

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 551 113**

51 Int. Cl.:

A61K 39/39 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

C07K 14/005 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/29 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.01.2007 E 07709585 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.08.2015 EP 1981537**

54 Título: **Proteína E1E2 del VHC adyuvantada con MF59 más vector de alfavirus que codifica E1E2 del VHC para provocar linfocitos T específicos del VHC**

30 Prioridad:

04.01.2006 US 756354 P

11.05.2006 US 799840 P

25.08.2006 US 840082 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.11.2015

73 Titular/es:

GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. (100.0%)

Rue de l'Institut, 89

1330 Rixensart, BE

72 Inventor/es:

HOUGHTON, MICHAEL y

LIN, YIN-LING

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 551 113 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Proteína E1E2 del VHC adyuvantada con MF59 más vector de alfavirus que codifica E1E2 del VHC para provocar linfocitos T específicos del VHC

Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere a la activación de linfocitos T específicos del virus de la hepatitis C (VHC). Más particularmente, la invención se refiere a usar composiciones de proteína del VHC que incluyen complejos de E1E2 del VHC y o proteínas que comprenden genes no estructurales del VHC y posteriormente reforzar la respuesta inmunitaria usando un vector viral que comprende composiciones de ácido nucleico que codifican complejos de E1E2 del VHC y o genes no estructurales del VHC, para estimular respuestas inmunitarias humorales y mediadas por célula, tales como, por ejemplo, para activar linfocitos T específicos del VHC y provocar anticuerpos que neutralizan la infectividad del virus VHC.

Antecedentes

- 15 El virus de la hepatitis C (VHC) se identificó hace una década y ahora se sabe que es la causa más frecuente de hepatitis viral no A y no B (Choo y col., Science (1989) 244:359-362; Armstrong y col., Hepatology (2000) 31:777). El VHC infecta aproximadamente el 3% de la población mundial, una estimación de 200 millones de personas (Cohen, J., Science (1999) 285:26). Anualmente se producen aproximadamente 30.000 infecciones por el VHC nuevamente adquiridas en los Estados Unidos. Adicionalmente, hay una gran incidencia de infección por el VHC en países desarrollados. Aunque la respuesta inmunitaria es capaz de limpiar la infección por el VHC, la mayoría de las infecciones se vuelven crónicas. La mayoría de las infecciones agudas siguen siendo asintomáticas y la enfermedad hepática normalmente se produce solo después de años de infección crónica.

- 20 La secuencia genómica viral del VHC es conocida, ya que hay procedimientos para obtener la secuencia. Véanse, por ejemplo, las publicaciones internacionales N° WO 89/04669; WO 90/11089; y WO 90/14436. El VHC tiene un genoma de ARN monocatenario de sentido positivo de 9,5 kb y es un miembro de la familia de virus Flaviridae. Se han identificado al menos seis genotipos de VHC distintos, pero relacionados, basándose en análisis filogenéticos (Simmonds y col., J. Gen. Virol. (1993) 74:2391-2399). El virus codifica una única poliproteína que tiene aproximadamente 3000 residuos de aminoácidos (Choo y col., Science (1989) 244:359-362; Choo y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991) 88:2451-2455; Han y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991) 88:1711-1715).

- 25 En particular, como se muestra en la Figura 1, varias proteínas están codificadas por el genoma del VHC. El orden y nomenclatura de los productos de escisión de la poliproteína del VHC es del siguiente modo: NH₂-C-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4a-NS4b-NS5a-NS5b-COOH. También se ha identificado otra proteína (F) y resulta del desplazamiento del marco de lectura traduccional dentro del gen C. Branch y col., Semin. Liver Dis. (2005) 25:105-117. La escisión inicial de la poliproteína se cataliza por proteasas huésped que liberan tres proteínas estructurales, la nucleoproteína de la cápside del extremo N (llamada $\square$ core $\square$) y dos proteínas de la envuelta, gpE1 (también conocida como E) y gpE2 (también conocida como E2/NS1), además de proteínas no estructurales (NS) que codifican las enzimas virales y otras actividades. Las regiones de NS se llaman NS2, NS3, NS4 y NS5. NS2 es una proteína de la membrana integral con actividad proteolítica y, en combinación con NS3, escinde la unión NS2-NS3. La proteasa NS3, junto con su cofactor NS4a, sirve para procesar la poliproteína restante. En estas reacciones, NS3 libera un cofactor NS3 (NS4a), dos proteínas (NS4b y NS5a) y una ARN polimerasa dependiente de ARN (NS5b). La completitud de la maduración de poliproteína se inicia por la escisión autocatalítica en la unión NS3-NS4a, catalizada por la serina proteasa NS3.

- 30 E1 se detecta como una especie de glicoproteína de 32-35 kDa y se convierte por la endoglicosidasa H en una especie de aproximadamente 18 kDa. Por el contrario, la glicoproteína E2 muestra un complejo patrón tras la inmunoprecipitación de acuerdo con la generación de múltiples especies (Spaete y col., Virol. (1992) 188:819-830; Selby y col., J. Virol. (1996) 70:5177-5182; Grakoui y col., J. Virol. (1993) 67:1385-1395; Tomei y col., J. Virol. (1993) 67:4017-4026). Las proteínas de la envuelta del VHC E1 y E2 forman un complejo estable que es co-inmunoprecipitable (Grakoui y col., J. Virol. (1993) 67:1385-1395; Lanford y col., Virology (1993) 197:225-235; Ralston y col., J. Virol. (1993) 67:6753-6761).

- 35 E1 y E2 de longitud completa son retenidas dentro del retículo endoplásmico de las células y carecen de hidrato de carbono complejo cuando se expresan establemente o en un sistema de virus de la variolovacuna transitorio (Spaete y col., Virology (1992) 188:819-830; Ralston y col., J. Virol. (1993) 67:6753-6761). Como las proteínas E1 y E2 normalmente están unidas a la membrana en estos sistemas de expresión, se han producido formas truncadas secretadas con el fin de facilitar la purificación de las proteínas. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 6.121.020. Adicionalmente, se ha descrito la producción intracelular de E1E2 en células HeLa. Véase, por ejemplo, la publicación internacional N° WO 98/50556.

- 40 Las glicoproteínas E1 y E2 del VHC son de interés considerable debido a que se ha mostrado que son protectoras contra la exposición viral en estudios en primate (Choo y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1994) 91:1294-1298; Houghton, M. y Abrignani, S., Nature (2005) 436:961-966). Meunier y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2005) 102:4560-4565 usaron pseudopartículas retrovirales que mostraban glicoproteínas E1 y E2 intactas y encontraron

que los anticuerpos neutralizantes virales producidos durante las infecciones por el VHC-1 también eran capaces de neutralizar los genotipos del VHC 4, 5 y 6, pero solo tienen neutralización limitada contra los genotipos 2 y 3 del VHC.

5 Actualmente, las únicas terapias disponibles para el VHC son IFN- α y ribavirina. Desafortunadamente, estos agentes son eficaces en menos de la mitad de los pacientes tratados (Poynard y col., *Lancet* (1998) 352:1426; McHutchison y col., *Engl. J. Med.* (1998) 339:1485). Por tanto, hay una necesidad urgente del desarrollo de vacunas eficaces para prevenir la infección por el VHC, así como de inmunoterapias que van a usarse como alternativa, o conjuntamente con terapias existentes.

10 La inmunidad de linfocitos T al VHC puede determinar el desenlace de la infección por el VHC y enfermedad (Missale y col., *J. Clin. Invest.* (1996) 98:706; Cooper y col., *Immunity* (1999) 10:439; y Lechner y col., *J. Exp. Med.* (2000) 191:1499). Se ha mostrado que respuestas de linfocitos T específicas de virus desempeñan una función importante en resolver infecciones agudas por el VHC (Shoukry y col., *Ann. Rev. Microbiol.* (2004) 58:391-424). Un estudio concluyó que los individuos que mostraban respuestas predominantes de linfocitos T colaboradores Th0/Th1 CD4+ resolvieron sus infecciones por el VHC, mientras que aquellos con respuestas tipo Th2 tendieron a progresar a cronicidad (Tsai y col., *Hepatology* (1997) 25:449-458). Además, se ha mostrado que hay una correlación inversa entre la frecuencia de linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos del VHC y la carga viral (Nelson y col., *J. Immunol.* (1997) 158:1473). Se ha mostrado que el control del VHC en chimpancé se asocia a una respuesta Th1 de linfocitos T (Major y col., *J. Virol.* (2002) 76:6586-6595). En el modelo de chimpancé, respuestas de linfocitos T CD8+ fuertes y multispecíficas se han asociado a control espontáneo del VHC, y la emergencia de mutantes de escape se ha asociado al desarrollo de persistencia viral (Weiner y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1995) 92:2755-2759). Por tanto, parece que las respuestas de linfocitos T específicas del VHC desempeñan una función importante en controlar la infección por el VHC.

25 A pesar de los amplios avances en el desarrollo de productos farmacéuticos contra ciertos virus como el VIH, el control de la infección aguda y crónica por el VHC ha tenido un éxito limitado (Hoofnagle y di Bisceglie (1997) *N. Engl. J. Med.* 336:347-356). Como se ha explicado anteriormente, la generación de una fuerte respuesta de linfocitos T citotóxicos (CTL) puede ser importante para el control y la erradicación de infecciones por el VHC. Así, hay una necesidad en la materia de procedimientos eficaces de inducción de fuertes respuestas de CTL contra el VHC.

30 El documento WO0147551 enseña un procedimiento para provocar una respuesta inmunitaria que se une al antígeno E1E2 o E2 del VHC usando polipéptido E2 o E1E2 del VHC y polinucleótido que codifica el mismo en un animal o ser humano (reivindicación 1), dicho procedimiento puede comprender además la administración de un polipéptido codificado por el polinucleótido (reivindicación 27).

35 El procedimiento puede usarse como tratamiento profiláctico o terapéutico contra la infección por el VHC (resumen), en el que E1E2 del VHC se desvela como un polipéptido que tiene los residuos de aminoácidos 192-809 del VHC (resumen) y llevado por un vector viral (p 19, l 11) que incluye un vector de alfavirus (p 19, l 17) y adyuvante de emulsión de aceite en agua que comprende 5% en peso/volumen de escualeno, 0,5% de Tween 80 y/o 0,5% de Span 85 y opcionalmente, MTP-PE, 5% (p 25, l 8-10). La composición de adyuvante es preferentemente alumbre o MF59 que compensa inherentemente los tres componentes citados anteriormente (p 25, l 30).

40 Puig y col., *Vaccine* (2004) 22:991-1000 desvelan que la inmunización de chimpancé con una vacuna basada en proteína de la envuelta potencia respuestas inmunitarias humorales y celulares específicas que retrasan la infección por el virus de la hepatitis C.

Houghton y col., *Nature* (2005) 436:961-966 tratan las perspectivas para una vacuna contra la hepatitis C.

Belyakov y col., *Blood* (2005) 107:3258-3264 observan el impacto de los CTL CD8+ con alta avidez por la mucosa inducida por vacuna en el retraso de la diseminación viral del SIDA de la mucosa.

Resumen de la invención

45 El alcance de la presente invención se define por las reivindicaciones y cualquier información que no entre dentro de las reivindicaciones se proporciona para información solo.

La invención proporciona una primera composición que comprende un complejo de proteína E1E2 del VHC y un adyuvante MF59 para su uso en un procedimiento de estimular una respuesta inmunitaria en un sujeto vertebrado, comprendiendo dicho procedimiento:

50 administrar al menos una vez la primera composición a dicho sujeto vertebrado; y
posteriormente administrar al menos una vez una segunda composición que comprende un vector de alfavirus que comprende un ácido nucleico que codifica un complejo de E1E2 del VHC a dicho sujeto vertebrado,
por el cual el ácido nucleico que codifica un complejo de E1E2 del VHC se expresa en una o más células del sujeto y se produce el complejo de proteína E1E2.

La invención también proporciona el uso de una primera composición que comprende un complejo de proteína E1E2 del VHC y un adyuvante MF59 y una segunda composición que comprende un vector de alfavirus que comprende un ácido nucleico que codifica un complejo de E1E2 del VHC, por el cual el ácido nucleico que codifica un complejo de E1E2 del VHC se expresa en una o más células de un sujeto y se produce el complejo de proteína E1E2, en la fabricación de:

(i) un medicamento para activar linfocitos T de un sujeto vertebrado, en el que dichos linfocitos T reconocen un epítipo de un polipéptido del virus de la hepatitis C (VHC); o

(ii) un medicamento para estimular una respuesta inmunitaria en un sujeto vertebrado.

La invención también proporciona un kit para inducir o generar una respuesta inmunitaria en un sujeto, comprendiendo dicho kit (i) una primera composición que comprende una proteína E1E2 del VHC y un adyuvante MF59; y (ii) una segunda composición que comprende un vector de alfavirus que codifica al menos una porción de la proteína E1E2 del VHC de la primera composición.

La inmunización con proteínas NS345 del VHC puede provocar respuestas de linfocitos T al VHC y CpG puede potenciar la respuesta. La presente invención proporciona combinación mejorada de sensibilización-refuerzos que proporcionan tanto una respuesta de anticuerpo neutralizante como respuestas de linfocitos T (linfocito T CD4+ y CTL) al VHC.

En particular, la invención proporciona una combinación de proteínas y polinucleótidos del VHC que codifican una o más proteínas del VHC. En una realización, los polinucleótidos que codifican las proteínas se administran como parte de una partícula de vector viral. En una realización, la partícula de vector viral es un alfavirus y en una realización preferida es un replicón de alfavirus quimérico encapsidado en una partícula de alfavirus defectuosa. En una realización, la respuesta inmunitaria comprende la activación de linfocitos T específicos del VHC. La presente invención se basa en parte en el sorprendente descubrimiento de que la sensibilización de respuestas inmunitarias usando vacunas de proteína E1E2 del VHC y el refuerzo con construcciones de ácidos nucleicos de E1E2 del VHC administradas en una partícula de alfavirus defectuosa estimula una robusta respuesta de linfocitos T CD8+. Así, el uso de tales combinaciones proporciona un enfoque eficaz para estimular una respuesta inmunitaria celular y o humoral a los inmunógenos E1E2 del VHC.

Adicionalmente, la sensibilización con una poliproteína del VHC o proteína de fusión del VHC y el refuerzo con alfavirus que codifica al menos una porción de la misma poliproteína o proteína de fusión también puede proporcionar una elevada respuesta inmunitaria al VHC.

En una realización, la invención proporciona una llamada pauta de inmunización de “sensibilización-refuerzo” para provocar o aumentar una respuesta inmunitaria al VHC en un sujeto. En una realización preferida, la etapa de inmunización por sensibilización comprende inmunizar un sujeto con una o más proteínas, seguido de una etapa de refuerzo que comprende inmunizar el sujeto con un vector viral que codifica una o más de dichas proteínas. En algunas realizaciones, el vector viral es un alfavirus. En algunas realizaciones, las proteínas son proteínas del VHC. En algunas realizaciones, el sujeto es un sujeto vertebrado. En algunas realizaciones, el sujeto vertebrado es un ser humano. En una realización preferida, las proteínas son proteínas del VHC y el vector viral es un vector de alfavirus y el sujeto es un animal vertebrado o sujeto vertebrado. En algunas realizaciones, el animal vertebrado o sujeto vertebrado es un ser humano.

En ciertas realizaciones, las composiciones inmunogénicas descritas en el presente documento se administran a un sujeto mamífero y en algunas realizaciones el sujeto es un ser humano. Sensibilización, como se usa en el presente documento, significa cualquier procedimiento por el cual una primera inmunización con las composiciones de proteína inmunogénicas descritas en el presente documento permite la generación de una respuesta inmunitaria al antígeno diana o antígenos tras una segunda o posterior inmunización (refuerzo) con las partículas de replicón de virus descritas en el presente documento que comprenden al menos uno del mismo antígeno o antígenos administrados en la etapa de sensibilización, en el que la segunda respuesta inmunitaria es mayor que la lograda si la primera inmunización tanto no se proporciona como si la primera inmunización administrada no comprende el mismo antígeno o antígenos administrados en la segunda inmunización. La sensibilización engloba pautas que incluyen una dosis única o dosificaciones múltiples, administradas cada hora, diariamente, semanalmente, mensualmente o anualmente. En una realización particular, la sensibilización (o inmunización por sensibilización) comprende al menos dos administraciones (que comprenden uno o más dosis o dosificación). Por ejemplo, en una realización particular, la sensibilización por administración de una o más composiciones inmunogénicas descritas en el presente documento implica al menos dos (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más) administraciones (que comprenden una o más dosis o dosificaciones) de la(s) composición (composiciones) inmunogénica(s). El intervalo de tiempo entre administraciones puede ser horas, días, semanas, meses o años. Además, en ciertas realizaciones, las etapas repetidas pueden realizarse usando las mismas composiciones inmunogénicas o diferentes.

En algunas realizaciones, las composiciones inmunogénicas descritas en el presente documento se administran como un refuerzo para reforzar la respuesta inmunitaria lograda después de la sensibilización del sujeto. Se administran partículas de replicón de alfavirus como refuerzo, algún tiempo después de la sensibilización. Las

- partículas de replicón de virus administradas como refuerzo comprenden un ácido nucleico que codifica al menos un mismo antígeno administrado por al menos una etapa de sensibilización. En una realización particular, el refuerzo (o inmunización por refuerzo) es aproximadamente dos (2) a veintisiete (27) semanas después de la sensibilización (o inmunización por sensibilización). El refuerzo engloba pautas que incluyen una dosis única o dosificaciones múltiples, administradas cada hora, diariamente, semanalmente, mensualmente o anualmente. En ciertas realizaciones, el refuerzo (o inmunización por refuerzo) comprende al menos una administración. En otras realizaciones, el refuerzo (o inmunización por refuerzo) comprende al menos dos administraciones (que comprenden una o más dosis o dosificaciones). Por ejemplo, en un caso tal, en una realización particular, el refuerzo por administración de una o más partículas de replicón de virus implica al menos dos (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más) administraciones (que comprenden una o más dosis o dosificación) de la(s) partícula(s) de replicón de virus. El intervalo de tiempo entre administraciones puede ser horas, días, semanas, meses o años. Además, en ciertas realizaciones, las etapas repetidas pueden realizarse usando las mismas partículas de replicón de virus o composiciones inmunogénicas o diferentes.
- Las inmunizaciones por sensibilización o refuerzo pueden ser una combinación de una o más de las vías de inmunización intramuscular, mucosa o sistémica.
- La(s) etapa(s) de sensibilización comprende(n) inmunizar un sujeto con el heterodímero E1/E2 del VHC y un adyuvante que es MF59, seguido de una etapa de refuerzo que comprende la inmunización con una partícula de replicón de alfavirus que comprende un ácido nucleico que codifica la proteína E1/E2.
- En una realización, la(s) etapa(s) de sensibilización comprende(n) inmunizar un sujeto con el heterodímero E1/E2 del VHC, MF59 y un CpG, seguido de una etapa de refuerzo que comprende la inmunización con una partícula de replicón de alfavirus que comprende un ácido nucleico que codifica la proteína E1/E2.
- Las etapas de inmunización que comprenden la administración de una proteína, los kits y las composiciones de la invención pueden todos comprender además la administración o inclusión de un CpG u otra molécula inmunoestimulante y o adyuvante.
- En una realización, la(s) etapa(s) de sensibilización comprende(n) inmunizar un sujeto con el heterodímero E1/E2 del VHC, MF59 y un CpG, seguido de una etapa de refuerzo que comprende la inmunización con una partícula de replicón de alfavirus que comprende un ácido nucleico que codifica la proteína E1/E2.
- En una realización, la(s) etapa(s) de sensibilización comprende(n) inmunizar un sujeto vertebrado con el heterodímero E1/E2 del VHC, MF59 y un CpG, seguido de una etapa de refuerzo que comprende la inmunización con una partícula de replicón de alfavirus que comprende un ácido nucleico que codifica la proteína E1/E2.
- Los polipéptidos y nucleótidos que codifican dichos polipéptidos se derivan de la misma cepa aislada del VHC, o de cepas y cepas aisladas diferentes que incluyen cepas aisladas que tienen cualquiera de los diversos genotipos del VHC, para proporcionar elevada protección contra un amplio intervalo de genotipos del VHC.
- En una realización, la invención proporciona tratar un sujeto que ya se ha expuesto a la infección por el VHC (es decir, un sujeto vertebrado que ya se ha “sensibilizado” por exposición a uno o más antígenos del VHC) con una pauta de refuerzo de alfavirus para potenciar la respuesta inmunitaria al VHC en el sujeto vertebrado. En otras realizaciones en las que un sujeto vertebrado ya está infectado con o se ha expuesto a VHC, el tratamiento puede incluir una o más etapas de sensibilización junto con una o más etapas de refuerzo.
- En una realización, la invención proporciona tratar un sujeto vertebrado que ya se ha expuesto a la infección por el VHC (es decir, un sujeto vertebrado que ya ha sido “sensibilizado” por exposición a uno o más antígenos del VHC) con una pauta de refuerzo de alfavirus para potenciar la respuesta inmunitaria al VHC en el sujeto vertebrado. En otras realizaciones en las que un sujeto vertebrado ya se ha infectado con o expuesto al VHC, el tratamiento puede incluir una o más etapas de sensibilización junto con una o más etapas de refuerzo.
- La presente invención también proporciona un kit para inducir o generar una respuesta inmunitaria en un sujeto tal como un mamífero.
- El kit puede comprender dosis únicas o múltiples de la primera composición, de la segunda composición o de tanto la primera como la segunda composiciones. Así, en una realización particular, para facilitar las administraciones repetidas, el kit puede comprender una pluralidad de viales para una o ambas composiciones, comprendiendo cada vial la dosis que va a administrarse al sujeto en cada administración. El kit puede comprender además instrucciones para el uso del kit. En otras realizaciones, el kit también puede comprender un aplicador para administrar la primera composición y/o un aplicador para administrar la segunda composición al mamífero.
- Los kits de la invención pueden comprender además instrucciones para usar las composiciones del kit solas o junto con otras composiciones.
- Los complejos de proteínas E1/E2 y o el alfavirus que codifica dichos complejos de E1/E2 pueden ser secuencias de proteína parcial o completa (o que codifica proteína en el caso del vector viral) como se describen adicionalmente en

el presente documento. Además, no es necesario que la secuencia exacta usada como composición de inmunización de proteína se incluya en el ácido nucleico que codifica la secuencia de proteínas. Tanto la secuencia de aminoácidos como el ácido nucleico que codifica la secuencia de proteínas pueden ser parciales o completos respecto al genoma del VHC.

- 5 La primera y segunda composiciones pueden administrarse una o más veces en cualquier variedad de combinaciones, tales como, por ejemplo 1, 2, 3, 4, o 5 o más administraciones secuenciales de la primera composición que comprende una proteína, seguido de 1, 2, 3, 4 o 5 o más administraciones secuenciales de la segunda composición que comprende un vector viral. Además, la administración de la segunda composición puede producirse antes de la administración de una segunda composición o posterior a la primera composición.
- 10 Las primeras composiciones de proteína pueden comprender más de un adyuvante o un adyuvante y otra composición inmunoestimulante. Un adyuvante preferido es una emulsión de aceite en agua submicrométrica. En una realización, la emulsión de aceite en agua submicrométrica que va a añadirse a la composición de proteína comprende 4-5% en peso/volumen de escualeno, 0,25-1,0% en peso/volumen de monooleato de polioxietilensorbitano y/o 0,25-1,0% de trioleato de sorbitano, y opcionalmente, N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-hidroxi-fosforiloxi)-etilamina (MTP-PE). En una realización, la emulsión de aceite en agua submicrométrica es MF59. Una composición inmunoestimulante preferida es un ácido nucleico inmunoestimulante que en una composición preferida es un ácido nucleico inmunoestimulante de CpG.
- 15

En una realización preferida, la primera composición que comprende una proteína E1E2 puede producirse por expresión de un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80% de identidad de secuencias con la secuencia de aminoácidos representada en las posiciones 192-809 de las Figuras 2A-2C.

En otra realización preferida, la segunda composición que comprende un vector viral que comprende un ácido nucleico que codifica un complejo de E1E2 del VHC codifica una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80% de identidad de secuencias con la secuencia de aminoácidos representada en las posiciones 192-746 de las Figuras 2A-2C.

- 25 El adyuvante y el (los) antígenos de proteína pueden administrarse simultáneamente, secuencialmente o por separado. El adyuvante puede administrarse para sensibilizar el sujeto antes de la administración del (de los) antígeno(s) o después de la administración del (de los) antígeno(s) para reforzar la respuesta inmunitaria a ese antígeno. El adyuvante y el (los) antígeno(s) de proteína se administran preferentemente en mezcla.

- 30 El (Los) antígeno(s) de proteína y el vector viral pueden administrarse simultáneamente, secuencialmente o por separado. La composición de proteína puede administrarse para sensibilizar el sujeto antes de la administración del vector viral. El (Los) antígeno(s) de proteína y el vector viral se administran preferentemente secuencialmente con antígeno de proteína administrado al menos una vez antes de administrar el vector viral.

Breve descripción de las figuras

- 35 La Figura 1 es una representación en diagrama del genoma del VHC, que representa las diversas regiones de la poliproteína del VHC.
Las Figuras 2A-2C (SEC ID N°: 1 y 2, secuencia de aminoácidos encima de cada fila: y la secuencia del codón triplete de ácidos nucleicos bicatenario en la parte inferior de cada fila) muestran la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos correspondiente para la región E1/E2/p7 del VHC-1. Los números mostrados en la figura son con respecto a la poliproteína del VHC-1 de longitud completa. Se muestran las regiones E1, E2 y p7.
- 40 La Figura 3 muestra la expresión de CD8+ e IFN- γ específica del VHC en ratones vacunados como se describe en la leyenda y ejemplos.
La Figura 4 muestra la expresión de CD8+ e IFN- γ específica del VHC en ratones vacunados como se describen en los ejemplos.
- 45 La Figura 5a muestra la expresión de CD4+ e IFN- γ específica del VHC en ratones vacunados como se describe en la leyenda y ejemplos.
La Figura 5b muestra la expresión de CD8+ e IFN- γ específica del VHC en ratones vacunados como se describe en los ejemplos.
- 50 La Figura 6 muestra los resultados de ensayos de ELISA para la determinación de la producción de anticuerpos como se describe en los ejemplos.
La Figura 7 muestra un diagrama de la proteína de fusión E2NS3*NS4NS5tcore121 como se describe en los ejemplos.
- 55 La Figura 8 muestra gráficamente los resultados de linfocitos T CD4 específicos del VHC generados tras la inmunización con diversas construcciones de alfavirus NS como se describe en los ejemplos.
La Figura 9 muestra gráficamente los resultados de linfocitos T CD8 específicos del VHC generados tras la inmunización con diversas construcciones de alfavirus NS como se describe en los ejemplos.
La Figura 10 muestra gráficamente los resultados de linfocitos T CD8 específicos del VHC generados tras la inmunización con diversos alfavirus NS y o construcciones de polipéptido NS como se describe en los ejemplos.

La Figura 11 muestra gráficamente los resultados de linfocitos T CD4 específicos del VHC generados tras la inmunización con diversos alfavirus NS y o polipéptido NS como se describe en los ejemplos.

La Figura 12 muestra gráficamente los resultados de títulos de anticuerpos neutralizantes (es decir, títulos de anticuerpos para bloquear la unión de E1E2 a CD81) generados en ratones inmunizados con una pauta de sensibilización-refuerzo de E1E2 como se describe en los ejemplos.

La Figura 13 muestra gráficamente los resultados de la prevención de la infectividad por sueros de sensibilización-refuerzo en un cultivo celular de VHC / ensayo de luciferasa (es decir, un ensayo neutralizante de HCVcc).

La Figura 14 demuestra gráficamente la prevención de la infectividad para un cultivo celular de VHC / ensayo de luciferasa, en particular el ensayo neutralizante de HCVcc.

Descripción detallada de la invención

El alcance de la presente invención se define por las reivindicaciones y cualquier información que no entre dentro de las reivindicaciones se proporciona para información solo. La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, procedimientos convencionales de química, bioquímica, técnicas de ADN recombinante e inmunología, dentro de la experiencia de la materia. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, Fundamental Virology, 2nd Edition, vol. I & II (B.N. Fields and D.M. Knipe, eds.); Handbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell eds., Blackwell Scientific Publications); T.E. Creighton, Proteins: Structures and Molecular Properties (W.H. Freeman and Company, 1993); A.L. Lehninger, Biochemistry (Worth Publishers, Inc., current addition); Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd Edition, 1989); Methods In Enzymology (S. Colowick and N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.).

Las siguientes abreviaturas de aminoácidos se usan en todo el texto:

Alanina: Ala (A)	Arginina: Arg (R)
Asparagina: Asn (N)	Ácido aspártico: Asp (D)
Cisteína: Cys (C)	Glutamina: Gln (Q)
Ácido glutámico: Glu (E)	Glicina: Gly (G)
Histidina: His (H)	Isoleucina: Ile (I)
Leucina: Leu (L)	Lisina: Lys (K)
Metionina: Met (M)	Fenilalanina: Phe (F)
Prolina: Pro (P)	Serina: Ser (S)
Treonina: Thr (T)	Triptófano: Trp (W)
Tirosina: Tyr (Y)	Valina: Val (V)

1. DEFINICIONES

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

Los términos “polipéptido” y “proteína” se refieren a un polímero de residuos de aminoácidos y no se limitan a una longitud mínima del producto. Así, péptidos, oligopéptidos, dímeros, multímeros y similares están incluidos dentro de la definición. Tanto las proteínas de longitud completa como los fragmentos de las mismas están englobados por la definición. Los términos también incluyen modificaciones posteriores a la 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 delecciones, adiciones y sustituciones (generalmente conservativas en la naturaleza), a la secuencia nativa, mientras que la proteína mantenga la actividad deseada. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como mediante mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser accidentales, tales como mediante mutaciones de huéspedes que producen las proteínas o errores debido a la amplificación por PCR.

Por un “polipéptido E1” se indica una molécula derivada de una región E1 del VHC. La región E1 madura del VHC-1 empieza en aproximadamente el aminoácido 192 de la poliproteína y continúa hasta aproximadamente el aminoácido 383, numerado con respecto a la poliproteína del VHC-1 de longitud completa (véanse las Figuras 1 y 2A-2C. Los aminoácidos 192-383 de las Figuras 2A-2C se corresponden con las posiciones de aminoácidos 20-211 de SEC ID N°: 2). Los aminoácidos en aproximadamente 173 a aproximadamente 191 (aminoácidos 1-19 de SEC ID N°: 2) sirven de secuencia señal para la E1. Así, por un “polipéptido E1” se indica tanto una proteína E1 precursora, que incluye la secuencia señal, como un polipéptido E1 maduro que carece de esta secuencia, o incluso un polipéptido E1 con una secuencia señal heteróloga. El polipéptido E1 incluye una secuencia de anclaje a la membrana del extremo C que se produce en aproximadamente las posiciones de aminoácidos 360-383 (véase la publicación internacional N° WO 96/04301, publicada el 15 de febrero de 1996). Un polipéptido E1, como se define en el presente documento, puede o puede no incluir la secuencia de anclaje del extremo C o porciones de la misma.

Por un “polipéptido E2” se indica una molécula derivada de una región E2 del VHC. La región E2 madura del VHC-1 empieza en aproximadamente el aminoácido 383-385, numerado con respecto a la poliproteína del VHC-1 de longitud completa (véanse las Figuras 1 y 2A-2C. Los aminoácidos 383-385 de las Figuras 2A-2C se corresponden

con las posiciones de aminoácidos 211-213 de SEC ID N°: 2). Un péptido señal empieza en aproximadamente el aminoácido 364 de la poliproteína. Así, por un "polipéptido E2" se indica tanto una proteína E2 precursora, que incluye la secuencia señal, como un polipéptido E2 maduro que carece de esta secuencia, o incluso un polipéptido E2 con una secuencia señal heteróloga. El polipéptido E2 incluye una secuencia de anclaje a la membrana del extremo C que se produce en aproximadamente las posiciones de aminoácidos 715-730 y puede extenderse tan lejos como aproximadamente el residuo de aminoácido 746 (véase Lin y col., J. Virol. (1994) 68:5063-5073). Un polipéptido E2, como se define en el presente documento, puede o puede no incluir la secuencia de anclaje del extremo C o porciones de la misma. Además, un polipéptido E2 también puede incluir toda o una porción de la región p7 que se produce inmediatamente adyacente al extremo C de E2. Como se muestra en las Figuras 1 y 2A-2C, la región p7 se encuentra en las posiciones 747-809, numeradas con respecto a la poliproteína del VHC-1 de longitud completa (posiciones de aminoácidos 575-637 de SEC ID N°: 2). Adicionalmente, se sabe que existen múltiples especies de E2 del VHC (Spaete y col., Virol (1992) 188:819-830; Selby y col., J. Virol (1996) 70:5177-5182; Grakoui y col., J. Virol. (1993) 67:1385-1395; Tomei et al., J. Virol. (1993) 67:4017-4026). Por consiguiente, para los fines de la presente invención, el término "E2" engloba cualquiera de estas especies de E2 que incluyen, sin limitación, especies que tienen delecciones de 1-20 o más de los aminoácidos desde el extremo N de E2, tales como, por ejemplo, delecciones de 1, 2, 3, 4, 5..., 10..., 15, 16, 17, 18, 19... etc., aminoácidos. Tales especies E2 incluyen aquellas que empiezan en el aminoácido 387, aminoácido 402, aminoácido 403, etc.

Regiones E1 y E2 representativas del VHC-1 se muestran en las Figuras 2A-2C y SEC ID N°: 2. Para los fines de la presente invención, las regiones E1 y E2 se definen con respecto al número de aminoácido de la poliproteína codificada por el genoma del VHC-1, designándose la metionina iniciadora la posición 1. Véase, por ejemplo, Choo y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991) 88:2451-2455. Sin embargo, debe observarse que el término un "polipéptido E1" o un "polipéptido E2", como se usan en el presente documento, no se limita a la secuencia del VHC-1. A este respecto, las regiones E1 o E2 correspondientes en otras cepas aisladas del VHC pueden determinarse fácilmente alineando secuencias de las cepas aisladas de un modo que pone las secuencias en alineamiento máximo. Esto puede realizarse con cualquiera de varios paquetes de software informático, tales como ALIGN 1.0, disponible de la Universidad de Virginia, Departamento de Bioquímica (Attn: Dr. William R. Pearson). Véase Pearson y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85:2444-2448.

Además, un "polipéptido E1" o un "polipéptido E2", como se define en el presente documento, no se limita a un polipéptido que tiene la secuencia exacta representada en las figuras. De hecho, el genoma del VHC está en un estado de flujo constante *in vivo* y contiene varios dominios variables que presentan grados relativamente altos de variabilidad entre cepas aisladas. Se conoce varias regiones conservadas y variables entre estas cepas y, en general, las secuencias de aminoácidos de epítopes derivadas de estas regiones tendrán un alto grado de homología de secuencias, por ejemplo, homología de secuencias de aminoácidos superior al 30%, preferentemente superior al 40%, superior al 60%, e incluso más del 80-90% de homología, cuando las dos secuencias están alineadas. Es fácilmente evidente que los términos engloban polipéptidos E1 y E2 de cualquiera de las diversas cepas y cepas aisladas del VHC, que incluyen cepas aisladas que tienen cualquiera de los 6 genotipos del VHC descritos en Simmonds y col., J. Gen. Virol. (1993) 74:2391-2399 (por ejemplo, las cepas 1, 2, 3, 4 etc.), además de cepas aisladas recientemente identificadas, y subtipos de estas cepas aisladas, tales como VHC1a, VHC1b etc.

Así, por ejemplo, el término polipéptido "E1" o "E2" se refiere a secuencias nativas de E1 o E2 de cualquiera de las diversas cepas del VHC, además de análogos, muteínas y fragmentos inmunogénicos, como se define adicionalmente más adelante. Se conocen los genotipos completos de muchas de estas cepas. Véanse, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 6.150.087 y los N° de acceso de GenBank AJ238800 y AJ238799.

Adicionalmente, los términos "polipéptido E1" y "polipéptido E2" engloban proteínas que incluyen modificaciones a la secuencia nativa, tales como delecciones, adiciones y sustituciones internas (generalmente conservativas en la naturaleza), tales como proteínas sustancialmente homólogas a la secuencia original. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como mediante mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser accidentales, tal como mediante acontecimientos mutacionales que existen de forma natural. Todas estas modificaciones están englobadas en la presente invención, mientras que los polipéptidos E1 y E2 modificados sirvan para su fin previsto. Así, por ejemplo, si los polipéptidos E1 y/o E2 van a usarse en composiciones de vacuna, las modificaciones deben estar de forma que no se pierda actividad inmunológica (es decir, la capacidad para provocar una respuesta inmunitaria humoral o celular al polipéptido). Generalmente, entonces, para los fines de la presente invención, los polipéptidos retendrán al menos un epítipo de linfocitos T de forma que pueda generarse una respuesta inmunitaria celular en un sujeto al que se administran los polipéptidos.

Por "E1E2" o el complejo de proteína E1E2 se indica una proteína que contiene al menos un polipéptido E1 y al menos un polipéptido E2, como se ha descrito anteriormente. Un complejo tal también puede incluir toda o una porción de la región p7 que se produce inmediatamente adyacente al extremo C de E2. Como se muestra en las Figuras 1 y 2A-2C, la región p7 se encuentra en las posiciones 747-809, numeradas con respecto a la poliproteína del VHC-1 de longitud completa (posiciones de aminoácidos 575-637 de SEC ID N°: 2). Un complejo de E1E2 representativo que incluye la proteína p7 se llama "E1E2₈₀₉" en el presente documento. Las composiciones que comprenden los complejos de proteína E1E2 útiles para la práctica de la invención pueden incluir adicionalmente uno o más adyuvantes.

El modo de asociación de E1 y E2 en un complejo E1E2 es irrelevante. Los polipéptidos E1 y E2 pueden asociarse mediante interacciones no covalentes tales como mediante fuerzas electrostáticas, o por enlaces covalentes. Por ejemplo, los polipéptidos E1E2 de la presente invención pueden estar en forma de una proteína de fusión que incluye un polipéptido E1 inmunogénico y un polipéptido E2 inmunogénico, como se han definido anteriormente. La fusión puede expresarse de un polinucleótido que codifica una quimera E1E2. Alternativamente, los complejos de E1E2 pueden formarse espontáneamente simplemente mezclando proteínas E1 y E2 que se han producido individualmente. Similarmente, cuando se co-expresan y se secretan en medio, las proteínas E1 y E2 pueden formar un complejo espontáneamente. Así, el término engloba complejos de E1E2 (también llamados agregados) que se forman espontáneamente tras la purificación de E1 y/o E2. Tales agregados pueden incluir uno o más monómeros de E1 en asociación con uno o más monómeros de E2. El número de monómeros de E1 y E2 presentes no necesita ser igual, mientras que estén presentes al menos un monómero de E1 y un monómero de E2. La detección de la presencia de un complejo de E1E2 se determina fácilmente usando técnicas de detección de proteínas estándar tales como electroforesis en gel de poliacrilamida y técnicas inmunológicas tales como inmunoprecipitación.

Los términos “análogo” y “muteína” se refieren a derivados biológicamente activos de la molécula de referencia, tales como E1E2₈₀₉, o fragmentos de tales derivados, que retienen actividad deseada, tal como inmunorreactividad en ensayos descritos en el presente documento. En general, el término “análogo” se refiere a compuestos que tienen una secuencia de polipéptidos nativa y estructura con una o más adiciones, sustituciones (generalmente conservativas en la naturaleza) y/o deleciones de aminoácidos, con respecto a la molécula nativa, mientras que las modificaciones no destruyan la actividad inmunogénica. El término “muteína” se refiere a péptidos que tienen uno o más peptidomiméticos (“peptoides”). Preferentemente, el análogo o muteína tiene al menos la misma inmunorreactividad que la molécula nativa. Procedimientos para la preparación de análogos de polipéptidos y muteínas se conocen en la técnica y se describen adicionalmente más adelante.

Análogos particularmente preferidos incluyen sustituciones que son conservativas en la naturaleza, es decir, aquellas sustituciones que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales. Específicamente, 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 sin carga -- glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina. La fenilalanina, el triptófano y la tirosina se clasifican algunas 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 una sustitución conservativa similar de un aminoácido con un aminoácido estructuralmente relacionado, no tendrá un efecto importante sobre la actividad biológica. Por ejemplo, el polipéptido de interés, tal como un polipéptido E1E2, puede incluir hasta aproximadamente 5-10 sustituciones de aminoácidos conservativas o no conservativas, o incluso hasta aproximadamente 15-25 o 50 sustituciones de aminoácidos conservativas o no conservativas, o cualquier número entero entre 5-50, mientras que la función deseada de la molécula siga intacta. Un experto en la materia puede fácilmente determinar regiones de la molécula de interés que pueden tolerar el cambio por referencia a representaciones de Hopp/Woods y Kyte-Doolittle, muy conocidas en la técnica.

Por “fragmento” está previsto un polipéptido que consiste en solo una parte de la secuencia y estructura de polipéptidos de longitud completa intacta. El fragmento puede incluir una deleción del extremo C, una deleción del extremo N y/o una deleción interna del polipéptido nativo. Un “fragmento inmunogénico” de una proteína del VHC particular generalmente incluirá al menos aproximadamente 5-10 residuos de aminoácidos contiguos de la molécula de longitud completa, preferentemente al menos aproximadamente 15-25 residuos de aminoácidos contiguos de la molécula de longitud completa, y lo más preferentemente al menos aproximadamente 20-50 o más residuos de aminoácidos contiguos de la molécula de longitud completa, que define un epítipo, o cualquier número entero entre 5 aminoácidos y la secuencia de longitud completa, a condición de que el fragmento en cuestión retenga la capacidad para provocar una respuesta inmunológica como se define en el presente documento. Para una descripción de fragmentos inmunogénicos conocidos de E1 y E2 del VHC véase, por ejemplo, Chien y col., publicación internacional N° WO 93/00365.

El término “epítipo”, como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia de al menos aproximadamente 3 a 5, preferentemente aproximadamente 5 a 10 o 15, y no más de aproximadamente 500 aminoácidos (o cualquier número entero entremedias), que define una secuencia que, por sí misma o como parte de una secuencia mayor, provoca una respuesta inmunológica en el sujeto al que se administra. Frecuentemente, un epítipo se unirá a un anticuerpo generado en respuesta a tal secuencia. No hay límite superior crítico a la longitud del fragmento, que puede comprender casi la longitud completa de la secuencia de proteínas, o incluso una proteína de fusión que comprende dos o más epítopos de la poliproteína del VHC. Un epítipo para su uso en la invención objeto no se limita a un polipéptido que tiene la secuencia exacta de la porción de la proteína original de la que se deriva. De hecho, los genomas virales están en un estado de flujo constante y contienen varios dominios variables que presentan grados de variabilidad relativamente altos entre cepas aisladas. Así, el término “epítipo” engloba secuencias idénticas a la secuencia nativa, además de modificaciones a la secuencia nativa, tales como deleciones, adiciones y sustituciones (generalmente conservativas en la naturaleza).

Las regiones de un polipéptido dado que incluyen un epítipo pueden identificarse usando cualquier número de técnicas de mapeo de epítopos, muy conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols in

Methods in Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, New Jersey. Por ejemplo, pueden determinarse epítopes lineales, por ejemplo, sintetizando simultáneamente grandes números de péptidos sobre soportes sólidos, correspondiéndose los péptidos con porciones de la molécula de proteína, y haciendo reaccionar los péptidos con anticuerpos mientras que los péptidos están todavía unidos a los soportes.

5 Tales técnicas se conocen en la técnica y se describen en, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 4.708.871; Geysen y col. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998-4002; Geysen y col. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:178-182; Geysen y col. (1986) Molec. Immunol. 23:709-715. Usando tales técnicas se han identificado varios epítopes del VHC. Véase, por ejemplo, Chien y col., Viral Hepatitis and Liver Disease (1994) pp. 320-324, y adicionalmente más adelante. Similarmente, se identifican fácilmente epítopes conformacionales determinando la conformación espacial
10 de aminoácidos tal como, por ejemplo, por cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols, arriba. También pueden identificarse regiones antigénicas de proteínas usando antigenicidad estándar y representaciones de hidropatía, tales como aquellas calculadas usando, por ejemplo, el programa de software Omega versión 1.0 disponible de Oxford Molecular Group. Este programa informático emplea el procedimiento de Hopp/Woods, Hopp y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1981) 78:3824-3828
15 para determinar perfiles de antigenicidad y la técnica de Kyte-Doolittle, Kyte y col., J. Mol. Biol. (1982) 157:105-132 para las representaciones de hidropatía.

Como se usa en el presente documento, el término "epítopo conformacional" se refiere a una porción de una proteína de longitud completa, o un análogo o muteína de la misma, que tiene características estructurales nativas a la secuencia de aminoácidos que codifica el epítopo dentro de la proteína natural de longitud completa.
20 Características estructurales nativas incluyen, pero no se limitan a, glicosilación y estructura tridimensional. La longitud del epítopo que define la secuencia puede estar sujeta a amplias variaciones, ya que se cree que estos epítopes se forman por la forma tridimensional del antígeno (por ejemplo, plegamiento). Así, los aminoácidos que definen el epítopo pueden ser relativamente pocos en número, pero ampliamente dispersos a lo largo de la longitud de la molécula (o incluso sobre diferentes moléculas en el caso de dímeros, etc.), poniéndose en la conformación de
25 epítopo correcta mediante plegamiento. Las porciones del antígeno entre los residuos que definen el epítopo pueden no ser críticas para la estructura conformacional del epítopo. Por ejemplo, la delección o sustitución de estas secuencias intercaladas puede no afectar el epítopo conformacional dado que se mantienen las secuencias críticas para la conformación del epítopo (por ejemplo, cisteínas que participan en el disulfuro, sitios de glicosilación, etc.).

Los epítopes conformacionales se identifican fácilmente usando los procedimientos tratados anteriormente. Además, la presencia o ausencia de un epítopo conformacional en un polipéptido dado puede determinarse fácilmente mediante cribado del antígeno de interés con un anticuerpo (suero policlonal o monoclonal para el epítopo conformacional) y comparando su reactividad con la de una versión desnaturalizada del antígeno que retiene solo epítopes lineales (si los hay). En tal cribado usando anticuerpos policlonales, puede ser ventajoso absorber el suero policlonal primero con el antígeno desnaturalizado y ver si retiene anticuerpos para el antígeno de interés. Los
35 epítopes conformacionales derivados de las regiones E1 y E2 se describen en, por ejemplo, la publicación internacional N° WO 94/01778.

Como se usa en el presente documento, el término "epítopo de linfocitos T" se refiere a una característica de una estructura de péptido que es capaz de inducir la inmunidad de linfocitos T hacia la estructura de péptido o un hapteno asociado. Los epítopes de linfocitos T generalmente comprenden determinantes de péptidos lineales que adoptan conformaciones extendidas dentro de la hendidura de unión al péptido de moléculas del MHC (Unanue y col., Science (1987) 236:551-557). La conversión de polipéptidos en determinantes de péptido lineales asociados al MHC de clase II (generalmente entre los 5-14 aminoácidos de longitud) se llama "procesamiento de antígenos", que se lleva a cabo por células presentadoras de antígeno (APC). Más particularmente, un epítopo de linfocitos T se define por características locales de una estructura de péptido corto, tal como propiedades primarias de la secuencia
45 de aminoácidos que implican la carga e hidrofobia, y ciertos tipos de estructura secundaria, tales como helicidad, que no dependen del plegamiento del polipéptido entero. Además, se cree que los péptidos cortos capaces de reconocimiento por linfocitos T cooperadores son estructuras generalmente anfipáticas que comprenden un lado hidrófobo (para la interacción con la molécula del MHC) y un lado hidrófilo (para la interacción con el receptor de linfocitos T) (Margalit y col., Computer Prediction of T-cell Epitopes, New Generation Vaccines Marcel-Dekker, Inc, ed. G.C. Woodrow y col., (1990) pp. 109-116) y adicionalmente que las estructuras anfipáticas tienen una conformación de hélice α (véase, por ejemplo, Spouge y col., J. Immunol. (1987) 138:204-212; Berkower y col., J. Immunol. (1986) 136:2498-2503).
50

Por tanto, pueden predecirse fácilmente segmentos de proteínas que incluyen epítopes de linfocitos T usando numerosos programas informáticos (véase, por ejemplo, Margalit y col., Computer Prediction of T-cell Epitopes, New Generation Vaccines Marcel-Dekker, Inc, ed. G.C. Woodrow y col., (1990) pp. 109-116). Tales programas generalmente comparan la secuencia de aminoácidos de un péptido con secuencias que se sabe que inducen una respuesta de linfocitos T y buscan patrones de aminoácidos que se cree que son requeridos para un epítopo de linfocitos T.
55

Una "respuesta inmunológica" a un antígeno del VHC o composición es el desarrollo en un sujeto de una respuesta inmunitaria humoral y/o celular a 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
60

blancos. Un aspecto importante de la inmunidad celular implica una respuesta específica de antígeno por linfocitos T citolíticos ("CTL"). Los CTL tienen especificidad por antígenos de péptido que se presentan en asociación con proteínas codificadas por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y se expresan sobre las superficies de células. Los CTL ayudan a inducir y promover la destrucción intracelular de microbios intracelulares, o la lisis de células infectadas con tales microbios. Otro aspecto de inmunidad celular implica una respuesta específica de antígeno por linfocitos T cooperadores. Los linfocitos T cooperadores actúan ayudando a estimular la función, y centrando la actividad de, células efectoras no específicas contra células que muestran antígenos de péptido en asociación con moléculas del MHC sobre su superficie. Una "respuesta inmunitaria celular" también se refiere a la producción de citocinas, quimiocinas y otras moléculas tales producidas por linfocitos T activados y/u otros glóbulos blancos, que incluyen aquellos derivados de linfocitos T CD4+ y CD8+. Una composición o vacuna que provoca una respuesta inmunitaria celular puede servir para sensibilizar a un sujeto vertebrado por la presentación de antígeno en asociación con moléculas del MHC en la superficie celular. La respuesta inmunitaria mediada por célula se dirige a, o cerca, de células que presentan antígeno en su superficie. Además, pueden generarse linfocitos T específicos de antígeno para permitir la futura protección de un huésped inmunizado. La capacidad de un antígeno particular para estimular una respuesta inmunológica mediada por célula puede determinarse por varios ensayos, tales como por ensayos de linfoproliferación (activación de linfocitos); ensayos citotóxicos de células CTL, o ensayando para linfocitos T específicos para el antígeno en un sujeto sensibilizado. Tales ensayos son muy conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, Erickson y col., J. Immunol. (1993) 151:4189-4199; Doe y col., Eur. J. Immunol. (1994) 24:2369-2376.

Así, una respuesta inmunológica, como se usa en el presente documento, puede ser una que estimula la producción de CTL, y/o la producción o activación de linfocitos T cooperadores. El antígeno de interés también puede provocar una respuesta inmunitaria mediada por anticuerpo, que incluye, por ejemplo, la neutralización de anticuerpos de unión (NOB). La presencia de una respuesta de anticuerpos NOB se determina fácilmente por las técnicas descritas en, por ejemplo, Rosa y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1996) 93:1759. Por tanto, una respuesta inmunológica puede incluir uno o más de los siguientes efectos: la producción de anticuerpos por linfocitos B; y/o la activación de linfocitos T supresores y/o linfocitos T $\gamma\delta$ dirigidos específicamente a un antígeno o antígenos presentes en la composición o vacuna de interés. Estas respuestas pueden servir para neutralizar la infectividad y/o mediar en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo-complemento, o dependiente de anticuerpo (ADCC) para proporcionar protección o alivio de síntomas a un huésped inmunizado. Tales respuestas pueden determinarse usando inmunoensayos y ensayos de neutralización estándar, muy conocidos en la técnica.

Por "aislado" se indica, cuando se refiere a un polipéptido, que la molécula indicada está separada y es discreta 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 que carece, por completo o en parte, de secuencias normalmente asociadas a él en la naturaleza; o una secuencia, como existe en la naturaleza, pero que tiene secuencias heterólogas en asociación con ellas; o una molécula disociada del cromosoma.

Por "determinante antigénico equivalente" se indica un determinante antigénico de diferentes sub-especies o cepas del VHC, tal como de las cepas 1, 2, 3, etc., del VHC cuyos determinantes antigénicos no son necesariamente idénticos debido a la variación de secuencias, pero que se producen en posiciones equivalentes en la secuencia del VHC en cuestión. En general, las secuencias de aminoácidos de determinantes antigénicos equivalentes tendrán un alto grado de homología de secuencias, por ejemplo, homología de secuencias de aminoácidos superior al 30%, normalmente superior al 40%, tal como superior al 60%, e incluso más del 80-90% de homología, cuando las dos secuencias están alineadas.

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

En general, "identidad" se refiere a una correspondencia nucleótido a nucleótido o aminoácido a aminoácido exacta de dos polinucleótidos o secuencias de polipéptidos, respectivamente. La identidad en porcentaje puede determinarse por una comparación directa de la información de secuencias entre dos moléculas alineando las secuencias, contando el número exacto de coincidencias entre las secuencias alineadas, dividiendo entre la longitud de la secuencia más corta y multiplicando el resultado por 100. Pueden usarse programas informáticos fácilmente disponibles para ayudar en el análisis, tales como ALIGN, Dayhoff, M.O. en Atlas of Protein Sequence and Structure M.O. Dayhoff ed., 5 Suppl. 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. Programas para determinar la identidad de secuencias de nucleótidos están disponibles en the Wisconsin Sequence Analysis Package, versión 8 (disponible de 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 the Wisconsin

Sequence Analysis Package citado anteriormente. Por ejemplo, la identidad en porcentaje de una secuencia de nucleótidos particular con una secuencia de referencia puede determinarse usando 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.

- 5 Otro procedimiento de establecimiento de la identidad en porcentaje en el contexto de la presente invención es usar el paquete MPSRCH de programas protegidos por derechos de autor por la Universidad de Edimburgo, desarrollados por John F. Collins y Shane S. Sturrok, y distribuidos por IntelliGenetics, Inc. (Mountain View, CA). A partir de este paquete de aplicaciones, el algoritmo de Smith-Waterman puede emplearse cuando los parámetros por defecto se usen 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 "Coincidencia" refleja la "identidad de secuencias". Otros programas adecuados para calcular la identidad en porcentaje o similitud entre secuencias se conocen generalmente en la técnica, por ejemplo, otro programa de alineamiento es BLAST, usado con parámetros por defecto. Por ejemplo, BLASTN y BLASTP pueden usarse usando los siguientes parámetros por defecto: código genético = estándar; filtro = ninguno; cadena = ambas; corte = 60; esperado = 10; matriz = BLOSUM62; descripciones = 50 secuencias; clasificar por = MAYOR PUNTUACIÓN; bases de datos = no redundantes, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + GenBank CDS translations + Swiss protein + Spupdate + PIR. Detalles de estos programas son muy conocidos en la técnica.

- 20 Alternativamente, la homología puede determinarse por hibridación de polinucleótidos en condiciones que forman dúplex estables entre regiones homólogas, seguido de digestión con nucleasa(s) específica(s) monocatenaria(s), y determinación del tamaño de los fragmentos digeridos. Las secuencias de ADN que son sustancialmente homólogas pueden identificarse en un experimento de hibridación Southern bajo, por ejemplo, condiciones rigurosas, como se define para ese sistema particular. La definición de condiciones de hibridación apropiadas está dentro de la experiencia en la materia. Véase, por ejemplo, Sambrook y col., arriba; *DNA Cloning*, arriba; *Nucleic Acid Hybridization*, arriba.

- 25 Por el término "variante degenerada" está previsto un polinucleótido que contiene cambios en la secuencia de ácidos nucleicos del mismo, que codifica un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que el polipéptido codificado por el polinucleótido del que se deriva la variante degenerada. Así, una variante degenerada de ADN de E1E2₈₀₉ es una molécula con una o más diferencias de bases en la secuencia de ADN de la que se deriva la molécula, pero que codifica la secuencia de aminoácidos de E1E2₈₀₉.

- 30 Una "secuencia codificante" o una secuencia que "codifica" un polipéptido seleccionado es una molécula de ácido nucleico que se transcribe (en el caso de ADN) y se traduce (en el caso de ARNm) en un polipéptido *in vitro* o *in vivo* cuando se pone bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. Los límites de la secuencia codificante se determinan por un codón de iniciación en el extremo 5' (amino) y un codón de terminación de la traducción en el extremo 3' (carboxi). Una secuencia de terminación de la transcripción puede localizarse 3' con respecto a la secuencia codificante. Para E1/E2, no se producen codones de terminación de la iniciación naturalmente en la poliproteína. Pueden prepararse construcciones de expresión de proteína sintética que comprenden proteínas de fusión E1/E2 que comprende además un codón de iniciación y opcionalmente una secuencia secretora o conductora usando diversas técnicas conocidas para el experto y un ejemplo de la cual se proporciona en el presente documento.

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

- 45 Un "polinucleótido del VHC" es un polinucleótido que codifica un polipéptido del VHC, como se ha definido anteriormente.

- "Operativamente enlazados" se refiere a una disposición de elementos en la que los componentes así descritos están configurados de manera que realizan su función deseada. Así, un promotor dado operativamente enlazado a una secuencia codificante es capaz de efectuar la expresión de la secuencia codificante cuando están presentes los factores de transcripción adecuados, etc. Un promotor no necesita estar contiguo a la secuencia codificante, mientras que funcione dirigiendo la expresión de la misma. Así, por ejemplo, pueden estar presentes secuencias intermedias sin traducir ya transcritas entre la secuencia promotora y la secuencia codificante, como pueden ser intrones transcritos, y la secuencia promotora puede todavía considerarse "operativamente enlazada" a la secuencia codificante.

- 55 "Recombinante", como se usa en el presente documento para describir una molécula de ácido nucleico, significa un polinucleótido de origen genómico, de ADNc, viral, semisintético o sintético que, en virtud de su origen o manipulación, no está asociado a todo o una parte del polinucleótido con el que está asociado en la naturaleza. El término "recombinante", como se usa con respecto a una proteína o polipéptido, significa un polipéptido producido por la expresión de un polinucleótido recombinante. En general, el gen de interés se clona y luego se expresa en organismos transformados, como se describe adicionalmente más adelante. El organismo huésped expresa el gen

extraño para producir la proteína bajo condiciones de expresión.

Un “elemento de control” se refiere a una secuencia de polinucleótidos que ayuda en la expresión de una secuencia codificante con la que está enlazada. El término incluye promotores, secuencias de terminación de la transcripción, dominios reguladores en la dirección 5', señales de poliadenilación, regiones sin traducir, que incluyen 5'-UTR y 3'-UTR y, cuando convenga, secuencias conductoras y potenciadores, que conjuntamente proporcionan la transcripción y traducción de una secuencia codificante en una célula huésped.

Un “promotor”, como se usa en el presente documento, es una región reguladora de ADN capaz de unir ARN polimerasa en una célula huésped e iniciar la transcripción de una secuencia codificante aguas abajo (dirección 3') operativamente enlazada a la misma. Para los fines de la presente invención, una secuencia promotora incluye el mínimo número de bases o elementos necesarios para iniciar la transcripción de un gen de interés a niveles detectables por encima del fondo. Dentro de la secuencia promotora es un sitio de iniciación de la transcripción, además de dominios de unión de proteína (secuencias consenso) responsables de la unión de ARN polimerasa. Los promotores eucariotas frecuentemente contendrán, pero no siempre, cajas “TATA” y cajas “CAT”.

Una secuencia de control “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 en ARNm, que entonces se traduce en el polipéptido codificado por la secuencia codificante.

“Casete de expresión” o “construcción de expresión” se refiere a un ensamblaje que es capaz de dirigir la expresión de la(s) secuencia(s) o gen(es) de interés. El casete de expresión incluye elementos de control, como se ha descrito anteriormente, tal como un promotor que está operativamente enlazado a (de manera que dirija la transcripción de) la(s) secuencia(s) o gen(es) de interés, y frecuentemente también incluye una secuencia de poliadenilación. Dentro de ciertas realizaciones de la invención, el casete de expresión descrito en el presente documento puede estar contenido dentro de una construcción de plásmido. Además de los componentes del casete de expresión, la construcción de plásmido también puede incluir uno o más marcadores de selección, una señal que permite que la construcción de plásmido exista como ADN monocatenario (por ejemplo, un origen de replicación de M13), al menos un sitio de clonación múltiple y un origen de replicación “de mamífero” (por ejemplo, un SV40 u origen de replicación de adenovirus).

“Transformación”, como se usa en el presente documento, se refiere a la inserción de un polinucleótido exógeno en una célula huésped, independientemente del procedimiento usado para la inserción: por ejemplo, transformación por captación directa, transfección, infección y similares. Para procedimientos de transformación particulares véase adicionalmente más adelante. El polinucleótido exógeno puede mantenerse como un vector no integrado, por ejemplo, un episoma, o alternativamente, puede integrarse en el genoma del huésped.

Por “inmunización de ácido nucleico” se indica la introducción de una molécula de ácido nucleico que codifica uno o más inmunógenos seleccionados, tales como un complejo de E1E2, en una célula huésped, para la expresión *in vivo* del inmunógeno. La molécula de ácido nucleico puede introducirse directamente en un sujeto receptor, tal como mediante inyección, inhalación, administración oral, intranasal y a la mucosa, o similares, o puede introducirse *ex vivo*, en células que se han extraído del huésped. En el último caso, las células transformadas se reintroducen en el sujeto, en el que puede organizarse una respuesta inmunitaria contra el inmunógeno codificado por la molécula de ácido nucleico.

El término “alfavirus” tiene su significado convencional en la materia, e incluye virus de la encefalitis equina del este (EEE), virus de la encefalitis equina venezolana (VEE), virus de Everglades, virus de Mucambo, virus de Pixuna, incluye virus de la encefalitis del oeste (WEE), virus de Sindbis (SIN), arbovirus sudafricano N° 86 (S.A.AR86), virus de Girdwood S.A., virus de Ockelbo, virus del bosque de Semliki, virus de Middelburg, virus de Chikungunya, virus de O'Nyong-Nyong, virus del río Ross, virus del bosque de Barmah, virus de Getah, virus de Sagiyama, virus de Bebaru, virus de Mayaro, virus de Una, virus de Aura, virus de Whataroa, virus de Babanki, virus de Kyzlagach, virus de Highlands J, virus del fuerte Morgan, virus de Ndumu, virus de Buggy Creek, y cualquier otro virus clasificado por el Comité Internacional sobre la Taxonomía de Virus (ICTV) como alfavirus. Alfavirus preferidos para su uso en la presente invención son cepas de SIN, cepas de VEE, virus de Ockelbo, y virus quiméricos de los mismos.

Un “vector viral” se refiere a una construcción de ácidos nucleicos que lleva, y dentro de ciertas realizaciones, es capaz de dirigir la expresión de una molécula de ácido nucleico de interés, tal como un polinucleótido que codifica un complejo E1E2. Los vectores virales pueden utilizarse en varios formatos, que incluyen ADN, ARN y partículas de replicón recombinantes. Así, como se usa en el presente documento, el término vector viral incluye un ácido nucleico provisto en una partícula viral, tal como, por ejemplo, una partícula de alfavirus quimérica defectuosa.

Un “vector de alfavirus” se refiere a una construcción de ácidos nucleicos que lleva, y dentro de ciertas realizaciones, es capaz de dirigir la expresión de una molécula de ácido nucleico de interés, tal como un polinucleótido que codifica un complejo de E1E2. Los vectores de alfavirus pueden utilizarse en varios formatos, que incluyen ADN, ARN y partículas de replicón recombinantes. Tales vectores de replicón se han derivado de alfavirus que incluyen, por ejemplo, virus de Sindbis, virus del bosque de Semliki y/o virus de la encefalitis equina venezolana. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N° 5.789.245; 5.814.482; y 6.376.235 y el documento WO 02/099035.

Los términos “vector de replicón de ARN de alfavirus”, “vector de replicón de ARN”, “vector de replicón” o “replicón” se refieren a una molécula de ARN que es capaz de dirigir su propia amplificación o auto-replicación *in vivo*, dentro de una célula diana. Para dirigir su propia amplificación, la molécula de ARN debe codificar la(s) polimerasa(s) necesaria(s) para catalizar la amplificación de ARN (por ejemplo, proteínas no estructurales de alfavirus nsP1, nsP2, nsP3, nsP4) y también contener secuencias de ARN en *cis* requeridas para la replicación que son reconocidas y utilizadas por la(s) polimerasa(s) codificada(s). Un replicón de vector ARN de alfavirus normalmente contiene los siguientes elementos ordenados: secuencias virales o celulares en 5' requeridas para la amplificación mediada por proteínas no estructurales (también puede denominarse 5' CSE, o secuencia de replicación en *cis* en 5', o secuencias viral en 5' requeridas en *cis* para la replicación, o secuencia en 5' que es capaz de iniciar la transcripción de un alfavirus), secuencias que, cuando se expresan, codifican proteínas no estructurales de alfavirus biológicamente activas (por ejemplo, nsP1, nsP2, nsP3, nsP4), y secuencias virales o celulares en 3' requeridas para la amplificación mediada por proteínas no estructurales (también pueden denominarse 3' CSE, o secuencias virales en 3' requeridas en *cis* para la replicación, o una secuencia de reconocimiento de ARN polimerasa de alfavirus). El replicón de vector de ARN de alfavirus también debe contener un medio para expresar una o más secuencias heterólogas, tales como, por ejemplo, un IRES o un promotor subgenómico viral (por ejemplo, alfaviral) (por ejemplo, promotor de la región de unión) que puede, en ciertas realizaciones, modificarse con el fin de aumentar o reducir la transcripción viral del fragmento subgenómico, o para reducir la homología con casetes de expresión cooperadores defectuosos o de proteínas estructurales, y una o más secuencias heterólogas que van a expresarse. Cuando se usan como vectores, los replicones también contendrán secuencias adicionales, por ejemplo, una o más secuencias heterólogas que codifican uno o más polipéptidos (por ejemplo, un gen que codifica la proteína o un gen próximo al extremo 3') y/o un tramo de poliadenilato.

Como se usa en el presente documento, los términos “partícula de alfavirus quimérica” y “partícula de replicón de alfavirus quimérica” se refieren a una quimera o partícula quimérica tal como un virus, o partícula tipo virus, específicamente modificada o manipulada para contener un ácido nucleico derivado de un alfavirus distinto del alfavirus del que se derivó cualquiera de la proteína de la cápside y/o de la envuelta (por ejemplo, de un virus diferente). En una partícula tal, el ácido nucleico derivado de un alfavirus es una molécula de ARN que comprende uno de cualquier número de diferentes longitudes, que incluye, pero no se limita a, longitud de genoma (que codifica proteínas no estructurales y estructurales) y longitud de replicón (delecionada de una o más proteínas estructurales). Por ejemplo, y no previsto como limitación, las partículas de replicón quiméricas pueden incluir ARN de replicón del virus de Sindbis (SIN) dentro de una cápside que tiene un dominio de unión de ARN del virus de Sindbis y un dominio de interacción de la glicoproteína de la envuelta del virus de la encefalitis equina venezolana (VEE), rodeado por una envuelta de la glicoproteína del VEE y/o un ARN de replicón de VEE que tiene una delección en nsP3, una señal de encapsidación de SIN insertada en la delección en nsP3 y proteínas de la cápside y de la envuelta derivadas de SIN. Vectores de alfavirus quiméricos se describen, por ejemplo, en las publicaciones de patente de EE.UU. 20030232324 y 20030148262.

En una realización preferida, la invención emplea partículas de alfavirus defectuosas que son quiméricas. Como se usa en el presente documento, el término “partícula de alfavirus defectuosa” se refiere a una partícula de virus que puede generar copias de su ARN tras la infección en una célula, expresando así cualquier gen exógeno codificado en el alfavirus, pero el virus carece de una o más funciones requeridas para la producción de nuevas partículas virales tras la infección. Normalmente, tales partículas de alfavirus defectuosas carecen de uno o más genes estructurales requeridos para la generación de nuevas partículas (véase, por ejemplo, el documento WO/61772).

Los términos “cantidad eficaz” o “cantidad farmacéuticamente eficaz” de una composición inmunogénica, como se proporcionan en el presente documento, se refieren a una cantidad no tóxica, pero suficiente, de la composición para proporcionar la respuesta deseada, tal como una respuesta inmunológica, y opcionalmente, un efecto terapéutico correspondiente. La cantidad exacta requerida variará de sujeto a sujeto, dependiendo de la especie, edad y condiciones generales del sujeto, la gravedad de la afección que está tratándose, y la macromolécula particular de interés, modo de administración y similares. Una cantidad “eficaz” apropiada en cualquier caso individual puede determinarse por un experto habitual en la materia usando experimentación rutinaria.

Por “sujeto vertebrado” se indica cualquier miembro del subfilo de los cordados, que incluye, sin limitación, seres humanos y otros primates, que incluyen primates no humanos tales como chimpancés y otros simios superiores y especies de mono; animales de granja tales como ganado vacuno, ovejas, cerdos; cabras y caballos; mamíferos domésticos tales como perros y gatos; animales de laboratorio que incluyen roedores tales como ratones, ratas y cobayas; aves, que incluyen aves domésticas, salvajes y de caza tales como pollos, pavos y otras aves gallináceas, patos, gansos y similares. El término no indica una edad particular. Así, pretenden cubrirse tanto individuos adultos como recién nacidos. La invención descrita en el presente documento está prevista para su uso en cualquiera de las especies de vertebrado anteriores, ya que los sistemas inmunitarios de todos estos vertebrados operan similarmente.

El término “tratamiento”, como se usa en el presente documento, se refiere a tanto (1) la prevención de infección o reinfección (profilaxis), como a (2) la reducción o eliminación de síntomas de la enfermedad de interés (terapia).

2. MODOS DE LLEVAR A CABO LA INVENCION

Antes de describir la presente invención en detalle, debe entenderse que la presente invención no se limita a formulaciones o parámetros de proceso particulares ya que tales pueden, por supuesto, variar.

Es fundamental para la presente invención el descubrimiento de que los procedimientos de inmunización que usan una o más administraciones iniciales de complejos de proteínas E1E2 del VHC, seguido de refuerzo con un vector viral que comprende construcciones de ácidos nucleicos que codifican una E1E2 del VHC, producen respuestas de linfocitos T CD8+ del VHC potenciadas. Así, como se describe en más detalle más adelante, los sujetos se administran inicialmente con complejos de E1E2, tales como complejos expresados usando ADN de E1E2₈₀₉, en una o más inmunizaciones. Las composiciones que incluyen los complejos de E1E2 también pueden contener adyuvantes, tales como las emulsiones de aceite en agua submicrométricas descritas en detalle más adelante. Los sujetos se refuerzan posteriormente con una composición de vector viral que comprende construcciones de ácidos nucleicos que codifican complejos de E1E2, tales como composiciones de vector viral que contienen partículas de replicón de alfavirus que codifican complejos de E1E2. Los complejos de E1E2 codificados por las construcciones de ácidos nucleicos pueden ser tanto el mismo complejo de E1E2 que se usa inicialmente, como pueden codificar otras proteínas E1E2, como se describe adicionalmente más adelante, mientras que se genere una respuesta inmunitaria. Así, por ejemplo, si se usan complejos derivados de ADN de E1E2₈₀₉ para sensibilizar la respuesta inmunitaria, el sujeto puede reforzarse con una composición que incluye ácido nucleico que codifica E1E2₈₀₉, o ácido nucleico que codifica otra proteína E1E2, tal como E1E2₇₄₆. En una realización preferida, un vector viral como se describe en el presente documento es una partícula de alfavirus defectuosa, que puede ser una partícula de alfavirus quimérica.

Adicionalmente, las composiciones anteriores pueden usarse solas, o en combinación con otras composiciones, tales como composiciones que comprenden otras proteínas del VHC, composiciones que comprenden ADN que codifica otras proteínas del VHC, además de composiciones que comprenden sustancias auxiliares, tales como inmunoglobulinas, citocinas, linfocinas y quimiocinas, que incluyen, pero no se limitan a, citocinas tales como IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12, etc. (véase, por ejemplo, la publicación internacional N° WO 99/44636), IL-2 modificada (cys125-ser125), GM-CSF, M-CSF, factor de necrosis tumoral (TNF), interferones e interferones pegilados, tales como γ -interferón, IP-10, MIP1 β , FLP-3, ribavirina, RANTES, ARNip, ARN antisentido, inhibidores de polimerasa, helicasa, GTPasa, ATPasa, proteasa, glicosilación, metaloproteasa y/o IRES. Así, los presentes procedimientos pueden usarse con otras pautas terapéuticas para tratar la infección por el VHC. Si se usan en combinación con otras composiciones, tales composiciones pueden administrarse antes de, simultáneamente con o posteriormente a las composiciones de E1E2.

Con el fin de un entendimiento adicional de la invención, a continuación se proporciona una discusión más detallada referente a las composiciones de proteína E1E2 y ácido nucleico, y composiciones adicionales para su uso en los procedimientos objeto.

POLIPÉPTIDOS E1E2

Como se ha explicado anteriormente, en los procedimientos desvelados en el presente documento, se sensibilizan respuestas inmunitarias en sujetos usando una o más administraciones de composiciones que incluyen complejos de E1E2. Entonces, los sujetos se refuerzan usando construcciones de ácidos nucleicos E1E2. E1, E2 y p7 son conocidos por contener epítopes de linfocitos T humanos (tanto CD4+ y CD8+). Los complejos de E1E2 comprenden polipéptidos E1 y E2 que incluyen uno o más epítopes de linfocitos T, asociados tanto mediante interacciones no covalentes como covalentes. Además, pueden usarse múltiples copias de epítopes de linfocitos T conservados específicos en complejos de E1E2, tales como un material compuesto de epítopes de diferentes genotipos.

El polipéptido E1 del VHC es una glicoproteína y se extiende de aproximadamente el aminoácido 192 al aminoácido 383 (numerado con respecto a la poliproteína de VHC-1). Véase Choo y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991) 88:2451-2455. Aminoácidos en aproximadamente 173 a aproximadamente 191 representan una secuencia señal para E1. Un polipéptido E2 del VHC también es una glicoproteína y se extiende de aproximadamente el aminoácido 383 o 384 al aminoácido 746. Un péptido señal para E2 empieza en aproximadamente el aminoácido 364 de la poliproteína. Así, el término E1 de "longitud completa" o E1 "no truncado", como se usa en el presente documento, se refiere a polipéptidos que incluyen, al menos, los aminoácidos 192-383 de una poliproteína del VHC (numerados con respecto a VHC-1). Con respecto a E2, el término "longitud completa" o "no truncado", como se usa en el presente documento, se refiere a polipéptidos que incluyen, al menos, los aminoácidos 383 o 384 al aminoácido 746 de una poliproteína del VHC (numerados con respecto a VHC-1). Como será evidente de la presente divulgación, los polipéptidos E1E2 para su uso con la presente invención pueden incluir aminoácidos adicionales de la región p7, tales como aminoácidos 747-809.

E2 existe como múltiples especies (Spaete y col., Virol. (1992) 188:819-830; Selby y col., J. Virol. (1996) 70:5177-5182; Grakoui y col., J. Virol. (1993) 67:1385-1395; Tomei y col., J. Virol. (1993) 67:4017-4026) y puede producirse escisión y proteólisis en los extremos N y C de los polipéptidos E1 y E2. Así, un polipéptido E2 como se encuentra en un complejo de E1E2 puede comprender al menos los aminoácidos 405-661, por ejemplo, 400, 401, 402... a 661, tales como 383 o 384-661, 383 o 384-715, 383 o 384-746, 383 o 384-749 o 383 o 384-809, o 383 o 384 a cualquier extremo C entre 661-809, de una poliproteína del VHC, numerados con respecto a la poliproteína del VHC-1 de

longitud completa. Similarmente, polipéptidos E1 preferibles para su uso en el presente documento pueden comprender los aminoácidos 192-326, 192-330, 192-333, 192-360, 192-363, 192-383 o 192 a cualquier extremo C entre 326-383, de una poliproteína del VHC.

Los complejos de E1E2 también pueden estar constituidos de fragmentos inmunogénicos de E1 y E2 que comprenden epítopes, preferentemente epítopes de linfocitos T. Por ejemplo, los fragmentos de polipéptidos E1 pueden comprender de aproximadamente 5 a casi la longitud completa de la molécula, tal como 6, 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 185 o más aminoácidos de un polipéptido E1, o cualquier número entero entre los números establecidos. Similarmente, los fragmentos de polipéptidos E2 pueden comprender 6, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300 o 350 aminoácidos de un polipéptido E2, o cualquier número entero entre los números establecidos. Los polipéptidos E1 y E2 pueden ser de las mismas cepas del VHC o de cepas diferentes.

Por ejemplo, epítopes derivados de, por ejemplo, la región hipervariable de E2, tales como una región que abarca los aminoácidos 384-410 o 390-410, pueden incluirse en el polipéptido E2. Un epítipo de E2 particularmente eficaz para incorporar en la secuencia de E2 es uno que incluye una secuencia consenso derivada de esta región, tal como la secuencia consenso Gly-Ser-Ala-Ala-Arg-Thr-Thr-Ser-Gly-Phe-Val-Ser-Leu-Phe-Ala-Pro-Gly-Ala-Lys-Gln-Asn (SEC ID N°: 3), que representa una secuencia consenso para los aminoácidos 390-410 del genoma de tipo 1 del VHC. Epítopes de E1 y E2 adicionales son conocidos y se describen en, por ejemplo, Chien y col., publicación internacional N° WO 93/00365.

Además, los polipéptidos E1 y E2 del complejo pueden carecer de toda o una porción del dominio que atraviesa la membrana. La secuencia de anclaje a la membrana funciona asociando el polipéptido al retículo endoplásmico. Normalmente, tales polipéptidos son capaces de secreción en medio de crecimiento en el que se cultiva un organismo que expresa la proteína. Sin embargo, como se describe en la publicación internacional N° WO 98/50556, tales polipéptidos también pueden recuperarse intracelularmente. La secreción en medio de crecimiento se determina fácilmente usando varias técnicas de detección, que incluyen, por ejemplo, electroforesis en gel de poliacrilamida y similares, y técnicas inmunológicas tales como ensayos de inmunoprecipitación como se describen en, por ejemplo, la publicación internacional N° WO 96/04301, publicada el 15 de febrero de 1996. Con E1, generalmente los polipéptidos que terminan con aproximadamente la posición de aminoácido 370 y superior (basado en la numeración de E1 de VHC-1) serán retenidos por el ER y de ahí que no sean secretados en medio de crecimiento. Con E2, los polipéptidos que terminan con aproximadamente la posición de aminoácido 731 y superior (también basado en la numeración de la secuencia de E2 de VHC-1) serán retenidos por el ER y no serán retenidos por el ER (véase, por ejemplo, la publicación internacional N° WO 96/04301, publicada el 15 de febrero de 1996). Debe observarse que estas posiciones de aminoácidos no son absolutas y pueden variar cierto grado. Así, la presente invención contempla el uso de los polipéptidos E1 y E2 que retienen el dominio de unión transmembranario, además, los polipéptidos que carecen de toda o una porción del dominio de unión transmembranario, que incluyen los polipéptidos E1 que terminan en aproximadamente los aminoácidos 369 e inferiores, y los polipéptidos E2, que terminan en aproximadamente los aminoácidos 730 e inferiores, pretenden ser capturados por la presente invención. Además, la truncación del extremo C puede extenderse más allá del dominio que atraviesa la membrana hacia el extremo N. Así, por ejemplo, truncaciones de E1 que se producen en posiciones inferiores a, por ejemplo, 360 y truncaciones de E2 que se producen en posiciones inferiores a, por ejemplo, 715, también están englobadas por la presente invención. Todo esto es necesario porque los polipéptidos E1 y E2 truncados siguen siendo funcionales para su fin previsto. Sin embargo, construcciones de E1 truncadas particularmente preferidas son aquellas que no se extienden más allá de aproximadamente el aminoácido 300. Las preferidas son aquellas que terminan en la posición 360. Construcciones de E2 truncadas preferidas son aquellas con truncaciones del extremo C que no se extienden más allá de aproximadamente la posición de aminoácido 715. Truncaciones de E2 particularmente preferidas son aquellas moléculas truncadas después de cualquiera de los aminoácidos 715-730, tal como 725. Si se usan moléculas truncadas, es preferible usar moléculas E1 y E2 que están ambas truncadas.

Los polipéptidos E1 y E2 y complejos de los mismos también pueden estar presentes como asialoglicoproteínas. Tales asialoglicoproteínas se producen por procedimientos conocidos en la técnica, tales como usando células en las que se bloquea la glicosilación terminal. Cuando estas proteínas se expresan en tales células y se aíslan por cromatografía de afinidad por lectina de GNA, las proteínas E1 y E2 se agregan espontáneamente. Procedimientos detallados para producir estos agregados de E1E2 se describen en, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 6.074.852.

Además, los complejos de E1E2 pueden comprender una mezcla heterogénea de moléculas, debido a la escisión y escisión proteolítica, como se ha descrito anteriormente. Así, una composición que incluye complejos de E1E2 puede incluir múltiples especies de E1E2, tales como E1E2 que termina en el aminoácido 746 (E1E2₇₄₆), E1E2 que termina en el aminoácido 809 (E1E2₈₀₉), o cualquiera de las otras diversas moléculas de E1 y E2 descritas anteriormente, tales como moléculas de E2 con truncaciones del extremo N de 1-20 aminoácidos, tales como especies de E2 que empiezan en el aminoácido 387; aminoácido 402, aminoácido 403, etc.

Debe observarse que, por comodidad, las regiones E1 y E2 se definen generalmente con respecto al número de aminoácido con respecto a la poliproteína codificada por el genoma del VHC-1a, como se describe en Choo y col. (1991) Proc Natl Acad Sci USA 88:2451, designándose la metionina iniciadora la posición 1. Sin embargo, los polipéptidos para su uso con la presente invención no se limitan a aquellos derivados de la secuencia de VHC-1a.

Cualquier cepa o cepa aislada del VHC puede servir de base para proporcionar secuencias inmunogénicas para su uso con la invención. A este respecto, las regiones correspondientes en otra cepa aislada del VHC pueden determinarse fácilmente alineando secuencias de las dos cepas aisladas de un modo que pone las secuencias en alineamiento máximo.

- 5 Se conocen en la técnica diversas cepas y cepas aisladas del VHC, que se diferencian entre sí por cambios en la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos. Por ejemplo, la cepa aislada VHC J1.1 se describe en Kubo y col. (1989) Japan. Nucl. Acids Res. 17:10367-10372; Takeuchi y col. (1990) Gene 91:287-291; Takeuchi y col. (1990) J. Gen. Virol. 71:3027-3033; y Takeuchi y col. (1990) Nucl. Acids Res. 18:4626. Las secuencias codificantes completas de dos cepas aisladas independientes, VHC-J y BK, se describen por Kato y col., (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:9524-9528 y Takamizawa y col., (1991) J. Virol. 65:1105-1113, respectivamente. Las cepas aisladas del VHC-1 se describen por Choo y col. (1990) Brit. Med. Bull. 46:423-441; Choo y col. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2451-2455 y Han y col. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1711-1715. Las cepas aisladas del VHC HC-J1 y HC-J4 se describen en Okamoto y col. (1991) Japan J. Exp. Med. 60:167-177. Las cepas aisladas del VHC HCT 18, HCT 23, Th, HCT 27, EC1 y EC10 se describen en Weiner y col. (1991) Virol. 180:842-848. Las cepas aisladas del VHC Pt-1, VHC-K1 y VHC-K2 se describen en Enomoto y col. (1990) Biochem. Biophys. Res. Commun. 170:1021-1025. Las cepas aisladas del VHC A, C, D y E se describen en Tsukiyama-Kohara y col. (1991) Virus Genes 5:243-254. Los polinucleótidos y polipéptidos E1E2 del VHC para su uso en las composiciones y procedimientos de la invención pueden obtenerse a partir de cualquiera de las cepas anteriormente citadas del VHC o de cepas aisladas recientemente descubiertas aisladas de tejidos o fluidos de pacientes infectados.
- 20 Los complejos de E1E2 se producen fácilmente recombinantemente, tanto como proteínas de fusión como, por ejemplo, co-transfectando células huésped con construcciones que codifican los polipéptidos E1 y E2 de interés. La co-transfección puede llevarse a cabo tanto en *trans* como *cis*, es decir, usando vectores separados o usando un único vector que lleva tanto los genes E1 como E2. Si se hace usando un único vector, ambos genes pueden accionarse por un único conjunto de elementos de control o, alternativamente, los genes pueden estar presentes en el vector en casetes de expresión individuales, conducidos por elementos de control individuales. Tras la expresión, las proteínas E1 y E2 se asociarán espontáneamente. Alternativamente, los complejos pueden formarse mezclando las proteínas individuales juntas que se han producido por separado, tanto en forma purificada como semi-purificada, o incluso mezclando medios de cultivo en los que se han cultivado las células huésped que expresan las proteínas, si las proteínas son secretadas. Finalmente, los complejos de E1E2 para su uso con la presente invención pueden expresarse como una proteína de fusión en la que la porción deseada de E1 está fusionada con la porción de E2 deseada.
- 25
- 30

Procedimientos para producir complejos de E1E2 a partir de proteínas E1 y E2 truncadas de longitud completa que son secretadas en medios, además de proteínas truncadas intracelularmente producidas, se conocen en la técnica. Por ejemplo, tales complejos pueden producirse recombinantemente, como se describe en la patente de EE.UU. N° 6.121.020; Ralston y col., J. Virol. (1993) 67:6753-6761, Grakoui y col., J. Virol. (1993) 67:1385-1395; y Lanford y col., Virology (1993) 197:225-235.

35

Construcciones de ácidos nucleicos que codifican los complejos de E1E2

- Los polinucleótidos que codifican proteínas E1, E2 y E1E2 contienen menos de un genoma del VHC entero y pueden ser ARN o ADN mono- o bicatenario. Preferentemente, los polinucleótidos se aíslan libres de otros componentes, tales como proteínas y lípidos. Los polinucleótidos codifican los polipéptidos E1 y E2 y complejos de los mismos, descritos anteriormente, y así comprenden secuencias codificantes de los mismos. Los polinucleótidos usados en la invención también pueden comprender otras secuencias de nucleótidos no del VHC, tales como secuencias que codifican conectores, secuencias señal, o ligandos útiles en la purificación de proteínas tales como glutatión-S-transferasa y proteína A estafilocócica.
- 40
- 45 Los polinucleótidos que codifican los diversos polipéptidos del VHC pueden aislarse de una biblioteca genómica derivada de secuencias de ácidos nucleicos presentes en, por ejemplo, plasma, suero o hígado homogeneizado de un individuo infectado por el VHC, o pueden sintetizarse en el laboratorio, por ejemplo, usando un sintetizador automático. Puede usarse un procedimiento de amplificación tal como PCR para amplificar polinucleótidos de tanto ADN genómico del VHC o ADNc que codifica el mismo.
- 50 Los polinucleótidos pueden comprender secuencias codificantes para estos polipéptidos que se producen naturalmente o pueden incluir secuencias artificiales que no se producen en la naturaleza. Por ejemplo, puede ser útil proporcionar un codón de iniciación de metionina y secuencia conductora para la proteína E1 E2, ya que esta proteína es parte de una proteína de fusión más grande. Estos polinucleótidos pueden enlazarse para formar una secuencia codificante para los complejos de E1E2 usando técnicas de biología molecular estándar. Si se desea, pueden clonarse polinucleótidos en un vector de expresión y transformarse en, por ejemplo, células bacterianas, de levadura, insecto o de mamífero de manera que las proteínas de fusión de la invención puedan expresarse en y aislarse de un cultivo celular.
- 55

Las construcciones de expresión de la presente invención, que codifican proteínas E1E2, o construcciones de expresión individuales que comprenden secuencias que codifican E1 y E2, pueden usarse para la inmunización de

ácido nucleico, con el fin de reforzar y estimular una respuesta inmunológica, tal como una respuesta inmunitaria celular, usando un vector viral que codifica y expresa las proteínas E1/E2 del VHC. En una realización preferida, el vector viral es una partícula de alfavirus defectuosa que es una partícula de alfavirus quimérica.

- Preparaciones liposómicas para el uso con la presente invención incluyen preparaciones catiónicas (positivamente cargadas), aniónicas (negativamente cargadas) y neutras, con los liposomas catiónicos particularmente preferidos. Los liposomas catiónicos están fácilmente disponibles. Por ejemplo, están disponibles liposomas de N[1-2,3-dioleiloxi]propil]-N,N,N-trietilamonio (DOTMA) bajo la marca comercial Lipofectin, de GIBCO BRL, Grand Island, NY (véase, por tanto, Feigner y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1987) 84:7413-7416). Otros lípidos comercialmente disponibles incluyen transfectace (DDAB/DOPE) y DOTAP/DOPE (Boehringer). Otros liposomas catiónicos pueden prepararse a partir de materiales fácilmente disponibles usando técnicas muy conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Szoka y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1978) 75:4194-4198; publicación PCT Nº WO 90/11092 para una descripción de la síntesis de liposomas de DOTAP (1,2-bis(oleoiloxi)-3-(trimetilamonio)propano). Los diversos complejos de liposoma-ácido nucleico se preparan usando procedimientos conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, Straubinger y col., en METHODS OF IMMUNOLOGY (1983), Vol. 101, pp. 512-527; Szoka y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1978) 75:4194-4198; Papahadjopoulos y col., Biochim. Biophys. Acta (1975) 394:483; Wilson y col., Cell (1979) 17:77; Deamer y Bangham, Biochim. Biophys. Acta (1976) 443:629; Ostro y col., Biochem. Biophys. Res. Commun. (1977) 76:836; Fraley y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1979) 76:3348; Enoch y Strittmatter, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1979) 76:145; Fraley y col., J. Biol. Chem. (1980) 255:10431; Szoka y Papahadjopoulos, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1978) 75:145; y Schaefer-Ridder y col., Science (1982) 215:166.
- Se han desarrollado varios sistemas basados en virus para la transferencia génica en células de mamífero. Por ejemplo, los retrovirus proporcionan una plataforma conveniente para los sistemas de administración génica, tales como virus del sarcoma murino, virus del tumor mamario de ratón, virus de la leucemia murina de Moloney y virus del sarcoma de Rous. Un gen seleccionado puede insertarse en un vector y encapsidarse en partículas retrovirales usando técnicas conocidas en la técnica. El virus recombinante pueden entonces aislarse y administrarse a células del sujeto tanto *in vivo* como *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 y col., Virology (1991) 180:849-852; Bums y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) 90:8033-8037; y Boris-Lawrie y Temin, Cur. Opin. Genet. Develop. (1993) 3:102-109. Brevemente, los vehículos de administración de genes retrovirales de la presente invención puede construirse fácilmente a partir de una amplia variedad de retrovirus, que incluyen, por ejemplo, retrovirus de tipo B, C y D, además de espumavirus y lentivirus tales como FIV, VIH, VIH-1, VIH-2 y SIV (véase RNA Tumor Viruses, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory, 1985). Tales retrovirus pueden obtenerse fácilmente a partir de depósitos o colecciones tales como la Colección Americana de Cultivos Tipo ("ATCC"; 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209), o aislarse de fuentes conocidas usando técnicas comúnmente disponibles.
- También se han descrito varios vectores de adenovirus, tales como vectores de adenovirus tipo 2 y tipo 5. A diferencia de los retrovirus que se integran en el genoma del huésped, los adenovirus persisten extracromosómicamente, minimizando así los riesgos asociados a la mutagénesis insercional (Haj-Ahmad y Graham, J. Virol. (1986) 57:267-274; Bett y col., J. Virol. (1993) 67:5911-5921; Mittereder y col., Human Gene Therapy (1994) 5:717-729; Seth y col., J. Virol. (1994) 68:933-940; Barr y col., Gene Therapy (1994) 1:51-58; Berkner, K.L. BioTechniques (1988) 6:616-629; y Rich y col., Human Gene Therapy (1993) 4:461-476).
- También pueden usarse vectores de conjugado molecular, tales como los vectores de adenovirus quimérico descritos en Michael y col., J. Biol. Chem. (1993) 268:6866-6869 y Wagner y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89:6099-6103, para la administración génica.
- Miembros del género alfavirus, tales como, pero no se limitan a vectores derivados del virus de la encefalitis equina venezolana (VEE), virus de Sindbis (SIN) y virus del bosque de Semliki, también encontrarán uso como vectores virales para administrar el gen de interés. Se han desarrollado varios miembros del género alfavirus como vectores de expresión de "replicón" para su uso como vacunas y terapéuticos. Los vectores de replicón pueden utilizarse en varios formatos, que incluyen ADN y ARN, para hacer partículas tipo virus recombinante que contienen los vectores de replicón (partículas de replicón). Tales vectores de replicón pueden derivarse de cualquiera de los alfavirus anteriormente descritos, tales como SIN (Xiong y col. (1989) Science 243:1188-1191; Dubensky y col., (1996) J. Virol. 70:508-519; Hariharan y col. (1998) J. Virol. 72:950-958; Polo y col. (1999) PNAS 96:4598-4603), virus del bosque de Semliki (Liljestrom (1991) Bio/Technology 9:1356-1361; Berglund y col. (1998) Nat. Biotech. 16:562-565) y VEE (Pushko y col. (1997) Virology 239:389-401). Véanse, por tanto, las patentes de EE.UU. Nº 5.789.245; 5.814.482; y 6.376.235 y el documento WO 02/099035.
- La estrategia general para la construcción de vectores de expresión basados en alfavirus implica sustituir los genes de la proteína estructural viral con el gen heterólogo de interés, manteniendo el control transcripcional mediante el promotor de ARN subgenómico altamente activo. Vectores de esta configuración se llaman "replicones" de ARN y pueden transcribirse *in vitro* a partir de ADNc usando un promotor de bacteriófago, o, generarse *in vivo* directamente a partir de ADN cuando se asocian a un promotor eucariota. El ARN de replicón de alfavirus se encapsida generalmente en partículas de vector recombinante por co-transfección transitoria con ARN cooperador defectuoso transcrito *in vitro*, o, usando líneas celulares de encapsidación estables que tienen casetes de expresión de

proteínas estructurales. El (Los) casete(s) de expresión de proteínas estructurales, también llamados construcciones “cooperadoras defectuosas” cuando son incapaces de replicación por sí mismas, usadas para la encapsidación del vector, codifican tanto la poliproteína estructural de alfavirus “nativa” intacta que se procesa post-traduccionalmente en C, E2 y E1 maduro; como proteínas estructurales de alfavirus que se han fraccionado en casetes separados que codifican tanto C como E2/E1. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. Nº 6.465.634; 6.426.196; 6.376.236; 6.342.372; 6.329.201; 6.015.686; 5.843.723; y las publicaciones internacionales Nº WO 95/07995 y WO 96/17072; Polo y col. (1999) Proc. Nat'l Acad. Sci USA 96:4598-4603; Dubensky y col. (1996) J. Virology 70(1):508-519; Frolov y col. (1996). Proc Natl Acad Sci USA. 93(21):11371-11377).

Particularmente preferido para su uso en administrar el refuerzo de E1E2 es un vector de alfavirus quimérico, tal como quimeras de partículas de replicón de SIN y VEE. Vectores de alfavirus quiméricos se describen, por ejemplo, en las publicaciones de patente de EE.UU. 20030232324 y 20030148262 y Perri y col., J. Virol. (2003) 77:10394-10403. Por ejemplo, las partículas con ARN de replicón de VEE-E1E2 encapsidadas dentro de proteínas de la envuelta de SIN o ARN de replicón de SIN-E1E2 dentro de proteínas de la envuelta de VEE encontrarán uso con los presentes procedimientos. Como se muestra en los ejemplos más adelante, las partículas de replicón de VEE/SIN indujeron respuestas de linfocitos T CD8+ específicas del VHC en modelos murinos cuando se administran después de la sensibilización con vacunas de proteína E1E2.

Pueden usarse otros vectores, que incluyen, pero no se limitan a, virus 40 simio y citomegalovirus. Pueden usarse vectores bacterianos, tales como *Salmonella* ssp., *Yersinia enterocolitica*, *Shigella* spp., *Vibrio cholerae*, *Mycobacterium* cepa BCG y *Listeria monocytogenes*. También pueden usarse 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).

Las construcciones de expresión también pueden encapsularse, adsorberse a o asociarse a, vehículos en partículas. Tales vehículos presentan múltiples copias de una molécula seleccionada para el sistema inmunitario y promueven el atrapamiento y la retención de moléculas en ganglios linfáticos locales. Las partículas pueden ser fagocitadas por macrófagos y pueden potenciar la presentación de antígeno mediante la liberación de citocinas. Ejemplos de vehículos en partículas incluyen aquellos derivados de polímeros de poli(metacrilato de metilo), además de micropartículas derivadas de poli(lactidas) y poli(lactida-co-glicolidas), conocidas como PLG. Véanse, por ejemplo, Jeffery y col., Pharm. Res. (1993) 10:362-368; y McGee y col., J. Microencap. (1996).

Un procedimiento preferido para adsorber macromoléculas sobre micropartículas preparadas se describe en la publicación internacional Nº WO 00/050006. Brevemente, las micropartículas se rehidratan y se dispersan en una suspensión de micropartículas esencialmente monoméricas usando detergentes aniónicos o catiónicos dializables. Detergentes útiles incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de las diversas N-metilglucamidas (conocidas como MEGA), tales como heptanoil-N-metilglucamida (MEGA-7), octanoil-N-metilglucamida (MEGA-8), nonanoil-N-metilglucamida (MEGA-9) y decanoil-N-metil-glucamida (MEGA-10); ácido cólico; colato de sodio; ácido desoxicólico; desoxicolato de sodio; ácido taurocólico; taurocolato de sodio; ácido taurodesoxicólico; taurodesoxicolato de sodio; 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propano-sulfonato (CHAPS); 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-2-hidroxi-1-propano-sulfonato (CHAPSO); -dodecil-N,N-dimetil-3-ammonio-1-propano-sulfonato (ZWITTERGENT 3-12); N,N-bis-(3-D-gluconamidopropil)-desoxicolamida (desoxi-BIGCHAP); -octilglucósido; monolaurato de sacarosa; ácido glicocólico / glicocolato de sodio; laurosarcosina (sal de sodio); ácido glicodesoxicólico / glicodesoxicolato de sodio; dodecilsulfato de sodio (SDS); ácido 3-(trimetilsilil)-1-propanosulfónico (DSS); cetrimida (CTAB, cuyo principal componente es bromuro de hexadeciltrimetilamonio); bromuro de hexadeciltrimetilamonio; bromuro de dodeciltrimetilamonio; bromuro de hexadeciltrimetilamonio; bromuro de tetradeciltrimetilamonio; bromuro de bencildimetildodecilamonio; cloruro de bencildimetil-hexadecilamonio; y bromuro de bencildimetiltetradecilamonio. Los detergentes anteriores están comercialmente disponibles de, por ejemplo, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO. También pueden usarse diversos lípidos catiónicos conocidos en la técnica como detergentes. Véase Balasubramaniam y col., 1996, Gene Ther., 3:163-72 y Gao, X., y L. Huang. 1995, Gene Ther., 2:7110-722.

Puede usarse una amplia variedad de otros procedimientos para administrar las construcciones de expresión a células. Tales procedimientos incluyen transfección mediada por DEAE-dextrano, precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por polilisina o poliornitina, o precipitación usando otras sales inorgánicas insolubles, tales como fosfato de estroncio, silicatos de aluminio que incluyen bentonita y caolín, óxido crómico, silicato de magnesio, talco y similares. Otros procedimientos útiles de transfección incluyen electroporación, sonoporación, fusión de protoplastos, liposomas, administración de peptoides o microinyección. Véanse, por ejemplo, Sambrook y col., arriba, para una discusión de técnicas para transformar células de interés; y Felgner, P.L., Advanced Drug Delivery Reviews (1990) 5:163-187, para una revisión de sistemas de administración útiles para la transferencia génica. Procedimientos de administración de ADN usando electroporación se describen en, por ejemplo, las patentes de EE.UU. Nº 6.132.419; 6.451.002, 6.418.341, 6.233.483, la publicación de patente de EE.UU. Nº 2002/0146831; y la publicación internacional Nº WO/0045823.

Además, los polinucleótidos del VHC pueden adsorberse en, o atraparse dentro de, un ISCOM. ISCOM clásicos se forman por combinación de colesterol, saponina, fosfolípido e inmunógenos, tales como proteínas de la envuelta viral. Generalmente, las moléculas del VHC (normalmente con una región hidrófoba) se solubilizan en detergente y se añaden a la mezcla de reacción, por lo que los ISCOM se forman con la molécula del VHC incorporada en su

interior. Los ISCOM también se denominan en el presente documento IMX. Las composiciones de matriz de ISCOM se forman idénticamente, pero sin proteínas virales. Proteínas con alta carga positiva pueden unirse electrostáticamente en las partículas de ISCOM, en vez de mediante fuerzas hidrófobas. Para una discusión general más detallada de saponinas e ISCOM, y procedimientos de formulación de ISCOM, véase Barr y col. (1998) Adv. Drug Delivery Reviews 32:247-271 (1998); las patentes de EE.UU. N° 4.981.684, 5.178.860, 5.679.354 y 6.027.732; publicaciones europeas N° EPA 109.942; 180.564 y 231.039; y Coulter y col. (1998) Vaccine 16:1243.

Adicionalmente, sistemas de administración biolística, que emplean vehículos en partículas tales como oro y tungsteno, son especialmente útiles para administrar las construcciones de expresión de la presente invención. Las partículas están recubiertas con la construcción que va a administrarse y se aceleran a alta velocidad, generalmente bajo una atmósfera reducida, usando una descarga de polvo de pistola de una "pistola de genes". Para una descripción de tales técnicas, y aparatos útiles, por tanto, véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N° 4.945.050; 5.036.006; 5.100.792; 5.179.022; 5.371.015; y 5.478.744.

Otros polipéptidos y polinucleótidos del VHC

Como se ha explicado anteriormente, la presente invención puede emplear otras composiciones que comprenden inmunógenos del VHC o ADN que codifica tales inmunógenos. Tales composiciones pueden administrarse antes de, posterior a, o simultáneamente a las composiciones de complejo de E1E2, además de antes de, posterior a o simultáneamente a las composiciones de ácido nucleico de E1E2 para reforzar la respuesta inmunitaria.

La presente divulgación también emplea otras proteínas del VHC en lugar de E1/E2 como antígeno para la sensibilización y refuerzo de la respuesta inmunitaria al VHC. En algunas realizaciones, la invención pueden emplear proteínas no estructurales (NS) del VHC fusionadas con una o más proteínas estructurales del VHC tales como E1, E2 y o proteína core. En una realización, la invención proporciona una composición de proteína de sensibilización que comprende una proteína de fusión del VHC que consiste esencialmente en E2

El genoma del virus de la hepatitis C normalmente contiene un único marco de lectura abierto de aproximadamente 9.600 nucleótidos, que se transcribe en una poliproteína. La secuencia de longitud completa de la poliproteína se desvela en la publicación europea N° 388.232 y la patente de EE.UU. N° 6.150.087. Como se muestra en la Tabla 1 y la Figura 1, una poliproteína del VHC, tras la escisión, produce al menos diez productos distintos, en el orden de NH₂-core-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4a-NS4b-NS5a-NS5b-COOH. El polipéptido core se produce en las posiciones 1-191, numeradas con respecto al VHC-1 (véase, Choo y col. (1991) Proc. Natl. Acad Sci. USA 88:2451-2455, para el genoma del VHC-1). Este polipéptido se procesa adicionalmente para producir un polipéptido del VHC con aproximadamente los aminoácidos 1-173. Los polipéptidos de la envuelta, E1 y E2, se producen en aproximadamente las posiciones 192-383 y 384-746, respectivamente. El dominio P7 se encuentra en aproximadamente las posiciones 747-809. NS2 es una proteína de membrana integral con actividad proteolítica y se encuentra en aproximadamente las posiciones 810-1026 de la poliproteína. NS2, tanto solo como en combinación con NS3 (encontrado en aproximadamente las posiciones 1027-1657), escinde el enlace sencillo de NS2-NS3 que a su vez genera el extremo N de NS3 y libera una gran poliproteína que incluye tanto actividades de serina proteasa como de ARN helicasa. La NS3 proteasa, encontrada en aproximadamente las posiciones 1027-1207, sirve para procesar la restante poliproteína. La actividad de helicasa se encuentra en aproximadamente las posiciones 1193-1657. La completitud de la maduración de poliproteínas se inicia por escisión autocatalítica en la unión NS3-NS4a, catalizada por la serina proteasa de NS3. Las posteriores escisiones mediadas por NS3 de la poliproteína del VHC parecen implicar el reconocimiento de uniones de escisión de poliproteína por una molécula NS3 de otro polipéptido. En estas reacciones, NS3 libera un cofactor de NS3 (NS4a, encontrada en aproximadamente las posiciones 1658-1711), dos proteínas (NS4b encontrada en aproximadamente las posiciones 1712-1972, y NS5a encontrada en aproximadamente las posiciones 1973-2420) y una ARN polimerasa dependiente de ARN (NS5b encontrada en aproximadamente las posiciones 2421-3011).

Tabla 1	
Dominio	Límites aproximados*
C (núcleo)	1-191
E1	192-383
E2	384-746
P7	747-809
NS2	810-1026
NS3	1027-1657
NS4a	1658-1711
NS4b	1712-1972
NS5a	1973-2420
NS5b	2421-3011

(continuación)

Tabla 1	
Dominio	Límites aproximados*
*Numerado con respecto a VHC-1. Véase Choo y col. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2451-2455. A menos que se indique lo contrario, toda la numeración de aminoácidos de las construcciones del VHC es con respecto al VHC-1.	

Se conocen las secuencias para los productos de poliproteína del VHC anteriores, ADN que codifican los mismos y polipéptidos inmunogénicos derivados de los mismos (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 5.350.671). Por ejemplo, se han descrito varios polipéptidos inmunogénicos generales y específicos, derivados de la poliproteína del VHC. Véanse, por ejemplo, Houghton y col., publicaciones europeas N° 318.216 y 388.232; Choo y col. Science (1989) 244:359-362; Kuo y col. Science (1989) 244:362-364; Houghton y col. Hepatology (1991) 14:381-388; Chien y col. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89:10011-10015; Chien y col. J. Gastroent. Hepatol. (1993) 8:S33-39; Chien y col., publicación internacional N° WO 93/00365; Chien, D.Y., publicación internacional N° WO 94/01778. Estas publicaciones proporcionan unos amplios antecedentes sobre VHC generalmente, además de sobre la fabricación y usos de reactivos inmunológicos de polipéptidos del VHC.

Cualquier polipéptido del VHC inmunogénico deseado o ADN que codifique el mismo puede utilizarse con la presente invención. Por ejemplo, polipéptidos del VHC derivados de la región core, tales como los polipéptidos derivados de la región encontrada entre los aminoácidos 1-191; aminoácidos 10-53; aminoácidos 10-45; aminoácidos 67-88; aminoácidos 86-100; 81-130; aminoácidos 121-135; aminoácidos 120-130; aminoácidos 121-170; y cualquiera de los epítopes de core identificados en, por ejemplo, Houghton y col., la patente de EE.UU. N° 5.350.671; Chien y col. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89:10011-10015; Chien y col. J. Gastroent. Hepatol. (1993) 8:S33-39; Chien y col., publicación internacional N° WO 93/00365; Chien, D.Y., publicación internacional N° WO 94/01778; y la patente de EE.UU. N° 6.150.087, encontrarán uso con los procedimientos objeto.

Adicionalmente, los polipéptidos derivados de las regiones no estructurales del virus también encontrarán uso en el presente documento. Se ha descrito la región NS3/4a de la poliproteína del VHC y la secuencia de aminoácidos y la estructura general de la proteína se desvelan en Yao y col. Structure (noviembre de 1999) 7:1353-1363. Véase, por tanto, Dasmahapatra y col., patente de EE.UU. N° 5.843.752. Como se ha explicado anteriormente, pueden usarse tanto la secuencia nativa como los análogos inmunogénicos en las formulaciones objeto. Dasmahapatra y col., patente de EE.UU. N° 5.843.752 y Zhang y col., patente de EE.UU. N° 5.990.276, describen ambos análogos de NS3/4a y procedimientos de preparación de los mismos.

Además, los polipéptidos para su uso en las composiciones objeto y procedimientos pueden derivarse de la región NS3 de la poliproteína del VHC. Se conocen varios de tales polipéptidos, que incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos derivados de las regiones c33c y c100, además de proteínas de fusión que comprenden un epítipo de NS3, tal como c25. Estos y otros polipéptidos de NS3 son útiles en los presentes procedimientos y se conocen en la técnica y se describen en, por ejemplo, Houghton y col., patente de EE.UU. N° 5.350.671; Chien y col. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89:10011-10015; Chien y col. J. Gastroent. Hepatol. (1993) 8:S33-39; Chien y col., publicación internacional N° WO 93/00365; Chien, D.Y., publicación internacional N° WO 94/01778; y la patente de EE.UU. N° 6.150.087.

Adicionalmente, en los presentes procedimientos pueden usarse múltiples antígenos de fusión de epítipes (llamados "MEFA"), como se describen en, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N° 6.514.731 y 6.428.792. Tales MEFA incluyen múltiples epítipes derivados de dos o más de las diversas regiones virales. Los epítipes son preferentemente de más de una cepa del VHC, proporcionando así la capacidad añadida de proteger contra múltiples cepas del VHC en una única vacuna.

Como se ha explicado anteriormente, por comodidad, las diversas regiones del VHC se han definido con respecto al número de aminoácido con respecto a la poliproteína codificada por el genoma del VHC-1a, como se describe en Choo y col. (1991) Proc Natl Acad Sci USA 88 :2451, designándose la metionina iniciadora la posición 1. Sin embargo, los polipéptidos y polinucleótidos del VHC para su uso con la presente invención no se limitan a aquellos derivados de la secuencia de VHC-1a y cualquier cepa o cepa aislada del VHC puede servir de base para proporcionar secuencias antigénicas para su uso con la invención, como se ha explicado en detalle anteriormente.

Los polinucleótidos y polipéptidos anteriores pueden obtenerse usando los procedimientos de producción recombinante descritos anteriormente para los polipéptidos y polinucleótidos E1E2.

Composiciones inmunogénicas

Una vez producidos, los polinucleótidos E1E2, complejos u otros inmunógenos pueden proporcionarse en composiciones inmunogénicas en, por ejemplo, composiciones de vacuna profiláctica (es decir, para prevenir la infección) o terapéutica (para tratar VHC tras la infección). Las composiciones incluirán generalmente uno o más "excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables" tales como agua, solución salina, glicerol, etanol, etc.

Adicionalmente, en tales vehículos pueden estar presentes sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias de tamponamiento del pH y similares.

Un vehículo está opcionalmente presente, por ejemplo, en composiciones de proteína usadas para sensibilizar la respuesta inmunitaria a E1E2. Los vehículos son moléculas que por sí mismos no inducen la producción de anticuerpos perjudiciales para el individuo que recibe la composición. Vehículos adecuados normalmente son macromoléculas grandes lentamente metabolizadas tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácido, agregados de lípidos (tales como gotitas de aceite o liposomas), y partículas de virus inactivos. Tales vehículos son muy conocidos para aquellos expertos habituales en la materia. Además, el polipéptido inmunogénico puede conjugarse con un toxoide bacteriano, tal como toxoide de la difteria, tétanos, cólera, etc.

También pueden estar presentes adyuvantes en las composiciones para potenciar la respuesta inmunitaria. Adyuvantes para su uso con la invención incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguiente expuestos a continuación:

A. Composiciones que contienen minerales

Composiciones que contienen minerales adecuadas para su uso como adyuvantes en la divulgación incluyen sales minerales tales como sales de aluminio y sales de calcio. La divulgación incluye sales minerales tales como hidróxidos (por ejemplo, oxihidróxidos), fosfatos (por ejemplo, hidroxifosfatos, ortofosfatos), sulfatos, etc. (véanse, por ejemplo, los capítulos 8 y 9 de Vaccine Design... (1995) eds. Powell & Newman. ISBN: 030644867X. Plenum), o mezclas de diferentes compuestos minerales (por ejemplo, una mezcla de un fosfato y un adyuvante de hidróxido, opcionalmente con un exceso de fosfato), tomando los compuestos cualquier forma adecuada (por ejemplo, gel, cristalina, amorfa, etc.), y prefiriéndose la adsorción a la(s) sal(es). Las composiciones que contienen minerales también pueden formularse como una partícula de sal metálica (documento WO00/23105).

Pueden incluirse sales de aluminio en vacunas de la divulgación de forma que la dosis de Al^{3+} esté entre 0,2 y 1,0 mg por dosis. En un aspecto, el adyuvante basado en aluminio para su uso en la presente divulgación es alumbre (sulfato de aluminio y potasio ($AlK(SO_4)_2$)), o un derivado del alumbre tal como el formado *in situ* mezclando un antígeno en tampón fosfato con alumbre, seguido de valoración y precipitación con una base tal como hidróxido de amonio o hidróxido sódico.

Otro adyuvante basado en aluminio para su uso en formulaciones de vacuna de la presente divulgación es el adyuvante de hidróxido de aluminio ($Al(OH)_3$) u oxihidróxido de aluminio cristalino ($AlOOH$), que es un excelente adsorbente, que tiene una área superficial de aproximadamente 500 m²/g. Alternativamente, se proporciona adyuvante de fosfato de aluminio ($AlPO_4$) o hidroxifosfato de aluminio que contienen grupos fosfato en lugar de alguno o todos los grupos hidroxilo del adyuvante de hidróxido de aluminio. Los adyuvantes de fosfato de aluminio preferidos proporcionados en este documento son amorfos y solubles en medios ácidos, básicos y neutros.

En otro aspecto, el adyuvante de la divulgación comprende tanto fosfato de aluminio como hidróxido de aluminio. En una realización más particular de la misma, el adyuvante tiene una mayor cantidad de fosfato de aluminio que el hidróxido de aluminio, tal como una relación de 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1 o superior a 9:1 en peso de fosfato de aluminio con respecto a hidróxido de aluminio. Todavía más particulares, las sales de aluminio en la vacuna están presentes a 0,4 a 1,0 mg por dosis de vacuna, o 0,4 a 0,8 mg por dosis de vacuna, o 0,5 a 0,7 mg por dosis de vacuna, o aproximadamente 0,6 mg por dosis de vacuna.

Generalmente, el (los) adyuvante(s) basado(s) en aluminio preferido(s), o relación de múltiples adyuvantes basados en aluminio tales como fosfato de aluminio con respecto a hidróxido de aluminio, se selecciona por la optimización de la atracción electrostática entre moléculas de forma que el antígeno lleve una carga opuesta a la del adyuvante al pH deseado. Por ejemplo, el adyuvante de fosfato de aluminio (iep = 4) se adsorbe a lisozima, pero no a albúmina a pH 7,4. Si la albúmina debiera ser la diana, se seleccionaría el adyuvante de hidróxido de aluminio (iep 11,4). Alternativamente, el pretratamiento de hidróxido de aluminio con fosfato reduce su punto isoeléctrico, haciendo que sea un adyuvante preferido para antígenos más básicos.

B. Emulsiones de aceite

Composiciones de emulsión de aceite adecuadas para su uso como adyuvantes en la divulgación incluyen emulsiones de escualeno-agua, tales como MF59 (5% de escualeno, 0,5% de Tween 80 y 0,5% de Span 85, formuladas en partículas submicrométricas usando un microfluidizador). Véase el documento WO90/14837; y las patentes de EE.UU. N° 6.299.884 y 6.451.325. Véanse, por tanto, Podda, "The adjuvanted influenza vaccines with novel adjuvants: experience with the MF59-adjuvanted vaccine", Vaccine (2001) 19: 2673-2680; Frey y col., "Comparison of the safety, tolerability, and immunogenicity of a MF59-adjuvanted influenza vaccine and a non-adjuvanted influenza vaccine in non-elderly adults", Vaccine (2003) 21:4234-4237. MF59 se usa como adyuvante en la vacuna de subunidad trivalente contra el virus de la gripe FLUAD[™].

Adyuvantes para su uso en las composiciones son emulsiones de aceite en agua submicrométricas. Las emulsiones de aceite en agua submicrométricas preferidas para su uso en este documento son emulsiones de escualeno/agua

que opcionalmente contienen cantidades variables de MTP-PE tales como una emulsión de aceite en agua submicrométrica que contiene 4-5% peso/volumen de escualeno, 0,25-1,0% peso/volumen de Tween 80™ (poli(monooleato de oxiethylensorbitano)) y/o 0,25-1,0% de Span 85™ (trioleato de sorbitano) y opcionalmente N-acetilmuramyl-L-alanyl-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxi-fosforiloxi)-etilamina (MTP-PE), por ejemplo, la emulsión de aceite en agua submicrométrica conocida como "MF59" (publicación internacional N° WO 90/14837; patentes de EE.UU. N° 6.299.884 y EE.UU. N° 6.451.325; y Ott y col., "MF59 - Design and Evaluation of a Safe and Potent Adjuvant for Human Vaccines" en Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (Powell, M.F. y Newman, M.J. eds.) Plenum Press, New York, 1995, pp. 277-296). MF59 contiene 4-5% peso/volumen de escualeno (por ejemplo 4,3%), 0,25-0,5% peso/volumen de Tween 80™ y 0,5% peso/volumen de Span 85™ y opcionalmente contiene diversas cantidades de MTP-PE, formuladas en partículas submicrométricas usando un microfluidizador tal como el microfluidizador de modelo 110Y (Microfluidics, Newton, MA). Por ejemplo, MTP-PE puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 0-500 µg/dosis, más preferentemente de 0-250 µg/dosis y lo más preferentemente de 0-100 µg/dosis. Como se usa en este documento, el término "MF59-0" se refiere a la emulsión de aceite en agua submicrométrica anterior que carece de MTP-PE, mientras que el término MF59-MTP denota una formulación que contiene MTP-PE. Por ejemplo, "MF59-100" contiene 100 µg de MTP-PE por dosis, etc. MF69, otra emulsión de aceite en agua submicrométrica para su uso en este documento, contiene 4,3% peso/volumen de escualeno, 0,25% peso/volumen de Tween 80™ y 0,75% peso/volumen de Span 85™ y opcionalmente MTP-PE. Todavía otra emulsión de aceite en agua submicrométrica es MF75, también conocida como SAF, que contiene 10% de escualeno, 0,4% de Tween 80™, 5% de polímero L121 bloqueado con Pluronic y thr-MDP, también microfluidizado en una emulsión submicrométrica. MF75-MTP denota una formulación de MF75 que incluye MTP, tal como de 100-400 µg de MTP-PE por dosis.

Las emulsiones de aceite en agua submicrométricas, los procedimientos de preparación de las mismas y los agentes inmunoestimulantes tales como muramilo péptidos para su uso en las composiciones se describen en detalle en la publicación internacional N° WO 90/14837 y las patentes de EE.UU. N° 6.299.884 y patente 6.451.325.

También puede usarse adyuvante completo de Freund (CFA) y adyuvante incompleto de Freund (IFA) como adyuvantes en la divulgación.

C. Formulaciones de saponina

También pueden usarse formulaciones de saponina como adyuvantes en la divulgación. Las saponinas son un grupo heterólogo de glucósidos de esterol y glucósidos triterpenoides que se encuentran en la corteza, las hojas, los tallos, las raíces e incluso las flores de una amplia variedad de especies de plantas. Las saponinas aisladas de la corteza del árbol *Quillaja saponaria* Molina se han estudiado exhaustivamente como adyuvantes. La saponina también puede obtenerse comercialmente de *Smilax ornata* (zarzaparrilla), *Gypsophila paniculata* (velo de novia) y *Saponaria officinalis* (raíz de jabón). Las formulaciones de adyuvante de saponina incluyen formulaciones purificadas tales como QS21, además de formulaciones de lípidos tales como ISCOM.

Las composiciones de saponina se han purificado usando cromatografía en capa fina de alta resolución (HP-TLC) y cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa (RP-HPLC). Se han identificado fracciones purificadas específicas usando estas técnicas que incluyen QS7, QS17, QS18, QS21, QH-A, QH-B y QH-C. Preferentemente, la saponina es QS21. Un procedimiento de producción de QS21 se desvela en la patente de EE.UU. N° 5.057.540. Las formulaciones de saponina también pueden comprender un esterol tal como colesterol (véase el documento WO96/33739).

Las combinaciones de saponinas y colesterol pueden usarse para formar partículas únicas llamadas complejos inmunoestimulantes (ISCOM). Los ISCOM normalmente también incluyen un fosfolípido tal como fosfatidiletanolamina o fosfatidilcolina. Puede usarse cualquier saponina conocida en los ISCOM. Preferentemente, el ISCOM incluye uno o más de QuilA, QHA y QHC. Los ISCOM se describen adicionalmente en los documentos EP0109942, WO96/11711 y WO96/33739. Opcionalmente, los ISCOM pueden carecer de detergente(s) adicional(es). Véase el documento WO00/07621.

Una revisión del desarrollo de adyuvantes basados en saponinas puede encontrarse en Barr y col., "ISCOMs and other saponin based adjuvants", Advanced Drug Delivery Reviews (1998) 32:247-271. Véase también Sjölander y col., "Uptake and adjuvant activity of orally delivered saponin and ISCOM vaccines", Advanced Drug Delivery Reviews (1998) 32:321-338.

D. Virosomas y partículas similares a virus (VLP)

Los virosomas y las partículas similares a virus (VLP) también pueden usarse como adyuvantes en la divulgación. Estas estructuras contienen generalmente una o más proteínas de un virus opcionalmente combinado o formulado con un fosfolípido. Son generalmente no patógenas, no replicantes y generalmente no contienen ninguno de los genomas virales nativos. Las proteínas virales pueden producirse recombinantemente o aislarse a partir de virus completos. Estas proteínas virales adecuadas para uso en virosomas o VLP incluyen proteínas derivadas del virus de la gripe (tales como HA o NA), virus de la hepatitis B (tales como proteínas de núcleo o de cápside), virus de la hepatitis E, virus del sarampión, virus Sindbis, rotavirus, virus de la glosopeda, retrovirus, virus de Norwalk, virus del

papiloma humano, VIH, fagos de ARN, fago Q β (tal como proteínas de la cubierta), fago GA, fago fr, fago AP205 y Ty (tal como la proteína p1 del retrotransposón Ty). Los VLP se tratan adicionalmente en los documentos WO03/024480; WO03/024481 y Niikura y col., "Chimeric Recombinant Hepatitis E Virus-Like Particles as an Oral Vaccine Vehicle Presenting Foreign Epitopes", *Virology* (2002) 293:273-280; Lenz y col., "Papillomavirus-Like Particles Induce Acute Activation of Dendritic Cells", *Journal of Immunology* (2001) 5246-5355; Pinto y col., "Cellular Immune Responses to Human Papillomavirus (HPV)-16 L1 Healthy Volunteers Immunized with Recombinant HPV-16 L1 Virus-Like Particles", *Journal of Infectious Diseases* (2003) 188:327-338; y Gerber y col., "Human Papillomavirus-Like Particles Are Efficient Oral Immunogens when Coadministered with *Escherichia coli* Heat-Labile Enterotoxin Mutant R192G or CpG", *Journal of Virology* (2001) *Virol.* 75(10):4752-4760. Los virosomas se tratan adicionalmente en, por ejemplo, Gluck y col., "New Technology Platforms in the Development of Vaccines for the Future", *Vaccine* (2002) 20:B10-B16. Los virosomas de la gripe reconstituidos potenciadores de la inmunidad (IRIV) se usan como sistema de administración de antígeno de subunidad en el producto trivalente intranasal INFLEXAL[™] {Mischler y Metcalfe (2002) *Vaccine* 20 Suppl 5:B17-B23} y el producto INFLUVAC PLUS[™].

E. Derivados bacterianos o microbianos

Adyuvantes adecuados para su uso en la divulgación incluyen derivados bacterianos o microbianos tales como:

(1) Derivados no tóxicos de lipopolisacárido enterobacteriano (LPS)

Tales derivados incluyen monofosforil lípido A (MPL) y MPL 3-O-desacilado (3dMPL). 3dMPL es una mezcla de monofosforil lípido A 3-des-O-acilado con 4, 5 ó 6 cadenas aciladas. Una forma de "partícula pequeña" preferida de monofosforil lípido A 3-des-O-acilado se desvela en el documento EP 0 689 454. Tales "partículas pequeñas" de 3dMPL son demasiado pequeñas para esterilizarse por filtración a través de una membrana de 0,22 micrómetros (véase el documento EP 0 689 454). Otros derivados de LPS no tóxicos incluyen miméticos de monofosforil lípido A tales como derivados de fosfato de aminoalquilglucosaminida, por ejemplo, RC-529. Véase Johnson y col. (1999) *Bioorg Med Chem Lett* 9:2273-2278.

(2) Derivados del lípido A

Los derivados del lípido A incluyen derivados del lípido A de *Escherichia coli* tales como OM-174. OM-174 se describe, por ejemplo, en Meraldi y col., "OM-174, a New Adjuvant with a Potential for Human Use, Induces a Protective Response with Administered with the Synthetic C-Terminal Fragment 242-310 from the circumsporozoite protein of *Plasmodium berghei*", *Vaccine* (2003) 21:2485-2491; y Pajak y col., "The Adjuvant OM-174 induces both the migration and maturation of murine dendritic cells in vivo", *Vaccine* (2003) 21:836-842.

(3) Oligonucleótidos inmunoestimulantes

Oligonucleótidos inmunoestimulantes adecuados para uso como adyuvantes en la invención incluyen secuencias de nucleótidos que contienen un motivo CpG (una secuencia de dinucleótidos que contiene una citosina sin metilar seguida de guanósina y enlazada por un enlace fosfato a una guanósina). También se ha mostrado que los ARN bicatenarios bacterianos u oligonucleótidos que contienen secuencias palindrómicas o de poli(dG) son inmunoestimulantes.

Los CpG pueden incluir modificaciones/análogos de nucleótidos tales como modificaciones de fosforotioato y pueden ser bicatenarios o monocatenarios. Opcionalmente, la guanósina puede sustituirse con un análogo tal como 2'-desoxi-7-deazaguanósina. See Kandimalla y col., "Divergent synthetic nucleotide motif recognition pattern: design and development of potent immunomodulatory oligodeoxyribonucleotide agents with distinct cytokine induction profiles", *Nucleic Acids Research* (2003) 31(9): 2393-2400; documentos WO02/26757 y WO99/62923 para ejemplos de posibles sustituciones análogas. El efecto adyuvante de los oligonucleótidos de CpG se trata adicionalmente en Krieg, "CpG motifs: the active ingredient in bacterial extracts?", *Nature Medicine* (2003) 9(7): 831-835; McCluskie y col., "Parenteral and mucosal prime-boost immunization strategies in mice with hepatitis B surface antigen and CpG DNA", *FEMS Immunology and Medical Microbiology* (2002) 32:179-185; documentos WO98/40100; patente de EE.UU. N° 6.207.646; patente de EE.UU. N° 6.239.116 y patente de EE.UU. N° 6.429.199.

La secuencia de CpG puede dirigirse a TLR9, tal como el motivo GTCGTT o TTCGTT. See Kandimalla y col., "Toll-like receptor 9: modulation of recognition and cytokine induction by novel synthetic CpG DNAs", *Biochemical Society Transactions* (2003) 31 (parte 3): 654-658. La secuencia de CpG puede ser específica para inducir una respuesta inmunitaria Th1 tal como un ODN CpG-A, o puede ser más específica para inducir una respuesta de linfocitos B tal como un ODN CpG-B. Los ODN CpG-A y CpG-B se tratan en Blackwell y col., "CpG-A-Induced Monocyte IFN-gamma-Inducible Protein-10 Production is Regulated by Plasmacytoid Dendritic Cell Derived IFN-alpha", *J. Immunol.* (2003) 170(8):4061-4068; Krieg, "From A to Z on CpG", *TRENDS in Immunology* (2002) 23(2): 64-65 y el document WO01/95935. Preferentemente, el CpG es un ODN de CpG-A.

Preferentemente, el oligonucleótido de CpG se construye de manera que el extremo 5' esté accesible para el reconocimiento de receptores. Opcionalmente, dos secuencias de oligonucleótidos de CpG pueden unirse en sus extremos 3' para formar "inmunómeros". Véanse, por ejemplo, Kandimalla y col., "Secondary structures in CpG oligonucleotides affect immunostimulatory activity", *BBRC* (2003) 306:948-953; Kandimalla y col., "Toll-like receptor

9: modulation of recognition and cytokine induction by novel synthetic GpG DNAs", Biochemical Society Transactions (2003) 31(parte 3):664-658; Bhagat y col., "CpG penta- and hexadeoxyribonucleotides as potent immunomodulatory agents" BBRC (2003) 300:853-861 y el documento WO03/035836.

(4) *Toxinas ribosilantes de ADP y derivados desintoxicados de las mismas*

- 5 Las toxinas ribosilantes de ADP bacterianas y los derivados desintoxicados de las mismas pueden usarse como adyuvantes en la divulgación. Preferentemente, la proteína se deriva de *E. coli* (es decir, enterotoxina lábil al calor de *E. coli* "LT"), cólera ("CT") o pertussis ("PT"). El uso de toxinas ribosilantes de ADP desintoxicadas como adyuvantes de la mucosa se describe en el documento WO95/17211 y como adyuvantes parenterales en el documento WO98/42375. Preferentemente, el adyuvante es un mutante de LT desintoxicado tal como LT-K63, LT-R72 y LT-192G. El uso de toxinas ribosilantes de ADP y derivados desintoxicados de las mismas, particularmente LT-K63 y LT-R72, como adyuvantes puede encontrarse en las siguientes referencias: Beignon y col., "The LTR72 Mutant of Heat-Labile Enterotoxin of Escherichia coli Enhances the Ability of Peptide Antigens to Elicit CD4+ T Cells and Secrete Gamma Interferon after Co application onto Bare Skin", Infection and Immunity (2002) 70(6):3012-3019; Pizza y col., "Mucosal vaccines: non toxic derivatives of LT and CT as mucosal adjuvants", Vaccine (2001) 19:2534-2541; Pizza y col., "LTK63 and LTR72, two mucosal adjuvants ready for clinical trials" Int. J. Med. Microbiol (2000) 290(4-5):455-461; Scharton-Kersten y col., "Transcutaneous Immunization with Bacterial ADP-Ribosylating Exotoxins, Subunits and Unrelated Adjuvants", Infection and Immunity (2000) 68(9):5306-5313; Ryan y col., "Mutants of Escherichia coli Heat-Labile Toxin Act as Effective Mucosal Adjuvants for Nasal Delivery of an Acellular Pertussis Vaccine: Differential Effects of the Nontoxic AB Complex and Enzyme Activity on Th1 and Th2 Cells" Infection and Immunity (1999) 67(12):6270-6280; Partidos y col., "Heat-labile enterotoxin of Escherichia coli and its site-directed mutant LTK63 enhance the proliferative and cytotoxic T-cell responses to intranasally co-immunized synthetic peptides", Immunol. Lett. (1999) 67(3):209-216; Peppoloni y col., "Mutants of the Escherichia coli heat-labile enterotoxin as safe and strong adjuvants for intranasal delivery of vaccines", Vaccines (2003) 2(2):285-293; and Pine y col., (2002) "Intranasal immunization with influenza vaccine and a detoxified mutant of heat labile enterotoxin from Escherichia coli (LTK63)" J. Control Release (2002) 85(1-3):263-270. La referencia numérica para sustituciones de aminoácidos se basa preferentemente en los alineamientos de las subunidades A y B de toxinas ribosilantes de ADP expuestas en Domenighini y col., Mol. Microbiol (1995) 15(6):1165-1167.

F. Bioadhesivos y mucoadhesivos

- 30 También pueden usarse bioadhesivos y mucoadhesivos como adyuvantes en la divulgación. Bioadhesivos adecuados incluyen microesferas de ácido hialurónico esterificadas (Singh y col. (2001) J. Cont. Rele. 70:267-276) o mucoadhesivos tales como derivados reticulados de poli(ácido acrílico), poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, polisacáridos y carboximetilcelulosa. También pueden usarse quitosano y derivados del mismo como adyuvantes en la invención. Por ejemplo, el documento WO99/27960.

G. Micropartículas

- 35 También pueden usarse micropartículas como adyuvantes en la divulgación. Se prefieren micropartículas (es decir, una partícula de ~100 nm a ~150 µm de diámetro, más preferentemente ~200 nm a ~30 µm de diámetro, y lo más preferentemente ~500 nm a ~10 µm de diámetro) formadas a partir de materiales que son biodegradables y no tóxicos (por ejemplo, un poli(α-hidroxiácido), un ácido polihidroxibutírico, un polioctoéster, un polianhídrido, una policaprolactona, etc.), con poli(lactida-co-glicolida), opcionalmente tratadas para tener una superficie negativamente cargada (por ejemplo, con SDS) o una superficie positivamente cargada (por ejemplo, con un detergente catiónico, tal como CTAB).

H. Liposomas

Ejemplos de formulaciones de liposomas adecuadas para uso como adyuvantes se describen en la patente de EE.UU. Nº 6.090.406, la patente de EE.UU. Nº 5.916.588 y el documento EP 0 626 169.

- 45 I. Formulaciones de polioxietilenéteres y polioxietilenésteres

Adyuvantes adecuados para uso en la divulgación incluyen polioxietilenéteres y polioxietilenésteres. Documento WO99/52549. Tales formulaciones incluyen adicionalmente tensioactivos de éster de polioxietilensorbitano en combinación con un octoxinol (documento WO01/21207), además de tensioactivos de polioxietilentalquiléter o éster en combinación con al menos un tensioactivo no iónico adicional tal como un octoxinol (documento WO01/21152).

- 50 Los polioxietilenéteres preferidos se seleccionan del siguiente grupo: polioxietilen-9-lauriléter (laureth 9), polioxietilen-9-esteoriléter, polioxietilen-8-esteoriléter, polioxietilen-4-lauriléter, polioxietilen-35-lauriléter y polioxietilen-23-lauriléter.

J. Polifosfaceno (PCPP)

- 55 Formulaciones de PCPP se describen, por ejemplo, en Andrianov y col., "Preparation of hydrogel microspheres by coacervation of aqueous polyphosphazene solutions", Biomaterials (1998) 19(1-3):109-115 y Payne y col., "Protein

Release from Polyphosphazene Matrices”, Adv. Drug. Delivery Review (1998) 31(3):185-196.

K. Muramipéptidos

5 Ejemplos de muramipéptidos adecuados para uso como adyuvantes en la divulgación incluyen N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP) y N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina (MTP-PE).

L. Compuestos de imidazoquinolina

10 Ejemplos de compuestos de imidazoquinolina adecuados para uso como adyuvantes en la divulgación incluyen imiquimod y sus análogos, descritos adicionalmente en Stanley “Imiquimod and the imidazoquinolines: mechanism of action and therapeutic potential” Clin Exp Dermatol (2002) 27(7):571-577; Jones, “Resiquimod 3M”, Curr Opin Investig Drugs (2003) 4(2):214-218; y las patentes de EE.UU. N° 4.689.338, 5.389.640, 5.268.376, 4.929.624, 5.266.575, 5.352.784, 5.494.916, 5.482.936, 5.346.905, 5.395.937, 5.238.944 y 5.525.612.

M. Compuestos de tiosemicarbazona

15 Ejemplos de compuestos de tiosemicarbazona, además de procedimientos de formulación, preparación y cribado para los compuestos, todos adecuados para su uso como adyuvantes en la divulgación, incluyen aquellos descritos en el documento WO04/60308. Las tiosemicarbazonas son particularmente eficaces en la estimulación de células mononucleares de sangre periférica humana para la producción de citocinas, tales como TNF- α .

N. Compuestos de triptantrina

20 Ejemplos de compuestos de triptantrina, además de procedimientos de formulación, preparación y cribado para tales compuestos, todos adecuados para su uso como adyuvantes en la divulgación, incluyen aquellos descritos en el documento WO04/64759. Los compuestos de triptantrina son particularmente eficaces en la estimulación de células mononucleares de sangre periférica humana para la producción de citocinas, tales como TNF- α .

La divulgación también puede comprender combinaciones de aspectos de uno o más de los adyuvantes identificados anteriormente. Por ejemplo, pueden usarse las siguientes composiciones de adyuvante en la invención:

- 25 (1) una saponina y una emulsión de aceite en agua (documento WO99/11241);
- (2) una saponina (por ejemplo, QS21) + un derivado de LPS no tóxico (por ejemplo, 3dMPL) (véase el documento WO94/00153);
- (3) una saponina (por ejemplo, QS21) + un derivado de LPS no tóxico (por ejemplo, 3dMPL) + un colesterol;
- (4) una saponina (por ejemplo, QS21) + 3dMPL + IL-12 (opcionalmente + un esteroide) (documento WO98/57659);
- 30 (5) combinaciones de 3dMPL con, por ejemplo, QS21 y/o emulsiones de aceite en agua (véanse las solicitudes de patente europea 0835318, 0735898 y 0761231);
- (6) SAF, que contiene 10% de escualano, 0,4% de Tween 80, 5% de Pluronic-polímero de bloque L121, y thr-MDP, tanto microfluidizado en una emulsión submicrométrica como agitado con vórtex para generar una emulsión de mayor tamaño de partícula;
- 35 (7) sistema de adyuvante Ribi[™] (RAS), (Ribi Immunochem) que contiene 2% de escualeno, 0,2% de Tween 80, y uno o más componentes de la pared de la célula 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[™]); y
- (8) una o más sales minerales (tales como una sal de aluminio) + un derivado de LPS no tóxico (tal como 3dPML);
- 40 (9) una o más sales minerales (tal como una sal de aluminio) + un oligonucleótido inmunoestimulante (tal como una secuencia de nucleótidos que incluye un motivo CpG).

O. Inmunomoduladores humanos

45 Inmunomoduladores humanos adecuados para su uso como adyuvantes en la divulgación incluyen 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- γ), factor estimulante de colonias de macrófagos y factor de necrosis tumoral.

Las sales de aluminio y MF59 son adyuvantes preferidos para su uso con vacunas inyectables contra la gripe. Las toxinas bacterianas y los bioadhesivos son adyuvantes preferidos para su uso con vacunas administradas por las mucosas, tales como vacunas nasales.

50 Las composiciones para su uso en la divulgación comprenderán una cantidad terapéuticamente eficaz de ADN que codifica los complejos de E1E2 (o una cantidad terapéuticamente eficaz de proteína) y cualquier otro de los componentes anteriormente mencionados, según se necesite. Por “cantidad terapéuticamente eficaz” se indica una cantidad de una proteína o ADN que codifica la misma que inducirá una respuesta inmunológica, preferentemente una respuesta inmunológica protectora, en el individuo al que se administra. Una respuesta tal generalmente

producirá el desarrollo en el sujeto de una respuesta inmunitaria mediada por anticuerpo y/o secretora o celular a la composición. Normalmente, una respuesta tal incluye, pero no se limita a, uno o más de los siguientes efectos; la producción de anticuerpos de cualquiera de las clases inmunológicas, tales como inmunoglobulinas A, D, E, G o M; la proliferación de linfocitos B y T; la provisión de activación, crecimiento y diferenciación de señales a células inmunológicas; expansión de poblaciones de linfocitos T cooperadores, linfocitos T supresores y/o linfocitos T citotóxicos y/o linfocitos T $\gamma\delta$.

Las composiciones de proteína E1E2 pueden comprender mezclas de uno o más de los complejos de E1E2, tales como complejos de E1E2 derivados de más de una cepa aislada viral, además de antígenos del VHC adicionales. Además, como se ha explicado anteriormente, los complejos de E1E2 pueden estar presentes como una mezcla heterogénea de moléculas, debido a escisión y escisión proteolítica. Así, una composición que incluye complejos de E1E2 puede incluir múltiples especies de E1E2, tales como E1E2 que terminan en el aminoácido 746 (E1E2₇₄₆), E1E2 que terminan en el aminoácido 809 (E1E2₈₀₉), o cualquiera de las otras diversas moléculas de E1 y E2 descritas anteriormente, tales como moléculas de E2 con truncaciones del extremo N de 1-20 aminoácidos, tales como especies de E2 que empiezan en el aminoácido 387, aminoácido 402, aminoácido 403, etc.

Como se ha explicado anteriormente, las composiciones (tanto ADN como proteína) pueden administrarse conjuntamente con otros antígenos y agentes inmunorreguladores, tales como inmunoglobulinas, citocinas, linfocinas y quimiocinas, que incluyen, pero no se limitan a, citocinas tales como IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12, etc. (véase, por ejemplo, la publicación internacional N° WO 99/44636), IL-2 modificada (cys125→ser125), GM-CSF, M-CSF, factor de necrosis tumoral (TNF), interferones e interferones pegilados, tales como γ -interferón, IP-10, MIP1 β , FLP-3, ribavirina, RANTES, ARNip, ARN antisentido, inhibidores de la polimerasa, helicasa, GTPasa, ATPasa, proteasa, glicosilación, metaloproteasa y/o IRES. Así, los presentes procedimientos pueden usarse con otras pautas terapéuticas para tratar la infección por el VHC. Si se usa en combinación con otras composiciones, tales composiciones pueden administrarse antes de, simultáneamente con o posteriormente a las composiciones de E1E2.

Linfocitos T específicos del VHC

Los linfocitos T específicos del VHC que se activan por los complejos de E1E2 anteriormente descritos, expresados *in vivo* o *in vitro*, reconocen preferentemente un epítipo de un polipéptido del VHC tal como un polipéptido E1 y/o E2, o un complejo de E1E2. Los linfocitos T específicos del VHC pueden ser CD8⁺ o CD4⁺.

Los linfocitos T CD8⁺ específicos del VHC son preferentemente linfocitos T citotóxicos (CTL) que pueden destruir células infectadas por el VHC que muestran epítopos E1 y/o E2 complejados con una molécula del MHC de clase I. Los linfocitos T CD8⁺ específicos del VHC también pueden expresar interferón- γ (IFN- γ). Los linfocitos T CD8⁺ específicos del VHC pueden detectarse por, por ejemplo, ensayos de liberación de ⁵¹Cr (véanse los ejemplos). Los ensayos de liberación de ⁵¹Cr miden la capacidad de los linfocitos T CD8⁺ específicos del VHC para lisar células diana que muestran un epítipo E1, E2 o E1E2. Los linfocitos T CD8⁺ específicos del VHC que expresan IFN- γ también pueden detectarse por procedimientos inmunológicos, preferentemente por tinción intracelular para el IFN- γ después de la estimulación *in vitro* con un polipéptido E1, E2 o E1E2 (véanse los ejemplos).

Las células CD4⁺ específicas del VHC activadas por los complejos de E1E2 anteriormente descritos, expresados *in vivo* o *in vitro*, reconocen preferentemente un epítipo de un polipéptido E1 y/o E2, que incluye un epítipo de un complejo de E1E2, que está unido a una molécula del MHC de clase II sobre una célula infectada por el VHC y proliferan en respuesta a la estimulación con complejos de E1E2.

Los linfocitos T CD4⁺ específicos del VHC pueden detectarse por un ensayo de linfoproliferación (véanse los ejemplos). Los ensayos de linfoproliferación miden la capacidad de linfocitos T CD4⁺ específicos del VHC para proliferar en respuesta a un epítipo E1, E2 y/o E1E2.

Procedimientos de activación de linfocitos T específicos del VHC

Las proteínas o polinucleótidos E1E2 pueden usarse para estimular una respuesta inmunitaria, tal como para activar linfocitos T específicos del VHC tanto *in vitro* como *in vivo*. La activación de linfocitos T específicos del VHC puede usarse, entre otras cosas, para proporcionar sistemas modelo para optimizar respuestas de CTL al VHC y para proporcionar tratamiento profiláctico o terapéutico contra la infección por el VHC. Para la activación *in vitro*, las proteínas se suministran preferentemente a linfocitos T mediante un plásmido o un vector viral, tal como un vector de alfavirus, como se ha descrito anteriormente.

Poblaciones policlonales de linfocitos T pueden obtenerse de la sangre, y preferentemente de órganos linfoides periféricos, tales como ganglios linfáticos, bazo, o timo, de mamíferos que se han infectado con un VHC. Mamíferos preferidos incluyen ratones, chimpancés, babuinos y seres humanos. El VHC sirve para ampliar el número de linfocitos T específicos del VHC activados en el mamífero. Los linfocitos T específicos del VHC derivados del mamífero pueden entonces re-estimularse *in vitro* añadiendo, por ejemplo, E1E2 del VHC, a los linfocitos T. Los linfocitos T específicos del VHC pueden entonces probarse para, entre otras cosas, proliferación, producción de IFN- γ , y la capacidad para lisar células diana que expresan epítopos E1E2 *in vitro*.

En un ensayo de linfoproliferación, los linfocitos T CD4⁺ activados por el VHC proliferan cuando se cultivan con un péptido epitópico E1E2, pero no en ausencia de un péptido epitópico. Así, epítopes E1 y E2 particulares u otros antígenos del VHC que son reconocidos por linfocitos T CD4⁺ específicos del VHC pueden identificarse usando un ensayo de linfoproliferación.

- 5 Similarmente, la detección de IFN- γ en linfocitos T CD8⁺ específicos del VHC después de la estimulación *in vitro* con las proteínas del VHC anteriormente descritas puede usarse para identificar epítopes E1, E2 y E1E2 u otros antígenos del VHC que son particularmente eficaces en estimular linfocitos T CD8⁺ para producir IFN- γ (véanse los ejemplos).

- Además, los ensayos de liberación de ⁵¹Cr son útiles para determinar el nivel de respuesta de CTL al VHC. Véase
10 Cooper y col. Immunity 10:439-449. Por ejemplo, pueden obtenerse linfocitos T CD8⁺ específicos del VHC del hígado de un paciente infectado por el VHC. Estos linfocitos T pueden probarse en ensayos de liberación de ⁵¹Cr contra células diana que expresan, por ejemplo, epítopes E1E2. Pueden construirse varias poblaciones de células diana que expresan diferentes epítopes E1E2, de manera que cada población de células diana exprese diferentes epítopes de E1E2. Las células CD8⁺ específicas del VHC pueden ensayarse contra cada una de estas poblaciones
15 de célula diana. Los resultados de los ensayos de liberación de ⁵¹Cr pueden usarse para determinar qué epítopes de E1E2 son responsables de la respuesta de CTL más fuerte al VHC. Complejos de E1E2 que contienen los epítopes responsables de la respuesta de CTL más fuerte pueden entonces construirse usando la información derivada de los ensayos de liberación de ⁵¹Cr.

Administración

- 20 Normalmente, las composiciones inmunogénicas (tanto ADN como proteína) se preparan como inyectables, bien como disoluciones líquidas o como suspensiones; también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para disolución en, o suspensión en, vehículos líquidos antes de la inyección. Así, una vez formuladas, las composiciones se administran convencionalmente parenteralmente, por ejemplo, mediante inyección, tanto subcutáneamente como intramuscularmente. Formulaciones adicionales adecuadas para otros modos de administración incluyen
25 formulaciones orales y pulmonares, supositorios, y aplicaciones transdérmicas.

- El tratamiento de dosificación puede ser una única dosificación de sensibilización y un único refuerzo, o puede ser un programa de múltiples dosis. El intervalo entre dosificaciones (sensibilización y refuerzo) variará según factores tales como la edad del paciente y la naturaleza de la composición, y estos factores pueden evaluarse por un médico. La administración de las primeras dosis de sensibilización y de refuerzo está generalmente separada por al menos 2
30 semanas, normalmente al menos 4 semanas. Los procedimientos pueden comprender más de una dosis de sensibilización y/o más de una dosis de refuerzo, por ejemplo, dos o más dosis de sensibilización seguidas de dos o más dosis de refuerzo. El término refuerzo de "recuerdo" se refiere a cualquier dosis de refuerzo administrada después del refuerzo inicial. El momento en el que se administra el refuerzo de "recuerdo" puede variar de horas (por ejemplo, 1 a 72 horas o cualquier momento de tiempo entremedias) o días (por ejemplo, 1 a 90 días o cualquier
35 momento de tiempo entremedias) a meses (por ejemplo, 1 a 36 meses o cualquier momento de tiempo entremedias) o incluso años después del refuerzo inicial. Puede administrarse más de un refuerzo de recuerdo en los mismos intervalos de tiempo o intervalos de tiempo variables el uno con respecto al otro. Pueden usarse composiciones inmunogénicas idénticas o diferentes para cada dosis de sensibilización. Las dosis de sensibilización y de refuerzo pueden distinguirse, por tanto, por la vía de administración, en vez de por su momento adecuado.

- 40 Preferentemente, la cantidad administrada es suficiente para provocar el tratamiento o prevención de los síntomas de enfermedad. La cantidad exacta necesaria variará dependiendo del sujeto que está tratándose; la edad y condición general del individuo que va a tratarse; la capacidad del sistema inmunitario del individuo para acoplarse en una respuesta inmunitaria; el grado de protección deseado; la gravedad de la afección que está tratándose; la macromolécula particular seleccionada y su modo de administración, entre otros factores. Una cantidad eficaz apropiada puede determinarse fácilmente por un experto en la materia. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se
45 encontrará en un intervalo relativamente amplio que puede determinarse mediante ensayos rutinarios usando modelos *in vitro* e *in vivo* conocidos en la técnica. La cantidad de ácido nucleico y polipéptidos E1E2 usada en los ejemplos más adelante proporciona orientación general que puede usarse para optimizar la provocación de respuestas inmunitarias celulares específicas del VHC, tales como para activar linfocitos T específicos del VHC *in vivo*.
50

- Por ejemplo, el inmunogén se inyecta preferentemente intramuscularmente a un mamífero grande, tal como un primate, por ejemplo, un babuino, chimpancé o ser humano. Para la administración de la proteína E1E2, generalmente se administrarán aproximadamente 0,1 μ g a aproximadamente 5,0 mg de inmunogén por dosis, o cualquier cantidad entre los intervalos establecidos, tales como 0,5 μ g a aproximadamente 10 mg, 1 μ g a
55 aproximadamente 2 mg, 2,5 μ g a aproximadamente 250 μ g, 4 μ g a aproximadamente 200 μ g, tal como 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10..., 20..., 30..., 40..., 50..., 60..., 70..., 80..., 90..., 100, etc., μ g por dosis. Para las administraciones de refuerzo, la cantidad de construcciones de ácidos nucleicos E1E2 administradas dependerá del vector, si se usa alguno. Por ejemplo, si se administra ADN de E1E2 sin un vector viral, aproximadamente 1 μ g a 500 mg de ADN, tal como 5 μ g a 100 mg de ADN, por ejemplo, 10 μ g a 50 mg, o 100 μ g, a 5 mg, tal como 20... 30..., 40..., 50..., 60..., 100..., 200 μ g, etc., a 500 μ g de
60 ADN, y cualquier número entero entre los intervalos establecidos, encontrará uso en los procedimientos objeto. Si se

usan vectores virales, tales como replicones de alfavirus, para la administración, generalmente, una dosis eficaz incluirá del orden de aproximadamente 10^5 a 10^{20} unidades infecciosas de los vectores virales, más preferentemente 10^8 a 10^{15} , e incluso más preferentemente aproximadamente 10^{10} a 10^{13} unidades infecciosas de los vectores virales, o cualquier valor dentro de estos intervalos.

- 5 Las construcciones de ácidos nucleicos E1E2 se administran usando protocolos de administración génica estándar. Procedimientos para la administración génica se conocen en la técnica. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. Nº 5.399.346, 5.580.859, 5.589.466. Pueden administrarse construcciones de ácidos nucleicos E1E2 tanto directamente al sujeto vertebrado como, alternativamente, administrarse *ex vivo*, a células derivadas del sujeto y reimplantarse las células en el sujeto.
- 10 La administración de los polipéptidos E1E2 y ácido nucleico puede provocar una respuesta inmunitaria celular, y/o un título de anticuerpos anti-E1 anti-E2 y/o anti-E1E2 en el mamífero que dura durante al menos 1 semana, 2 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 6 meses, 1 año, o más. Como se ha explicado anteriormente, el ácido nucleico E1E2 también puede administrarse para proporcionar una respuesta de recuerdo. Si se logra una respuesta tal, los títulos de anticuerpos en la respuesta inmunitaria celular pueden disminuir con el tiempo, sin embargo, la
- 15 exposición al virus VHC o inmunogén produce la rápida inducción de anticuerpos y/o una respuesta inmunitaria celular, por ejemplo, dentro de solo algunos días. Opcionalmente, tales respuestas pueden mantenerse en un mamífero proporcionando una o más inyecciones de refuerzo de las construcciones de ácidos nucleicos E1E2, como se ha explicado anteriormente, 2 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 1 año, o más después de la inyección primaria.
- 20 Una composición para su uso con los procedimientos se administra de un modo compatible con la composición particular usada y en una cantidad que es eficaz para estimular una respuesta inmunitaria, tal como para activar linfocitos T específicos del VHC como se mide por, entre otras cosas, un ensayo de liberación de ^{51}Cr , un ensayo de linfoproliferación, o por tinción intracelular para IFN- γ . Las proteínas y/o polinucleótidos pueden administrarse tanto a un mamífero que no está infectado por un VHC como pueden administrarse a un mamífero infectado por el VHC.
- 25 Una cantidad eficaz de la composición de la invención puede determinarse fácilmente usando solo experimentación rutinaria. Los modelos *in vitro* e *in vivo* descritos anteriormente pueden emplearse para identificar dosis apropiadas. La cantidad de proteína y polinucleótido usada en el ejemplo descrito más adelante proporciona orientación general que puede usarse para optimizar la activación de linfocitos T específicos del VHC tanto *in vivo* como *in vitro*.

3. PARTE EXPERIMENTAL

- 30 A continuación están ejemplos de realizaciones específicas para llevar a cabo la presente invención. Los ejemplos se ofrecen para fines ilustrativos solo, y no pretenden limitar el alcance de la presente invención de ningún modo.

Se han hecho esfuerzos por garantizar la exactitud con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperaturas, etc.), pero, por supuesto, debe permitirse algún error y desviación experimental.

Materiales y procedimientos

- 35 Se compraron enzimas de fuentes comerciales, y se usaron según las pautas de los fabricantes.

En el aislamiento de fragmentos de ADN, excepto cuando se indique, todas las manipulaciones de ADN se hicieron según procedimientos convencionales. Véase Sambrook y col., arriba. Pueden comprarse enzimas de restricción, T₄ ADN ligasa, *E. coli*, ADN polimerasa 11, fragmento de Klenow y otros reactivos biológicos de proveedores comerciales y usarse según las pautas de los fabricantes. Los fragmentos de ADN bicatenario se separaron sobre

- 40 geles de agarosa.

Fuentes para los reactivos químicos generalmente incluyen Sigma Chemical Company, St. Louis, MO; Aldrich, Milwaukee, WI; Roche Molecular Biochemicals, Indianápolis, IN.

Producción de proteína E1E2₈₀₉

- 45 Se construyó el plásmido pCMVtpaE1E2p7 (6275 pb) clonando VHC-1 que codifica los aminoácidos 192 a 809 con la secuencia señal del activador tisular del plasminógeno (tPA) en la dirección 5' en el vector de expresión pnewCMV-II. El vector pnewCMV es un vector de clonación basado en pUC19 que comprende los siguientes elementos: un origen de replicación del SV40, un potenciador/promotor del CMV humano, un intrón del CMV humano, un conductor del activador tisular humano del plasminógeno (tPA), un terminador de poli A de la hormona de crecimiento bovina y un gen de resistencia a ampicilina.
- 50 Se expresó E1E2₈₀₉ a partir de células CHO recombinantes como se ha descrito previamente (Spaete y col., Virology (1992) 188:819-830). Los complejos de E1E2 se extrajeron de dentro de las células CHO con detergente Triton X-100. Los complejos de E1E2 se purificaron usando cromatografía en agarosa de lectina de *Galanthus nivalis* (Vector Laboratories, Burlingame, Calif.) y cromatografía de intercambio catiónico de flujo rápido en S-Sepharose (Pharmacia).

Se emulsionaron 2 µg de complejos de E1E2 producidos expresando los polinucleótidos de E1E2₈₀₉ con la emulsión de aceite en agua submicrométrica MF59. MF59 se fabricó en Chiron Vaccines, Marburgo, y se ha descrito previamente en detalle (Ott y col., "MF59 -- Design and Evaluation of a Safe and Potent Adjuvant for Human Vaccines" en Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (Powell, M.F. y Newman, M.J. eds.) Plenum Press, New York, 1995, pp. 277-296)

Alfavirus que codifican E1E2₈₀₉

Las partículas de alfavirus defectuosas en la replicación representan una plataforma de administración de vacunas eficaz debido a la expresión de alto nivel del antígeno extraño, la falta de inmunidad pre-existente en seres humanos, el direccionamiento de las células dendríticas y la potente estimulación de la inmunidad innata. En particular, se usaron quimeras de partículas de replicón de VEE/SIN que combinan las cualidades deseables seleccionadas del virus de Sindbis (SIN) y el virus de la encefalitis equina venezolana (VEE). Tales quimeras se produjeron como se describe en Perri y col., J. Virol. (2003) 77:10394-10403 y las publicaciones de patente 20030232324 y 20030148262.

Propagación e infección de líneas celulares

Se mantuvieron células BHK-21 en medio esencial mínimo de Dulbecco (DMEM) complementado con 10% de suero de ternero fetal (FCS), piruvato de sodio 10 mM y penicilina y estreptomycin a 37 °C con 5% de CO₂. Se infectaron monocapas de células de aproximadamente el 80% de confluencia con partículas de replicón durante 1 h en DMEM que contenía 1% de FCS a 37 °C y luego se incubaron durante la noche en DMEM que contenía 10% de FCS.

Vector de replicón y construcciones cooperadoras defectuosas

Se derivó VCR-Chim2.1 de VCR (Perri y col., J Virol. 2003, 77: 10394-403) (i) insertando una secuencia de encapsidación del virus de Sindbis (SIN) amplificada por PCR (nt 945 a 1076 del genoma de SIN) como una fusión en el marco dentro del gen 3 (nsP3) de la proteína no estructural del virus de la encefalitis equina venezolana (VEE) entre los sitios *Xho*I en los nt 5493 y 5595 y (ii) sustituyendo la región sin traducir en 3' (3'UTR) del VEE con la 3'UTR de SIN del vector de replicón derivado de SIN previamente publicado, SINCR (Perri y col., J Virol. 2003, 77: 10394-403). Se generaron fragmentos de genes E1E2 (746) y E1E2p7 (809) para la inserción en el vector quimérico por amplificación por PCR de pCMVtpaE1E2p7, y luego el ADNc se insertó en los vectores de replicón VCR-Chim2.1, produciendo construcciones VEE/SIN-E1E2₇₄₆ y VEE/SIN-E1E2₈₀₉.

Producción de partículas de replicón de alfavirus que expresan proteínas del VHC

Se insertaron secuencias que codifican tanto las proteínas de la cápside como de la envuelta de SIN en el esqueleto cooperador defectuoso basado en VEE (VCR-DH) (Perri y col., J Virol. 2003, 77: 10394-403).

Se generaron partículas de replicón quiméricas por co-electroporación de ARN transcritos *in vitro* correspondientes a un replicón y dos cooperadores defectuosos, uno que expresa proteína de la cápside y el otro que expresa proteínas de la envuelta, como se ha descrito previamente (Perri y col., J Virol. 2003, 77: 10394-403).

Las partículas de replicón que expresan VHC-E1E2₇₄₆ o E1E2₈₀₉ se recogieron como sobrenadantes de cultivo 24 h después de la electroporación, se clarificaron por filtración y se purificaron por cromatografía de intercambio catiónico. Se determinaron los títulos de partículas de replicón por tinción intracelular de E1 y E2 expresados, siguiendo infección durante la noche de células BHK-21 con diluciones sucesivas de partículas. Las células infectadas se permeabilizaron y se fijaron usando un kit Cytofix/Cytoperm (Pharmingen) y luego se tiñeron con anticuerpos conjugados con isotiocianato de fluoresceína para el antígeno E1 o E2 del VHC. Usando análisis de citometría de flujo se determinó el porcentaje de células positivas para E1 o E2 y se usó para calcular títulos. La ausencia de virus competentes en la replicación contaminantes se determinó por cinco infecciones consecutivas de célula BHK-21 sin tratamiento previo y determinación de títulos. Finalmente, se midieron los niveles de endotoxina para todas las muestras de partículas de replicón y se mostró que eran <0,5 unidad de endotoxina/ml.

Poliproteínas de NS

También pueden identificarse epítopes reconocidos por un receptor de linfocitos T sobre un linfocito T activado por el VHC por, por ejemplo, ensayo de liberación de ⁵¹Cr o por ensayo de linfoproliferación (véanse los ejemplos). En un ensayo de liberación de ⁵¹Cr, pueden construirse células diana que muestran el epítipo de interés clonando un polinucleótido que codifica el epítipo en un vector de expresión y transformando el vector de expresión en las células diana. Los linfocitos T CD8⁺ específicos del VHC 30 lisarán células diana que expresan, por ejemplo, un epítipo NS3, NS4, NS5a, NS5b, NS3NS4NS5a, o NS3NS4NS5aNS5b y no lisarán células que no expresan un epítipo tal. En un ensayo de linfoproliferación, los linfocitos T CD4⁺ activados por el VHC proliferarán cuando se cultivan con, por ejemplo, un péptido epitópico NS3, NS4, NS5a, NS5b, NS3NS4NS5a o NS3NS4NS5aNS5b, pero no en ausencia de un péptido epitópico del VHC.

Los polipéptidos E2, 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, o 10 o más de uno o más de los polipéptidos en la proteína

de fusión. Se producen múltiples cepas virales del VHC, y pueden usarse polipéptidos NS3, NS4, NS5a y NS5b de cualquiera de estas cepas en una proteína de fusión. Una proteína de fusión representativa para su uso se muestra en la Figura 7, cuya numeración de aminoácidos es con respecto a la poliproteína del VHC-1.

Alfavirus que expresa la poliproteína NS345

5 Vector de replicón y construcciones cooperadoras defectuosas

Se generó un ácido nucleico que codifica NS345 por amplificación por PCR de NS3-NS5, y a continuación el ADNc (aa 1027-3012) se insertó en los vectores de replicón VCR-Chim2.1 (J Virol. 2003, 77: 10394-403), produciendo construcciones VEE/SIN-NS345.

Producción de partículas de replicón de alfavirus

10 Se recogieron partículas de replicón que expresan VHC-NS345 como sobrenadantes de cultivo 24 h después de la electroporación, se clarificaron por filtración y se purificaron por cromatografía de intercambio catiónico. Se determinaron los títulos de partículas de replicón por tinción intracelular de NS3, NS4, NS5a y NS5b expresados, siguiendo infección durante la noche de células BHK-21 con diluciones sucesivas de partículas. Las células infectadas se permeabilizaron y se fijaron usando un kit Cytofix/Cytoperm (Pharmingen) y luego se tiñeron con anticuerpos para NS3, NS4, NS5a y NS5b del VHC y anti-IgG de ratón conjugada con Alexa fluor 488. Usando análisis de citometría de flujo se determinó el porcentaje de células positivas para NS3, NS4, NS5a y NS5b y se usó para calcular los títulos. La ausencia de virus competentes en la replicación contaminantes se determinó por cinco infecciones consecutivas de célula BHK-21 sin tratamiento previo y determinación de títulos. Finalmente, se midieron los niveles de endotoxina para todas las muestras de partículas de replicón y se mostró que eran <0,03 unidad de endotoxina/ml.

20 Se inyectaron im diez (10) ratones por grupo de ratones balb/c con los materiales indicados en la semana 0, 3 y 6. Para los experimentos de sensibilización-refuerzo, los ratones se sensibilizaron en la semana 0 y 3, y se reforzaron en la semana 6. Los presentes inventores usaron la partícula de replicación 5E6 de VEE/SIN-NS345 y 50 µg de poliproteína (NS345core) mezclada con 5 µg de ISCOMATRIZ (CSL) para inyección. Los ratones se sacrificaron en la semana 8 y se recogieron los bazo para detectar la respuesta de CD4 y CD8.

Tinción intracelular (ICS)

30 Se estimularon células del bazo (1E×6) con 10 µg/ml de los péptidos indicados durante 6 horas a 37 °C en presencia de anti-CD28 µg/ml (BD Biosciences, San Jose, CA) y Brefeldin A (BD Biosciences, San Jose, CA), y entonces se tiñeron con anticuerpos para CD8 (BD Biosciences, San Jose, CA). A continuación, las células se fijaron y se permeabilizaron para la tinción con IFN-γ (BD Biosciences, San Jose, CA). Después de la tinción, las células se analizaron por citometría de flujo. Los datos representan población positiva doble para IFN-γ y CD8 en linfocitos T CD8+.

Conjunto de NS3, NS4, NS5a o NS5b: péptidos que se solapan 20-meros que cubren la región de NS3, NS4, NS5a o NS5b:

35 Pép NS3-1: LVALGINAVAYYRGL (SEC ID N°: 6) (Simon, Cornell y col. 2003)
Pép NS3-2: TTVRLRAYMNTPLGLP (SEC ID N°: 7) (Simon, Cornell y col. 2003)
Pép NS3-3: SSPVPVQSF (SEC ID N°: 8) (Arribillaga, de Cerio y col. 2002; Arribillaga, Sarobe y col. 2005)
Pép NS5b: MSYSWTGALVTPCAAE (SEC ID N°: 9) (Uno-Furuta, Matsuo y col. 2003)
SOD-C100: proteína NS4 recombinante purificada de levadura
40 SOD-NS5: proteína NS5A/B recombinante purificada de levadura

Tinción intracelular para interferón-gamma (IFN-γ).

45 Se usó tinción intracelular para IFN-γ para identificar los linfocitos T CD8⁺ que secretan IFN-γ después de la estimulación *in vitro* con los péptidos reunidos E1 o E2, o péptidos E2 de CD4 o E2 de CD8 individuales, indicados más adelante. En particular, se estimularon 1 x 10⁶ células del bazo con 10 µg/ml de los péptidos E1 o E2 como se indica en la Figura 4, durante 6 horas a 37 °C en presencia de anti-CD28 (1 µg/ml) (BD Biosciences, San Jose, CA) y brefeldina A (BD Biosciences, San Jose, CA), y a continuación se tiñeron con anticuerpos para CD8 (BD Biosciences, San Jose, CA). A continuación, las células se fijaron y se permeabilizaron para tinción de IFN-γ (BD Biosciences, San Jose, CA). Después de la tinción, las células se analizaron por citometría de flujo.

Los datos representan población positiva doble para IFN-γ y CD8 en linfocitos T CD8+.

50 Conjunto de E1: péptidos que se solapan 20-meros que cubren la región E1.
Conjunto de E2: péptidos que se solapan 20-meros que cubren la región E2.
Pép E2 de CD4: QTHHTGGQAGHQAHSALTGLFSPGAKQN (SEC ID N°: 4) (Zucchelli y col., J Virol. (2000) 74:11598-11607).
Pép E2 de CD8: DATYSRCGSGPWITPRCLVD (SEC ID N°: 5) (Zucchelli y col., J. Virol. (2000) 74:11598-11607).
55

Pueden identificarse epítopes de proteínas NS y proteínas de fusión descritos en el presente documento por varios procedimientos. Por ejemplo, pueden aislarse polipéptidos NS3, NS4, NS5a, NS5b o proteínas de fusión que comprenden cualquier combinación de los anteriores, por ejemplo, por purificación por inmutafinidad usando un anticuerpo monoclonal para el polipéptido o proteína. La secuencia de proteínas aislada puede entonces cribarse preparando una serie de 20 péptidos cortos por escisión proteolítica de la proteína purificada, que juntos extienden la secuencia de proteínas entera. Empezando con, por ejemplo, polipéptidos 100-meros, cada polipéptido puede probarse para la presencia de epítopes reconocidos por un receptor de linfocitos T en un linfocito T activado por el VHC, fragmentos progresivamente más pequeños y que se solapan pueden entonces probarse a partir de un 100-mero identificado para mapear el epítopo de interés.

Ejemplo 1

Inmunización de ratones usando replicones E1E2 o E1E2P7

Se inmunizaron tres veces ratones Balb/c con PBS (sin tratamiento previo), replicones de alfavirus quiméricos de VEE/SIN (4E+6 o 4E+5 partículas de replicación de V/S-E1E2 y V/S-E1E2P7), proteína E1E2P7 más MF59 y proteína E1E2P7 más MF59 y CpG. Los ratones se inmunizaron en la semana 0 y 3, y 6, y luego se recogieron los bazo en la semana 8. Las células del bazo se estimularon con 10 ug/ml de conjuntos de péptidos del VHC (conjunto de E1 y conjunto de E2) o péptidos individuales (pép E2 de CD4 y pép E2 de CD8) y a continuación se tiñeron con anticuerpo para CD8 y IFN- γ para el análisis de citometría de flujo. Los datos presentan el porcentaje de la población positiva para IFN- γ en los linfocitos T CD8⁺ después de la inmunización. Como indicó la flecha roja, la sensibilización con V/S-E1E2 o V/S-E1E2P7 pudo estimular una respuesta de linfocitos T CD8⁺ muy buena para la producción de IFN- γ .

Los resultados se muestran en la Figura 3. Como puede apreciarse, los replicones VEE/SIN-E1E2 y VEE/SIN-E1E2P7 estimularon ambos una robusta respuesta de linfocitos T CD8⁺ a la proteína E1, pero no estimularon una respuesta de linfocitos T CD4⁺ específica del VHC (Figura 5a). Estos resultados demuestran que cuando un polinucleótido que codifica antígeno E1E2 sin P7 se administra con una partícula de alfavirus defectuosa sin ir precedida por un sensibilización con proteína E1E2P7/MF59, se potencia la respuesta de linfocitos T CD8⁺ al antígeno E1.

Ejemplo 2

Inmunización de ratones usando vacunas de proteína E1E2P7, seguido de refuerzos con partículas de replicón quiméricas E1E2 o E1E2P7

Los siguientes estudios se realizaron para determinar el efecto de inmunizaciones primarias de E1E2P7, seguido de refuerzos de replicón de E1E2, sobre respuestas de linfocitos T específicas del VHC. Se inyectaron intramuscularmente (im) ratones Balb/c (10 ratones por grupo) con los materiales indicados (Figura 4) en la semana 0, 3, y 6, y el suero se recogió en la semana 2, 5 y 8. Para el experimento de sensibilización-refuerzo, los ratones se sensibilizaron en la semana 0 y 3 con proteína E1E2P7 más MF59, y se reforzaron con las partículas de replicón quiméricas indicadas en la semana 6. Se usaron 4 x 10⁶ partículas de replicación de VEE/SIN-E1E2 y VEE/SIN-E1E2₈₀₉ (también llamado E1E2P7) y se emulsionaron 2 μ g de complejos de proteína E1E2 (E1E2₈₀₉ derivado de la expresión de la construcción de E1E2₈₀₉ descrita anteriormente en Materiales y procedimientos, "Producción de proteína E1E2₈₀₉") con MF59 para inyección. La producción de la proteína E1E2/MF59 se describe, por ejemplo, en el documento WO03/002065. Los ratones se sacrificaron en la semana 8 y los bazo se recogieron para detectar la respuesta de CD4 y CD8.

Los resultados se muestran en la Figura 4. Como puede apreciarse, VEE/SIN-E1E2 estimuló una robusta respuesta de linfocitos T CD8⁺, pero no estimuló una respuesta de linfocitos T CD4⁺ específicos del VHC (Figura 5a). Como se indica en la Figura 4, la sensibilización con E1E2₈₀₉/MF59 seguido de refuerzos con "VEE/SIN-E1E2" o "VEE/SIN-E1E2₈₀₉" (también denominado E1/E2 P7) estimuló respuestas de linfocitos T CD8 muy buenas para la producción de IFN- γ . La sensibilización definitiva de respuestas de linfocitos T CD8⁺ se obtuvo primero por la sensibilización con E1E2₈₀₉/MF59, seguido de refuerzo con VEE/SIN-E1E2. Estos resultados evidencian que la pauta de sensibilización-refuerzo anteriormente descrita puede ser beneficiosa en enfoques de vacunas profilácticas y terapéuticas contra VHC, ya que esta pauta produce un aumento en una respuesta de CD8⁺ específica de E2 del VHC.

Ejemplo 3

Inmunización de ratones usando vacunas de proteína E1E2P7 más CpG, seguido de refuerzos con partículas de replicón quiméricas E1E2 o E1E2P7

Se realizaron inmunizaciones como en el Ejemplo 2, pero en este ejemplo se añadió CpG a las composiciones inmunogénicas de sensibilización de proteína E1/E2. Todos los procedimientos fueron como antes y se diluyó proteína E1/E2 a 2 ug en 50 ul. Estos 50 ul de proteína se añadieron a 50 ul de MF59, a los que se añadió 1 ul de CpG (concentración 10 ug/ul). Tras la sensibilización con proteína como antes, se usaron alfavirus quiméricos que codifican E1/E2 (es decir, VEE/SIN-E1E2) para las inmunizaciones de refuerzo.

Los resultados de añadir CpG a la pauta de sensibilización de E1/E2 MF59 se muestran en la Figura 5a y 5b.

Se realizó la determinación de la respuesta al isotipo de IgG tras diversas estrategias de inmunización. Los resultados se muestran en la Figura 6. Refiriéndose ahora a la Figura 6, se muestra que la inmunización con E1E2/MF59 y E1E2/MF59/CpG indujo respuesta de Ab equivalente, pero diferentes relaciones de IgG1/2a. Por tanto, la pauta de sensibilización/refuerzo sin CpG indujo una respuesta de anticuerpo Ab que era superior a la del alfavirus que codifica E1/E2 sola, pero menor que la proteína sola.

La secuencia de CpG "7909" que se usó en estos experimentos estaba en la dirección 5' a 3' TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT (SEC ID N°: 10) (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 6.239.116.) CpG 7909 es un oligodesoxinucleótido de CpG de clase B 24-mero (Vaccine. 2004 Aug 13;22(23-24):3136-43.)

Ejemplo 5

También se examinaron títulos de anticuerpos para E1 y E2 tras la sensibilización-refuerzo con una pauta de E1/E2. El alfavirus solo que codifica E1/E2 o E1/E2P7 no provocó respuestas anti-E1 o E2 significativas, pero cuando se administra como parte de una sensibilización con proteína E1/E2 y refuerzo con alfavirus que codifica E1/E2, se produjeron anticuerpos para E1 y E2. Se compararon la respuesta del isotipo a las pautas de sensibilización-refuerzo para E1/E2 entre sensibilización con proteína con y sin CpG como parte de la etapa de sensibilización con proteína. Como se muestra en la Figura 6, cuando se administró CpG con sensibilización con proteína, la respuesta inmunitaria se pareció a una respuesta TH1 (elevada IgG2A) mientras que sin CpG se indujo una respuesta tipo TH2 (elevada IgG1).

Ejemplo 6

Neutralización de anticuerpos de unión: Títulos de anticuerpos para bloquear E1E2 a CD81

Se usó un ensayo citofluorimétrico cuantitativo para evaluar la unión de proteína de la envuelta de la hepatitis C a células humanas (Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 93, pp. 1759-1763, 1996; Science Vol. 282, pp. 938-941, 1998). Este ensayo ha demostrado una correlación positiva entre el título de anticuerpos protectores de chimpancé y la capacidad de estos anticuerpos para inhibir la unión de la proteína E2 recombinante a la célula diana. CD81 humano, un miembro de la superfamilia tetraspanina, se une a la proteína E2 recombinante y, lo más importante, el ARN del VHC asociado a la envoltura. El sitio de unión de E2 del VHC se mapeó con un bucle celular adicional importante de CD81 (EC2) que se conserva en tanto seres humanos como chimpancés. Se clonó una molécula de fusión recombinante que contiene el gran bucle celular adicional de CD81 humano fusionado con el extremo C de la tiorredoxina, se expresó y se purificó. Los datos del ensayo de los presentes inventores sugieren que los anticuerpos protectores del VHC derivados de chimpancés inmunizados con una vacuna de E1/E2 pueden inhibir tanto la proteína E1/E2 como E2 que se une a CD81. La proteína de receptor recombinante de CD81 se recubre sobre placas de 96 pocillos. Se usa anticuerpo monoclonal específico anti-E2 marcado con europio para la detección.

Se recubrió el receptor recombinante de CD81, 250 ng por ensayo, en tampón borato de sodio en placa Costar de unión a medio de 96 pocillos (Placa A) durante la noche. Diluir por separado el antígeno E1/E2 de CHO (5 ug/ml) y Moab 5E5/H7*Eu3+ (0,33 ug/ml) en reactivo de trabajo. En una placa de dilución (Placa B), se añadieron 55 ul de E1/E2 de CHO diluido junto con 55 ul de 5E5/H7-Eu3+ Moab en reactivo de trabajo a cada pocillo. Las placas se agitaron durante 15 minutos a 40 °C. Entonces, a cada pocillo de la placa B se añadió una dilución adicional doble de 110 ul de muestra de suero diluido en tampón PBS/BSA, se agitó durante 45 min a 40 °C. Por consiguiente, se transfirieron 200 ul del contenido de cada pocillo de la placa B a la placa recubierta con CD81 (Placa A). La placa se agitó durante 45 min a 40 °C. La placa se lavó cinco veces con tampón de lavado (1x PBS, 0,1% de Tween-20) y se añadieron 200 ul por pocillo de Enhancement Solution (Wallac) a cada pocillo y se agitaron durante 5 min a temperatura ambiente. La placa se colocó en el contador Wallac 1420 Multilabel y se leyó con el protocolo 'Europio'.

Se usó la inhibición al 50% multiplicada por el factor de dilución para estimar el título de CD81. Se usó el sangrado pre-inmunizado de un sujeto dado a la dilución del ensayo 1:10 como control negativo. Se estimó el porcentaje de inhibición para cada dato de sangrado post-inmunizado usando la siguiente fórmula:

% de inhibición es igual:

(Señal de control negativo – Señal de muestra) / Señal de control negativo x 100%.

Los resultados del anticuerpo neutralizante (es decir, títulos de anticuerpos para bloquear E1E2 a CD81) generados con diversas pautas de vacuna descritas en el presente documento se proporcionan en la Figura 12. Estos resultados demuestran que la poliproteína E1E2 más MF59 y opcionalmente CpG produjo los mayores títulos de anticuerpos neutralizantes, pero que la inmunización con una pauta de la sensibilización con E1/E2 MF59 más CpG, seguido de refuerzo con alfavirus defectuoso que codifica E1E2, también produjo una neutralización significativa de los anticuerpos de unión. La glicoproteína E1E2 más MF59 y sin CpG produjo los mayores títulos de anticuerpos neutralizantes (es decir, anti-CD81), pero la inmunización con una pauta de la sensibilización con E1/E2 MF59 más CpG seguido de refuerzo con alfavirus defectuoso que codifica E1E2 e inmunización con la glicoproteína E1E2 más MF59 y CpG también produjo neutralización significativa de los anticuerpos de unión (anti-CD81).

Ejemplo 7Inmunización de ratones usando la proteína E2NS345core121 más ISCOM

Se inmunizaron tres veces ratones Balb/c con PBS (sin tratamiento previo), replicones de alfavirus quiméricos de VEE/SIN que codifican proteína verde fluorescente o NS345 (5E+5 o 5E+6). Los ratones se inmunizaron en la semana 0 y 3, y 6, y luego se recogieron los bazo en la semana 8. Las células del bazo se estimularon con 10 ug/ml de conjuntos de péptidos del VHC y a continuación se tiñeron con anticuerpo para CD4 (Figura 8) o CD8 (Figura 9) e IFN- γ para la análisis de citometría de flujo. Los datos presentan el porcentaje de la población positiva para IFN- γ en los linfocitos T CD8⁺ o CD4⁺ después de la inmunización.

Los resultados se muestran en las Figuras 8 y 9. Como puede apreciarse, los replicones VEE/SIN-NS345 indujeron amplias respuestas de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ específicas del VHC, especialmente respuestas de linfocitos T CD8⁺.

Ejemplo 8Inmunización de ratones usando la sensibilización con vacuna de proteína NS345core/ISCOM, seguido de replicones quiméricos de alfavirus que codifican las regiones de la proteína NS345 como se ha descrito anteriormente para los refuerzos de partículas

Se construyó un ácido nucleico sintético del VHC-1a que codifica una proteína de fusión del VHC que consiste en, en una secuencia de amino a carboxi, la secuencia de aminoácidos 384-715 de E2, aminoácidos 1018 a 1026 de NS2, aminoácidos 1027 a 1657 de NS3, aminoácidos 1658 a 1972 de NS4, aminoácidos 1973 a 2990 de NS5 y aminoácidos 1 a 121 de core, en la que la serina en la posición 1165 de la secuencia de NS3 se sustituye con una alanina, el aminoácido 9 de la secuencia de core es una lisina y el aminoácido 11 de la secuencia de core es arginina. Esta secuencia se representa esquemáticamente en la Figura 7 con numeraciones de aminoácidos con respecto a la secuencia del VHC-1.

En una realización, las poliproteínas NS del VHC tienen una mutación en NS3 que inactiva la actividad de proteasa. Tales mutaciones permiten la expresión de una proteína de fusión, como se describe en el documento WO2004/005473. Adicionalmente, en una realización, la invención comprende poliproteínas NS del VHC, también se prefiere comprender además una o más secuencias de proteínas estructurales del VHC en la proteína de fusión.

La proteína de fusión codificada en ella se expresó en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. La proteína de fusión se clonó y se expresó en el plásmido pBS24.1 que contiene adicionalmente ADN del inserto de la proteína de fusión utilizando técnicas de clonación recombinantes estándar y en particular aquellos procedimientos descritos previamente en los documentos US2006-0088819A1, WO01/38360 y WO2004/005473. La proteína de fusión anterior se designa "e2ns3_mns5tr.c121" o "E2NS3*NS4NS5tcore121".

La poliproteína e2ns3_mns5tr.c121 se manipuló genéticamente para la expresión en *Saccharomyces cerevisiae* usando el vector de expresión en levadura pBS24.1 (patente de Estados Unidos 6.458.527, sección 4.2.4.2 y patente de Estados Unidos 5.635.374). Este vector contiene la secuencia 2 μ para la replicación autónoma en levadura y los genes de levadura *leu2d* y *URA3* como marcadores de selección. El terminador del factor α , el gen β -lactamasa y el origen de replicación de *ColE1*, requeridos para la replicación del plásmido en bacterias, también están presentes en este vector de expresión.

Se realizaron las siguientes etapas para construir el casete de expresión para la poliproteína e2ns3_mns5tr.c121:

Primero, para ensamblar la región del extremo N, un fragmento HindIII/AclI de 819 pb se aisló en gel del subclon nº 3 de pGEM7.d.E2 (HindIII/XhoI). El sitio de clonación HindIII de 5' va seguido de la secuencia ACAAACAAA, el iniciador ATG, y codones para el ectodominio de E2 de VHC-1, empezando en aa384 y continuando a un sitio de restricción AclI en aa650. El fragmento HindIII/AclI y un fragmento sintético con cinasa AclI/CeIII de 34 pb, correspondiente a aa651- aa662 del ectodominio de E2, se ligaron en un vector pT7Blue2 HindIII/CeIII que contenía un fragmento CeIII/BlnI de 228 pb que codificaba los aa662 a aa715 de la secuencia del ectodominio de E2 del VHC-1 E2, seguido de codones para los aa1018 - aa1039 de NS2 y NS3 del VHC-1. La mezcla de ligación se transformó en células competentes HB101 y se sembraron sobre placas de agar de Luria-ampicilina (100 μ g/ml). Después del análisis de ADN miniprep, identificación de los clones deseados y confirmación de secuencias, pT7Blue2.E2/ns2.3 #23 se digirió con HindIII y BlnI para aislar un fragmento de 1081 pb.

En segundo lugar, para introducir la mutación Ser₁₁₆₅-Ala en el dominio de NS3, un fragmento BlnI/ClaI de 703 pb se aisló en gel a partir de pSP72 HindIII/ClaI.ns3mut 1165 #15. Este fragmento de 703 pb codifica aa1040-aa1274 del genoma del VHC-1 en el que Ser₁₁₆₅ se mutó a Ala por mutagénesis dirigida al sitio.

Tercero, para facilitar la clonación del casete de expresión de e2.ns3_m-ns5core121, se ligaron el fragmento HindIII/BlnI de 1081 pb y el fragmento BlnI/ClaI de 703 pb en el vector pSP72 HindIII/ClaI. La mezcla de ligación se transformó como antes, y después del análisis de ADN el clon resultante se llamó pSP72.HindIII/ClaI e2.ns3_m #1

Cuarto, se purificó en gel un fragmento de HindIII/ClaI de 1784 pb de pSP72.HindIII/ClaI e2.ns3_m#1 descrito anteriormente. Se aisló un fragmento de 2787 pb de ClaI/NheI que codifica aa1274-aa2202 de NS3-NS5a de VHC-1 de un clon del VHC-1 de longitud completa, pUC.HCV3. Se aisló en gel un fragmento NheI/SalI de 2732 pb de un subclon pSP72.HindIII/SalI.ns5ab.2990.core121 #27. El fragmento NheI/SalI se corresponde con aa2203-2990 de NS5a y NS5b, seguido de aa1-121 del dominio core. Dentro de la secuencia de core del VHC-1, los aa consenso se incorporaron en la posición 9 (Lys) y 11 (Arg).

Finalmente, se ligó el fragmento del promotor de ADH2/GAPDH BamHI/HindIII de 1366 pb, descrito en la patente de los Estados Unidos 6.183.985, con el fragmento HindIII/ClaI de 1784 pb, el fragmento ClaI/NheI de 2787 pb y el fragmento NheI/SalI de 2732 pb en el vector de expresión en levadura BamHI/SalI pBS24.1, creando así el plásmido pd.e2ns3_mns5tr.c121.

Se transformó el genotipo de la cepa AD3* de *S. cerevisiae* (mat α ,leu2,trp1,ura3-52,prb-1122,pep4-3,prc1-407, cir⁺,trp⁺, :DM15[GAP/ADR] con el plásmido de expresión en levadura pd.e2ns3_mns5tr.c121, se transformaron células de levadura con el plásmido de expresión usando un protocolo de acetato de litio. Se cultivaron en línea transformantes Ura para las colonias individuales y se aplicaron en parches sobre placas de leu/-8% de glucosa para aumentar el número de copias de plásmido. Se cultivaron cultivos iniciadores de Leu durante 24 horas a 30 °C y a continuación se diluyeron 1:20 en medios YEPD (extracto de levadura, bactopectona, 2% de glucosa). Las células se cultivaron durante 48 horas a 30 °C y se recogieron después del agotamiento de la glucosa en el medio. Para probar la expresión del antígeno recombinante e2ns3_mns5tr.c121, se lisaron alícuotas de células con perlas de vidrio en tampón de lisis (Tris-Cl 10 mM a pH 7,5, EDTA 1 mM, DTT 10 mM). Los lisados se limpiaron por centrifugación a alta velocidad. Las alícuotas de las fracciones solubles e insolubles se hirvieron en tampón de muestra SDS a pH 12 + DTT 50 mM, se ejecutaron en geles de 4-20% de Tris-Glicina y se tiñeron con azul de Coomassie. La proteína recombinante se detectó en la fracción insoluble después de la lisis con perlas de vidrio.

La cepa AD3* de *S. cerevisiae* se deriva originalmente de la cepa BJ2168 descrita en la patente de Estados Unidos 6.458.527, sección 4.2.4.42.

La proteína de fusión E2NS3*NS4NS5tcore121 se expresó a partir de un plásmido de levadura usando el promotor ADH2/GAPDH. La proteína de fusión E2NS345tcore121 comprende los aminoácidos del extremo amino al carboxi 384-715(E2)-1018-1026 (NS2)-1027-1972(NS3NS4)-1973-2990 (NS5t)-1-121 (Core). La numeración de aminoácidos es con respecto a la poliproteína de longitud completa del VHC y NS3 y core se modifican como se indica anteriormente.

La proteína E2NS3*NS4NS5tcore121 producida como se ha descrito anteriormente se usó para producir la fusión del VHC-ISCOM del siguiente modo. Las formulaciones de fusión-ISCOM se prepararon mezclando la proteína de fusión con una ISCOMATRIX (ISCOM vacíos) previamente formada utilizando interacciones iónicas para maximizar la asociación entre la proteína de fusión y el adyuvante. Se prepara ISCOMATRIX esencialmente como se ha descrito en Coulter y col. (1998) Vaccine 16:1243. Procedimientos adicionales para la producción de poliproteínas del VHC más ISCOM. Las formulaciones de fusión-ISCOM también se denominan en el presente documento "IMX/poly".

Se realizaron los siguientes estudios para determinar el efecto de E2NS3*NS4NS5tcore121/ISCOMS con o sin inmunizaciones primarias con CpG, seguido de refuerzos con replicón de NS345 sobre las respuestas de linfocitos T específicas del VHC. Alternativamente, las inmunizaciones se invirtieron y el alfavirus que codificaba NS345 se administró antes de las formulaciones de fusión-ISCOM. Se inyectaron intramuscularmente (im) ratones Balb/c (10 ratones por grupo) con los materiales indicados (Figuras 10 y 11) en la semana 0, 3, y 6, y el suero se recogió en la semana 2, 5 y 8.

Ejemplo 9

Ab de neutralización cruzada que bloquean la infección por JFH1-HCVcc (VHC-2a) a células Huh7

Se analizaron los sueros inmunes de diversas pautas de sensibilización-refuerzo como se han descrito en el presente documento para la capacidad para neutralizar la infectividad de una cepa del VHC heteróloga en un ensayo de cultivo de tejido de VHC. Se generó una construcción genómica del VHC que codificaba la cepa de VHC del tipo 2a con un gen indicador de luciferasa provisto en una configuración monocistrónica con el genoma de JH1 y se llamó JFH1 2a HCVcc. En este ensayo, la replicación de la luciferasa de JFH1 se detecta observando la actividad de la luciferasa como unidades relativas de luz (URL), que a su vez se representa como el % de control (inyección con PBS) en la Figura 13. Se usó la construcción de luciferasa de JFH1 encapsidada en partículas infecciosas para infectar hepatocitos. Se dejó que la infección se produjera después de que partículas virales se trataran durante 1 hora a 37 °C y a continuación se usaron para infectar células Huh7. Las células infectadas se incubaron durante la tres días y a continuación se ensayaron para la actividad de luciferasa.

Los resultados de este ejemplo con ratones demuestran que la sensibilización-refuerzo con E1/E2 MF59/CpG seguido de alfavirus que codifica E1E2 de VHC-1a generó anticuerpos neutralizantes que neutralizaron la infección de un tipo 2a del VHC heterólogo, JFH1 2a HCVcc (Figura 13). Ejemplos previos demostraron que esta combinación de sensibilización-refuerzo particular también provocaba una respuesta significativa de linfocitos T.

La Figura 14 demuestra que los sueros inmunes de un chimpancé que se inmunizó con E1E2 MF59 y proteína CD81 purificada producen una reducción en la actividad de la luciferasa en las condiciones usadas para los sueros de ratones en este ejemplo. Este control demuestra la utilidad del ensayo para detectar la neutralización.

LISTADO DE SECUENCIAS

5	<110> Novartis Vaccines and Diagnostics, Inc.	
	<120> Activación de linfocitos T específicos del VHC	
10	<130> P051096EP	
	<140> EP 07709585.9	
	<141> 04-01-2007	
15	<150> 60/756.354	
	<151> 04-01-2006	
	<150> 60/799.840	
20	<151> 11-05-2006	
	<150> 60/840.082	
	<151> 25-08-2006	
25	<160> 11	
	<170> PatentIn versión 3.3	
	<210> 1	
	<211> 1914	
30	<212> ADN	
	<213> Virus 1 de la hepatitis C	
	<400> 1	
	tctttctcta tcttccttct ggccctgctc tcttgcttga ctgtgccgcg ttcggcctac	60
	caagtgcgca actccacggg gctctaccac gtcaccaatg attgccctaa ctcgagtatt	120
	gtgtacgagg cggccgatgc catcctgcac actccggggg gcgtcccttg cgttcgcgag	180
	ggcaacgcct cgagggtgttg ggtggcgatg acccctacgg tggccaccag ggatggcaaa	240
	ctccccgcga cgcagcttcg acgtcacatc gatctgcttg tcgggagcgc caccctctgt	300
	tcggccctct acgtggggga cctgtgoggg tctgtctttc ttgtggcca actgtttacc	360
	ttctctccca ggccgcaactg gacgacgcaa gggtgcaatt gctctatcta tccgggcca	420
	ataacgggtc accgcatggc atgggatatg atgatgaact ggtcccctac gacggcgttg	480
	gtaatggctc agctgctccg gatccacaa gccatcttgg acatgatcgc tgggtgctcac	540
	tggggagtcc tggcgggcat agcgtatttc tccatgggtg ggaactgggc gaaggtcctg	600
	gtagtgtctc tgcattttgc cggcgtcgac gcggaaacct acgtcaccgg gggaagtgcc	660
	ggccacactg tgtctggatt tgtagcctc ctgcaccag gcgccaagca gaacgtccag	720

ES 2 551 113 T3

```

ctgatcaaca ccaacggcag ttggcacctc aatagcacgg cctgaactg caatgatagc 780
ctcaacaccg gctggttggc agggcttttc taccaccaca agttcaactc ttcaggctgt 840
cctgagaggc tagccagctg ccgacccctt accgattttg accagggttg gggccctatc 900
agttatgcca acggaagcgg ccccgaccag cggccctact gctggcacta cccccaaaa 960
ccttgcggtg ttgtgcccgc gaagagtgtg tgtggtccgg tatattgctt cactcccagc 1020
cccggtgttg tgggaacgac cgacaggtcg ggccgcccga cctacagctg gggtgaaaat 1080
gatacggacg tcttcgtcct taacaatacc agggcaccgc tgggcaattg gttcggttgt 1140
acctggatga actcaactgg attcaccaaa gtgtgaggag cgctccttg tgcacatgga 1200
ggggcgggca acaacaccct gcactgcccc actgattgct tccgcaagca tccggacgcc 1260
acatactctc ggtgcggctc cggtccttg atcacacca ggtgcctggt cgactaccgc 1320
tataggcttt ggcattatcc ttgtaccatc aactacacta tatttaaaat caggatgtac 1380
gtgggagggg tcgagcacag gctggaagct gcctgcaact ggacgcgggg cgaacgttgc 1440
gatctggaag atagggacag gtccgagctc agcccgttac tgctgaccac tacacagtgg 1500
caggtcctcc cgtgttcctt cacaaccctg ccagccttgt ccaccggcct catccacctc 1560
caccagaaca ttgtggacgt gcagtacttg tacgggggtg ggtcaagcat cgcgtcctgg 1620
gccattaagt gggagtacgt cgtcctcctg ttccttctgc ttgcagacgc gcgcgtctgc 1680
tctgcttgt ggatgatgct actcatatcc caagcggaag cggctttgga gaacctcgta 1740
atacttaatg cagcatccct ggccgggacg cacggtcttg tatccttctt cgtgttcttc 1800
tgctttgcat ggtatctgaa gggtaagtgg gtgcccggag cggctctacac cttctacggg 1860
atgtggcctc tctcctgct cctgttggcg ttgccccagc gggcgtacgc gtaa 1914

```

<210> 2
 <211> 637
 <212> PRT
 <213> Virus 1 de la hepatitis C
 <400> 2

```

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

```

ES 2 551 113 T3

Ala Ser Ala Tyr Gln Val Arg Asn Ser Thr Gly Leu Tyr His Val Thr
20 25 30

Asn Asp Cys Pro Asn Ser Ser Ile Val Tyr Glu Ala Ala Asp Ala Ile
35 40 45

Leu His Thr Pro Gly Cys Val Pro Cys Val Arg Glu Gly Asn Ala Ser
50 55 60

Arg Cys Trp Val Ala Met Thr Pro Thr Val Ala Thr Arg Asp Gly Lys
65 70 75 80

Leu Pro Ala Thr Gln Leu Arg Arg His Ile Asp Leu Leu Val Gly Ser
85 90 95

Ala Thr Leu Cys Ser Ala Leu Tyr Val Gly Asp Leu Cys Gly Ser Val
100 105 110

Phe Leu Val Gly Gln Leu Phe Thr Phe Ser Pro Arg Arg His Trp Thr
115 120 125

Thr Gln Gly Cys Asn Cys Ser Ile Tyr Pro Gly His Ile Thr Gly His
130 135 140

Arg Met Ala Trp Asp Met Met Met Asn Trp Ser Pro Thr Thr Ala Leu
145 150 155 160

Val Met Ala Gln Leu Leu Arg Ile Pro Gln Ala Ile Leu Asp Met Ile
165 170 175

Ala Gly Ala His Trp Gly Val Leu Ala Gly Ile Ala Tyr Phe Ser Met
180 185 190

Val Gly Asn Trp Ala Lys Val Leu Val Val Leu Leu Leu Phe Ala Gly
195 200 205

Val Asp Ala Glu Thr His Val Thr Gly Gly Ser Ala Gly His Thr Val
210 215 220

Ser Gly Phe Val Ser Leu Leu Ala Pro Gly Ala Lys Gln Asn Val Gln

ES 2 551 113 T3

225		230		235		240
Leu Ile Asn Thr	Asn Gly Ser Trp His	Leu Asn Ser Thr	Ala Leu Asn			
	245	250	255			
Cys Asn Asp Ser	Leu Asn Thr Gly Trp	Leu Ala Gly Leu	Phe Tyr His			
	260	265	270			
His Lys Phe Asn	Ser Ser Gly Cys Pro	Glu Arg Leu Ala	Ser Cys Arg			
	275	280	285			
Pro Leu Thr Asp	Phe Asp Gln Gly Trp	Gly Pro Ile Ser	Tyr Ala Asn			
	290	295	300			
Gly Ser Gly Pro	Asp Gln Arg Pro Tyr	Cys Trp His Tyr	Pro Pro Lys			
305	310	315	320			
Pro Cys Gly Ile	Val Pro Ala Lys Ser	Val Cys Gly Pro	Val Tyr Cys			
	325	330	335			
Phe Thr Pro Ser	Pro Val Val Val Gly	Thr Thr Asp Arg	Ser Gly Ala			
	340	345	350			
Pro Thr Tyr Ser	Trp Gly Glu Asn Asp	Thr Asp Val Phe	Val Leu Asn			
	355	360	365			
Asn Thr Arg Pro	Pro Leu Gly Asn Trp	Phe Gly Cys Thr	Trp Met Asn			
	370	375	380			
Ser Thr Gly Phe	Thr Lys Val Cys Gly	Ala Pro Pro Cys	Val Ile Gly			
385	390	395	400			
Gly Ala Gly Asn	Asn Thr Leu His Cys	Pro Thr Asp Cys	Phe Arg Lys			
	405	410	415			
His Pro Asp Ala	Thr Tyr Ser Arg Cys	Gly Ser Gly Pro	Trp Ile Thr			
	420	425	430			
Pro Arg Cys Leu	Val Asp Tyr Pro Tyr	Arg Leu Trp His	Tyr Pro Cys			
	435	440	445			

ES 2 551 113 T3

Thr Ile Asn Tyr Thr Ile Phe Lys Ile Arg Met Tyr Val Gly Gly Val
450 455 460

Glu His Arg Leu Glu Ala Ala Cys Asn Trp Thr Arg Gly Glu Arg Cys
465 470 475 480

Asp Leu Glu Asp Arg Asp Arg Ser Glu Leu Ser Pro Leu Leu Leu Thr
485 490 495

Thr Thr Gln Trp Gln Val Leu Pro Cys Ser Phe Thr Thr Leu Pro Ala
500 505 510

Leu Ser Thr Gly Leu Ile His Leu His Gln Asn Ile Val Asp Val Gln
515 520 525

Tyr Leu Tyr Gly Val Gly Ser Ser Ile Ala Ser Trp Ala Ile Lys Trp
530 535 540

Glu Tyr Val Val Leu Leu Phe Leu Leu Leu Ala Asp Ala Arg Val Cys
545 550 555 560

Ser Cys Leu Trp Met Met Leu Leu Ile Ser Gln Ala Glu Ala Ala Leu
565 570 575

Glu Asn Leu Val Ile Leu Asn Ala Ala Ser Leu Ala Gly Thr His Gly
580 585 590

Leu Val Ser Phe Leu Val Phe Phe Cys Phe Ala Trp Tyr Leu Lys Gly
595 600 605

Lys Trp Val Pro Gly Ala Val Tyr Thr Phe Tyr Gly Met Trp Pro Leu
610 615 620

Leu Leu Leu Leu Leu Ala Leu Pro Gln Arg Ala Tyr Ala
625 630 635

<210> 3
<211> 21
<212> PRT
<213> Virus 1 de la hepatitis C

<400> 3

ES 2 551 113 T3

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

Gly Ala Lys Gln Asn
20

<210> 4
<211> 27
<212> PRT
<213> Virus de la hepatitis C
<400> 4

Gln Thr His Thr Thr Gly Gly Gln Ala Gly His Gln Ala His Ser Leu
1 5 10 15

Thr Gly Leu Phe Ser Pro Gly Ala Lys Gln Asn
20 25

<210> 5
<211> 20
<212> PRT
<213> Virus de la hepatitis C
<400> 5

Asp Ala Thr Tyr Ser Arg Cys Gly Ser Gly Pro Trp Ile Thr Pro Arg
1 5 10 15

Cys Leu Val Asp
20

<210> 6
<211> 15
<212> PRT
<213> Virus de la hepatitis C
<400> 6

Leu Val Ala Leu Gly Ile Asn Ala Val Ala Tyr Tyr Arg Gly Leu
1 5 10 15

<210> 7
<211> 15
<212> PRT
<213> Virus de la hepatitis C
<400> 7

Thr Thr Val Arg Leu Arg Ala Tyr Met Asn Thr Pro Gly Leu Pro
1 5 10 15

<210> 8
<211> 10
<212> PRT
<213> Virus de la hepatitis C

ES 2 551 113 T3

<400> 8

Ser Ser Pro Pro Val Val Pro Gln Ser Phe
1 5 10

5 <210> 9
<211> 16
<212> PRT
<213> Virus de la hepatitis C

10 <400> 9

Met Ser Tyr Ser Trp Thr Gly Ala Leu Val Thr Pro Cys Ala Ala Glu
1 5 10 15

15 <210> 10
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial

20 <220>
<223> oligodesoxinucleótido CpG 7909

<400> 10
tcgtcgtttt gtcgtttgt cgtt 24

25 <210> 11
<211> 1914
<212> ADN
<213> Virus 1 de la hepatitis C

30 <400> 11

ttacgcgtac gcccgctggg gcaacgccaa caggagcagg aggagaggcc acatcccgt 60

gaaggtgtag accgctcogg gcacccactt acccttcaga taccatgcaa agcagaagaa 120
 cacgaggaag gatacaagac cgtgcgtccc ggccagggat gctgcattaa gtattacgag 180
 gttctccaaa gcgcgttcog cttgggatat gagtagcato atccacaagc aggagcagac 240
 ggcgcgtct gcaagcagaa ggaacaggag gacgaogtac tcccacttaa tggcccagga 300
 cgcgatgctt gacccccccc cgtacaagta ctgcacgtcc acaatgttct ggtggagggtg 360
 gatgaggcog gtggacaagg ctggcagggt tgtgaaggaa cacgggagga cctgccactg 420
 tgtagtggtc agcagtaacg ggctgagctc ggacctgtcc ctatcttcca gatcgcaacg 480
 ttgcccccgc gtccagttgc aggcagcttc cagcctgtgc tcgacccctc ccaogtacat 540
 cctgatttta aatatagtgt agttgatggt acaaggataa tgccaaagcc tatacgggta 600
 gtgcaccagg cacotgggtg tgatocaggg accggagccg caccgagagt atgtggcgtc 660
 cggatgcttg cggaagcaat cagtggggca gtgcagggtg ttgttgcccg cccctccgat 720
 gacacaagga ggcgctccgc acactttggt gaatccagtt gagttcatcc aggtacaacc 780
 gaaccaattg cccagcgggtg gcctgggtatt gttaaggacg aagacgtccg tatcattttc 840
 accccagctg taggtggggc cgcccgacct gtccgtcggt cccaccacca cggggctggg 900
 agtgaagcaa tataccggac cacacacact cttcgcgggc acaataccgc aaggttttgg 960
 ggggtagtgc cagcagtagg ggcgctggtc ggggcogott cgttggtcat aactgatagg 1020
 gcccagccc tgggtcaaat cggtaagggg toggcagctg gctagcctct caggacagcc 1080
 tgaagagttg aacttggtg gatagaaaag ccttgccaac cagccggtgt tgaggctatc 1140
 attgcagttc agggccgtgc tattgaggtg ccaactgccg ttggtgttga tcagctggac 1200
 gttctgcttg gcgcctgggt cgaggaggct aacaaatcca gacacagtgt ggcgggcact 1260
 tccccgggtg acgtgggttt ccgcgtcgac gccggcaaat agcagcagca ctaccaggac 1320
 cttcgcccag tccccacca tggagaaata cgtatgccc gccaggactc cccagtgagc 1380
 accagcgatc atgtccaaga tggcttggtg gatccggagc agctgagcca ttaccaacgc 1440
 cgtcgtaggg gaccagttca tcatcatatc ccatgccatg cggtgaccgc ttatatggcc 1500
 gggatagata gagcaattgc aaccttgct cgtccagtg cgcctgggag agaaggtaaa 1560
 cagttggccg acaagaaaga cagaccgcga caggtcccc acgtagaggg ccgaacagag 1620
 ggtggcgtc ccgacaagca gatcgatgtg acgtcgaagc tgogtcgcgg ggagtttgcc 1680

ES 2 551 113 T3

```
atccctggtg gccacgtag gggtcacgc caccacacac ctgaggcgt tgcctcgcg 1740
aacgcaaggg acgcaccccg gagtgtgcag gatggcatcg gccgcctcgt acacaatact 1800
cgagttaggg caatcattgg tgacgtggta gagccccgtg gagttgcgca cttggtaggc 1860
cgaagcgggc acagtcaagc aagagagcag ggccagaagg aagatagaga aaga      1914
```

REIVINDICACIONES

1. Una primera composición que comprende un complejo de proteína E1E2 del virus de la hepatitis C (VHC) y un adyuvante MF59, para su uso en un procedimiento de estimulación de una respuesta inmunitaria en un sujeto vertebrado, comprendiendo dicho procedimiento:
 - 5 administrar al menos una vez la primera composición a dicho sujeto vertebrado; y posteriormente administrar al menos una vez una segunda composición que comprende un vector de alfavirus que comprende un ácido nucleico que codifica un complejo de E1E2 del VHC a dicho sujeto vertebrado, por la cual el ácido nucleico que codifica un complejo de E1E2 del VHC se expresa en una o más células del sujeto y se produce el complejo de proteína E1E2.
- 10 2. La composición para uso de la reivindicación 1, en la que el vector de alfavirus es una partícula de alfavirus defectuosa.
3. La composición de las reivindicaciones 1 o 2, en la que tanto bien:
 - (i) el sujeto está infectado con el VHC antes de la administración de una o más de dicha primera y segunda composiciones; o bien
 - 15 (ii) el sujeto no está infectado con el VHC antes de la administración de una o más de dicha primera y segunda composiciones.
4. La composición para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 3, que comprende una proteína o péptido del VHC que comprende un epítipo del VHC, en la que la respuesta inmunitaria comprende una respuesta de linfocitos T o una respuesta de anticuerpos.
- 20 5. La composición para uso de la reivindicación 4, en la que la respuesta de linfocitos T comprende una respuesta de linfocitos T CD8 o una respuesta de linfocitos T CD4.
6. La composición para uso de la reivindicación 5, en la que la respuesta de anticuerpos comprende una respuesta de anticuerpo neutralizante que neutraliza la infectividad del VHC.
7. La composición para uso de la reivindicación 6, en la que la respuesta del anticuerpo neutralizante neutraliza la infectividad de más de una cepa del VHC o tipo, por ejemplo, VHC1a y VHC2a.
- 25 8. La composición para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 3, que comprende un complejo de proteína E1E2 del VHC, en la que los linfocitos T comprenden linfocitos T CD8+.
9. La composición para uso de la reivindicación 8, en la que los linfocitos T CD8+ expresan interferón- γ .
10. La composición para uso de la reivindicación 1, en la que la respuesta inmunitaria comprende una respuesta inmunitaria celular, o una respuesta inmunitaria humoral.
- 30 11. La composición para uso de la reivindicación 10, en la que la respuesta inmunitaria humoral incluye:
 - (i) anticuerpos que neutralizan la unión de la proteína E2 del VHC a la proteína CD81; o
 - (ii) anticuerpos que neutralizan más de un tipo de VHC.
12. La composición para uso de la reivindicación 11 (ii), en la que los anticuerpos neutralizan la infectividad de al menos el tipo 1a del VHC y tipo 2a del VHC.
- 35 13. La composición que comprende un complejo de E1E2 del VHC para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 8, 9, 10, 11 o 12, en la que la primera composición comprende además un oligonucleótido de CpG, por ejemplo, en una dirección 5' - 3' 5TCGTCGTTTGTCTGTTTGTCTGTT-3 (SEC ID N°: 10).
14. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 8 o 9, en la que el complejo de E1E2 en la composición de proteína se produce por la expresión de un polinucleótido que codifica:
 - (i) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80% de identidad de secuencias con la secuencia de aminoácidos representada en las posiciones 192-809 de las Figuras 2A-2C; o
 - (ii) la secuencia de aminoácidos representada en las posiciones 192-809 de las Figuras 2A-2C; o
 - (iii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80% de identidad de secuencias con la secuencia de aminoácidos representada en las posiciones 192-746 de las Figuras 2A-2C; o
 - 45 (iv) la secuencia de aminoácidos representada en las posiciones 192-746 de las Figuras 2A-2C.
15. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 8, 9 o 14, en la que el vector viral que comprende un ácido nucleico que codifica un complejo de E1E2 del VHC codifica:
 - (i) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80% de identidad de secuencias con la secuencia de

aminoácidos representada en las posiciones 192-809 de las Figuras 2A-2C; o

(ii) la secuencia de aminoácidos representada en las posiciones 192-809 de las Figuras 2A-2C.

5 16. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 8, 9, 14 o 15, en la que el vector viral que comprende un ácido nucleico que codifica un complejo de E1E2 del VHC es una partícula de replicón de alfavirus defectuosa quimérica.

17. La composición para uso de la reivindicación 16, en la que el complejo de proteína E1E2 del VHC en la primera composición se produce por la expresión de un polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos representada en las posiciones 192-809 de las Figuras 2A-2C.

10 18. La composición para su uso de la reivindicación 16, en la que el vector viral que comprende un ácido nucleico que codifica un complejo de E1E2 del VHC codifica:

(i) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80% de identidad de secuencias con la secuencia de aminoácidos representada en las posiciones 192-746 de las Figuras 2A-2C; o

(ii) una secuencia de aminoácidos representada en las posiciones 192-746 de las Figuras 2A-2C.

15 19. La composición para uso de la reivindicación 17, en la que el nucleico que codifica un complejo de E1E2 del VHC codifica:

(i) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80% de identidad de secuencias, por ejemplo, el 100% de identidad de secuencias, con la secuencia de aminoácidos representada en las posiciones 192-809 de las Figuras 2A-2C; o

(ii) una secuencia de aminoácidos representada en las posiciones 192-809 de las Figuras 2A - 2C.

20 20. Uso de una primera composición que comprende un complejo de proteína E1E2 del VHC y un adyuvante MF59, y una segunda composición que comprende un vector de alfavirus que comprende un ácido nucleico que codifica un complejo de E1E2 del VHC, por lo que el ácido nucleico que codifica un complejo de E1E2 del VHC se expresa en una o más células de un sujeto y se produce el complejo de proteína E1E2, en la fabricación de:

25 (i) un medicamento para activar linfocitos T de un sujeto vertebrado, en el que dichos linfocitos T reconocen un epítoto de un polipéptido del virus de la hepatitis C (VHC); o

(ii) un medicamento para estimular una respuesta inmunitaria en un sujeto vertebrado.

30 21. Un kit para inducir o generar una respuesta inmunitaria en un sujeto, comprendiendo dicho kit (i) una primera composición que comprende una proteína E1E2 del VHC y un adyuvante MF59; y (ii) una segunda composición que comprende un vector de alfavirus que codifica al menos una porción de la proteína E1E2 del VHC de la primera composición.

Genoma del VHC y proteínas recombinantes

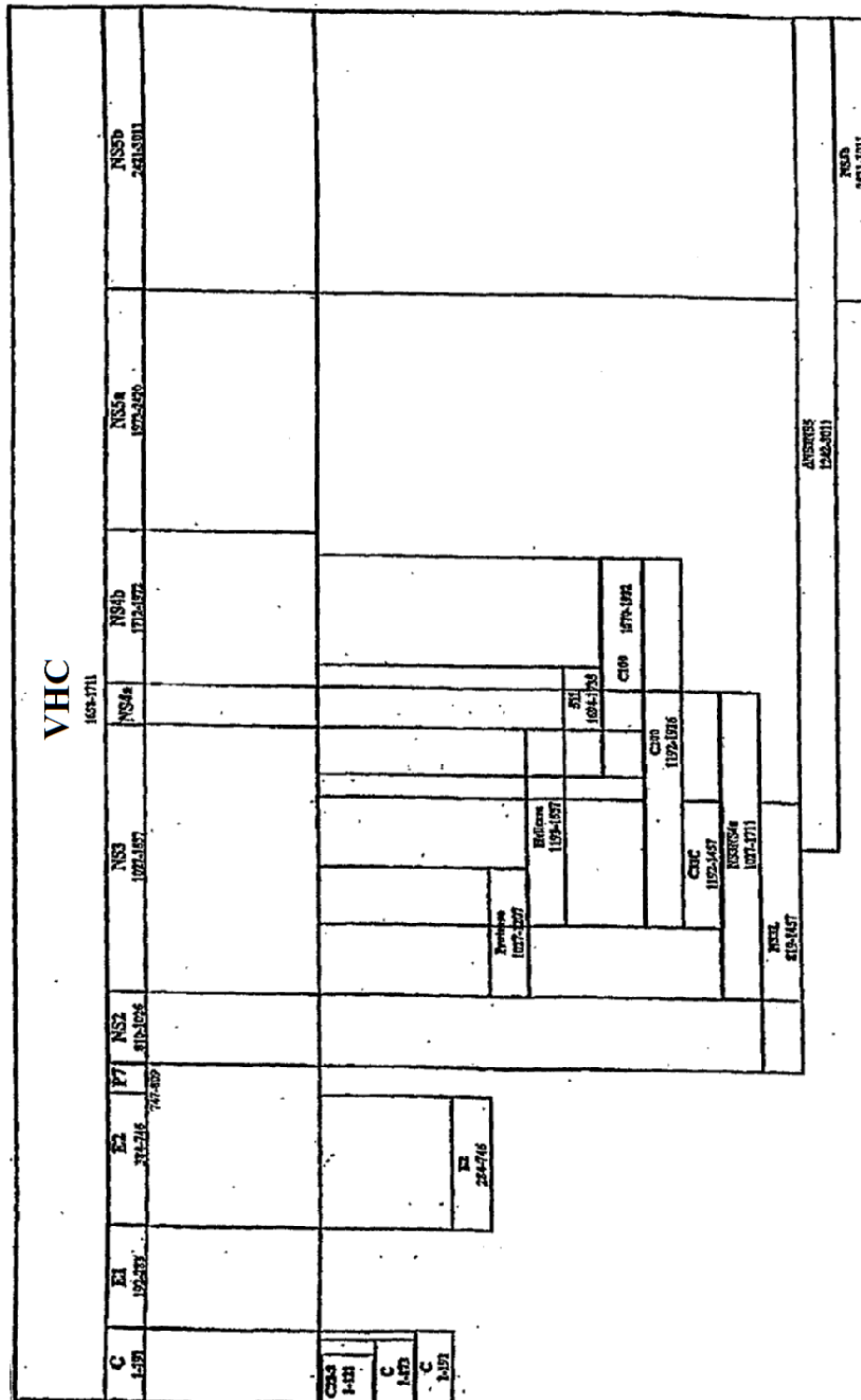


FIG. 1

E1 MADURA

SerPheSerIlePheLeuLeuAlaLeuLeuSerCysLeuThrValProAlaSerAlaTyr 192
TCTTCTCTATCTTCTTCTGSCCCTGCTCTCTTGCTTGACTGTGCCCCGCTTCGGCCTAC
AGAAAGAGATAGAAGGAAGACCGGGACGAGAGAACGAACTGACACGGGCGAAGCCGCATG

GlnValArgAsnSerThrGlyLeuTyrHisValThrAsnAspCysProAsnSerSerIle 212
CAAGTGCGCAACTCCACGGGGCTCTACACGTCACCAATGATTGCCCTAACTCGAGTATT
GTTACACGCGTTGAGGTGCCCCGAGATGGTGCACTGGTTACTAACGGGATTGAGCTCATAA

ValTyrGluAlaAlaAspAlaIleLeuHisThrProGlyCysValProCysValArgGlu 232
GTGTACGAGGCGGCGGATGCCATCCTGCACACTCCGGGGTGCGTCCCTTGCGTTTCGCGAG
CACATGCTCCGCGCGCTACGGTAGGAAGTGTGAGGCCCCACGCAGGGAACGCAAGCGCTC

GlyAsnAlaSerArgCysTrpValAlaMetThrProThrValAlaThrArgAspGlyLys 252
GGCAACCGCTCGAGGTGTTGGGTGGCGATGACCCCTACGGTGGCCACCAGGGATGGCAA
CCGTTGCGGAGCTCCACAACCCACCGCTACTGGGGATGCCACCGGTGGTCCCTACCGTTT

LeuProAlaThrGlnLeuArgArgHisIleAspLeuLeuValGlySerAlaThrLeuCys 272
CTCCCCGCGACGCGAGCTTCGACGTCACATCGATCTGCTTGTGCGGAGCGCCACCCCTCTGT
GAGGGGCGCTGCGTGAAGCTGCAGTGTAGCTAGACGAACAGCCCTCGCGGTGGGAGACA

SerAlaLeuTyrValGlyAspLeuCysGlySerValPheLeuValGlyGlnLeuPheThr 292
TCGGCCCTCTACGTGGGGACCTGTGCGGTCTGTCTTCTTGTGCGGCCAACTGTTTACC
AGCCGGGAGATGCACCCCTGGACACGCCAGACAGAAAGAACAGCCGGTTGACAAATGG

PheSerProArgArgHisTrpThrThrGlnGlyCysAsnCysSerIleTyrProGlyHis 312
TTCTCTCCAGGCGCCACTGGACGACGCAAGGTTGCAATTGCTCTATCTATCCCGGCCAT
AAGAGAGGGTCCGCGGTGACCTGCTGCGTTCCAACGTTAACGAGATAGATAGGGCCGGTA

IleThrGlyHisArgMetAlaTrpAspMetMetMetAsnTrpSerProThrThrAlaLeu 332
ATAACGGGTACCCGATGGCATGGGATATGATGATGAAGTGGTCCCTACGACGGCGTTG
TATTGCCAGTGCGGTACCGTACCCTATACTACTACTTGACCAGGGGATGCTGCCGCAAC

ValMetAlaGlnLeuLeuArgIleProGlnAlaIleLeuAspMetIleAlaGlyAlaHis 352
GTAATGGCTCAGCTGCTCCGGATCCCAAGCCATCTTGGACATGATCGCTGGTGTCTCAC
CATTACCGAGTCGACGAGGCCTAGGGTGTTCGGTAGAACCTGTACTAGCGACCACGAGTG

TrpGlyValLeuAlaGlyIleAlaTyrPheSerMetValGlyAsnTrpAlaLysValLeu 372
TGGGGAGTCCTGGCGGGCATAGCGTATTTCTCCATGGTGGGGAAGTGGGCGAAGGTCCTG
ACCCCTCAGGACCGCCCGTATCGCATAAAGAGGTACCACCCCTTGACCCGCTTCAGGAC

E2

ValValLeuLeuLeuPheAlaGlyValAspAlaGluThrHisValThrGlyGlySerAla 392
GTAGTGCTGCTGCTATTTGCCGGCGTCGACGCGGAAACCCACGTCACCGGGGGAAGTGCC
CATCACGACGACGATAAACGGCCGCGAGCTGCGCCTTTGGGTGCAGTGGCCCCCTTCACGG

GlyHisThrValSerGlyPheValSerLeuLeuAlaProGlyAlaLysGlnAsnValGln 412
GGCCACACTGTGTCTGGATTTGTTAGCCTCCTCGCACCGAGGCGCCAAGCAGAACGTCCAG
CCGGTGTGACACAGACCTAAACAATCGGAGGAGCGTGGTCCGCGGTTTCGTCTTGAGGTC

FIGURA 2A

LeuIleAsnThrAsnGlySerTrpHisLeuAsnSerThrAlaLeuAsnCysAsnAspSer 432
 CTGATCAACACCAACGGCAGTTGGCACCTCAATAGCACGGCCCTGAACTGCAATGATAGC
 GACTAGTTGTGGTTGCCGTCAACCGTGGAGTTATCGTGCCGGGACTTGACGTTACTATCG

LeuAsnThrGlyTrpLeuAlaGlyLeuPheTyrHisHisLysPheAsnSerSerGlyCys 452
 CTCAACACCGGCTGGTTGGCAGGGCTTTTCTATCACCACAAGTTCAACTCTTCAGGCTGT
 GAGTTGTGGCCGACCAACCGTCCCGAAAAGATAGTGGTGTTCAGTTGAGAAGTCCGACA

ProGluArgLeuAlaSerCysArgProLeuThrAspPheAspGlnGlyTrpGlyProIle 472
 CCTGAGAGGCTAGCCAGCTGCCGACCCCTTACCGATTTTGACCAGGGCTGGGGCCCTATC
 GGACTCTCCGATCGGTTCGACGGCTGGGGAATGGCTAAAACTGGTCCCGACCCGGGATAG

SerTyrAlaAsnGlySerGlyProAspGlnArgProTyrCysTrpHisTyrProProLys 492
 AGTTATGCCAACGGAAGCGGCCCCGACCAGCGCCCCCTACTGCTGGCACTACCCCCAAAA
 TCAATACGGTTGCCCTTCGCCGGGGCTGGTCCGGGGATGACGACCGTGATGGGGGGTTTT

ProCysGlyIleValProAlaLysSerValCysGlyProValTyrCysPheThrProSer 512
 CCTTGCGGTATTGTGCCCGCAAGAGTGTGTGTGGTCCGGTATATTGCTTCACTCCCAGC
 GGAACGCCATAACACGGGCGCTTCTCACACACACCAGGCCATATAACGAAGTGAGGGTCG

ProValValValGlyThrThrAspArgSerGlyAlaProThrTyrSerTrpGlyGluAsn 532
 CCCGTGGTGGTGGGAACGACCGACAGGTGGGGCGCGCCACCTACAGCTGGGGTGAAAAT
 GGGCACCACCACCCTTGCTGGCTGTCCAGCCCGCGGGGTGGATGTGACCCCACTTTTA

AspThrAspValPheValLeuAsnAsnThrArgProProLeuGlyAsnTrpPheGlyCys 552
 GATACGGACGTCTTCGTCTTAACAATACCAGGCCACCGCTGGGCAATTGGTTCCGTTGT
 CTATGCCTGCAGAAGCAGGAATTGTTATGGTCCGGTGGCGACCCGTTAACCAAGCCAACA

ThrTrpMetAsnSerThrGlyPheThrLysValCysGlyAlaProProCysValIleGly 572
 ACCTGGATGAACCTCAACTGGATTCAACAAAGTGTGCGGAGCGCCTCCTTGTGTATCGGA
 TGGACCTACTTGAGTTGACCTAAGTGGTTTCACACGCCTCGCGGAGGAACACAGTAGCCT

GlyAlaGlyAsnAsnThrLeuHisCysProThrAspCysPheArgLysHisProAspAla 592
 GGGGCGGGCAACAACACCCCTGCACTGCCCCACTGATTGCTTCCGCAAGCATCCGGACGCC
 CCCCGCCCGTTGTTGTGGGACGTGACGGGGTGACTAACGAAGGCGTTTCGTAGGCCTGCGG

ThrTyrSerArgCysGlySerGlyProTrpIleThrProArgCysLeuValAspTyrPro 612
 ACATACTCTCGGTGCGGCTCCGGTCCCTGGATCACACCCAGGTGCCTGGTCGACTACCCG
 TGTATGAGAGCCACGCCGAGGCCAGGACCTAGTGTGGTCCACGGACCAGCTGATGGC

TyrArgLeuTrpHisTyrProCysThrIleAsnTyrThrIlePheLysIleArgMetTyr 632
 TATAGGCTTTGGCATTATCCTTGTACCATCAACTACACTATATTTAAATCAGGATGTAC
 ATATCCGAAACCGTAATAGGAACATGGTAGTTGATGTGATATAAATTTAGTCCTACATG

ValGlyGlyValGluHisArgLeuGluAlaAlaCysAsnTrpThrArgGlyGluArgCys 652
 GTGGGAGGGGTGAGCACAGGCTGGAAGCTGCCTGCAACTGGACGCGGGGCGAACGTTGC
 CACCCTCCCCAGCTCGTGTCCGACCTTCGACGGACGTTGACCTGCGCCCCGCTTGCAACG

AspLeuGluAspArgAspArgSerGluLeuSerProLeuLeuLeuThrThrThrGlnTrp 672
 GATCTGGAAGATAGGGACAGGTCCGAGCTCAGCCCGTTACTGCTGACCACTACACAGTGG
 CTAGACCTTCTATCCCTGTCCAGGCTCGAGTCGGGCAATGACGACTGGTGATGTGTACC

FIGURA 2B

GlnValLeuProCysSerPheThrThrLeuProAlaLeuSerThrGlyLeuIleHisLeu 692
 CAGGTCCTCCCGTGTTCTTCACAACCCCTGCCAGCCTTGTCCACCCGCCCTCATCCACCTC
 GTCCAGGAGGGCACAAGGAAGTGTTGGGACGGTCGGAACAGGTGGCCGGAGTAGGTGGAG

 HisGlnAsnIleValAspValGlnTyrLeuTyrGlyValGlySerSerIleAlaSerTrp 712
 CACCAGAACATTGTGGACGTGCAGTACTTGTACGGGGTGGGGTCAAGCATCGCGTCCTGG
 GTGGTCTTGTAACACCTGCACGTTCATGAACATGCCCCACCCCAGTTCGTAGCGCAGGACC

 AlaIleLysTrpGluTyrValValLeuLeuPheLeuLeuLeuAlaAspAlaArgValCys 732
 GCCATTAAGTGGGAGTACGTCTCTCCTGTTCCCTTCTGCTTGACAGACGCGCGCGTCTGC
 CGGTAATTCACCCCTCATGCAGCAGGAGGACAAGGAAGACGAACGTCTGCGCGCGCAGACG

 P7
 SerCysLeuTrpMetMetLeuLeuIleSerGlnAlaGluAlaAlaLeuGluAsnLeuVal 752
 TCCTGCTTGTTGGATGATGCTACTCATATCCCAAGCGGAAGCGGCTTTGGAGAACCTCGTA
 AGGACGAACACCTACTACGATGAGTATAGGGTTTCGCTTCGCCGAAACCTCTTGGAGCAT

 IleLeuAsnAlaAlaSerLeuAlaGlyThrHisGlyLeuValSerPheLeuValPhePhe 772
 ATACTTAATGCAGCATCCCTGGCCGGGACGCACGGTCTTGTATCCTTCCTCGTGTTCCTC
 TATGAATTACGTCGTAGGGACCGGCCCTGCGTGCCAGAACATAGGAAGGAGCACAGAAG

 CysPheAlaTrpTyrLeuLysGlyLysTrpValProGlyAlaValTyrThrPheTyrGly 792
 TGCTTTGCATGGTATCTGAAGGGTAAGTGGGTGCCCCGGAGCGGTCTACACCTTCTACGGG
 ACGAAACGTACCATAGACTTCCCATTACCCACGGGCCTCGCCAGATGTGGAAGATGCCC

 MetTrpProLeuLeuLeuLeuLeuLeuAlaLeuProGlnArgAlaTyrAlaOC 809
 ATGTGGCCTCTCCTCCTGCTCCTGTTGGCGTTGCCCCAGCGGGCGTACGCGTAA
 TACACCGGAGAGGAGGACGAGGACAACCGCAACGGGGTCGCCCGCATGCGCATT

FIGURA 2C

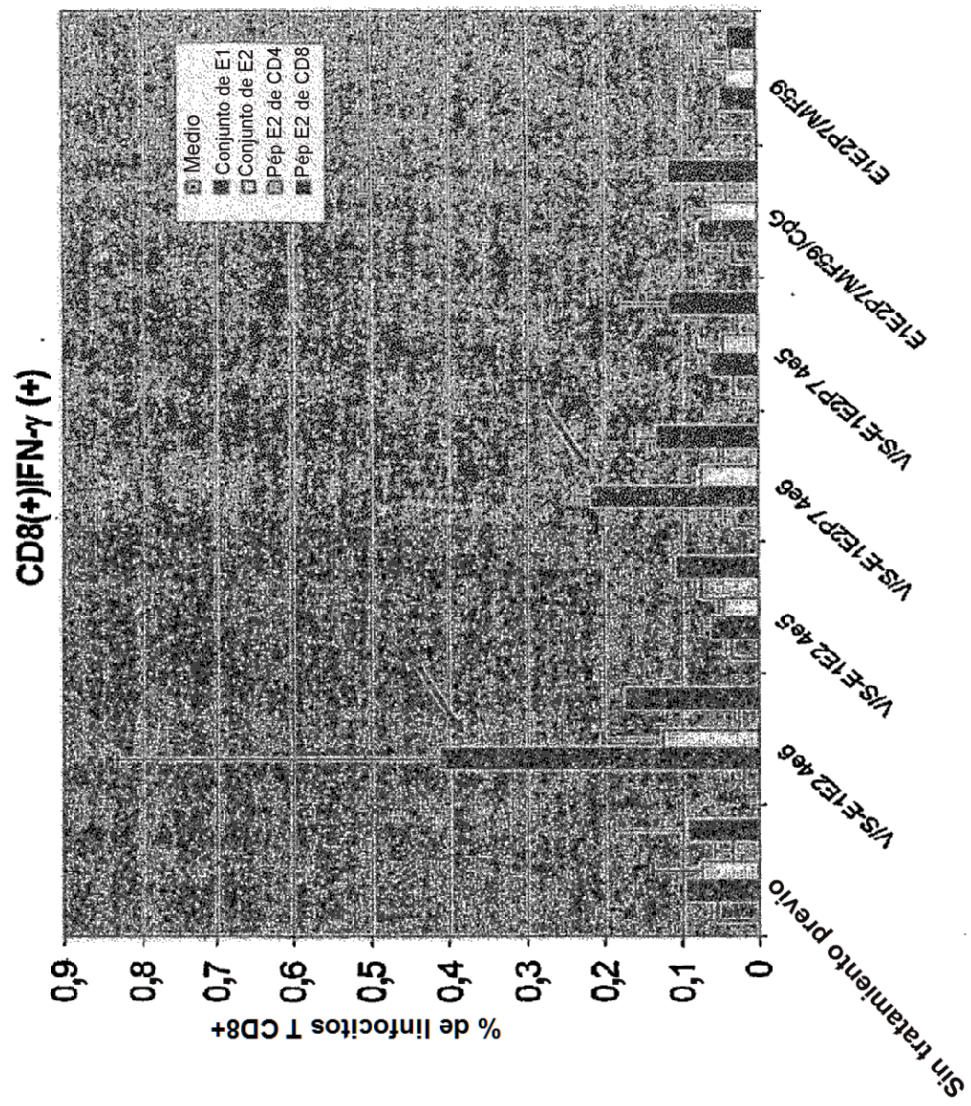


Figura 3

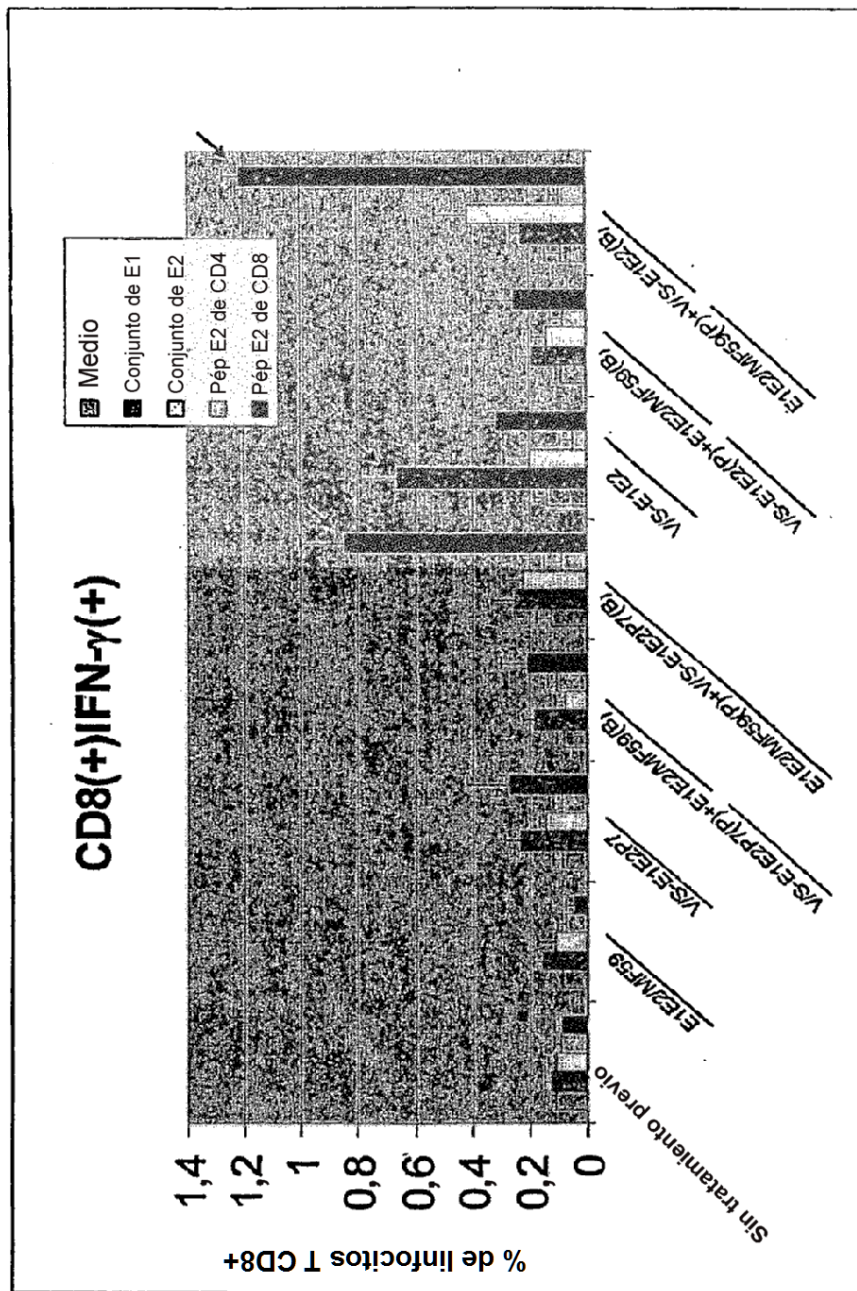


Figura 4

Figura 5a

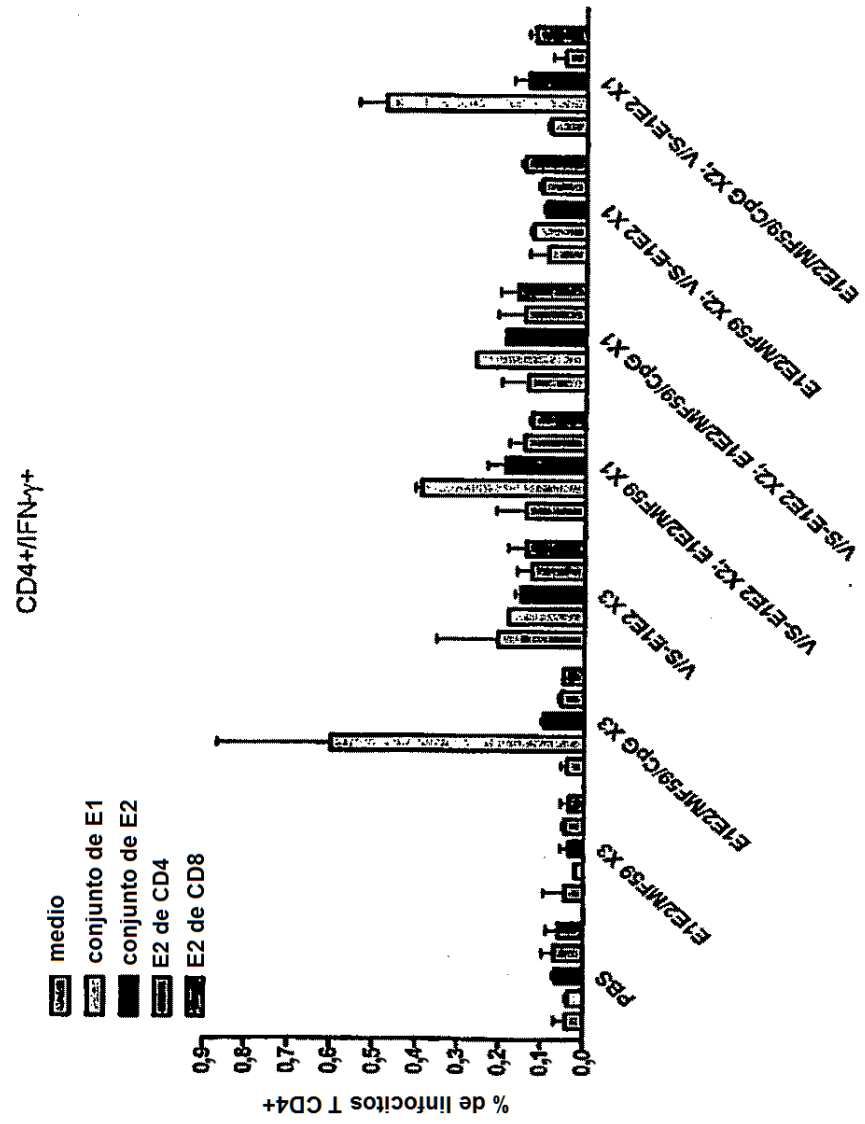
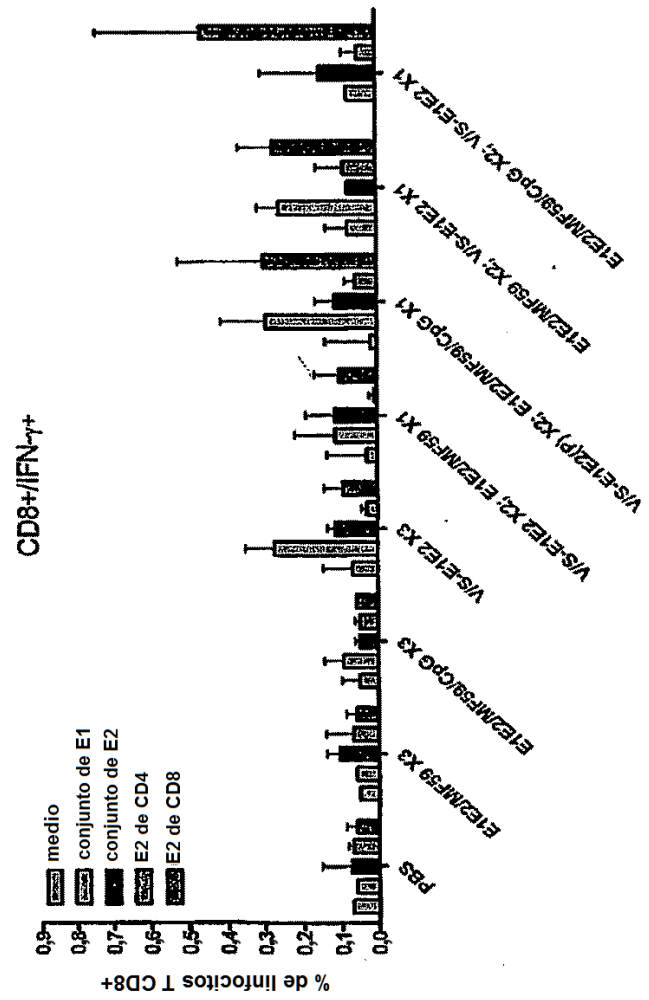


Figura 5b



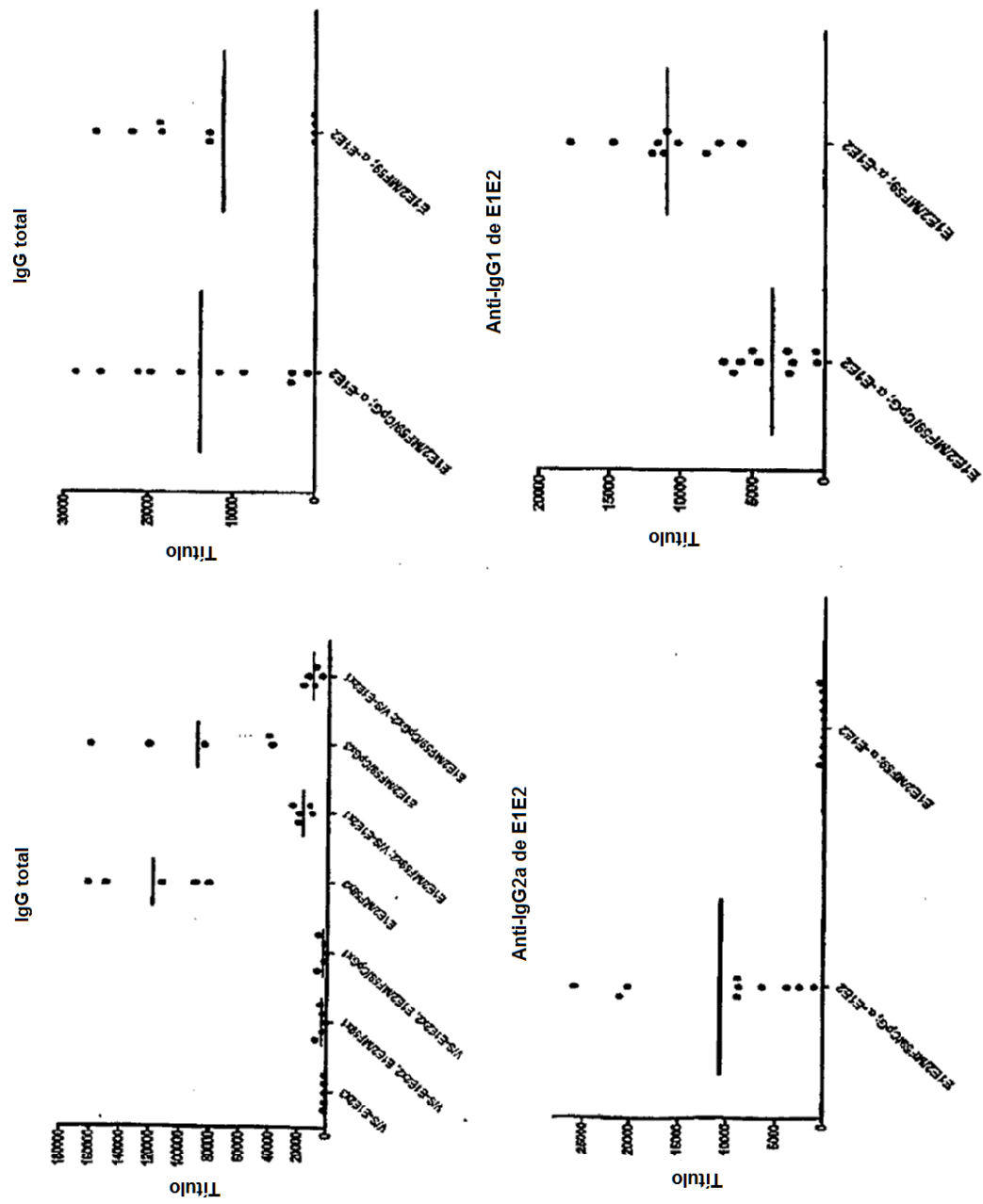


FIGURA 6.

Figura 7

VHC



e2.ns3m.ns5tr +/- core 121



Figura 8
CD4+//IFN- γ +

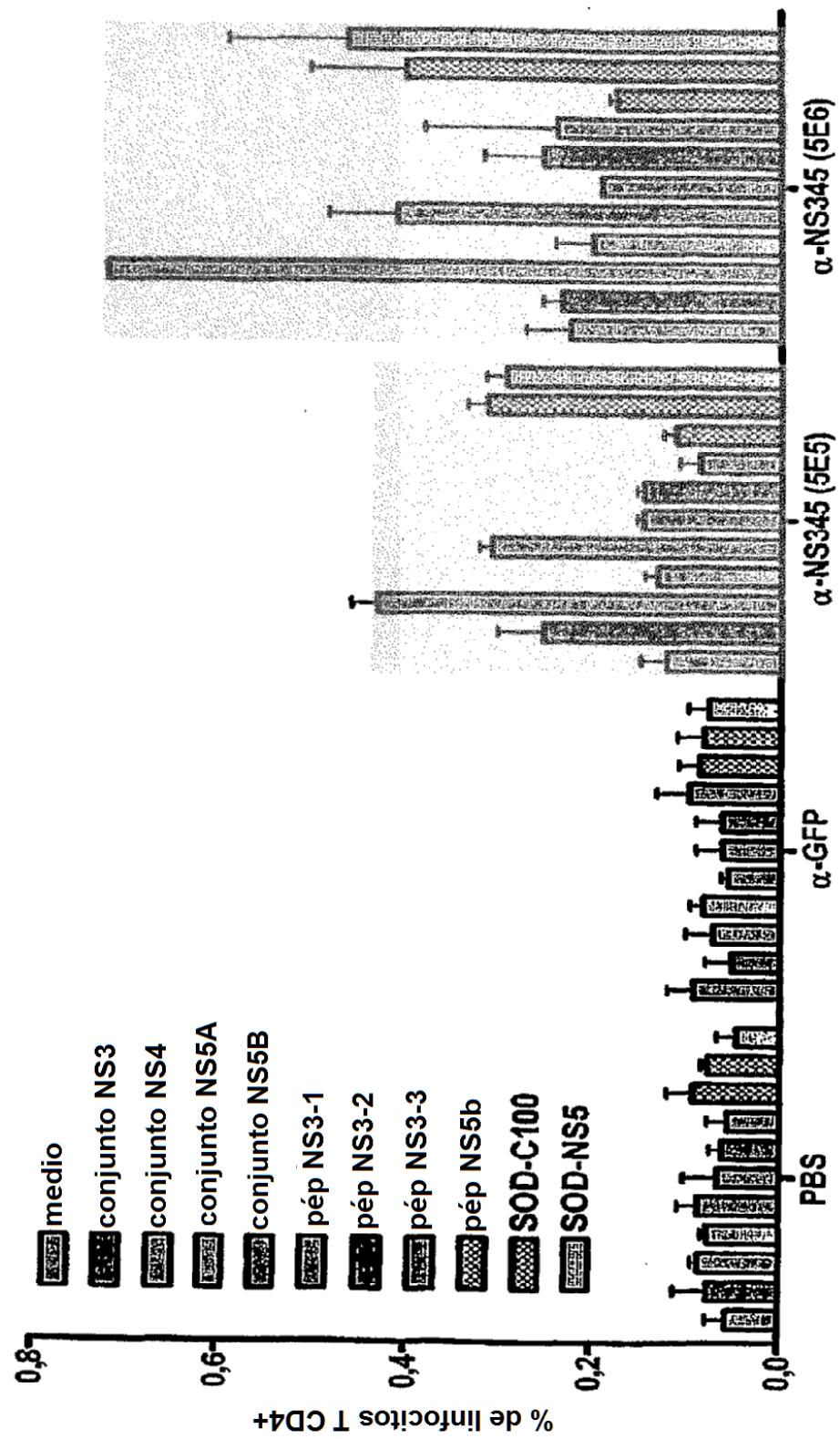


Figura 9

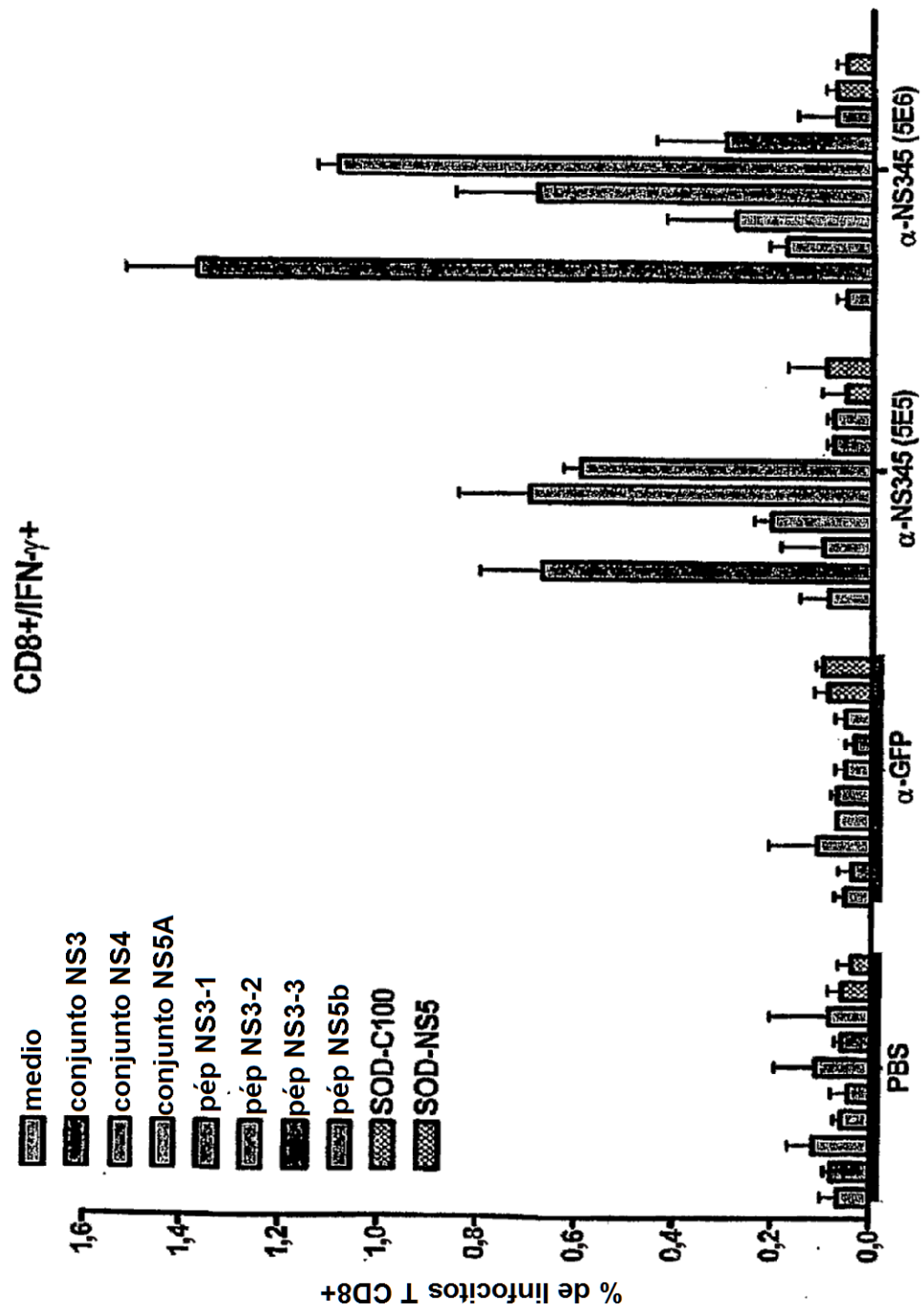


FIGURA 10

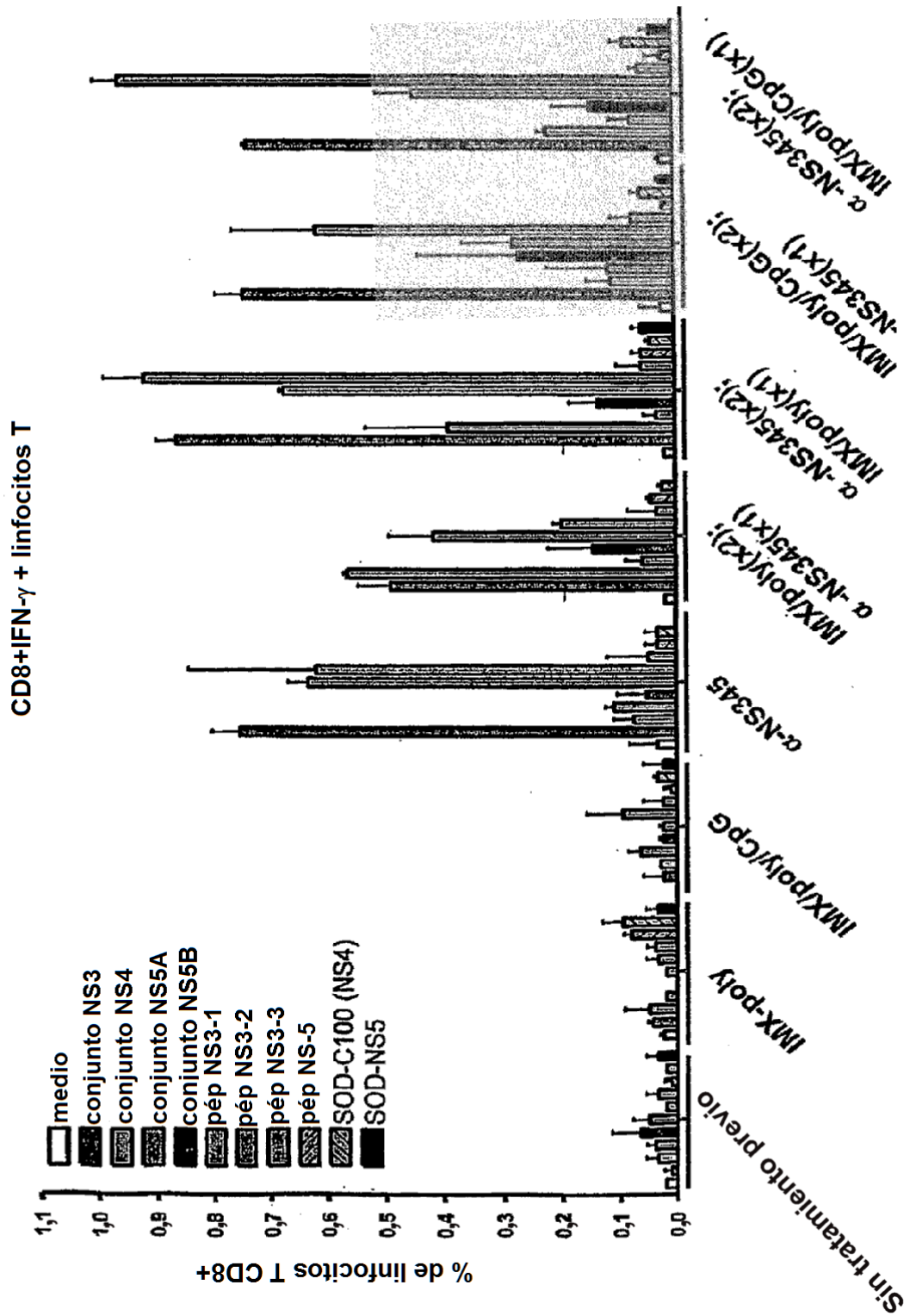


FIGURA 11

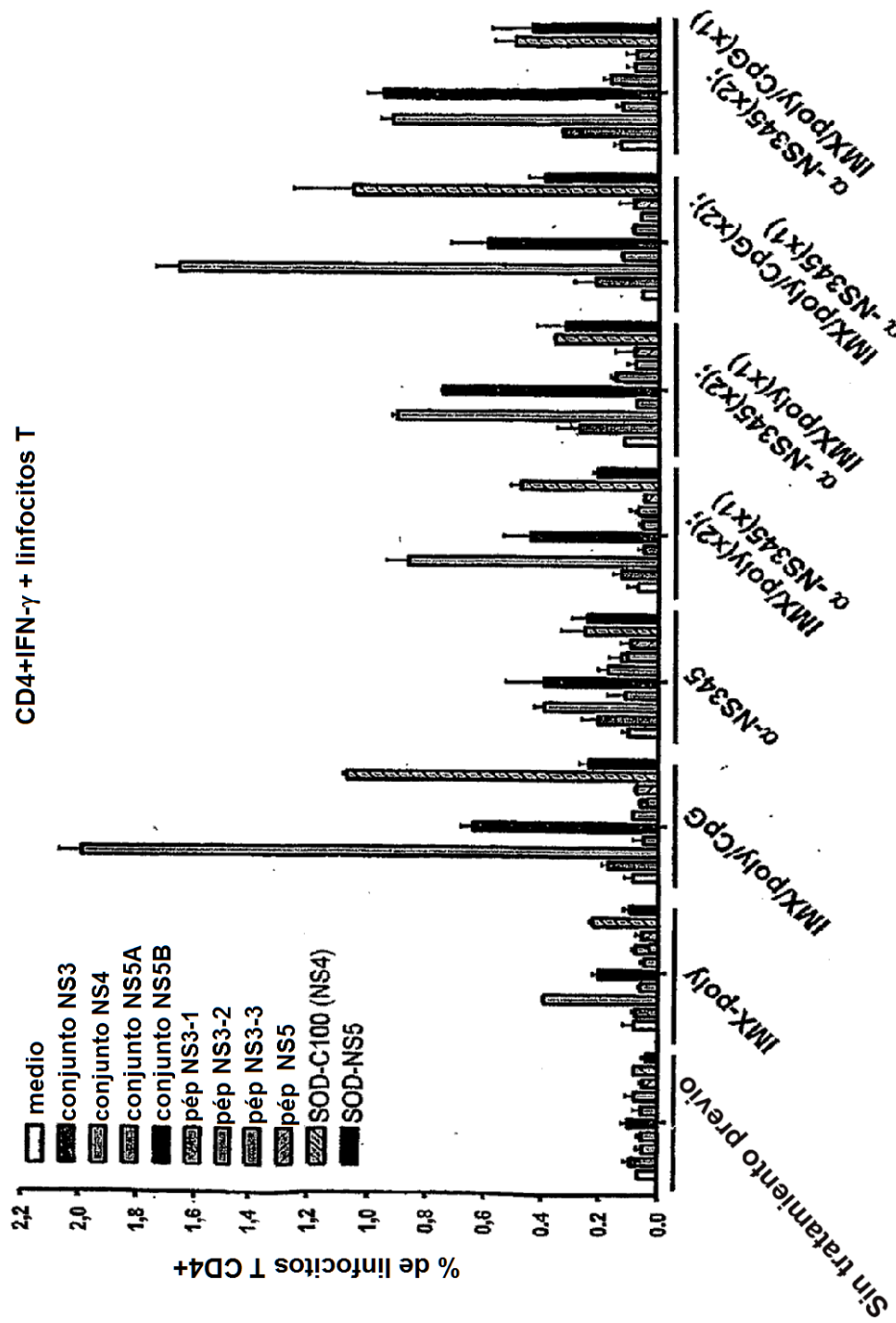


Figura 12
Título de Ab que bloquean la unión a CD81

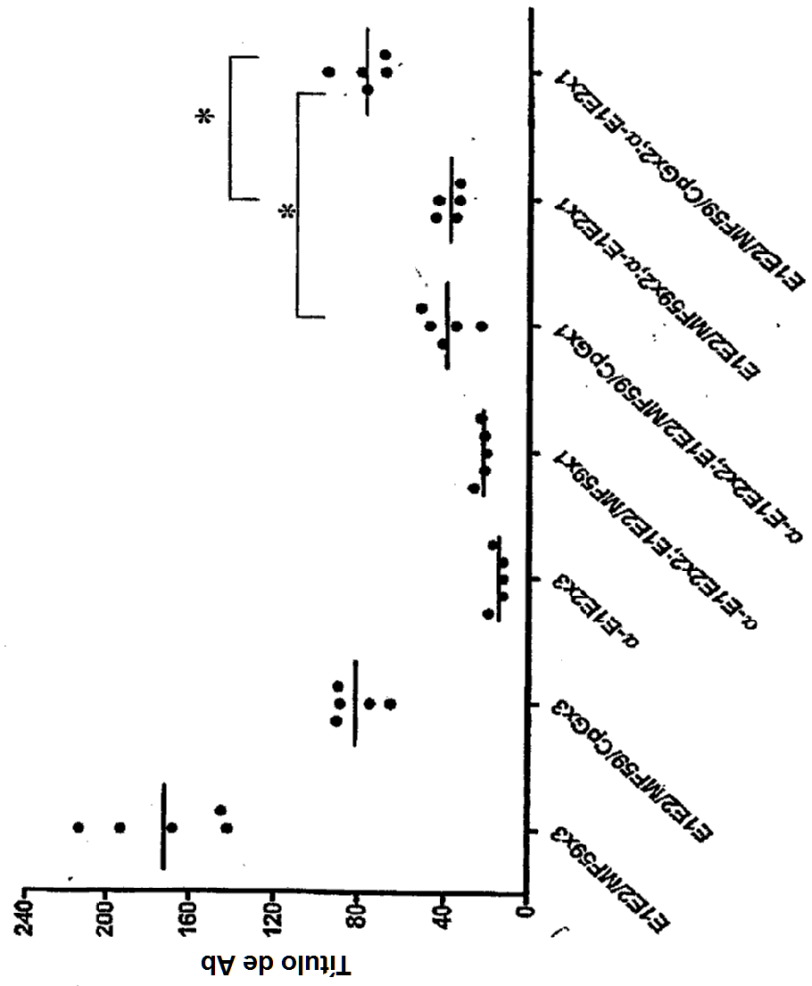


FIGURA 13

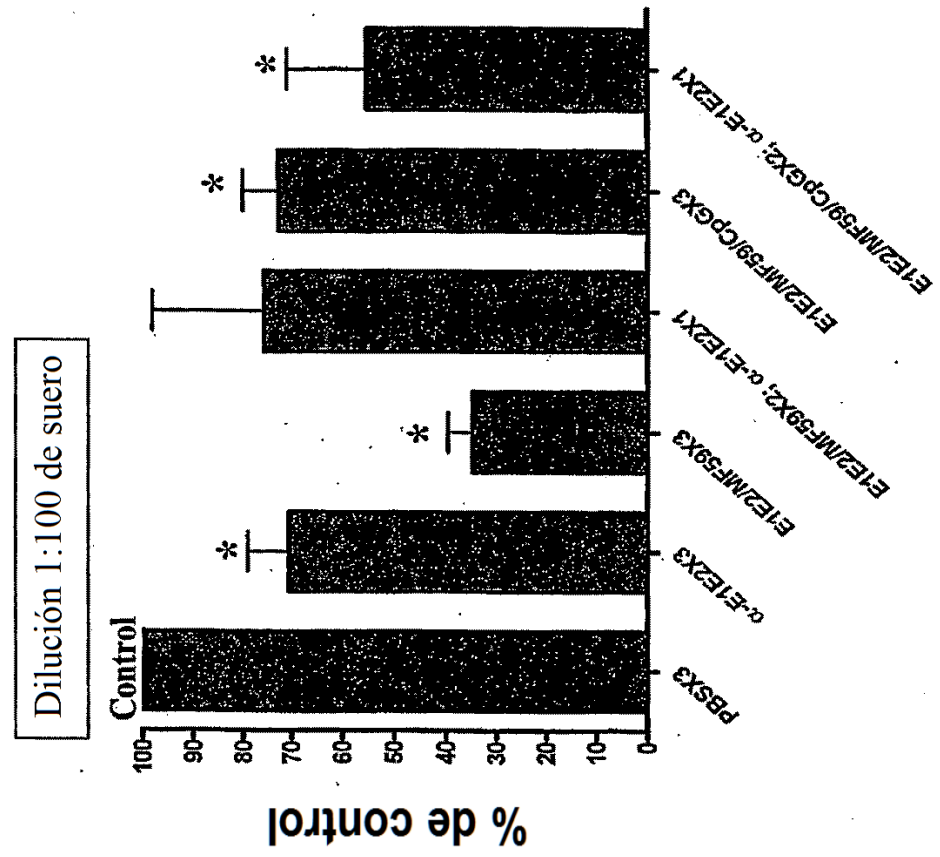


Figura 14

