(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 411 096**

(51) Int. CI.:

C12N 15/51 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C07K 14/18 (2006.01)
A61K 39/29 (2006.01)
A61K 39/295 (2006.01)
A61K 31/70 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.10.2000 E 00973922 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2013 EP 1232267**

(54) Título: **Activación de linfocitos T específicos contra el VHC**

(30) Prioridad:

27.10.1999 US 161713 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.07.2013

(73) Titular/es:

NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS, INC. (100.0%)
4560 HORTON STREET
EMERYVILLE, CA 94608, US

(72) Inventor/es:

PALIARD, XAVIER;
HOUGHTON, MICHAEL y
SELBY, MARK

(74) Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

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

Activación de linfocitos T específicos contra el VHC.

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCIÓN

La invención se refiere a la activación de linfocitos T específicos contra el virus de la hepatitis C (VHC). Más concretamente, la invención se refiere al uso de múltiples polipéptidos de VHC, ya sea en solitario o como fusiones, para estimular respuestas inmunitarias mediadas por células, tales como para activar los linfocitos T específicos contra el VHC.

Antecedentes de la invención

La infección por el virus de la hepatitis C (VHC) es un problema de salud importante, estando aproximadamente un 1% de la población mundial infectada con el virus. Más de un 75% de los individuos con infección aguda evolucionan finalmente hasta un estado de portador crónico que puede derivar en cirrosis, insuficiencia hepática y carcinoma hepatocelular. Véase Alter *et al.* (1992) N. Engl. J. Med. 327:1899-1905; Resnick and Koff. (1993) Arch. Intem. Med. 153:1672-1677; Seeff (1995) Gastrointest. Dis. 6:20-27; Tong *et al*. (1995) N. Engl. J. Med. 332:1463-1466.

A pesar de los grandes avances en el desarrollo de fármacos contra determinados virus como el VIH, el control de la infección aguda y crónica por VHC ha tenido un éxito limitado (Hoofnagle y di Bisceglie (1997) N. Engl J. Med. 336:347-356). En concreto, se cree que es importante la generación de una respuesta fuerte de los linfocitos T citotóxicos (LTC) para el control y la erradicación de las infecciones por VHC. Por lo tanto, existe la necesidad en la técnica de métodos eficaces para inducir respuestas fuertes de los LTC contra el VHC.

Cho J.H. *et al*. VACCINE, 17 (9-10), 5 de marzo de 1999, págs. 1136-1144 describe un plásmido que codifica una proteína de fusión NS345ab y su uso para activar los linfocitos T. El documento EE.UU. 5.683.864 describe el uso de proteínas de fusión de VHC-1 en inmunoensayos.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

Es un objeto de la invención proporcionar reactivos y métodos para activar linfocitos T que reconocen epítopos de polipéptidos de VHC. Este y otros objetos de la invención se proporcionan mediante una o más de las formas de realización que se describen más adelante.

La invención proporciona proteínas de VHC útiles para activar linfocitos T específicos contra el VHC. Una forma de realización proporciona una proteína de fusión que consiste esencialmente en un polipéptido NS3, un polipéptido NS4 y un polipéptido NS5 de un virus de la hepatitis C (VHC) y un polipéptido proveniente de la región central de la poliproteína de VHC en los aminoácidos 1-191 de la poliproteína de VHC, numerados con respecto a VHC-1 para su uso en la generación de una respuesta inmunitaria contra el VHC en un mamífero.

Otra forma de realización proporciona una proteína de fusión que consiste esencialmente en un polipéptido NS3, un polipéptido NS4, un polipéptido NS5a y un polipéptido NS5b de VHC y un polipéptido proveniente de la región central de la poliproteína de VHC en los aminoácidos 1-191 de la poliproteína de VHC, numerados con respecto a VHC-1 para su uso en la generación de una respuesta inmunitaria contra el VHC en un mamífero.

Otra forma de realización más de la invención proporciona una proteína de fusión que comprende un polipéptido NS3, un polipéptido NS4, un polipéptido NS5a y opcionalmente un polipéptido NS5b de un VHC y un polipéptido proveniente de la región central de la poliproteína de VHC en los aminoácidos 1-191 de la poliproteína de VHC, numerados con respecto a VHC-1 para su uso en la generación de una respuesta inmunitaria contra el VHC en un mamífero. En una forma de realización de la descripción, uno de los polipéptidos de VHC proviene de una cepa de VHC diferente a la de los demás polipéptidos.

La descripción también proporciona composiciones que comprenden cualquiera de estas proteínas de fusión y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Otra forma de realización de la descripción proporciona una composición que consiste esencialmente un polipéptido NS3, un polipéptido NS4 y un polipéptido NS5a, o una composición que consiste esencialmente en polinucleótidos que codifican las proteínas individuales.

Otra forma de realización de la descripción proporciona una composición que consiste esencialmente en un polipéptido NS3, un polipéptido NS4, un polipéptido NS5a y un polipéptido NS5b de un VHC, o una composición que consiste esencialmente en polinucleótidos que codifican las proteínas individuales.

Otra forma de realización más de la descripción proporciona una composición que consiste esencialmente en un polipéptido NS3, un polipéptido NS4, un polipéptido NS5a y opcionalmente un polipéptido NS5b de un VHC, o una

composición que consiste esencialmente en polinucleótidos que codifican las proteínas individuales. En una forma de realización de la descripción, uno de los polipéptidos o polinucleótidos de VHC proviene de una cepa de VHC diferente a la de los demás.

Incluso otra forma de realización de la descripción proporciona un polinucleótido aislado y purificado que codifica una proteína de fusión que consiste esencialmente en un polipéptido NS3, un polipéptido NS4 y un polipéptido NS5a de un VHC o una proteína de fusión que consiste esencialmente en un polipéptido NS3, un polipéptido NS4, un polipéptido NS5a y un polipéptido NS5b de un VHC.

Todavía otra forma de realización de la descripción proporciona una composición que comprende un polinucleótido aislado y purificado que codifica una proteína de fusión que consiste esencialmente en cualquiera de un polipéptido NS3, un polipéptido NS4 y un polipéptido NS5a de un VHC o que consiste esencialmente en un polipéptido NS3, un polipéptido NS4, un polipéptido NS5a y un polipéptido NS5b de un VHC. La composición según la descripción comprende también un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Otra forma de realización de la descripción proporciona un polinucleótido aislado y purificado que codifica una proteína de fusión que comprende un polipéptido NS3, un polipéptido NS4 y un polipéptido NS5a de un VHC en el que uno de los polipéotidos NS3, NS4 y NS5a proviene de una cepa de VHC diferente a la de los otros dos polipéptidos. La descripción también proporciona una composición que comprende este polinucleótido y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Todavía otra forma de realización de la descripción proporciona un polinucleótido aislado y purificado que codifica una proteína de fusión que comprende un polipéptido NS3, un polipéptido NS4, un polipéptido NS5a y un polipéptido NS5b de un VHC. En una forma de realización de la descripción, uno de los polipéptidos proviene de una cepa de VHC diferente a la de los demás polipéptidos. La descripción también proporciona una composición que comprende este polinucleótido y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Incluso otra forma de realización de la invención proporciona un método *in vitro* para activar linfocitos T que reconocen un epítopo de un polipéptido de VHC, que comprende la etapa de poner en contacto los linfocitos T con una proteína de fusión que comprende un polipéptido NS3, un polipéptido NS4 y un polipéptido NS5 de un VHC y un polipéptido proveniente de la región central de la poliproteína de VHC en los aminoácidos 1-191 de la poliproteína de VHC, numerados con respecto a VHC-1, mediante el cual una población de linfocitos T activados reconoce un epítopo de los polipéptidos NS3, NS4, NS5a o NS5b.

La invención proporciona así métodos y reactivos para activar linfocitos T que reconocen epítopos de polipéptidos de VHC. Estos métodos y reactivos resultan especialmente ventajosos para identificar epítopos de polipéptidos de VHC asociados con una respuesta fuerte de los LTC y para inmunizar mamíferos, incluidos los seres humanos, contra el VHC.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra una comparación paralela de la de expresión de IFN-γ generada en los animales en respuesta al suministro de constructos alfavirales que codifican NS3NS4NS5a.

La Figura 2 muestra la expresión de IFN-γ generada en los animales en respuesta al suministro de ADN plasmídico que codifica NS3NS4NS5a ("desnudo"), ADN unido a PLG que codifica NS3NS4NS5a ("PLG"), plásmidos de ADN distintos que codifican NS5a, NS34a y NS4ab ("desnudo"), y ADN unido a PLG que codifica NS5a, NS34a y NS4ab ("PLG").

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, métodos convencionales de química, bioquímica, técnicas de ADN recombinante e inmunología, dentro de los conocimientos de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Sambrook, *et al*., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª Edición); Methods In Enzymology (S. Colowick y N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); DNA Cloning, Vols. I y II (D.N. Glover ed.); Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait ed.); Nucleic Acid Hybridization (B.D. Hames y S.J. Higgins eds.); Animal Cell Culture (R.K. Freshney ed.); Perbal, B., A Practical Guide to Molecular Cloning.

Debe señalarse que, tal como se utilizan en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una", “uno”, “el” y "la" incluyen los referentes plurales a menos que el contenido dicte claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "un antígeno" incluye una mezcla de dos o más antígenos, y similar.

I. Definiciones

En la descripción de la presente invención, se emplearán los siguientes términos, y pretenden ser definidos como se indica a continuación.

Los términos "polipéptido" y "proteína" se refieren a un polímero de restos de aminoácidos y no se limitan a una longitud mínima del producto. Por lo tanto, dentro de la definición se incluyen péptidos, oligopéptidos, dímeros, multímeros, y similares. Quedan abarcados por la definición los fragmentos y proteínas de longitud completa de los mismos. Los términos también incluyen modificaciones post-expresión del polipéptido, por ejemplo, glicosilación, acetilación, fosforilación y similares. Además, para los fines de la presente invención, un "polipéptido" se refiere a una proteína que incluye modificaciones, tales como deleciones, adiciones y sustituciones (generalmente de naturaleza conservadora), en la secuencia nativa, siempre que la proteína mantenga la actividad deseada. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como a través de mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser accidentales, tal como a través de mutaciones de los hospedadores que producen las proteínas o errores debidos a la amplificación por PCR.

Un polipéptido de VHC es un polipéptido, como se ha definido anteriormente, proveniente de la poliproteína de VHC. El polipéptido no tiene que provenir físicamente de VHC, sino que puede producirse de forma sintética o recombinante. Por otra parte, el polipéptido puede provenir de cualquiera de las diversas cepas de VHC, tal como de las cepas 1, 2, 3 ó 4 de VHC. Se conocen varias regiones conservadas y variables entre estas cepas y, en general, las secuencias de aminoácidos de los epítopos provenientes de estas regiones tendrán un alto grado de homología de secuencia, por ejemplo, una homología de secuencia de aminoácidos superior a un 30%, preferentemente superior a un 40%, cuando las dos secuencias están alineadas. Por lo tanto, por ejemplo, el término polipéptido "NS4" se refiere al NS4 nativo de cualquiera de las diversas cepas de VHC, así como a fragmentos inmunogénicos, muteínas, y análogos de NS4, tal como se define más adelante.

Los términos "análogo" y "muteína" se refieren a derivados biológicamente activos de la molécula de referencia, o fragmentos de tales derivados, que conservan la actividad deseada, tal como la capacidad para estimular una respuesta inmunitaria mediada por células, tal como se define más adelante. En general, el término "análogo" se refiere a compuestos que tienen una secuencia polipeptídica nativa y una estructura con una o más adiciones, sustituciones (generalmente de naturaleza conservadora), y/o deleciones de aminoácidos, con respecto a la molécula nativa, siempre que las modificaciones no destruyan la actividad inmunogénica. El término "muteína" se refiere a péptidos que tienen uno o más miméticos de péptidos ("peptoides"), tales como los descritos en la publicación internacional Nº WO 91/04282. Preferentemente, el análogo o la muteína tiene al menos la misma inmunoactividad que la molécula nativa. Los métodos para preparar muteínas y análogos de polipéptidos son conocidos en la técnica y se describen más adelante.

Los análogos especialmente preferentes incluyen sustituciones que son de naturaleza conservadora, es decir, aquellas sustituciones que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales. En concreto, los aminoácidos se dividen generalmente en cuatro familias: 1) ácidos - aspartato y glutamato; 2) básicos - lisina, arginina, histidina; 3) no polares - alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano; y 4) polares no cargados - glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina. La fenilalanina, el triptófano y la tirosina se clasifican a veces como aminoácidos aromáticos. Por ejemplo, es razonablemente predecible que una sustitución aislada de leucina con isoleucina o valina, un aspartato con un glutamato, una treonina con una serina, o un reemplazo conservador similar de un aminoácido con un aminoácido estructuralmente relacionado, no tenga un efecto importante sobre la actividad biológica. Por ejemplo, el polipéptido de interés puede incluir hasta aproximadamente 5-10 sustituciones de aminoácidos conservadoras o no conservadoras, o incluso hasta aproximadamente 15-25 sustituciones de aminoácidos conservadoras o no conservadoras, o cualquier número entero entre 5-25, siempre que la función deseada de la molécula permanezca intacta. Un experto en la materia puede determinar fácilmente las regiones de la molécula de interés que pueden tolerar cambios por referencia a los gráficos de Hopp/Woods y Kyte-Doolittle, bien conocidos en la técnica.

"Fragmento" se refiere a un polipéptido que consiste en sólo una parte de la estructura y la secuencia del polipéptido de longitud completa intacta. El fragmento puede incluir una deleción C-terminal y/o una deleción N-terminal del polipéptido nativo. Un "fragmento inmunogénico" de una proteína de VHC concreta incluirá generalmente al menos aproximadamente 5-10 restos de aminoácidos contiguos de la molécula de longitud completa, preferentemente al menos aproximadamente 15-25 restos de aminoácidos contiguos de la molécula de longitud completa, y lo más preferentemente al menos aproximadamente 20-50 o más restos de aminoácidos contiguos de la molécula de longitud completa, que definen un epítopo, o cualquier número entero entre 5 aminoácidos y la secuencia de longitud completa, siempre que el fragmento en cuestión conserve la actividad inmunogénica, tal como se mide mediante los ensayos descritos en el presente documento. Para una descripción de diversos epítopos de VHC, véase, por ejemplo, Chien *et al*., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89:10011-10015; Chien *et al*., J. Gastroent. Hepatol. (1993) 8:S33-39; Chien *et al*., publicación de patente internacional Nº WO 93/00365; Chien, D.Y., publicación de patente internacional Nº WO 94/01778; las solicitudes de patente de EE.UU. admitidas, del mismo solicitante, con los números de serie 08/403.590 y 08/444.818

El término "epítopo", tal como se utiliza en el presente documento se refiere a una secuencia de al menos aproximadamente 3 a 5, preferentemente de aproximadamente 5 a 10 ó 15, y no más de aproximadamente 1.000

aminoácidos (o cualquier número entero entre ellos), que definen una secuencia que por sí misma o como parte de una secuencia mayor, se une a un anticuerpo generado en respuesta a tal secuencia. No hay límite superior crítico para la longitud del fragmento, que puede comprender casi la longitud completa de la secuencia de la proteína, o incluso una proteína de fusión que comprende dos o más epítopos de la poliproteína de VHC. Un epítopo para su uso en la presente invención no se limita a un polipéptido que tiene la secuencia exacta de la porción de la proteína parental de la que proviene. De hecho, los genomas virales están en un estado de flujo constante y contienen varios dominios variables que presentan grados relativamente altos de variabilidad entre los aislados. Por lo tanto, el término "epítopo" abarca secuencias idénticas a la secuencia nativa, así como modificaciones en la secuencia nativa, tales como deleciones, adiciones y sustituciones (generalmente de naturaleza conservadora).

Las regiones de un polipéptido determinado que incluyen un epítopo pueden identificarse utilizando multitud de técnicas de mapeo de epítopos, bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Volumen 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, Nueva Jersey. Por ejemplo, pueden determinarse epítopos lineales, por ejemplo, sintetizando simultáneamente muchos péptidos sobre soportes sólidos, correspondiendo los péptidos a porciones de la molécula de proteína, y haciendo reaccionar los péptidos con anticuerpos mientras los péptidos están todavía fijados a los soportes. Tales técnicas son conocidas en la técnica y se describen, por ejemplo, en la patente de EE.UU. Nº 4.708.871; Geysen *et al.* (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998-4002; Geysen *et al.* (1986) Molec. Immunol. 23:709-715. Del mismo modo, los epítopos conformacionales se identifican fácilmente determinando la conformación espacial de los aminoácidos tal como, por ejemplo, mediante cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols, *supra*. También pueden identificarse las regiones antigénicas de las proteínas utilizando gráficos convencionales de antigenicidad e hidropatía, tales como los calculados utilizando, por ejemplo, el programa de software Omiga versión 1.0 disponible en el Oxford Molecular Group. Este programa informático emplea el método de Hopp/Woods, Hopp *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1981) 78:3824-3828 para determinar los perfiles de antigenicidad, y la técnica de Kyte-Doolittle, Kyte *et al.*, J. Mol. Biol. (1982) 157:105-132 para los gráficos de hidropatía.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "epítopo conformacional" se refiere a una porción de una proteína de longitud completa, o un análogo o una muteína de la misma, que tiene las características estructurales nativas de la secuencia de aminoácidos que codifica el epítopo dentro de la proteína natural de longitud completa. Las características estructurales nativas incluyen, pero no se limitan a, glicosilación y estructura tridimensional. Preferentemente, un epítopo conformacional se produce de forma recombinante y se expresa en una célula de la que se puede extraer en condiciones que conserven sus características estructurales deseadas, por ejemplo, sin desnaturalización del epítopo. Tales células incluyen bacterias, levaduras, insectos y células de mamíferos. La expresión y el aislamiento de los epítopos conformacionales recombinantes desde la poliproteína de VHC se describen, por ejemplo, en las publicaciones internacionales Nº WO 96/04301, WO 94/01778, WO 95/33053, WO 92/08734.

Una "respuesta inmunológica" a una composición o a un antígeno de VHC (incluidos el polipéptido y los polinucleótidos que codifican polipéptidos que se expresan *in vivo*) es el desarrollo en un sujeto de una respuesta inmunitaria celular y/o humoral contra las moléculas presentes en la composición de interés. Para los fines de la presente invención, una "respuesta inmunitaria humoral" se refiere a una respuesta inmunitaria mediada por moléculas de anticuerpo, mientras que una "respuesta inmunitaria celular" es una mediada por linfocitos T y/u otros glóbulos blancos. Un aspecto importante de la inmunidad celular implica una respuesta específica de antígeno por parte de los linfocitos T citolíticos ("LTC"). Los LTC tienen especificidad para los antígenos peptídicos que son presentados asociados a proteínas codificadas por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y expresados en las superficies de las células. Los LTC ayudan a inducir y promover la destrucción intracelular de los microbios intracelulares, o la lisis de células infectadas con tales microbios. Otro aspecto de la inmunidad celular implica una respuesta específica de antígeno por parte de los linfocitos T auxiliares. Los linfocitos T auxiliares actúan para ayudar a estimular la función, y centran la actividad de las células efectoras no específicas contra las células que presentan antígenos peptídicos asociados a moléculas MHC en su superficie. Una "respuesta inmunitaria celular" también se refiere a la producción de citocinas, quimiocinas y otras moléculas de este tipo producidas por linfocitos T activados y/u otros glóbulos blancos, incluidos los provenientes de linfocitos T $CD4^+$ y $CD8^+$.

Una composición o vacuna que provoca una respuesta inmunitaria celular puede servir para sensibilizar a un sujeto vertebrado mediante la presentación de antígenos asociados a moléculas MHC en la superficie celular. La respuesta inmunitaria mediada por células se dirige contra, o cerca de, las células que presentan antígenos en su superficie. Además, pueden generase linfocitos T específicos de antígeno para permitir la futura protección de un hospedador inmunizado.

La capacidad de un antígeno concreto para estimular una respuesta inmunológica mediada por células puede determinarse mediante varios ensayos, tal como mediante ensayos de linfoproliferación (activación de linfocitos), ensayos de células citotóxicas LTC, o mediante ensayos para linfocitos T específicos contra el antígeno en un sujeto sensibilizado. Tales ensayos son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Erickson *et al.*, J. Immunol. (1993) 151:4189-4199; Doe *et al.*, Eur. J. Immunol. (1994) 24:2369-2376; y los ejemplos que se presentan más adelante.

Por lo tanto, una respuesta inmunológica tal como se utiliza en el presente documento puede ser una que estimula la producción de los LTC, y/o la producción o activación de los linfocitos T auxiliares. El antígeno de interés también puede provocar una respuesta inmunitaria mediada por anticuerpos. Por lo tanto, una respuesta inmunológica puede incluir uno o más de los siguientes efectos: la producción de anticuerpos por los linfocitos B; y/o la activación de los linfocitos T supresores y/o los linfocitos T γδ dirigidos específicamente contra un antígeno o antígenos presentes en la composición o vacuna de interés. Estas respuestas pueden servir para neutralizar la infectividad, y/o mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) o por anticuerpo-complemento, para proporcionar protección a o aliviar los síntomas de un hospedador inmunizado. Tales respuestas pueden determinarse utilizando ensayos de neutralización e inmunoensayos convencionales, bien conocidos en la técnica.

Una "secuencia codificante" o una secuencia que "codifica" un polipéptido seleccionado, es una molécula de ácido nucleico que se transcribe (en el caso del ADN) y se traduce (en el caso del ARNm) a un polipéptido *in vitro* o *in vivo* cuando se pone bajo el control de las secuencias reguladoras apropiadas. Los límites de la secuencia codificante vienen determinados por un codón de inicio en el extremo 5' (amino)terminal y un codón de terminación de la traducción en el extremo 3' (carboxilo)terminal. Una secuencia de terminación de la transcripción puede estar en dirección 3' respecto a la secuencia codificante.

Un "polinucleótido" o molécula de "ácido nucleico" puede incluir secuencias monocatenarias y bicatenarias y se refiere, pero no se limita a, ADNc de ARNm viral, procariota o eucariota, secuencias de ADN genómico de ADN procariota o viral (por ejemplo, virus y retrovirus de ADN), y especialmente secuencias de ADN sintético. El término recoge también secuencias que incluyen cualquiera de los análogos de base de ADN y ARN conocidos.

"Unido operativamente" se refiere a una disposición de elementos en la que los componentes así descritos están configurados para realizar la función deseada. Por lo tanto, un promotor determinado operativamente unido a una secuencia codificante es capaz de efectuar la expresión de la secuencia codificante cuando están presentes los factores de transcripción apropiados, etc. El promotor no necesita ser contiguo a la secuencia codificante, siempre que actúe para dirigir la expresión de la misma. Por lo tanto, por ejemplo, pueden estar presentes secuencias intermedias no traducidas pero transcritas entre la secuencia promotora y la secuencia codificante, al igual que los intrones transcritos, y la secuencia promotora puede considerarse aún "unida operativamente" a la secuencia codificante.

"Recombinante" tal como se utiliza en el presente documento para describir una molécula de ácido nucleico se refiere a un polinucleótido de origen genómico, ADNc, viral, semisintético o sintético que, en virtud de su origen o manipulación no está asociado en su totalidad o en parte con el polinucleótido con el que está asociado en la naturaleza. El término "recombinante" tal como se utiliza con respecto a una proteína o polipéptido se refiere a un polipéptido producido mediante la expresión de un polinucleótido recombinante. En general, el gen de interés se clona y a continuación se expresa en organismos transformados, como se describe más adelante. El organismo hospedador expresa el gen extraño para producir la proteína en condiciones de expresión.

Un "elemento testigo" se refiere a una secuencia de polinucleótido que ayuda a expresar una secuencia codificante a la que está unido. La expresión incluye promotores, secuencias de terminación de la transcripción, dominios reguladores cadena arriba, señales de poliadenilación, regiones no traducidas, incluidas las 5' -UTR y 3'-UTR y cuando proceda, secuencias líder y potenciadores, que de manera conjunta proporcionan la transcripción y la traducción de una secuencia codificante en una célula hospedadora.

Un "promotor", tal como se utiliza en el presente documento es una región reguladora de ADN capaz de unirse a una ARN polimerasa en una célula hospedadora e iniciar la transcripción de una secuencia codificante cadena abajo (dirección 3') unida operativamente a la misma. Para los fines de la presente descripción, una secuencia promotora incluye el número mínimo de bases o elementos necesarios para iniciar la transcripción de un gen de interés a niveles detectables por encima del nivel de fondo. Dentro de la secuencia promotora hay un sitio de iniciación de la transcripción, así como dominios de unión a proteínas (secuencias consenso) responsables de la unión de la ARN polimerasa. Los promotores eucariotas con frecuencia, pero no siempre, contienen cajas "TATA" y cajas "CAT".

Una secuencia testigo "dirige la transcripción" de una secuencia codificante en una célula cuando la ARN polimerasa se une a la secuencia promotora y transcribe la secuencia codificante a ARNm, que a continuación se traduce al polipéptido codificado por la secuencia codificante.

"Casete de expresión" o "constructo de expresión" se refiere a un conjunto que es capaz de dirigir la expresión de la(s) secuencia(s) o gen(es) de interés. El casete de expresión incluye elementos testigo, como se ha descrito anteriormente, tales como un promotor que está unido operativamente a (para dirigir la transcripción de) la(s) secuencia(s) o gen(es) de interés, y con frecuencia incluye también una secuencia de poliadenilación. Dentro de determinadas formas de realización de la descripción, el casete de expresión descrito en el presente documento puede estar contenido dentro de un constructo plasmídico. Además de los componentes del casete de expresión, el constructo plasmídico puede incluir también uno o más marcadores seleccionables, una señal que permita que el constructo plasmídico exista como ADN monocatenario (por ejemplo, un origen de replicación de M13), al menos

uno sitio de clonación múltiple y un origen la replicación de "mamífero" (por ejemplo, un origen de replicación de adenovirus o SV40).

"Transformación", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la inserción de un polinucleótido exógeno en una célula hospedadora, independientemente del método utilizado para la inserción: por ejemplo, transformación mediante captación directa, transfección, infección, y similares. Para los métodos de transfección concretos, véase más adelante. El polinucleótido exógeno puede mantenerse como un vector no integrado, por ejemplo, un episoma, o como alternativa, puede integrarse en el genoma del hospedador.

Una "célula hospedadora" es una célula que ha sido transformada, o puede ser transformada, por una secuencia de ADN exógeno.

Por "aislado" se entiende, cuando se refiere a un polipéptido, que la molécula indicada es distinta y está separada del organismo completo con el que la molécula se encuentra en la naturaleza o está presente en ausencia sustancial de otras macromoléculas biológicas del mismo tipo. El término "aislado" con respecto a un polinucleótido es una molécula de ácido nucleico desprovista, en parte o en su totalidad, de secuencias normalmente asociadas con ella en la naturaleza; o una secuencia, tal como existe en la naturaleza, pero que tiene secuencias heterólogas asociadas a la misma; o una molécula disociada del cromosoma.

El término "purificado" tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a que preferentemente están presentes al menos un 75% en peso, más preferentemente al menos un 85% en peso, aún más preferentemente al menos un 95% en peso, y lo más preferentemente al menos un 98% en peso, de macromoléculas biológicas del mismo tipo.

"Homología" se refiere al porcentaje de identidad entre dos restos de polipéptido o dos de polinucleótido. Dos secuencias de polipéptido, o dos de ADN, son "sustancialmente homólogas" entre sí cuando las secuencias presentan al menos aproximadamente un 50%, preferentemente al menos aproximadamente un 75%, más preferentemente al menos aproximadamente un 80%-85%, preferentemente al menos aproximadamente un 90%, y lo más preferentemente al menos aproximadamente un 95%-98%, o más, de identidad de secuencia en una longitud definida de las moléculas. Tal como se utiliza en el presente documento, sustancialmente homólogo también se refiere a secuencias que muestran identidad completa con la secuencia de polipéptido o de ADN especificada.

En general, "identidad" se refiere a una correspondencia exacta nucleótido a nucleótido o aminoácido a aminoácido de dos polinucleótidos o secuencias de polipéptido, respectivamente. El porcentaje de identidad puede determinarse mediante una comparación directa de la información de la secuencia entre dos moléculas alineando las secuencias, contando el número exacto de correspondencias entre las dos secuencias alineadas, dividiendo por la longitud de la secuencia más corta, y multiplicando el resultado por 100. Para facilitar el análisis pueden utilizarse programas informáticos de fácil adquisición, tales como ALIGN, Dayhoff, M.O. en Atlas of Protein Sequence and Structure M.O. Dayhoff ed., 5 Supl. 3:353-358, National biomedical Research Foundation, Washington, DC, que adapta el algoritmo de homología local de Smith y Waterman Advances in Appl. Math. 2:482-489, 1981 para el análisis de péptidos. Los programas para determinar la identidad de secuencia de nucleótidos se encuentran disponibles en el Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 (disponible en Genetics Computer Group, Madison, WI), por ejemplo, los programas BESTFIT, FASTA y GAP, que también se basan en el algoritmo de Smith y Waterman. Estos programas se utilizan fácilmente con los parámetros por defecto recomendados por el fabricante y descritos en el Wisconsin Sequence Analysis Package mencionado anteriormente. Por ejemplo, puede determinarse el porcentaje de identidad de una secuencia de nucleótidos concreta respecto a una secuencia de referencia utilizando el algoritmo de homología de Smith y Waterman con una tabla de puntuación por defecto y una penalización por hueco de seis posiciones de nucleótidos.

Otro método para establecer el porcentaje de identidad en el contexto de la presente descripción es utilizar el paquete de programas MPSRCH propiedad de la Universidad de Edimburgo, desarrollado por John F. Collins y Shane S. Sturrok, y distribuido por IntelliGenetics, Inc. (Mountain View, CA). A partir de este conjunto de paquetes puede emplearse el algoritmo de Smith-Waterman en el que se utilizan los parámetros por defecto para la tabla de puntuación (por ejemplo, penalización por apertura de hueco de 12, penalización por extensión de hueco de uno y un hueco de seis). A partir de los datos generados el valor "Match" refleja la "identidad de secuencia". Otros programas adecuados para calcular el porcentaje de identidad o similitud entre secuencias son generalmente conocidos en la técnica, por ejemplo, otro programa de alineamiento es BLAST, utilizado con parámetros por defecto. Por ejemplo, pueden utilizarse BLASTN y BLASTP utilizando los siguientes parámetros por defecto: genetic code = standard; filter = none; strand = both; cutoff = 60; expect =10; Matrix = BLOSUM62; Descriptions = 50 sequences; sort by = HIGH SCORE; Databases = non-redundant, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + GenBank CDS translations + Swiss protein + Spupdate + PIR. Los detalles de estos programas pueden encontrarse en la siguiente dirección de internet: http://www.ncbi.nlm.gov/cgi-binBLAST.

Como alternativa, puede determinarse la homología mediante hibridación de polinucleótidos en condiciones que formen dúplex estables entre las regiones homólogas, seguido de digestión con nucleasa(s) específica(s) de la forma monocatenaria, y determinación del tamaño de los fragmentos digeridos. Pueden identificarse las secuencias

de ADN que son sustancialmente homólogas en un experimento de hibridación Southern, por ejemplo, en condiciones rigurosas, como se definen para ese sistema concreto. La definición de las condiciones de hibridación apropiadas está dentro de los conocimientos de la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, *supra*; DNA Cloning, *supra*; Nucleic Acid Hybridization, *supra*.

Por "inmunización con ácido nucleico" se entiende la introducción de una molécula de ácido nucleico que codifica uno o más antígenos seleccionados en una célula hospedadora, para la expresión *in vivo* del antígeno o antígenos. La molécula de ácido nucleico puede introducirse directamente en el sujeto receptor, tal como mediante inyección, inhalación, administración por vía oral, intranasal y mucosa, o similares, o puede introducirse *ex vivo*, en células que han sido retiradas del hospedador. En este último caso, las células transformadas se vuelven a introducir en el sujeto en el que puede ponerse en marcha una respuesta inmunitaria contra el antígeno codificado por la molécula de ácido nucleico.

Tal como se utiliza en el presente documento, "tratamiento" se refiere a cualquiera de a) la prevención de la infección o reinfección, como en una vacuna tradicional, b) la reducción o eliminación de síntomas, y c) la eliminación sustancial o completa del patógeno en cuestión. El tratamiento puede efectuarse profilácticamente (antes de la infección) o terapéuticamente (después de la infección).

Por "sujeto vertebrado" se entiende cualquier miembro del subfilo de los cordados, incluidos, sin limitación, seres humanos y otros primates, incluidos primates no ser humanos tales como chimpancés y otros simios y especies de monos; animales de granja tales como ganado vacuno, ovejas, cerdos, cabras y caballos; mamíferos domésticos tales como perros y gatos; animales de laboratorio incluidos roedores tales como ratones, ratas y cobayas; aves, incluidas aves domésticas, silvestres y de caza tales como pollos, pavos y otras aves gallináceas, patos, gansos, y similares. La expresión no indica una edad concreta. Por lo tanto, pretende incluir tanto individuos adultos como recién nacidos. La invención descrita en el presente documento está destinada al uso en cualquiera de las especies de vertebrados anteriormente indicadas, puesto que los sistemas inmunitarios de todos estos vertebrados funcionan de manera similar.

II. Modos de llevar a cabo la invención

Antes de describir la presente invención detalladamente, debe entenderse que la presente invención no está limitada a parámetros de proceso o formulaciones concretos ya que éstos, por supuesto, pueden variar. Debe entenderse también que la terminología utilizada en el presente documento sólo tiene el fin de describir formas de realización concretas de la invención, y no pretende ser limitativa.

Aunque en la práctica de la presente invención pueden utilizarse varias composiciones y métodos similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, en el presente documento se describen los materiales y métodos preferentes.

Es un descubrimiento de la presente invención que las proteínas de fusión, las combinaciones de los componentes individuales de estas fusiones, y los polinucleótidos que las codifican, que comprenden un polipéptido NS3, un polipéptido NS4 y un polipéptido NS5a, o un polipéptido NS3, un polipéptido NS4, un polipéptido NS5a y un polipéptido NS5b de un virus de VHC, pueden utilizarse para activar los linfocitos T específicos contra el VHC, es decir, los linfocitos T que reconocen epítopos de estos polipéptidos. La activación de linfocitos T específicos contra el VHC por tales proteínas y polipéptidos de fusión, o combinaciones de los polipéptidos individuales que componen las fusiones, proporcionan sistemas modelo *in vitro* e *in vivo* para el desarrollo de vacunas contra el VHC, especialmente para la identificación de epítopos de polipéptidos de VHC asociados con una respuesta. También pueden utilizarse proteínas de fusión, o combinaciones de las proteínas individuales, para generar una respuesta inmunitaria contra el VHC en un mamífero, especialmente una respuesta de los LTC, ya sea para fines terapéuticos o profilácticos.

Proteínas de fusión NS3NS4NS5a y NS3NS4NS5aNS5b

Los genomas de las cepas de VHC contienen un único marco de lectura abierto de aproximadamente 9.000 a 12.000 nucleótidos, que son transcritos a una poliproteína. Un poliproteína de VHC se escinde para producir al menos diez productos distintos, del orden de NH_2-Región Central-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4a-NS4b-NS5a-NS5b-COOH. Las proteínas de fusión de la invención (proteínas de fusión NS3NS4NS5a, también denominadas "NS345a" en el presente documento) comprenden los polipéptidos NS3, NS4 (NS4a y NS4b) y NS5a de VHC, o comprenden los polipéptidos NS3, NS4 (NS4a y NS4b), NS5a y NS5b de VHC (proteínas de fusión NS3NS4NS5aNS5b, también denominadas "NS345ab" en el presente documento). Otras fusiones descritas en los ejemplos incluyen fusiones de NS3 y NS4 de VHC (NS4a y NS4b, también denominadas "NS34" y "NS34ab"), así como fusiones de NS3 y NS4a de VHC (también denominadas "NS34a").

La proteína NS3 de VHC funciona como una proteasa y una helicasa y se produce aproximadamente del aminoácido 1027 al aminoácido 1657 de la poliproteína (numerados con respecto a VHC-1). Véase Choo *et al.* (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2451-2455. La NS4 de VHC se produce aproximadamente del aminoácido 1658 al aminoácido 1972, la NS5a se produce aproximadamente del aminoácido 1973 al aminoácido 2420, y la NS5b de VHC se

produce aproximadamente del aminoácido 2421 al aminoácido 3011 de la poliproteína (numerados con respecto a VHC-1) (Choo *et al.*, 1991).

La polipéptidos NS3, NS4, NS5a y NS5b presentes en las diversas fusiones descritas anteriormente pueden ser polipéptidos de longitud completa o porciones de los polipéptidos NS3, NS4 (NS4a y NS4b), NS5a y NS5b. Las porciones de los polipéptidos NS3, NS4, NS5a y NS5b que componen la proteína de fusión comprenden al menos un epítopo, que es reconocido por un receptor de linfocitos T en un linfocito T activado, tal como 2152-HEYPVGSQL-2160 (SEQ ID NO: 1) y 2224-AELIEANLLWRQEMG-2238 (SEQ ID NO: 2). Los epítopos de NS3, NS4 (NS4a y NS4b), NS5a, NS5b, NS3NS4NS5a y NS3NS4NS5aNS5b pueden identificarse mediante varios métodos. Por ejemplo, los polipéptidos NS3, NS4, NS5a o NS5b o las proteínas de fusión que comprenden cualquier combinación de los anteriores, pueden aislarse, por ejemplo, mediante purificación por inmunoafinidad utilizando un anticuerpo monoclonal para el polipéptido o proteína. A continuación puede cribarse la secuencia de proteína aislada preparando varios péptidos cortos mediante escisión proteolítica de la proteína purificada, que juntos abarcan toda la secuencia de la proteína. Al comenzar, por ejemplo, con polipéptidos 100-meros, puede ensayarse cada polipéptido para detectar la presencia de epítopos reconocidos por un receptor de linfocitos T en un linfocito T activado por VHC, a continuación pueden ensayarse fragmentos solapantes y progresivamente más pequeños a partir de un 100-mero identificado para mapear el epítopo de interés.

Los epítopos reconocidos por un receptor de linfocitos T en un linfocito T activado por VHC pueden identificarse, por ejemplo, mediante un ensayo de liberación de ^{51}Cr (véase el Ejemplo 2) o mediante un ensayo de linfoproliferación (véase el Ejemplo 4). En un ensayo de liberación de ^{51}Cr, pueden construirse células diana que presenten el epítopo de interés clonando un polinucleótido que codifica el epítopo en un vector de expresión y transformando el vector de expresión en las células diana. Los linfocitos T $CD8^+$ específicos contra el VHC lisarán las células diana que presenten un epítopo de NS3, NS4, NS5a NS5b, NS3NS4NS5a o NS3NS4NS5aNS5b y no lisarán las células que no presenten tal epítopo. En un ensayo de linfoproliferación, los linfocitos T $CD4^+$ activados por VHC proliferarán cuando se cultiven con un péptido epitópico de NS3, NS4, NS5a, NS5b, NS3NS4NS5a, o NS3NS4NS5aNS5b, pero no en ausencia de un péptido epitópico de VHC.

Los polipéptidos NS3, NS4, NS5a y NS5b pueden producirse en cualquier orden en la proteína de fusión. Si se desea, pueden producirse al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 o más de uno o más de los polipéptidos en la proteína de fusión. Se producen múltiples cepas virales de VHC, y pueden utilizarse los polipéptidos NS3, NS4, NS5a y NS5b de cualquiera de estas cepas en una proteína de fusión.

Se han determinado las secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos de varios aislados y cepas de VHC, incluidas las secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos de los genes y polipéptidos de NS3, NS4, NS5a, NS5b. Por ejemplo, el aislado VHC J1.1 se describe en Kubo *et al.* (1989) Japón. Nucl. Acids Res. 17:10367-10372; Takeuchi *et al.* (1990) Gene 91:287-291; Takeuchi *et al.* (1990) J. Gen. Virol. 71:3027-3033; y Takeuchi *et al.* (1990) Nucl. Acids Res. 18:4626. Las secuencias codificantes completas de dos aislados independientes, VHC-J y BK, se describen en Kato *et al.*, (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:9524-9528 y Takamizawa *et al.*, (1991) J. Virol. 65:1105-1113, respectivamente.

Las publicaciones que describen los aislados de VHC-1 incluyen Choo *et al.* (1990) Brit. Med. Bull. 46:423-441; Choo *et al.* (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2451-2455 y Han *et al.* (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1711-1715. Los aislados de VHC HC-J1 y HC-J4 se describen en Okamoto *et al.* (1991) Japan J. Exp. Med. 60:167-177. Los aislados de VHC HCT 18~, HCT 23, Th, HCT 27, EC1 y EC10 se describen en Weiner *et al.* (1991) Virol. 180:842-848. Los aislados de VHC Pt-1, VHC-K1 y K2 se describen en Enomoto *et al.* (1990) Biochem. Biophys. Res. Commun. 170:1021-1025. Los aislados de VHC A, C, D y E se describen en Tsukiyama-Kohara *et al.* (1991) Virus Genes 5:243-254.

Cada uno de los componentes NS3, NS4, NS5a y NS5b de una proteína de fusión puede obtenerse de la misma cepa o aislado de VHC o de diferentes cepas o aislados de VHC. Las proteínas de fusión que comprenden los polipéptidos de VHC de, por ejemplo, el polipéptido NS3 pueden provenir de una primera cepa de VHC, y los polipéptidos NS4 y NS5a pueden provenir de una segunda cepa de VHC. Como alternativa, el polipéptido NS4 puede provenir de una primera cepa de VHC, y los polipéptidos NS3 y NS5a pueden provenir de una segunda cepa de VHC. Opcionalmente, el polipéptido NS5a puede provenir de una primera cepa de VHC, y los polipéptidos NS3 y NS4 pueden provenir de una segunda cepa de VHC. También pueden utilizarse en una proteína de fusión NS3NS4NS5a polipéptidos NS3, NS4 y NS5a que provengan cada uno de diferentes cepas de VHC. Del mismo modo, en una proteína de fusión que comprende NS5b, al menos uno de los polipéptidos NS3, NS4, NS5a y NS5b puede provenir de una cepa de VHC diferente a la de los demás polipéptidos. Opcionalmente, también pueden utilizarse en una proteína de fusión NS3NS4NS5aNS5b polipéptidos NS3, NS4, NS5a y NS5b que provengan cada uno de diferentes cepas de VHC.

Además de NS3, NS4a, NS4b, NS5a y NS5b, las proteínas de fusión pueden contener otros polipéptidos provenientes de la poliproteína de VHC. Por ejemplo, puede ser deseable incluir polipéptidos provenientes de la región central de la poliproteína de VHC. Esta región se produce en las posiciones de aminoácidos 1-191 de la poliproteína de VHC, numerados con respecto a VHC-1. En las fusiones de la invención pueden utilizarse tanto la

proteína de longitud completa como los epítopos de la proteína de longitud completa, tales como los epítopos encontrados entre los aminoácidos 10-53, los aminoácidos 10-45, los aminoácidos 67-88, los aminoácidos 120-130, o cualquiera de los epítopos de la región central identificados, por ejemplo, en Houghton *et al.*, patente de EE.UU. Nº 5.350.671; Chien *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89:10011-10015; Chien *et al.*, J. Gastroent. Hepatol. (1993) 8:533-39; Chien *et al.*, publicación internacional Nº WO 93/00365; Chien, D.Y., publicación internacional Nº WO 94/01778; y la solicitud de patente de EE.UU. de propiedad común, admitida, con números de serie 08/403.590 y 08/444.818.

Preferentemente, las proteínas de fusión anteriormente descritas, así como los componentes individuales de estas proteínas, se producen por recombinación. Puede introducirse un polinucleótido que codifica estas proteínas en un vector de expresión que puede expresarse en un sistema de expresión adecuado. Está disponible en la técnica una variedad de sistemas de expresión de bacterias, levaduras, mamíferos e insectos, y puede utilizarse cualquiera de tales sistemas de expresión. Opcionalmente, puede traducirse un polinucleótido que codifica estas proteínas en un sistema de traducción libre de células. Tales métodos son bien conocidos en la técnica. También pueden construirse proteínas mediante síntesis de proteínas en fase sólida.

Si se desea, las proteínas de fusión, o los componentes individuales de estas proteínas, también pueden contener otras secuencias de aminoácidos, tales como conectores de aminoácidos o secuencias señal, así como ligandos útiles para la purificación de proteínas, tales como glutatión-S transferasa y proteína A estafilocócica.

Polinucleótidos NS3NS4NS5a y NS3NS4NS5aNS5b

Los polinucleótidos contienen menos de un genoma completo de VHC y pueden ser ARN o ADN monocatenario o bicatenario. Preferentemente, los polinucleótidos se aíslan libres de otros componentes, tales como proteínas y lípidos. Los polinucleótidos NS3NS4NS5a codifican las proteínas de fusión NS3NS4NS5a descritas anteriormente, y por lo tanto comprenden las secuencias codificantes para los polipéptidos NS3, NS4 y NS5a. Los polinucleótidos NS3NS4NS5aNS5b codifican las proteínas de fusión NS3NS4NS5aNS5b descritas anteriormente, y por lo tanto comprenden las secuencias codificantes para los polipéptidos NS3, NS4, NS5a y NS5b. Del mismo modo, los polinucleótidos que codifican otras fusiones, tales como NS3NS4 y NS3NS4a comprenderán las secuencias de los polipéptidos individuales de VHC. Los polinucleótidos de la invención también pueden comprender otras secuencias de nucleótidos, tales como secuencias que codifican conectores, secuencias señal, o ligandos útiles para la purificación de proteínas tales como glutatión-S-transferasa y proteína A estafilocócica.

Los polinucleótidos que codifican NS3, NS4, NS5a y/o NS5b pueden aislarse de una biblioteca genómica proveniente de las secuencias de ácidos nucleicos presentes, por ejemplo, en el plasma, suero, u homogeneizado de hígado de un individuo infectado con VHC o pueden sintetizarse en el laboratorio, por ejemplo, utilizando un sintetizador automático. Puede utilizarse un método de amplificación tal como la PCR para amplificar polinucleótidos a partir de ADNc o ADN genómico de VHC que codifica NS3, NS4, NS5a, o NS5b.

Los polinucleótidos que codifican los polipéptidos NS3, NS4, NS5a o NS5b pueden comprender secuencias codificantes para estos polipéptidos que se producen de forma natural o pueden ser secuencias artificiales que no se producen en la naturaleza. Estos polinucleótidos pueden ligarse para que formen una secuencia codificante para las proteínas de fusión utilizando técnicas convencionales de biología molecular. Si se desea, pueden clonarse los polinucleótidos en un vector de expresión y transformarse, por ejemplo, en células bacterianas, de levadura, de insecto o de mamífero de manera que las proteínas de fusión de la invención puedan expresarse y aislarse de un cultivo de células.

Pueden utilizarse los constructos de expresión de la presente invención, incluida la fusión deseada, o los constructos de expresión individuales que comprenden los componentes individuales de estas fusiones, para la inmunización con ácidos nucleicos, para activar los linfocitos T específicos contra el VHC, utilizando protocolos convencionales de suministro de genes. Los métodos para el suministro de genes son conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. Nº 5.399.346, Nº 5.580.859 y Nº 5.589.466. Los genes pueden suministrarse directamente al sujeto vertebrado o, como alternativa, suministrarse *ex vivo*, a células provenientes del sujeto y reimplantar las células en el sujeto. Por ejemplo, los constructos pueden suministrarse como ADN plasmídico, por ejemplo, contenido dentro de un plásmido, tal como pBR322, pUC, o ColEl 1.

Además, los constructos de expresión pueden empaquetarse en liposomas antes de suministrarse a las células. La encapsulación de lípidos se realiza generalmente utilizando liposomas capaces de unirse de manera estable a, o capturar y retener, ácido nucleico. La relación entre ADN condensado y preparación lipídica puede variar pero generalmente será de aproximadamente 1:1 (mg de ADN:micromoles de lípido), o más de lípido. Para una revisión del uso de liposomas como vehículos para el suministro de ácidos nucleicos, véase, Hug y Sleight, Biochim. Biophys. Acta. (1991) 1097:1-17; Straubinger *et al.*, en Methods of Enzymology (1983), volumen 101, páginas 512-527.

Las preparaciones liposomales para su uso con la presente invención incluyen preparaciones catiónicas (cargadas positivamente), aniónicas (cargadas negativamente) y neutras, siendo especialmente preferentes los liposomas

catiónicos. Los liposomas catiónicos se pueden adquirir fácilmente. Por ejemplo, los liposomas N[1-2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trietilamonio (DOTMA) están disponibles con la marca comercial Lipofectina, de GIBCO BRL, Grand Island, NY. (Véase, también, Felgner *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (1987) 84:7413-7416). Otros lípidos disponibles en el mercado incluyen transfectace (DDAB/DOPE) y DOTAP/DOPE (Boehringer). Pueden prepararse otros liposomas catiónicos a partir de materiales de fácil adquisición utilizando técnicas bien conocidas en la técnica. Véanse, por ejemplo, Szoka *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1978) 75:4194-4198; la publicación PCT Nº WO 90/11092 para una descripción de la síntesis de liposomas DOTAP (1,2-bis(oleoiloxi)-3-(trimetilamonio)propano). Los diversos complejos liposoma-ácido nucleico se preparan utilizando métodos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Straubinger *et al.*, en METHODS OF IMMUNOLOGY (1983), volumen 101, páginas 512-527; Szoka *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1978) 75:4194-4198; Papahadjopoulos *et al.*, Biochim. Biophys. Acta (1975) 394:483; Wilson *et al*., Cell (1979) 17:77); Deamer y Bangham, Biochim. Biophys. Acta (1976) 443:629; Ostro *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. (1977) 76:836; Fraley *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1979) 76:3348; Enoc y Strittmatter, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1979) 76:145; Fraley *et al*., J. Biol. Chem. (1980) 255:10431; Szoka y Papahadjopoulos, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1978) 75:145; y Schaefer-Ridder *et al.*, Science (1982) 215:166.

El ADN también puede suministrarse en composiciones lipídicas de cocleato similares a las descritas por Papahadjopoulos *et al.*, Biochem. Biophys. Acta. (1975) 394:483-491. Véanse, también, las patentes de EE.UU. Nº 4.663.161 y Nº 4.871.488.

Se han desarrollado varios sistemas basados en virus para la transferencia de genes a células de mamífero. Por ejemplo, los retrovirus proporcionan una plataforma conveniente para los sistemas de suministro de genes, tales como el virus del sarcoma murino, virus de tumor mamario de ratón, virus de la leucemia murina de Moloney y virus del sarcoma de Rous. Puede insertarse un gen seleccionado en un vector y empaquetarse en partículas retrovirales utilizando técnicas conocidas en la técnica. A continuación, puede aislarse el virus recombinante y suministrarse a las células del sujeto ya sea *in vivo* o *ex vivo*. Se han descrito varios sistemas retrovirales (patente de EE.UU. Nº 5.219.740; Miller y Rosman, BioTechniques (1989) 7:980-990; Miller, A.D., Human Gene Therapy (1990) 1:5-14; Scarpa *et al.*, Virology (1991) 180:849-852; Burns *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) 90:8033-8037; y Boris-Lawrie y Temin, Cur. Opin. Genet. Develop. (1993.) 3:102-109. En resumen, pueden construirse fácilmente vehículos de suministro de genes retrovirales de la presente invención a partir de una amplia variedad de retrovirus, incluidos por ejemplo, los retrovirus de tipo B, C y D, así como espumavirus y lentivirus tales como FIV, VIH, VIH-1, VIH-2 y SIV (véase RNA Tumor Viruses, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory, 1985). Pueden obtenerse fácilmente tales retrovirus a partir de depósitos o colecciones tales como la American Type Culture Collection ("ATCC"; 10801 University Blvd., Manassas, VA, 20110-2209), o aislarse a partir de fuentes conocidas utilizando técnicas comúnmente disponibles.

También se han descrito varios vectores adenovirales, tales como vectores de adenovirus de tipo 2 y de tipo 5. A diferencia de los retrovirus que se integran en el genoma del hospedador, los adenovirus persisten extracromosómicamente minimizando así los riesgos asociados con la mutagénesis por inserción (Haj-Ahmad y Graham, J. Virol (1986) 57:267-274; Bett *et al.*, J. Virol (. 1993) 67:5911-5921; Mittereder *et al.*, Human Gene Therapy (1994) 5:717-729; Seth *et al.*, J. Virol (1994) 68:933-940; Barr *et al.*, Gene Therapy. (1994) 1:51-58; Berkner, K.L. BioTechniques (1988) 6:616-629; y Rich *et al.*, Human Gene Therapy (1993) 4:461-476).

También puede utilizarse, para el suministro de genes, vectores de conjugados moleculares, tales como los vectores quiméricos adenovirales descritos en Michael *et al.*, J. Biol. Chem. (1993) 268:6866-6869 y Wagner *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89:6099-6103.

También se utilizarán como vectores virales para suministrar el gen de interés los miembros del género *Alphavirus*, tales como, pero no limitados a, vectores provenientes de los virus Sindbis y Semliki Forest, VEE. Para obtener una descripción de vectores provenientes del virus Sindbis útiles para la práctica de los presentes métodos, véase, Dubensky *et al.*, J. Virol. (1996) 70:508-519 y las publicaciones internacionales Nº WO 95/07995 y Nº WO 96/17072.

Pueden utilizarse otros vectores, incluidos, pero no limitados a, virus 40 de simio y citomegalovirus. Pueden utilizarse vectores bacterianos, tales como *Salmonella spp*., *Yersinia enterocolitica*, *Shigella spp*., *Vibrio cholerae*, cepa BCG de *Mycobacterium*, y *Listeria monocytogenes*. También pueden utilizarse minicromosomas tales como MC y MC1, bacteriófagos, cósmidos (plásmidos en los que se han insertado sitios *cos* del fago lambda) y replicones (elementos genéticos que son capaces de replicación bajo su propio control en una célula).

Los constructos de expresión también pueden encapsularse, adsorberse a, o asociarse con, vehículos particulados. Tales vehículos presentan al sistema inmunológico múltiples copias de una molécula seleccionada y promueven la captura y retención de las moléculas en los ganglios linfáticos locales. Las partículas pueden ser fagocitadas por macrófagos y pueden mejorar la presentación de antígenos a través de la liberación de citocinas. Los ejemplos de vehículos particulados incluyen los provenientes de polímeros de polimetilmetacrilato, así como micropartículas provenientes de poli(lactidas) y poli(lactida-co-glicólidos), conocidas como PLG. Véase, por ejemplo, Jeffery *et al.*, Pharm. Res. (1993) 10:362-368 y McGee *et al.*, J J. Microencap. (1996).

Puede utilizarse una amplia variedad de otros métodos para suministrar los constructos de expresión a las células. Tales métodos incluyen la transfección mediada por DEAE-dextrano, precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por polilisina o poliornitina, o precipitación utilizando otras sales inorgánicas insolubles, tales como fosfato de estroncio, silicatos de aluminio incluidos bentonita y caolín, óxido crómico, silicato de magnesio, talco, y similares. Otros métodos de transfección útiles incluyen electroporación, sonoporación, fusión de protoplastos, liposomas, suministro de peptoides o microinyección. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, *supra*, para un análisis de técnicas para transformar las células de interés; y Felgner, P.L., Advanced Drug Delivery Reviews (1990) 5:163-187, para una revisión de los sistemas de suministro útiles para la transferencia de genes. En la publicación internacional Nº WO/0045823 se describe un método especialmente eficaz de suministro de ADN mediante electroporación.

Además, los sistemas de suministro biolísticos que emplean vehículos particulados tales como oro y tungsteno, resultan especialmente útiles para suministrar los constructos de expresión de la presente invención. Las partículas se recubren con el constructo a suministrar y se aceleran a alta velocidad, generalmente en atmósfera reducida, mediante un disparo de una "pistola de genes". Para una descripción de tales técnicas y aparatos útiles a este efecto, véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. Nº 4.945.050, Nº 5.036.006, Nº 5.100.792, Nº 5.179.022, Nº 5.371.015 y Nº 5.478.744.

Composiciones que comprenden proteínas de fusión o polinucleótidos

La descripción también proporciona composiciones que comprenden las proteínas de fusión o polinucleótidos, así como composiciones que incluyen los componentes individuales de estas proteínas de fusión o polinucleótidos. Las composiciones según la descripción comprenden preferentemente un vehículo farmacéuticamente aceptable. El propio vehículo no debe inducir la producción de anticuerpos perjudiciales para el hospedador. Los vehículos farmacéuticamente aceptables son bien conocidos por los expertos en la materia. Tales vehículos incluyen, pero no se limitan a, macromoléculas grandes lentamente metabolizadas, tales como proteínas, polisacáridos tales como sefarosa funcionalizada con látex, agarosa, celulosa, perlas de celulosa y similares, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos tales como ácido poliglutámico, polilisina, y similares, copolímeros de aminoácidos, y partículas virales inactivas.

En las composiciones según la descripción también pueden utilizarse sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, sales minerales tales como clorhidratos, bromhidratos, fosfatos o sulfatos, así como sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos, malonatos o benzoatos. Son sustratos proteicos especialmente útiles las seroalbúminas, hemocianina de lapa californiana, moléculas de inmunoglobulina, tiroglobulina, ovoalbúmina, toxoide tetánico, y otras proteínas bien conocidas por los expertos en la materia. Las composiciones según la descripción también pueden contener líquidos o excipientes, tales como agua, solución salina, glicerol, dextrosa, etanol, o similares, solos o en combinación, así como sustancias tales como humectantes, emulsionantes o amortiguadores del pH. También pueden utilizarse liposomas como vehículo para una composición según la descripción, y tales liposomas se han descrito anteriormente.

Si se desea, pueden incluirse moléculas co-estimuladoras que mejoran la presentación del inmunógeno a los linfocitos, tales como B7-1 o B7-2, o citocinas tales como GM-CSF, IL-2, e IL-12, en una composición según la descripción. Opcionalmente, también pueden incluirse adyuvantes en una composición. Los adyuvantes que pueden utilizarse incluyen, pero no se limitan a: 1) sales de aluminio (alumbre), tales como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio, etc.; 2) formulaciones de emulsión de aceite en agua (con o sin otros inmunoestimulantes específicos tales como péptidos de muramilo (véase más adelante) o componentes de la pared celular bacteriana), tales como por ejemplo: a) MF59 (publicación PCT Nº WO 90/14837), que contiene escualeno al 5%, Tween 80 al 0,5%, y Span 85 al 0,5% (que contiene opcionalmente diversas cantidades de MTP-PE), formulados en partículas submicrométricas utilizando un microfluidizador tal como el microfluidizador Modelo 110Y (Microfluidics, Newton, MA), b) SAF, que contiene escualeno al 10%, Tween 80 al 0,4%, polímero L121 bloqueado con plurónico al 5%, y Thr-MDP (véase más adelante) ya sea microfluidizado en una emulsión submicrométrica o agitado en vórtex para generar una emulsión de tamaño de partícula más grande, y c) sistema adyuvante Ribi™ (RAS), (Ribi Immunochem, Hamilton, MT) que contiene escualeno al 2%, Tween 80 al 0,2%, y uno o más componentes de la pared celular bacteriana del grupo que consiste en monofosforil lípido A (MPL), dimicolato de trehalosa (TDM), y esqueleto de la pared celular (CWS), preferentemente MPL + CWS (Detox™); 3) pueden utilizarse adyuvantes de saponina, tales como Stimulon™ (Cambridge Bioscience, Worcester, MA), o generarse partículas a partir de los mismos, tales como los ISCOM (complejos inmunoestimulantes); 4) adyuvante completo de Freund (CFA) y adyuvante incompleto de Freund (IFA); 5) citocinas, tales como interleucinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12, etc.), interferones (por ejemplo, interferón gamma), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor de necrosis tumoral (TNF), etc.; 6) mutantes destoxificados de una toxina de ribosilación de ADP bacteriana tal como una toxina del cólera (CT), una toxina de pertussis (PT), o una toxina de *E. coli* lábil al calor (LT), especialmente LT-K63, LT-R72, CT-S109, PT-K9/G129; véanse, por ejemplo, los documentos WO 93/13302 y WO 92/19265; 7) otras sustancias que actúan como inmunoestimulantes para mejorar la eficacia de la composición; y 8) micropartículas con macromoléculas adsorbidas, como se describe en la solicitud de patente de EE.UU. relacionada con número de serie 09/285.855 (presentada el 2 de abril de 1999) y la solicitud de patente internacional con número de serie PCT/US99/17308 (presentada el 29 de julio de 1999). Resultan preferentes el alumbre y MF59.

Como se ha mencionado anteriormente, los péptidos de muramilo incluyen, pero no se limitan a, N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), -acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (CGP 11637, denominado no-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina (CGP 19835A, denominado MTP-PE), etc.

Métodos de producción de anticuerpos específicos contra VHC

Pueden utilizarse las proteínas de fusión de VHC, tales como las proteínas de fusión NS3NS4SN5a y NS3NS4NS5aNS5b, para producir anticuerpos monoclonales y policlonales específicos contra el VHC. Los anticuerpos monoclonales y policlonales específicos contra el VHC se unen específicamente a antígenos de VHC.

Pueden producirse anticuerpos policlonales administrando la proteína de fusión a un mamífero, tal como un ratón, un conejo, una cabra, o un caballo. Se recoge el suero del animal inmunizado y se purifican los anticuerpos del plasma mediante, por ejemplo precipitación con sulfato de amonio, seguido de cromatografía, preferentemente cromatografía de afinidad. Las técnicas para producir y procesar antisueros policlonales son conocidas en la técnica.

También pueden producirse fácilmente anticuerpos monoclonales dirigidos contra epítopos específicos del VHC presentes en las proteínas de fusión. Pueden fusionarse linfocitos B normales de un mamífero, tal como un ratón, inmunizado con, por ejemplo, una proteína de fusión NS3NS4SN5a o una NS3NS4NS5aNS5b con, por ejemplo, células de mieloma de ratón sensibles a HAT, para producir hibridomas. Los hibridomas que producen anticuerpos específicos contra VHC pueden identificarse mediante RIA o ELISA y aislarse por clonación en agar semisólido o por dilución limitante. Los clones que producen anticuerpos específicos contra VHC se aíslan mediante otra ronda de selección.

Los anticuerpos, tanto monoclonales como policlonales, que están dirigidos contra epítopos de VHC, resultan especialmente útiles para detectar la presencia de VHC o de antígenos de VHC en una muestra, tal como una muestra de suero de un ser humano infectado con VHC. Un inmunoensayo para detectar un antígeno de VHC puede utilizar un anticuerpo o varios anticuerpos. Un inmunoensayo para detectar un antígeno de VHC puede utilizar, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal dirigido contra un epítopo de VHC, una combinación de anticuerpos monoclonales dirigidos contra epítopos de un polipéptido de VHC, anticuerpos monoclonales dirigidos contra epítopos de diferentes polipéptidos de VHC, anticuerpos policlonales dirigidos contra el mismo antígeno de VHC, anticuerpos policlonales dirigidos contra diferentes antígenos de VHC, o una combinación de anticuerpos monoclonales y policlonales. Los protocolos del inmunoensayo pueden basarse, por ejemplo, en ensayos de competencia, de reacción directa, o de tipo sándwich utilizando, por ejemplo, el anticuerpo marcado. Los marcadores pueden ser, por ejemplo, fluorescentes, quimioluminiscentes, o radiactivos.

Pueden utilizarse adicionalmente anticuerpos policlonales o monoclonales para aislar antígenos o partículas de VHC mediante columnas de inmunoafinidad. Pueden fijarse los anticuerpos a un soporte sólido, por ejemplo, mediante adsorción o mediante unión covalente de manera que los anticuerpos conserven su actividad inmunoselectiva. Opcionalmente, pueden incluirse grupos espaciadores de manera que el sitio de unión al antígeno del anticuerpo permanezca accesible. A continuación, pueden utilizarse los anticuerpos inmovilizados para unir partículas o antígenos de VHC de una muestra biológica, tal como sangre o plasma. Las partículas o antígenos de VHC unidos se recuperan de la matriz de la columna, por ejemplo, mediante un cambio del pH.

Linfocitos T específicos contra el VHC

Los linfocitos T específicos contra el VHC que son activados por las fusiones descritas anteriormente, incluida la proteína de fusión NS3NS4NS5a o la proteína de fusión NS3NS4NS5aNS5b, expresadas *in vivo* o *in vitro*, o combinaciones de los componentes individuales de las fusiones, reconocen preferentemente un epítopo de un polipéptido de VHC tal como un polipéptido NS3, NS4, NS5a, NS5b, incluido un epítopo de una proteína de fusión NS3NS4NS5a o una proteína de fusión NS3NS4NS5aNS5b. Los linfocitos T específicos contra el VHC pueden ser $CD8^+$ o $CD4^+$.

Los linfocitos T $CD8^+$ específicos contra el VHC son preferentemente los linfocitos T citotóxicos (LTC) que pueden matar las células infectadas por el VHC que presentan epítopos de NS3, NS4, NS5a, NS5b que forman complejos con una molécula de MHC de clase I. Los linfocitos T $CD8^+$ específicos contra el VHC también pueden expresar interferón-γ (IFN-γ). Los linfocitos T $CD8^+$ específicos contra el VHC pueden detectarse, por ejemplo, mediante ensayos de liberación de ^{51}Cr (véase el Ejemplo 2). Los ensayos de liberación de ^{51}Cr miden la capacidad de los linfocitos T $CD8^+$ específicos contra el VHC para lisar las células diana que presentan un epítopo de NS3, NS4, NS5a, NS5b, NS3NS4NS5a o NS3NS4NS5aNS5b. Los linfocitos T $CD8^+$ específicos contra el VHC que expresan IFN-γ también puede detectarse mediante métodos inmunológicos, preferentemente mediante tinción intracelular para IFN-γ después de la estimulación *in vitro* con un polipéptido NS3, un polipéptido NS4, un polipéptido NS5a o un polipéptido NS5b (véase el Ejemplo 3).

Las linfocitos T $CD4^+$ específicos contra el VHC activados por las fusiones anteriormente descritas, tales como una proteína de fusión NS3NS4NS5a o NS3NS4NS5aNS5b, expresadas *in vivo* o *in vitro*, y combinaciones de los

componentes individuales de estas proteínas, reconocen preferentemente un epítopo de un polipéptido NS3, NS4, NS5a o NS5b, incluido un epítopo de una proteína de fusión NS3NS4NS5a o NS3NS4NS5aNS5b, que está unida a una molécula MHC de clase II en una célula infectada con el VHC y proliferan en respuesta a los péptidos NS3NS4NS5a o NS3NS4NS5aNS5b estimuladores.

Los linfocitos T $CD4^+$ específicos contra el VHC pueden detectarse mediante un ensayo de linfoproliferación (véase el Ejemplo 4). Los ensayos de linfoproliferación miden la capacidad de los linfocitos T $CD4^+$ específicos contra el VHC para proliferar en respuesta a un epítopo de NS3, un epítopo de NS4, un epítopo de NS5a o un epítopo de NS5b.

Métodos para activar linfocitos T específicos contra el VHC

Los polinucleótidos o las proteínas de fusión NS3NS4NS5a y los polinucleótidos o las proteínas de fusión NS3NS4NS5aNS5b, o combinaciones de los componentes individuales de estos polinucleótidos y proteínas, pueden utilizarse para activar los linfocitos T específicos contra el VHC ya sea *in vitro* o *in vivo*. La activación de linfocitos T específicos contra el VHC puede utilizarse, entre otras cosas, para proporcionar sistemas modelo para optimizar las respuestas de los LTC contra el VHC y para proporcionar tratamiento profiláctico o terapéutico contra la infección por VHC. Para la activación *in vitro*, las proteínas se suministran preferentemente a los linfocitos T mediante un plásmido o un vector viral, tal como un vector adenoviral, tal como se ha descrito anteriormente.

Las poblaciones policlonales de linfocitos T pueden provenir de la sangre, y, preferentemente, de órganos linfoides periféricos, tales como ganglios linfáticos, bazo o timo, de mamíferos que han sido infectadas con un VHC. Los mamíferos preferentes incluyen ratones, chimpancés, babuinos y seres humanos. El VHC sirve para aumentar el número de linfocitos T específicos contra el VHC activados en el mamífero. A continuación, los linfocitos T específicos contra el VHC provenientes del mamífero pueden volverse a estimular *in vitro* añadiendo los péptidos epitópicos NS3NS4NS5a o NS3NS4NS5aNS5b de VHC a los linfocitos T. A continuación, pueden ensayarse los linfocitos T específicos contra el VHC para comprobar, entre otras cosas, la proliferación, la producción de IFN-γ y la capacidad para lisar las células diana que presentan epítopos de NS3NS4NS5a o NS3NS4NS5aNS5b *in vitro*.

En un ensayo de linfoproliferación (véase el Ejemplo 4), los linfocitos T $CD4^+$ específicos contra el VHC proliferan cuando se cultivan con un péptido epitópico NS3, NS4, NS5a, NS5b, NS3NS4NS5a o NS3NS4NS5aNS5b, pero no en ausencia de un péptido epitópico. Por lo tanto, pueden identificarse los epítopos concretos NS3, NS4, NS5a, NS5b, NS3NS4NS5a y NS3NS4NS5aNS5b que son reconocidos por los linfocitos T $CD4^+$ específicos contra el VHC utilizando un ensayo de linfoproliferación.

Del mismo modo, puede utilizarse la detección de IFN-γ en los linfocitos T $CD8^+$ específicos contra el VHC después de la estimulación *in vitro* con las proteínas de fusión anteriormente descritas, o componentes individuales de estas proteínas, para identificar los epítopos de NS3, NS4, NS5a, NS5b, NS3NS4NS5a y NS3NS4NS5aNS5b especialmente eficaces en la estimulación de los linfocitos T $CD8^+$ para que produzcan IFN-γ (véase el Ejemplo 3).

Además, los ensayos de liberación de ^{51}Cr resultan útiles para determinar el nivel de respuesta de los LTC contra el VHC. Véase Cooper *et al.* Immunity 10:439-449. Por ejemplo, los linfocitos T $CD8^+$ específicos contra el VHC pueden provenir del hígado de un mamífero infectado con VHC. Estos linfocitos T pueden ensayarse en ensayos de liberación de ^{51}Cr contra células diana que presentan, por ejemplo, epítopos de NS3NS4NS5a o NS3NS4NS5aNS5b. Pueden construirse varias poblaciones de células diana que expresen diferentes epítopos de NS3NS4NS5a o NS3NS4NS5aNS5b de manera que cada población de células diana presente diferentes epítopos de NS3NS4NS5a o NS3NS4NS5aNS5b. Pueden ensayarse los linfocitos $CD8^+$ específicos contra el VHC contra cada una de estas poblaciones de células diana. Los resultados de los ensayos de liberación de ^{51}Cr pueden utilizarse para determinar qué epítopos de NS3NS4NS5a o NS3NS4NS5aNS5b son responsables de la respuesta LTC más fuerte contra el VHC. A continuación, pueden construirse proteínas de fusión NS3NS4NS5a o proteínas de fusión NS3NS4NS5aNS5b que contengan los epítopos responsables de la respuesta LTC más fuerte, utilizando la información proveniente de los ensayos de liberación de ^{51}Cr.

Una proteína de fusión NS3NS4NS5a o NS3NS4NS5aNS5b o un polinucleótido que codifica tal proteína de fusión, así como los componentes individuales de estas proteínas de fusión o polinucleótidos, pueden administrarse a un mamífero, tal como un ratón, babuino, chimpancé o ser humano, para activar los linfocitos T específicos contra el VHC *in vivo*. La administración puede ser mediante cualquier medio conocido en la técnica, incluida la inyección parenteral, intranasal, intramuscular o subcutánea, incluida la inyección con una pistola de biobalística ("pistola de genes"), como se ha analizado anteriormente.

Preferentemente, se utiliza la inyección de un polinucleótido NS3NS4NS5a o NS3NS4NS5aNS5b, o composiciones que contienen una combinación de los componentes individuales de los polinucleótidos de fusión, para activar los linfocitos T. Además de las ventajas prácticas de la simplicidad de construcción y modificación, la inyección de polinucleótidos NS3NS4NS5a o NS3NS4NS5aNS5b da como resultado la síntesis de una proteína de fusión NS3NS4NS5a o NS3NS4NS5aNS5b, respectivamente, en el hospedador. Del mismo modo, la administración de los componentes individuales de estos polinucleótidos, tal como en una composición que consiste esencialmente en los

polinucleótidos individuales que codifican NS3, NS4, NS5a o una composición que consiste esencialmente en los polinucleótidos individuales que codifican NS3, NS4, NS5a y NS5b, da como resultado la expresión de las proteínas individuales en el hospedador. Por lo tanto, estos inmunógenos se presentan al sistema inmunitario del hospedador con modificaciones post-traduccionales, estructura y conformación nativas. Los polinucleótidos se inyectan preferentemente por vía intramuscular a un mamífero grande, tal como un ser humano, a una dosis de 0,5, 0,75, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 5 ó 10 mg/kg.

Una composición según la descripción que comprende un polinucleótido o una proteína de fusión NS3NS4NS5a, un polinucleótido o una proteína de fusión NS3NS4NS5aNS5b, combinaciones de estas fusiones, o una combinación de los componentes individuales de los mismos, se administra de manera compatible con la composición concreta utilizada y en una cantidad eficaz para activar los linfocitos T específicos contra el VHC según se mide, entre otras cosas, mediante un ensayo de liberación de ^{51}Cr, un ensayo de linfoproliferación, o mediante tinción intracelular para IFN-γ. Las proteínas y/o los polinucleótidos pueden administrarse a un mamífero que no está infectado con un VHC o pueden administrarse a un mamífero infectado con el VHC. Las dosificaciones concretas de los polinucleótidos o las proteínas de fusión en una composición dependerán de muchos factores incluidos, pero no limitados a, la especie, edad y estado general del mamífero al que se administra la composición, y el modo de administración de la composición. Una cantidad eficaz de la composición según la descripción puede determinarse fácilmente utilizando sólo experimentación de rutina. Para identificar las dosis apropiadas pueden emplearse los modelos *in vitro* e *in vivo* descritos anteriormente. La cantidad de polinucleótido NS3NS4NS5a utilizado en el ejemplo que se describe más adelante proporciona una orientación general que puede utilizarse para optimizar la activación de los linfocitos T específicos contra el VHC ya sea *in vivo* o *in vitro*. Generalmente, se administrarán 0,5, 0,75, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 5 ó 10 mg de un polinucleótido o una proteína de fusión NS3NS4NS5a o NS3NS4NS5aNS5b, o de cada uno de los componentes individuales, a un mamífero grande, tal como un babuino, chimpancé o ser humano. Si se desea, también pueden proporcionarse moléculas co-estimuladoras o adyuvantes antes de, después de, o junto con las composiciones.

Las respuestas inmunitarias del mamífero generadas por la administración de una composición según la descripción, incluida la activación de linfocitos T específicos contra el VHC, pueden mejorarse variando la dosificación, la vía de administración o los regímenes de refuerzo. Las composiciones según la descripción pueden administrarse en un régimen monodosis, o preferentemente en un régimen multidosis en el que el primer ciclo de vacunación incluye de 1 a 10 dosis separadas, seguidas de otras dosis administradas a intervalos de tiempo posteriores necesarios para mantener y/o reforzar una respuesta inmunitaria, por ejemplo, de 1 a 4 meses para una segunda dosis, y si es necesario, dosis posteriores(s) después de varios meses.

III. Parte experimental

Más adelante se presentan ejemplos de las formas de realización específicas para llevar a cabo la presente invención. Los ejemplos se ofrecen sólo con fines ilustrativos, y no pretenden limitar el alcance de la presente invención en modo alguno. Los expertos en la materia comprenderán fácilmente que la invención puede ponerse en práctica de diversas maneras, dadas las indicaciones de la presente descripción.

Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperaturas, etc.), pero, por supuesto, debe permitirse que pueda haber cierto error y desviación experimental.

EJEMPLO 1

Producción de polinucleótidos NS3NS4NS5a.

Se aisló un polinucleótido que codifica NS3NS4NS5a (aproximadamente los aminoácidos 1027 a 2399, numerados con respecto a VHC-1) (también denominado "NS345a" en el presente documento) o NS5a (aproximadamente los aminoácidos 1973 a 2399, numerados con respecto a VHC-1) a partir un VHC. Los polinucleótidos que codifican un resto de metionina se ligaron al extremo 5' de estos polinucleótidos y los polinucleótidos se clonaron en vectores plasmídicos, de virus vaccinia y adenovirales.

Protocolos de inmunización. En un protocolo de inmunización, se inmunizaron ratones con 50 µg de ADN plasmídico que codificaba NS5a o que codificaba una proteína de fusión NS3NS4NS5a mediante inyección intramuscular en el músculo tibial anterior. Seis semanas más tarde se proporcionó una inyección de refuerzo de 10^7 ufp de virus vaccinia (VV)-NS5a (intraperitoneal) o 50 µg de plásmido testigo (intramuscular).

En otro protocolo de inmunización, se inyectaron a los ratones, por vía intramuscular en el músculo tibial anterior, 10^{10} partículas adenovirales que codificaban una proteína de fusión NS3NS4NS5a. Seis semanas más tarde se proporcionó una inyección de refuerzo intraperitoneal de 10^7 ufp de VV-NS5a o una inyección de refuerzo intramuscular de 10^{10} partículas adenovirales que codificaban NS3NS4NS5a.

EJEMPLO 2

La inmunización con ADN que codifica una proteína de fusión NS3NS4NS5a activa los linfocitos T $CD8^+$ específicos contra el VHC.

Ensayo de liberación de ^{51}Cr. Se utilizó un ensayo de liberación de ^{51}Cr para medir la capacidad de los linfocitos T específicos contra el VHC para lisar las células diana que presentaban un epitopo de NS5a. Se combinaron esplenocitos de los animales inmunizados. Estas células se volvieron a estimular *in vitro* durante seis días con el péptido epitópico LTC p214K9 (2152-HEYPVGSQL-2160, SEQ ID NO: 1) de VHC-NS5a en presencia de IL-2. A continuación se ensayaron los esplenocitos para determinar la actividad citotóxica en un ensayo convencional de liberación de ^{51}Cr contra células diana sensibilizadas con péptido (L929) que expresan moléculas de MHC de clase I, pero no de clase II, tal como se describe en Weiss (1980) J. Biol. Chem. 255:9912-9917. Se ensayaron relaciones entre efector (linfocitos T) y diana (linfocitos B) de 60:1, 20:1 y 7:1. Se calculó el porcentaje de lisis específica para cada relación entre efector y diana.

Los resultados de los ensayos se muestran en las Tablas 1 y 2. La Tabla 1 demuestra que la inmunización con ADN plasmídico que codifica una proteína de fusión NS3NS4NS5a activa los linfocitos T $CD8^+$ que reconocen y lisan las células diana que presentan un epitopo de NS5a. Sorprendentemente, el polipéptido NS5a de la proteína de fusión NS3NS4NS5a fue capaz de activar los linfocitos T a pesar de estar presente el polipéptido NS5a en una proteína de fusión.

De manera similar, la Tabla 2 demuestra que el suministro de la proteína de fusión NS3NS4NS5a a los ratones mediante un vector adenoviral también activa los linfocitos T $CD8^+$ que reconocen y lisan las células diana que presentan un epítopo de NS5a de VHC. Por lo tanto, puede utilizarse la inmunización con el ADN "desnudo" (plasmídico) que codifica una proteína de fusión NS3NS4NS5a o con la proteína de fusión codificada por el vector adenoviral para activar los linfocitos T específicos contra el VHC.

EJEMPLO 3

La inmunización con ADN que codifica una proteína de fusión NS3NS4NS5a activa los linfocitos T $CD8^+$ específicos contra el VHC que expresan IFN-γ.

Tinción intracelular para interferón-gamma (IFN-γ). Se utilizó la tinción intracelular para IFN-γ para identificar los linfocitos T $CD8^+$ que secretaban IFN-γ después de la estimulación *in vitro* con el epítopo de NS5a p214K9. Se volvieron a estimular esplenocitos de ratones inmunizados individuales *in vitro* con p214K9 o con un péptido no específico durante 6-12 horas en presencia de IL-2 y monensina. A continuación, se tiñeron las células para la detección de CD8 de superficie y para la detección de IFN-γ intracelular y se analizaron por citometría de flujo. A continuación, se calculó el porcentaje de linfocitos T $CD8^+$ que también eran positivos para IFN-γ. Los resultados de estos ensayos se muestran en las Tablas 1 y 2. La Tabla 1 demuestra que los linfocitos T $CD8^+$ activados en respuesta a la inmunización con ADN plasmídico que codifica una proteína de fusión NS3NS4NS5a también expresan IFN-γ. La inmunización con una proteína de fusión NS3NS4NS5a codificada en un adenovirus también da como resultado linfocitos T $CD8^+$ específicos contra el VHC que expresan IFN-γ, aunque en menor medida que la inmunización con una proteína de fusión NS3NS4NS5a codificada por plásmido (Tabla 2).

Tabla 1. Linfocitos T CD8+ específicos contra NS5a de VHC en ratones inmunizados con ADN NS5a o NS345a

Ensayo de liberación de ^{51}Cr					Tinción intracelular para la detección de IFN-γ			
Porcentaje de lisis específica de dianas*					Porcentaje de linfocitos T CD8+ positivos para IFN-g**			
Relación E:T	ADN NS5a		ADN NS345a		ADN NS5a		ADN NS345a	
	p214K9	-	p214K9	-	p214K9	-	p214K9	-
60:1	77	5	66	6				
20:1	61	4	49	2	1,74	0,26	1,18	0,40
7:1	29	1	29	4				

*Las células diana (L929) se pulsaron con p214K9 o medios solos y se marcaron con ^{51}Cr. **Los esplenocitos se cultivaron con p214K9 o medios solos durante 12 horas en presencia de monensina.

p214K9 es un péptido epitópico de LTC (2152-HEYPVGSQL-2160, SEQ ID NO: 1) de NS5a de VHC. '-' se refiere a la ausencia de péptido.

Tabla 2. Linfocitos T CD8+ específicos contra NS5a de VHC estimulados por adenovirus o ADN que codifica NS345a								
Ensayo de liberación de ^{51}Cr					Tinción intracelular para la detección de IFN-γ			
Porcentaje de lisis específica de dianas*					Porcentaje de linfocitos T CD8+ positivos para IFN-g**			
Relación E:T	Adeno NS5a		ADN NS345a		Adeno NS5a		ADN NS345a	
	p214K9	-	p214K9	-	p214K9	p214J	p214K9	p214J
60:1	76	2	55	5				
20:1	85	2	22	3	3,24	0,13	0,25	0,09
7:1	62	<1	10	3				
*Las células diana (L929) se pulsaron con p214K9 o p214J y se marcaron con ^{51}Cr. **Los esplenocitos se cultivaron con p214K9 o p214J durante 12 horas en presencia de monensina. p214K9 es un péptido epitópico de LTC (2152-HEYPVGSQL-2160, SEQ ID NO: 1) de NS5a de VHC. P214J es un péptido testigo (10 mero) de NS5a de VHC.								

EJEMPLO 4

La inmunización con ADN que codifica una proteína de fusión NS3NS4NS5a estimula la proliferación de los linfocitos T CD4$^+$ específicos contra el VHC.

Ensayo de linfoproliferación. Los esplenocitos de ratones inmunizados combinados se empobrecieron en linfocitos T CD8$^+$ utilizando perlas magnéticas y se cultivaron por triplicado con p222D, un péptido epitópico NS5a de NS5a de VHC (2224-AELIEANLLWRQEMG-2238, SEQ ID NO: 2), o en medio solo. Después de 72 horas, se pulsaron las células con 1 µ de Ci por pocillo de ^{3}H-timidina y se recogieron 6-8 horas más tarde. La incorporación de radiactividad se midió después de la recolección. Se calculó el cpm promedio.

Como se muestra en la Tabla 3, la inmunización con una proteína de fusión NS3NS4NS5a codificada por plásmido estimula la proliferación de linfocitos T CD4$^+$ específicos contra el VHC. La inmunización con un vector adenoviral que codifica la proteína de fusión también dio como resultado la proliferación estimulada de linfocitos T CD4$^+$ específicos contra el VHC (Tabla 4).

Tabla 3. Linfocitos T CD4$^+$ específicos para NS5a de VHC en ratones inmunizados con ADN NS5a o NS345a			
CPM promedio			
ADN NS5a		ADN NS345a	
p222D	medios	p222D	medios
4523	740	4562	861
(x6,1)		(x5,3)	
p222D es un péptido epitópico de CD4$^+$ (aa: 2224- AELIEANLLWRQEMG-2238, SEQ ID NO: 2) de NS5a de VHC.			

Tabla 4. Linfocitos T $CD4^+$ específicos para NS5 de VHC estimulados por adenovirus o ADN que codifica NS345a			
CPM promedio			
Adeno NS345a		ADN NS345a	
p222D	medios	p222D	medios
896	357	1510	385
(x2,5)		(x3,9)	
p222D es un péptido epitópico de $CD4^+$ (aa: 2224- AELIEANLLWRQEMG-2238, SEQ ID NO: 2) de NS5a de VHC.			

EJEMPLO 5

Eficacia de las formulaciones de vacunas de ADN que codifican NS345a para estimular los LTC en ratones.

Se inmunizaron ratones con 10 µg-100 µg de ADN plasmídico que codificaba la proteína de fusión NS345a como se ha descrito en el Ejemplo 1, con ADN unido a PLG que codificaba NS345a, que se describe más adelante, o con ADN que codificaba NS345a, suministrado mediante electroporación (véase, por ejemplo, la publicación internacional Nº WO/0045823 para esta técnica de suministro). Las inmunizaciones fueron seguidas de una inyección de refuerzo, seis semanas más tarde, de 1×10^7 ufp de virus vaccinia que codificaba NS5a, ADN plasmídico que codificaba NS345a o ADN plasmídico que codificaba NS5a, cada uno como se ha descrito en el Ejemplo 1.

ADN suministrado mediante PLG. Se obtuvieron polímeros de polilactida-co-glicólido (PLG) de Boehringer Ingelheim, EE.UU. El polímero PLG utilizado en este estudio fue RG505, que tiene una relación de copolímero de 50/50 y un peso molecular de 65 kDa (datos del fabricante). Se prepararon micropartículas catiónicas con ADN adsorbido utilizando un proceso de evaporación de disolvente modificado, esencialmente como se describe en Singh *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2000) 97:811-816. En resumen, las micropartículas se prepararon emulsionando 10 ml de una solución de polímero al 5% p/v en cloruro de metileno con 1 ml de PBS a alta velocidad utilizando un homogeneizador IKA. A continuación, se añadió la emulsión primaria a 50 ml de agua destilada que contenía bromuro de cetil trimetil amonio (CTAB) (0,5% p/v). Esto dio lugar a la formación de una emulsión agua/aceite/agua que se agitó a 6.000 rpm durante 12 horas a temperatura ambiente, lo que permitió que se evaporase el cloruro de metileno. Las micropartículas resultantes se lavaron dos veces en agua destilada por centrifugación a 10.000 g y se liofilizaron. Después de la preparación, el lavado y la recogida, se adsorbió el ADN sobre las micropartículas incubando 100 mg de micropartículas catiónicas en una solución lmg/ml de ADN a 4ºC durante 6 horas. A continuación, se separaron las micropartículas por centrifugación, se lavó el sedimento con tampón TE y se liofilizaron las micropartículas.

La actividad de los LTC y la expresión de IFN-γ se midieron mediante ensayo de liberación de ^{51}Cr o tinción intracelular como se ha descrito en los ejemplos 2 y 3, respectivamente. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

Los resultados demuestran que la inmunización con ADN plasmídico que codifica NS345a para sensibilizar ratones da como resultado la activación de linfocitos T $CD8^+$ específicos contra el VHC.

Tabla 5: Eficacia de las formulaciones de vacunas de ADN que codifica NS345a para estimular los LCT en ratones

			ICS para IFN-gamma (% de linfocitos $CD8^+$ que son IFN-g+)					
Vacunas de ADN NS345a	Refuerzo	Media	Desv.Est. P	Nº de ratones estudiados	% de respuesta	Nº de experimentos	Veces de aumento *vs*. ADN "desnudo"	¿Actividad de LTC?
ADN NS345a	VVNS5a	1,02	1,70	41	68%	10	N/A	SI
ADN NS345a	ADN NS345a	0,02	0,04	22	5%	5	N/A	SI
ADN NS345a	ADN NS5a	0,22	0,21	24	63%	5	N/A	SI
ADN NS345a eV (electroporación)	VVNS5a	5,00	4,36	7	100%	2	4,90	SI
ADN PLGNS345a	VVNS5a	2,65	2,54	6	100%	2	2,60	SI
ADN PLGNS345a	ADN NS5a	0,33	0,24	15	80%	3	1,50	SI

EJEMPLO 6

Vías de inmunización y partículas de replicones SINCR (DC+) que codifican NS345a

Se prepararon partículas de replicones de alfavirus, por ejemplo, SINCR (DC+) como se describe en Polo *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1999) 96:4598-4603. Se inyectaron a los ratones 5×10^6 UI de partículas de replicones SINCR (DC+) que codificaban NS345a, por vía intramuscular (IM) como se ha descrito en el Ejemplo 1, o por vía subcutánea (S/C) en la base de la cola (BoT) y en la almohadilla plantar (FP), o con una combinación de 2/3 del ADN suministrado por administración IM y 1/3 por vía BoT. Las inmunizaciones fueron seguidas de una inyección de refuerzo de virus de vaccinia que codificaba NS5a como se ha descrito en el Ejemplo 1.

Se midió la expresión de IFN-γ mediante tinción intracelular como se ha descrito en el Ejemplo 3. Los resultados se muestran en la Tabla 6. Los resultados demuestran que la inmunización mediante partículas de replicones SINCR (DC+) que codifican NS345a por diversas vías da como resultado linfocitos T $CD8^+$ específicos contra el VHC que expresan IFN-γ.

Tabla 6: Vías de inmunización y partículas de replicones SINCR (DC+) que codifican NS345a (todos los ratones provocados con VVNS5a)

		ICS para IFN-gamma (% de linfocitos $CD8^+$ que son IFN-g+)				
Vacunas	Vías de inmunización	Media	Desv.Est.P	Nº de ratones estudiados	Nº de experimentos	% de ratones que respondieron
SINCR (DC+) $5X10^6$	100% IM (ta)	1,11	0,63	3	1	100%
SINCR (DC+) $SX10^6$	100% S/C (BoT + FP)	0,62	0,29	3	1	100%
SINCR (DC+) $5X10^6$	2/3 IM (ta) + 1/3 S/C (BoT)	2,43	2,00	3	1	100%

EJEMPLO 7

Partículas de replicones SINCR (DC+) vs. SINDC (LP) que codifican NS345a

Se prepararon partículas de replicones de alfavirus, por ejemplo, SINCR (DC+) y SINCR (LP) como se describe en Polo *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1999) 96:4598-4603. Se inmunizaron ratones con 1 x 10^3 UI a 1 x 10^7 UI de partículas de replicones SINCR (DC+) o SINCR (LP) que codificaban NS345a, mediante inyección intramuscular en el músculo tibial anterior, seguido de una inyección de refuerzo, a las 6 semanas, de 10^7 ufp de virus vaccinia que codificaba NS5a.

Se midió la expresión de IFN-γ mediante tinción intracelular como se ha descrito en el Ejemplo 3. La administración de un aumento del número de partículas de replicones SINCR (DC+) que codificaban NS345a dio como resultado un aumento del % de linfocitos T $CD8^+$ que expresaban IFN-γ.

EJEMPLO 8

Estimulación con replicones de alfavirus, seguido de diversos regímenes de refuerzo.

Se prepararon partículas de replicones de alfavirus, por ejemplo, SINCR (DC+) como se describe en Polo *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1999) 96:4598-4603. Se sensibilizaron ratones con SINCR (DC+), 1,5 x 10^6 UI de partículas de replicones que codificaban NS345a, mediante inyección intramuscular en el músculo tibial anterior, seguido de una dosis de refuerzo, a las 6 semanas, de 10 µg-100 µg de ADN plasmídico que codificaba NS5a, de 10^{10} partículas adenovirales que codificaban NS345a, de 1,5 x 10^6 IU de partículas de replicones SINCR (DC+) que codificaban NS345a, o de 10^7 ufp de virus vaccinia que codificaba NS5a.

Se midió la expresión de IFN-γ mediante tinción intracelular como se ha descrito en el Ejemplo 3. Los resultados se muestran en la Tabla 7. Los resultados demuestran que el refuerzo con virus vaccinia que codifica ADN NS5a da como resultado la generación más fuerte de linfocitos T $CD8^+$ específicos contra el VHC que expresan IFN-γ. El refuerzo con el plásmido que codifica NS5a ADN también da como resultado una buena respuesta, mientras que las menores respuestas se observaron con animales estimulados con SINCR DC+ o NS345a adenoviral.

Tabla 7: Estimulación con partículas de replicones de alfavirus, seguida de diversos regímenes de refuerzo						
		ICS para IFN-gamma (% de linfocitos $CD8^+$ que son IFN-g+)				
Vacunas	Refuerzo	Media	Desv.Est.P	Nº de ratones estudiados	Nº de experimentos	% de ratones que respondieron
SINCR (DC+) $1,5X10^6$	ADN NS5a	0,46	0,36	4	1	75%
SINCR (DC+) $1,5X10^6$	Adeno NS345a ($10X10^{10}$)	0,04	0,04	4	1	25%
SINCR (DC+) $1,5X10^6$	SINCR (DC+) $1,5X10^6$	0,06	0,06	8	2	25%
SINCR (DC+) $1,5X10^6$	VVNS5a ($1X10^7$)	2,43	2,45	4	1	100%

EJEMPLO 9

Alfavirus que expresan NS345a

Se prepararon partículas de replicones de alfavirus, por ejemplo, SINCR (DC+) y SINCR (LP) como se describe en Polo *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1999) 96:4598-4603. Se inmunizaron ratones con 1×10^2 UI a 1×10^6 UI de replicones SINCR (DC+) que codificaban NS345a mediante una combinación de vías de administración (2/3 IM y 1/3 S/C), así como mediante S/C solo, o con 1×10^2 UI a 1×10^6 UI de partículas de replicones SINCR (LP) que codificaban NS345a mediante una combinación de las vías de administración (2/3 IM y 1/3 S/C), así como mediante S/C solo. Las inmunizaciones fueron seguidas de una inyección de refuerzo, a las 6 semanas, de 10^7 ufp de virus vaccinia que codificaba NS5a.

Se midió la expresión de IFN-γ mediante tinción intracelular como se ha descrito en el Ejemplo 3. Los resultados se muestran en la Figura 1. Los resultados indican la activación de linfocitos T $CD8^+$ específicos contra el VHC.

EJEMPLO 10

Eficacia de las formulaciones de vacunas de ADN que codifica NS5a para estimular los LTC en ratones

Se inmunizaron ratones con 10 µg-100 µg de ADN plasmídico que codificaba NS5a como se ha descrito en el Ejemplo 1 o con ADN unido a PLG que codificaba NS5a como se ha descrito en el Ejemplo 5. Las inmunizaciones fueron seguidas de una inyección de refuerzo, a las 6 semanas, de 10 µg-100 µg de ADN plasmídico que codificaba NS5a, de 10^{10} partículas adenovirales que codificaban NS345a, de $1,5 \times 10^6$ UI de partículas de replicones SINCR (DC+) que codificaban NS345a, o de 10^7 ufp de virus vaccinia que codificaba NS5a.

Se midió la actividad de los LTC y la expresión de IFN-γ mediante los métodos descritos en los Ejemplos 2 y 3.

Los resultados se muestran en la Tabla 8. Los resultados demuestran que la estimulación con ADN plasmídico que codifica NS5a o ADN unido a PLG que codifica NS5a da como resultado la activación de los linfocitos T $CD8^+$ específicos contra el VHC.

Tabla 8: Eficacia de las formulaciones de vacunas de ADN que codifica NS5a para estimular los LCT en ratones

			ICS para IFN-gamma (% de linfocitos $CD8^+$ que son IFN-g+)					
Vacunas NS5a	Refuerzo	Media	Desv.Est.P	Nº de ratones estudiados	% de respuesta	Nº de experimentos	Veces de aumento *vs*. ADN "desnudo"	¿Actividad de LTC?
ADN NS5a	VVNS5a	1,67	1,49	8	100%	3	N/A	SI
ADN NS5a	ADN NS5a	0,17	0,09	12	83%	3	N/A	SI
ADN PLGNS5a	ADN NS5a	0,22	0,09	9	100%	2	1,29	SI
ADN NS5a	Adeno NS345a	0,10	0,08	4	50%	1	N/A	NO
ADN NS5a	SINCR NS345a	0,20	0,17	4	75%	1	N/A	SI

EJEMPLO 11

Eficacia de las formulaciones de vacuna de ADN que codifica NS345b para estimular los LTC en ratones

Se inmunizaron ratones con 10 µg-100 µg de ADN plasmídico que codificaba NS34b mediante inyección intramuscular en el músculo tibial anterior o con ADN unido a PLG que codificaba NS5a como se ha descrito en el Ejemplo 5. Las inmunizaciones fueron seguidas de una inyección de refuerzo de ADN plasmídico que codificaba NS5a como se ha descrito en el Ejemplo 1.

Se midió la actividad de los LTC y la expresión de IFN-γ mediante los métodos descritos en los Ejemplos 2 y 3.

Los resultados se muestran en la Tabla 9. Los resultados demuestran que la estimulación con ADN plasmídico que codifica NS345b o NS345b unido a PLG da como resultado la activación de los linfocitos T $CD8^+$ específicos contra el VHC.

Tabla 9: Eficacia de las formulaciones de vacunas de ADN que codifica NS345b para estimular los LCT en ratones

			ICS para IFN-gamma (% de linfocitos $CD8^+$ que son IFN-g+)					
Vacunas de ADN NS345	Refuerzo	Media	Desv.Est.P	Nº de ratones estudiados	% de respuesta	Nº de experimentos	Veces de aumento *vs*. ADN "desnudo"	¿Actividad de LTC?
ADN NS345	ADN NS5a	0,18	0,16	15	60%	3	N/A	SI
ADN PLGNS345	ADN NS5a	0,30	0,33	14	57%	3	1,67	SI

EJEMPLO 12

Administración de ADN mediante plásmidos independientes

Se inmunizaron ratones con 100 µg de ADN plasmídico que codificaba NS345a o con 100 µg de ADN unido a PLG que codificaba NS345a. Además, se administraron al mismo tiempo, a otro grupo de ratones, plásmidos de ADN independientes que codificaban NS5a, NS34a y NS4ab (33,3 µg de cada uno). Por último, se administró al mismo tiempo, a otro grupo de ratones, ADN unido a PLG que codificaba NS5a, NS34a y NS4ab (33,3 µg de cada uno). Las inmunizaciones fueron seguidas de una inyección de refuerzo de $1x10^7$ ufp de virus vaccinia que codificaba NS5a, 6 semanas después de la primera inmunización.

Se midió la expresión de IFN-γ mediante el método descrito en el Ejemplo 3. Los resultados se muestran en la Figura 2. Los resultados demuestran una respuesta especialmente vigorosa en la activación de los linfocitos T $CD8^+$ específicos contra el VHC cuando el ADN se descompone en subunidades más pequeñas y se une a PLG.

Por lo tanto, se describen polipéptidos de VHC, ya sea en solitario o en forma de fusiones, para estimular respuestas inmunitarias mediadas por células.

REIVINDICACIONES

1. Método *in vitro* para activar linfocitos T que reconocen un epítopo de un polipéptido de VHC, que comprende la etapa de:

poner en contacto los linfocitos T con una proteína de fusión que comprende un polipéptido NS3, un polipéptido NS4, un polipéptido NS5 de un virus de la hepatitis C (VHC) y un polipéptido de la región central de la poliproteína de VHC en los aminoácidos 1-191 de la poliproteína de VHC, numerados con respecto a VHC-1, mediante el cual una población de linfocitos T activados reconoce un epítopo de los polipéptidos NS3, NS4, NS5a o NS5b.

2. Proteína de fusión que comprende un polipéptido NS3, un polipéptido NS4, un polipéptido NS5 de un virus de la hepatitis C (VHC) y un polipéptido de la región central de la poliproteína de VHC en los aminoácidos 1-191 de la poliproteína de VHC, numerados con respecto a VHC-1 para su uso en la generación de una respuesta inmunitaria contra el VHC en un mamífero.

3. Uso de una proteína de fusión que comprende un polipéptido NS3, un polipéptido NS4, un polipéptido NS5 de un virus de la hepatitis C (VHC) y un polipéptido de la región central de la poliproteína de VHC en los aminoácidos 1-191 de la poliproteína de VHC, numerados con respecto a VHC-1 en la fabricación de un medicamento para activar linfocitos T que reconocen un epítopo de un polipéptido de VHC, mediante el cual una población de linfocitos T activados reconoce un epítopo de los polipéptidos NS3, NS4, NS5a o NS5b.

4. Método según la reivindicación 1 o uso según la reivindicación 3 en el que los linfocitos T se obtienen de un mamífero seleccionado del grupo que consiste en un ratón, un babuino, un chimpancé y un ser humano.

5. Método según la reivindicación 1 o uso según la reivindicación 3 en el que la población de linfocitos T comprende linfocitos T $CD4^+$.

6. Método según la reivindicación 1 o uso según la reivindicación 3 en el que la población de linfocitos T comprende linfocitos T $CD8^+$.

7. Método o uso según la reivindicación 6 en el que los linfocitos T $CD8^+$ expresan interferón-γ.

8. Método o uso según la reivindicación 6 en el que los linfocitos T $CD8^+$ reconocen específicamente un epítopo de un polipéptido NS5a.

9. Método o uso según la reivindicación 8 en el que el epítopo está seleccionado del grupo que consiste en los epítopos que se muestran en la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2.

10. Método según la reivindicación 1 o uso según la reivindicación 3 en el que los linfocitos T comprenden linfocitos T $CD4^+$ y $CD8^+$.

11. Método según la reivindicación 1 en el que la etapa de poner en contacto comprende adicionalmente poner en contacto los linfocitos T con un adyuvante.

12. Uso según la reivindicación 3 en el que el medicamento comprende un adyuvante.

13. Método según la reivindicación 1 o uso según la reivindicación 3 en el que la proteína de fusión es proporcionada por un polinucleótido que codifica la proteína de fusión.

14. Método o uso según la reivindicación 13 en el que el polinucleótido es ADN.

15. Método o uso según la reivindicación 13 en el que el polinucleótido es ARN.

16. Uso según la reivindicación 3 en el que los linfocitos T están en un mamífero.

17. Uso según la reivindicación 16 en el que el mamífero está seleccionado del grupo que consiste en un ratón, un babuino, un chimpancé y un ser humano.

18. Método o uso según la reivindicación 4 o uso según la reivindicación 16 en el que el mamífero está infectado con un VHC.

19. Método o uso según la reivindicación 4 o uso según la reivindicación 16 en el que el mamífero no está infectado con un VHC.

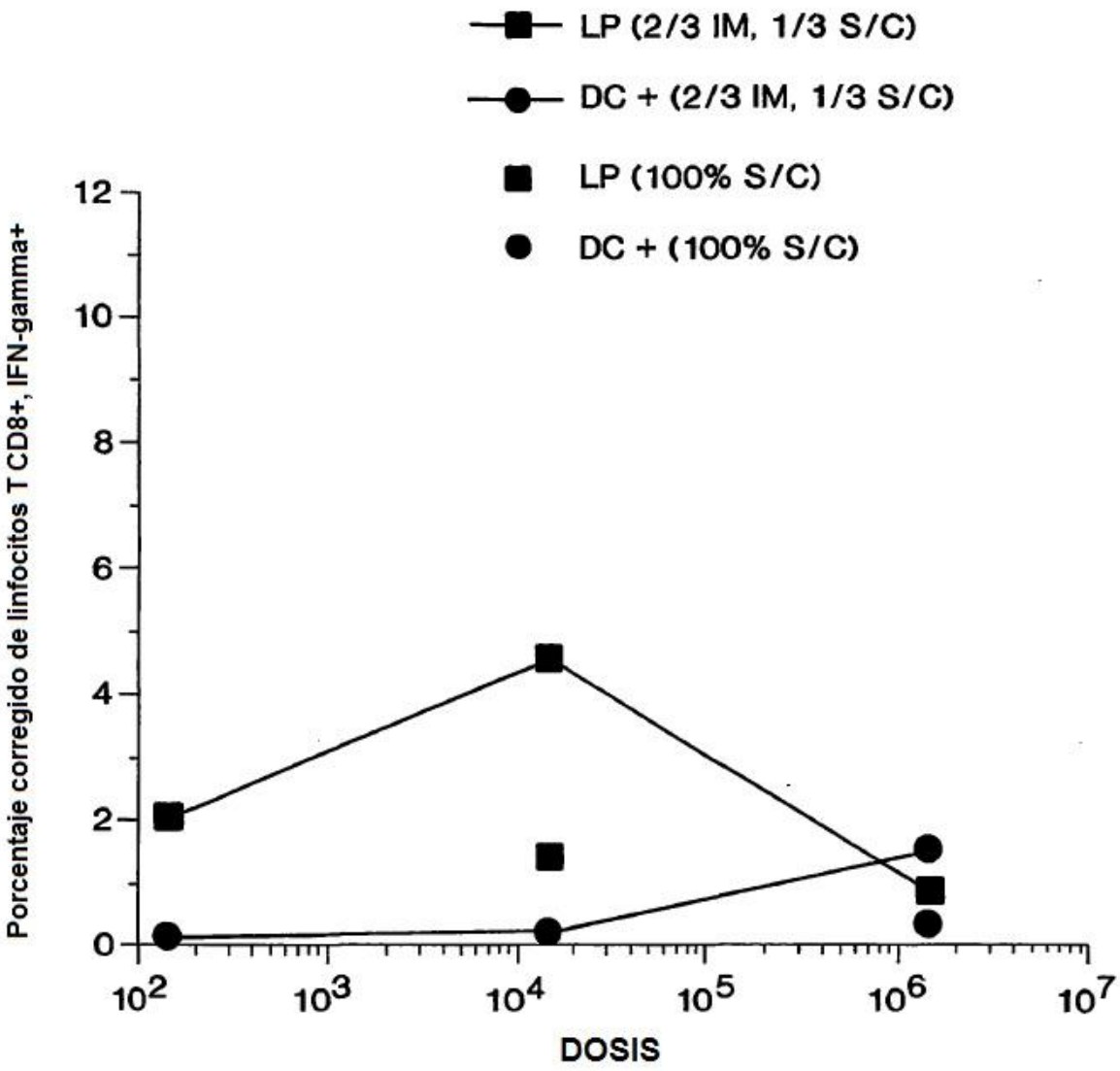
LP (2/3 IM, 1/3 S/C)
DC + (2/3 IM, 1/3 S/C)
LP (100% S/C)
DC + (100% S/C)
Porcentaje corregido de linfocitos T CD8+, IFN-gamma+
12
10
8
6
4
2
0
10^2
10^3
10^4
10^5
10^6
10^7
DOSIS

FIG. 1

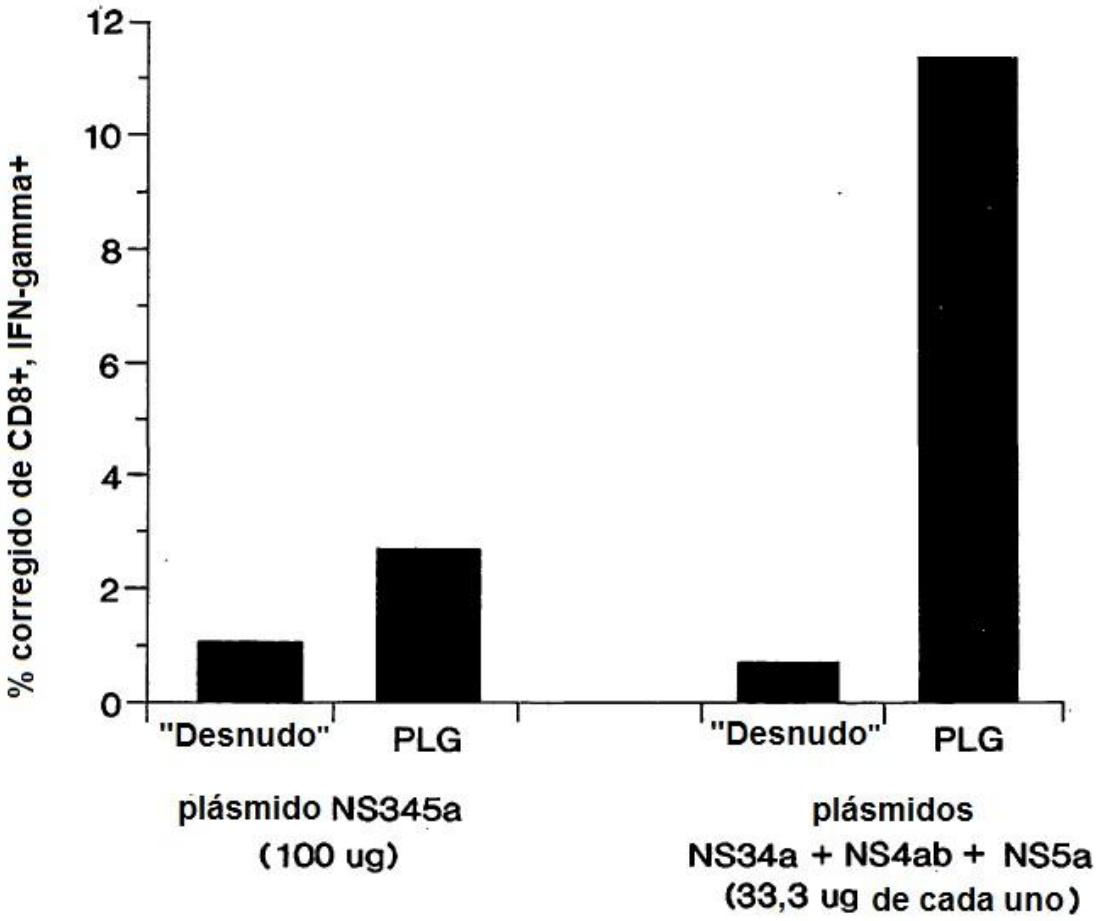
% corregido de CD8+, IFN-gamma+
12
10
8
6
4
2
0
"Desnudo"
PLG
"Desnudo"
PLG
plásmido NS345a
(100 ug)
plásmidos
NS34a + NS4ab + NS5a
(33,3 ug de cada uno)

FIG. 2