides, estatinas y talidomida y análogos de la misma incluyendo IMiD™ (que son análogos estructurales y funcionales de talidomida (por ejemplo, REVLIMID® (lenalidomida), ACTIMID® (pomalidomida)); agentes proinflamatorios, tales como componentes fúngicos o bacterianos o cualquier citocina o quimiocina proinflamatoria; vacunas inmunoterapéuticas incluyendo, aunque sin limitación, vacunas basadas en virus, vacunas basadas en bacteria o vacunas basadas en anticuerpo; y cualquier otro inmunomodulador, inmunopotenciador, agente  
45 antiinflamatorio y/o agente proinflamatorio. Se contempla cualquier combinación de dichos agentes por la invención, y cualquiera de dichos agentes combinado con o administrado en un protocolo con (por ejemplo, simultáneamente, secuencialmente en otros formatos con) un agente inmunoterapéutico basado en levadura es una composición abarcada por la invención. Dichos agentes son bien conocidos en la técnica. Estos agentes pueden usarse en solitario o en combinación con otros agentes descritos en este documento.

60 Los agentes pueden incluir agonistas o antagonistas de una proteína o péptido dado o dominio del mismo. Como se usa en este documento, un "agonista" es cualquier compuesto o agente, incluyendo sin limitación moléculas pequeñas, proteínas, péptidos, anticuerpos, agentes de unión a ácido nucleico, etc., que se une a un receptor o ligando y produce o activa una respuesta, que puede incluir agentes que imitan la acción de una sustancia de origen natural que se une al receptor o ligando. Un "antagonista" es cualquier compuesto o agente, incluyendo sin limitación moléculas pequeñas, proteínas, péptidos, anticuerpos, agentes de unión a ácido nucleico, etc., que bloquee o inhibe

o reduce la acción de un agonista.

Las composiciones de la invención pueden incluir además o pueden administrarse con (simultáneamente, secuencialmente o intermitentemente con) cualquier otro compuesto o composición que sea útil para prevenir o tratar una infección por VHD o cualquier compuesto que trate o mejore cualquier síntoma de infección por VHD. Dichos agentes incluyen, aunque sin limitación, fármacos de molécula pequeña contra AgHD, o interferones, tales como interferón- $\alpha$ 2a o interferón- $\alpha$ 2a pegilado (PEGASYS®). Además, las composiciones de la invención pueden usarse junto con otras composiciones inmunoterapéuticas, incluyendo inmunoterapia profiláctica y/o terapéutica. Aunque no se han aprobado composiciones de inmunoterapia en los Estados Unidos para el tratamiento de VHD, dichas composiciones pueden incluir vacunas de proteína o de subunidad de epítopo de VHD, vacunas de vector vírico de VHD, citocinas y/u otros agentes inmunomoduladores (por ejemplo, agonistas de TLR, fármacos inmunomoduladores).

La invención también incluye un kit que comprende cualquiera de las composiciones descritas en este documento, o cualquiera de los componentes individuales de las composiciones descritas en este documento.

#### Uso de composiciones

Las composiciones de la divulgación, que pueden incluir uno cualquiera o más (por ejemplo, combinaciones de dos, tres, cuatro, cinco o más) composiciones inmunoterapéuticas basadas en levadura descritas en este documento, antígenos de VHD incluyendo proteínas de VHD y proteínas de fusión, y/o moléculas de ácido nucleico recombinantes que codifican dichas proteínas de VHD o proteínas de fusión descritas anteriormente, y otras composiciones que comprenden dichas composiciones basadas en levadura, antígenos, proteínas, proteínas de fusión o moléculas recombinantes descritas en este documento, pueden usarse en una diversidad de métodos *in vivo* e *in vitro*, incluyendo, aunque sin limitación, tratar y/o prevenir una infección por VHD y sus secuelas, en ensayos de diagnóstico para VHD o para producir anticuerpos contra VHD.

La infección por VHD se detecta muy típicamente por medición de ARN de VHD, detección del antígeno de VHD (AgHD) y/o detección de anti-VHD (anticuerpos contra VHD). La detección de ARN de VHD puede realizarse, por ejemplo, por ensayos de hibridación de nucleótidos (que pueden incluir hibridación *in situ*) o reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR). La RT-PCR es el más sensible de estos ensayos, y detecta 10 genomas/ml. El AgHD o IgM o IgG de anti-VHD en suero típicamente se detectan por ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA) o radioinmunoensayo (RIA), y el AgHD también puede detectarse por inmunofluorescencia o tinción inmunohistoquímica de biopsias de hígado. Como la infección por VHB es esencial para la infección por VHD, la presencia del antígeno de superficie de VHB (AgHB) habitualmente precede a la detección de VHD.

La coinfección aguda con VHD (VHD/VHB) se caracteriza por elevados títulos de IgM anti-HBc (anticuerpos contra el antígeno central de VHB), que son anticuerpos que desaparecen en infección crónica por VHB. El AgHD también es un marcador temprano de infección aguda por VHD (tanto en el entorno de coinfección como en el entorno de superinfección). Los anticuerpos anti-HD son marcadores posteriores, pero pueden usarse para establecer el diagnóstico si ya no están presentes los marcadores tempranos, y son un indicador de progresión a infección crónica. En infección crónica por VHD, los AgHD forman complejos con los anticuerpos anti-HD a elevado título. En esta fase, es difícil detectar AgHD en el hígado, pero típicamente puede detectarse ARN de VHD en el suero, y el elevado título de anticuerpos anti-HD es el biomarcador principal usado para diagnosticar infección crónica por VHD.

El VHD se considera eliminado cuando tanto el ARN de VHD en el suero como el AgHD en el hígado quedan persistentemente indetectables (Pascarella *et al.*, *supra*), aunque únicamente cuando viene acompañado por o seguido por eliminación de AgHB (antígeno de superficie de VHB) se considera que la cura es definitiva. Se cree que el desarrollo de anticuerpos anti-HD protegerá contra reinfección con VHD, y la eliminación del virus se caracteriza típicamente por la normalización de los niveles de ALT, la reducción en la necroinflamación hepática y la detención de la progresión de la fibrosis hepática.

Un aspecto de la divulgación se refiere a un método para tratar la infección crónica por virus de hepatitis D (VHD) y/o para prevenir, mejorar o tratar al menos un síntoma de infección crónica por VHD, en un individuo o población de individuos. El método incluye la etapa de administrar a un individuo o una población de individuos que están infectados de forma crónica con VHD una o más composiciones inmunoterapéuticas de la invención. En un aspecto, la composición es una composición inmunoterapéutica que comprende uno o más antígenos de VHD como se describe en este documento, que puede incluir una o más composiciones inmunoterapéuticas basadas en levadura. En un aspecto, la composición incluye una proteína o proteína de fusión que comprende antígenos de VHD como se describe en este documento y/o una molécula de ácido nucleico recombinante que codifica dicha proteína o proteína de fusión. En un aspecto, el individuo o población de individuos se trata además con al menos otro compuesto terapéutico útil para el tratamiento de infección por VHD, tal como interferón de tipo I (por ejemplo IFN- $\alpha$ ).

En este aspecto de la divulgación, el sujeto a tratar, que tiene infección crónica por VHD, también estará infectado, por lo tanto, con virus de hepatitis B (VHB). Por consiguiente, un aspecto adicional de este método de la invención es tratar de forma simultánea o secuencial (antes o después) el sujeto para la infección por VHB. Se sabe que una

- diversidad de agentes son útiles para prevenir y/o tratar o mejorar la infección por VHB. Dichos agentes incluyen, aunque sin limitación, compuestos antivíricos, incluyendo, aunque sin limitación, análogos nucleotídicos inhibidores de transcriptasa inversa (nRTI). En un aspecto de la invención, los compuestos antivíricos adecuados incluyen, aunque sin limitación: tenofovir (VIREAD®), lamivudina (EPIVIR®), adefovir (HEPSERA®), telbivudina (TYZEKA®), entecavir (BARACLUDE®) y combinaciones de los mismos, y/o interferones, tales como interferón- $\alpha$ 2a o interferón- $\alpha$ 2a pegilado (PEGASYS®) o interferón- $\lambda$ . Para el tratamiento de VHB, estos agentes típicamente se administran durante largos períodos de tiempo (por ejemplo, diariamente o semanalmente durante hasta uno a cinco años o más).
- 10 Además, pueden combinarse otras composiciones para el tratamiento de VHB con las composiciones de la invención para tratar VHD, tales como diversas composiciones profilácticas y/o inmunoterapéuticas para VHB. Las vacunas profilácticas para VHB han estado disponibles en el mercado desde los primeros años de 1980, y son vacunas de virus de subunidad no infecciosas que proporcionan antígeno de superficie de virus de hepatitis B recombinante purificado (AgHB) y pueden administrarse empezando en el nacimiento. Actualmente no hay vacunas terapéuticas aprobadas para VHB.
- Otro aspecto de la divulgación se refiere a un método para inmunizar a un individuo o población de individuos contra VHD para prevenir la infección por VHD, prevenir la infección crónica por VHD y/o reducir la gravedad de la infección por VHD en el individuo o población de individuos. El método incluye la etapa de administrar a un individuo o población de individuos que no esté infectada con VHD (o se cree que no está infectada con VHD), una composición de la invención. En un aspecto, la composición es una composición inmunoterapéutica que comprende uno o más antígenos de VHD como se describe en este documento, incluyendo una o más composiciones inmunoterapéuticas basadas en levadura. En un aspecto, la composición incluye una proteína de fusión que comprende antígenos de VHD como se describe en este documento, o molécula de ácido nucleico recombinante que codifica dicha proteína de fusión.
- 25 En un aspecto de esta divulgación, el sujeto o población a inmunizar contra infección por VHD usando una composición de la invención ya está crónicamente infectado con VHB. En este aspecto de la divulgación, el sujeto que ya está infectado crónicamente con VHB puede estar recién diagnosticado, diagnosticado pero actualmente sin tratar para la infección por VHB independientemente del tiempo desde el diagnóstico de VHB o actualmente en tratamiento para infección crónica por VHB, y puede incluir sujetos que han estado en tratamiento para infección por VHB durante un largo periodo de tiempo (por ejemplo, años). Dichos sujetos también pueden incluir sujetos que se han tratado para VHB previamente y se cree que están curados de la infección por VHB actualmente. Una composición inmunoterapéutica contra VHD de la invención también puede usarse para inmunizar a individuos o poblaciones de individuos que pueden estar en mayor riesgo de quedar infectados con VHB y VHD independientemente del estado de infección de VHB (por ejemplo, estos individuos pueden estar inmunizados incluso si son VHB negativos, o si el estado de VHB del individuo es desconocido), por ejemplo, debido a la localización en un área del mundo donde el VHD es endémico o muy prevalente. Los individuos o poblaciones de individuos que están en mayor riesgo de exposición a infección por VHB en comparación con la población general (por ejemplo, debido a la localización, ocupación y/o prácticas de alto riesgo asociadas con transmisión de VHB) también pueden inmunizarse contra VHD (simultáneamente), particularmente si estos individuos están localizados en un área donde el VHD es endémico o prevalente.
- 30 Como se usa en este documento, la expresión "tratar" una infección por VHD, o cualquier permutación de la misma (por ejemplo, "tratado para infección por VHD", etc.) se refiere en líneas generales a aplicar o administrar una composición de la invención una vez se ha producido la infección (aguda o crónica), con el objetivo de reducir o eliminar el título vírico detectable (por ejemplo, reducción del ARN vírico), reducción en al menos un síntoma producido por la infección en el individuo, retardo o prevención de la aparición y/o gravedad de los síntomas y/o secuelas posteriores causadas por la infección, reducción del daño a órganos o sistemas fisiológicos (por ejemplo, cirrosis) resultantes de la infección (por ejemplo reducción de los niveles anómalos de ALT, reducción de la inflamación hepática, reducción de la fibrosis hepática), prevención y/o reducción en la frecuencia e incidencia de carcinoma hepatocelular (HCC), mejora en la función orgánica o sistémica que se vio afectada negativamente por la infección (normalización de los niveles en suero de ALT, mejora en la inflamación hepática, mejora en la fibrosis hepática), mejora de las respuesta inmunitarias contra la infección, mejora de las respuesta inmunitarias de memoria a largo plazo contra la infección, reactivación reducida del virus VHD, salud general mejorada del individuo o población de individuos, y/o supervivencia global mejorada del individuo o población de individuos. Todos estos parámetros son en comparación el estado del individuo o población de individuos en ausencia del uso de las composiciones inmunoterapéuticas contra VHD de la invención.
- 35 En un aspecto, un objetivo del tratamiento es eliminación vírica mantenida durante al menos 6 meses después de completarse el tratamiento. En un aspecto, un objetivo del tratamiento es la pérdida de ARN de VHD detectable en el suero y AgHB en el hígado, seguido por eliminación de AgHB (antígeno de superficie de VHB), el último de los cuales puede conseguirse cuando la infección correspondiente por VHB se trata simultánea o secuencialmente con el tratamiento para VHD descrito en este documento, tal como por administración simultánea o secuencial de fármacos antivíricos para VHB u otros tratamientos para VHB, incluyendo, aunque sin limitación, interferones, agentes de inmunoterapia para VHB u otros tratamientos terapéuticos para VHB. En un aspecto, un objetivo del

tratamiento es el desarrollo de anticuerpos (seroconversión) contra el AgHD (anti-HD). La seroconversión puede determinarse por radioinmunoensayo, inmunoensayo enzimático. Los resultados adicionales del tratamiento satisfactorio de la infección por VHD incluyen normalización de los niveles de ALT, reducción en la necroinflamación del hígado y detención de la progresión de la fibrosis hepática.

5 "Prevenir" una infección por VHD o cualquier permutación de la misma (por ejemplo, "prevención de infección por VHD", etc.), se refiere en líneas generales a aplicar o administrar una composición de la invención antes de que se haya producido una infección con VHD, con el objetivo de prevenir la infección por VHD, prevenir la infección crónica por VHD (es decir, posibilitar que un individuo elimine una infección aguda por VHD sin intervención adicional) o al menos reducir la gravedad y/o duración de la infección y/o el daño fisiológico causado por la infección crónica, incluyendo mejorar la supervivencia, en un individuo o población de individuos si la infección se produce posteriormente. En un aspecto, la presente invención puede usarse para prevenir una infección crónica por VHD, tal como posibilitando que un individuo quede infectado de forma aguda con VHD posterior a la administración de una composición de la invención para eliminar la infección y no quedar infectado de forma crónica. En un aspecto, la presente invención se usa para prevenir o reducir la aparición o gravedad de una infección por VHD en un individuo infectado crónicamente por VHB, incluso si la propia infección por VHB no está curada.

20 La presente divulgación incluye el suministro (administración, inmunización) de una o más composiciones inmunoterapéuticas de la invención, incluyendo una composición de inmunoterapia para VHD basada en levadura, a un sujeto. El proceso de administración puede realizarse *ex vivo* o *in vivo*, pero típicamente se realiza *in vivo*. La administración *ex vivo* se refiere a realizar parte de la etapa reguladora fuera del paciente, tal como administrando una composición de la presente invención a una población de células (células dendríticas) retiradas de un paciente en condiciones de modo que un vehículo de levadura, uno o más antígenos y cualquier otro agente o composición se carguen en la célula, y devolviendo las células al paciente. La composición terapéutica de la presente invención 25 puede devolverse al paciente o administrarse a un paciente, por cualquier modo adecuado de administración.

30 La administración de una composición puede ser sistémica, a la mucosa y/o proximal a la ubicación del sitio diana (por ejemplo, cerca de un sitio de infección). Las vías adecuadas de administración serán evidentes para los expertos en la materia, dependiendo del tipo de afección a prevenir o tratar, el antígeno usado y/o la población celular o tejido diana. Diversos métodos aceptables de administración incluyen, aunque sin limitación, administración intravenosa, administración intraperitoneal, administración intramuscular, administración intranodal, administración intracoronaria, administración intraarterial (por ejemplo, en una arteria carótida), administración subcutánea, suministro transdérmico, administración intratraqueal, administración intraarticular, administración intraventricular, inhalación (por ejemplo aerosol), administración intracraneal, intravertebral, intraocular, aural, intranasal, oral, pulmonar, impregnación de un catéter e inyección directa en un tejido. En un aspecto, las vías de administración incluyen: intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intradérmica, intranodal, intramuscular, transdérmica, inhalada, intranasal, oral, intraocular, intraarticular, intracraneal e intravertebral. El suministro parenteral puede incluir vía intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intrapleural, intrapulmonar, intravenosa, subcutánea, por catéter en la aurícula y catéter venoso. El suministro aural puede incluir gotas para el oído, el suministro intranasal puede incluir 40 gotas para la nariz, o inyección intranasal y el suministro intraocular puede incluir colirios. El suministro por aerosol (inhalación) también puede realizarse usando métodos convencionales en la técnica, (véase, por ejemplo, Stribling *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 189:11277-11281, 1992). Otras vías de administración que modulan la inmunidad de la mucosa pueden ser útiles en el tratamiento de infecciones víricas. Dichas vías incluyen vía bronquial, intradérmica, intramuscular, intranasal, otra vía de inhalación, rectal, subcutánea, tópica, transdérmica, vaginal y uretral. En un aspecto, una composición inmunoterapéutica de la invención se administra por vía subcutánea.

50 Con respecto a las composiciones de inmunoterapia basada en levadura de la invención, en general, una única dosis adecuada es una dosis que puede proporcionar de forma eficaz un vehículo de levadura y un antígeno (si se incluye) a un tipo celular, tejido o región dada del organismo del paciente en una cantidad eficaz para provocar una respuesta inmunitaria específica de antígeno contra uno o más antígenos o epítopos de VHD, cuando se administra una o más veces durante un periodo de tiempo adecuado. Por ejemplo, en una realización, una dosis única de un vehículo de levadura de la presente invención es de aproximadamente  $1 \times 10^5$  a aproximadamente  $5 \times 10^7$  equivalentes de células de levadura por kilogramo de peso corporal del organismo al que se está administrando la composición. En un aspecto, una dosis única de un vehículo de levadura de la presente invención es de aproximadamente 0,1 Y.U. ( $1 \times 10^6$  células) a aproximadamente 100 Y.U. ( $1 \times 10^9$  células) por dosis (es decir, por organismo), incluyendo cualquier dosis intermedia, en incremento de  $0.1 \times 10^6$  células (es decir  $1.1 \times 10^6$ ,  $1.2 \times 10^6$ ,  $1.3 \times 10^6$ ...). En una realización, las dosis incluyen dosis entre 1 Y.U. y 40 Y.U., dosis entre 1 Y.U. y 50 Y.U., dosis entre 1 Y.U. y 60 Y.U., dosis entre 1 Y.U. y 70 Y.U. o dosis entre 1 Y.U. y 80 Y.U., y en un aspecto, entre 10 Y.U. y 40 Y.U., 50 Y.U., 60 Y.U., 70 Y.U. o 80 Y.U. En una realización, las dosis se administran en diferentes sitios en el individuo, pero durante el mismo periodo de dosificación. Por ejemplo, puede administrarse una dosis de 40 Y.U. mediante inyección de dosis de 10 Y.U. a cuatro sitios diferentes en el individuo durante un periodo de dosificación, o puede administrarse una dosis de 20 Y.U. inyectando dosis de 5 Y.U. a cuatro sitios diferentes en el individuo, o inyectando dosis de 10 Y.U. a dos sitios diferentes en el individuo, durante el mismo periodo de dosificación. La invención incluye la administración de una cantidad de la composición de inmunoterapia basada en levadura (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 Y.U. o más) en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más sitios diferentes en un individuo para formar una única dosis.

Se administran "reforzadores" o "refuerzos" de una composición terapéutica, por ejemplo, cuando la respuesta inmunitaria contra el antígeno ha menguado o según lo necesario para proporcionar una respuesta inmunitaria o inducir una respuesta de memoria contra uno o más antígenos particulares. Los reforzadores pueden administrarse desde aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 semanas, de intervalo, hasta mensualmente, bimensualmente, trimestralmente, anualmente, hasta varios años después de la administración original. En una realización, una pauta de administración es una en que se administran de aproximadamente  $1 \times 10^5$  a aproximadamente  $5 \times 10^7$  equivalentes de células de levadura de una composición por kg de peso corporal del organismo a al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más veces durante un periodo de tiempo desde semanas, hasta meses, hasta años. En una realización, las dosis se administran semanalmente para 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más dosis, seguidas por dosis mensuales según lo necesario para conseguir la inhibición deseada o eliminación del virus VHD. Por ejemplo, las dosis pueden administrarse hasta que el individuo consigue seroconversión, hasta que los títulos de ARN de VHD son persistentemente indetectables, hasta que no se detecta AgHD en el hígado, hasta que no se detecta AgHB de VHB, y/o hasta que los niveles de ALT se normalizan. En una realización, las dosis se administran en un protocolo de 4 semanas (cada 4 semanas o en el día 1, semana 4, semana 8, semana 12, etc., para entre 2 y 10 dosis o más según se determine por el médico). Pueden administrarse dosis adicionales incluso después de que el individuo haya conseguido seroconversión, si se desea, aunque dicha dosificación puede ser no necesaria.

Las composiciones inmunoterapéuticas contra VHD de la invención, incluyendo las composiciones inmunoterapéuticas para VHD basadas en levadura, pueden administrarse con uno o más agentes terapéuticos o profilácticos adicionales. Dichos agentes terapéuticos o profilácticos pueden incluir agentes que son útiles para la prevención y/o tratamiento de VHD y pueden incluir adicionalmente agentes que son útiles para la prevención y/o tratamiento de VHB. En un aspecto de la divulgación, se administra uno o más agentes terapéuticos o profilácticos adicionales de forma secuencial con la composición de inmunoterapia basada en levadura. En otro aspecto, se administra uno o más agentes terapéuticos o profilácticos adicionales antes de administrar la composición de inmunoterapia basada en levadura. En otro aspecto, se administra uno o más agentes terapéuticos o profilácticos adicionales después de administrar la composición de inmunoterapia para VHD basada en levadura. En un aspecto, se administra uno o más agentes terapéuticos o profilácticos adicionales en dosis alternas con la composición de inmunoterapia basada en levadura, o en un protocolo en que la composición de VHD basada en levadura se administra a intervalos prescritos entremedias o con una o más dosis consecutivas de los agentes adicionales, o viceversa. En un aspecto, la composición de inmunoterapia de VHD basada en levadura se administra en una o más dosis durante un periodo de tiempo antes de comenzar a administrar de los agentes adicionales. En otras palabras, la composición inmunoterapéutica de VHD basada en levadura se administra como una monoterapia durante un periodo de tiempo, y después se añade la administración del agente terapéutico o profiláctico, de forma simultánea con nuevas dosis de inmunoterapia de VHD basada en levadura, o de un modo alterno con la inmunoterapia basada en levadura. Como alternativa, el agente puede administrarse durante un periodo de tiempo antes de empezar la administración de la composición de inmunoterapia de VHD basada en levadura.

En un aspecto de la divulgación, un agente terapéutico adicional a usar junto con una composición inmunoterapéutica de VHD basada en levadura de la invención es un interferón. En un aspecto, el interferón es interferón- $\alpha$  y, en un aspecto, interferón- $\alpha 2b$  (administrado por inyección subcutánea 3 veces a la semana); o interferón- $\alpha 2a$  pegilado (por ejemplo, PEGASYS®). Como se usa en este documento, el término "interferón" se refiere a una citocina que típicamente se produce por células del sistema inmunitario y por una amplia diversidad de células en respuesta a la presencia de ARN bicatenario. Los interferones ayudan a la respuesta inmunitaria inhibiendo la replicación vírica dentro de las células hospedadoras, activando los linfocitos citolíticos naturales y los macrófagos, aumentando la presentación de antígeno a los linfocitos e induciendo la resistencia de las células hospedadoras a la infección vírica. Los interferones de tipo I incluyen interferón- $\alpha$ . Los interferones de tipo III incluyen interferón- $\lambda$ . Los interferones útiles en los métodos de la presente invención incluyen cualquier interferón de tipo I o de tipo III, incluyendo interferón- $\alpha$ , interferón- $\alpha 2$  y, en un aspecto, formas de mayor duración de interferón, incluyendo, aunque sin limitación, interferones pegilados, proteínas de fusión de interferón (interferón fusionado a albúmina) y formulaciones de liberación controlada que comprenden interferón (por ejemplo, interferón en microesferas o interferón con nanopartículas de poliaminoácido). Un interferón, PEGASYS®, interferón- $\alpha 2a$  pegilado, es un conjugado covalente de interferón- $\alpha 2a$  recombinante (peso molecular [PM] aproximado de 20 000 Dalton) con una única cadena de polietilenglicol (PEG) bis-monometoxi ramificada (PM aproximado de 40 000 Dalton). El resto de PEG se une a un único sitio al resto de interferón- $\alpha$  mediante un enlace amida estable a lisina. El interferón- $\alpha 2a$  pegilado tiene un peso molecular aproximado de 60 000 Dalton.

Para el tratamiento de VHB, típicamente se administra interferón por inyección intramuscular o subcutánea, y habitualmente se administra a una dosis alta durante un largo periodo de tiempo. En una realización, se administra IFN- $\alpha$  convencional a aproximadamente 9 millones de unidades tres veces a la semana o 5 millones de unidades al día durante 12 meses, lo que puede prolongarse si los AgHB no se eliminan. IFN- $\alpha$  pegilado puede administrarse semanalmente a una dosis entre 3 y 10 millones de unidades, siendo preferido 3 millones de unidades en una realización, y siendo preferidas dosis mayores en otras realizaciones (por ejemplo, 4 millones de unidades, 5 millones de unidades, 6 millones de unidades, 7 millones de unidades, 8 millones de unidades, 9 millones o 10 millones de unidades). En general, se administran dosis de interferón en una pauta regular, que puede variar de 1, 2, 3, 4, 5 o 6 veces a la semana, hasta semanalmente, bisemanalmente, cada tres semanas o mensualmente, y dependen del tipo de interferón administrado, la tolerancia del paciente y la resolución de la infección. Una dosis

típica de interferón que está actualmente disponible se proporciona semanalmente (IFN- $\alpha$  pegilado), y esta es una pauta posológica referida para interferón, de acuerdo con la presente invención.

- En un aspecto de la divulgación, cuando empieza un ciclo de tratamiento de terapia con interferón, se administran 5 dosis adicionales de la composición inmunoterapéutica de la invención durante el mismo periodo de tiempo, o durante al menos una parte de ese tiempo, y pueden continuar administrándose una vez ha finalizado el ciclo de interferón. Sin embargo, la pauta posológica para la inmunoterapia durante el periodo completo puede ser, y se espera que típicamente sea, diferente de la del interferón. Por ejemplo, la composición inmunoterapéutica puede administrarse en los mismos días o al menos 3-4 días después de la última dosis dada (más reciente) de interferón 10 (o cualquier cantidad adecuada de días después de la última dosis) y puede administrarse diariamente, semanales, bisemanalmente, mensualmente, bimensualmente o cada 3-6 meses, o a intervalos más largos según determine el médico. Durante un periodo inicial de monoterapia, la administración de la composición inmunoterapéutica, si se utiliza, la composición inmunoterapéutica preferiblemente se administra semanalmente durante entre 4 y 12 15 semanas, seguida por administración mensual (independientemente del momento en que se añada el interferón adicional al protocolo). En un aspecto, la composición inmunoterapéutica se administra semanalmente durante cuatro o cinco semanas, seguida por administración mensual después de ello, hasta concluir el protocolo de tratamiento completo. En un aspecto de la invención, el uso de una composición inmunoterapéutica de VHD de la invención se usa en un protocolo sin interferón (es decir, como monoterapia o en combinación con uno o más agentes que no son interferón).
- En un aspecto de la invención, un agente terapéutico adicional a administrar junto con una composición inmunoterapéutica contra VHD basada en levadura de la invención es un compuesto antivírico que es eficaz para el tratamiento de la infección por VHB coexistente en el sujeto. Como se usa en este documento, el término "antivírico" 20 se refiere a cualquier compuesto o fármaco, típicamente un inhibidor de molécula pequeña o anticuerpo, que aborda una o más etapas del ciclo vital del virus que dirige efectos terapéuticos antivíricos directos. Los compuestos antivíricos adecuados incluyen, aunque sin limitación: tenofovir (VIREAD®), lamivudina (EPIVIR®), adefovir (HEPSERA®), telbivudina (TYZEKA®), entecavir (BARACLUDE®) y combinaciones de los mismos.
- El tenofovir (fumarato de tenofovir disoproxilo o TDF) o ácido [(2R)-1-(6-amino-9H-purin-9-il)propan-2-il]oxi]metilfosfónico, es un análogo nucleotídico inhibidor de la transcriptasa inversa (nRTI). Para el tratamiento de 25 infección por VHB, el tenofovir se administra típicamente a adultos como una píldora tomada a una dosis de 300 mg (fumarato de tenofovir disoproxilo) una vez al día. La dosificación para pacientes pediátricos se basa en el peso corporal del paciente (8 mg por kg de peso corporal, hasta 300 mg una vez al día) y puede proporcionarse como comprimido o polvo oral.
- La lamivudina, o 2',3'-didesoxi-3'-tiacetidina, habitualmente llamada 3TC, es un análogo nucleosídico potente 35 inhibidor de la transcriptasa inversa (nRTI). Para el tratamiento de infección por VHB, la lamivudina es administrada como una píldora o solución oral tomada a una dosis de 100 mg una vez al día (1,4-2 mg/0,45 kg (1 lb) dos veces al día para niños de 3 meses a 12 años de edad).
- El adefovir (adefovir dipivoxilo), o 9-[2-[[bis[(pivaloiloxy)metoxi]-fostinil]-metoxi]etil]adenina, es un análogo nucleotídico 40 administrado por vía oral inhibidor de la transcriptasa inversa (nRTI). Para el tratamiento de infección por VHB, el adefovir se administra como una píldora tomada a una dosis de 10 mg una vez al día.
- La telbivudina o 1-(2-deoxi- $\beta$ -L-eritro-pentofuranosil)-5-metilpirimidin-2,4(1H,3H)-diona, es un análogo nucleosídico 45 de timidina sintético (el isómero-L de timidina). Para el tratamiento de infección por VHB, la telbivudina se administra como una píldora o solución oral a una dosis de 600 mg una vez al día.
- El entecavir, o 2-Amino-9-[(1S,3R,4S)-4-hidroxi-3-(hidroximetil)-2-metilidenclopentil]-6,9-dihidro-3H-purin-6-one, es 50 un análogo nucleosídico (análogo de guanina) que inhibe la transcripción inversa, la replicación del ADN y la transcripción de virus. Para el tratamiento de infección por VHB, el entecavir se administra como una píldora o solución oral tomada a una dosis de 0,5 mg una vez al día (1 mg al día para mutaciones resistentes a lamivudina o resistentes a telbivudina).
- En aspectos de la divulgación, una composición inmunoterapéutica u otros agentes pueden administrarse juntos 55 (simultáneamente). Como se usa en este documento, el uso simultáneo no significa necesariamente que todas las dosis de todos los compuestos se administren en el mismo día al mismo tiempo. En su lugar, el uso simultáneo significa que cada uno de los componentes del tratamiento (por ejemplo, inmunoterapia y tratamiento con interferón) se empiezan en aproximadamente el mismo periodo (en horas, hasta 1-7 días entre sí, o incluso más (semanas o 60 meses de separación) pero se administran como parte del mismo protocolo) y se administran durante el mismo periodo general de tiempo, observando que cada componente puede tener una pauta posológica diferente (por ejemplo, interferón semanalmente, inmunoterapia mensualmente). Además, antes o después del periodo de administración simultánea, uno cualquiera de los agentes o composiciones inmunoterapéuticas puede administrarse sin el otro agente o agentes.

Se contempla por la presente divulgación que el uso de una composición inmunoterapéutica de la invención con un interferón tal como IFN- $\alpha$  posibilitará un ciclo de tiempo más corto para el uso del interferón, o puede posibilitar la eliminación del interferón. Los requisitos de dosificación para el interferón también pueden reducirse o modificarse como resultado de la combinación con el agente inmunoterapéutico de la invención para mejorar en líneas generales

5 la tolerancia del paciente al fármaco. Además, se contempla que la composición inmunoterapéutica de la invención posibilitará la seroconversión o respuestas víricas mantenidas para pacientes en que el tratamiento con interferón en solitario no logra conseguir estos criterios de valoración. En otras palabras, más pacientes conseguirán negatividad vírica o seroconversión cuando se combina una composición inmunoterapéutica de la invención con un interferón que los que conseguirán negatividad vírica o seroconversión usando interferón en solitario.

10 En el método de la presente divulgación, las composiciones o composiciones terapéuticas pueden administrarse a un animal, incluyendo cualquier vertebrado, y particularmente cualquier miembro de la clase de vertebrados, mamíferos, incluyendo, sin limitación, primates, roedores, ganado y mascotas domésticas. El ganado incluye mamíferos a consumir o que producen productos útiles (por ejemplo, ovejas para producción de lana). Los mamíferos a tratar o proteger incluyen seres humanos, perros, gatos, ratones, ratas, cabras, ovejas, ganado bovino, caballos y cerdos.

15 Un "individuo" es un vertebrado, tal como un mamífero, incluyendo sin limitación un ser humano. Los mamíferos incluyen, aunque sin limitación, animales de granja, animales para el deporte, mascotas, primates, ratones y ratas. El término "individuo" puede usarse indistintamente con el término "animal", "sujeto" o "paciente".

#### *Técnicas generales útiles en la invención*

20 La práctica de la presente invención empleará, salvo que se indique de otro modo, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica, química de ácidos nucleicos e inmunología, que son bien conocidas para los expertos en la materia. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía, tal como, Methods of Enzymology, Vol. 194, Guthrie *et al.*, eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1990); Biology and activities of yeasts, Skinner, *et al.*, eds., Academic Press (1980); Methods in yeast genetics: a laboratory course manual, Rose *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1990);

25 The Yeast *Saccharomyces*: Cell Cycle and Cell Biology, Pringle *et al.*, eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1997); The Yeast *Saccharomyces*: Gene Expression, Jones *et al.*, eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1993); The Yeast *Saccharomyces*: Genome Dynamics, Protein Synthesis, and Energetics, Broach *et al.*, eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1992); Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición (Sambrook *et al.*, 1989) y Molecular Cloning: A Laboratory Manual, tercera edición (Sambrook y Russel, 2001), (conjuntamente mencionado en este documento como "Sambrook"); Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel *et al.*, eds., 1987, incluyendo los suplementos hasta 2001); RCP: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis *et al.*, eds., 1994); Harlow and Lane (1988), Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Publications, Nueva York; Harlow y Lane (1999) Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (conjuntamente mencionado en este documento como "Harlow y Lane"), Beaucage *et al.* eds., Current

30 Protocols in Nucleic Acid Chemistry, John Wiley and Sons, Inc., Nueva York, 2000); Casarett and Doull's Toxicology The Basic Science of Poisons, C. Klaassen, ed., 6.<sup>a</sup> edición (2001), y Vaccines, S. Plotkin y W. Orenstein, eds., 3.<sup>a</sup> edición (1999).

#### *Definiciones generales*

35 45 Un "TARMOGEN®" (Globelimmune, Inc., Louisville, Colorado) se refiere en líneas generales a un vehículo de levadura que expresa uno o más antígenos heterólogos de forma extracelular (en su superficie), de forma intracelular (internamente o citosólicamente) o tanto extracelularmente como intracelularmente. Los productos TARMOGEN® se han descrito en líneas generales (véase por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 5.830.463).

50 55 Determinadas composiciones de inmunoterapia basada en levadura, y métodos de preparación y uso general de las mismas, también se describen en detalle, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos n.º 5.830.463, la patente de estos unidos n.º 7.083.787, la patente de estos unidos n.º 7.736.642, Stubbs *et al.*, Nat. Med. 7:625-629 (2001), Lu *et al.*, Cancer Research 64:5084-5088 (2004), y en Bernstein *et al.*, Vaccine 24 de enero de 2008; 26(4):509-21.

60 65 Como se usa en este documento, el término "análogo" se refiere a un compuesto químico que es estructuralmente similar a otro compuesto, pero difiere ligeramente en la composición (como en el remplazo de un átomo por un átomo de un elemento diferente o en la presencia de un grupo funcional particular, o el remplazo de un grupo funcional por otro grupo funcional). Por tanto, un análogo es un compuesto que es similar o comparable en su función y aspecto, pero tiene estructura u origen diferente con respecto al compuesto de referencia.

Los términos "sustituido", "derivado sustituido" y "derivado", cuando se usan para describir un compuesto, significan que al menos un hidrógeno unido al compuesto sin sustituir está remplazado con un átomo diferente o un resto químico.

Aunque un derivado tiene una estructura física similar al compuesto precursor, el derivado puede tener diferentes propiedades químicas y/o biológicas del compuesto precursor. Dichas propiedades pueden incluir, aunque sin

limitación, actividad aumentada o disminuida del compuesto precursor, nueva actividad en comparación con el compuesto precursor, biodisponibilidad potenciada o disminuida, eficacia potenciada o disminuida, estabilidad potenciada o disminuida *in vitro* y/o *in vivo*, y/o propiedades de absorción potenciadas o disminuidas.

- 5 En general, la expresión "biológicamente activo" indica que un compuesto (incluyendo una proteína o péptido) tiene al menos una actividad detectable que tiene un efecto sobre los procesos metabólicos u otros procesos de una célula u organismo, medidos u observados *in vivo* (es decir, en un entorno fisiológico natural) o *in vitro* (es decir, en condiciones de laboratorio).
- 10 De acuerdo con la presente invención, el término "modular" puede usarse indistintamente con "regular" y se refiere en general a regulación por aumento o regulación por disminución de una actividad particular. Como se usa en este documento, la expresión "regular por aumento" puede usarse en general para describir cualquiera de: provocar, iniciar, incrementar, aumentar, reforzar, mejorar, potenciar, amplificar, promover o proporcionar, con respecto a una actividad particular. Asimismo, el término "regular por disminución" puede usarse en general para describir cualquiera de: disminuir, reducir, inhibir, mejorar, menguar, minimizar, bloquear o prevenir, con respecto a una actividad particular.
- 15

En un aspecto de la presente divulgación, cualquiera de las secuencias de aminoácidos descritas en este documento puede producirse con al menos uno, y hasta aproximadamente 20, aminoácidos heterólogos adicionales flanqueando cada uno de los extremos C y/o N de la secuencia de aminoácidos especificada. La proteína o polipéptido resultante puede mencionarse como "que consiste esencialmente en" la secuencia de aminoácidos especificada. De acuerdo con la presente invención, los aminoácidos heterólogos son una secuencia de aminoácidos que no se encuentran de forma natural (es decir, no se encuentran en la naturaleza, *in vivo*) flanqueando la secuencia de aminoácidos especificada, o que no están relacionados con la función de la secuencia de aminoácidos especificada, o que no estarían codificados por los nucleótidos que flanquean la secuencia de ácido nucleico de origen natural que codifica la secuencia de aminoácidos específica según se produce en el gen, si dichos nucleótidos en la secuencia de origen natural se tradujeran usando el uso convencional de codones para el organismo del que se obtiene la secuencia de aminoácidos dada. Asimismo, la expresión "que consiste esencialmente en", cuando se usa con referencia a una secuencia de ácido nucleico en este documento, se refiera a una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos especificada que puede estar flanqueada por al menos uno y hasta como mucho aproximadamente 60, nucleótidos heterólogos adicionales en cada uno del extremo 5' y/o 3' de la secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos especificada. Los nucleótidos heterólogos no se encuentran de forma natural (es decir, no se encuentran en la naturaleza, *in vivo*) flanqueando la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la secuencia de aminoácidos especificada según se produce en el gen natural o no codifican una proteína que confiere ninguna función adicional a la proteína o cambia la función de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos especificada.

De acuerdo con la presente invención, la expresión "se une selectivamente a" se refiere a la capacidad de un anticuerpo, fragmento de unión a antígeno o compañero de unión de la presente invención de unirse preferentemente a proteínas especificadas. Más específicamente, la expresión "se une selectivamente" se refiere a la unión específica de una proteína a otra (por ejemplo, un anticuerpo, fragmento del mismo o compañero de unión para un antígeno), donde el nivel de unión, medido por cualquier ensayo convencional (por ejemplo, un inmunoensayo), es estadísticamente mayor significativamente que el control de fondo para el ensayo. Por ejemplo, cuando se realiza un inmunoensayo, los controles típicamente incluyen un pocillo/tubo de reacción que contiene anticuerpo o fragmento de unión a antígeno en solitario (es decir, en ausencia de antígeno), donde una cantidad de reactividad (por ejemplo, unión no específica al pocillo) por el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo en ausencia del antígeno se considera el fondo. La unión puede medirse usando una diversidad de métodos convencionales en la técnica incluyendo inmunoensayos enzimáticos (por ejemplo, ELISA, ensayos de inmunotransferencia, etc.).

50 Una referencia a una proteína o polipéptido útil en la presente invención incluye proteínas de longitud completa, proteínas de fusión o cualquier fragmento, dominio, epítopo conformacional u homólogo de dichas proteínas, incluyendo dominios funcionales y dominios inmunológicos de proteínas. Más específicamente, una proteína aislada, de acuerdo con la presente invención, es una proteína (incluyendo un polipéptido o péptido) que se ha retirado de su medio natural (es decir, que se ha sometido a manipulación humana) y puede incluir proteínas purificadas, proteínas parcialmente purificadas, proteínas producidas de forma recombinante y proteínas producidas sintéticamente, por ejemplo. Por tanto, "aislado" no refleja el grado al que se ha purificado la proteína. Preferiblemente, una proteína aislada de la presente invención se produce de forma recombinante. De acuerdo con la presente invención, los términos "modificación" y "mutación" pueden usarse indistintamente, particularmente con respecto a las modificaciones/mutaciones a la secuencia de aminoácidos de las proteínas o partes de las mismas (o secuencias de ácido nucleico) descritas en este documento.

65 Como se usa en este documento, el término "homólogo" se usa para hacer referencia a una proteína o péptido que difiere de una proteína o péptido de origen natural (es decir, la proteína "prototipo" o "de tipo silvestre") por modificaciones menores a la proteína o péptido de origen natural, pero que mantiene la proteína básica y la estructura de cadena lateral de la forma de origen natural. Dichos cambios incluyen, aunque sin limitación: cambios

en una o unas pocas cadenas laterales de aminoácidos; cambios en uno o unos pocos aminoácidos, incluyendo eliminaciones (por ejemplo, una versión truncada de la proteína o péptido), inserciones y/o sustituciones; cambios en la estequiometría de uno o unos pocos átomos; y/o derivatizaciones menores, incluyendo aunque sin limitación: metilación, glucosilación, fosforilación, acetilación, miristoilación, prenilación, palmitación, amidación y/o adición de glucosilfosfatidil inositol. Un homólogo puede tener propiedades potenciadas, disminuidas o sustancialmente similares en comparación con la proteína o péptido de origen natural. Un homólogo puede incluir un agonista de una proteína o un antagonista de una proteína. Los homólogos pueden producirse usando técnicas conocidas en la técnica para la producción de proteínas incluyendo, aunque sin limitación, modificaciones directas a la proteína de origen natural aislada, síntesis directa de proteínas o modificaciones a la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína usando, por ejemplo, técnicas clásicas o recombinantes de ADN para lograr mutagénesis aleatoria o dirigida.

Un homólogo de una proteína dada puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en, una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 45 %, o al menos aproximadamente un 50 %, o al menos aproximadamente un 55 %, o al menos aproximadamente un 60 %, o al menos aproximadamente un 65 %, o al menos aproximadamente un 70 %, o al menos aproximadamente un 75 %, o al menos aproximadamente un 80 %, o al menos aproximadamente un 85 %, o al menos aproximadamente un 90 %, o al menos aproximadamente un 91 % idéntica, o al menos aproximadamente un 92 % idéntica, o al menos aproximadamente un 93 % idéntica, o al menos aproximadamente un 94 % idéntica, o al menos aproximadamente un 95 % idéntica, o al menos aproximadamente un 96 % idéntica, o al menos aproximadamente un 97 % idéntica, o al menos aproximadamente un 98 % idéntica, o al menos aproximadamente un 99 % idéntica (o cualquier porcentaje de identidad entre un 45 % y un 99 %, en incrementos de números enteros), a la secuencia de aminoácidos de la proteína de referencia. En una realización, el homólogo comprende, consiste esencialmente en o consiste en, una secuencia de aminoácidos que es menos de un 100 % idéntica, menos de aproximadamente un 99 % idéntica, menos de aproximadamente un 98 % idéntica, menos de aproximadamente un 97 % idéntica, menos de aproximadamente un 96 % idéntica, menos de aproximadamente un 95 % idéntica y así sucesivamente, en incrementos de un 1 %, hasta menos de aproximadamente un 70 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de origen natural de la proteína de referencia.

Un homólogo puede incluir proteínas o dominios de proteínas que son "casi de longitud completa", lo que significa que dicho homólogo difiere de la proteína de longitud completa, dominio funcional o dominio inmunológico (tal cual se describe proteína, dominio funcional o dominio inmunológico en este documento o como se conoce de otra manera o se describe en una secuencia disponible al público) por la adición o eliminación de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos del extremo N y/o C de dicha proteína de longitud completa o dominio funcional de longitud completa o dominio inmunológico de longitud completa.

Como se usa en este documento, salvo que se especifique de otro modo, una referencia a un porcentaje (%) de identidad se refiere a una evaluación de la homología que se realiza usando: (1) una búsqueda de homología BLAST 2.0 Basic BLAST usando blastp para búsquedas de aminoácidos y blastn para búsquedas de ácido nucleico con parámetros por defecto convencionales, donde la secuencia de consulta se filtra para regiones de baja complejidad por defecto (descrito en Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. y Lipman, D.J. (1997) "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." Nucleic Acids Res. 25:3389-3402); (2) una alineación BLAST 2 (usando los parámetros descritos a continuación); (3) y/o PSI-BLAST con los parámetros por defecto convencionales (BLAST iterada de posición específica). Se aprecia que debido a algunas diferencias en los parámetros convencionales entre BLAST 2.0 Basic BLAST y BLAST 2, podrían reconocerse dos secuencias específicas con homología significativa usando el programa BLAST 2, mientras que una búsqueda realizada en BLAST 2.0 Basic BLAST usando una de las secuencias como secuencia de consulta puede no identificar la segunda secuencia en las mejores coincidencias. Además, PSI-BLAST proporciona una versión automatizada, fácil de usar de una búsqueda "de perfil", que es una manera sensible de buscar homólogos de secuencia. El programa, en primer lugar realiza una búsqueda en base de datos BLAST con huecos. El programa PSI-BLAST usa la información de cualquier alineación significativa devuelta para construir una matriz de valores específicos de posición, que remplaza la secuencia de consulta para la siguiente ronda de búsqueda de base de datos. Por lo tanto, debe entenderse que el porcentaje de identidad puede determinarse usando uno cualquiera de estos programas.

Las secuencias específicas pueden alinearse entre sí usando la secuencia BLAST 2 como se describe en Tatusova y Madden, (1999), "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", FEMS Microbiol Lett. 174:247-250, incorporado en este documento por referencia en su totalidad. La alineación de secuencias BLAST 2 se realiza en blastp o blastn usando el algoritmo BLAST 2.0 para realizar una búsqueda de BLAST con huecos (BLAST 2.0) entre las dos secuencias permitiendo la introducción de huecos (eliminaciones e inserciones) en la alineación resultante. Con fines de claridad en este documento, se realiza una alineación de secuencia BLAST 2 usando los siguientes parámetros por defecto convencionales.

Para blastn, usando la matriz 0 BLOSUM62:

65 Recompensa por coincidencia = 1  
Penalización por falta de coincidencia = -2

Penalizaciones por abertura de hueco (5) y extensión de hueco (2)  
disminución por hueco x (50) expectativa (10) tamaño de palabra (11) filtro (activo)

Para blastp, usando la matriz 0 BLOSUM62:

- 5       Penalizaciones por abertura de hueco (11) y extensión de hueco (1)  
disminución por hueco x (50) expectativa (10) tamaño de palabra (3) filtro (activo).
- 10      Una molécula de ácido nucleico aislada es una molécula de ácido nucleico que se ha retirado de su medio natural (es decir, que se ha sometido a manipulación humana), siendo su medio natural el genoma o cromosoma en que se encuentra la molécula de ácido nucleico en la naturaleza. Por tanto, "aislada" no refleja necesariamente el grado al que se ha purificado la molécula de ácido nucleico, sino que indica que la molécula no incluye un genoma completo o un cromosoma completo en que se encuentra la molécula de ácido nucleico en la naturaleza. Una molécula de ácido nucleico aislada puede incluir un gen. Una molécula de ácido nucleico aislada que incluye un gen no es un fragmento de un cromosoma que incluye dicho gen, sino que en lugar incluye la región codificante y regiones reguladoras asociadas con el gen, pero no genes adicionales que se encuentran de forma natural en el mismo cromosoma. Una molécula de ácido nucleico aislada también puede incluir una secuencia de ácido nucleico específica flanqueada por (es decir, en el extremo 5' y/o 3' de la secuencia) ácidos nucleicos adicionales que no flanquean normalmente la secuencia de ácido nucleico específica en la naturaleza (es decir, secuencias heterólogas). La molécula de ácido nucleico aislada puede incluir ADN, ARN (por ejemplo, ARNm) o derivados de ADN o ARN (por ejemplo, ADNc). Aunque la expresión "molécula de ácido nucleico" se refiere principalmente a la molécula de ácido nucleico física y la expresión "secuencia de ácido nucleico" se refiere principalmente a la secuencia de nucleótidos en la molécula de ácido nucleico, las dos expresiones pueden usarse indistintamente, especialmente con respecto a una molécula de ácido nucleico, o una secuencia de ácido nucleico, que puede codificar una proteína o dominio de una proteína.

Una molécula de ácido nucleico recombinante es una molécula que puede incluir al menos una de cualquier secuencia de ácido nucleico que codifique una cualquiera o más proteínas descritas en este documento unida de forma funcional a al menos una de cualquier secuencia de control de la transcripción que pueda regular de forma eficaz la expresión de la molécula o moléculas de ácido nucleico en la célula a transfectar. Aunque la expresión "molécula de ácido nucleico" se refiere principalmente a la molécula de ácido nucleico física y la expresión "secuencia de ácido nucleico" se refiere principalmente a la secuencia de nucleótidos en la molécula de ácido nucleico, las dos expresiones pueden usarse indistintamente, especialmente con respecto a una molécula de ácido nucleico, o una secuencia de ácido nucleico, que puede codificar una proteína. Además, la expresión "molécula recombinante" se refiere principalmente a una molécula de ácido nucleico unida de forma funcional a una secuencia de control de la transcripción, pero puede usarse indistintamente con la expresión "molécula de ácido nucleico" que se administra a un animal.

Una molécula de ácido nucleico recombinante incluye un vector recombinante, que es cualquier secuencia de ácido nucleico, típicamente una secuencia heteróloga, que está unida de forma funcional a la molécula de ácido nucleico aislada que codifica una proteína de fusión de la presente invención, que puede posibilitar la producción recombinante de la proteína de fusión, y que puede suministrar la molécula de ácido nucleico a la célula hospedadora de acuerdo con la presente invención. Dicho vector puede contener secuencias de ácido nucleico que no se encuentran de forma natural adyacentes a las moléculas de ácido nucleico aisladas a insertar en el vector. El vector puede ser de ARN o ADN, procariota o eucariota, y preferiblemente en la presente invención, es un virus o un plásmido. Los vectores recombinantes pueden usarse en la clonación, secuenciación y/o manipulación de otra manera de moléculas de ácido nucleico, y pueden usarse en el suministro de dichas moléculas (por ejemplo, como en una composición de ADN o una composición basada en vector vírico). Los vectores recombinantes se usan preferiblemente en la expresión de moléculas de ácido nucleico, y también pueden mencionarse como vectores de expresión. Los vectores recombinantes preferidos pueden expresarse en una célula hospedadora transfectada.

En una molécula recombinante de la presente invención, las moléculas de ácido nucleico se unen de forma funcional a vectores de expresión que contienen secuencias reguladoras tales como secuencias de control de la transcripción, secuencias de control de la traducción, orígenes de replicación y otras secuencias reguladoras que son compatibles con la célula hospedadora y que controlan la expresión de las moléculas de ácidos nucleicos de la presente invención. En particular, las moléculas recombinantes de la presente invención incluyen moléculas de ácido nucleico que están unidas de forma funcional a una o más secuencias de control de la expresión. La expresión "unida de forma funcional" se refiere a unir una molécula de ácido nucleico a una secuencia de control de la expresión de una manera tal que la molécula se expresa cuando se transfetta (es decir, se transforma, transduce o transfetta) en una célula hospedadora.

De acuerdo con la presente invención, el término "transfección" se usa para hacer referencia a cualquier método por el que pueda insertarse una molécula de ácido nucleico exógena (es decir, una molécula de ácido nucleico recombinante) en una célula. El término "transformación" puede usarse indistintamente con el término "transfección" cuando dicho término se usa para hacer referencia a la introducción de moléculas de ácido nucleico en células microbianas, tales como algas, bacterias y levaduras. En sistemas microbianos, el término "transformación" se usa

para describir un cambio hereditario debido a la adquisición de ácidos nucleicos exógenos por el microorganismo y es esencialmente sinónimo del término "transfección." Por lo tanto, las técnicas de transfección incluyen, aunque sin limitación, transformación, tratamiento químico de células, bombardeo de partículas, electroporación, microinyección, lipofección, adsorción, infección y fusión de protoplastos.

5 Los siguientes resultados experimentales se proporcionan con fines de ilustración y no pretenden limitar el alcance de la invención.

## Ejemplos

### 10 Ejemplo 1

El siguiente ejemplo describe la producción de una composición inmunoterapéutica basada en levadura para el tratamiento o prevención de infección por virus de hepatitis D (VHD).

15 En este experimento, se genomanipuló la levadura (por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae*) para que expresara un antígeno de VHD bajo el control del promotor inducible por cobre, *CUP1*. El antígeno de VHD era un único polipéptido de aproximadamente 218 aminoácidos, con los siguientes elementos de secuencia fusionados en fase desde el extremo N al C, representado por la SEQ ID NO: 30: (1) un péptido en el extremo N para conferir 20 resistencia a degradación por el proteasoma y estabilizar la expresión (posiciones 1 a 6 de la SEQ ID NO: 30); 2) un espaciador de dos aminoácidos (Thr-Ser) para introducir un sitio para la enzima de restricción *SpeI* (posiciones 7 a 8 de la SEQ ID NO: 30); 3) la secuencia de aminoácidos de un antígeno grande (L) de VHD de genotipo 1 (AgHD-L) que se modificó para eliminar la secuencia de localización nuclear (posiciones 9 a 212 de la SEQ ID NO: 30, también 25 representada en este documento por la SEQ ID NO: 28); y 4) una marca de hexahistidina (posiciones 213 a 218 de la SEQ ID NO: 30). Una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión de la SEQ ID NO: 30 (codones optimizados para la expresión en levadura) está representada en este documento por la SEQ ID NO. 29. La SEQ ID NO: 30 (y la SEQ ID NO: 28) contiene múltiples epítopos o dominios que se cree que potencian la inmunogenicidad del antígeno de VHD. Por ejemplo, las posiciones 34 a 42 y las posiciones 51 a 59 de la SEQ ID NO: 30, comprenden epítopos conocidos de linfocitos-T de MHC de clase I, y las posiciones 34 a 49, las posiciones 58 a 73, las posiciones 74 a 87, las posiciones 30 104 a 119 y las posiciones 120-151 comprenden epítopos conocidos de linfocitos-T de MHC de clase II. Una composición de inmunoterapia de levadura que expresa la SEQ ID NO: 30 también se menciona en este documento como VHD1.

35 Un segundo producto que expresa el mismo antígeno de VHD que anteriormente, pero con la SLN retenida, se produjo de la siguiente manera. Se genomanipuló la levadura (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*) para que expresara el antígeno de VHD bajo el control del promotor inducible por cobre, *CUP1*. El antígeno de VHD era un único polipéptido de aproximadamente 228 aminoácidos, con los siguientes elementos de secuencia fusionados en fase desde el extremo N al C, representado por la SEQ ID NO: 33: (1) un péptido en el extremo N para conferir 40 resistencia a degradación por el proteasoma y estabilizar la expresión (posiciones 1 a 6 de la SEQ ID NO: 33); 2) un espaciador de dos aminoácidos (Thr-Ser) para introducir un sitio para la enzima de restricción *SpeI* (posiciones 7 a 8 de la SEQ ID NO: 33); 3) la secuencia de aminoácidos de un antígeno grande (L) de VHD de genotipo 1 (AgHD-L) correspondiente a la SEQ ID NO: 2 excepto por la sustitución de una alanina en el lugar de la glutamina en la posición 66 de la SEQ ID NO: 2 (posiciones 9 a 222 de la SEQ ID NO: 33, también representada en este documento por la SEQ ID NO: 31); y 4) una marca de hexahistidina (posiciones 223 a 228 de la SEQ ID NO: 33). Una secuencia 45 de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión de la SEQ ID NO: 33 (codones optimizados para la expresión en levadura) está representada en este documento por la SEQ ID NO. 32. La SEQ ID NO: 33 (y la SEQ ID NO: 31) contiene múltiples epítopos o dominios que se cree que potencian la inmunogenicidad del antígeno de VHD. Por ejemplo, las posiciones 34 a 42 y las posiciones 51 a 59 de la SEQ ID NO: 33, comprenden epítopos conocidos de linfocitos-T de MHC de clase I, y las posiciones 34 a 49, las posiciones 58 a 73, las posiciones 74 a 89, las 50 posiciones 82 a 97, las posiciones 114 a 129 y las posiciones 130 a 161 comprenden epítopos conocidos de linfocitos-T de MHC de clase II. Una composición de inmunoterapia de levadura que expresa la SEQ ID NO: 33 también se menciona en este documento como VHD2.

55 Para producir las composiciones de inmunoterapia de levadura VHD1 y VHD2, en resumen, se optimizaron los codones del ADN que codifica los antígenos de VHD descritos anteriormente para su expresión en levadura, y después se digirió con *EcoRI* y *NotI* y se insertaron detrás del promotor *CUP1* (pGL-100) en vectores de expresión de la levadura de 2 µm. La secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 29 codifica la proteína de fusión representada por la SEQ ID NO: 30, y la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 32 codifica la proteína de fusión representada por la SEQ ID NO: 33. Los plásmidos resultantes se introdujeron en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* W303a 60 por transfección con acetato de litio/polietilenglicol, y se seleccionaron los transfectantes primarios en placas mínimas sólidas que carecen de uracilo (UDM; medio de retirada de uridina). Las colonias se volvieron a sembrar en estrías en UDM o ULDM (medio de retirada de uridina y leucina) y se permitió que crecieran durante 3 días a 30 °C. Los cultivos líquidos que carecen de uridina (medio U2: 20 g/l de glucosa; 6,7 g/l de base nitrogenada de levadura que contiene sulfato de amonio; 0,04 mg/ml de cada uno de histidina, leucina, triptófano y adenina) o que carece de uridina y leucina (medio UL2: 20 g/l de glucosa; 6,7 g/l de base nitrogenada de levadura que contiene sulfato de amonio; y 0,04 mg/ml de cada uno de histidina, triptófano y adenina) se inocularon de las placas y los cultivos 65

iniciadores se cultivaron durante 20 h a 30 °C, 250 r.p.m. Los cultivos primarios se usaron para inocular cultivos finales de la misma formulación y se continuó el crecimiento hasta que se alcanzó una densidad de 1,1 a 4,0 YU/ml. Los cultivos se indujeron con sulfato de cobre 400 µM a esta densidad de partida de 1-4 YU/ml durante 3 h a 30 °C. Las células de cada cultivo entonces se recogieron, se lavaron con PBS y se inactivaron por calor a 56 °C durante 1 hora en PBS.

Después de inactivar por calor los cultivos, las células se lavaron tres veces en PBS y se aisló la proteína total por ruptura de microesferas de vidrio seguido por ebullición en tampón de lisis SDS. La cuantificación de la proteína total se hizo por ensayo de unión de amidoschwarz/nitrocelulosa, y se midió el contenido de antígeno de VHD por transferencia de Western usando una sonda de anticuerpo monoclonal antimarca His seguida por interpolación a una curva patrón de proteína NS3 de VHC marcada con His.

Los resultados se muestran en las figuras 2 y 3. La figura 2 muestra la expresión inducible por cobre de VHD1 y VHD2: U2 frente a UL2 usando un conjunto de patrones internos (VHD1 y VHD2 cargados a 4 µg de proteína/carril) y la figura 3 muestra la expresión inducible por cobre de VHD1 y VHD2: U2 frente a UL2 usando un segundo conjunto de patrones internos (VHD1 y VHD2 cargados a 4 µg de proteína/carril). Estas células muestran que cada una de las composiciones de inmunoterapia basada en levadura de VHD de la invención descritas anteriormente expresan la proteína de VHD, y pueden identificarse por transferencia de Western. La expresión de antígeno fue mejor usando medio UL2. La expresión calculada de antígeno fue ~7171 ng de proteína por Y.U. para la levadura que expresa la SEQ ID NO: 30 (VHD1) y ~6600 ng de proteína por Y.U. para la levadura que expresa la SEQ ID NO: 33 (VHD2) (unidad de levadura; una unidad de levadura (Y.U.) es  $1 \times 10^7$  células de levadura o equivalentes de células de levadura) o 76 pmol de proteína por Y.U.). Sin embargo, se observó que VHD2 forma grumos y tiene un tiempo de duplicación mucho más largo que VHD1. La aglomeración celular y el crecimiento extremadamente lento son características indeseadas para candidatos de inmunoterapia basada en levadura y, por consiguiente, se selecciona VHD1 para experimentos adicionales.

## Ejemplo 2

El siguiente ejemplo describe la producción de otra composición inmunoterapéutica basada en levadura para el tratamiento o prevención de infección por virus de hepatitis D (VHD).

En este experimento, se genomanipuló la levadura (por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae*) para que expresara un antígeno de VHD bajo el control del promotor inducible por cobre, *CUP1*. El antígeno de VHD era un único polipéptido de aproximadamente 422 aminoácidos, con los siguientes elementos de secuencia fusionados en fase desde el extremo N al C, representado por la SEQ ID NO: 36: (1) un péptido en el extremo N para conferir resistencia a degradación por el proteasoma y estabilizar la expresión (posiciones 1 a 6 de la SEQ ID NO: 36); 2) un espaciador de dos aminoácidos (Thr-Ser) para introducir un sitio para la enzima de restricción *SpeI* (posiciones 7 a 8 de la SEQ ID NO: 36); 3) la secuencia de aminoácidos de un antígeno grande (L) de VHD de genotipo 1 (AgHD-L) que se modificó para eliminar la secuencia de localización nuclear (posiciones 9 a 212 de la SEQ ID NO: 36); 4) la secuencia de aminoácidos de un antígeno grande (L) de VHD de genotipo 2 (AgHD-L) que se modificó para eliminar la secuencia de localización nuclear (posiciones 213 a 416 de la SEQ ID NO: 36); y 5) una marca de hexahistidina (posiciones 417 a 422 de la SEQ ID NO: 36). Una secuencia de aminoácidos que representa únicamente las secuencias de VHD en esta proteína de fusión es la SEQ ID NO: 34. Una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión de la SEQ ID NO: 36 (codones optimizados para la expresión en levadura) está representada en este documento por la SEQ ID NO: 35. La SEQ ID NO: 36 (y la SEQ ID NO: 34) contiene múltiples epítopos o dominios que se cree que potencian la inmunogenicidad del antígeno de VHD. Por ejemplo, dentro de la secuencia del antígeno de VHD de genotipo 1, las posiciones 34 a 42 y las posiciones 51 a 59 de la SEQ ID NO: 36, comprenden epítopos conocidos de linfocitos-T de MHC de clase I, y las posiciones 34 a 49, las posiciones 58 a 73, las posiciones 74 a 89, las posiciones 82 a 97, las posiciones 114 a 129 y las posiciones 130 a 161 comprenden epítopos conocidos de linfocitos-T de MHC de clase II. Las secuencias correspondientes pueden identificarse en la secuencia del antígeno de VHD de genotipo 2. Una composición de inmunoterapia de levadura que expresa la SEQ ID NO: 36 también se menciona en este documento como VHD3.

Para producir la composición inmunoterapéutica de levadura de VHD3, en resumen, Se optimizaron los codones del ADN que codifica el antígeno de VHD descrito anteriormente para su expresión en levadura, y después se digirió con *EcoRI* y *NotI* y se insertó detrás del promotor *CUP1* (pGI-100) en vectores de expresión de la levadura de 2 µm. La secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 35 codifica la proteína de fusión representada por la SEQ ID NO: 36. Los plásmidos resultantes se introdujeron en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* W303α por transfección con acetato de litio/polietilenglicol, y se seleccionaron los transfectantes primarios en placas mínimas sólidas que carecen de uracilo (UDM; medio de retirada de uridina). Las colonias se volvieron a sembrar en estrías en UDM o ULDM (medio de retirada de uridina y leucina) y se permitió que crecieran durante 3 días a 30 °C. Los cultivos líquidos que carecen de uridina (medio U2: 20 g/l de glucosa; 6,7 g/l de base nitrogenada de levadura que contiene sulfato de amonio; 0,04 mg/ml de cada uno de histidina, leucina, triptófano y adenina) o que carece de uridina y leucina (medio UL2: 20 g/l de glucosa; 6,7 g/l de base nitrogenada de levadura que contiene sulfato de amonio; y 0,04 mg/ml de cada uno de histidina, triptófano y adenina) se inocularon de las placas y los cultivos iniciadores se cultivaron durante 20 h a 30 °C, 250 r.p.m. Los cultivos primarios se usaron para inocular cultivos finales de la misma

formulación y se continuó el crecimiento hasta que se alcanzó una densidad de 1,1 a 4,0 YU/ml. Los cultivos se indujeron con sulfato de cobre 400 µM a esta densidad de partida de 1-4 YU/ml durante 3 h a 30 °C. Las células de cada cultivo entonces se recogieron, se lavaron con PBS y se inactivaron por calor a 56 °C durante 1 hora en PBS.

- 5 Después de inactivar por calor los cultivos, las células se lavaron tres veces en PBS y se aisló la proteína total por  
 ruptura de microesferas de vidrio seguido por ebullición en tampón de lisis SDS. La cuantificación de la proteína total  
 se hizo por ensayo de unión de amidoschwarz/nitrocelulosa, y se midió el contenido de antígeno de VHD por  
 transferencia de Western usando una sonda de anticuerpo monoclonal antimarca His seguida por interpolación a  
 una curva patrón de proteína NS3 de VHC marcada con His. Los resultados se muestran en la figura 4. La figura 4  
 10 muestra la expresión inducible por cobre de VHD3 en cada uno de medio U2 frente a UL2 usando dos conjuntos  
 diferentes de patrones internos. Los resultados muestran que VHD3 expresa altos niveles del antígeno de VHD, y  
 puede identificarse por transferencia de Western. La expresión de antígeno fue mejor usando medio UL2. La  
 expresión calculada de antígeno fue ~23861 ng de proteína por Y.U. para la levadura que expresa la SEQ ID NO: 36  
 15 (VHD3). Se seleccionó VHD3 para experimentación adicional.

### Ejemplo 3

El siguiente ejemplo describe experimentos preclínicos en ratones para demostrar la inmunogenicidad de  
 20 composiciones de inmunoterapia de VHD basada en levadura de la invención cuando se administran *in vivo*.

En estos experimentos, se inmunicaron por vía subcutánea tres grupos de ratones C57BL/6 como en la tabla 2. Los  
 25 ratones se inmunicaron con VHD1 (SEQ ID NO: 30, véase el ejemplo 1) y VHD3 (SEQ ID NO: 36, véase el ejemplo  
 2) y con una composición de levadura de control conocida como OVAX2010 (esta levadura expresa ovalbúmina de  
 pollo que comprende un péptido líder del factor alfa del extremo N, expresión dirigida por el promotor *CUP1*).

**Tabla 2: Grupos de inmunización: ratones/C57BL/6**

Grupo	Ratones	Vacuna	Régimen (una vez por semana durante 3 semanas)
A	C57BL/6 n=5	OVAX2010	nuca 2,5 YU, flanco 2,5 YU
B	C57BL/6 n=5	VHD1	nuca 2,5 YU, flanco 2,5 YU
C	C57BL/6 n=5	VHD3	nuca 2,5 YU, flanco 2,5 YU

Los ratones se inmunicaron con un total de 5 Y.U. (en dos localizaciones a 2,5 Y.U. por sitio de inyección) de la  
 30 composición de inmunoterapia basada en levadura indicada una vez por semana durante 3 semanas en total. Ocho  
 días después de la tercera inmunización, los ratones se sacrificaron y se retiraron los bazo y los ganglios linfáticos,  
 se maceraron hasta suspensiones de células individuales y se contaron. Las células se colocaron en placas de 96  
 pocillos de fondo en U a 200 000 células/pocillo ( $10^6$  células/ml) y se añadieron antígenos peptídicos específicos de  
 35 VHD a 30 µg/ml. Después de una incubación de 4 días en una incubadora humidificada de 37 °C/CO<sub>2</sub> al 5 %, se  
 transfirieron 150 µl (150 000 células) a placas ELISpot de interleucina-2/interferón-γ (IL-2/IFN-γ) dobles (R&D  
 Systems) durante 24 horas. Las placas se revelaron según las instrucciones del fabricante y se contaron las  
 manchas usando instrumentación y programa informático de recuento de manchas validados (CTL Inc.). Los  
 péptidos de VHD usados en este ensayo fueron:

- 40 • VHD 26-34 (que se une a HLA-A2): KLEDLERDL; SEQ ID NO: 20  
 • VHD 43-51 (que se une a HLA-A2): KLEDENPWL; SEQ ID NO: 19

Los resultados de este experimento se muestran en las figuras 5A, 5B, 6A y 6B. La figura 5A muestra que la  
 45 vacunación con VHD1 o VHD3 provoca una respuesta ELISpot de IFN-γ específica de VHD que se reveló  
 específicamente por la adición *ex vivo* de un péptido de epítopo de linfocitos-T de VHD conocido (P2: VHD 43-51 o  
 SEQ ID NO: 19; p=0,0008 VHD3 frente a OVAX). Este resultado es significativo porque IFN-γ es un componente  
 clave de una respuesta inmunitaria adaptativa funcional; se produce por linfocitos-T efectores que son Th1CD4<sup>+</sup> y  
 50 linfocitos-T citotóxicos (CTL) CD8<sup>+</sup> en el desarrollo de inmunidad funcional. Aunque hubo un nivel notable de  
 manchas de ELISpot de fondo en pocillos que contenían únicamente medio de cultivo, la especificidad del antígeno  
 de la respuesta inmunitaria está clara incluso después de sustraer este fondo de los recuentos de ELISpot tratados  
 con péptido (figura 5B). De forma notable, VHD3 provocó una respuesta ELISpot 3,5 veces mayor que VHD1 (figura  
 5B; 42 manchas para VHD3 frente a 12 manchas para VHD1) y contiene un recuento de antígenos de VHD ~3,3  
 veces superior que VHD1 (23861 Ng/YU para VHD3 frente a 7171 Ng/YU para VHD1). Este hallazgo ilustra que un  
 55 recuento mayor de antígenos por célula de levadura se correlaciona con una mayor frecuencia de linfocitos-T  
 específicos de antígeno provocados por la inmunoterapia con levadura.

Los resultados del ensayo de ELISpot de IL-2 también revelaron la inducción de una respuesta inmunitaria  
 60 específica de antígeno contra la vacunación con VHD-1. La figura 6A muestra que la vacunación con VHD1 provoca  
 una respuesta ELISpot de IL-2 que se revela específicamente por adición *ex vivo* de un péptido de VHD diferente  
 (P1: VHD-26-34 o SEQ ID NO: 20; p=0,02 VHD1 frente a OVAX). Este resultado confirma la calidad de la respuesta  
 inmunitaria inducida por la vacunación inmunoterapéutica de levadura-VHD porque IL-2 estimula el crecimiento,

diferenciación y supervivencia de linfocitos-T citotóxicos específicos de antígeno. Aunque hay un nivel notable de manchas de ELISpot de IL-2 de fondo para muestras incubadas con medio de cultivo únicamente ("sin estim." en la figura 6A), la especificidad de antígeno de la respuesta inmunitaria es clara incluso después de la sustracción de este fondo de los recuentos de ELISpot tratados con péptido (figura 6B). El número de manchas de ELISpot de IL-2 5 con el fondo corregido para ratones vacunados con VHD1 es el doble de los ratones vacunados con OVAX.

Tomados en conjunto, los datos de ELISpot de IFN-γ e IL-2 muestran que las composiciones inmunoterapéuticas basadas en levadura de VHD de la invención provocan linfocitos-T específicos de antígeno como resultado de la administración *in vivo*, que producen citocinas que son marcadores conocidos de inducción de CTL, y que ilustran la 10 utilidad de estas composiciones para la inducción de respuestas anti-VHD funcionales.

#### Ejemplo 4

El siguiente ejemplo describe un ensayo clínico en fase 1 en voluntarios sanos.

15 Se realiza un estudio clínico en fase 1 con escala de dosis al descubierto de 12 semanas usando una composición de inmunoterapia de VHD basada en levadura descrita en este documento (por ejemplo, la composición de inmunoterapia contra VHD descrita en los ejemplos 1 o 2). Los resultados son voluntarios inmunoactivos y sanos sin indicación previa o en curso o registro de infección por VHD o infección por VHB.

20 A aproximadamente 48 sujetos (6 brazos, 8 sujetos por brazo) que cumplen estos criterios se les administra la composición de inmunoterapia de VHD basada en levadura en un protocolo de escala de cohorte de dosis secuencial utilizando uno de dos protocolos de dosificación de la siguiente manera:

25 Protocolo A: Dosificación de sensibilización-refuerzo (4 dosis semanales empezando en el día 1, seguidas por 2 dosis mensuales en la semana 4 y la semana 8)

- Brazo 1A: 20 unidades de levadura (Y.U.) (administradas en dosis de 10 Y.U. a 2 sitios diferentes)
- Brazo 2A: 40 Y.U. (administradas en dosis de 10 Y.U. a 4 sitios diferentes);
- Brazo 3A: 80 Y.U. (administradas en dosis de 20 Y.U. a 4 sitios diferentes)

Dosificación cada 4 semanas (tres dosis totales administradas en el día 1, semana 4 y semana 8)

- 30
- Brazo 1B: 20 Y.U. (administradas en dosis de 10 Y.U. a 2 sitios diferentes);
  - Brazo 2B: 40 Y.U. (administradas en dosis de 10 Y.U. a 4 sitios diferentes);
  - Brazo 3B: 80 Y.U. (administradas en dosis de 20 Y.U. a 4 sitios diferentes)

Todas las dosis se administran por vía subcutánea y la dosis se divide entre dos o cuatro sitios en el organismo (cada visita) como se indica anteriormente. La seguridad y la inmunogenicidad (por ejemplo, respuestas de linfocitos-T específicos de antígeno medidas por ELISpot y proliferación de linfocitos-T) se evalúan. Específicamente, se 35 desarrolla un algoritmo basado en ELISpot para individuos categóricos que responden. Los ensayos ELISpot que miden los linfocitos-T reguladores (Treg) también se evalúan y se evalúa la proliferación de linfocitos-T CD4<sup>+</sup> en respuesta a antígenos de VHD y se correlacionan con el desarrollo de anticuerpos anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA).

40 Se espera que el agente inmunoterapéutico contra VHD basado en levadura se tolere bien y muestre inmunogenicidad medida por uno o más de ensayo ELISpot, ensayo de proliferación de linfocitos (LPA), estimulación de linfocitos-T *ex vivo* por antígenos de VHB y/o ASCA.

#### Ejemplo 5

45 El siguiente ejemplo describe un ensayo clínico en fase 1b/2a en sujetos infectados de forma crónica tanto con virus de hepatitis D como con virus de hepatitis B (brazo terapéutico) o monoinfectados con virus de hepatitis B (brazo profiláctico).

50 Se ejecuta un ensayo clínico en fase 1b/2a de escala de dosis al descubierto usando una composición de inmunoterapia contra VHD basada en levadura descrita en este documento (por ejemplo, la composición de inmunoterapia contra VHD descrita en los ejemplos 1 o 2). En el brazo 1 (brazo de tratamiento terapéutico de VHD), los sujetos son inmunoactivos y están infectados de forma crónica tanto con virus de hepatitis B (VHB) como con virus de hepatitis D (VHD). En el brazo 2 (brazo de profilaxis para VHD), los sujetos son inmunoactivos y están 55 infectados de forma crónica con VHB sin evidencias de coinfección con VHD (es decir, monoinfección con VHB). En cada brazo, la infección crónica por VHB está bien controlada por tratamiento antivírico contra VHB convencional (por ejemplo, fumarato de tenofovir disoproxilo o TDF (VIREAD®)) medida por los niveles de ADN de VHB.

- En la fase uno de este estudio, a los sujetos de ambos brazos que cumplen los criterios relevantes se les administra la composición de inmunoterapia de VHD basada en levadura en un protocolo de escala de cohorte de dosis secuencial utilizando intervalos de dosis de 0,05 Y.U. a 80 Y.U. Opcionalmente, una única cohorte de pacientes recibirá inyecciones subcutáneas de placebo (PBS) en la misma pauta que la inmunoterapia más tratamiento antivírico continuado. Existen normas conservativas de detención para brotes de ALT y signos de descompresión.
- En la segunda fase de cada brazo de este ensayo, los sujetos se asignan aleatoriamente a cohortes de cantidades iguales para continuar con antivíricos en solitario o antivíricos más el protocolo inmunoterapéutico contra VHD basado en levadura (dosis 1 y dosis 2) durante hasta 48 semanas. Los pacientes del brazo 2 pueden tener un seguimiento opcional durante un plazo más largo (más allá de 48 semanas) para controlar las tasas de infección por VHD. En el brazo 2, una única cohorte de pacientes recibirá inyecciones subcutáneas de placebo (PBS) en la misma pauta que la inmunoterapia contra VHD, más tratamiento antivírico continuado para VHB.
- En el brazo 1, se evalúa la seguridad, la cinética vírica de VHD, la seroconversión de AgHD y la inmunogenicidad específica de VHD (por ejemplo, respuestas de linfocitos-T específicos de antígeno medidas por ELISpot), así como seroconversión de AgHB para medir los efectos del tratamiento de VHB simultáneamente. Además, se controla la bioquímica dependiente de la dosis (ALT).
- En el brazo 2, se evalúan la seguridad y la inmunogenicidad específica de VHD (por ejemplo, respuestas de linfocitos-T específicos de antígeno medidas por ELISpot), así como la seroconversión de AgHB simultáneamente, y los sujetos se controlan de forma rutinaria para indicaciones de infección por VHD, incluyendo por detección de ARN de VHD, detección del antígeno de VHD (AgHD) y/o detección de anti-VHD (anticuerpos contra VHD).
- En el brazo 1 (terapéutico), se espera que la composición de inmunoterapia contra VHD basada en levadura proporcione un beneficio terapéutico a pacientes infectados por VHD de forma crónica. Se espera que la inmunoterapia sea segura y esté bien tolerada a todas las dosis suministradas. Se espera que los pacientes que reciben al menos la dosis máxima de inmunoterapia contra VHD basada en levadura muestren respuestas de linfocitos-T específicos de VHD que surgen por el tratamiento determinadas por ELISpot, y se espera que los pacientes con respuestas de linfocitos-T específicos de VHD basales previas muestren respuestas de linfocitos-T específicas de VHD mejoradas mientras están en tratamiento. Se espera que los pacientes que reciben inmunoterapia contra VHD basada en levadura muestren reducciones en el ARN de VHD y/o mejora en las tasas de seroconversión de VHD en comparación con el grupo antivírico y/o en comparación con el grupo controlado con placebo, si se utilizan. Se esperan mejoras en la normalización de ALT en pacientes que reciben inmunoterapia contra VHD basada en levadura.
- En el brazo 2 (profilaxis), se espera que la composición de inmunoterapia contra VHD basada en levadura proporcione protección contra la coinfección de los pacientes monoinfectados con VHB con VHD, incluyendo evidencias de tasas disminuidas de coinfección con VHD, gravedad reducida de los síntomas y secuelas asociadas con infección por VHD, supervivencia global aumentada y/o eliminación aumentada de la infección por VHD como enfermedad aguda, en comparación con el control (grupo de placebo). Además, se espera que los pacientes que reciben al menos la dosis máxima de inmunoterapia de VHD basada en levadura muestren respuestas de linfocitos-T específicos de VHD que surgen por el tratamiento determinadas por ELISpot.
- LISTADO DE SECUENCIAS**
- <110> Globelimmune, Inc.  
 King, Thomas H.  
 David, Apelian H.
- <120> Composiciones y métodos para el tratamiento o prevención de infección por virus de hepatitis delta  
<130> 3923-39-PCT  
<150> 61/497.039
- <151> 14/06/2011  
<160> 36  
<170> PatentIn versión 3.5  
<210> 1  
<211> 1676  
<212> ADN  
<213> virus de hepatitis D  
<400> 1

## ES 2 671 381 T3

catggccat ctccgagcga	60
acggtaaaga gcgttggatc	120
acggac gattccccca tgactctgga	180
gaaaagaagg agctggcct cccgatccga	240
ccggccgaaa ggtcgaggta cccagaagga	300
cctccagagg accccttcag cgaacagaga	360
gatagggaga gatgcttagga	420
acggggctag tcggtggtg ttccgc	480
gaactcggcg aatcgcccc acatagcagc	540
tcccggagcc cttccaaaa tgaccgaggg	
gggtggctag gaacgcgggg gaccagtgga	600
gccatggat gcccttcccg atgtccgatc	
atctccctcc ccccgagtg tcgcccagga	660
atggcgggac cccactcaac tgggtccgc	
gttccatcct ttcttacctg atggccggca	720
tggtcccagc ctcccggtg ggcacatcc	
cgaaacattc cgaaggggac cgtccctcg	780
taatggcgaa tgggaccag aagtctct	
agattcccag agagaatcga	840
gagaaaactg gctctccctt agccatccga	
gtggacgctc gtcctccctc ggatgcccag	900
gtcggaccgc gaggaggtgg agatccatg	
ccgacccgaa gagaaagaa ggacgcgaga	960
cacgaacccg tgagtggaaa cccgtttat	
tcactgggt cgacaactct gggagaaaa	1020
gggaggatcg gctggaaaga gtatatccta	
tggatccc tcacgtccag cccctcccg	1080
gtcctggaga agggggactc cggacgctt	
agcatgttg ggacgaagcc	1140
gccccgggc gctccctcg atccacccctc	
gagggggttc acaccccaa ccgacgggccc	1200
ggctgttctt cttcccttc tctcgttcc	
ctcggtcaac ctcttaagtt cctttcttc	1260
ttcattgctg aggtgcttcc ctcccgccgc	
cagctgttt ctcttgttct cgagggcctt	1320
cattcgatcg tgatcctgcc ttcattgttc	
ggagaaccct cccctgagag gcctcttccc	1380
aggcccgag tctatctcca tctggccgt	
tccgcgggg gagccccctc tccatccta	1440
tcttcttcc tcagaattcc tttgatgttt	
cccagccagg gatttcgtc ctcaagttt	1500
ttgattttct tcttaatctt ccggagggtcc	
ctctcgagat cctctaactt ctttcttccg	1560
tttacccact gtcgaggat cccctctttt	
ccgtcgcgat tcctcttcga ctccgaacgg	1620
ctcatctcga caagaggcga cggcctcag	
tactcttact ctttctgtt aagaggagac	1676
tgctggactc gacgccccgag ttccgag	

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 214

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; virus de hepatitis D

ES 2 671 381 T3

<400> 2

Met Ser Arg Ser Glu Ser Lys Arg Asn Arg Asp Gly Arg Glu Gly Ile  
1 5 10 15

Leu Glu Gln Trp Val Asn Gly Arg Lys Lys Leu Glu Asp Leu Glu Arg  
20 25 30

Asp Leu Arg Lys Ile Lys Lys Ile Lys Lys Leu Glu Asp Glu Asn  
35 40 45

Pro Trp Leu Gly Asn Ile Lys Gly Ile Leu Gly Lys Lys Asp Lys Asp  
50 55 60

Gly Glu Gly Ala Pro Pro Ala Lys Arg Ala Arg Thr Asp Gln Met Glu  
65 70 75 80

Ile Asp Ser Gly Pro Gly Lys Arg Pro Leu Arg Gly Gly Phe Ser Asp  
85 90 95

Lys Glu Arg Gln Asp His Arg Arg Arg Lys Ala Leu Glu Asn Lys Arg  
100 105 110

Lys Gln Leu Ala Ala Gly Gly Lys His Leu Ser Lys Glu Glu Glu Glu  
115 120 125

Glu Leu Lys Arg Leu Thr Glu Glu Asp Glu Arg Arg Glu Arg Arg Thr  
130 135 140

Ala Gly Pro Ser Val Gly Gly Val Asn Pro Leu Glu Gly Gly Ser Arg  
145 150 155 160

Gly Ala Pro Gly Gly Phe Val Pro Asn Met Leu Ser Val Pro Glu  
165 170 175

Ser Pro Phe Ser Arg Thr Gly Glu Gly Leu Asp Val Arg Gly Asn Gln  
180 185 190

Gly Phe Pro Trp Asp Ile Leu Phe Pro Ala Asp Pro Pro Phe Ser Pro  
195 200 205

Gln Ser Cys Arg Pro Gln  
210

5 <210> 3

<211> 195

<212> PRT

<213> virus de hepatitis D

10 <400> 3

## ES 2 671 381 T3

Met Ser Arg Ser Glu Ser Lys Arg Asn Arg Asp Gly Arg Glu Gly Ile  
 1 5 10 15

Leu Glu Gln Trp Val Asn Gly Arg Lys Lys Leu Glu Asp Leu Glu Arg  
 20 25 30

Asp Leu Arg Lys Ile Lys Lys Ile Lys Lys Leu Glu Asp Glu Asn  
 35 40 45

Pro Trp Leu Gly Asn Ile Lys Gly Ile Leu Gly Lys Lys Asp Lys Asp  
 50 55 60

Gly Glu Gly Ala Pro Pro Ala Lys Arg Ala Arg Thr Asp Gln Met Glu  
 65 70 75 80

Ile Asp Ser Gly Pro Gly Lys Arg Pro Leu Arg Gly Gly Phe Ser Asp  
 85 90 95

Lys Glu Arg Gln Asp His Arg Arg Lys Ala Leu Glu Asn Lys Arg  
 100 105 110

Lys Gln Leu Ala Ala Gly Gly Lys His Leu Ser Lys Glu Glu Glu  
 115 120 125

Glu Leu Lys Arg Leu Thr Glu Glu Asp Glu Arg Arg Glu Arg Arg Thr  
 130 135 140

Ala Gly Pro Ser Val Gly Gly Val Asn Pro Leu Glu Gly Ser Arg  
 145 150 155 160

Gly Ala Pro Gly Gly Phe Val Pro Asn Met Leu Ser Val Pro Glu  
 165 170 175

Ser Pro Phe Ser Arg Thr Gly Glu Gly Leu Asp Val Arg Gly Asn Gln  
 180 185 190

Gly Phe Pro  
 195

<210> 4  
 <211> 1688

5 <212> ADN  
 <213> virus de hepatitis D

<400> 4

# ES 2 671 381 T3

atggggcgca agccgaacga aggattccgg taaggggaga ggaagaatcc cgaagggtt	60
ccccactaaa gagtggaaaga attctcgga agcttctccc aagaagaacc agaatcccc	120
aagagagaga atggatcccc atgacgctgg aagagactcc gggtaaccaa gtcaaggaga	180
aggaacggta gaaaagagcg agcctctcgta tacgaaaggg ccgcgaccta tcaagttgg	240
agtcatccgg gccaaagggt tgaaaaatcc cacagacggg agccaccagg agggatctag	300
gagaatccac ctccagagga cccccctcaa tgaacagaag actctctacc tcggaggaaa	360
aagaccatag cgataggaag agatgctagg agtaggcggc gaccaaagcg aggaagaaag	420
taaagaaagc aacggggcta gcgagtggat gttccgcccc aaggggagcc gagtgaggct	480
tatcccgggg aactcggcgt atcgtcccga aatgaggagc ccggatcccc ttccaaaaag	540
acggagaggg ggtgactagg aatcgggctc cggtgatcc gtgggaccag cccgctccac	600
ctccggca cactccttcc cccctgcggg cccccccata agatggcagg aacccactca	660
ttggggtccg ctgttccatt ctttcttacc ttgtggccgg catggtccca gcctcctcgc	720
tggccggc tggcaacat tccgagggga ccgtccctcg gtaatggcga atgggaccca	780
gaactctctc tagattccca gagagaatcg agagaaaact ggctctccct tagccatccg	840
agtaggacgt ctgtcctccct acggatgccc aggtcggacc gcgaggaggt ggagatgcca	900
tgccgaccgg aagagggaaag aagaacacgg acgcgaaccc gtaagtggaa ccctgatcct	960
ttattggggg gtacactcga ggagtggaaag ggcgtgcccc gggggagccg gattgaccta	1020
cgggaatccc cggtcgcctc tgatgtccag tccctcccc gtccgagaga agggagattc	1080
cggaaactcca gtcatttgag ggacgaagcc gccccgggc gtcacccctcg gacttcctcc	1140
aggagggttc acatccccaa cccgcgggcc ggctacttt ctttgtttt cgtcgtcttc	1200
aatggtaac ctcctgagtt cctcttcttc ttccttgctg aggcttttc ccccccggga	1260
gagttggttc ttcttggttc ggagggcctt cttctgcgg tggcctgccc ttccttgtc	1320
ggtaaccccg ctcttggtag gtttcttcctt aggtccggag tcgacccctca tctgatctgt	1380
tccggccctc ttgcgggggg gagctccctc cccgtcccttc cttttctta tgattcccg	1440
gatgtcccccc agccaggat tgcatacctc gagtcttttgc atggcttttc tggccttccg	1500
gagggtctctc tcgagctttt ccgcctttt tcttgtggat acccactttt cgaggatatc	1560
ttcccttcctt cccctccggc ttttcctcga ttccggattgg ctcatacctcg acgaggggcga	1620
cggtcctcag ttctctctat tctttcttt tgaaagagga gactgctggt ccaaacgccc	1680
gagtcggg	1688

<210> 5

<211> 214

<212> PRT

<213> virus de hepatitis D

ES 2 671 381 T3

<400> 5

Met Ser Gln Ser Glu Ser Arg Lys Ser Arg Arg Gly Gly Arg Glu Asp  
1 5 10 15

Ile Leu Glu Lys Trp Val Ser Thr Arg Lys Lys Ala Glu Glu Leu Glu  
20 25 30

Arg Asp Leu Arg Lys Ala Arg Lys Thr Ile Lys Arg Leu Glu Asp Asp  
35 40 45

Asn Pro Trp Leu Gly Asn Ile Leu Gly Ile Ile Arg Lys Gly Lys Asp  
50 55 60

Gly Glu Gly Ala Pro Pro Ala Lys Arg Ala Arg Thr Asp Gln Met Glu  
65 70 75 80

Val Asp Ser Gly Pro Arg Lys Lys Pro His Lys Ser Gly Phe Thr Asp  
85 90 95

Lys Glu Arg Gln Asp His Arg Arg Arg Lys Ala Leu Gln Asn Lys Lys  
100 105 110

Asn Gln Leu Ser Ala Gly Gly Lys Ser Leu Ser Lys Glu Glu Glu Glu  
115 120 125

Glu Leu Arg Arg Leu Thr Ile Glu Asp Asp Glu Arg Gln Arg Arg Val  
130 135 140

Ala Gly Pro Arg Val Gly Asp Val Asn Pro Pro Gly Gly Ser Pro Arg  
145 150 155 160

Gly Ala Pro Gly Gly Phe Val Pro Gln Met Thr Gly Val Pro Glu  
165 170 175

Ser Pro Phe Ser Arg Thr Gly Glu Gly Leu Asp Ile Arg Gly Asp Arg  
180 185 190

Gly Phe Pro Trp Val Asn Pro Ala Pro Pro Gly Gln Arg Leu Pro Leu  
195 200 205

Leu Glu Cys Thr Pro Gln  
210

5

<210> 6

<211> 195

<212> PRT

<213> virus de hepatitis D

ES 2 671 381 T3

<400> 6

Met Ser Gln Ser Glu Ser Arg Lys Ser Arg Arg Gly Gly Arg Glu Asp  
1 5 10 15

Ile Leu Glu Lys Trp Val Ser Thr Arg Lys Lys Ala Glu Glu Leu Glu  
20 25 30

Arg Asp Leu Arg Lys Ala Arg Lys Thr Ile Lys Arg Leu Glu Asp Asp  
35 40 45

Asn Pro Trp Leu Gly Asn Ile Leu Gly Ile Ile Arg Lys Gly Lys Asp  
50 55 60

Gly Glu Gly Ala Pro Pro Ala Lys Arg Ala Arg Thr Asp Gln Met Glu  
65 70 75 80

Val Asp Ser Gly Pro Arg Lys Lys Pro His Lys Ser Gly Phe Thr Asp  
85 90 95

Lys Glu Arg Gln Asp His Arg Arg Arg Lys Ala Leu Gln Asn Lys Lys  
100 105 110

Asn Gln Leu Ser Ala Gly Gly Lys Ser Leu Ser Lys Glu Glu Glu Glu  
115 120 125

Glu Leu Arg Arg Leu Thr Ile Glu Asp Asp Glu Arg Gln Arg Arg Val  
130 135 140

Ala Gly Pro Arg Val Gly Asp Val Asn Pro Pro Gly Gly Ser Pro Arg  
145 150 155 160

Gly Ala Pro Gly Gly Phe Val Pro Gln Met Thr Gly Val Pro Glu  
165 170 175

Ser Pro Phe Ser Arg Thr Gly Glu Gly Leu Asp Ile Arg Gly Asp Arg  
180 185 190

Gly Phe Pro  
195

5 <210> 7  
<211> 1677  
<212> ADN  
<213> virus de hepatitis D

10 <400> 7

## ES 2 671 381 T3

tgggcccgtt ccggcaaggg ggtccgaaat cgagagcggg ggagaactcc cgagagttgg	60
gagaagaaaag agggcgaaaa ttctcgacg gatccccaa gctccaaca gaggaagaga	120
acaagataga ggagccccc cgacgctagc aaaccgtcgc gcactggag aggagtggc	180
ggaagataga aacggagacc ccggtccgaa tgccaatcg cagcaaactc ctctggagtc	240
ctccggccg aaaggagaaa actaccggcg gagggtgatc cacccggagt tgaacggaca	300
agccacatcc agaggacccc ttcggcgaac agaagaccct ggtaccggga gggaatagcc	360
catagtacaa gggagatgc taggagtcgg aggaagccag aacgactgag aaagcaaaga	420
gagcaacggg gctagccacc gggtgttcca tccatggat cggtggcag tgaggcttat	480
cccggggtg acgcctcgcc ctttccttag catcgaaatc cggggccccc tcccaggaat	540
gggaacaggg ggagatcgac cggggcccgc aggaccgat ggagttcccc caccatccct	600
tccggacgaa aactggtccc gatagggca cccacaatag gatggcaaaa gggactctc	660
gggtccgtcg ttccatcctt ttcttactc gtggccggca tggcccccagc ctccctcgctg	720
gcgcggctg ggcaacgatc cgagggagct actcctctcg agaatcgca aatggggccc	780
ctcgctcgta tctccgagag gagacgagaa ggaggtggat ctcccttgc catccgaggg	840
agctacgctc tccttacgga tgcccaggc ggaccgcgag gaggtggaga tcccatgccg	900
acccgaagag gaaaggagga cacggacgac aaaccgttag ttctattgcc ctttatttt	960
gggtgcaccc tgggaccagg taatacccg ggggaggcgg ggtaaaccca tactatggaa	1020
actgctgggt tcctcgatg tcgatccct ctcccgttcg ggaaaagggg gactccggaa	1080
ctccctgcag gctgggcacg aagcccccac cgggcgtcc cctcggcggg ccgtccattg	1140
ggttcacacc cccaggtcgc gggccggctg ttcttcttc tcttcgtcg tcattccctgg	1200
ccagcctccg gagttctctt tcttcgtcg ggctgaggtg ctttccccct ccggccagtt	1260
gcttcttctt gtttccagg gccttccttc ttctgtggtc ccgcctctcc tggtcggta	1320
acccctggc ctgggtttc ctcccaggc cgaaatcaac ctccatggtt tcctgcctcg	1380
gcctttcgc cggggcgct ccgtttcgt ctttttcct tctcaacagt ccaacgacgt	1440
tccctagcca ggggttctca tcctcaagtt tcttgatctt cttgtggct cgccggagat	1500
ctttcgtcgag ctttcgctg ttcttcctt cctctaccca ctgttcgagg atctcctctc	1560
tctccttcga ggtcagcctt gcgacggttt ggctcatcct gagaccgggg agcttcgacg	1620
atctcttatac tctcctaagg aggaaggagc tctcgaacgc ccccccggct cctcgga	1677

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 214

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; virus de hepatitis D

## ES 2 671 381 T3

&lt;400&gt; 8

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

5

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 195

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; virus de hepatitis D

10

&lt;400&gt; 9

## ES 2 671 381 T3

Met Ser Gln Thr Val Ala Arg Leu Thr Ser Lys Glu Arg Glu Glu Ile  
 1 5 10 15

Leu Glu Gln Trp Val Glu Glu Arg Lys Asn Arg Arg Lys Leu Glu Lys  
 20 25 30

Asp Leu Arg Arg Ala Asn Lys Lys Ile Lys Lys Leu Glu Asp Glu Asn  
 35 40 45

Pro Trp Leu Gly Asn Val Val Gly Leu Leu Arg Arg Lys Lys Asp Glu  
 50 55 60

Asp Gly Ala Pro Pro Ala Lys Arg Pro Arg Gln Glu Thr Met Glu Val  
 65 70 75 80

Asp Ser Gly Pro Gly Arg Lys Pro Lys Ala Arg Gly Phe Thr Asp Gln  
 85 90 95

Glu Arg Arg Asp His Arg Arg Arg Lys Ala Leu Glu Asn Lys Lys Lys  
 100 105 110

Gln Leu Ala Gly Gly Lys His Leu Ser Gln Glu Glu Glu Glu  
 115 120 125

Leu Arg Arg Leu Ala Arg Asp Asp Asp Glu Arg Glu Arg Arg Thr Ala  
 130 135 140

Gly Pro Arg Pro Gly Gly Val Asn Pro Met Asp Gly Pro Pro Arg Gly  
 145 150 155 160

Ala Pro Gly Gly Phe Val Pro Ser Leu Gln Gly Val Pro Glu Ser  
 165 170 175

Pro Phe Ser Arg Thr Gly Glu Gly Ile Asp Ile Arg Gly Thr Gln Gln  
 180 185 190

Phe Pro Trp  
 195

<210> 10  
 <211> 140  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 5

<220>  
 <223> Construcción sintética  
 10

<400> 10

ES 2 671 381 T3

Asn Gly Arg Lys Lys Leu Glu Asp Leu Glu Arg Asp Leu Arg Lys Ile  
1 5 10 15

Lys Lys Lys Ile Lys Lys Leu Glu Asp Glu Asn Pro Trp Leu Gly Asn  
20 25 30

Ile Lys Gly Ile Leu Gly Lys Lys Asp Lys Asp Gly Glu Gly Ala Pro  
35 40 45

Pro Ala Lys Arg Ala Arg Thr Asp Gln Met Glu Ile Asp Ser Gly Pro  
50 55 60

Gly Lys Arg Pro Leu Arg Gly Gly Phe Ser Asp Lys Glu Arg Gln Asp  
65 70 75 80

His Arg Arg Arg Lys Ala Leu Glu Asn Lys Arg Lys Gln Leu Ala Ala  
85 90 95

Gly Gly Lys His Leu Ser Lys Glu Glu Glu Glu Leu Lys Arg Leu  
100 105 110

Thr Glu Glu Asp Glu Arg Arg Glu Arg Arg Thr Ala Gly Pro Ser Val  
115 120 125

Gly Gly Val Asn Pro Leu Glu Gly Gly Ser Arg Gly  
130 135 140

<210> 11

<211> 6

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<400> 11

Met Ala Asp Glu Ala Pro  
1 5

15

<210> 12

<211> 152

<212> PRT

<213> Artificial

20

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 12

ES 2 671 381 T3

Met Ala Asp Glu Ala Pro Asn Gly Arg Lys Lys Leu Glu Asp Leu Glu  
1 5 10 15

Arg Asp Leu Arg Lys Ile Lys Lys Ile Lys Lys Leu Glu Asp Glu  
20 25 30

Asn Pro Trp Leu Gly Asn Ile Lys Gly Ile Leu Gly Lys Lys Asp Lys  
35 40 45

Asp Gly Glu Gly Ala Pro Pro Ala Lys Arg Ala Arg Thr Asp Gln Met  
50 55 60

Glu Ile Asp Ser Gly Pro Gly Lys Arg Pro Leu Arg Gly Gly Phe Ser  
65 70 75 80

Asp Lys Glu Arg Gln Asp His Arg Arg Arg Lys Ala Leu Glu Asn Lys  
85 90 95

Arg Lys Gln Leu Ala Ala Gly Gly Lys His Leu Ser Lys Glu Glu Glu  
100 105 110

Glu Glu Leu Lys Arg Leu Thr Glu Glu Asp Glu Arg Arg Glu Arg Arg  
115 120 125

Thr Ala Gly Pro Ser Val Gly Gly Val Asn Pro Leu Glu Gly Gly Ser  
130 135 140

Arg Gly His His His His His His  
145 150

<210> 13

<211> 89

5 <212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 13

10 Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser

## ES 2 671 381 T3

1	5	10	15
---	---	----	----

Ala Ser Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln			
20	25	30	

Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Leu Asp Leu Glu Gly Asp Phe			
35	40	45	

Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu			
50	55	60	

Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val			
65	70	75	80

Ser Leu Asp Lys Arg Glu Ala Glu Ala			
85			

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 89

5 &lt;212&gt; PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

&lt;400&gt; 14

Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser			
1	5	10	15

Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln			
20	25	30	

Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Leu Asp Leu Glu Gly Asp Phe			
35	40	45	

Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu			
50	55	60	

Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val			
65	70	75	80

Ser Leu Asp Lys Arg Glu Ala Glu Ala			
85			

10 &lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 235

&lt;212&gt; PRT

15 &lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Construcción sintética

20 &lt;400&gt; 15

## ES 2 671 381 T3

Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser  
 1 5 10 15

Ala Ser Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln  
 20 25 30

Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Leu Asp Leu Glu Gly Asp Phe  
 35 40 45

Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu  
 50 55 60

Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val  
 65 70 75 80

Ser Leu Asp Lys Arg Glu Ala Glu Ala Asn Gly Arg Lys Lys Leu Glu  
 85 90 95

Asp Leu Glu Arg Asp Leu Arg Lys Ile Lys Lys Lys Ile Lys Lys Leu  
 100 105 110

Glu Asp Glu Asn Pro Trp Leu Gly Asn Ile Lys Gly Ile Leu Gly Lys  
 115 120 125

Lys Asp Lys Asp Gly Glu Gly Ala Pro Pro Ala Lys Arg Ala Arg Thr  
 130 135 140

Asp Gln Met Glu Ile Asp Ser Gly Pro Gly Lys Arg Pro Leu Arg Gly  
 145 150 155 160

Gly Phe Ser Asp Lys Glu Arg Gln Asp His Arg Arg Arg Lys Ala Leu  
 165 170 175

Glu Asn Lys Arg Lys Gln Leu Ala Ala Gly Gly Lys His Leu Ser Lys  
 180 185 190

Glu Glu Glu Glu Leu Lys Arg Leu Thr Glu Glu Asp Glu Arg Arg  
 195 200 205

Glu Arg Arg Thr Ala Gly Pro Ser Val Gly Gly Val Asn Pro Leu Glu  
 210 215 220

Gly Gly Ser Arg Gly His His His His His His  
 225 230 235

<210> 16  
 <211> 420  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

## ES 2 671 381 T3

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Construcción sintética

&lt;400&gt; 16

5

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

## ES 2 671 381 T3

Lys Ala Leu Gln Asn Lys Lys Asn Gln Leu Ser Ala Gly Gly Lys Ser  
 225                    230                    235                    240

Leu Ser Lys Glu Glu Glu Glu Leu Arg Arg Leu Thr Ile Glu Asp  
 245                    250                    255

Asp Glu Arg Gln Arg Arg Val Ala Gly Pro Arg Val Gly Asp Val Asn  
 260                    265                    270

Pro Pro Gly Gly Ser Pro Arg Gly Val Glu Glu Arg Lys Asn Arg Arg  
 275                    280                    285

Lys Leu Glu Lys Asp Leu Arg Arg Ala Asn Lys Lys Ile Lys Lys Leu  
 290                    295                    300

Glu Asp Glu Asn Pro Trp Leu Gly Asn Val Val Gly Leu Leu Arg Arg  
 305                    310                    315                    320

Lys Lys Asp Glu Asp Gly Ala Pro Pro Ala Lys Arg Pro Arg Gln Glu  
 325                    330                    335

Thr Met Glu Val Asp Ser Gly Pro Gly Arg Lys Pro Lys Ala Arg Gly  
 340                    345                    350

Phe Thr Asp Gln Glu Arg Arg Asp His Arg Arg Arg Lys Ala Leu Glu  
 355                    360                    365

Asn Lys Lys Lys Gln Leu Ala Gly Gly Lys His Leu Ser Gln Glu  
 370                    375                    380

Glu Glu Glu Glu Leu Arg Arg Leu Ala Arg Asp Asp Asp Glu Arg Glu  
 385                    390                    395                    400

Arg Arg Thr Ala Gly Pro Arg Pro Gly Gly Val Asn Pro Met Asp Gly  
 405                    410                    415

Pro Pro Arg Gly  
 420

<210> 17  
 <211> 432  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

10  
 <400> 17

ES 2 671 381 T3

Met Ala Asp Glu Ala Pro Asn Gly Arg Lys Lys Leu Glu Asp Leu Glu  
1 5 10 15

Arg Asp Leu Arg Lys Ile Lys Lys Ile Lys Lys Leu Glu Asp Glu  
20 25 30

Asn Pro Trp Leu Gly Asn Ile Lys Gly Ile Leu Gly Lys Lys Asp Lys  
35 40 45

Asp Gly Glu Gly Ala Pro Pro Ala Lys Arg Ala Arg Thr Asp Gln Met  
50 55 60

Glu Ile Asp Ser Gly Pro Gly Lys Arg Pro Leu Arg Gly Phe Ser  
65 70 75 80

Asp Lys Glu Arg Gln Asp His Arg Arg Lys Ala Leu Glu Asn Lys  
85 90 95

Arg Lys Gln Leu Ala Ala Gly Gly Lys His Leu Ser Lys Glu Glu Glu  
100 105 110

Glu Glu Leu Lys Arg Leu Thr Glu Glu Asp Glu Arg Arg Glu Arg Arg  
115 120 125

Thr Ala Gly Pro Ser Val Gly Gly Val Asn Pro Leu Glu Gly Ser  
130 135 140

Arg Gly Val Ser Thr Arg Lys Lys Ala Glu Glu Leu Glu Arg Asp Leu  
145 150 155 160

Arg Lys Ala Arg Lys Thr Ile Lys Arg Leu Glu Asp Asp Asn Pro Trp  
165 170 175

Leu Gly Asn Ile Leu Gly Ile Ile Arg Lys Gly Lys Asp Gly Glu Gly  
180 185 190

Ala Pro Pro Ala Lys Arg Ala Arg Thr Asp Gln Met Glu Val Asp Ser  
195 200 205

Gly Pro Arg Lys Lys Pro His Lys Ser Gly Phe Thr Asp Lys Glu Arg  
210 215 220

Gln Asp His Arg Arg Lys Ala Leu Gln Asn Lys Lys Asn Gln Leu  
225 230 235 240

Ser Ala Gly Gly Lys Ser Leu Ser Lys Glu Glu Glu Glu Leu Arg  
245 250 255

ES 2 671 381 T3

Arg Leu Thr Ile Glu Asp Asp Glu Arg Gln Arg Arg Val Ala Gly Pro  
260 265 270

Arg Val Gly Asp Val Asn Pro Pro Gly Gly Ser Pro Arg Gly Val Glu  
275 280 285

Glu Arg Lys Asn Arg Arg Lys Leu Glu Lys Asp Leu Arg Arg Ala Asn  
290 295 300

Lys Lys Ile Lys Lys Leu Glu Asp Glu Asn Pro Trp Leu Gly Asn Val  
305 310 315 320

Val Gly Leu Leu Arg Arg Lys Lys Asp Glu Asp Gly Ala Pro Pro Ala  
325 330 335

Lys Arg Pro Arg Gln Glu Thr Met Glu Val Asp Ser Gly Pro Gly Arg  
340 345 350

Lys Pro Lys Ala Arg Gly Phe Thr Asp Gln Glu Arg Arg Asp His Arg  
355 360 365

Arg Arg Lys Ala Leu Glu Asn Lys Lys Lys Gln Leu Ala Gly Gly Gly  
370 375 380

Lys His Leu Ser Gln Glu Glu Glu Glu Leu Arg Arg Leu Ala Arg  
385 390 395 400

Asp Asp Asp Glu Arg Glu Arg Arg Thr Ala Gly Pro Arg Pro Gly Gly  
405 410 415

Val Asn Pro Met Asp Gly Pro Pro Arg Gly His His His His His His  
420 425 430

<210> 18

<211> 515

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<400> 18

Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser  
1 5 10 15

Ala Ser Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln  
20 25 30

## ES 2 671 381 T3

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

ES 2 671 381 T3

Val Asp Ser Gly Pro Arg Lys Lys Pro His Lys Ser Gly Phe Thr Asp  
290 295 300

Lys Glu Arg Gln Asp His Arg Arg Arg Lys Ala Leu Gln Asn Lys Lys  
305 310 315 320

Asn Gln Leu Ser Ala Gly Gly Lys Ser Leu Ser Lys Glu Glu Glu  
325 330 335

Glu Leu Arg Arg Leu Thr Ile Glu Asp Asp Glu Arg Gln Arg Arg Val  
340 345 350

Ala Gly Pro Arg Val Gly Asp Val Asn Pro Pro Gly Gly Ser Pro Arg  
355 360 365

Gly Val Glu Glu Arg Lys Asn Arg Arg Lys Leu Glu Lys Asp Leu Arg  
370 375 380

Arg Ala Asn Lys Lys Ile Lys Lys Leu Glu Asp Glu Asn Pro Trp Leu  
385 390 395 400

Gly Asn Val Val Gly Leu Leu Arg Arg Lys Lys Asp Glu Asp Gly Ala  
405 410 415

Pro Pro Ala Lys Arg Pro Arg Gln Glu Thr Met Glu Val Asp Ser Gly  
420 425 430

Pro Gly Arg Lys Pro Lys Ala Arg Gly Phe Thr Asp Gln Glu Arg Arg  
435 440 445

Asp His Arg Arg Arg Lys Ala Leu Glu Asn Lys Lys Lys Gln Leu Ala  
450 455 460

Gly Gly Gly Lys His Leu Ser Gln Glu Glu Glu Glu Leu Arg Arg  
465 470 475 480

Leu Ala Arg Asp Asp Asp Glu Arg Glu Arg Arg Thr Ala Gly Pro Arg  
485 490 495

Pro Gly Gly Val Asn Pro Met Asp Gly Pro Pro Arg Gly His His His  
500 505 510

His His His  
515

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

ES 2 671 381 T3

<213> virus de hepatitis D

<400> 19

5                   Lys Leu Glu Asp Glu Asn Pro Trp Leu  
                  1                         5

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

10                  <213> virus de hepatitis D

<400> 20

15                   Lys Leu Glu Asp Leu Glu Arg Asp Leu  
                  1                         5

<210> 21

<211> 16

<212> PRT

20                  <213> virus de hepatitis D

<400> 21

25                   Lys Leu Glu Asp Leu Glu Arg Asp Leu Arg Lys Ile Lys Lys Lys Ile  
                  1                         5                         10                         15

<210> 22

<211> 16

<212> PRT

30                  <213> virus de hepatitis D

<400> 22

35                   Trp Leu Gly Asn Ile Lys Gly Ile Leu Gly Lys Lys Asp Lys Asp Gly  
                  1                         5                         10                         15

<210> 23

<211> 16

<212> PRT

40                  <213> virus de hepatitis D

<400> 23

45                   Ala Gly Ala Pro Pro Ala Lys Arg Ala Arg Thr Asp Gln Met Glu Ile  
                  1                         5                         10                         15

<210> 24

<211> 16

50                  <212> PRT

<213> virus de hepatitis D

<400> 24

55                   Ala Arg Thr Asp Gln Met Glu Ile Asp Ser Gly Pro Gly Lys Arg Pro  
                  1                         5                         10                         15

<210> 25

<211> 16

<212> PRT

<213> virus de hepatitis D

<400> 25

ES 2 671 381 T3

Lys Ala Leu Glu Asn Lys Arg Lys Gln Leu Ala Ala Gly Gly Lys His  
1 5 10 15

<210> 26

<211> 32

5 <212> PRT

<213> virus de hepatitis D

<400> 26

Leu Ser Lys Glu Glu Glu Glu Leu Lys Arg Leu Thr Glu Glu Asp  
1 5 10 15

Glu Arg Arg Glu Arg Arg Thr Ala Gly Pro Ser Val Gly Gly Val Asn  
10 20 25 30

<210> 27

<211> 10

15 <212> PRT

<213> virus de hepatitis D

<400> 27

Ala Gly Ala Pro Pro Ala Lys Arg Ala Arg  
20 1 5 10

<210> 28

<211> 204

<212> PRT

25 <213> Artificial

<220>

<223> construcción sintética

<400> 28

30 Met Ser Arg Ser Glu Ser Lys Arg Asn Arg Asp Gly Arg Glu Gly Ile  
1 5 10 15

Leu Glu Gln Trp Val Asn Gly Arg Lys Lys Leu Glu Asp Leu Glu Arg  
20 25 30

Asp Leu Arg Lys Ile Lys Lys Ile Lys Lys Leu Glu Asp Glu Asn  
35 40 45

Pro Trp Leu Gly Asn Ile Lys Gly Ile Leu Gly Lys Lys Asp Lys Asp  
50 55 60

## ES 2 671 381 T3

Gly Thr Asp Gln Met Glu Ile Asp Ser Gly Pro Gly Lys Arg Pro Leu  
 65                    70                    75                    80

Arg Gly Gly Phe Ser Asp Lys Glu Arg Gln Asp His Arg Arg Arg Lys  
 85                    90                    95

Ala Leu Glu Asn Lys Arg Lys Gln Leu Ala Ala Gly Gly Lys His Leu  
 100                    105                    110

Ser Lys Glu Glu Glu Glu Leu Lys Arg Leu Thr Glu Glu Asp Glu  
 115                    120                    125

Arg Arg Glu Arg Arg Thr Ala Gly Pro Ser Val Gly Gly Val Asn Pro  
 130                    135                    140

Leu Glu Gly Gly Ser Arg Gly Ala Pro Gly Gly Phe Val Pro Asn  
 145                    150                    155                    160

Met Leu Ser Val Pro Glu Ser Pro Phe Ser Arg Thr Gly Glu Gly Leu  
 165                    170                    175

Asp Val Arg Gly Asn Gln Gly Phe Pro Trp Asp Ile Leu Phe Pro Ala  
 180                    185                    190

Asp Pro Pro Phe Ser Pro Gln Ser Cys Arg Pro Gln  
 195                    200

<210> 29

<211> 677

5                    <212> ADN  
                       <213> Artificial

<220>

<223> construcción sintética

10                    <220>

<221> CDS

<222> (13)..(669)

15                    <400> 29

gaattcgcca cc atg gct gac gaa gct cct act agt atg agt aga tct gaa            51  
                       Met Ala Asp Glu Ala Pro Thr Ser Met Ser Arg Ser Glu  
                       1                    5                    10

tca aag aga aat aga gat ggc aga gag ggt att cta gaa caa tgg gtg            99  
                       Ser Lys Arg Asn Arg Asp Gly Arg Glu Gly Ile Leu Glu Gln Trp Val  
                       15                    20                    25

aat ggt aga aag aaa tta gag gac ctc gaa cgt gac ctt aga aag att            147  
                       Asn Gly Arg Lys Lys Leu Glu Asp Leu Glu Arg Asp Leu Arg Lys Ile  
                       30                    35                    40                    45

## ES 2 671 381 T3

aag aag aaa atc aaa aag ctc gaa gat gaa aac cca tgg cta ggc aat Lys Lys Lys Ile Lys Lys Leu Glu Asp Glu Asn Pro Trp Leu Gly Asn 50 55 60	195
atc aaa ggt atc tta ggt aaa aag gat aaa gac ggt aca gat caa atg Ile Lys Gly Ile Leu Gly Lys Lys Asp Lys Asp Gly Thr Asp Gln Met 65 70 75	243
gaa att gat tct ggc cca ggc aaa aga cct tta aga ggt gga ttc tct Glu Ile Asp Ser Gly Pro Gly Lys Arg Pro Leu Arg Gly Phe Ser 80 85 90	291
gat aaa gag aga caa gat cat agg cga cgt aaa gcc cta gaa aat aag Asp Lys Glu Arg Gln Asp His Arg Arg Lys Ala Leu Glu Asn Lys 95 100 105	339
aga aaa cag ttg gct gca ggg ggc aag cat ttg tca aag gag gag gaa Arg Lys Gln Leu Ala Ala Gly Gly Lys His Leu Ser Lys Glu Glu Glu 110 115 120 125	387
gag gaa ttg aaa aga ttg act gaa gag gat gaa cgt aga gaa aga cgt Glu Glu Leu Lys Arg Leu Thr Glu Glu Asp Glu Arg Arg Glu Arg Arg 130 135 140	435
aca gcg ggt cct tca gtc ggc ggt gtt aac cca tta gaa ggt ggt tca Thr Ala Gly Pro Ser Val Gly Gly Val Asn Pro Leu Glu Gly Ser 145 150 155	483
aga gga gca cct gga gga ttc gta cca aac atg ttg tcc gtt cca Arg Gly Ala Pro Gly Gly Phe Val Pro Asn Met Leu Ser Val Pro 160 165 170	531
gaa agc cca ttt tcc aga acc ggg gaa ggg ctg gac gtt aga ggt aat Glu Ser Pro Phe Ser Arg Thr Gly Glu Gly Leu Asp Val Arg Gly Asn 175 180 185	579
caa gga ttt cca tgg gat ata ctt ttt cca gca gat cca cca ttt tct Gln Gly Phe Pro Trp Asp Ile Leu Phe Pro Ala Asp Pro Pro Phe Ser 190 195 200 205	627
cct caa tct tgt agg cct cag cac cat cat cac cat cac tag gcggccgc Pro Gln Ser Cys Arg Pro Gln His His His His His His His 210 215	677
<210> 30	
<211> 218	
<212> PRT	
<213> Artificial	
<220>	
<223> Construcción sintética	
<400> 30	
Met Ala Asp Glu Ala Pro Thr Ser Met Ser Arg Ser Glu Ser Lys Arg 1 5 10 15	
Asn Arg Asp Gly Arg Glu Gly Ile Leu Glu Gln Trp Val Asn Gly Arg 20 25 30	

## ES 2 671 381 T3

Lys Lys Leu Glu Asp Leu Glu Arg Asp Leu Arg Lys Ile Lys Lys Lys  
 35 40 45

Ile Lys Lys Leu Glu Asp Glu Asn Pro Trp Leu Gly Asn Ile Lys Gly  
 50 55 60

Ile Leu Gly Lys Lys Asp Lys Asp Gly Thr Asp Gln Met Glu Ile Asp  
 65 70 75 80

Ser Gly Pro Gly Lys Arg Pro Leu Arg Gly Gly Phe Ser Asp Lys Glu  
 85 90 95

Arg Gln Asp His Arg Arg Arg Lys Ala Leu Glu Asn Lys Arg Lys Gln  
 100 105 110

Leu Ala Ala Gly Gly Lys His Leu Ser Lys Glu Glu Glu Glu Leu  
 115 120 125

Lys Arg Leu Thr Glu Glu Asp Glu Arg Arg Glu Arg Arg Thr Ala Gly  
 130 135 140

Pro Ser Val Gly Gly Val Asn Pro Leu Glu Gly Ser Arg Gly Ala  
 145 150 155 160

Pro Gly Gly Phe Val Pro Asn Met Leu Ser Val Pro Glu Ser Pro  
 165 170 175

Phe Ser Arg Thr Gly Glu Gly Leu Asp Val Arg Gly Asn Gln Gly Phe  
 180 185 190

Pro Trp Asp Ile Leu Phe Pro Ala Asp Pro Pro Phe Ser Pro Gln Ser  
 195 200 205

Cys Arg Pro Gln His His His His His His  
 210 215

<210> 31

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> construcción sintética

10

<400> 31

## ES 2 671 381 T3

Met Ser Arg Ser Glu Ser Lys Arg Asn Arg Asp Gly Arg Glu Gly Ile  
 1 5 10 15

Leu Glu Gln Trp Val Asn Gly Arg Lys Lys Leu Glu Asp Leu Glu Arg

20 25 30

Asp Leu Arg Lys Ile Lys Lys Ile Lys Lys Leu Glu Asp Glu Asn  
 35 40 45

Pro Trp Leu Gly Asn Ile Lys Gly Ile Leu Gly Lys Lys Asp Lys Asp  
 50 55 60

Gly Ala Gly Ala Pro Pro Ala Lys Arg Ala Arg Thr Asp Gln Met Glu  
 65 70 75 80

Ile Asp Ser Gly Pro Gly Lys Arg Pro Leu Arg Gly Gly Phe Ser Asp  
 85 90 95

Lys Glu Arg Gln Asp His Arg Arg Arg Lys Ala Leu Glu Asn Lys Arg  
 100 105 110

Lys Gln Leu Ala Ala Gly Gly Lys His Leu Ser Lys Glu Glu Glu  
 115 120 125

Glu Leu Lys Arg Leu Thr Glu Glu Asp Glu Arg Arg Glu Arg Arg Thr  
 130 135 140

Ala Gly Pro Ser Val Gly Gly Val Asn Pro Leu Glu Gly Gly Ser Arg  
 145 150 155 160

Gly Ala Pro Gly Gly Phe Val Pro Asn Met Leu Ser Val Pro Glu  
 165 170 175

Ser Pro Phe Ser Arg Thr Gly Glu Leu Asp Val Arg Gly Asn Gln  
 180 185 190

Gly Phe Pro Trp Asp Ile Leu Phe Pro Ala Asp Pro Pro Phe Ser Pro  
 195 200 205

Gln Ser Cys Arg Pro Gln  
 210

<210> 32

<211> 707

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

# ES 2 671 381 T3

<223> construcción sintética

5 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (13)..(699)

<400> 32

<pre> gaattcgcca cc atg gct gac gaa gct cct act agt atg agt aga tct gaa           Met Ala Asp Glu Ala Pro Thr Ser Met Ser Arg Ser Glu           1           5           10 </pre> <pre> tca aag aga aat aga gat ggc aga gag ggt att cta gaa caa tgg gtg           Ser Lys Arg Asn Arg Asp Gly Arg Glu Gly Ile Leu Glu Gln Trp Val           15          20          25 </pre> <pre> aat ggt aga aag aaa tta gag gac ctc gaa cgt gac ctt aga aag att           Asn Gly Arg Lys Lys Leu Glu Asp Leu Glu Arg Asp Leu Arg Lys Ile           30          35          40          45 </pre> <pre> aag aag aaa atc aaa aag ctc gaa gat gaa aac cca tgg cta ggc aat           Lys Lys Lys Ile Lys Leu Glu Asp Glu Asn Pro Trp Leu Gly Asn           50          55          60 </pre> <pre> atc aaa ggt atc tta ggt aaa aag gat aaa gac ggt gcc ggt gcc cca           Ile Lys Gly Ile Leu Gly Lys Asp Lys Asp Gly Ala Gly Ala Pro           65          70          75 </pre> <pre> cct gct aaa aga gct aga aca gat caa atg gaa att gat tct ggc cca           Pro Ala Lys Arg Ala Arg Thr Asp Gln Met Glu Ile Asp Ser Gly Pro           80          85          90 </pre> <pre> ggc aaa aga cct tta aga ggt gga ttc tct gat aaa gag aga caa gat           Gly Lys Arg Pro Leu Arg Gly Gly Phe Ser Asp Lys Glu Arg Gln Asp           95          100         105 </pre> <pre> cat agg cga cgt aaa gcc cta gaa aat aag aga aaa cag ttg gct gca           His Arg Arg Lys Ala Leu Glu Asn Lys Arg Lys Gln Leu Ala Ala           110         115         120         125 </pre> <pre> ggg ggc aag cat ttg tca aag gag gag gaa gag ttg aaa aga ttg           Gly Gly Lys His Leu Ser Lys Glu Glu Glu Glu Leu Lys Arg Leu           130         135         140 </pre> <pre> act gaa gag gat gaa cgt aga gaa aga cgt aca gcg ggt cct tca gtc           Thr Glu Glu Asp Glu Arg Arg Glu Arg Arg Thr Ala Gly Pro Ser Val           145         150         155 </pre> <pre> ggc ggt gtt aac cca tta gaa ggt ggt tca aga gga gca cct gga gga           Gly Gly Val Asn Pro Leu Glu Gly Gly Ser Arg Gly Ala Pro Gly Gly           160         165         170 </pre> <pre> gga ttc gta cca aac atg ttg tcc gtt cca gaa agc cca ttt tcc aga           Gly Phe Val Pro Asn Met Leu Ser Val Pro Glu Ser Pro Phe Ser Arg           175         180         185 </pre> <pre> acc ggg gaa ggg ctg gac gtt aga ggt aat caa gga ttt cca tgg gat           Thr Gly Glu Gly Leu Asp Val Arg Gly Asn Gln Gly Phe Pro Trp Asp           190         195         200         205 </pre> <pre> ata ctt ttt cca gca gat cca cca ttt tct cct caa tct tgt agg cct           Ile Leu Phe Pro Ala Asp Pro Pro Phe Ser Pro Gln Ser Cys Arg Pro           210         215         220 </pre> <pre> cag cac cat cat cac cat cac tag gcggccgc           Gln His His His His His           225 </pre>	51
	99
	147
	195
	243
	291
	339
	387
	435
	483
	531
	579
	627
	675
	707

## ES 2 671 381 T3

<210> 33  
 <211> 228  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> Construcción sintética

&lt;400&gt; 33

10

Met	Ala	Asp	Glu	Ala	Pro	Thr	Ser	Met	Ser	Arg	Ser	Glu	Ser	Lys	Arg
1								10						15	

Asn	Arg	Asp	Gly	Arg	Glu	Gly	Ile	Leu	Glu	Gln	Trp	Val	Asn	Gly	Arg
							20		25				30		

Lys	Lys	Leu	Glu	Asp	Leu	Glu	Arg	Asp	Leu	Arg	Lys	Ile	Lys	Lys	Lys
							35		40		45				

Ile	Lys	Lys	Leu	Glu	Asp	Glu	Asn	Pro	Trp	Leu	Gly	Asn	Ile	Lys	Gly
							50		55		60				

Ile	Leu	Gly	Lys	Lys	Asp	Lys	Asp	Gly	Ala	Gly	Ala	Pro	Pro	Ala	Lys
							65		70		75		80		

Arg	Ala	Arg	Thr	Asp	Gln	Met	Glu	Ile	Asp	Ser	Gly	Pro	Gly	Lys	Arg
							85		90		95				

Pro	Leu	Arg	Gly	Gly	Phe	Ser	Asp	Lys	Glu	Arg	Gln	Asp	His	Arg	Arg
							100		105		110				

Arg	Lys	Ala	Leu	Glu	Asn	Lys	Arg	Lys	Gln	Leu	Ala	Ala	Gly	Gly	Lys
							115		120		125				

His	Leu	Ser	Lys	Glu	Glu	Glu	Glu	Leu	Lys	Arg	Leu	Thr	Glu	Glu	
							130		135		140				

Asp	Glu	Arg	Arg	Glu	Arg	Arg	Thr	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Gly	Gly	Val
							145		150		155		160		

Asn	Pro	Leu	Glu	Gly	Gly	Ser	Arg	Gly	Ala	Pro	Gly	Gly	Phe	Val
							165		170		175			

Pro	Asn	Met	Leu	Ser	Val	Pro	Glu	Ser	Pro	Phe	Ser	Arg	Thr	Gly	Glu
							180		185		190				

Gly	Leu	Asp	Val	Arg	Gly	Asn	Gln	Gly	Phe	Pro	Trp	Asp	Ile	Leu	Phe
							195		200		205				

Pro	Ala	Asp	Pro	Pro	Phe	Ser	Pro	Gln	Ser	Cys	Arg	Pro	Gln	His	His

210

215

220

His	His	His	His
			225

## ES 2 671 381 T3

<210> 34  
 <211> 408  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> construcción sintética

&lt;400&gt; 34

10

Met	Ser	Arg	Ser	Glu	Ser	Lys	Arg	Asn	Arg	Asp	Gly	Arg	Glu	Gly	Ile
1				5					10				15		

Leu	Glu	Gln	Trp	Val	Asn	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu	Glu	Asp	Leu	Glu	Arg
					20			25					30		

Asp	Leu	Arg	Lys	Ile	Lys	Lys	Ile	Lys	Lys	Leu	Glu	Asp	Glu	Asn
			35			40						45		

Pro	Trp	Leu	Gly	Asn	Ile	Lys	Gly	Ile	Leu	Gly	Lys	Lys	Asp	Lys	Asp
				50			55			60					

Gly	Thr	Asp	Gln	Met	Glu	Ile	Asp	Ser	Gly	Pro	Gly	Lys	Arg	Pro	Leu
			65			70			75			80			

Arg	Gly	Gly	Phe	Ser	Asp	Lys	Glu	Arg	Gln	Asp	His	Arg	Arg	Arg	Lys
				85				90			95				

Ala	Leu	Glu	Asn	Lys	Arg	Lys	Gln	Leu	Ala	Ala	Gly	Gly	Lys	His	Leu
				100				105			110				

Ser	Lys	Glu	Glu	Glu	Glu	Leu	Lys	Arg	Leu	Thr	Glu	Glu	Asp	Glu
				115			120			125				

Arg	Arg	Glu	Arg	Arg	Thr	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Gly	Gly	Val	Asn	Pro
				130				135			140				

Leu	Glu	Gly	Gly	Ser	Arg	Gly	Ala	Pro	Gly	Gly	Gly	Phe	Val	Pro	Asn
				145			150			155			160		

Met	Leu	Ser	Val	Pro	Glu	Ser	Pro	Phe	Ser	Arg	Thr	Gly	Glu	Gly	Leu
				165				170			175				

Asp	Val	Arg	Gly	Asn	Gln	Gly	Phe	Pro	Trp	Asp	Ile	Leu	Phe	Pro	Ala
				180				185			190				

ES 2 671 381 T3

Asp Pro Pro Phe Ser Pro Gln Ser Cys Arg Pro Gln Met Ser Gln Ser  
195 200 205

Glu Ser Arg Lys Ser Arg Arg Gly Gly Arg Glu Asp Ile Leu Glu Lys  
210 215 220

Trp Val Ser Thr Arg Lys Lys Ala Glu Glu Leu Glu Arg Asp Leu Arg  
225 230 235 240

Lys Ala Arg Lys Thr Ile Lys Arg Leu Glu Asp Asp Asn Pro Trp Leu  
245 250 255

Gly Asn Ile Leu Gly Ile Ile Arg Lys Gly Lys Asp Gly Thr Asp Gln  
260 265 270

Met Glu Val Asp Ser Gly Pro Arg Lys Lys Pro His Lys Ser Gly Phe  
275 280 285

Thr Asp Lys Glu Arg Gln Asp His Arg Arg Arg Lys Ala Leu Gln Asn  
290 295 300

Lys Lys Asn Gln Leu Ser Ala Gly Gly Lys Ser Leu Ser Lys Glu Glu  
305 310 315 320

Glu Glu Glu Leu Arg Arg Leu Thr Ile Glu Asp Asp Glu Arg Gln Arg  
325 330 335

Arg Val Ala Gly Pro Arg Val Gly Asp Val Asn Pro Pro Gly Ser  
340 345 350

Pro Arg Gly Ala Pro Gly Gly Phe Val Pro Gln Met Thr Gly Val  
355 360 365

Pro Glu Ser Pro Phe Ser Arg Thr Gly Glu Gly Leu Asp Ile Arg Gly  
370 375 380

Asp Arg Gly Phe Pro Trp Val Asn Pro Ala Pro Pro Gly Gln Arg Leu  
385 390 395 400

Pro Leu Leu Glu Cys Thr Pro Gln  
405

<210> 35  
<211> 1292  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
<223> construcción sintética

## ES 2 671 381 T3

<220>  
<221> CDS  
<222> (13)..(1284)

5	<400> 35	
	gaattcgcca cc atg gct gac gaa gct cct act agt atg agt aga tct gaa Met Ala Asp Glu Ala Pro Thr Ser Met Ser Arg Ser Glu 1 5 10	51
	tca aag aga aat aga gat ggc aga gag ggt att cta gaa caa tgg gtg Ser Lys Arg Asn Arg Asp Gly Arg Glu Gly Ile Leu Glu Gln Trp Val 15 20 25	99
	aat ggt aga aag aaa tta gag gac ctc gaa cgt gac ctt aga aag att Asn Gly Arg Lys Lys Ile Glu Asp Leu Glu Arg Asp Leu Arg Lys Ile 30 35 40 45	147
	aag aag aaa atc aaa aag ctc gaa gat gaa aac cca tgg cta ggc aat Lys Lys Lys Ile Lys Leu Glu Asp Glu Asn Pro Trp Leu Gly Asn 50 55 60	195
	atc aaa ggt atc tta ggt aaa aag gat aaa gac ggt aca gat caa atg Ile Lys Gly Ile Leu Gly Lys Asp Lys Asp Gly Thr Asp Gln Met 65 70 75	243
	gaa att gat tct ggc cca ggc aaa aga cct tta aga ggt gga ttc tct Glu Ile Asp Ser Gly Pro Gly Lys Arg Pro Leu Arg Gly Gly Phe Ser 80 85 90	291
	gat aaa gag aga caa gat cat agg cga cgt aaa gcc cta gaa aat aag Asp Lys Glu Arg Gln Asp His Arg Arg Arg Lys Ala Leu Glu Asn Lys 95 100 105	339
	aga aaa cag ttg gct gca ggg ggc aag cat ttg tca aag gag gag gaa Arg Lys Gln Leu Ala Ala Gly Gly His Leu Ser Lys Glu Glu Glu 110 115 120 125	387
	gag gaa ttg aaa aga ttg act gaa gag gat gaa cgt aga gaa aga cgt Glu Glu Leu Lys Arg Leu Thr Glu Glu Asp Glu Arg Arg Glu Arg Arg 130 135 140	435
	aca gcg ggt cct tca gtc ggc ggt gtt aac cca tta gaa ggt ggt tca Thr Ala Gly Pro Ser Val Gly Gly Val Asn Pro Leu Glu Gly Gly Ser 145 150 155	483
	aga ggg gga gca cct gga gga gga ttc gta cca aac atg ttg tcc gtt Arg Gly Gly Ala Pro Gly Gly Phe Val Pro Asn Met Leu Ser Val 160 165 170	531
	cca gaa agc cca ttt tcc aga acc ggg gaa ggg ctg gac gtt aga ggt Pro Glu Ser Pro Phe Ser Arg Thr Gly Glu Gly Leu Asp Val Arg Gly 175 180 185	579
	aat caa gga ttt cca tgg gat ata ctt ttt cca gca gat cca cca ttt Asn Gln Gly Phe Pro Trp Asp Ile Leu Phe Pro Ala Asp Pro Pro Phe 190 195 200 205	627
	tct cct caa tct tgt agg cca cag atg tct cag tca gaa tcc aga aaa Ser Pro Gln Ser Cys Arg Pro Gln Met Ser Gln Ser Glu Ser Arg Lys	675

## ES 2 671 381 T3

210	215	220	
agc aga aga ggc gga aga gag gat att ttg gaa aaa tgg gtg tct act Ser Arg Arg Gly Gly Arg Glu Asp Ile Leu Glu Lys Trp Val Ser Thr 225	230	235	723
aga aag aaa gct gag gaa tta gaa agg gat ctt aga aaa gcg aga aaa Arg Lys Lys Ala Glu Glu Leu Glu Arg Asp Leu Arg Lys Ala Arg Lys 240	245	250	771
acc att aaa aga ctg gaa gat gat aat cca tgg ttg ggc aac atc cta Thr Ile Lys Arg Leu Glu Asp Asp Asn Pro Trp Leu Gly Asn Ile Leu 255	260	265	819
ggt ata atc aga aaa gga aaa gat ggg aca gac caa atg gaa gta gat Gly Ile Ile Arg Lys Gly Lys Asp Gly Thr Asp Gln Met Glu Val Asp 270	275	280	867
285			
tct gga cct agg aaa aag cct cat aag tca ggt ttc acg gat aag gaa Ser Gly Pro Arg Lys Lys Pro His Lys Ser Gly Phe Thr Asp Lys Glu 290	295	300	915
aga caa gac cac aga cgt aga aaa gct ttg caa aac aag aag aac caa Arg Gln Asp His Arg Arg Arg Lys Ala Leu Gln Asn Lys Lys Asn Gln 305	310	315	963
320			
ctg tcc gca gga ggc aaa tct ctc tca aaa gag gaa gaa gaa gag ctg Leu Ser Ala Gly Gly Lys Ser Leu Ser Lys Glu Glu Glu Glu Leu 325	330	330	1011
345			
agg aga ctt act ata gaa gat gac gag aga caa aga cga gtt gcc ggt Arg Arg Leu Thr Ile Glu Asp Asp Glu Arg Gln Arg Arg Val Ala Gly 335	340	345	1059
355			
cct gga ggg ggc ttt gta cca caa atg aca ggt gtc cct gaa tca cca Pro Gly Gly Phe Val Pro Gln Met Thr Gly Val Pro Glu Ser Pro 370	375	380	1107
360			
365			
ttc tct aga act ggt gaa ggt ttg gat atc aga ggt gac aga ggt ttt Phe Ser Arg Thr Gly Glu Gly Leu Asp Ile Arg Gly Asp Arg Gly Phe 385	390	395	1155
395			
cca tgg gtg aat cct gct cca cca ggt cag cga tta cca tta ttg gaa Pro Trp Val Asn Pro Ala Pro Pro Gly Gln Arg Leu Pro Leu Leu Glu 400	405	410	1203
410			
415			
tgc aca cct caa cat cac cat cac cat tag gcggccgc Cys Thr Pro Gln His His His His His 415	420		1251
420			
<210> 36			1292
<211> 423			
<212> PRT			
<213> Artificial			
<220>			
<223> Construcción sintética			

## ES 2 671 381 T3

&lt;400&gt; 36

Met	Ala	Asp	Glu	Ala	Pro	Thr	Ser	Met	Ser	Arg	Ser	Glu	Ser	Lys	Arg
1															15
Asn	Arg	Asp	Gly	Arg	Glu	Gly	Ile	Leu	Glu	Gln	Trp	Val	Asn	Gly	Arg
							20								30
Lys	Lys	Leu	Glu	Asp	Leu	Glu	Arg	Asp	Leu	Arg	Lys	Ile	Lys	Lys	Lys
							35								45
Ile	Lys	Lys	Leu	Glu	Asp	Glu	Asn	Pro	Trp	Leu	Gly	Asn	Ile	Lys	Gly
							50								60
Ile	Leu	Gly	Lys	Lys	Asp	Lys	Asp	Gly	Thr	Asp	Gln	Met	Glu	Ile	Asp
							65								80
Ser	Gly	Pro	Gly	Lys	Arg	Pro	Leu	Arg	Gly	Gly	Phe	Ser	Asp	Lys	Glu
							85								95
Arg	Gln	Asp	His	Arg	Arg	Arg	Lys	Ala	Leu	Glu	Asn	Lys	Arg	Lys	Gln
							100								110
Leu	Ala	Ala	Gly	Gly	Lys	His	Leu	Ser	Lys	Glu	Glu	Glu	Glu	Leu	
							115								125
Lys	Arg	Leu	Thr	Glu	Glu	Asp	Glu	Arg	Arg	Glu	Arg	Arg	Thr	Ala	Gly
							130								140
Pro	Ser	Val	Gly	Gly	Val	Asn	Pro	Leu	Glu	Gly	Gly	Ser	Arg	Gly	Gly
							145								160
Ala	Pro	Gly	Gly	Phe	Val	Pro	Asn	Met	Leu	Ser	Val	Pro	Glu	Ser	
							165								175
Pro	Phe	Ser	Arg	Thr	Gly	Glu	Gly	Leu	Asp	Val	Arg	Gly	Asn	Gln	Gly
							180								190
Phe	Pro	Trp	Asp	Ile	Leu	Phe	Pro	Ala	Asp	Pro	Pro	Phe	Ser	Pro	Gln
							195								205
Ser	Cys	Arg	Pro	Gln	Met	Ser	Gln	Ser	Glu	Ser	Arg	Lys	Ser	Arg	Arg
							210								220
Gly	Gly	Arg	Glu	Asp	Ile	Leu	Glu	Lys	Trp	Val	Ser	Thr	Arg	Lys	Lys
							225								240
Ala	Glu	Glu	Leu	Glu	Arg	Asp	Leu	Arg	Lys	Ala	Arg	Lys	Thr	Ile	Lys

## ES 2 671 381 T3

245

250

255

Arg Leu Glu Asp Asp Asn Pro Trp Leu Gly Asn Ile Leu Gly Ile Ile  
260 265 270

Arg Lys Gly Lys Asp Gly Thr Asp Gln Met Glu Val Asp Ser Gly Pro  
275 280 285

Arg Lys Lys Pro His Lys Ser Gly Phe Thr Asp Lys Glu Arg Gln Asp  
290 295 300

His Arg Arg Arg Lys Ala Leu Gln Asn Lys Lys Asn Gln Leu Ser Ala  
305 310 315 320

Gly Gly Lys Ser Leu Ser Lys Glu Glu Glu Glu Leu Arg Arg Leu  
325 330 335

Thr Ile Glu Asp Asp Glu Arg Gln Arg Arg Val Ala Gly Pro Arg Val  
340 345 350

Gly Asp Val Asn Pro Pro Gly Gly Ser Pro Arg Gly Ala Pro Gly Gly  
355 360 365

Gly Phe Val Pro Gln Met Thr Gly Val Pro Glu Ser Pro Phe Ser Arg  
370 375 380

Thr Gly Glu Gly Leu Asp Ile Arg Gly Asp Arg Gly Phe Pro Trp Val  
385 390 395 400

Asn Pro Ala Pro Pro Gly Gln Arg Leu Pro Leu Leu Glu Cys Thr Pro  
405 410 415

Gln His His His His His  
420

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición inmunoterapéutica que comprende:

- 5        a) un vehículo de levadura; y  
          b) una proteína de fusión que comprende antígenos de VHD, en la que el antígeno de VHD se selecciona de la SEQ ID NO: 34 o SEQ ID NO: 28; y

en la que la composición provoca una respuesta inmunitaria específica de VHD cuando se administra a un sujeto.

10      2. La composición inmunoterapéutica de la reivindicación 1, en la que la proteína de fusión tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEQ ID NO: 36 o SEQ ID NO: 30 o una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 36 o SEQ ID NO: 30, respectivamente.

15      3. La composición inmunoterapéutica de la reivindicación 1 o reivindicación 2, en la que el antígeno de VHD se expresa por el vehículo de levadura.

20      4. La composición inmunoterapéutica de cualquier reivindicación precedente, en la que el vehículo de levadura es una levadura completa.

25      5. La composición inmunoterapéutica de la reivindicación 4, en la que la levadura completa está inactivada por calor.

6. La composición inmunoterapéutica de cualquier reivindicación precedente, en la que el vehículo de levadura es de *Saccharomyces cerevisiae*.

25      7. La composición inmunoterapéutica de cualquier reivindicación precedente, en la que la composición se formula en un excipiente farmacéuticamente aceptable adecuado para su administración a un sujeto.

30      8. La composición inmunoterapéutica de cualquier reivindicación precedente, en la que la composición contiene más de un 90 % de proteína de levadura.

9. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para su uso en un tratamiento para tratar una infección por VHD.

35      10. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para su uso en un tratamiento para prevenir una infección por VHD en un sujeto.

11. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 10, en la que el sujeto está infectado de forma crónica con VHB.

40

FIG. 1

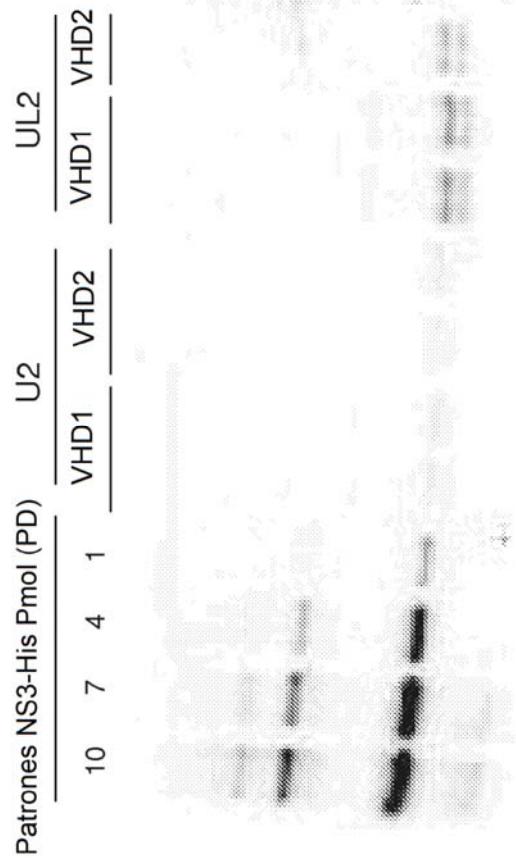
**FIG. 2**

FIG. 3

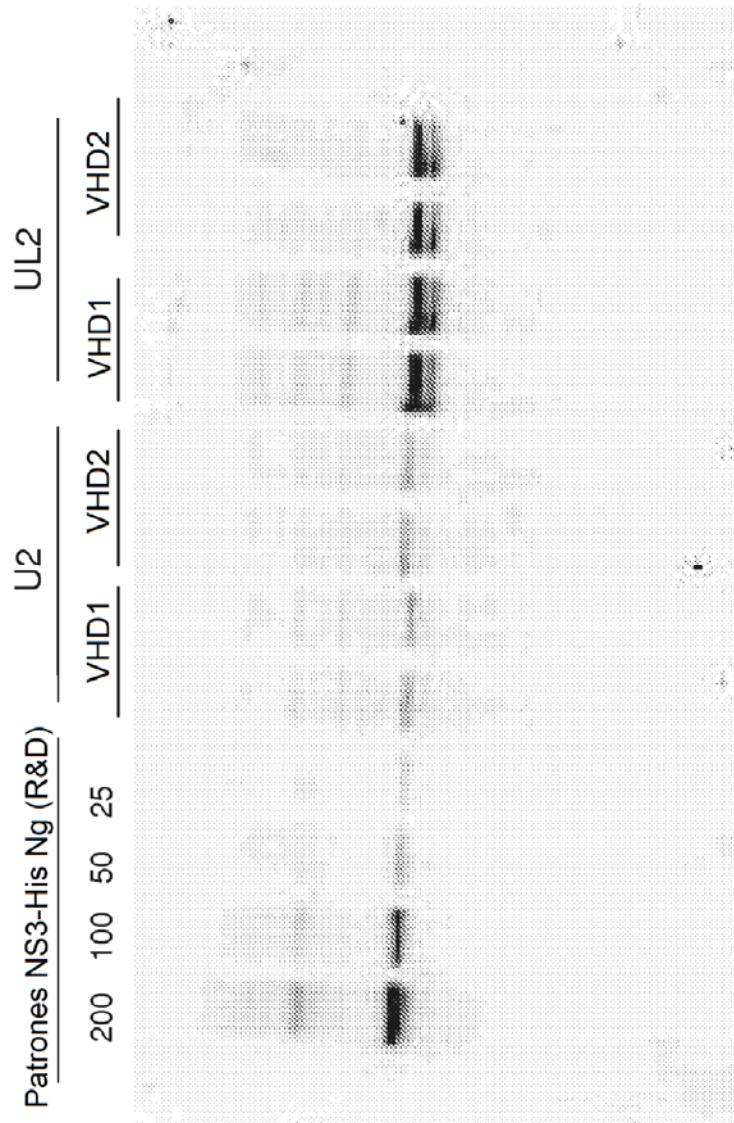
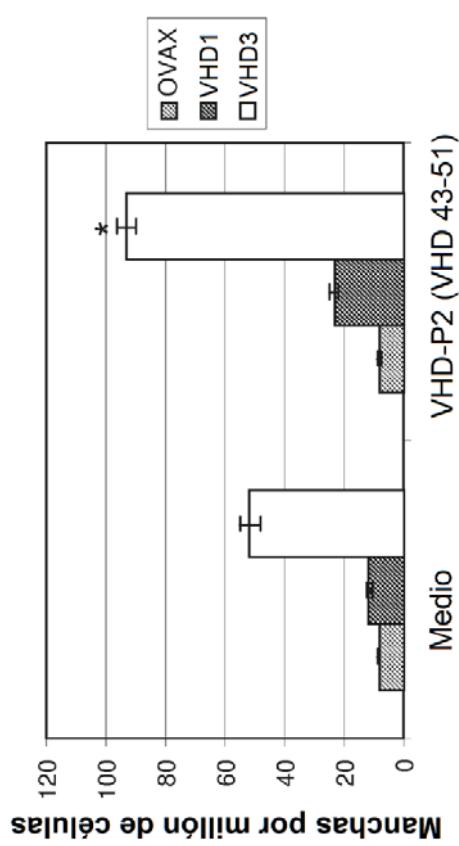
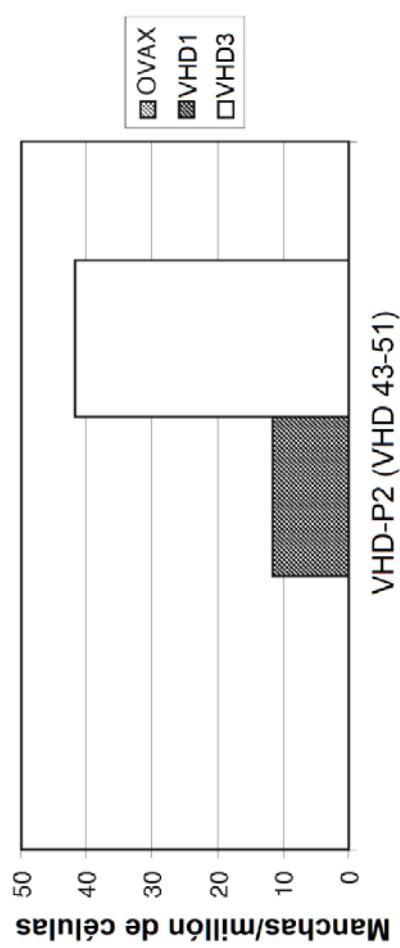
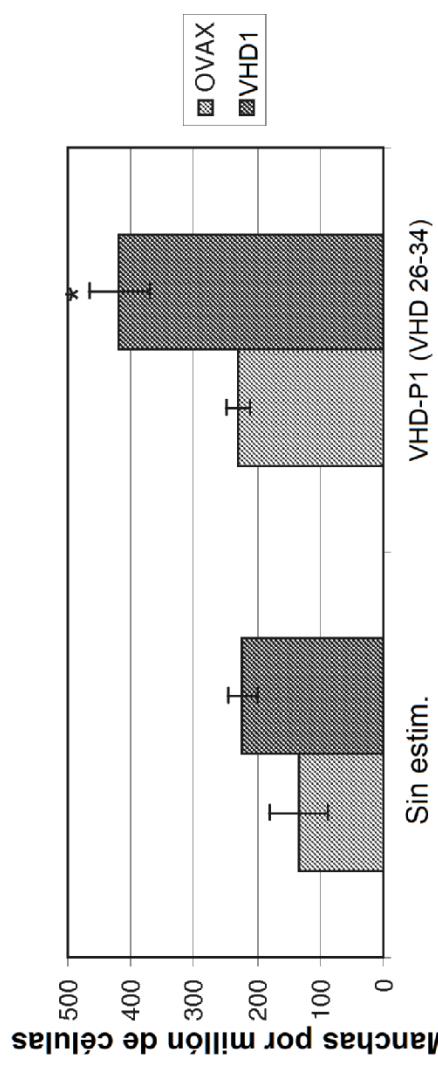


FIG. 4

Patrones NS3-His Pmol (PD)	VHD3	Patrones NS3-His Ng
10	U2	25
7	UL2	50
4		100
1		200



**FIG. 5A****FIG. 5B**

**FIG. 6A****FIG. 6B**