



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 362 578**

51 Int. Cl.:
C12N 5/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04742880 .0**

96 Fecha de presentación : **04.06.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1629091**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.03.2006**

54 Título: **Composición que comprende la poliproteína NS3/NS4 y el polipéptido NS5B del VHC, vectores de expresión que incluyen las secuencias nucleicas correspondientes y utilización en terapéutica.**

30 Prioridad: **05.06.2003 FR 03 06772**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.07.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.07.2011

73 Titular/es: **TRANSGENE SA**
Parc d'Innovation boulevard Gonthier
d'Andernach
67400 Illkirch Graffenstaden, FR
Institut National de la Sante et de la Recherche
Medicale (INSERM)

72 Inventor/es: **Fournillier, Anne;**
Inchauspe, Geneviève;
Abraham, Jean-Daniel;
Dimitrova-Tchomakov, Maria y
Parnot, Marie

74 Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

ES 2 362 578 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

Composición que comprende la poliproteína NS3/NS4 y el polipéptido NS5B del VHC, vectores de expresión que incluyen las secuencias nucleicas correspondientes y utilización en terapéutica.

La presente invención se refiere al campo de la vacunación profiláctica y terapéutica dirigida contra el virus de la hepatitis C (VHC). Tiene asimismo por objeto una nueva composición que contiene una poliproteína que corresponde a las dos proteínas colineales NS3 y NS4 (denominadas a continuación poliproteína NS3/NS4) y un polipéptido constituido por NS5b, los vectores, tales como adenovirus o poxvirus, capaces de expresar esta composición y su utilización como vacuna.

La hepatitis C es la causa principal de las hepatitis adquiridas por transfusión. La hepatitis C se puede transmitir asimismo por otras vías percutáneas, por ejemplo por inyección de drogas por vía intravenosa. Por otra parte, el riesgo de contaminación de los profesionales de la salud no es despreciable. La transmisión sexual ya ha sido descrita.

La hepatitis C se distingue de las demás formas de enfermedades del hígado asociadas a virus, tales como la hepatitis A, B o D. Las infecciones por el virus de la hepatitis C (VHC o HCV) son mayoritariamente crónicas, dando como resultado enfermedades del hígado, tales como hepatitis, cirrosis y carcinoma en un gran número de casos (5 a 20%) y representan en los países desarrollados 30% de los trasplantes hepáticos.

Aunque el riesgo de transmisión del virus por transfusión haya disminuido por el hecho del establecimiento de ensayos de cribado en los años 1990, la frecuencia de nuevas infecciones por la hepatitis C sigue siendo elevada. A título de ejemplo, un estudio reciente indica que habría todavía en la actualidad 10.000 a 15.000 nuevos casos de infección por año en Francia (S. Deuffic *et al.*, *Hepatology* 1999; 29: 1596-1601). Actualmente, aproximadamente 170 millones de personas en el mundo están infectadas de manera crónica por el VHC (hepatitis C: Global prevalence (update)", 2000, *Weekly Epidemiological Record*, Vol. 75(3)). Las poblaciones con riesgo elevado son principalmente el personal hospitalario y los usuarios de drogas intravenosas, pero existen donantes de sangre asintomáticos que no pertenecen a estos grupos de riesgo elevado, y en los que se han encontrado anticuerpos anti-VHC circulantes. Para estos últimos, no se ha identificado todavía la vía de infección. Existen por lo tanto unas infecciones por VHC (estimación de entre 5 y 10%), denominadas infecciones esporádicas, cuya etiología no se conoce y que no pueden ser controladas.

El VHC ha sido el primer virus hepatótrofo aislado por medio de técnicas de biología molecular. Las secuencias del genoma vírico han sido clonadas antes de que la partícula vírica haya sido visualizada.

El VHC pertenece a un nuevo género de la familia de las *Flaviviridae*, los hepacivirus. Es un virus con ARN monocatenario positivo, de 9,5 kb, que se replica mediante una copia de ARN complementario, y cuyo producto de traducción es un precursor poliproteico de aproximadamente 3.000 aminoácidos. El extremo 5' del genoma del VHC corresponde a una región no traducida adyacente a los genes que codifican para las proteínas estructurales, la proteína core de la nucleocápside, las dos glicoproteínas de cubierta, E1 y E2, y una pequeña proteína denominada p7. La región no traducida 5' y el gen core están relativamente bien conservados en los distintos genotipos. Las proteínas de cubierta E1 y E2 están codificadas por regiones más variables de un aislado a otro. La proteína p7 es una proteína extremadamente hidrófoba que constituiría un canal iónico. El extremo 3' del genoma del VHC contiene los genes que codifican para las proteínas no estructurales (NS2, NS3, NS4, NS5) y para una región 3' no codificante que posee un dominio bien conservado (Major ME, Feinstone SM, *Hepatology*, junio de 1997, 25(6):1527-1538).

En la actualidad, la terapia más eficaz para el tratamiento de la hepatitis C, asocia el interferón pegilado y la ribavirina (Manns MP *et al.*, *The Lancet*, 22 de septiembre de 2001, Vol. 358, 958-965). Mientras que esta terapia es particularmente eficaz en el caso de pacientes infectados por cepas víricas que pertenecen a los genotipos 2 y 3, ésta tiene solamente un efecto limitado sobre los genotipos 1a, 1b y 4 (Manns MP, *supra*). Menos del 50% de los pacientes tratados se vuelven unos "respondedores a largo plazo". Por otra parte, esta terapia es una intervención costosa (10.000 a 15.000 euro/paciente/año) y está asociada a unos efectos tóxicos. En efecto, 5 a 10% de los pacientes están obligados a interrumpir el tratamiento antes del final.

Por lo tanto, es necesario desarrollar una composición vacunal que tiene como diana todos los genotipos.

Varios estudios muestran, en la actualidad, que el control de una infección debida al VHC, o bien naturalmente ("resolución espontánea"), o bien después del tratamiento ("resolución terapéutica"), está asociada a la inducción o la potencialización de respuestas inmunitarias con mediación celular, haciendo intervenir los linfocitos T-CD4⁺ y T-CD8⁺ (tal como se describe, por ejemplo, en LECHNER, F. *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, 30:2479-2487 (2000) y en Thimme R. *et al.*, 2001, *J. Exp. Med.*, 194(10): 1395-1406).

Las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH o también denominado HLA en el ser humano) son denominadas de clase I o de clase II. Las moléculas de clase I están expresadas sobre la casi totalidad de las

células nucleadas y son capaces de presentar unos epítomos o péptidos a los linfocitos T citotóxicos (CTL) CD8⁺. Las moléculas de clase II son capaces de presentar unos epítomos a las células T CD4⁺, pero su expresión está restringida a las células presentadoras de antígeno.

5 Las vacunas contra el virus de la hepatitis C previstas actualmente se basan en la utilización de proteínas recombinantes adyuvantadas, de péptidos, de vectores de expresión entre los cuales se pueden citar los vectores de origen vírico o bacteriano o de ADN desnudo. En este caso, se utiliza una o varias proteínas víricas o uno o varios genes que codifican para estas proteínas víricas.

10 Cuando se seleccionan varias proteínas víricas o varios genes que codifican para estas proteínas víricas, están frecuentemente constituidas o bien por una parte o por el conjunto de las proteínas estructurales (Makimura *et al.*, 1996, Vaccine, 14: 28-34; Fournillier A., *et al.*, 1999, J. Virology, 73: 7497-7504), o bien por las proteínas no estructurales individuales o que comprenden por lo menos dos proteínas contiguas (Brinster *et al.*, 2001, Hepatology, 34: 1206-1217), o bien por una mezcla de proteínas estructurales y no estructurales (Pancholi *et al.*, 15 2003, J. Virology, 77:382-390).

La solicitud de patente WO 99/38880 describe la utilización de tres genes que codifican separadamente para las tres proteínas NS3, NS4 y NS5 (a y b) en una composición vacunal que comprende tres vacunas ADN que expresan cada una separadamente estas tres proteínas. Los autores muestran en el ratón la inducción de linfocitos T 20 específicos de los tres antígenos. Sólo la vacuna que expresa NS5a y b ha sido ensayada *in vivo* en un ensayo de protección.

La solicitud de patente WO 01/30812 describe por su parte la utilización de una proteína de fusión constituida por las proteínas no estructurales NS3, NS4 y NS5a, llegado el caso en asociación con la proteína no estructural NS5b. Los 25 autores han indicado que esta asociación permitía activar las células T específicas de VHC. Esta solicitud de patente describe simplemente la capacidad de formulaciones vacunales (tipo ADN desnudo, adenovirus recombinante o virus de la vacuna recombinante) que expresan la proteína de fusión NS3, NS4 y NS5a o la proteína NS5a para inducir unas respuestas inmunitarias específicas y mediadas por unos linfocitos T específicos.

30 Cho *et al.* (Vaccine. 1999 Mar. 5; 17(9-10):1136-44) describen un método de vacunación que utiliza un vector de expresión que contiene la mitad 3' del genoma del VHC (nucleótidos 3395 a 9391, tal como se indica en el capítulo "2.1 plasmid construction", página 1137), y que codifica para una poliproteína constituida por los 4 polipéptidos NS3, NS4, NS5a y NS5b, estando el polipéptido NS5a presente necesariamente.

35 El solicitante ha demostrado ahora, contra toda previsión, que la asociación particular de las proteínas no estructurales NS3, NS4 y NS5b, siendo NS3 y NS4 expresadas de manera colineal, presentaba un mejor poder inmunógeno y protector superior al obtenido con una vacuna que incluye, además de estas proteínas no estructurales, asimismo la proteína NS5a y/u otras proteínas estructurales del VHC tal como core, E1 o E2, y tenía un efecto sobre la capacidad de las células que proceden de pacientes infectados por unas cepas víricas para 40 inducir unas respuestas inmunitarias específicas.

Así, la presente invención tiene por objeto una composición peptídica constituida por una poliproteína NS3/NS4 del virus de la hepatitis C, así como por un polipéptido NS5b del virus de la hepatitis C.

45 Tiene asimismo por objeto los vectores que incluyen las secuencias nucleotídicas que codifican para esta composición peptídica, tales como los adenovirus y los poxvirus, así como los microorganismos o células hospedantes transformados por estos vectores.

50 Tiene por último por objeto la utilización de la composición peptídica y de los vectores para la preparación de un medicamento destinado a la inhibición o al control de una infección provocada por el virus de la hepatitis C, y en una composición vacunal.

La presente invención tal como se define en las reivindicaciones propone por lo tanto una nueva composición peptídica constituida por una poliproteína NS3/NS4 y por un polipéptido NS5b del VHC, composición que tiene la 55 capacidad de estimular una respuesta inmunitaria con mediación celular específica del VHC, de manera que es útil en el campo de la vacunación profiláctica y terapéutica dirigida contra el virus de la hepatitis C.

60 La poliproteína NS3/NS4 de la composición peptídica de la invención está constituida por la proteína NS3 y por la proteína NS4a y b, sin interrupción en la secuencia peptídica, tal como en la poliproteína nativa. En efecto, tal como se ha indicado anteriormente, el genoma de VHC contiene un solo marco de lectura abierto que está transcrito en una poliproteína. Esta poliproteína del VHC puede ser escindida para producir por lo menos diez partes distintas, en el orden NH₂-core-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4a-NS4b-NS5a-NS5b-COOH.

65 La proteína NS3 es una proteína de 630 aminoácidos que aparece aproximadamente del aminoácido 1027 al aminoácido 1657 de la poliproteína. La proteína NS4, proteína de 314 aminoácidos, aparece aproximadamente del aminoácido 1658 al aminoácido 1972 (numeración con respecto al VHC-1) (Choo *et al.*, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci.,

vol. 88:2451-2455). La poliproteína NS3/NS4 aparece por lo tanto aproximadamente del aminoácido 1027 al aminoácido 1972.

5 Tratándose del polipéptido NS5b contenido asimismo en la composición de la invención, éste está constituido por 590 aminoácidos y aparece aproximadamente del aminoácido 2421 al aminoácido 3011 de la poliproteína (Choo *et al.*, 1991, *supra*).

10 La proteína NS3 comprende dos dominios estructurales distintos, a saber un dominio N-terminal provisto de una actividad proteásica con serina activa que interviene en la maduración de la poliproteína vírica, y un dominio C-terminal que comprende una actividad helicasa asociada a una actividad NTPásica que desempeña un papel en la replicación del genoma viral.

15 Mediante las expresiones "poliproteína NS3/NS4" y "polipéptido NS5b" se entienden evidentemente las poliproteínas y los polipéptidos que tienen las secuencias en aminoácidos nativas, que proceden de cualquier cepa y aislado del VHC, así como sus análogos, muteínas y homólogos.

20 Por los términos "análogos" o "muteínas" de la poliproteína y del polipéptido, se entienden los derivados biológicamente activos de las moléculas de referencia que presentan la actividad deseada, a saber la capacidad para estimular una respuesta inmunitaria con mediación celular tal como se ha definido anteriormente.

25 De manera general, el término "análogo" se refiere a unos compuestos que tienen una secuencia y una estructura polipeptídica nativa que presenta una o varias adiciones, sustituciones (generalmente conservadoras en términos de naturaleza) y/o unas deleciones de aminoácido, con respecto a la molécula nativa, en la medida en la que las modificaciones no destruyen la actividad inmunógena. Por el término "muteína" se entienden los péptidos que presentan uno o varios elementos que imitan el péptido ("peptoides"), tales como los descritos en la solicitud de patente PCT WO 91/04282. Preferentemente, el análogo o la muteína tienen por lo menos la misma inmunoreactividad que la molécula nativa. Unos procedimientos de preparación de análogos y de muteínas polipeptídicas son conocidos por el experto en la materia y se describen a continuación.

30 Los análogos particularmente preferidos incluyen las sustituciones conservadoras en naturaleza, es decir las sustituciones que tienen lugar en una familia de aminoácidos. Específicamente, los aminoácidos están generalmente divididos en 4 familias, a saber (1) los aminoácidos tales como el aspartato y el glutamato, (2) los aminoácidos básicos tales como la lisina, la arginina y la histidina, (3) los aminoácidos no polares tales como la alanina, la leucina, la isoleucina, la prolina, la fenilalanina, la metionina y el triptófano, y (4) los aminoácidos no cargados polares tales como la glicina, la asparagina, la glutamina, la cisteína, la serina, la treonina y la tirosina. La fenilalanina, el triptófano y la tirosina están a veces clasificados en los aminoácidos aromáticos. Por ejemplo, se puede predecir de manera razonable que una sustitución aislada de leucina por isoleucina o valina, de un aspartato por un glutamato, de una treonina por una serina, o una sustitución conservadora similar de un aminoácido por otro aminoácido que tiene una relación estructural, no tendrá mayor efecto sobre la actividad biológica. El experto en la materia determinará fácilmente las regiones de la molécula peptídica de interés que pueden tolerar un cambio por referencia a las escalas Hopp/Woods y Kyte-Doolite, bien conocidas en la técnica.

45 Por la expresión "homología" se entiende el porcentaje de identidad entre dos moléculas peptídicas, tales como poliproteínas y polipéptidos. Dos secuencias de aminoácidos son "sustancialmente homólogas" entre sí cuando las secuencias presentan por lo menos 60%, preferentemente por lo menos 75%, más preferentemente por lo menos 80-85%, aún más preferentemente por lo menos 90%, y ventajosamente se prefiere por lo menos 95-98% o más de identidad de secuencia sobre una longitud definida de las moléculas peptídicas.

50 De manera general, el término "identidad" se refiere a una correspondencia exacta de aminoácido por aminoácido de dos secuencias peptídicas. El porcentaje de identidad se puede determinar mediante una comparación directa de la información de secuencia entre dos moléculas alineando las secuencias, contando el número exacto de desapareamientos entre las dos secuencias alineadas, dividiendo por la longitud de la secuencia más corta y multiplicando el resultado por 100. El porcentaje de identidad se puede determinar asimismo con la ayuda de programas de ordenadores tales como ALIGN, Dayhoff, M.O. en Atlas of Protein Sequence and Structure M.O. Dayhoff *et al.*, 1981, 5 Supl., 3: 482-489.

Las secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos de un cierto número de cepas y de aislados del VHC, y en particular de la proteína NS3, de la proteína NS4 y del polipéptido NS5b, ya han sido determinadas.

60 Por ejemplo, el aislado HCV-J1 se describe en Okamoto H. *et al.*, 1992, Nucleic Acids Res., 20: 6410-6410. Las secuencias codificantes completas de dos aislados independientes del VHC, a saber los aislados HCV-J y -BK, han sido descritas respectivamente en Kato *et al.*, 1990, Proc. Natl. Acda., Sci., 87:9524-9528 y en Takamizawa *et al.*, 1991, J. Virol., 65: 1105-1113. Tratándose del aislado HCV-1, se describe en Choo *et al.*, 1990, Brit. Med. Bull., 46: 423-441 y en Choo *et al.*, 1991, *supra*. El aislado HVC-H ha sido descrito en Inchauspé G. *et al.*; 1991, Proc. Natl. Acad. Sci., 88: 10292-10296. El aislado HCV-G9 ha sido descrito en Okamoto H., *et al.*, 1994, J. Gen. Virol., 45: 629-635. Los aislados HCV-J6 et -J8 han sido descritos respectivamente en Okamoto H., *et al.*, 1991, J. Gen. Virol., 72:

2697-2704 y Okamoto H., *et al.*, 1992, *Virology*, 188: 331-341. El aislado HVC-BEBE1 ha sido descrito en Nako H., *et al.*, 1996, *J. Gen. Virol.*, 141: 701-704 y el aislado HCV-NZL1 ha sido descrito en Sakamoto M., *et al.*, 1994, *J. Gen. Virol.*, 75: 1761-1768. Tratándose del aislado HCV-Tr, se ha descrito en Chayama K., *et al.*, 1994, *J. Gen. Virol.*, 75: 3623-3628. Los aislados HCV-ED43 et -EUH1480 han sido descritos respectivamente en Chamberlain R.W., *et al.*, 1997, *J. Gen. Virol.*, 78:1341-1347 y Chamberlain R.W., *et al.*, 1997, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 236: 44-49. El aislado HCV-EUHK2 ha sido descrito en Adams A., *et al.*, 1997, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 234: 393-396. Los aislados HCV-VN235, -VN405 y -VN004 han sido descritos en Tokita H., *et al.*, 1998, *J. Gen. Virol.*, 79: 1847. Por último, tratándose de los aislados HCV-JK049 et -JKD46, han sido descritos en Tokita H. *et al.*, 1996, *J. Gen. Virol.*, 77: 293-301.

Las cepas y aislados del VHC, tal como se han ilustrado anteriormente, pueden presentar unos genotipos diferentes, a saber unos genotipos 1a (aislados HCV-1, -J1 y -H), 1b (aislados HCV-J y BK), 1c (aislado HCV-G9), 2a (aislado HCV-J6), 2b (aislado HCV-J8), 2c (aislado HCV-BEBE1), 3a (aislado HCV-NZL1), 3b (aislado HCV-Tr), 4a (aislado HCV-ED43), 5a (aislado HCV-EUH1480), 6a (aislado HCV-EUHK2), 7b (aislado HCV-VN235), 8b (aislado HCV-VN405), 9a (aislado HCV-VN004), 10a (aislado HCV-JK049) y 11a (aislado HCV-JK046).

Según un modo de realización de la invención, NS3 y/o NS4 y/o NS5b proceden de virus de genotipos diferentes.

Según otro modo de realización, NS3 y/o NS4 y/o NS5b proceden de virus del mismo genotipo, preferentemente de genotipo 1b.

La poliproteína NS3/NS4 y el polipéptido NS5b contenidos en la composición peptídica de la invención pueden ser o bien de origen nativo, o bien de origen recombinante.

La poliproteína NS3/NS4 y el polipéptido NS5b de origen nativo se obtienen a partir de las cepas o de los aislados del VHC, a través de la utilización de cebadores oligonucleotídicos sintéticos que servirán para amplificar las secuencias víricas nativas, o bien a partir de sueros de pacientes infectados por el o los genotipos víricos diana, o bien a partir de ARN vírico ya purificado, que procede por ejemplo de sangre o de hígado de pacientes, o bien a partir de ADN complementario libre o clonado previamente en un vector de expresión, o también a partir de partículas víricas purificadas a partir de extracciones biológicas o de sistema de propagación *in vitro*.

La poliproteína NS3/NS4 y el polipéptido NS5b de la invención de origen recombinante se pueden obtener asimismo mediante la técnica de ingeniería genética que comprende las etapas siguientes:

- cultivar un microorganismo o células eucariotas transformados con la ayuda de una secuencia nucleotídica que codifica para dicha poliproteína NS3/NS4 o para dicho polipéptido NS5b, y
- recuperar el péptido producido por dicho microorganismo o dichas células eucariotas.

Esta técnica es bien conocida por el experto en la materia. Para más detalles sobre ella, se podrá hacer referencia al trabajo siguiente: *Recombinant DNA Technology I*, Editores Ales Prokop, Raskesh K Bajpai; *Annals of the New-York Academy of Sciences*, Volumen 646, 1991.

Las secuencias nucleotídicas que codifican para la poliproteína NS3/NS4 y el polipéptido NS5b se pueden preparar mediante síntesis química acoplada a un enfoque de ingeniería genética o mediante ingeniería genética sola, utilizando las técnicas bien conocidas por el experto en la materia y descritas por ejemplo en Sambrook J. *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 1989.

Las secuencias nucleotídicas que codifican para la poliproteína NS3/NS4 y el polipéptido NS5b se pueden insertar en unos vectores de expresión en un sistema de expresión adaptado, con el fin de obtener la composición peptídica de la invención.

Evidentemente, las secuencias nucleotídicas se pueden insertar en un solo vector de expresión o bien en dos vectores de expresión diferentes. En este último caso, la secuencia que codifica para la poliproteína NS3/NS4 se inserta en uno de los dos vectores y la secuencia que codifica para el polipéptido NS5b se inserta en el otro vector, pudiendo ser estos dos vectores de naturaleza idéntica o diferente.

Así, otro objeto de la invención consiste en los vectores de expresión para la expresión de secuencias nucleotídicas del virus de la hepatitis C, caracterizado porque dichas secuencias nucleotídicas del virus de la hepatitis C están constituidas por una secuencia nucleotídica que codifica para la poliproteína NS3/NS4 y una secuencia nucleotídica que codifica para el polipéptido NS5b, así como los medios necesarios para su expresión, estando dicha secuencia nucleotídica que codifica para la poliproteína NS3/NS4 y dicha secuencia nucleotídica que codifica para el polipéptido NS5b en un solo vector de expresión.

Se entiende por medio necesario para la expresión de un péptido, siendo el término péptido utilizado para cualquier molécula peptídica, tal como proteína, poliproteína, polipéptido, etc., cualquier medio que permite obtener el péptido,

tal como en particular un promotor, un terminador de transcripción, un origen de replicación y preferentemente un marcador de selección.

Los medios necesarios para la expresión de un péptido están relacionados de manera operativa con la secuencia de ácido nucleico que codifica para el péptido de interés. Mediante la expresión "relacionados de manera operativa" se entiende una yuxtaposición de dichos elementos necesarios para la expresión y del gen que codifica para el péptido de interés, los cuales están en una relación tal que esto les permite funcionar de manera esperada. Por ejemplo, pueden existir unas bases suplementarias entre el promotor y el gen de interés, mientras que su relación funcional esté preservada.

Los medios necesarios para la expresión de un péptido pueden ser unos medios homólogos, es decir incluidos en el genoma del vector utilizado, o bien ser heterólogos. En este último caso, dichos medios están clonados con el péptido de interés a expresar.

Unos ejemplos de promotores heterólogos que comprenden (i) los promotores víricos tales como el promotor SV40 (virus del simio 40), el promotor del gen de la timidina-quinasa del virus simplex del herpes (TK-HSV-1), el LTR del virus del sarcoma de Rous (RSV), el promotor temprano inmediato del citomegalovirus (CMV) y el promotor tardío mayor adenovírico (MLP), así como (ii), cualquier promotor celular que controla la transcripción de los genes que codifican para unos péptidos en unos eucariotas superiores, tal como el promotor del gen de fosfoglicerato-quinasa (PGK) constitutivo (Adra *et al.*, 1987, Gene, 60: 65-74), el promotor de los genes específicos del hígado alfa-antitripsina y FIX, y el promotor SM22 específico de las células del músculo liso (Moessler *et al.*, 1996, Development, 122: 2415-2425).

Según un modo de realización de la invención, las secuencias nucleotídicas que codifican para dicha poliproteína NS3/NS4 y dicho polipéptido NS5b proceden de genotipos diferentes.

Según otro modo de realización, las secuencias nucleotídicas que codifican para dicha poliproteína y dicho polipéptido proceden de un virus de igual genotipo, preferentemente el genotipo 1b.

En este caso también, se entiende por "secuencia nucleotídica" todas las secuencias que codifican para la poliproteína NS3/NS4 y el polipéptido NS5b nativos, así como para sus análogos, muteínas y homólogos, tal como los definidos anteriormente.

Dichas secuencias contenidas en el vector de expresión pueden estar relacionadas directamente entre sí bajo el control de un solo promotor y/o de un solo elemento regulador de la expresión, o bien pueden estar separadas estando cada una bajo la dependencia de los promotores y/o reguladores de la expresión independientes, idénticos o diferentes.

A título de vector de expresión que conviene para los fines de la invención, se pueden citar por ejemplo los plásmidos, los vectores víricos de tipo adenovirus, poxvirus, virus de la vacuna, baculovirus, los vectores bacterianos de tipo salmonela, y BCG.

Los adenovirus han sido detectados en numerosas especies animales, no se integran y son poco patógenos. Son capaces de infectar una variedad de tipos celulares, las células en división y las células en reposo. Poseen un tropismo natural para los epitelios bronquiales. Además, se han utilizado como vacunas entéricas vivas durante numerosos años con un excelente perfil de seguridad. Por último, se les puede hacer crecer fácilmente y purificarlos en gran cantidad. Estas características han hecho que los adenovirus sean particularmente apropiados para una utilización como vectores de expresión y en particular como vectores de terapia génica con fines terapéuticos y vacunales.

Según un modo de realización preferido, el vector de la invención es un adenovirus.

Unos ejemplos de adenovirus que se utilizan en la presente invención pueden ser derivados de cualquier fuente de origen humano o animal, en particular de origen canino (por ejemplo CAV-1 o CAV-2; referencia Genbank CAV1GENOM y CAV77082, respectivamente), de origen aviar (referencia Genbank AAVEDSDNA), de origen bovino (tal como BAV3, Seshidhar Reddy *et al.*, 1998, J. Virol., 72: 1394-1402), de origen ovino, felino, porcino, de origen simio, o bien de uno de sus híbridos. Se puede utilizar cualquier serotipo. Sin embargo, se prefieren los adenovirus de origen humano y en particular el adenovirus 5 (AdIV).

De manera general, los virus citados están disponibles en las colecciones ATCC y han sido objeto de numerosas publicaciones que describen su secuencia, su organización y su biología, lo cual permite que el experto en la materia los aplique fácilmente. Por ejemplo, la secuencia del adenovirus de tipo 5 se describe en la base de datos Genbank (M73260 y M29978).

El genoma de los adenovirus está constituido por una molécula de ADN lineal bicatenario de aproximadamente 36 kb que contiene más de aproximadamente 30 genes necesarios para terminar el ciclo vírico. Los primeros genes

están divididos en 4 regiones dispersadas en el genoma del adenovirus (E1 a E4). Las regiones E1, E2 y E4 son esenciales para la replicación vírica. La región E3 está considerada como una región no esencial en base a la observación de que los virus mutantes que aparecen naturalmente o los virus híbridos que han perdido esta región E3 continúan replicándose como los virus de tipo salvaje en las células cultivadas (Kelly y Lewis, 1973, J. Virol., 12:643-652). Los últimos genes (L1 a L5) codifican en su mayoría para las proteínas estructurales que constituyen la cápside vírica. Solapan por lo menos en parte los primeros motivos de transcripción y son transcritos a partir de un promotor único (MLP por "Major Late Promotor"). Además, el genoma adenovírico contiene en los dos extremos unas regiones de acción en cis esenciales para la replicación de ADN, respectivamente los motivos de repetición inversos 5' y 3' (ITR por "Inverted Terminal Repeats") y una secuencia de empaquetado.

Los adenovirus utilizados actualmente en los protocolos de terapia génica están desprovistos de la mayoría de la región E1, lo cual hace que los virus sean deficientes a nivel de su replicación para evitar su diseminación en el entorno y en el organismo hospedante. Además, la mayoría de los adenovirus están desprovistos asimismo de la región E3 con el fin de incrementar su capacidad de clonación. La factibilidad de la transferencia del gen utilizando estos vectores ha sido demostrada en una variedad de tejidos *in vivo* (véase por ejemplo Yei *et al.*, 1994, Hum. Gene Ther., 5: 731-744; Dai *et al.*, 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 1401-1405; US nº 6.099.831; y US nº 6.013.638).

Preferentemente, los promotores utilizados en los adenovirus como vector de expresión son unos promotores heterólogos tales como los promotores CMV y SV40.

Más preferentemente, el promotor CMV es el promotor de la poliproteína NS3/NS4 y el vector de expresión comprende como secuencia nucleotídica que codifica para dicha poliproteína el casete de expresión CMV-NS3-NS4.

Mediante la expresión "casete de expresión" se entiende una secuencia de ADN que contiene un promotor y un marco de lectura abierto para la expresión del péptido de interés, para insertar en un vector.

Preferentemente, asimismo, el promotor SV40 es el promotor del polipéptido NS5b y el vector de expresión comprende como secuencia nucleotídica que codifica para dicho polipéptido el casete de expresión SV40-NS5b.

Según un modo de realización de la invención, el genoma del adenovirus está modificado de manera que se sustituye la región E1 por el casete de expresión CMV-NS3-NS4 y se sustituye la región E3 por el casete de expresión SV40-NS5b.

Los métodos de supresión y de inserción de secuencias de ADN en unos vectores de expresión son ampliamente conocidos por el experto en la materia y consisten en particular en unas etapas de digestión enzimática y ligadura.

Otro vector de expresión particularmente apropiado para los fines de la invención es un poxvirus, que constituye otro modo de realización de la invención.

Los poxvirus constituyen un grupo de virus complejo recubiertos, que se distinguen principalmente por su morfología inhabitual, su gran genoma de ADN y su sitio citoplásmico de replicación. El genoma de varios elementos de los *poxviridae*, que comprende la cepa vírica de la vacuna de Copenhagen (VV) (Goebel *et al.*, 1990, Virol. 179: 247-266 y 517-563) y la cepa del virus de la vacuna modificada de Ankara (MVA) (Antoine *et al.*, 1998, Virol., 244:635-396) ha sido cartografiado y secuenciado. La cepa VV posee un genoma de ADN bicatenario de aproximadamente 192 kb que codifica para aproximadamente 200 proteínas de las cuales aproximadamente 100 están implicadas en el ensamblaje del virus. La cepa MVA es una cepa del virus de la vacuna altamente atenuada, generada por más de 500 pasajes en serie de la cepa de Ankara del virus de la vacuna (CVA) sobre unos fibroblastos de embriones de pollo (Mayr *et al.*, 1975, Infection, 3: 6-16). El virus MVA ha sido depositado en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (CNCM) con el número I-721. La determinación de la secuencia completa del genoma del MVA y la comparación con el del VV permite la identificación precisa de las alteraciones que han aparecido en el genoma vírico y la definición de siete deleciones (I a VII) y numerosas mutaciones que conducen a unos marcos de lectura abiertos fragmentados (Antoine *et al.*, 1998, Virology, 244: 365-396).

Otros ejemplos de poxvirus apropiados para los fines de la invención comprenden el pox del canario, el pox de aves de corral, el pox de vaca, el entomopox, el pox de simio, el pox de cerdo y el pox de pingüino.

El poxvirus se encuentra en dos formas morfológicamente distintas, denominadas virus maduro intracelular (IMV) y virus extracelular recubierto (EEV).

El poxvirus utilizado como vector de expresión de la invención presenta por lo menos una de las características siguientes, consideradas solas o en asociación:

- (i) el poxvirus es un virus MVA,
- (ii) el poxvirus está en forma morfológica IMV, y

(iii) el genoma del poxvirus está modificado de manera que se inserta el casete de expresión NS3/NS4 y se inserta el casete de expresión NS5b.

5 Cuando el genoma del poxvirus está modificado de manera que se insertan los dos casetes de interés, los medios necesarios para su expresión son homólogos. Así, en el caso en el que se utiliza el virus MVA, la expresión de NS3/NS4 puede estar por ejemplo bajo el control del promotor ph5r de manera que el casete de expresión correspondiente es ph5r-NS3-NS4, y la expresión de NS5b puede estar por ejemplo bajo el control del promotor p7.5 de manera que el casete de expresión correspondiente es p7.5-NS5b, y viceversa.

10 Según un modo de realización particular, cuando el genoma del poxvirus está modificado de manera que se insertan los dos casetes de interés, dichos dos casetes de expresión están orientados en el mismo sentido.

15 Según otro modo de realización particular, éstos están orientados en sentido opuesto.

En este caso también, los casetes de expresión están insertados en el genoma del poxvirus de manera conocida por el experto en la materia, tal como se ha indicado anteriormente.

20 Los vectores de la invención pueden comprender asimismo unas secuencias necesarias para la detección de diana de los péptidos hacia unos compartimentos celulares particulares. Un ejemplo de detección de diana puede ser la detección de diana hacia el retículo endoplásmico obtenido utilizando unas secuencias de direccionamiento del tipo de la secuencia líder procedente de la proteína E3 del adenovirus (Ciernik I.F., *et al.*, The Journal of Immunology, 1999, 162, 3915-3925).

25 Pueden comprender asimismo unas secuencias necesarias para la detección de diana hacia las células dendríticas y a la detección de diana a la membrana de las células.

La invención tiene asimismo por objeto los microorganismos y las células eucariotas transformados por un vector de expresión de la invención.

30 A título de ejemplos de microorganismos que convienen para los fines de la invención, se pueden citar las levaduras, tales como las de las familias siguientes: *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Kluveromyces*, *Pichia*, *Hanseluna*, *Yarrowia*, *Schwaniomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces carlsbergensis* y *Kluveromyces lactis* siendo preferidos; y las bacterias, tales como *E. coli* y las de las familias siguientes: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Salmonella*, *Streptococcus*, *Bacillus* y *Streptomyces*.

35 A título de ejemplo de células eucariotas, se pueden citar las células que proceden de animales tales como los mamíferos, los reptiles, los insectos y equivalentes. Las células eucariotas preferidas son las células que proceden del hámster chino (células CHO), del mono (células COS y Vero), del riñón de hámster enano (células BHK), del riñón de cerdo (células PK 15) y del riñón de conejo (células RK13), las líneas celulares humanas del osteosarcoma (células 143 B), las líneas celulares humanas HeLa y las líneas celulares humanas del hepatoma (del tipo células Hep G2), así como las líneas celulares de insecto (por ejemplo de *Spodoptera frugiperda*).

40 Las células hospedantes pueden ser suministradas en unos cultivos en suspensión o en frasco, en unos cultivos de tejidos, unos cultivos de órgano y equivalentes. Las células hospedantes pueden asimismo ser unos animales transgénicos.

45 La presente descripción se refiere asimismo a unos anticuerpos dirigidos contra una de las composiciones peptídicas de la invención tales como las definidas anteriormente o bien contra uno de los vectores de expresión de la invención tales como los definidos anteriormente.

50 Los anticuerpos son o bien unos anticuerpos policlonales, o bien monoclonales.

55 Los anticuerpos policlonales mencionados anteriormente se pueden obtener mediante la inmunización de un animal con la composición peptídica de la invención o bien con el vector de la invención a título de "antígeno de interés", seguida de la recuperación de los anticuerpos buscados en forma purificada, mediante la extracción del suero de dicho animal, y la separación de dichos anticuerpos de los demás constituyentes del suero, en particular mediante cromatografía de afinidad sobre una columna en la que se fija un antígeno específicamente reconocido por los anticuerpos, en particular un antígeno vírico de interés.

60 Los anticuerpos monoclonales se pueden obtener mediante la técnica de los hibridomas cuyo principio general se recuerda a continuación.

65 En un primer tiempo, se inmuniza un animal, generalmente un ratón (o unas células en cultivo en el marco de inmunizaciones *in vitro*) con la composición peptídica de la invención o bien con el vector de la invención a título de "antígeno de interés", cuyos linfocitos B son entonces capaces de producir unos anticuerpos contra dicho antígeno.

- Estos linfocitos productores de anticuerpos son fusionados a continuación con unas células mielomatosas "inmortales" (murinas en el ejemplo) para dar lugar a unos hibridomas. A partir de la mezcla heterogénea de las células así obtenida, se efectúa entonces una selección de las células capaces de producir un anticuerpo particular y de multiplicarse indefinidamente. Cada hibridoma se multiplica en forma de clon, conduciendo cada uno a la producción de un anticuerpo monoclonal cuyas propiedades de reconocimiento frente al antígeno de interés podrán ser ensayadas por ejemplo en ELISA, mediante inmunotransferencia en una o dos dimensiones, en inmunofluorescencia, o con la ayuda de un biosensor. Los anticuerpos monoclonales así seleccionados son purificados a continuación en particular según la técnica de cromatografía de afinidad descrita anteriormente.
- Las composiciones peptídicas, los vectores de expresión, las secuencias nucleotídicas que codifican para dicha poliproteína NS3/NS4 y dicho polipéptido NS5b, así como los anticuerpos son particularmente eficaces para la inhibición, la prevención y el control de la infección de los pacientes portadores del virus del VHC, de manera que su utilización para la preparación de un medicamento constituye otro objeto de la invención.
- La presente invención se refiere asimismo a una composición farmacéutica, en particular vacuna, que contiene a título de sustancia activa la composición peptídica de la invención, o bien un vector de expresión de la invención, o un vector de expresión que comprende una secuencia nucleotídica que codifica para la poliproteína NS3/NS4 con un vector de expresión que comprende una secuencia nucleotídica que codifica para el polipéptido NS5b, o bien las secuencias nucleotídicas que codifican para dicha poliproteína NS3/NS4 y dicho polipéptido NS5b, correspondiendo dichas secuencias nucleotídicas a las secuencias contenidas en los vectores de expresión de la invención, dispuestas bajo el control de elementos necesarios para una expresión constitutiva y/o inducible de dichos péptidos, o bien uno por lo menos de los anticuerpos antes mencionados.
- Por elementos necesarios para una expresión constitutiva de los péptidos, se entiende un promotor ubiquitario o específico de las células eucariotas.
- A título de elementos necesarios para una expresión inducible de los péptidos, se pueden citar los elementos de regulación del operón de *E. coli* para la resistencia a la tetraciclina (Gossen M. *et al*, Proc Natl Acad Sci USA, 89:5547-5551 (1992)).
- Según un modo de realización particular de la invención, la composición farmacéutica contiene asimismo un vehículo farmacéuticamente apropiado. Evidentemente, el experto en la materia determinará fácilmente la naturaleza del vehículo farmacéuticamente apropiado y la cantidad de polipéptidos a utilizar en función de los constituyentes de la composición farmacéutica.
- La cantidad y la naturaleza del vehículo farmacéuticamente apropiado pueden ser fácilmente determinadas por el experto en la materia. Éstas se seleccionan según la forma farmacéutica y el modo de administración deseados.
- Las composiciones farmacéuticas de la invención son apropiadas para la administración oral, sublingual, subcutánea, intramuscular, intravenosa, tópica, local, intratraqueal, intranasal, transdérmica, rectal, intraocular, intra-auricular, pudiendo dicho principio activo ser administrado en forma unitaria de administración.
- Las formas unitarias de administración pueden ser, por ejemplo, unos comprimidos, unas cápsulas blandas, unos gránulos, unos polvos, unas disoluciones o suspensiones orales inyectables, unos sellos transdérmicos ("parche"), unas formas de administración sublingual, bucal, intratraqueal, intraocular, intranasal, intra-auricular, por inhalación, unas formas de administración tópica, transdérmica, subcutánea, intramuscular o intravenosa, unas formas de administración rectal o unos implantes. Para la administración tópica, se pueden prever cremas, geles, pomadas, lociones o colirios.
- Estas formas galénicas se preparan según los métodos habituales de los campos considerados.
- Dichas formas unitarias se dosifican para permitir una administración diaria de 0,001 a 10 mg de sustancia activa por kg de peso corporal, según la forma galénica.
- Puede haber casos particulares en los que son apropiadas unas dosis más elevadas o más bajas; dichas dosificaciones no se apartan del marco de la invención. Según la práctica habitual, la dosificación apropiada para cada paciente se determina por el médico según el modo de administración, el peso y la respuesta del paciente.
- Las composiciones farmacéuticas de la invención contienen preferentemente a título de sustancia activa uno de los vectores de la invención o bien un vector de expresión que comprende una secuencia nucleotídica que codifica para la poliproteína NS3/NS4 con un vector de expresión que comprende una secuencia nucleotídica que codifica para el polipéptido NS5b, de manera que son útiles en vacunación profiláctica y terapéutica.
- La vacunación profiláctica y terapéutica se puede realizar mediante la inyección de una vacuna a base de uno o varios vectores de expresión de la invención, en la medida en la que el o los vectores de expresión codifican al final para la poliproteína NS3/NS4 y para el polipéptido NS5b a título de sustancia activa, inyección seguida de recuerdos

o no. Se puede realizar asimismo inyectando dos tipos de vectores de expresión de la invención diferentes, en primer lugar un adenovirus y después un poxvirus, de manera simultánea o diferida en el tiempo, y viceversa.

Estos vectores pueden estar contenidos en un kit farmacéutico.

Asimismo, otro objeto de la invención consiste en unos kits farmacéuticos, en particular vacunales, que comprenden por lo menos un vector de expresión que comprende una secuencia nucleotídica que codifica para la poliproteína NS3/NS4 y por lo menos un vector de expresión que comprende una secuencia nucleotídica que codifica para el polipéptido NS5b.

Otro objeto de la invención consiste en unos kits farmacéuticos, en particular vacunales, que comprenden por lo menos un vector de expresión de tipo adenovirus tal como el definido anteriormente y/o por lo menos un vector de expresión de tipo poxvirus tal como el definido anteriormente.

La vacunación profiláctica y terapéutica se puede realizar asimismo mediante la inyección de una vacuna a base de por lo menos un vector de expresión de la invención, o bien un vector de expresión que comprende una secuencia nucleotídica que codifica para la poliproteína NS3/NS4 con un vector de expresión que comprende una secuencia nucleotídica que codifica para el polipéptido NS5b, y de por lo menos una composición farmacéutica de la invención constituida por la composición peptídica de la invención o por los anticuerpos de la invención. Se puede realizar asimismo mediante la inyección de una vacuna a base de por lo menos un vector de expresión de la invención, o bien un vector de expresión que comprende una secuencia nucleotídica que codifica para la poliproteína NS3/NS4 con un vector de expresión que comprende una secuencia nucleotídica que codifica para el polipéptido NS5b, y de por lo menos una secuencia nucleotídica que codifica para la poliproteína NS3/NS4 y para el polipéptido NS5b.

Asimismo, otro objeto de la invención consiste en unos kits farmacéuticos, en particular vacunales, que comprenden por lo menos un vector de expresión de la invención, o bien un vector de expresión que comprende una secuencia nucleotídica que codifica para la poliproteína NS3/NS4 con un vector de expresión que comprende una secuencia nucleotídica que codifica para el polipéptido NS5b, y por lo menos una composición farmacéutica de la invención o por lo menos una secuencia nucleotídica que codifica para la poliproteína NS3/NS4 y para el polipéptido NS5b.

La presente invención se pondrá más claramente de manifiesto a partir de los ejemplos siguientes dados únicamente a título ilustrativo y no limitativo, así como con la ayuda de las figuras 1 a 7 adjuntas, en las que:

- la figura 1A a 1K representa los mapas de los diferentes plásmidos utilizados para la obtención de un adenovirus AdNS3NS4NS5b según la invención, en los que se indican los sitios de las diferentes enzimas de restricción y el emplazamiento de los fragmentos de secuencia que codifican para NS3/NS4 y para NS5b,
- la figura 2A a 2H representa los mapas de los diferentes plásmidos utilizados para la obtención de un poxvirus MVA NS3NS4NS5b según la invención, en los que se indican los sitios de las diferentes enzimas de restricción y el emplazamiento de los fragmentos de secuencia que codifican para NS3/NS4 y para NS5b,
- la figura 3 proporciona la respuesta celular inducida por el adenovirus AdNS3NS4, es decir según el ensayo CTL (figura 3A) en el que se ha utilizado el epítipo GLL para estimular los esplenocitos en cultivo y para cargar las dianas del CTL y cuyo resultado se expresa en porcentaje de lisis específica en función de la relación efector/diana, es decir según el ensayo ELISPOT (figura 3B), específico para el epítipo GLL, en el que el resultado se proporciona en número de puntos/10⁶ células,
- la figura 4 proporciona la respuesta celular inducida por el adenovirus AdNS5b según el ensayo ELISPOT, específico de los epítopos ALY y KLP,
- la figura 5 proporciona la respuesta celular inducida por el adenovirus adCE1E2 según el ensayo CTL en el que se ha utilizado el epítipo DLM para estimular los esplenocitos en cultivo y para cargar las dianas del CTL y cuyo resultado se expresa en porcentaje de lisis específica en función de la relación efector/diana,
- la figura 6 proporciona el título de virus recombinante de la vacuna, que resulta del ensayo de prueba, en pfu/ml/mg ovario, para los 4 grupos de 8 ratones inmunizados por las diferentes combinaciones de adenovirus: AdNS3NS4 + AdNS5b (1^{er} grupo), los adenovirus AdNS3NS4 + AdNS5b + AdNS5a (2^o grupo), los adenovirus AdNS3NS4 + AdNS5b + AdCE1E2 (3^{er} grupo) y el adenovirus AdβGa1 (4^o grupo), y
- la figura 7 proporciona el título de virus recombinante de la vacuna, que resulta del ensayo de prueba, en pfu/ml/mg ovario, para los 3 grupos de 8 ratones inmunizados por las diferentes combinaciones de adenovirus siguientes: AdNS3NS4NS5b (1^{er} grupo), AdNS3NS4 + AdNS5b (2^o grupo) y AdβGa1 (3^{er} grupo).

Ejemplo 1: Preparación de un adenovirus según la invención que permite la expresión de las proteínas NS3/NS4 y NS5b1. Adenovirus

Los adenovirus recombinantes se generan por transfección (CaPO₃) de la línea de complementación 293 (Graham, Smiley, *et al.* 1977) después de la linealización de los genomas por Pacl. Los virus recombinantes se propagan y se amplifican en esta misma línea, y su purificación se realiza a partir de las células infectadas. Las células se recuperan por centrifugación (1.500 rpm, (revoluciones por minuto), 10 min.) y se lisan mediante 3 ciclos de congelación/descongelación. El lisado celular se clarifica mediante dos centrifugaciones (2.000 rpm, 10 min.; 8.000 rpm, 15 min.), y después se purifica mediante dos ultracentrifugaciones sucesivas. La primera se realiza en un gradiente de cloruro de cesio (densidad 1,4 y 1,25) a 30.000 rpm durante 1 hora. La segunda se realiza en un cojín de cloruro de cesio (densidad 1,34) a 35.000 rpm durante 18 horas. Las fases que contienen los viriones se extraen y se diluyen a la mitad en un tampón de sacarosa al 60%. Las suspensiones víricas se dializan entonces contra un tampón de formulación (para 10 litros: 3.423 g de sacarosa; 12,11 g de Tris; 2,033 g de MgCl₂; 87,7 g de NaCl), y después se alicuotan. Su titulación se realiza mediante inmunofluorescencia indirecta sobre células 293 infectadas por diferentes diluciones víricas y marcadas por un anticuerpo específico de la DNA-Binding Protein adenovirale (α 72K B6-8) (Reich, Sarnow, *et al.*, 1983).

2. Preparación del adenovirus AdNS3NS4

Este adenovirus permite la expresión del gen que codifica para la poliproteína NS3/NS4 (SEC ID nº 1 y 2) bajo el control del promotor CMV.

2.1 Amplificación por PCR de la secuencia nucleotídica que codifica para la poliproteína NS3/NS4

Para ello, se han utilizado los oligonucleótidos siguientes:

oIV166: 5'-GGG GGG GCT ATG GCG CCT ATC ACG GCC TA-3' (SEC ID nº 9)

oIV171: 5'-GGG GGG ACG CGT TTA GCA TGG CGT GGA GCA GT-3' (SEC ID nº 10)

así como los agentes reactivos siguientes:

Taq DNA polimerasa, tampón PCR, MgCl₂ 1,5 mM y dNTP 10 mM (Invitrogen).

Las condiciones de PCR han sido las siguientes:

5 minutos a 94°C, y después

30 ciclos de la serie: 45 s a 94°C, 45 s a 62°C y 1 minuto a 72°C, y después

10 minutos a 72°C.

2.2 Inserción del fragmento de PCR NS3/NS4 en el plásmido de transferencia pTG13387

Se han realizado las etapas siguientes:

- Digestión enzimática del plásmido pTG13387 (figura 1A, Transgène) por *NheI/MluI* (*NheI*, Invitrogen en React 4 Buffer y *MluI*, Invitrogen en React 3 Buffer)
- Digestión enzimática del fragmento NS3/NS4 por *NheI/MluI*
- Ligadura (T4 DNA Ligase (Invitrogen) en Reaction Buffer (Invitrogen)),
- Transformación bacteriana (cepa 5K, Transgène)
- Selección de los clones bacterianos en medio LB (Difco) + ampicilina (100 µg/ml, Duchefa)
- Maxi-preparación plasmídica (Qiagen, según el protocolo del proveedor) de un clon positivo después del análisis de restricción
- Análisis de restricción: digestión mediante *SmaI* (Invitrogen en React 4 Buffer) y obtención de fragmentos de: 5450, 2164, 909, 214 y 180 pb
- Obtención del plásmido pIV315 delecionado de su región E1 y que contiene la secuencia NS3/NS4 bajo el control del promotor CMV (figura 1B).

2.3 Recombinación homóloga con el genoma adenovirico completo delecionado de su región E3 contenida en el plásmido pTG6624

Se han realizado las etapas siguientes:

- 5
- Digestión enzimática del plásmido obtenido anteriormente pIV315 por *PacI/PvuI* (*PacI* en tampón NEB1, Biolabs y *PvuI* en React 7 Buffer, Invitrogen); aislamiento sobre gel de agarosa del fragmento que contiene el casete pCMV-NS3-NS4
- 10
- Digestión enzimática del plásmido pTG6624 (figura 1C) por *Clal* (en React 1 Buffer, Invitrogen)
 - Transformación bacteriana (cepa BJ, Transgène) para realizar la recombinación homóloga entre los dos fragmentos plasmídicos
- 15
- Selección de los clones bacterianos en medio LB + ampicilina (100 µg/ml)
 - Maxi-preparación plasmídica (Qiagen) de un clon positivo después del análisis de restricción
- 20
- Análisis de restricción: digestión por *SmaI* y obtención de fragmentos de: 2263, 621, 3814, 214, 2164, 909, 180, 2463, 6480, 1398, 4456, 1455, 3540, 3386, 230 y 3685 pb
 - Obtención del genoma adenovirico completo Adenovirus AdNS3NS4, delecionado de sus regiones E3 y E1, habiendo sido esta última sustituida por el casete de expresión pCMV-NS3-NS4 (pIV317, figura 1D).

25 3. Preparación del adenovirus AdNS3NS4NS5b

Este adenovirus permite la expresión del gen que codifica para la poliproteína NS3/NS4 bajo el control del promotor CMV y la expresión del gen que codifica para el polipéptido NS5b bajo el control del promotor SV40.

30 3.1 Construcción del plásmido de transferencia que permite la clonación en la región E3 de adenovirus de una secuencia codificante bajo el control del promotor CMV

Se han realizado las etapas siguientes:

- 35
- Digestión enzimática del plásmido pTG4664 (figura 1E, Transgène) por *BglII* (en React 3 Buffer, Invitrogen)
 - Digestión enzimática del plásmido pTG13074 (figura 1F, Transgène) por *BamHI/BglII* (en React 3 Buffer, Invitrogen)
- 40
- Ligadura (T4 DNA Ligase), transformación bacteriana (cepa 5K)
 - Selección de los clones bacterianos en medio LB + ampicilina (100 µg/ml)
 - Maxi-preparación plasmídica (Qiagen) de un clon positivo después del análisis de restricción
- 45
- Análisis de restricción: digestión por *SmaI* y obtención de fragmentos de: 4940, 1305 y 230 pb
 - Obtención del plásmido pIV267 (figura 1G)
- 50
- Digestión del plásmido así obtenido pIV267 por *Clal/MunI* (en React 1 Buffer, Invitrogen)
 - Tratamiento por la DNA Polimerase I, Large (Klenow) Fragment (en React 2 Buffer, Invitrogen)
 - Ligadura (T4 DNA Ligase)
- 55
- Transformación bacteriana (cepa 5K)
 - Selección de los clones bacterianos en medio LB + ampicilina (100 µg/ml)
- 60
- Maxi-preparación plasmídica (Qiagen)
 - Análisis de restricción: digestión por *SmaI* y obtención de fragmentos de: 4692, 1305 y 230 pb
- 65
- Obtención del plásmido pIV270, plásmido de transferencia que permite la clonación en la región E3 del adenovirus de una secuencia codificante bajo el control del promotor CMV (figura 1H).

3.2 Sustitución del promotor CMV por el promotor SV40 en pIV270

Se han realizado las etapas siguientes:

- 5 - Amplificación mediante PCR del fragmento nucleotídico que corresponde al promotor SV40, a partir del plásmido comercial pcDNAHygro (Clonotech) gracias a los oligonucleótidos siguientes:
- oIV232: 5'-GGG GGG AGA TCT CCA GCA GGC AGA AGT ATG-3' (SEC ID nº 11)
 - oIV233: 5'-GGG GGG GTC GAC CGA AAA GGG ATA TAC AAG CTC-3' (SEC ID nº 12)
- 10 y según el modo de realización descrito en el punto 2.1 anterior, excepto que se ha utilizado una temperatura de 58°C en lugar de 62°C.
- 15 - Digestión enzimática de pIV270 por *BglII/SalI* (en React 10 Buffer, Invitrogen)
 - Digestión enzimática del fragmento de PCR por *BglII/SalI*
 - Ligadura (T4 DNA Ligase), transformación bacteriana (sepa 5K)
 - 20 - Selección de los clones bacterianos en medio LB + ampicilina (100 µg/ml)
 - Maxi-preparación plasmídica (Qiagen) de un clon positivo después del análisis de restricción
 - Análisis de restricción: digestión por *SmaI* y obtención de fragmentos de: 4692, 719, 80 y 230 pb
 - 25 - Obtención del plásmido pIV330, plásmido de transferencia que permite la clonación en la región E3 del adenovirus de una secuencia codificante bajo el control del promotor SV40 (figura 1I).

3.3 Inserción del fragmento de PCR NS5b en el plásmido de transferencia pIV330

Se han realizado las etapas siguientes:

- 35 - Amplificación por PCR de la secuencia nucleotídica que codifica para la proteína NS5b (SEC ID nº 3 y 4) gracias a los oligonucleótidos siguientes:
- oIV212: 5'-GGG GGG TCT AGA ATG TCA ATG TCC TAC ACA TGG AC-3' (SEC ID nº 13)
 - oIV218: 5'-GGG GGG TCT AGA TTA CCG GTT GGG GAG CAG GT-3' (SEC ID nº 14)
- 40 y según el modo de realización descrito en el punto 2.1 anterior, excepto que se ha utilizado una temperatura de 60°C en lugar de 62°C
- Digestión enzimática del plásmido oIV330 obtenido anteriormente por *XbaI* (en React 2 Buffer, Invitrogen)
 - Digestión enzimática del fragmento de PCR por *XbaI*
 - 45 - Ligadura (T4 DNA Ligase), transformación bacteriana (cepa 5K)
 - Selección de los clones bacterianos en medio LB + ampicilina (100 µg/ml)
 - 50 - Maxi-preparación plasmídica (Qiagen) de un clon positivo después del análisis de restricción
 - Análisis de restricción: digestión por *SmaI* y obtención de fragmentos de: 4692, 1505, 760, 719 y 230 pb
 - Obtención del plásmido pIV336, plásmido de transferencia en la delección E3 que contiene la secuencia NS5b bajo el control del promotor SV40 (figura 1J)
 - 55

3.4 Recombinación homóloga con el genoma adenovírico recombinante pIV317 para obtener el adenovirus del título

Se han realizado las etapas siguientes:

- 60 - Digestión del plásmido pIV317 obtenido en el punto 2.3 anterior por *SrfI* (en Universal Buffer, Stratagene)
- Digestión del plásmido pIV336 obtenido en el punto 3.3 por *NheI/SacI* (en BufferT, Amersham Pharmacia Biotech) y aislamiento sobre gel de agarosa del fragmento que contiene el casete pSV40-NS5b
 - 65 - Transformación bacteriana (cepa BJ) para realizar la recombinación homóloga entre los dos fragmentos

plasmídicos

- Selección de los clones bacterianos en medio LB + ampicilina (100 µg/ml)
- 5 - Maxi-preparación plasmídica (Qiagen) de un clon positivo después del análisis de restricción
- Análisis de restricción: digestión por *Sma*I y obtención de fragmentos de: 6480, 4456, 3814, 3540, 3386, 2739, 2463, 2263, 2164, 1455, 1398, 1105, 909, 760, 719, 621, 230, 214 y 180 pb
- 10 - Obtención del genoma adenovirico completo deseado, delecionado de la región E1, habiendo sido esta sustituida por el casete de expresión pCMV-NS3-NS4, y delecionado de la región E3, habiendo sido ésta sustituida por el casete de expresión pSV40-NS5B (plásmido pIV342, figura 1K)

4. Confirmación de la expresión de los antígenos insertados en los diferentes adenovirus

- 15 La expresión de los antígenos del VHC codificados por los adenovirus AdNS3NS4, AdNS5b y AdNS3NS4NS5b ha sido verificada mediante transferencia Western después de la infección de células Huh7. Tal como se esperaba, todos los antígenos han sido expresados.

20 **Ejemplo 2: Preparación de un poxvirus según la invención que permite la expresión de las proteínas NS3/NS4 y NS5b**

1. Poxvirus MVA

- 25 La cepa Modified Virus Ankara MVATG N33 ha sido suministrada por TRANSGENE S.A. (Estrasburgo, Francia).

2. Preparación del plásmido de transferencia que permite la expresión del gen NS3/NS4 bajo el control del promotor ph5r

- 30 2.1 Construcción del vector pIV250 que contiene los brazos de recombinación BRG2 y BRD2 del MVA, así como el gen de selección GPT bajo el control del promotor ph5r (MVA) seguido de un segundo promotor ph5r para permitir la expresión del gen de interés

35 En este punto, se desea la inserción del fragmento ph5r-GPT-BRG3-ph5r (que procede del plásmido pTG9997, Transgène) en el plásmido pTG6018 (Transgène) que contiene los brazos de recombinación BRG2 y BRD2.

Para ello, se han realizado las etapas siguientes:

- Digestión enzimática por *Bam*HI/*Sac*I (en React 2 Buffer, Invitrogen) del vector pTG6018 (figura 2A)
- 40 - Digestión enzimática por *Bam*HI, y después digestión parcial por *Sac*I del plásmido pTG9997 (figura 2B)
- Purificación según el protocolo de QIAGEN del fragmento de restricción de 1047 pb que contiene la secuencia que codifica para el ph5r-GPT-BRG3-ph5r
- 45 - Ligadura (T4 DNA Ligase), transformación bacteriana (cepa TG1, Statagene)
- Selección de los clones bacterianos sobre ampicilina (100 µg/ml)
- 50 - Maxi-preparación plasmídica (Qiagen) de un clon positivo después del análisis de restricción (*Eco*RV+*Hind*III (en React 2 Buffer, Invitrogen): fragmentos de 246, 439, 476, 826 y 2789 pb; *Sac*I: fragmentos de 915 y 3861 pb)
- Obtención del plásmido previsto (pIV250, figura 2C).

55 2.2 Amplificación por PCR de la secuencia nucleotídica que codifica para la poliproteína NS3/NS4

Se han utilizado los oligonucleótidos siguientes:

- 60 oIV225: 5'- GGG GGG CTG CAG ATG GCG CCT ATC ACG GCC TA -3' (SEC ID nº 15)
oIV226: 5'- GGG GGG TCT AGA TTA GCA TGG CGT GGA GCA GT -3' (SEC ID nº 16)

y según el modo de realización descrito en el ejemplo 1, punto 2.1 anterior, excepto que se ha utilizado una temperatura de 52°C en lugar de 62°C

2.3 Inserción del fragmento de PCR NS3-NS4 en el plásmido pIV250

Para ello, se han realizado las etapas siguientes:

- 5 - Digestión enzimática del plásmido pIV250 obtenido en el punto 2.1 anterior por *Pst*I (en React 2 Buffer, Invitrogen)/*Xba*I
- Digestión enzimática del fragmento PCR NS3/NS4 por *Pst*I/*Xba*I
- 10 - Ligadura (T4 DNA Ligase), transformación bacteriana (cepa TG1)
- Selección de los clones bacterianos sobre ampicilina (100 µg/ml)
- 15 - Maxi-preparación plasmídica (Qiagen) de un clon positivo después del análisis de restricción -(*Hind*III (en React 2 Buffer, Invitrogen): fragmentos de 4763 y 2789 pb; *Sph*I (en React 6 Buffer, Invitrogen): 1534 y 5991 pb; *Nco*I (en React 3 Buffer, Invitrogen): 2764 y 4761 pb)
- Obtención del plásmido de transferencia que contiene la secuencia que codifica para la poliproteína NS3/NS4 bajo el control del promotor ph5r (pIV327, figura 2D).
- 20

3 Preparación del plásmido pIV328 que permite la expresión de la proteína NS5b bajo el control del promotor p7,5

3.1 Amplificación por PCR de la secuencia nucleotídica que codifica para la proteína NS5b

25 Se han utilizado los oligonucleótidos siguientes:

oIV227: 5'- GGG GGG GTC GAC ATG TCA ATG TCC TAC ACA TGG AC -3' (SEC ID nº 17)
 oIV228: 5'- GGG GGG GCA TGC TTA CCG GTT GGG GAG CAG GT -3' (SEC ID nº 18)

30 y según el modo de realización descrito en el ejemplo 1, punto 2.1 anterior, excepto que se ha utilizado una temperatura de 52°C en lugar de 62°C.

3.2 Obtención del plásmido

35 Se han realizado las etapas siguientes:

- Digestión enzimática del fragmento PCR que codifica para NS5b por *Sal*I/*Sph*I
- Digestión enzimática de pTG186 (figura 2E, Transgène) por *Sal*I/*Sph*I
- 40 - Desfosforilación del vector pTG186 (fosfatasa alcalina ROCHE)
- Ligadura (T4 DNA Ligase), transformación bacteriana (cepa TG1)
- 45 - Selección de los clones bacterianos sobre ampicilina (100 µg/ml)
- Maxi-preparación plasmídica (Qiagen) de un clon positivo después del análisis de restricción: (*Hind*III: fragmentos de 1984, 2627 y 4437 pb; *Bgl*II: fragmentos de 321, 557, 1361, 1451, 2237 y 3121 pb; *Kpn*I (en React 4 Buffer, Invitrogen): fragmentos de: 2787 y 6261 pb)
- 50 - Obtención del plásmido de transferencia que contiene la secuencia que codifica para el polipéptido NS5b bajo el control del promotor p7.5 (pIV328, figura 2F)

4 Preparación de los plásmidos de transferencia pIV329 y pIV344 que permiten la expresión del gen que codifica para la poliproteína NS3/NS4 bajo el control del promotor ph5r y del gen que codifica para la proteína NS5b bajo el control del promotor p7.5

Para eso, se han realizado las etapas siguientes:

- 60 - Amplificación por PCR de la secuencia nucleotídica que codifica para la proteína NS5b a partir del plásmido pIV328 obtenido en el punto 3.2 anterior utilizando los oligonucleótidos siguientes:

oIV229: 5'- GGG GGG TCT AGA CCG GTA GTT CGC ATA TAC ATA -3' (SEC ID nº 19)
 oIV218: 5'- GGG GGG TCT AGA TTA CCG GTT GGG GAG CAG GT-3' (SEC ID nº 14)

65 y según el modo de realización descrito en el ejemplo 1, punto 2.1 anterior, excepto que se ha utilizado una

temperatura de 50°C en lugar de 62°C

- Digestión enzimática del fragmento de PCR por *Xba*I
- 5 - Digestión enzimática del plásmido pIV327 obtenido en el punto 2.3 anterior por *Xba*I
- Ligadura (T4 DNA Ligase), transformación bacteriana (cepa TG1)
- Selección de los clones bacterianos sobre ampicilina (100 µg/ml)
- 10 - Maxi-preparación plasmídica (Qiagen) de 2 clones positivos después del análisis de restricción: (PstI: pIV329: fragmentos de 3033 y 6466 pb, pIV344: 4641 y 4858 pb; *Ap*I (en React 4 Buffer, Invitrogen): pN329: 454, 960 y 8085 pb, pIV344: 454, 1418 y 7627 pb; *Nco*I: pIV329: 4269, 469 y 4761 pb, pIV344: 3053, 1685 y 4761 pb; *Sma*I: pIV329: 214, 2164, 1444 y 5677 pb, pIV344: 214, 2164, 928 y 6193 pb)
- 15 - Obtención o bien del plásmido de transferencia que permite la expresión de la poliproteína NS3/NS4 bajo el control del promotor ph5r y de la proteína NS5b bajo el control del promotor p75, estando los 2 casetes de expresión orientados en el mismo sentido (pIV329, figura 2G), o bien del plásmido de transferencia que permite la expresión de la poliproteína NS3/NS4 bajo el control del promotor ph5r y de la proteína NS5b bajo el control del promotor p7.5, estando los 2 casetes de expresión orientados en sentidos opuestos (pN344, figura 2H).
- 20

5. Confirmación de la expresión de los antígenos insertados en los diferentes poxvirus

25 Se ha verificado mediante transferencia Western, después de la infección de células Huh7 con los poxvirus en cuestión, que los poxvirus pIV329 y pIV344, que contienen las secuencias que codifican para la poliproteína NS3NS4 y el polipéptido NS5b, expresaban dichos antígenos del VHC.

Ejemplo 3: Demostración de la inmunogenicidad de la combinación NS3/NS4 y NS5b

30 1. Inmunización de los ratones

Se han inmunizado unos ratones transgénicos HLA-A2.1, una vez, mediante inyección intramuscular de por lo menos un adenovirus seleccionado de entre los adenovirus siguientes:

- 35 - AdNS3NS4 preparado en el ejemplo 1 anterior (punto 2.3),
- AdNS5b preparado en el ejemplo 1 anterior (punto 3.3),
- 40 - AdNS5a preparado según el modo de realización del ejemplo 1, punto 2, excepto que se han utilizado los cebadores nucleotídicos siguientes para amplificar la secuencia nucleotídica que codifica para el polipéptido NS5a (SEC ID nº 5 y 6):

45 oIV172: 5'-GGG GGG GGT ACC ATG TCC GGC TCG TGG CTA AGG-3' (SEC ID nº 20),

oIV173: 5'-GGG GGG TCT AGA TTA GCA GCA GAC GAT GTC GTC-3' (SEC ID nº 21),

que se ha sustituido en la PCR la temperatura de 62°C por 56°C, que la digestión enzimática de pTG13387 y del fragmento NS5a ha sido realizada por *Kpn*I/*Xba*I, el análisis de restricción por digestión por *Sma*I de pTG13387 dando los fragmentos de 180 et 7251 pb y de pTG6624 dando los fragmentos de 2263, 621, 5615, 180, 2463, 6480, 1398, 4456, 1455, 3540, 3386, 230 y 3685 pb.

- 50 - AdCE1E2 según el modo de realización del ejemplo 1, punto 2, excepto que se han utilizado los cebadores nucleotídicos siguientes para amplificar la secuencia nucleotídica que codifica para la poliproteína Core-E1-E2 (también denominada CE1E2) (SEC ID nº 7 y 8):

55 oIV62: 5'-GGG GGG GCT AGC ATG AGC ACA AAT CCT AAA CCT-3' (SEC ID nº 22)

oIV68: 5'-GGG GGG TCT AGA TCA GGC CTC AGC CTG GGC TAT-3' (SEC ID nº 23),

60 que se ha sustituido en la PCR la temperatura de 62°C por 56°C, que la digestión enzimática de pTG13387 y del fragmento CE1E2 se ha realizado por *Nhe*I/*Xba*I, el análisis de restricción por digestión por *Sma*I de pTG13387 dando los fragmentos de 163, 435, 2270, 180 y 5254 pb y de pTG6624 dando los fragmentos de 2263, 621, 3618, 163, 435, 2270, 180, 2463, 6480, 1398, 4456, 1455, 3540, 3386, 230 y 3685 pb,

- AdNS3NS4NS5b preparado en el ejemplo 1 anterior (punto 3) y
- 65 - AdβGal (Transgène),

según el protocolo siguiente:

- 10⁹ pfu de AdNS3NS4 o
- 10⁹ pfu de AdNS5b o
- 5 - 10⁹ pfu de AdCE1E2 o
- 10⁹ pfu de AdNS3NS4 y 10⁹ pfu de AdNS5b o
- 10⁹ pfu de AdNS3NS4, 10⁹ pfu de AdNS5b y 10⁹ pfu de AdNS5a
- 10⁹ pfu de AdNS3NS4, 10⁹ pfu de AdNS5b y 10⁹ pfu de AdCE1E2
- 10⁹ pfu AdNS3NS4NS5b o
- 10 - 10⁹ pfu de Adβ-Gal a título de control.

Antes de la inmunización, se ha verificado, mediante transferencia Western, la expresión de los antígenos del VHC y de β-Gal por los diferentes adenovirus utilizados para la inmunización.

15 2. Ensayos CTL y ELISPOT

Quince días después de la inyección, se ha analizado la respuesta celular aislando las células del bazo (esplenocitos) de los ratones, y se ha realizado un ensayo CTL y un ensayo ELISPOT de esta forma:

20 Para el ensayo CTL, se han cultivado estos esplenocitos en placas de 24 pocillos en presencia de:

- 5 μM del epítipo GLL (GLLGCIITSL, SEC ID nº 24) en el caso de los esplenocitos que proceden de ratones que han recibido AdNS3NS4, 5 μM del epítipo ALY (ALYDVVSTL, SEC ID nº 25) o 5 μM del epítipo KLQ (KLQDCTMLV, SEC ID nº 26) en el caso de los esplenocitos que proceden de ratones que han recibido AdNS5b
- 25 o de 5 μM del epítipo DLM (DLMGYIPLV, SEC ID nº 27) en el caso de los esplenocitos que proceden de ratones que han recibido AdCE1E2, estando estos epítipos en forma de péptido sintético (Eurogentex), y
- 10 U de interleucina 2 recombinante murina (Brinster *et al.*, Hepatology 2001) por ml en un medio mínimo esencial alfa (αMEM) durante 5 días. El 5º día, se ha realizado la etapa de reestimulación que consiste en añadir
- 30 a los esplenocitos en cultivo unos esplenocitos de ratones sin tratamiento previo en presencia de dichos epítipos durante 2 días. El 7º día, se ha realizado el ensayo CTL en sí que consiste en poner en presencia los esplenocitos de ratones inmunizados después de los 7 días de cultivo (células efectoras) y unas células EL4 S3-Rob HDD cargadas con 10 μM de dichos epítipos y marcadas con Cr⁵¹ (células diana). Se ha determinado la actividad citotóxica específica de las células efectoras mediante la medición, después de 4h de incubación con
- 35 las células diana, del Cr⁵¹ liberado tras la lisis de las células dianas utilizando un aparato de recuento γ-Cobra II (Packard, Rungis, Francia). Se ha determinado la liberación espontánea y máxima a partir de pocillos que contienen un medio solo, o bien un tampón de lisis (HCl 1N). Se ha calculado el porcentaje específico de citotoxicidad mediante la fórmula:
- 40
$$\left(\frac{\text{liberación en el ensayo} - \text{liberación espontánea}}{\text{liberación máxima} - \text{liberación espontánea}} \right) \times 100$$
. Se ha determinado la lisis específica de epítipo por la diferencia entre el porcentaje de lisis específica obtenido en presencia o en ausencia de dichos epítipos.

Se ha realizado el ensayo ELISPOT cultivando los esplenocitos durante 48h en unas placas de 96 pocillos Multiscreen (Millipore) previamente "recubiertas" con un anticuerpo anti-interferón gamma (IFNγ) (10 μg/ml final). Se han cultivado los esplenocitos en presencia de 10 μM de los epítipos apropiados, tal como se ha indicado anteriormente, y de 10 U de interleucina 2 recombinante murina por ml en αMEM. Para el control positivo, se han cultivado los esplenocitos o bien en presencia de concanavalina A (5 μg/ml). Para el control negativo, se han cultivado los esplenocitos en presencia de un péptido no específico que pertenece a la proteína de cápside del VHC, de secuencia DLMGYIPLV (asimismo denominado péptido irrelevante), o bien en medio solo sin epítipo. Se han lavado los pocillos tres veces, respectivamente con PBS-Tween 0,05% y después PBS, operación seguida de una incubación de 2h con unos anticuerpos anti-IFNγ de ratón biotinilados. Después del lavado, se han incubado los pocillos durante 1h con un conjugado de estreptavidina-peroxidasa de rábano picante y se ha revelado la actividad enzimática mediante degradación del sustrato AEC (aminoetilcarbazol). Los puntos obtenidos han sido contados gracias a un lector ELISpot Zeiss (microscopio Zeiss acoplado al programa KS-ELISpot).

Los resultados están indicados en las figuras 3 a 5 en las que S corresponde a ratón y ratón neg corresponde al ratón control.

60 Estos resultados demuestran que

- el AdNS3NS4 induce realmente una respuesta con mediación celular específica de los antígenos expresados, tal como se ha ilustrado en las figuras 3A y 3B, mediante la detección de linfocitos T específicos del epítipo GLL contenido en NS3.
- 65 - El AdNS5b induce realmente una respuesta con mediación celular específica de los antígenos expresados, tal

como se ha ilustrado en la figura 4, mediante la detección de linfocitos T específicos del epítipo ALY y KLQ contenidos en NS5b.

- El AdCE1E2 induce realmente una respuesta con mediación celular específica de los antígenos expresados, tal como se ha ilustrado en la figura 5, mediante la detección de linfocitos T específicos del epítipo DLM contenidos en la proteína Core.

3. Ensayo de prueba *in vivo* con la ayuda de un virus de vacuna recombinante

Con el fin de evaluar si las respuestas inmunes específicas inducidas por los diferentes adenovirus eran capaces de inducir una protección contra una prueba infecciosa ("protección *in vivo*"), se han sometido los ratones vacunados a dicha prueba.

Como el ratón no se puede infectar directamente por el VHC, se ha utilizado por lo tanto, para unir la inducción de una respuesta inmunitaria específica y la resistencia a una infección, un virus de vacuna recombinante (cepa WR) que codifica para las proteínas no estructurales del VHC (NS2 a NS5b) para realizar esta prueba. Este virus recombinante de la vacuna, después de una inyección intra-peritoneal de 10^7 pfu al ratón, se replicará en el animal. La replicación de este virus induce una respuesta inmunitaria al mismo tiempo específica de los antígenos de la vacuna y específica de los antígenos del VHC, tal como expresa asimismo las proteínas NS del VHC. Esta respuesta específica de los antígenos del VHC será aún más eficaz y vigorosa por cuanto que los ratones habrán recibido ya una vacuna que expresa los antígenos del VHC. En otras palabras, cuanto más eficaz (es decir que el sistema inmune de los ratones habrá sido "premiado" eficazmente por la vacuna) haya sido la vacunación (en el presente caso realizada con los adenovirus recombinantes), más fuerte será la respuesta anti-VHC generada después de la prueba por el virus recombinante de la vacuna y, en consecuencia, más "protegidos" estarán los ratones contra esta prueba. En la práctica, cuanto más bajo sea el porcentaje residual de virus de la vacuna en los ratones, más eficaz habrá sido la protección o la neutralización debida a la vacunación.

La neutralización del virus de la vacuna refleja al mismo tiempo la respuesta celular inducida por las proteínas del VHC y por las proteínas de la vacuna. La neutralización se evalúa mediante titulación del virus de vacuna residual a partir de los ovarios de los animales como sigue: los ovarios son extraídos 4 días después de la prueba, se sonicán, se congelan-descongelan 3 veces y, después de la centrifugación, se titulan unas diluciones sucesivas de sobrenadante según la técnica de las zonas de lisis (Murata *et al.*, PNAS, vol. 100, p. 6753-6758) sobre células Hutk-. Los títulos víricos son determinados en pfu/ml/mg de ovario.

4. Demostración de una protección superior de una vacunación que combina la poliproteína NS3/NS4 y el polipéptido NS5b

Se ha determinado el título de virus recombinante de la vacuna para 4 grupos de 8 ratones inmunizadas por las combinaciones de adenovirus siguientes: AdNS3NS4 + AdNS5b (1^{er} grupo), AdNS3NS4 + AdNS5b + AdNS5a (2^o grupo), AdNS3NS4 + AdNS5b + AdCE1E2 (3^{er} grupo) y Ad β Gal (4^o grupo).

Los resultados, indicados en la figura 6, son tratados de manera estadística basándose en el ensayo no paramétrico de Mann Whitney Wilcoxon (métodos estadísticos para uso de los médicos y de los biólogos, Collection Statistique en Biologie et en Médecine, Flammarion Medecine Sciences, (D. Schwartz), 1977) que se basa en una comparación de las medias, y permite la comparación de los valores de dos muestras x e y independientes.

Este ensayo se realiza como sigue: el conjunto de los valores de los dos grupos x e y a comparar se clasifica de manera creciente. Después, se atribuye un rango a cada valor, y se efectúa la suma de los rangos. Se obtiene entonces W_x y W_y . Se calcula entonces un valor de referencia denominado $(W_x)_t$ (valor teórico en la hipótesis nula en la que W_x no es diferente de W_y) y relacionado por la relación: $n(N+1)/2$, siendo n = número de ratones ensayados en el grupo x y N = número de ratones ensayados en los grupos x e y.

Si W_x es inferior a $(W_x)_t$ (porcentaje residual de virus de la vacuna en los ratones bajo) entonces se puede concluir que la neutralización debida a la vacunación es significativamente eficaz.

Si se considera el ejemplo del grupo AdNS3NS4NS5b anotado x comparado con el grupo Ad β Gal anotado y, se obtienen los valores siguientes:

$$W_x = 1+2+4+6+8+11+13+14 = 59 \text{ (8 ratones ensayados)}$$

$$W_y = 3+5+7+9+10+12+15+16 = 77 \text{ (8 ratones ensayados)}$$

Bajo la hipótesis nula, W_x no es diferente de W_y , y el valor esperado es: $(W_x)_t = (1/2)*8*17 = 68$.

$W_x < (W_x)_t$, lo cual significa que los valores obtenidos en el grupo AdNS3NS4NS5b son menores que los obtenidos en el grupo Ad β Gal, y que la neutralización debida a la vacunación es significativamente eficaz.

Los valores estadísticos para los demás grupos de ratones se indican en la tabla 1 siguiente:

Tabla 1

Grupo/AdβGal	Wx	(Wx) _t
AdNS3NS4 + NS5b	52	68
AdNS3NS4 + NS5b + NS5a	68	68
AdNS3NS4 + NS5b + CE1E2	74	68

5 Los valores en la tabla 1 anterior muestran que sólo una vacunación de los ratones por la combinación de los adenovirus NS3NS4 y adenovirus NS5b es capaz de inducir una neutralización significativa de la replicación del virus de la vacuna utilizado en la prueba con respecto al grupo de ratones control vacunado por AdβGal. Las vacunaciones realizadas utilizando las combinaciones que comprenden (AdNS3NS4 + AdNS5b + AdNS5a) o
10 (AdNS3/NS4 + AdNS5b + AdCE1E2), no llegan a una diferencia significativa con respecto al grupo de ratones control inmunizado por AdβGal.

Estos resultados permiten por lo tanto demostrar, de manera inesperada, la protección superior de una vacunación que combina la poliproteína NS3NS4 y el polipéptido NS5b.

15 5. Confirmación de la protección de una vacunación que combina la poliproteína NS3/NS4 y el polipéptido NS5b expresados conjuntamente por un mismo vector

20 Se ha determinado el título de virus recombinante de la vacuna para 3 grupos de 8 ratones inmunizados por las combinaciones de adenovirus siguientes: AdNS3NS4NS5b (1º grupo), AdNS3NS4 + AdNS5b (2º grupo) y AdβGal (3º grupo).

Los resultados, indicados en la figura 7, son tratados de manera estadística basándose en el ensayo no paramétrico de Mann Whitney Wilcoxon, tal como se ha descrito en el experimento anterior.

25 Los valores estadísticos para los grupos 1 y 2 comparados con el grupo control AdβGal se indican en la tabla 2 siguiente:

Tabla 2

Grupo/AdβGal	Wx	(Wx) _t
AdNS3NS4NS5b	49	68
AdNS3NS4 + NS5b	53	68

30 Los valores en la tabla 2 anterior muestran que la vacunación de los ratones por un adenovirus que codifica al mismo tiempo para los tres antígenos NS3, NS4 y NS5b, así como la combinación de los adenovirus NS3NS4 y adenovirus NS5b, es capaz de inducir una neutralización significativa de la replicación del virus de la vacuna
35 utilizado en la prueba con respecto al grupo de ratones control por el AdenoβGal. Este resultado confirma la protección de una vacunación que combina la poliproteína NS3/NS4 y el polipéptido NS5b expresados conjuntamente por un mismo vector.

Listado de secuencias

- <110> BIOMERIEUX
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE
- 5 <120> Composición que comprende la poliproteína NS3/NS4 y el polipéptido NS5b del VHC, vectores de expresión que incluyen las secuencias correspondientes y su uso en terapéutica
- <130> ADENOVIR
- 10 <160> 27
<170> PatentIn version 3.1
- <210> 1
- <211> 2844
- 15 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
- <220>
<223> secuencia que codifica NS3NS4
- 20 <220>
<221> CDS
<222> (1)..(2844)
<223>
- 25 <400> 1

```

atg gcg cct atc acg gcc tat tcc caa caa acg cgg ggc ctg ctt ggc      48
Met Ala Pro Ile Thr Ala Tyr Ser Gln Gln Thr Arg Gly Leu Leu Gly
1                    5                                10                    15

tgt atc atc act agc ctc aca ggt cgg gac aag aac cag gtc gat ggg      96
Cys Ile Ile Thr Ser Leu Thr Gly Arg Asp Lys Asn Gln Val Asp Gly
20                    25                                30

gag gtt cag gtg ctc tcc acc gca acg caa tct ttc ctg gcg acc tgc      144
Glu Val Gln Val Leu Ser Thr Ala Thr Gln Ser Phe Leu Ala Thr Cys
35                    40                                45

gtc aat ggc gtg tgt tgg acc gtc tac cat ggt gcc ggc tcg aag acc      192
Val Asn Gly Val Cys Trp Thr Val Tyr His Gly Ala Gly Ser Lys Thr
50                    55                                60

ctg gcc ggc ccg aag ggt cca atc acc caa atg tac acc aat gta gac      240
Leu Ala Gly Pro Lys Gly Pro Ile Thr Gln Met Tyr Thr Asn Val Asp
65                    70                                75                                80

cag gac ctc gtc ggc tgg ccg gcg ccc ccc ggg gcg cgc tcc atg aca      288
Gln Asp Leu Val Gly Trp Pro Ala Pro Pro Gly Ala Arg Ser Met Thr
85                    90                                95

ccg tgc acc tgc ggc agc tcg gac ctt tac ttg gtc acg agg cat gcc      336
Pro Cys Thr Cys Gly Ser Ser Asp Leu Tyr Leu Val Thr Arg His Ala
100                    105                                110

gat gtc att ccg gtg cgc cgg cga ggc gac agc agg ggg agt cta ctc      384
Asp Val Ile Pro Val Arg Arg Arg Gly Asp Ser Arg Gly Ser Leu Leu
115                    120                                125

```

tcc cct agg ccc gtc tcc tac ctg aag ggc tcc tcg ggt gga cca ctg	432
Ser Pro Arg Pro Val Ser Tyr Leu Lys Gly Ser Ser Gly Gly Pro Leu	
130 135 140	
ctt tgc cct tcg ggg cac gtt gta ggc atc ttc cgg gct gct gtg tgc	480
Leu Cys Pro Ser Gly His Val Val Gly Ile Phe Arg Ala Ala Val Cys	
145 150 155 160	
acc cgg ggg gtt gcg aag gcg gtg gac ttc ata ccc gtt gag tct atg	528
Thr Arg Gly Val Ala Lys Ala Val Asp Phe Ile Pro Val Glu Ser Met	
165 170 175	
gaa act acc atg cgg tct ccg gtc ttc aca gac aac tca tcc cct ccg	576
Glu Thr Thr Met Arg Ser Pro Val Phe Thr Asp Asn Ser Ser Pro Pro	
180 185 190	
gcc gta ccg caa aca ttc caa gtg gca cat tta cac gct ccc act ggc	624
Ala Val Pro Gln Thr Phe Gln Val Ala His Leu His Ala Pro Thr Gly	
195 200 205	
agc ggc aag agc acc aaa gtg ccg gct gca tat gca gcc caa ggg tac	672
Ser Gly Lys Ser Thr Lys Val Pro Ala Ala Tyr Ala Ala Gln Gly Tyr	
210 215 220	
aag gtg ctc gtc cta aac ccg tcc gtt gct gcc aca ttg ggc ttt gga	720
Lys Val Leu Val Leu Asn Pro Ser Val Ala Ala Thr Leu Gly Phe Gly	
225 230 235 240	
gcg tat atg tcc aag gca cat ggc atc gag cct aac atc aga act ggg	768
Ala Tyr Met Ser Lys Ala His Gly Ile Glu Pro Asn Ile Arg Thr Gly	
245 250 255	
gta agg acc atc acc acg ggc ggc ccc atc acg tac tcc acc tat ggc	816
Val Arg Thr Ile Thr Thr Gly Gly Pro Ile Thr Tyr Ser Thr Tyr Gly	
260 265 270	
aag ttc ctt gcc gac ggt gga tgc tcc ggg ggc gcc tat gac atc ata	864
Lys Phe Leu Ala Asp Gly Gly Cys Ser Gly Gly Ala Tyr Asp Ile Ile	
275 280 285	
ata tgt gac gaa tgc cac tca act gac tgg aca acc atc ttg ggc atc	912
Ile Cys Asp Glu Cys His Ser Thr Asp Trp Thr Thr Ile Leu Gly Ile	
290 295 300	
ggc aca gtc ctg gat cag gca gag acg gct gga gcg cgg ctc gtc gtg	960
Gly Thr Val Leu Asp Gln Ala Glu Thr Ala Gly Ala Arg Leu Val Val	
305 310 315 320	
ctc gcc acc gcc acg cct ccg gga tcg atc acc gtg cca cac ccc aac	1008
Leu Ala Thr Ala Thr Pro Pro Gly Ser Ile Thr Val Pro His Pro Asn	
325 330 335	
atc gag gaa gtg gcc ctg tcc aac act ggg gag att ccc ttc tat ggc	1056
Ile Glu Glu Val Ala Leu Ser Asn Thr Gly Glu Ile Pro Phe Tyr Gly	
340 345 350	
aaa gcc atc ccc att gag gcc atc aag ggg gga agg cat ctc atc ttc	1104
Lys Ala Ile Pro Ile Glu Ala Ile Lys Gly Gly Arg His Leu Ile Phe	
355 360 365	

tgc cat tcc aag aag aag tgt gac gag ctc gcc gca aag ctg aca ggc	1152
Cys His Ser Lys Lys Lys Cys Asp Glu Leu Ala Ala Lys Leu Thr Gly	
370 375 380	
ctc gga ctc aat gct gta gcg tat tac cgg ggt ctc gat gtg tcc gtc	1200
Leu Gly Leu Asn Ala Val Ala Tyr Tyr Arg Gly Leu Asp Val Ser Val	
385 390 395 400	
ata ccg act agc gga gac gtc gtt gtc gtg gca aca gac gct cta atg	1248
Ile Pro Thr Ser Gly Asp Val Val Val Val Ala Thr Asp Ala Leu Met	
405 410 415	
acg ggc ttt acc ggc gac ttt gac tca gtg atc gac tgc aac aca tgt	1296
Thr Gly Phe Thr Gly Asp Phe Asp Ser Val Ile Asp Cys Asn Thr Cys	
420 425 430	
gtc acc cag aca gtc gat ttc agc ttg gat ccc acc ttc acc att gag	1344
Val Thr Gln Thr Val Asp Phe Ser Leu Asp Pro Thr Phe Thr Ile Glu	
435 440 445	
acg aca acc gtg ccc caa gac gcg gtg tcg cgc tcg cag cgg cga ggt	1392
Thr Thr Thr Val Pro Gln Asp Ala Val Ser Arg Ser Gln Arg Arg Gly	
450 455 460	
agg act ggc agg ggc agg agt ggc atc tac agg ttt gtg act cca gga	1440
Arg Thr Gly Arg Gly Arg Ser Gly Ile Tyr Arg Phe Val Thr Pro Gly	
465 470 475 480	
gaa cgg ccc tca ggc atg ttc gac tcc tcg gtc ctg tgt gag tgc tat	1488
Glu Arg Pro Ser Gly Met Phe Asp Ser Ser Val Leu Cys Glu Cys Tyr	
485 490 495	
gac gca ggc tgc gct tgg tat gag ctc acg ccc gct gag act aca gtc	1536
Asp Ala Gly Cys Ala Trp Tyr Glu Leu Thr Pro Ala Glu Thr Val	
500 505 510	
agg ttg cgg gct tac ctg aat aca cca ggg ttg ccc gtc tgc cag gac	1584
Arg Leu Arg Ala Tyr Leu Asn Thr Pro Gly Leu Pro Val Cys Gln Asp	
515 520 525	
cat ctg gag ttc tgg gaa agc gtc ttc aca ggc ctc acc cac ata gat	1632
His Leu Glu Phe Trp Glu Ser Val Phe Thr Gly Leu Thr His Ile Asp	
530 535 540	
gcc cac ttc ctg tcc caa acc aag cag gca gga gac aac ttc ccc tac	1680
Ala His Phe Leu Ser Gln Thr Lys Gln Ala Gly Asp Asn Phe Pro Tyr	
545 550 555 560	
ctg gtg gca tac caa gcc acg gtg tgc gcc agg gct cag gct cca cct	1728
Leu Val Ala Tyr Gln Ala Thr Val Cys Ala Arg Ala Gln Ala Pro Pro	
565 570 575	
cca tcg tgg gat caa atg tgg aag tgt ctc ata cgg ctt aaa cct acg	1776
Pro Ser Trp Asp Gln Met Trp Lys Cys Leu Ile Arg Leu Lys Pro Thr	
580 585 590	
ctg cac ggg cca aca ccc ctg ctg tat agg cta gga gcc gtt caa aat	1824
Leu His Gly Pro Thr Pro Leu Leu Tyr Arg Leu Gly Ala Val Gln Asn	
595 600 605	

gag atc acc ctc acā cat ccc ata acc aaa ttc gtc atg gca tgc atg Glu Ile Thr Leu Thr His Pro Ile Thr Lys Phe Val Met Ala Cys Met 610 615 620	1872
tcg gcc gac ctg gag gtc gtc act agc acc tgg gtg ctg gta ggc gga Ser Ala Asp Leu Glu Val Val Thr Ser Thr Trp Val Leu Val Gly Gly 625 630 635 640	1920
gtc ctt gca gct ctg gcc gca tat tgc ctg aca acc ggt agt gtg gtc Val Leu Ala Ala Leu Ala Ala Tyr Cys Leu Thr Thr Gly Ser Val Val 645 650 655	1968
att gtg ggt agg atc att ttg tcc ggg agg ccg gct gtt gtt ccc gac Ile Val Gly Arg Ile Ile Leu Ser Gly Arg Pro Ala Val Val Pro Asp 660 665 670	2016
agg gaa gtc ctc tac cgg gag ttc gat gaa atg gaa gag tgc gcc tca Arg Glu Val Leu Tyr Arg Glu Phe Asp Glu Met Glu Glu Cys Ala Ser 675 680 685	2064
cac ctc cct tac atc gag caa gga atg cag ctc gcc gag cag ttc aag His Leu Pro Tyr Ile Glu Gln Gly Met Gln Leu Ala Glu Gln Phe Lys 690 695 700	2112
cag cag gca ctc ggg ttg ctg caa aca gcc acc aag caa gcg gag gcc Gln Gln Ala Leu Gly Leu Leu Gln Thr Ala Thr Lys Gln Ala Glu Ala 705 710 715 720	2160
gct gct ccc gtg gtg gag tcc agg tgg cgg gcc ctt gag gcc ttc tgg Ala Ala Pro Val Val Glu Ser Arg Trp Arg Ala Leu Glu Ala Phe Trp 725 730 735	2208
gca aag cac atg tgg aac ttc atc agc ggg ata cag tac tta gca ggc Ala Lys His Met Trp Asn Phe Ile Ser Gly Ile Gln Tyr Leu Ala Gly 740 745 750	2256
tta tcc act ctg cct ggg aac ccc gcg ata gca tca ctg atg gca ttc Leu Ser Thr Leu Pro Gly Asn Pro Ala Ile Ala Ser Leu Met Ala Phe 755 760 765	2304
aca gcc tct atc acc agt ccg ctc acc acc cag aat acc ctc cta ttc Thr Ala Ser Ile Thr Ser Pro Leu Thr Thr Gln Asn Thr Leu Leu Phe 770 775 780	2352
aac atc tta ggg gga tgg gtg gct gct caa ctc gct cct ccc agt gct Asn Ile Leu Gly Gly Trp Val Ala Ala Gln Leu Ala Pro Pro Ser Ala 785 790 795 800	2400
gct tcg gcc ttc gtg ggt gcc ggc att gcc ggt gcg gcc att ggc agc Ala Ser Ala Phe Val Gly Ala Gly Ile Ala Gly Ala Ala Ile Gly Ser 805 810 815	2448
ata ggc ctt ggg aag gtg ctt gtg gac att ctg gcg ggc tat gga gcg Ile Gly Leu Gly Lys Val Leu Val Asp Ile Leu Ala Gly Tyr Gly Ala 820 825 830	2496
ggg gtg gcc ggt gca ctc gtg gct ttt aag gtc atg agc ggc gag gcg Gly Val Ala Gly Ala Leu Val Ala Phe Lys Val Met Ser Gly Glu Ala 835 840 845	2544

```

ccc tcc gcc gag gac ctg gtt aac ttg ctc cct gcc atc ctc tcc ccc      2592
Pro Ser Ala Glu Asp Leu Val Asn Leu Leu Pro Ala Ile Leu Ser Pro
      850                               855                               860

ggc gcc ttg gtc gtc ggg atc gtg tgt gca gca atc ctg cgt cgg cac      2640
Gly Ala Leu Val Val Gly Ile Val Cys Ala Ala Ile Leu Arg Arg His
      865                               870                               875                               880

gtg ggc ccg gga gag ggg gct gtg cag tgg atg aac cgg ctg ata gcg      2688
Val Gly Pro Gly Glu Gly Ala Val Gln Trp Met Asn Arg Leu Ile Ala
      885                               890                               895

ttc gct tcg cgg ggt aac cac gtt tcc ccc acg cac tac gtg cct gag      2736
Phe Ala Ser Arg Gly Asn His Val Ser Pro Thr His Tyr Val Pro Glu
      900                               905                               910

agc gac gcc gca gca cgt gta act cag atc ctc tcc agc ctc acc atc      2784
Ser Asp Ala Ala Ala Arg Val Thr Gln Ile Leu Ser Ser Leu Thr Ile
      915                               920                               925

act cag ctg ctg aag agg ctt cac cag tgg att aat gag gac tgc tcc      2832
Thr Gln Leu Leu Lys Arg Leu His Gln Trp Ile Asn Glu Asp Cys Ser
      930                               935                               940

acg cca tgc taa
Thr Pro Cys
945

```

<210> 2
 <211> 947
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia que codifica NS3NS4

10 <400> 2

```

Met Ala Pro Ile Thr Ala Tyr Ser Gln Gln Thr Arg Gly Leu Leu Gly
 1                               5                               10                               15

Cys Ile Ile Thr Ser Leu Thr Gly Arg Asp Lys Asn Gln Val Asp Gly
      20                               25                               30

Glu Val Gln Val Leu Ser Thr Ala Thr Gln Ser Phe Leu Ala Thr Cys
      35                               40                               45

Val Asn Gly Val Cys Trp Thr Val Tyr His Gly Ala Gly Ser Lys Thr
      50                               55                               60

Leu Ala Gly Pro Lys Gly Pro Ile Thr Gln Met Tyr Thr Asn Val Asp
      65                               70                               75                               80

Gln Asp Leu Val Gly Trp Pro Ala Pro Pro Gly Ala Arg Ser Met Thr
      85                               90                               95

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

```


Asp Val Ile Pro Val Arg Arg Arg Gly Asp Ser Arg Gly Ser Leu Leu
 115 120 125
 Ser Pro Arg Pro Val Ser Tyr Leu Lys Gly Ser Ser Gly Gly Pro Leu
 130 135 140
 Leu Cys Pro Ser Gly His Val Val Gly Ile Phe Arg Ala Ala Val Cys
 145 150 155 160
 Thr Arg Gly Val Ala Lys Ala Val Asp Phe Ile Pro Val Glu Ser Met
 165 170 175
 Glu Thr Thr Met Arg Ser Pro Val Phe Thr Asp Asn Ser Ser Pro Pro
 180 185 190
 Ala Val Pro Gln Thr Phe Gln Val Ala His Leu His Ala Pro Thr Gly
 195 200 205
 Ser Gly Lys Ser Thr Lys Val Pro Ala Ala Tyr Ala Ala Gln Gly Tyr
 210 215 220
 Lys Val Leu Val Leu Asn Pro Ser Val Ala Ala Thr Leu Gly Phe Gly
 225 230 235 240
 Ala Tyr Met Ser Lys Ala His Gly Ile Glu Pro Asn Ile Arg Thr Gly
 245 250 255
 Val Arg Thr Ile Thr Thr Gly Gly Pro Ile Thr Tyr Ser Thr Tyr Gly
 260 265 270
 Lys Phe Leu Ala Asp Gly Gly Cys Ser Gly Gly Ala Tyr Asp Ile Ile
 275 280 285
 Ile Cys Asp Glu Cys His Ser Thr Asp Trp Thr Thr Ile Leu Gly Ile
 290 295 300
 Gly Thr Val Leu Asp Gln Ala Glu Thr Ala Gly Ala Arg Leu Val Val
 305 310 315 320
 Leu Ala Thr Ala Thr Pro Pro Gly Ser Ile Thr Val Pro His Pro Asn
 325 330 335
 Ile Glu Glu Val Ala Leu Ser Asn Thr Gly Glu Ile Pro Phe Tyr Gly
 340 345 350
 Lys Ala Ile Pro Ile Glu Ala Ile Lys Gly Gly Arg His Leu Ile Phe
 355 360 365
 Cys His Ser Lys Lys Lys Cys Asp Glu Leu Ala Ala Lys Leu Thr Gly
 370 375 380
 Leu Gly Leu Asn Ala Val Ala Tyr Tyr Arg Gly Leu Asp Val Ser Val
 385 390 395 400
 Ile Pro Thr Ser Gly Asp Val Val Val Val Ala Thr Asp Ala Leu Met
 405 410 415
 Thr Gly Phe Thr Gly Asp Phe Asp Ser Val Ile Asp Cys Asn Thr Cys
 420 425 430

Val Thr Gln Thr Val Asp Phe Ser Leu Asp Pro Thr Phe Thr Ile Glu
 435 440 445
 Thr Thr Thr Val Pro Gln Asp Ala Val Ser Arg Ser Gln Arg Arg Gly
 450 455 460
 Arg Thr Gly Arg Gly Arg Ser Gly Ile Tyr Arg Phe Val Thr Pro Gly
 465 470 475 480
 Glu Arg Pro Ser Gly Met Phe Asp Ser Ser Val Leu Cys Glu Cys Tyr
 485 490 495
 Asp Ala Gly Cys Ala Trp Tyr Glu Leu Thr Pro Ala Glu Thr Thr Val
 500 505 510
 Arg Leu Arg Ala Tyr Leu Asn Thr Pro Gly Leu Pro Val Cys Gln Asp
 515 520 525
 His Leu Glu Phe Trp Glu Ser Val Phe Thr Gly Leu Thr His Ile Asp
 530 535 540
 Ala His Phe Leu Ser Gln Thr Lys Gln Ala Gly Asp Asn Phe Pro Tyr
 545 550 555 560
 Leu Val Ala Tyr Gln Ala Thr Val Cys Ala Arg Ala Gln Ala Pro Pro
 565 570 575
 Pro Ser Trp Asp Gln Met Trp Lys Cys Leu Ile Arg Leu Lys Pro Thr
 580 585 590
 Leu His Gly Pro Thr Pro Leu Leu Tyr Arg Leu Gly Ala Val Gln Asn
 595 600 605
 Glu Ile Thr Leu Thr His Pro Ile Thr Lys Phe Val Met Ala Cys Met
 610 615 620
 Ser Ala Asp Leu Glu Val Val Thr Ser Thr Trp Val Leu Val Gly Gly
 625 630 635 640
 Val Leu Ala Ala Leu Ala Ala Tyr Cys Leu Thr Thr Gly Ser Val Val
 645 650 655
 Ile Val Gly Arg Ile Ile Leu Ser Gly Arg Pro Ala Val Val Pro Asp
 660 665 670
 Arg Glu Val Leu Tyr Arg Glu Phe Asp Glu Met Glu Glu Cys Ala Ser
 675 680 685
 His Leu Pro Tyr Ile Glu Gln Gly Met Gln Leu Ala Glu Gln Phe Lys
 690 695 700
 Gln Gln Ala Leu Gly Leu Leu Gln Thr Ala Thr Lys Gln Ala Glu Ala
 705 710 715 720
 Ala Ala Pro Val Val Glu Ser Arg Trp Arg Ala Leu Glu Ala Phe Trp
 725 730 735
 Ala Lys His Met Trp Asn Phe Ile Ser Gly Ile Gln Tyr Leu Ala Gly
 740 745 750

```

Leu Ser Thr Leu Pro Gly Asn Pro Ala Ile Ala Ser Leu Met Ala Phe
    755                                760                                765

Thr Ala Ser Ile Thr Ser Pro Leu Thr Thr Gln Asn Thr Leu Leu Phe
    770                                775                                780

Asn Ile Leu Gly Gly Trp Val Ala Ala Gln Leu Ala Pro Pro Ser Ala
    785                                790                                795                                800

Ala Ser Ala Phe Val Gly Ala Gly Ile Ala Gly Ala Ala Ile Gly Ser
    805                                810                                815

Ile Gly Leu Gly Lys Val Leu Val Asp Ile Leu Ala Gly Tyr Gly Ala
    820                                825                                830

Gly Val Ala Gly Ala Leu Val Ala Phe Lys Val Met Ser Gly Glu Ala
    835                                840                                845

Pro Ser Ala Glu Asp Leu Val Asn Leu Leu Pro Ala Ile Leu Ser Pro
    850                                855                                860

Gly Ala Leu Val Val Gly Ile Val Cys Ala Ala Ile Leu Arg Arg His
    865                                870                                875                                880

Val Gly Pro Gly Glu Gly Ala Val Gln Trp Met Asn Arg Leu Ile Ala
    885                                890                                895

Phe Ala Ser Arg Gly Asn His Val Ser Pro Thr His Tyr Val Pro Glu
    900                                905                                910

Ser Asp Ala Ala Ala Arg Val Thr Gln Ile Leu Ser Ser Leu Thr Ile
    915                                920                                925

Thr Gln Leu Leu Lys Arg Leu His Gln Trp Ile Asn Glu Asp Cys Ser
    930                                935                                940

Thr Pro Cys
    945

```

```

5 <210> 3
  <211> 1779
  <212> ADN
  <213> Secuencia artificial

10 <220>
    <223> secuencia que codifica NS5b

15 <220>
    <221> CDS
    <222> (1)..(1779)
    <223>

    <400> 3

```

```

atg tca atg tcc tac aca tgg aca ggt gcc ttg atc acg cca tgc gct      48
Met Ser Met Ser Tyr Thr Trp Thr Gly Ala Leu Ile Thr Pro Cys Ala
1          5                                10                                15

gcg gag gag agc aag ttg ccc atc aat ccg ttg agc aac tct ttg ctg      96
Ala Glu Glu Ser Lys Leu Pro Ile Asn Pro Leu Ser Asn Ser Leu Leu
          20                                25                                30

```

cgt cac cac agt atg gtc tac tcc aca aca tct cgc agc gca agt ctg	144
Arg His His Ser Met Val Tyr Ser Thr Thr Ser Arg Ser Ala Ser Leu	
35 40 45	
cgg cag aag aag gtc acc ttt gac aga ctg caa gtc ctg gac gac cac	192
Arg Gln Lys Lys Val Thr Phe Asp Arg Leu Gln Val Leu Asp Asp His	
50 55 60	
tac cgg gac gtg ctc aag gag atg aag gcg aag gcg tcc aca gtt aag	240
Tyr Arg Asp Val Leu Lys Glu Met Lys Ala Lys Ala Ser Thr Val Lys	
65 70 75 80	
gct agg ctt cta tct ata gag gag gcc tgc aaa ctg acg ccc cca cat	288
Ala Arg Leu Leu Ser Ile Glu Glu Ala Cys Lys Leu Thr Pro Pro His	
85 90 95	
tcg gcc aaa tcc aaa ttt ggc tac ggg gcg aag gac gtc cgg agc cta	336
Ser Ala Lys Ser Lys Phe Gly Tyr Gly Ala Lys Asp Val Arg Ser Leu	
100 105 110	
tcc agc agg gcc gtc aac cac atc cgc tcc gtg tgg gag gac ttg ctg	384
Ser Ser Arg Ala Val Asn His Ile Arg Ser Val Trp Glu Asp Leu Leu	
115 120 125	
gaa gac act gaa aca cca att gat acc acc atc atg gca aaa aat gag	432
Glu Asp Thr Glu Thr Pro Ile Asp Thr Thr Ile Met Ala Lys Asn Glu	
130 135 140	
gtt ttc tgc gtc caa cca gag aaa gga ggc cgc aag cca gct cgc ctt	480
Val Phe Cys Val Gln Pro Glu Lys Gly Gly Arg Lys Pro Ala Arg Leu	
145 150 155 160	
atc gta ttc cca gac ctg ggg gta cgt gta tgc gag aag atg gcc ctt	528
Ile Val Phe Pro Asp Leu Gly Val Arg Val Cys Glu Lys Met Ala Leu	
165 170 175	
tac gac gtg gtc tcc acc ctt cct cag gcc gtg atg ggc ccc tca tac	576
Tyr Asp Val Val Ser Thr Leu Pro Gln Ala Val Met Gly Pro Ser Tyr	
180 185 190	
gga ttc cag tac tct cct ggg cag cgg gtc gag ttc ctg gtg aat acc	624
Gly Phe Gln Tyr Ser Pro Gly Gln Arg Val Glu Phe Leu Val Asn Thr	
195 200 205	
tgg aaa tca aag aaa tgc cct atg ggc ttc tca tat gac acc cgc tgc	672
Trp Lys Ser Lys Lys Cys Pro Met Gly Phe Ser Tyr Asp Thr Arg Cys	
210 215 220	
ttt gac tca acg gtc act gag aat gac atc cgt act gag gag tca atc	720
Phe Asp Ser Thr Val Thr Glu Asn Asp Ile Arg Thr Glu Glu Ser Ile	
225 230 235 240	
tac caa tgt tgt gac ttg gcc ccc gaa gcc aga cag gcc ata aag tcg	768
Tyr Gln Cys Cys Asp Leu Ala Pro Glu Ala Arg Gln Ala Ile Lys Ser	
245 250 255	
ctc aca gag cgg ctc tac atc ggg ggt ccc ctg act aat tca aaa ggg	816
Leu Thr Glu Arg Leu Tyr Ile Gly Gly Pro Leu Thr Asn Ser Lys Gly	
260 265 270	

cag aac tgc ggt tat cgc cgg tgc cgc gcg agc ggc gtg ctg acg act	864
Gln Asn Cys Gly Tyr Arg Arg Cys Arg Ala Ser Gly Val Leu Thr Thr	
275 280 285	
agc tgc ggc aat acc ctc aca tgc tac ttg aaa gcc act gcg gcc tgt	912
Ser Cys Gly Asn Thr Leu Thr Cys Tyr Leu Lys Ala Thr Ala Ala Cys	
290 295 300	
cga gct gca aag ctc cag gac tgc acg atg ctc gtg aac gga gac gac	960
Arg Ala Ala Lys Leu Gln Asp Cys Thr Met Leu Val Asn Gly Asp Asp	
305 310 315 320	
ctt gtc gtt atc tgc gaa agc gcg gga acc cag gag gat gcg gcg agc	1008
Leu Val Val Ile Cys Glu Ser Ala Gly Thr Gln Glu Asp Ala Ala Ser	
325 330 335	
cta cga gtc ttc acg gag gct atg act agg tac tct gcc ccc ccc ggg	1056
Leu Arg Val Phe Thr Glu Ala Met Thr Arg Tyr Ser Ala Pro Pro Gly	
340 345 350	
gac ccg ccc caa cca gaa tac gac ttg gag ctg ata acg tca tgc tcc	1104
Asp Pro Pro Gln Pro Glu Tyr Asp Leu Glu Leu Ile Thr Ser Cys Ser	
355 360 365	
tcc aat gtg tcg gtc gcg cac gat gca tcc ggc aaa agg gtg tac tac	1152
Ser Asn Val Ser Val Ala His Asp Ala Ser Gly Lys Arg Val Tyr Tyr	
370 375 380	
ctc acc cgt gac ccc acc acc ccc ctc gca cgg gct gcg tgg gag aca	1200
Leu Thr Arg Asp Pro Thr Thr Pro Leu Ala Arg Ala Ala Trp Glu Thr	
385 390 395 400	
gtt aga cac act cca gtc aac tcc tgg cta ggc aat atc atc atg tat	1248
Val Arg His Thr Pro Val Asn Ser Trp Leu Gly Asn Ile Ile Met Tyr	
405 410 415	
gcg ccc acc cta tgg gcg agg atg att ctg atg act cat ttc ttc tct	1296
Ala Pro Thr Leu Trp Ala Arg Met Ile Leu Met Thr His Phe Phe Ser	
420 425 430	
atc ctt cta gct cag gag caa ctt gaa aaa gcc ctg gat tgt cag atc	1344
Ile Leu Leu Ala Gln Glu Gln Leu Glu Lys Ala Leu Asp Cys Gln Ile	
435 440 445	
tac ggg gcc tgc tac tcc att gag cca ctt gac cta cct cag atc atc	1392
Tyr Gly Ala Cys Tyr Ser Ile Glu Pro Leu Asp Leu Pro Gln Ile Ile	
450 455 460	
gaa cga ctc cat ggt ctt agc gca ttt tca ctc cat agt tac tct cca	1440
Glu Arg Leu His Gly Leu Ser Ala Phe Ser Leu His Ser Tyr Ser Pro	
465 470 475 480	
ggt gag atc aat agg gtg gct tca tgc ctc agg aaa ctt ggg gta cca	1488
Gly Glu Ile Asn Arg Val Ala Ser Cys Leu Arg Lys Leu Gly Val Pro	
485 490 495	
ccc ttg cga gtc tgg aga cat cgg gcc aga agt gtc cgc gct aag ttg	1536
Pro Leu Arg Val Trp Arg His Arg Ala Arg Ser Val Arg Ala Lys Leu	
500 505 510	

```

ctg tcc cag ggg ggg agg gcc gcc act tgc ggc aaa tac ctc ttc aac      1584
Leu Ser Gln Gly Gly Arg Ala Ala Thr Cys Gly Lys Tyr Leu Phe Asn
      515                      520                      525

tgg gca gta agg acc aag ctt aaa ctc act cca atc ccg gct gcg tcc      1632
Trp Ala Val Arg Thr Lys Leu Lys Leu Thr Pro Ile Pro Ala Ala Ser
      530                      535                      540

cag cta gac ttg tcc ggc tgg ttc gtt gct ggt tac aac ggg gga gac      1680
Gln Leu Asp Leu Ser Gly Trp Phe Val Ala Gly Tyr Asn Gly Gly Asp
545                      550                      555                      560

ata tat cac agc ctg tct cgt gcc cga ccc cgt tgg ttc atg ttg tgc      1728
Ile Tyr His Ser Leu Ser Arg Ala Arg Pro Arg Trp Phe Met Leu Cys
      565                      570                      575

cta ctc cta ctt tct gta ggg gta ggc atc tac ctg ctc ccc aac cgg      1776
Leu Leu Leu Leu Ser Val Gly Val Gly Ile Tyr Leu Leu Pro Asn Arg
      580                      585                      590

taa                                                                    1779

```

<210> 4
 <211> 592
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia que codifica NS5b

10 <400> 4

```

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

Ala Glu Glu Ser Lys Leu Pro Ile Asn Pro Leu Ser Asn Ser Leu Leu
      20                      25                      30

Arg His His Ser Met Val Tyr Ser Thr Thr Ser Arg Ser Ala Ser Leu
      35                      40                      45

Arg Gln Lys Lys Val Thr Phe Asp Arg Leu Gln Val Leu Asp Asp His
      50                      55                      60

Tyr Arg Asp Val Leu Lys Glu Met Lys Ala Lys Ala Ser Thr Val Lys
65                      70                      75                      80

Ala Arg Leu Leu Ser Ile Glu Glu Ala Cys Lys Leu Thr Pro Pro His
      85                      90                      95

Ser Ala Lys Ser Lys Phe Gly Tyr Gly Ala Lys Asp Val Arg Ser Leu
      100                     105                     110

Ser Ser Arg Ala Val Asn His Ile Arg Ser Val Trp Glu Asp Leu Leu
      115                     120                     125

Glu Asp Thr Glu Thr Pro Ile Asp Thr Thr Ile Met Ala Lys Asn Glu
      130                     135                     140

```

Val Phe Cys Val Gln Pro Glu Lys Gly Gly Arg Lys Pro Ala Arg Leu
 145 150 155 160
 Ile Val Phe Pro Asp Leu Gly Val Arg Val Cys Glu Lys Met Ala Leu
 165 170 175
 Tyr Asp Val Val Ser Thr Leu Pro Gln Ala Val Met Gly Pro Ser Tyr
 180 185 190
 Gly Phe Gln Tyr Ser Pro Gly Gln Arg Val Glu Phe Leu Val Asn Thr
 195 200 205
 Trp Lys Ser Lys Lys Cys Pro Met Gly Phe Ser Tyr Asp Thr Arg Cys
 210 215 220
 Phe Asp Ser Thr Val Thr Glu Asn Asp Ile Arg Thr Glu Glu Ser Ile
 225 230 235 240
 Tyr Gln Cys Cys Asp Leu Ala Pro Glu Ala Arg Gln Ala Ile Lys Ser
 245 250 255
 Leu Thr Glu Arg Leu Tyr Ile Gly Gly Pro Leu Thr Asn Ser Lys Gly
 260 265 270
 Gln Asn Cys Gly Tyr Arg Arg Cys Arg Ala Ser Gly Val Leu Thr Thr
 275 280 285
 Ser Cys Gly Asn Thr Leu Thr Cys Tyr Leu Lys Ala Thr Ala Ala Cys
 290 295 300
 Arg Ala Ala Lys Leu Gln Asp Cys Thr Met Leu Val Asn Gly Asp Asp
 305 310 315 320
 Leu Val Val Ile Cys Glu Ser Ala Gly Thr Gln Glu Asp Ala Ala Ser
 325 330 335
 Leu Arg Val Phe Thr Glu Ala Met Thr Arg Tyr Ser Ala Pro Pro Gly
 340 345 350
 Asp Pro Pro Gln Pro Glu Tyr Asp Leu Glu Leu Ile Thr Ser Cys Ser
 355 360 365
 Ser Asn Val Ser Val Ala His Asp Ala Ser Gly Lys Arg Val Tyr Tyr
 370 375 380
 Leu Thr Arg Asp Pro Thr Thr Pro Leu Ala Arg Ala Ala Trp Glu Thr
 385 390 395 400
 Val Arg His Thr Pro Val Asn Ser Trp Leu Gly Asn Ile Ile Met Tyr
 405 410 415
 Ala Pro Thr Leu Trp Ala Arg Met Ile Leu Met Thr His Phe Phe Ser
 420 425 430
 Ile Leu Leu Ala Gln Glu Gln Leu Glu Lys Ala Leu Asp Cys Gln Ile
 435 440 445
 Tyr Gly Ala Cys Tyr Ser Ile Glu Pro Leu Asp Leu Pro Gln Ile Ile
 450 455 460

Glu Arg Leu His Gly Leu Ser Ala Phe Ser Leu His Ser Tyr Ser Pro
 465 470 475 480

Gly Glu Ile Asn Arg Val Ala Ser Cys Leu Arg Lys Leu Gly Val Pro
 485 490 495

Pro Leu Arg Val Trp Arg His Arg Ala Arg Ser Val Arg Ala Lys Leu
 500 505 510

Leu Ser Gln Gly Gly Arg Ala Ala Thr Cys Gly Lys Tyr Leu Phe Asn
 515 520 525

Trp Ala Val Arg Thr Lys Leu Lys Leu Thr Pro Ile Pro Ala Ala Ser
 530 535 540

Gln Leu Asp Leu Ser Gly Trp Phe Val Ala Gly Tyr Asn Gly Gly Asp
 545 550 555 560

Ile Tyr His Ser Leu Ser Arg Ala Arg Pro Arg Trp Phe Met Leu Cys
 565 570 575

Leu Leu Leu Leu Ser Val Gly Val Gly Ile Tyr Leu Leu Pro Asn Arg
 580 585 590

<210> 5
 <211> 1344
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia que codifica NS5a

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1344)
 <223>

<400> 5

atg tcc ggc tcg tgg cta agg gat gtt tgg gac tgg ata tgc acg gtg 48
 Met Ser Gly Ser Trp Leu Arg Asp Val Trp Asp Trp Ile Cys Thr Val
 1 5 10 15

ttg act gac ttc aag acc tgg ctc cag tcc aag ctc ctg ccg aaa ttg 96
 Leu Thr Asp Phe Lys Thr Trp Leu Gln Ser Lys Leu Leu Pro Lys Leu
 20 25 30

ccg gga gtc cct ttc ttc tca tgc caa cgc ggg tac aag gga gtc tgg 144
 Pro Gly Val Pro Phe Phe Ser Cys Gln Arg Gly Tyr Lys Gly Val Trp
 35 40 45

cgg ggg gac ggc atc atg caa acc acc tgc cca tgt gga gca caa att 192
 Arg Gly Asp Gly Ile Met Gln Thr Thr Cys Pro Cys Gly Ala Gln Ile
 50 55 60

acc gga cat gtc aaa aac ggt tcc atg agg atc gtt ggg cct aaa acc 240
 Thr Gly His Val Lys Asn Gly Ser Met Arg Ile Val Gly Pro Lys Thr
 65 70 75 80

tgc agc aac acg tgg cac gga acg ttc ccc atc aac gcg tac acc aca	288
Cys Ser Asn Thr Trp His Gly Thr Phe Pro Ile Asn Ala Tyr Thr Thr	
85 90 95	
ggc ccc tgc aca ccc tcc ccg gcg ccg aac tat tcc agg gcg ctg tgg	336
Gly Pro Cys Thr Pro Ser Pro Ala Pro Asn Tyr Ser Arg Ala Leu Trp	
100 105 110	
cgg gtg gct gct gaa gag tac gtg gag att acg cgg gtg ggg gac ttc	384
Arg Val Ala Ala Glu Glu Tyr Val Glu Ile Thr Arg Val Gly Asp Phe	
115 120 125	
cac tac gtg acg ggt atg acc acc gac aac gta aaa tgc ccg tgc cag	432
His Tyr Val Thr Gly Met Thr Thr Asp Asn Val Lys Cys Pro Cys Gln	
130 135 140	
gtc ccg gcc ccc gaa ttc ttc act gaa ttg gac ggg gtg ccg ttg cac	480
Val Pro Ala Pro Glu Phe Phe Thr Glu Leu Asp Gly Val Arg Leu His	
145 150 155 160	
agg tac gct ccg gcg tgc aga cct ctc cta ccg gtg gat gtc aca ttc	528
Arg Tyr Ala Pro Ala Cys Arg Pro Leu Leu Arg Val Asp Val Thr Phe	
165 170 175	
cag gtc ggg ctc aac caa tac ctg gtt ggg tca cag ctc cca tgc gag	576
Gln Val Gly Leu Asn Gln Tyr Leu Val Gly Ser Gln Leu Pro Cys Glu	
180 185 190	
cct gag ccg gat gtg gca gtg ctc act tcc atg ctc acc gac ccc tcc	624
Pro Glu Pro Asp Val Ala Val Leu Thr Ser Met Leu Thr Asp Pro Ser	
195 200 205	
cac att aca gca gag acg gct aaa cgt agg ccg gcc agg ggg tct ccc	672
His Ile Thr Ala Glu Thr Ala Lys Arg Arg Pro Ala Arg Gly Ser Pro	
210 215 220	
ccc tcc ttg gcc agc tct tca gct agc caa ttg tct gcg cct tcc ttg	720
Pro Ser Leu Ala Ser Ser Ser Ala Ser Gln Leu Ser Ala Pro Ser Leu	
225 230 235 240	
aag gca aca tgc act acc cac cat gac tcc ccg gac gct gac ctc atc	768
Lys Ala Thr Cys Thr Thr His His Asp Ser Pro Asp Ala Asp Leu Ile	
245 250 255	
gag gcc aac ctc ctg tgg ccg cag gag atg ggc gga aac atc acc cgt	816
Glu Ala Asn Leu Leu Trp Arg Gln Glu Met Gly Gly Asn Ile Thr Arg	
260 265 270	
gtg gag tca gag aat aag gtg gta att ttg gac tct ttc gac ccg ctt	864
Val Glu Ser Glu Asn Lys Val Val Ile Leu Asp Ser Phe Asp Pro Leu	
275 280 285	
cga gcg gaa gag gat gag agg gaa gta tcc gtt gca gca gag atc ctg	912
Arg Ala Glu Glu Asp Glu Arg Glu Val Ser Val Ala Ala Glu Ile Leu	
290 295 300	
cga aaa tcc aag aag ttc ccc ccc gcg ttg ccc ata tgg gca cgc ccg	960
Arg Lys Ser Lys Lys Phe Pro Pro Ala Leu Pro Ile Trp Ala Arg Pro	
305 310 315 320	

gat tac aac cct cca ctg tta gag tcc tgg aaa agt ccg gac tac gtc 1008
 Asp Tyr Asn Pro Pro Leu Leu Glu Ser Trp Lys Ser Pro Asp Tyr Val
 325 330 335

cct ccg gcg gtg cat ggg tgc cca ttg ccg cct acc acg ggc cct cca 1056
 Pro Pro Ala Val His Gly Cys Pro Leu Pro Pro Thr Thr Gly Pro Pro
 340 345 350

ata ccg cct cca cgg aaa aag agg acg gtt gtt ctg aca gag tcc acc 1104
 Ile Pro Pro Pro Arg Lys Lys Arg Thr Val Val Leu Thr Glu Ser Thr
 355 360 365

gtg tct tct gcc ttg gcg gag ctg gct act aag act ttc ggc agc tcc 1152
 Val Ser Ser Ala Leu Ala Glu Leu Ala Thr Lys Thr Phe Gly Ser Ser
 370 375 380

gga tcg tcg gcc gtt gac agc ggc acg gcg acc gcc cct ccc gat cag 1200
 Gly Ser Ser Ala Val Asp Ser Gly Thr Ala Thr Ala Pro Pro Asp Gln
 385 390 395 400

acc tct gac gac ggt gac aaa gaa tct gac att gag tcg tac tcc tcc 1248
 Thr Ser Asp Asp Gly Asp Lys Glu Ser Asp Ile Glu Ser Tyr Ser Ser
 405 410 415

atg ccc ccc ctt gag ggg gag ccg ggg gac cct gat ctc agc gac ggg 1296
 Met Pro Pro Leu Glu Gly Glu Pro Gly Asp Pro Asp Leu Ser Asp Gly
 420 425 430

tct tgg tct acc gtg agc ggg gag gcc ggc gac gac atc gtc tgc tgc 1344
 Ser Trp Ser Thr Val Ser Gly Glu Ala Gly Asp Asp Ile Val Cys Cys
 435 440 445

<210> 6
 <211> 448
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia que codifica NS5a

10 <400> 6

Met Ser Gly Ser Trp Leu Arg Asp Val Trp Asp Trp Ile Cys Thr Val
 1 5 10 15

Leu Thr Asp Phe Lys Thr Trp Leu Gln Ser Lys Leu Leu Pro Lys Leu
 20 25 30

Pro Gly Val Pro Phe Phe Ser Cys Gln Arg Gly Tyr Lys Gly Val Trp
 35 40 45

Arg Gly Asp Gly Ile Met Gln Thr Thr Cys Pro Cys Gly Ala Gln Ile
 50 55 60

Thr Gly His Val Lys Asn Gly Ser Met Arg Ile Val Gly Pro Lys Thr
 65 70 75 80

Cys Ser Asn Thr Trp His Gly Thr Phe Pro Ile Asn Ala Tyr Thr Thr
 85 90 95

Gly Pro Cys Thr Pro Ser Pro Ala Pro Asn Tyr Ser Arg Ala Leu Trp
 100 105 110
 Arg Val Ala Ala Glu Glu Tyr Val Glu Ile Thr Arg Val Gly Asp Phe
 115 120 125
 His Tyr Val Thr Gly Met Thr Thr Asp Asn Val Lys Cys Pro Cys Gln
 130 135 140
 Val Pro Ala Pro Glu Phe Phe Thr Glu Leu Asp Gly Val Arg Leu His
 145 150 155 160
 Arg Tyr Ala Pro Ala Cys Arg Pro Leu Leu Arg Val Asp Val Thr Phe
 165 170 175
 Gln Val Gly Leu Asn Gln Tyr Leu Val Gly Ser Gln Leu Pro Cys Glu
 180 185 190
 Pro Glu Pro Asp Val Ala Val Leu Thr Ser Met Leu Thr Asp Pro Ser
 195 200 205
 His Ile Thr Ala Glu Thr Ala Lys Arg Arg Pro Ala Arg Gly Ser Pro
 210 215 220
 Pro Ser Leu Ala Ser Ser Ser Ala Ser Gln Leu Ser Ala Pro Ser Leu
 225 230 235 240
 Lys Ala Thr Cys Thr Thr His His Asp Ser Pro Asp Ala Asp Leu Ile
 245 250 255
 Glu Ala Asn Leu Leu Trp Arg Gln Glu Met Gly Gly Asn Ile Thr Arg
 260 265 270
 Val Glu Ser Glu Asn Lys Val Val Ile Leu Asp Ser Phe Asp Pro Leu
 275 280 285
 Arg Ala Glu Glu Asp Glu Arg Glu Val Ser Val Ala Ala Glu Ile Leu
 290 295 300
 Arg Lys Ser Lys Lys Phe Pro Pro Ala Leu Pro Ile Trp Ala Arg Pro
 305 310 315 320
 Asp Tyr Asn Pro Pro Leu Leu Glu Ser Trp Lys Ser Pro Asp Tyr Val
 325 330 335
 Pro Pro Ala Val His Gly Cys Pro Leu Pro Pro Thr Thr Gly Pro Pro
 340 345 350
 Ile Pro Pro Pro Arg Lys Lys Arg Thr Val Val Leu Thr Glu Ser Thr
 355 360 365
 Val Ser Ser Ala Leu Ala Glu Leu Ala Thr Lys Thr Phe Gly Ser Ser
 370 375 380
 Gly Ser Ser Ala Val Asp Ser Gly Thr Ala Thr Ala Pro Pro Asp Gln
 385 390 395 400
 Thr Ser Asp Asp Gly Asp Lys Glu Ser Asp Ile Glu Ser Tyr Ser Ser
 405 410 415
 Met Pro Pro Leu Glu Gly Glu Pro Gly Asp Pro Asp Leu Ser Asp Gly
 420 425 430
 Ser Trp Ser Thr Val Ser Gly Glu Ala Gly Asp Asp Ile Val Cys Cys
 435 440 445

<210> 7
 <211> 2241
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia que codifica CE1E2

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(2241)
 <223>

15 <400> 7

atg agc aca aat cct aaa cct caa aga aaa acc aaa cgt aac acc aac	48
Met Ser Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Asn	
1 5 10 15	
cgc cgc cca cag gac gtt aag ttc ccg ggc ggt ggt cag atc gtt ggt	96
Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly	
20 25 30	
gga gtt tac ctg ttg ccg cgc agg ggc ccc agg ttg ggt gtg cgc gcg	144
Gly Val Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Leu Gly Val Arg Ala	
35 40 45	
act agg aag act tcc gag cgg tcg caa cct cgt gga agg cga caa cct	192
Thr Arg Lys Thr Ser Glu Arg Ser Gln Pro Arg Gly Arg Arg Gln Pro	
50 55 60	
atc ccc aag gct cgc cgg ccc gag ggt agg acc tgg gct cag ccc ggg	240
Ile Pro Lys Ala Arg Arg Pro Glu Gly Arg Thr Trp Ala Gln Pro Gly	
65 70 75 80	
tac cct tgg ccc ctc tat ggc aac gag ggt atg ggg tgg gca gga tgg	288
Tyr Pro Trp Pro Leu Tyr Gly Asn Glu Gly Met Gly Trp Ala Gly Trp	
85 90 95	
ctc ctg tca ccc cgt ggc tct cgg cct agt tgg ggc ccc aca gac ccc	336
Leu Leu Ser Pro Arg Gly Ser Arg Pro Ser Trp Gly Pro Thr Asp Pro	
100 105 110	
cgg cgt agg tcg cgt aat ttg ggt aag gtc atc gat acc ctt aca tgc	384
Arg Arg Arg Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Ile Asp Thr Leu Thr Cys	
115 120 125	
ggc ttc gcc gac ctc atg ggg tac att ccg ctt gtc ggc gcc ccc cta	432
Gly Phe Ala Asp Leu Met Gly Tyr Ile Pro Leu Val Gly Ala Pro Leu	
130 135 140	
gga ggc gct gcc agg gcc ctg gcg cat ggc gtc cgg gtt ctg gag gac	480
Gly Gly Ala Ala Arg Ala Leu Ala His Gly Val Arg Val Leu Glu Asp	
145 150 155 160	

ggc gtg aac tat gca aca ggg aat ctg ccc ggt tgc tct ttc tct atc Gly Val Asn Tyr Ala Thr Gly Asn Leu Pro Gly Cys Ser Phe Ser Ile	528
165 170 175	
ttc ctc tta gct ttg ctg tct tgt ttg acc atc cca gct tcc gct tac Phe Leu Leu Ala Leu Leu Ser Cys Leu Thr Ile Pro Ala Ser Ala Tyr	576
180 185 190	
gag gtg cgc aac gtg tcc ggg ata tac cat gtc acg aac gac tgc tcc Glu Val Arg Asn Val Ser Gly Ile Tyr His Val Thr Asn Asp Cys Ser	624
195 200 205	
aac tca agt att gtg tat gag gca gcg gac atg atc atg cac acc ccc Asn Ser Ser Ile Val Tyr Glu Ala Ala Asp Met Ile Met His Thr Pro	672
210 215 220	
ggg tgc gtg ccc tgc gtc cgg gag agt aat ttc tcc cgt tgc tgg gta Gly Cys Val Pro Cys Val Arg Glu Ser Asn Phe Ser Arg Cys Trp Val	720
225 230 235 240	
gcg ctc act ccc acg ctc gcg gcc agg aac agc agc atc ccc acc acg Ala Leu Thr Pro Thr Leu Ala Ala Arg Asn Ser Ser Ile Pro Thr Thr	768
245 250 255	
aca ata cga cgc cac gtc gat ttg ctc gtt ggg gcg gct gct ctc tgt Thr Ile Arg Arg His Val Asp Leu Leu Val Gly Ala Ala Ala Leu Cys	816
260 265 270	
tcc gct atg tac gtt ggg gat ctc tgc gga tcc gtt ttt ctc gtc tcc Ser Ala Met Tyr Val Gly Asp Leu Cys Gly Ser Val Phe Leu Val Ser	864
275 280 285	
cag ctg ttc acc ttc tca cct cgc cgg tat gag acg gta caa gat tgc Gln Leu Phe Thr Phe Ser Pro Arg Arg Tyr Glu Thr Val Gln Asp Cys	912
290 295 300	
aat tgc tca atc tat ccc ggc cac gta tca ggt cac cgc atg gct tgg Asn Cys Ser Ile Tyr Pro Gly His Val Ser Gly His Arg Met Ala Trp	960
305 310 315 320	
gat atg atg atg aac tgg tca cct aca acg gcc cta gtg gta tcg cag Asp Met Met Met Asn Trp Ser Pro Thr Thr Ala Leu Val Val Ser Gln	1008
325 330 335	
cta ctc cgg atc cca caa gcc gtc gtg gac atg gtg gcg ggg gcc cac Leu Leu Arg Ile Pro Gln Ala Val Val Asp Met Val Ala Gly Ala His	1056
340 345 350	
tgg ggt gtc cta gcg ggc ctt gcc tac tat tcc atg gtg ggg aac tgg Trp Gly Val Leu Ala Gly Leu Ala Tyr Tyr Ser Met Val Gly Asn Trp	1104
355 360 365	
gct aag gtc ttg att gtg atg cta ctc ttt gct ggc gtt gac ggg cac Ala Lys Val Leu Ile Val Met Leu Leu Phe Ala Gly Val Asp Gly His	1152
370 375 380	
acc cac gtg aca ggg gga agg gta gcc tcc agc acc cag agc ctc gtg Thr His Val Thr Gly Gly Arg Val Ala Ser Ser Thr Gln Ser Leu Val	1200
385 390 395 400	

tcc tgg ctc tca caa ggg cca tct cag aaa atc caa ctc gtg aac acc	1248
Ser Trp Leu Ser Gln Gly Pro Ser Gln Lys Ile Gln Leu Val Asn Thr	
405 410 415	
aac ggc agc tgg cac atc aac agg acc gct ctg aat tgc aat gac tcc	1296
Asn Gly Ser Trp His Ile Asn Arg Thr Ala Leu Asn Cys Asn Asp Ser	
420 425 430	
ctc caa act ggg ttc att gct gcg ctg ttc tac gca cac agg ttc aac	1344
Leu Gln Thr Gly Phe Ile Ala Ala Leu Phe Tyr Ala His Arg Phe Asn	
435 440 445	
gcg tcc gga tgt cca gag cgc atg gcc agc tgc cgc ccc atc gac aag	1392
Ala Ser Gly Cys Pro Glu Arg Met Ala Ser Cys Arg Pro Ile Asp Lys	
450 455 460	
ttc gct cag ggg tgg ggt ccc atc act cac gtt gtg cct aac atc tcg	1440
Phe Ala Gln Gly Trp Gly Pro Ile Thr His Val Val Pro Asn Ile Ser	
465 470 475 480	
gac cag agg cct tat tgc tgg cac tat gca ccc caa ccg tgc ggt att	1488
Asp Gln Arg Pro Tyr Cys Trp His Tyr Ala Pro Gln Pro Cys Gly Ile	
485 490 495	
gta ccc gcg tcg cag gtg tgt ggc cca gtg tat tgc ttc acc ccg agt	1536
Val Pro Ala Ser Gln Val Cys Gly Pro Val Tyr Cys Phe Thr Pro Ser	
500 505 510	
cct gtt gtg gtg ggg acg acc gac cgt tcc gga gtc ccc acg tat agc	1584
Pro Val Val Val Gly Thr Thr Asp Arg Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ser	
515 520 525	
tgg ggg gag aat gag aca gac gtg ctg cta ctc aac aac acg cgg ccg	1632
Trp Gly Glu Asn Glu Thr Asp Val Leu Leu Leu Asn Asn Thr Arg Pro	
530 535 540	
ccg caa ggc aac tgg ttc ggc tgt aca tgg atg aat agc acc ggg ttc	1680
Pro Gln Gly Asn Trp Phe Gly Cys Thr Trp Met Asn Ser Thr Gly Phe	
545 550 555 560	
acc aag acg tgc ggg ggc ccc ccg tgt aac atc ggg ggg gtt ggc aac	1728
Thr Lys Thr Cys Gly Gly Pro Pro Cys Asn Ile Gly Gly Val Gly Asn	
565 570 575	
aac acc ttg att tgc ccc acg gat tgc ttc cga aag cac ccc gag gcc	1776
Asn Thr Leu Ile Cys Pro Thr Asp Cys Phe Arg Lys His Pro Glu Ala	
580 585 590	
act tac acc aaa tgc ggc tcg ggt cct tgg ttg aca cct agg tgt cta	1824
Thr Tyr Thr Lys Cys Gly Ser Gly Pro Trp Leu Thr Pro Arg Cys Leu	
595 600 605	
gtt gac tac cca tac aga ctt tgg cac tac ccc tgc act atc aat ttt	1872
Val Asp Tyr Pro Tyr Arg Leu Trp His Tyr Pro Cys Thr Ile Asn Phe	
610 615 620	
acc atc ttc aag gtc agg atg tac gtg ggg ggc gtg gag cac agg etc	1920
Thr Ile Phe Lys Val Arg Met Tyr Val Gly Gly Val Glu His Arg Leu	
625 630 635 640	

```

aac gcc gcg tgc aat tgg acc cga gga gag cgc tgt gac ctg gag gac      1968
Asn Ala Ala Cys Asn Trp Thr Arg Gly Glu Arg Cys Asp Leu Glu Asp
      645                                650                                655

agg gat aga tca gag ctt agc ccg ctg cta ttg tot aca acg gag tgg      2016
Arg Asp Arg Ser Glu Leu Ser Pro Leu Leu Leu Ser Thr Thr Glu Trp
      660                                665                                670

cag gta ctg ccc tgt tcc ttt acc acc cta ccg gct ctg tcc act gga      2064
Gln Val Leu Pro Cys Ser Phe Thr Thr Leu Pro Ala Leu Ser Thr Gly
      675                                680                                685

ttg atc cac ctc cat cag aat atc gtg gac gtg caa tac ctg tac ggt      2112
Leu Ile His Leu His Gln Asn Ile Val Asp Val Gln Tyr Leu Tyr Gly
      690                                695                                700

gta ggg tca gtg gtt gtc tcc gtc gta atc aaa tgg gag tat gtt ctg      2160
Val Gly Ser Val Val Val Ser Val Val Ile Lys Trp Glu Tyr Val Leu
      705                                710                                715                                720

ctg ctc ttc ctt ctc ctg gcg gac gcg cgc gtc tgt gcc tgc ttg tgg      2208
Leu Leu Phe Leu Leu Leu Ala Asp Ala Arg Val Cys Ala Cys Leu Trp
      725                                730                                735

atg atg ctg ctg ata gcc cag gct gag gcc tga                          2241
Met Met Leu Leu Ile Ala Gln Ala Glu Ala
      740                                745

```

<210> 8
 <211> 746
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia que codifica CE1E2

10 <400> 8

```

Met Ser Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Asn
 1          5          10          15

Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly
 20          25          30

Gly Val Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Leu Gly Val Arg Ala
 35          40          45

Thr Arg Lys Thr Ser Glu Arg Ser Gln Pro Arg Gly Arg Arg Gln Pro
 50          55          60

Ile Pro Lys Ala Arg Arg Pro Glu Gly Arg Thr Trp Ala Gln Pro Gly
 65          70          75          80

Tyr Pro Trp Pro Leu Tyr Gly Asn Glu Gly Met Gly Trp Ala Gly Trp
 85          90          95

Leu Leu Ser Pro Arg Gly Ser Arg Pro Ser Trp Gly Pro Thr Asp Pro
 100         105         110

```

Arg Arg Arg Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Ile Asp Thr Leu Thr Cys
 115 120 125
 Gly Phe Ala Asp Leu Met Gly Tyr Ile Pro Leu Val Gly Ala Pro Leu
 130 135 140
 Gly Gly Ala Ala Arg Ala Leu Ala His Gly Val Arg Val Leu Glu Asp
 145 150 155 160
 Gly Val Asn Tyr Ala Thr Gly Asn Leu Pro Gly Cys Ser Phe Ser Ile
 165 170 175
 Phe Leu Leu Ala Leu Leu Ser Cys Leu Thr Ile Pro Ala Ser Ala Tyr
 180 185 190
 Glu Val Arg Asn Val Ser Gly Ile Tyr His Val Thr Asn Asp Cys Ser
 195 200 205
 Asn Ser Ser Ile Val Tyr Glu Ala Ala Asp Met Ile Met His Thr Pro
 210 215 220
 Gly Cys Val Pro Cys Val Arg Glu Ser Asn Phe Ser Arg Cys Trp Val
 225 230 235 240
 Ala Leu Thr Pro Thr Leu Ala Ala Arg Asn Ser Ser Ile Pro Thr Thr
 245 250 255
 Thr Ile Arg Arg His Val Asp Leu Leu Val Gly Ala Ala Ala Leu Cys
 260 265 270
 Ser Ala Met Tyr Val Gly Asp Leu Cys Gly Ser Val Phe Leu Val Ser
 275 280 285
 Gln Leu Phe Thr Phe Ser Pro Arg Arg Tyr Glu Thr Val Gln Asp Cys
 290 295 300
 Asn Cys Ser Ile Tyr Pro Gly His Val Ser Gly His Arg Met Ala Trp
 305 310 315 320
 Asp Met Met Met Asn Trp Ser Pro Thr Thr Ala Leu Val Val Ser Gln
 325 330 335
 Leu Leu Arg Ile Pro Gln Ala Val Val Asp Met Val Ala Gly Ala His
 340 345 350
 Trp Gly Val Leu Ala Gly Leu Ala Tyr Tyr Ser Met Val Gly Asn Trp
 355 360 365
 Ala Lys Val Leu Ile Val Met Leu Leu Phe Ala Gly Val Asp Gly His
 370 375 380
 Thr His Val Thr Gly Gly Arg Val Ala Ser Ser Thr Gln Ser Leu Val
 385 390 395 400
 Ser Trp Leu Ser Gln Gly Pro Ser Gln Lys Ile Gln Leu Val Asn Thr
 405 410 415
 Asn Gly Ser Trp His Ile Asn Arg Thr Ala Leu Asn Cys Asn Asp Ser
 420 425 430

Leu Gln Thr Gly Phe Ile Ala Ala Leu Phe Tyr Ala His Arg Phe Asn
 435 440 445
 Ala Ser Gly Cys Pro Glu Arg Met Ala Ser Cys Arg Pro Ile Asp Lys
 450 455 460
 Phe Ala Gln Gly Trp Gly Pro Ile Thr His Val Val Pro Asn Ile Ser
 465 470 475 480
 Asp Gln Arg Pro Tyr Cys Trp His Tyr Ala Pro Gln Pro Cys Gly Ile
 485 490 495
 Val Pro Ala Ser Gln Val Cys Gly Pro Val Tyr Cys Phe Thr Pro Ser
 500 505 510
 Pro Val Val Val Gly Thr Thr Asp Arg Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ser
 515 520 525
 Trp Gly Glu Asn Glu Thr Asp Val Leu Leu Leu Asn Asn Thr Arg Pro
 530 535 540
 Pro Gln Gly Asn Trp Phe Gly Cys Thr Trp Met Asn Ser Thr Gly Phe
 545 550 555 560
 Thr Lys Thr Cys Gly Gly Pro Pro Cys Asn Ile Gly Gly Val Gly Asn
 565 570 575
 Asn Thr Leu Ile Cys Pro Thr Asp Cys Phe Arg Lys His Pro Glu Ala
 580 585 590
 Thr Tyr Thr Lys Cys Gly Ser Gly Pro Trp Leu Thr Pro Arg Cys Leu
 595 600 605
 Val Asp Tyr Pro Tyr Arg Leu Trp His Tyr Pro Cys Thr Ile Asn Phe
 610 615 620
 Thr Ile Phe Lys Val Arg Met Tyr Val Gly Gly Val Glu His Arg Leu
 625 630 635 640
 Asn Ala Ala Cys Asn Trp Thr Arg Gly Glu Arg Cys Asp Leu Glu Asp
 645 650 655
 Arg Asp Arg Ser Glu Leu Ser Pro Leu Leu Leu Ser Thr Thr Glu Trp
 660 665 670
 Gln Val Leu Pro Cys Ser Phe Thr Thr Leu Pro Ala Leu Ser Thr Gly
 675 680 685
 Leu Ile His Leu His Gln Asn Ile Val Asp Val Gln Tyr Leu Tyr Gly
 690 695 700
 Val Gly Ser Val Val Val Ser Val Val Ile Lys Trp Glu Tyr Val Leu
 705 710 715 720
 Leu Leu Phe Leu Leu Leu Ala Asp Ala Arg Val Cys Ala Cys Leu Trp
 725 730 735
 Met Met Leu Leu Ile Ala Gln Ala Glu Ala
 740 745

<210> 9
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> cebador oIV166

 <400> 9
 5 gggggggcta tggcgcctat cacggccta 29

 <210> 10
 <211> 32
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador oIV171
 15 <400> 10

 ggggggacgc gtttagcatg gcgtggagca gt 32
 20 <210> 11
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223> cebador oIV232

 <400> 11
 30 ggggggagat ctccagcagg cagaagtatg 30

 <210> 12
 <211> 33
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador oIV233
 40 <400> 12

 gggggggtcg accgaaaatg gatatacaag ctc 33
 45 <210> 13
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 50 <223> cebador oIV212

 <400> 13
 55 ggggggtcta gaatgtcaat gtctacaca tggac 35

 <210> 14
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60

 <220>
 <223> cebador oIV218

 <400> 14
 65 ggggggtcta gattaccggt tggggagcag gt 32

<210> 15
 <211> 32
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador oIV225

 10 <400> 15

 ggggggctgc agatggcgcc taccacggcc ta 32

 <210> 16
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 20 <223> cebador oIV226

 <400> 16

 ggggggtcta gattagcatg gcgtggagca gt 32
 25
 <210> 17
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> cebador oIV227

 <400> 17
 35
 gggggggtcg acatgtcaat gtcctacaca tggac 35

 <210> 18
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador oIV228
 45
 <400> 18

 gggggggcat gcttaccggt tggggagcag gt 32
 50
 <210> 19
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador oIV229

 <400> 19
 60
 ggggggtcta gaccgtagt tcgcatatac ata 33

 <210> 20
 <211> 33
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador oIV172

 <400> 20
 5 ggggggggta ccatgtccgg ctcgtggcta agg 33

 <210> 21
 <211> 33
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador oIV173
 15 <400> 21

 ggggggtcta gattagcagc agacgatgtc gtc 33
 20 <210> 22
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> cebador oIV62

 <400> 22
 30 ggggggggcta gcatgagcac aaatcctaaa cct 33

 <210> 23
 <211> 33
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador oIV68
 40 <400> 23

 ggggggtcta gatcaggcct cagcctgggc tat 33
 45 <210> 24
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 50 <223> epítopo GLL

 <400> 24

Gly Leu Leu Gly Cys Ile Ile Thr Ser Leu
1 5 10
 55 <210> 25
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> epítopo ALY

<400> 25

Ala Leu Tyr Asp Val Val Ser Thr Leu
1 5

5 <210> 26
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> epítipo KLQ

<400> 26

Lys Leu Gln Asp Cys Thr Met Leu Val
1 5

15 <210> 27
 <211> 9
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> epítipo DLM

25 <400> 27

Asp Leu Met Gly Tyr Ile Pro Leu Val
1 5

30

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición peptídica, caracterizada porque consiste en una poliproteína NS3/NS4 del virus de la hepatitis C, así como un polipéptido NS5b del virus de la hepatitis C.
2. Composición peptídica según la reivindicación 1, caracterizada porque NS3 y/o NS4 y/o NS5b proceden de virus de genotipos diferentes.
- 10 3. Composición peptídica según la reivindicación 1, caracterizada porque NS3, NS4 y NS5b proceden de un virus de igual genotipo, preferentemente de genotipo 1b.
- 15 4. Vector de expresión para la expresión de secuencias nucleotídicas del virus de la hepatitis C, caracterizado porque dichas secuencias nucleotídicas del virus de la hepatitis C están constituidas por una secuencia nucleotídica que codifica para la poliproteína NS3/NS4 y una secuencia nucleotídica que codifica para el polipéptido NS5b, así como los medios necesarios para su expresión, estando dicha secuencia nucleotídica que codifica para la poliproteína NS3/NS4 y dicha secuencia nucleotídica que codifica para el polipéptido NS5b en un único vector de expresión.
- 20 5. Vector de expresión según la reivindicación 4, caracterizado porque las secuencias nucleotídicas que codifican para dicha poliproteína NS3/NS4 y dicho polipéptido NS5b proceden de virus de genotipos diferentes.
- 25 6. Vector de expresión según la reivindicación 4, caracterizado porque las secuencias nucleotídicas que codifican para dicha poliproteína NS3/NS4 y dicho polipéptido NS5b proceden de un virus de igual genotipo, preferentemente el genotipo 1b.
- 30 7. Vector de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, caracterizado porque este vector es un plásmido, un vector vírico de tipo adenovirus, poxvirus, baculovirus, o un vector bacteriano de tipo salmonela, o BCG.
8. Vector de expresión según la reivindicación 7, caracterizado porque este vector es un adenovirus.
9. Vector de expresión según la reivindicación 8, caracterizado porque dicho vector es un adenovirus humano, preferentemente el adenovirus 5.
- 35 10. Vector de expresión según la reivindicación 8 ó 9, caracterizado porque el genoma del adenovirus está modificado de manera que se sustituye la región E1 por el casete de expresión CMV-NS3-NS4 y se sustituye la región E3 por el casete de expresión SV40-NS5b.
- 40 11. Vector de expresión según la reivindicación 7, caracterizado porque este vector es un poxvirus.
12. Vector de expresión según la reivindicación 11, caracterizado porque dicho poxvirus es un virus de la vacuna de la cepa Copenhagen o un virus de la vacuna modificado de Ankara.
- 45 13. Vector de expresión según la reivindicación 12, caracterizado porque presenta por lo menos una de las características siguientes, consideradas solas o en asociación:
- 50 i) el poxvirus es un virus MVA
- ii) el poxvirus está en forma morfológica IMV
- iii) el genoma del poxvirus está modificado de manera que se inserta el casete de expresión NS3/NS4 y se inserta el casete de expresión NS5b.
- 55 14. Vector de expresión según una de las reivindicaciones 11 a 13, caracterizado porque el genoma del poxvirus está modificado de manera que se inserta el casete de expresión ph5r-NS3-NS4 y se inserta el casete de expresión p7.5-NS5b.
- 60 15. Microorganismo o célula hospedante transformados por un vector de expresión tal como el definido en cualquiera de las reivindicaciones 4 a 14.
16. Utilización
- de una composición peptídica tal como la definida en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o bien
- 65 - de un vector de expresión tal como el definido en cualquiera de las reivindicaciones 4 a 14, o bien

- de un vector de expresión de una secuencia nucleotídica que codifica para la poliproteína NS3/NS4 del VHC con un vector de expresión de una secuencia nucleotídica que codifica para el polipéptido NS5b del VHC, o bien
 - de las secuencias nucleotídicas que codifican para dicha poliproteína NS3/NS4 y dicho polipéptido NS5b,
- 5 correspondiendo dichas secuencias nucleotídicas a las secuencias contenidas en los vectores de expresión tales como los definidos en cualquiera de las reivindicaciones 4 a 14, dispuestas bajo el control de elementos necesarios para una expresión constitutiva y/o inducible de dichos péptidos,
- 10 para la preparación de un medicamento destinado a la inhibición, la prevención o el control de una infección provocada por el virus de la hepatitis C en un animal.
17. Utilización según la reivindicación 16, caracterizada porque el medicamento está destinado a la inhibición, la prevención o el control de una infección provocada por el virus de la hepatitis C en el ser humano.
- 15 18. Composición farmacéutica, que comprende a título de sustancia activa la composición peptídica tal como la definida en las reivindicaciones 1 a 3, o bien un vector de expresión tal como el definido en cualquiera de las reivindicaciones 4 a 14, o bien un vector de expresión de una secuencia nucleotídica que codifica para la poliproteína NS3/NS4 del VHC con un vector de expresión de una secuencia nucleotídica que codifica para el polipéptido NS5b del VHC, así como los medios necesarios para su expresión.
- 20 19. Composición farmacéutica según la reivindicación 18, caracterizada porque comprende asimismo un vehículo farmacéuticamente apropiado.
- 25 20. Composición farmacéutica según la reivindicación 18 ó 19, caracterizada porque es apropiada para una administración subcutánea, intramuscular, intravenosa, tópica o transdérmica.
- 30 21. Kit farmacéutico, caracterizado porque comprende por lo menos un vector de expresión de una secuencia nucleotídica que codifica para la poliproteína NS3/NS4 del VHC y por lo menos un vector de expresión de una secuencia nucleotídica que codifica para el polipéptido NS5b del VHC, así como los medios necesarios para su expresión.
- 35 22. Kit farmacéutico, caracterizado porque comprende un vector de expresión tal como el definido en una de las reivindicaciones 7 a 10, y un vector de expresión tal como el definido en una de las reivindicaciones 11 a 14.
- 40 23. Kit farmacéutico, que comprende un vector de expresión tal como el definido en cualquiera de las reivindicaciones 4 a 14, o bien un vector de expresión de una secuencia nucleotídica que codifica para la poliproteína NS3/NS4 del VHC con un vector de expresión de una secuencia nucleotídica que codifica para el polipéptido NS5b del VHC, así como los medios necesarios para su expresión, y
- a. por lo menos una composición peptídica tal como la definida en las reivindicaciones 1 a 3, o
 - b. por lo menos una secuencia nucleotídica que codifica para la poliproteína NS3/NS4 del VHC y para el polipéptido NS5b del VHC.
- 45 24. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20 o kit farmacéutico según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 23, caracterizados porque se trata de una vacuna.

Figura 1

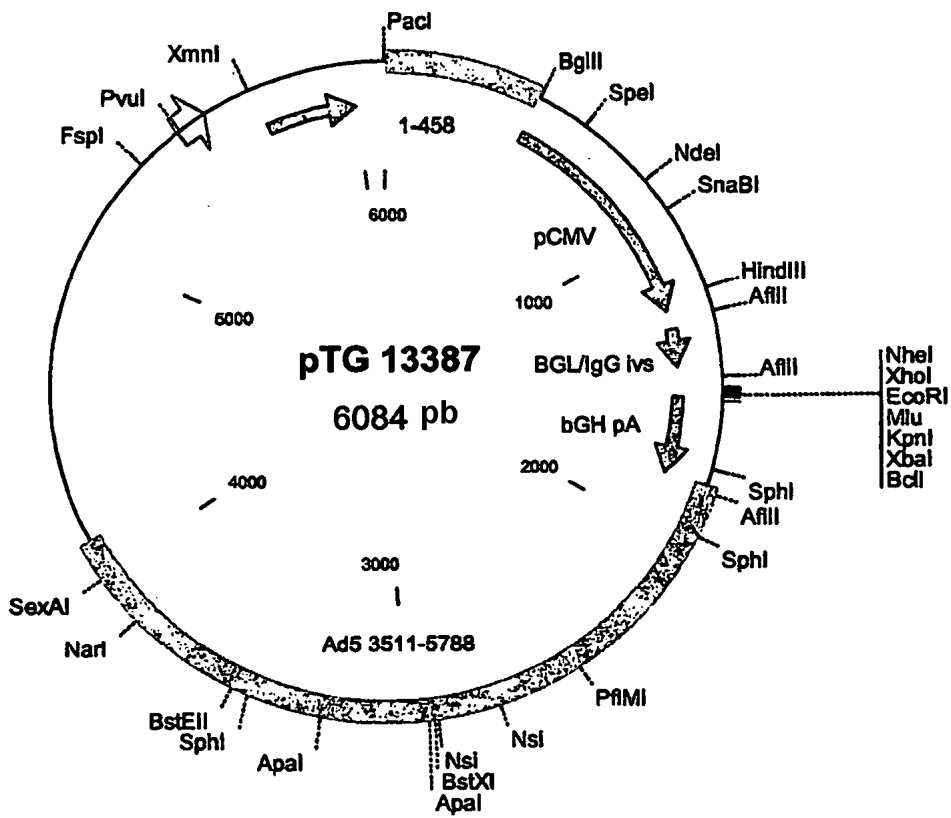


Figura 1A

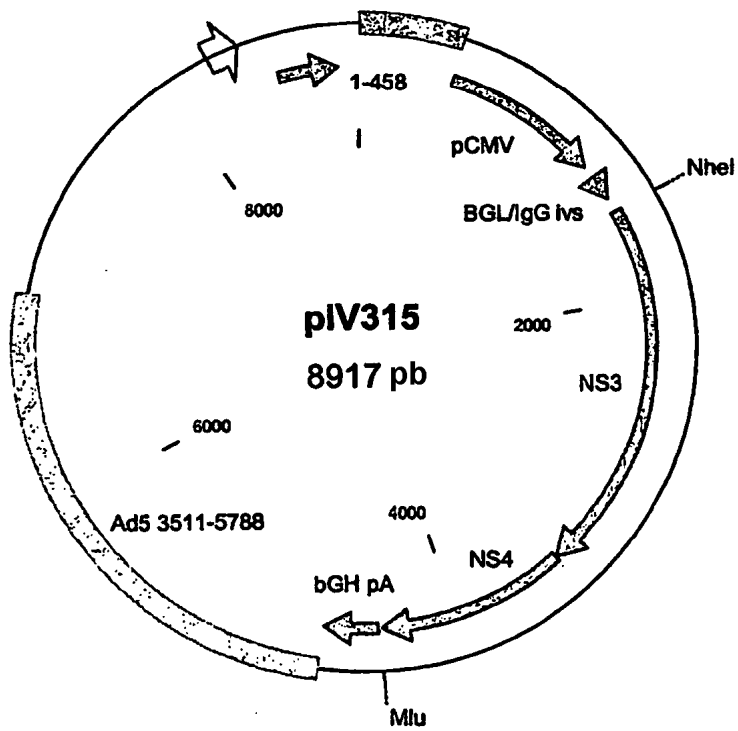


Figura 1b

Figura 1 (continuación)

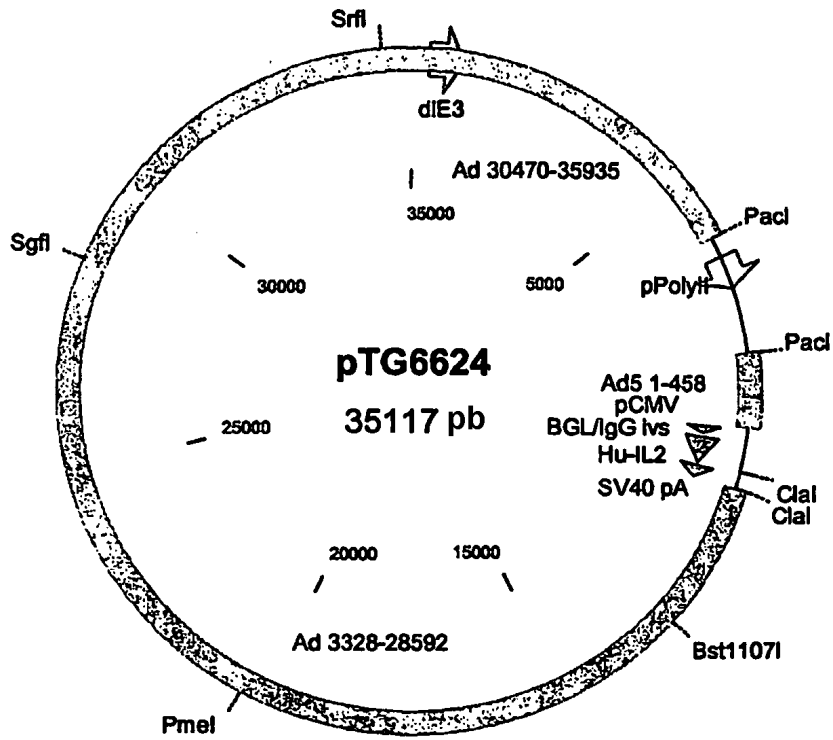


Figura 1c

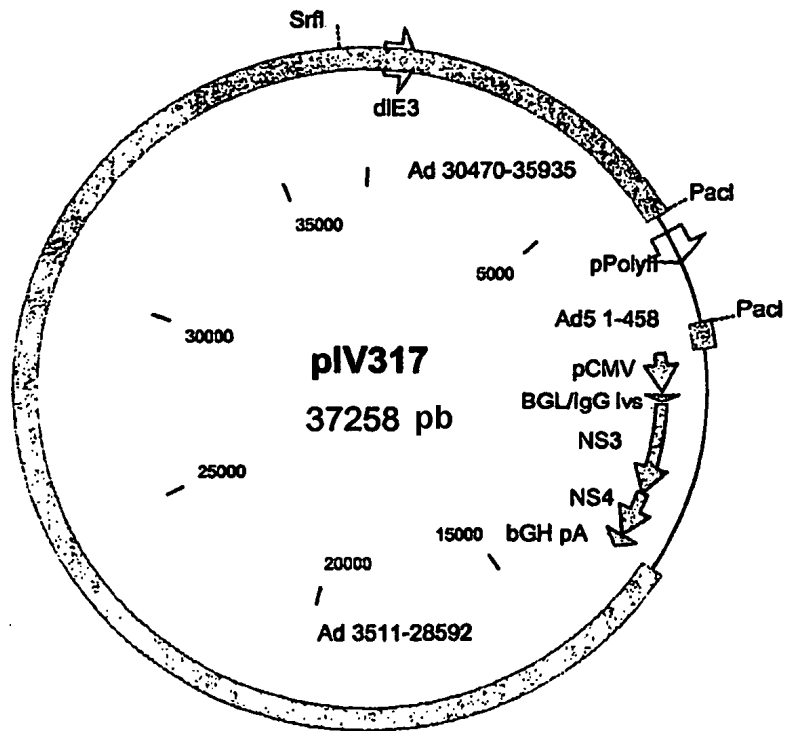


Figura 1d

Figura 1 (continuación)

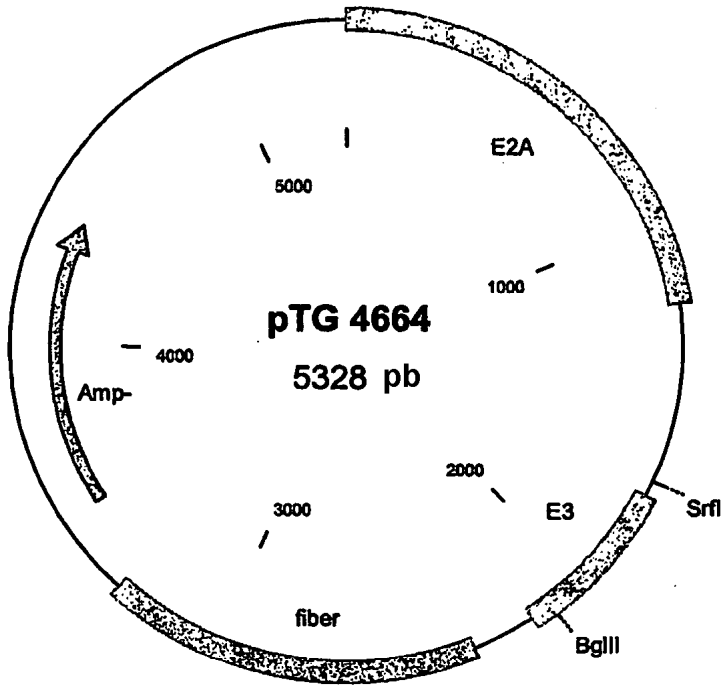


Figura 1E

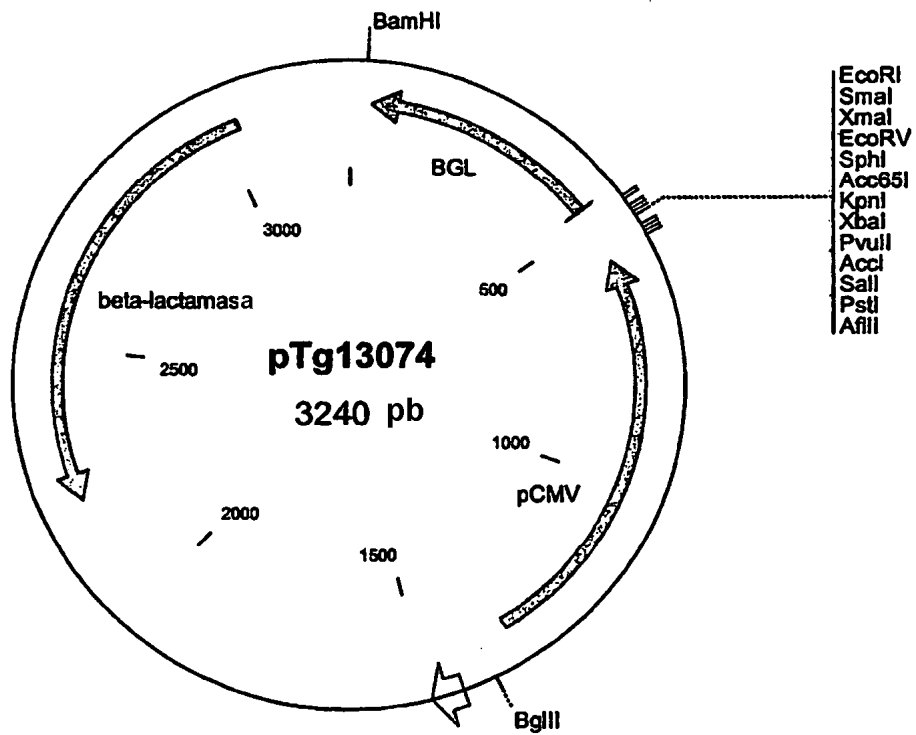


Figura 1F

Figura 1 (continuación)

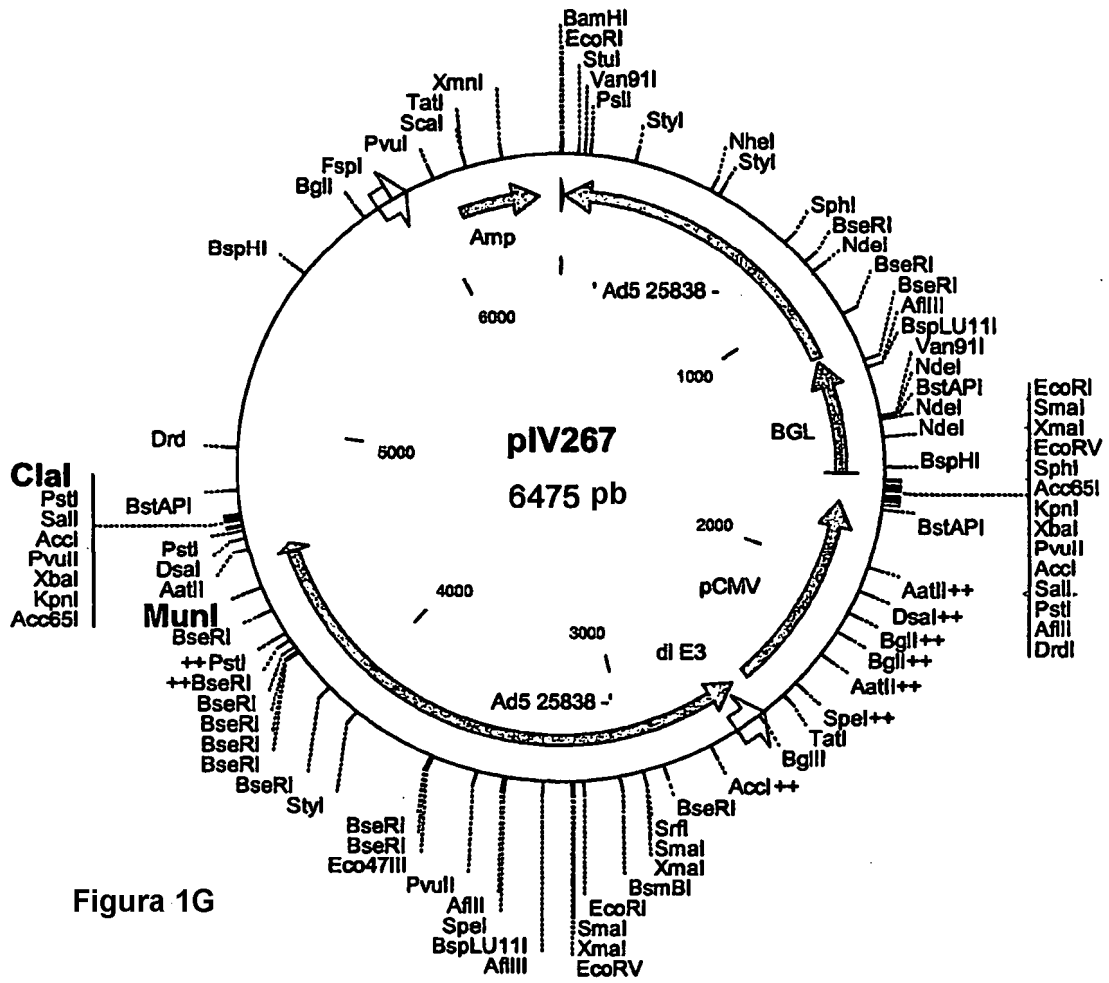


Figura 1G

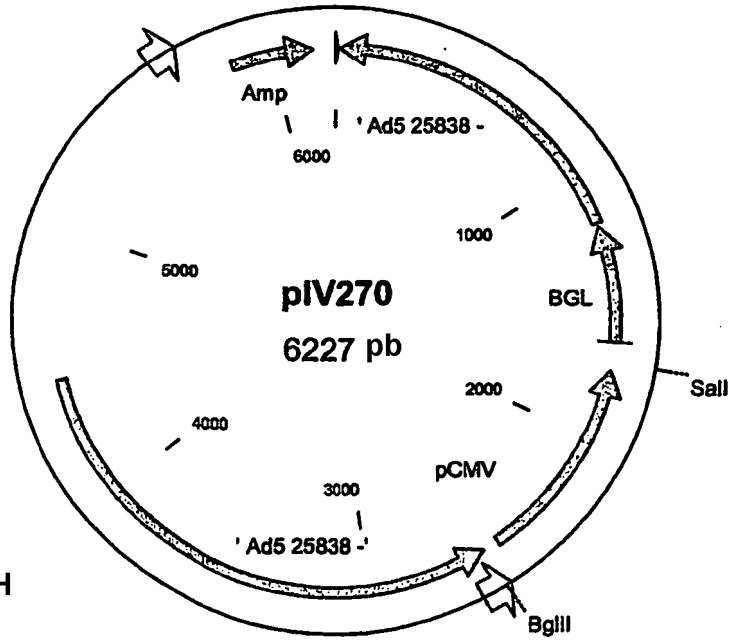


Figura 1H

Figura 1 (continuación)

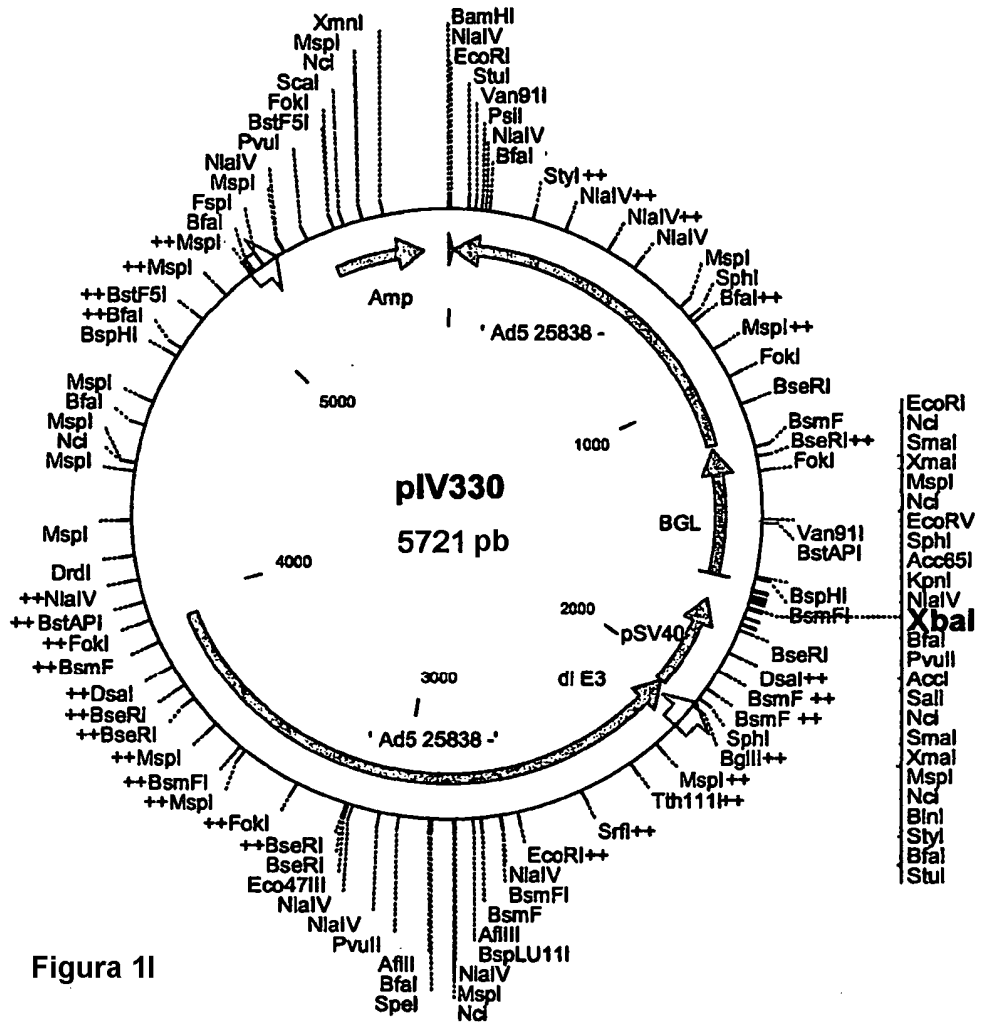


Figura 1I

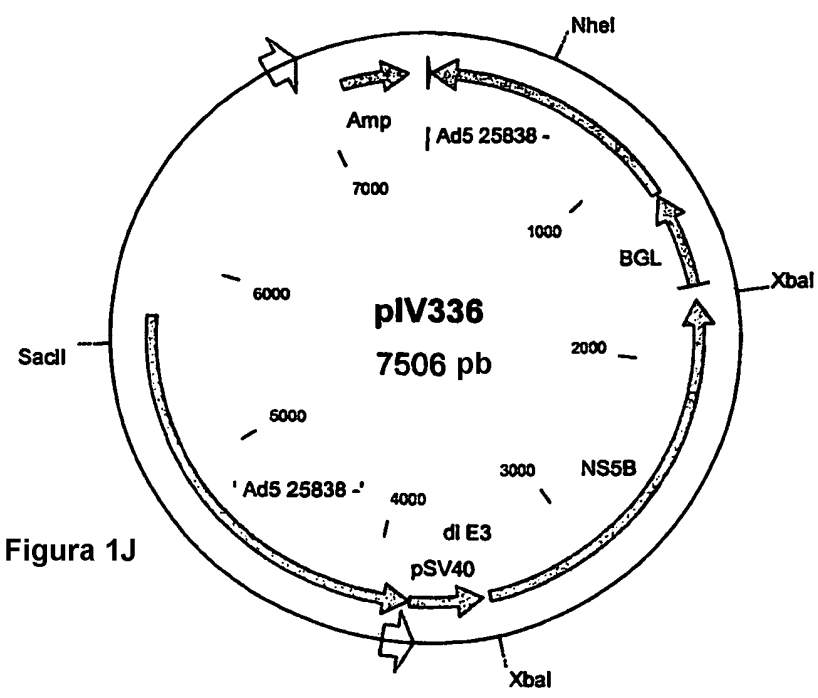


Figura 1J

Figura 1 (continuación)

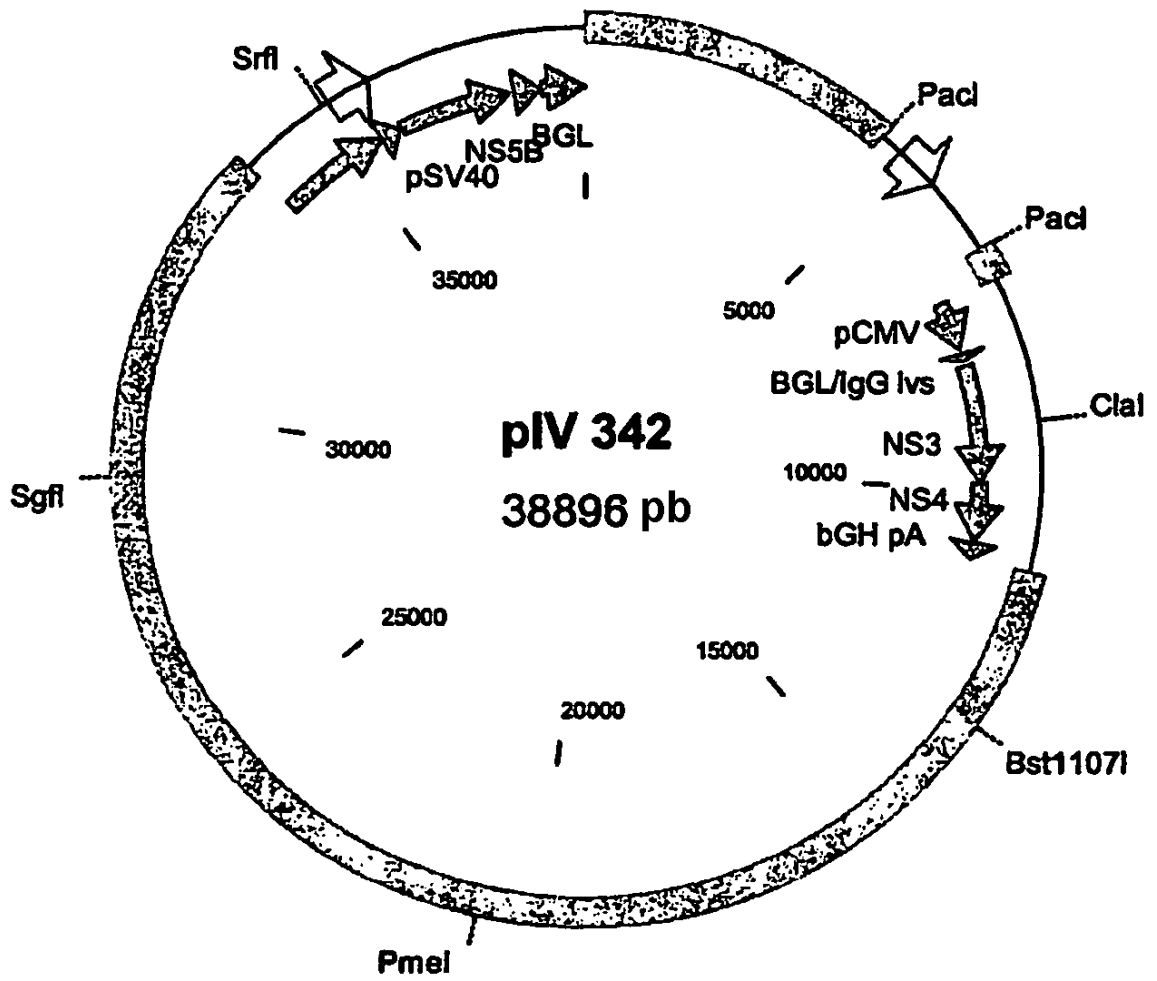


Figura 1K

Figura 2

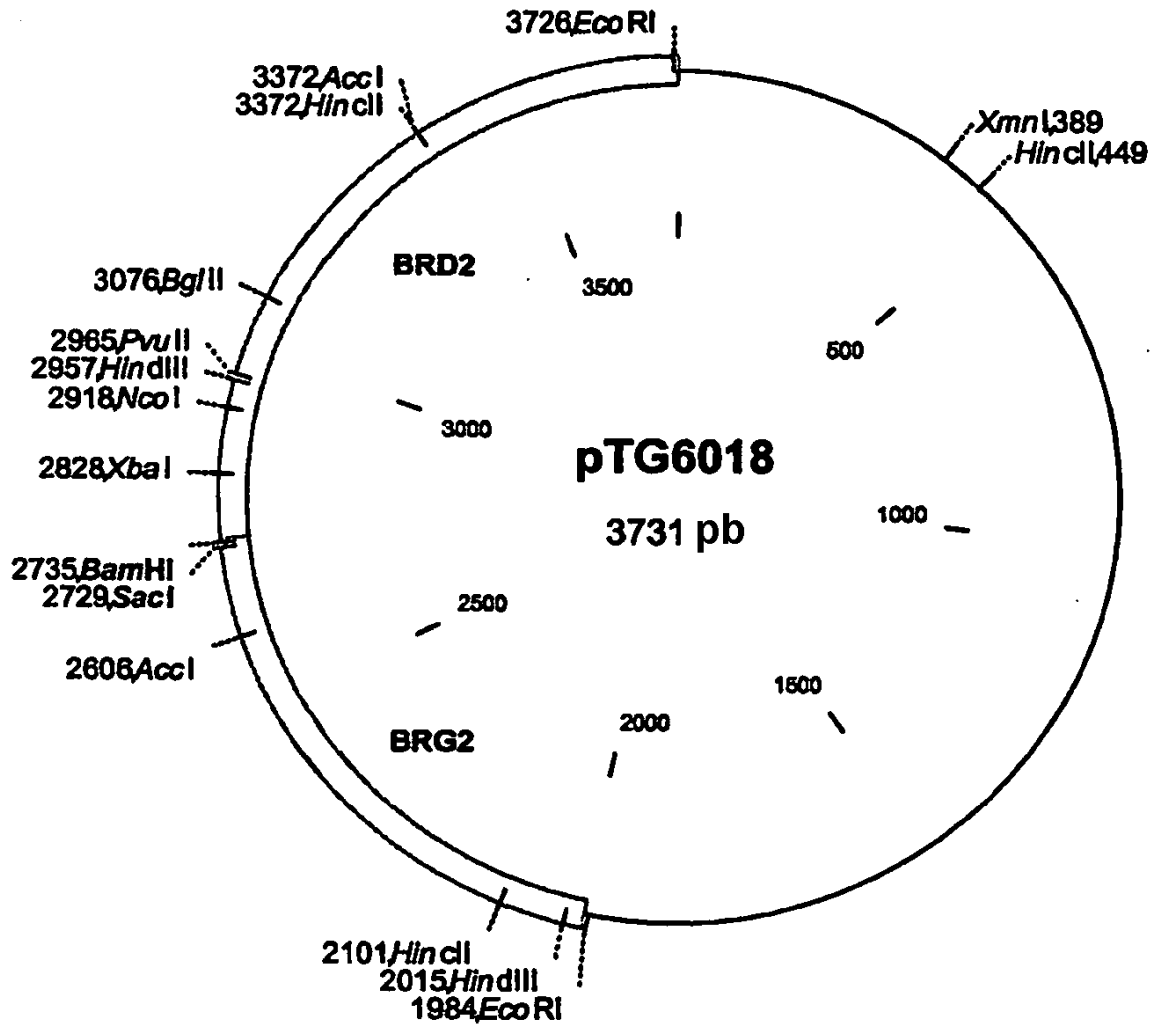


Figura 2A

Figura 2 (continuación)

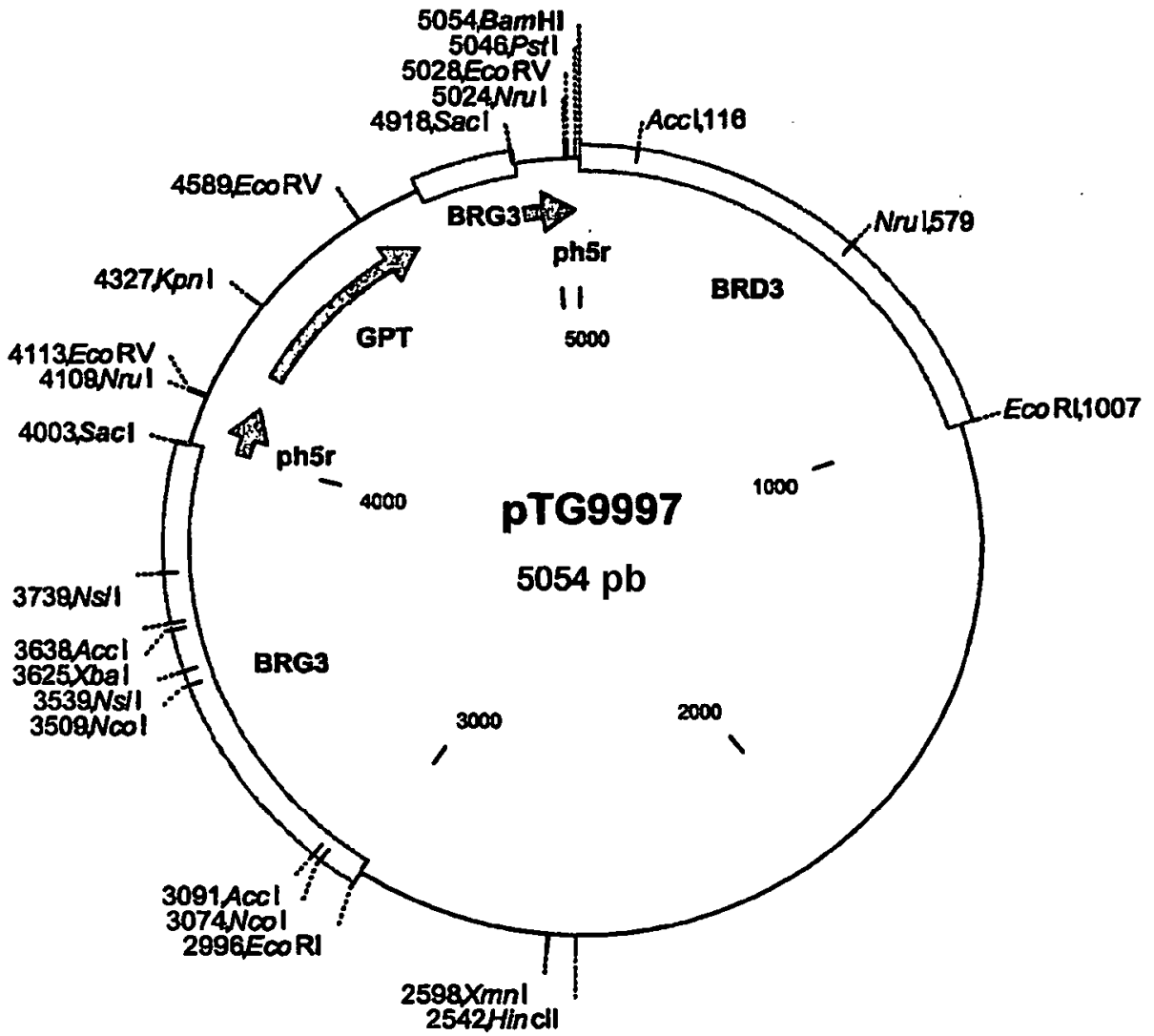


Figura 2B

Figura 2 (continuación)

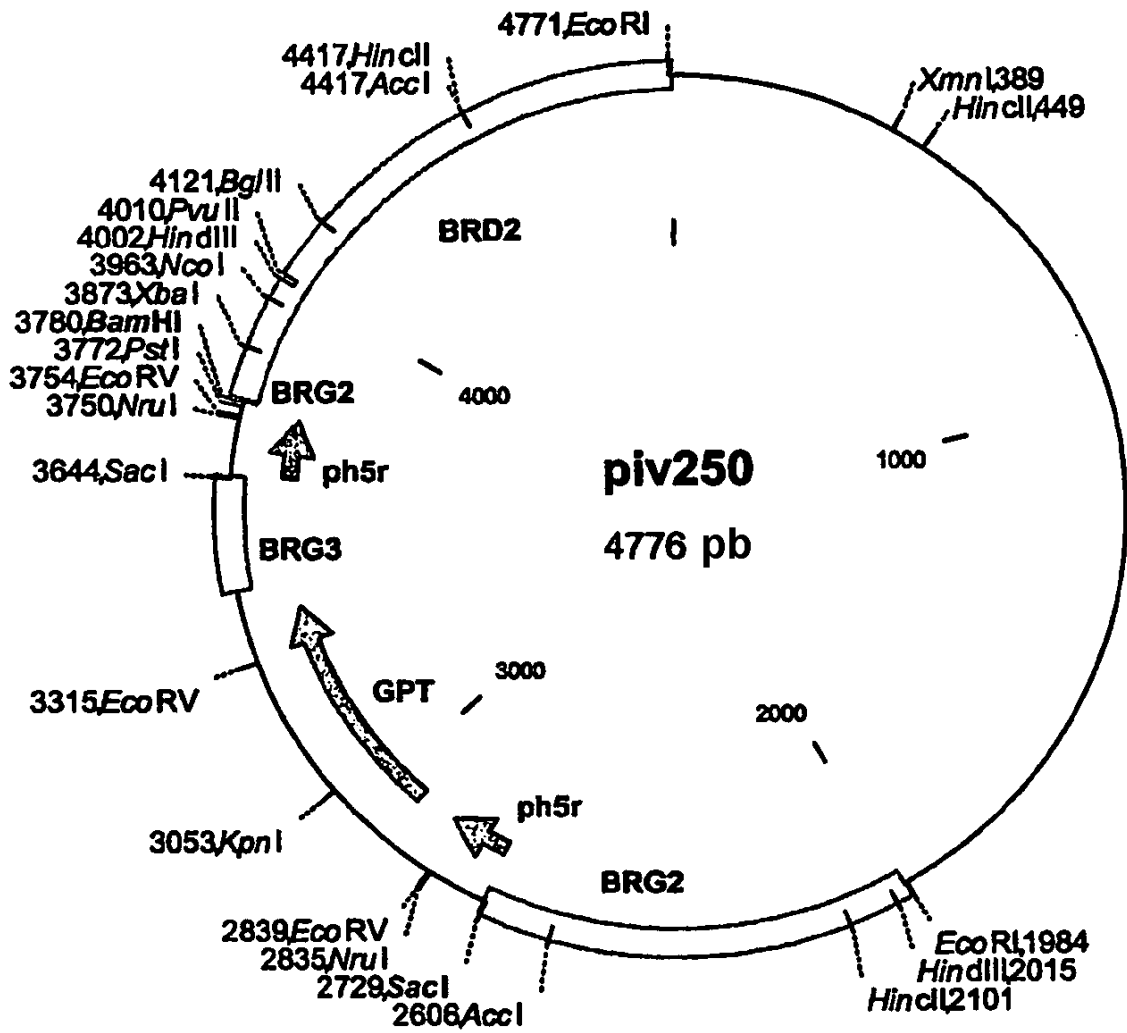


Figura 2C

Figura 2 (continuación)

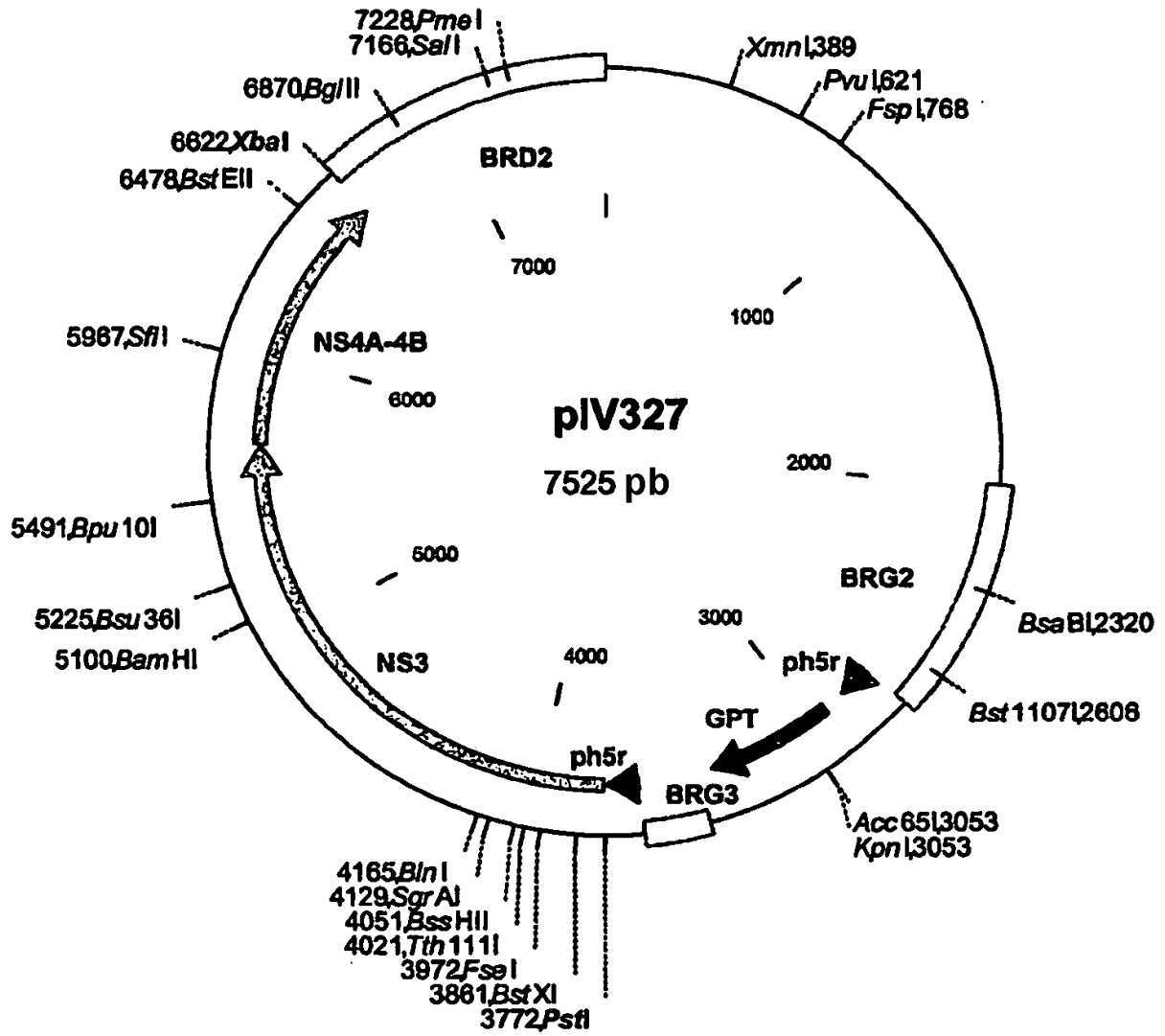


Figura 2D

Figura 2 (continuación)

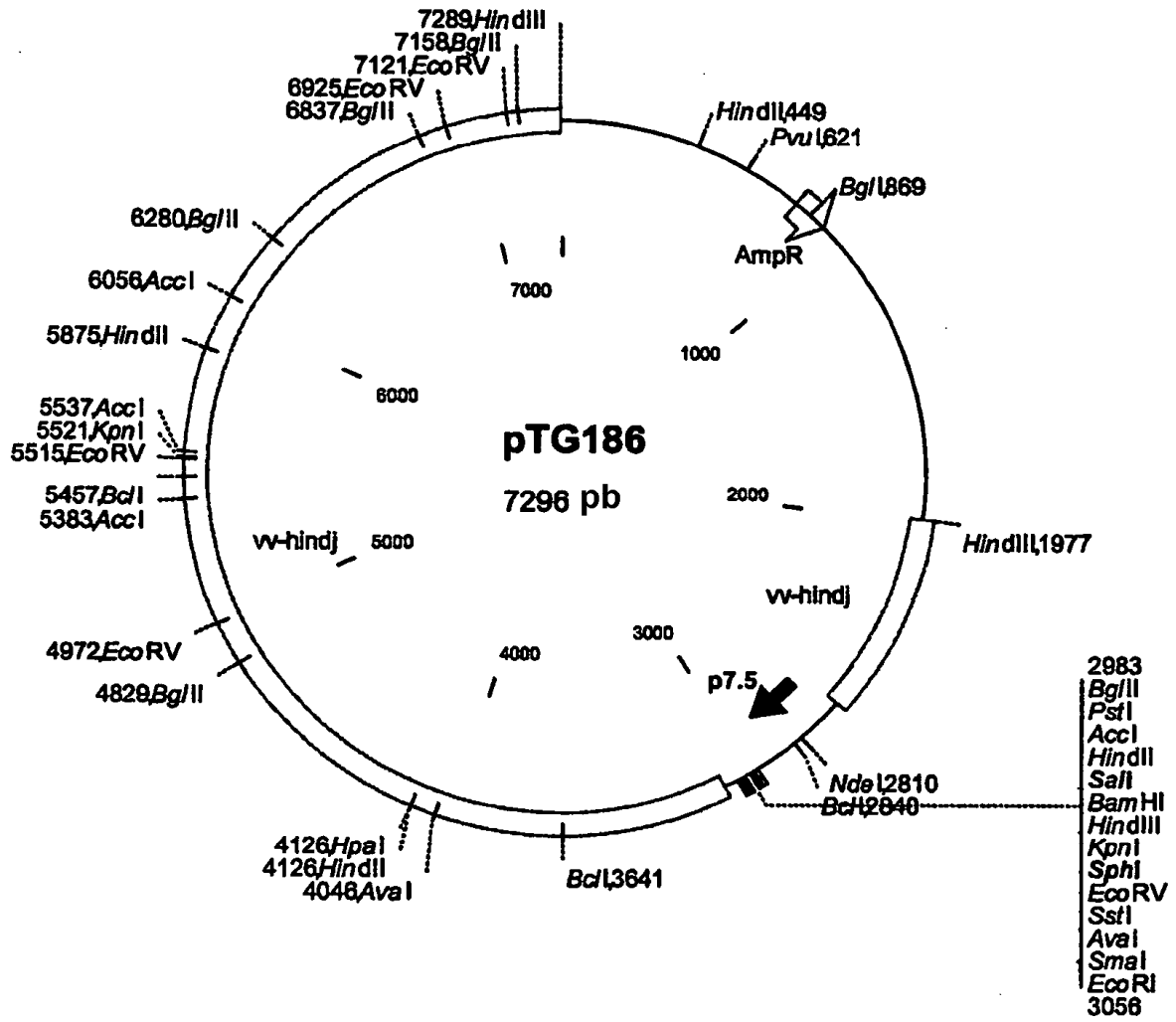


Figura 2E

Figura 2 (continuación)

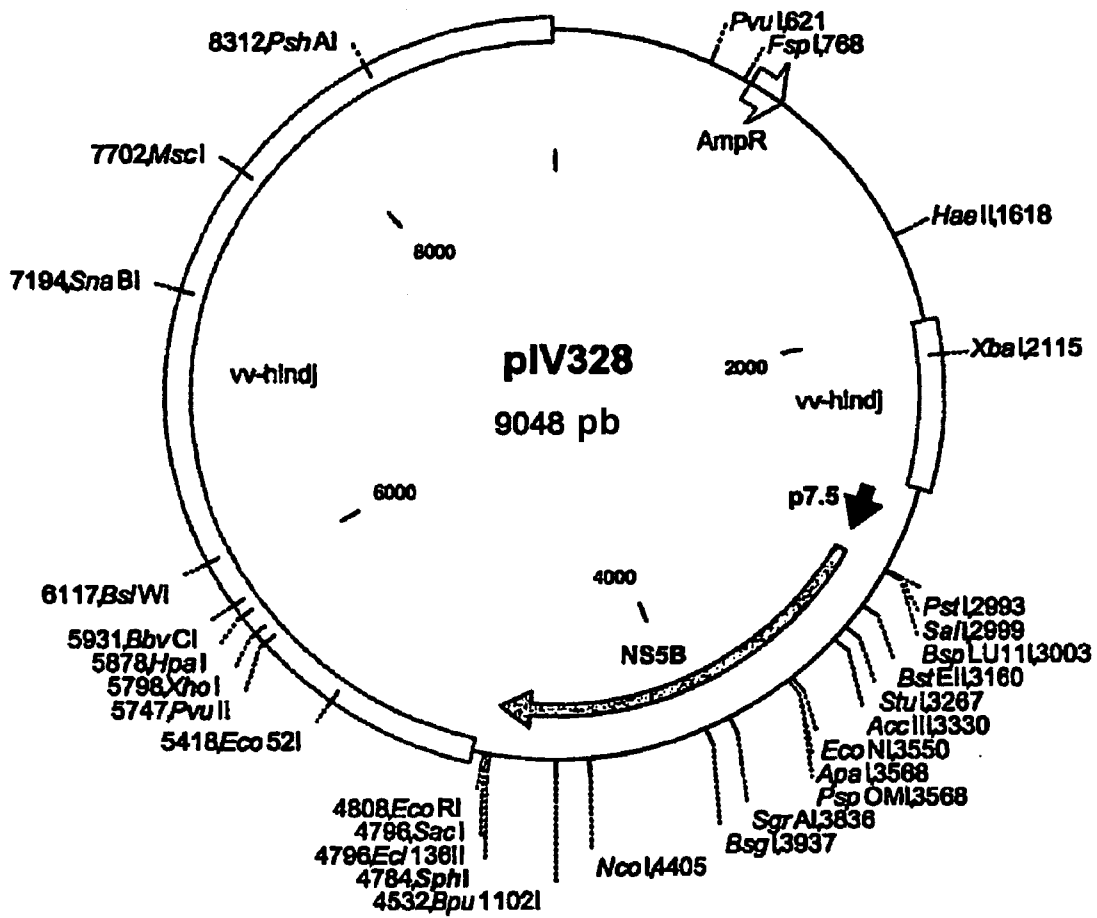


Figura 2F

Figura 2 (continuación)

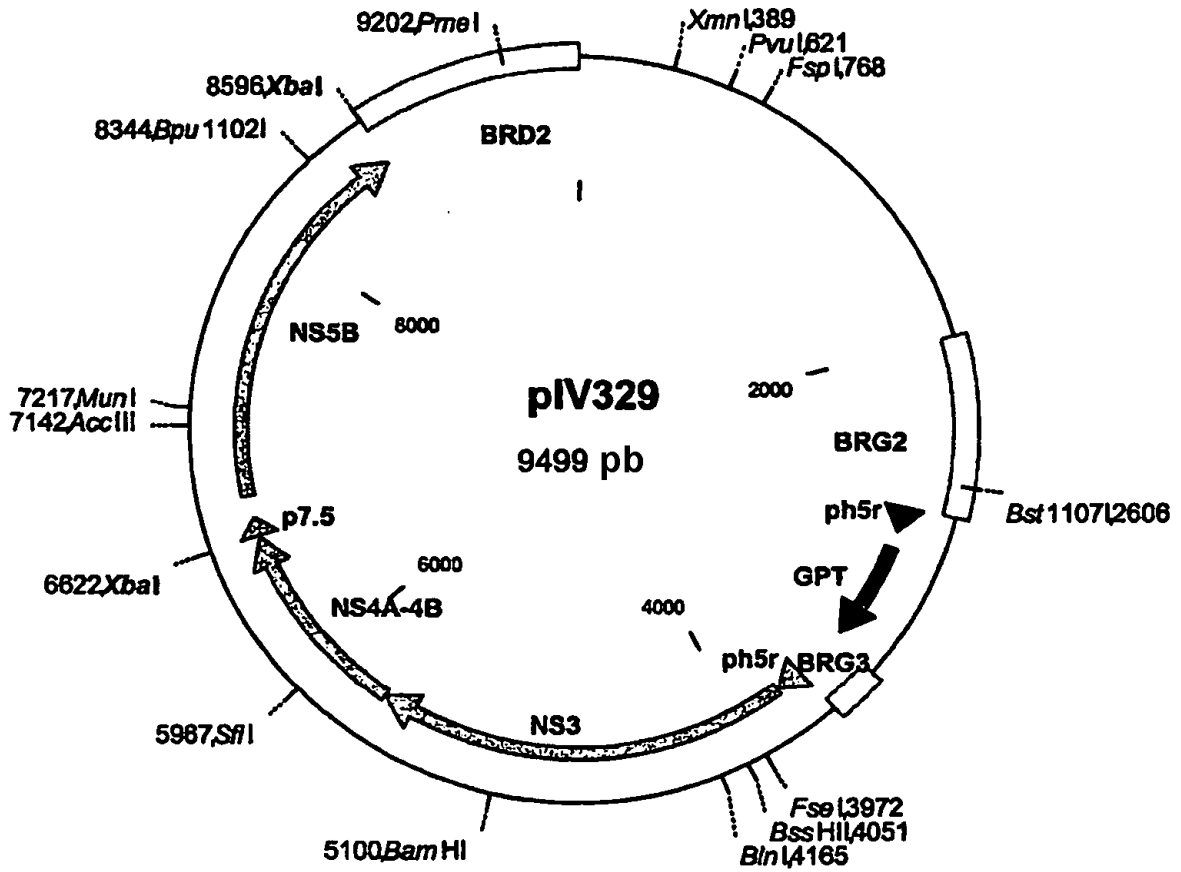


Figura 2G

Figura 2 (continuación)

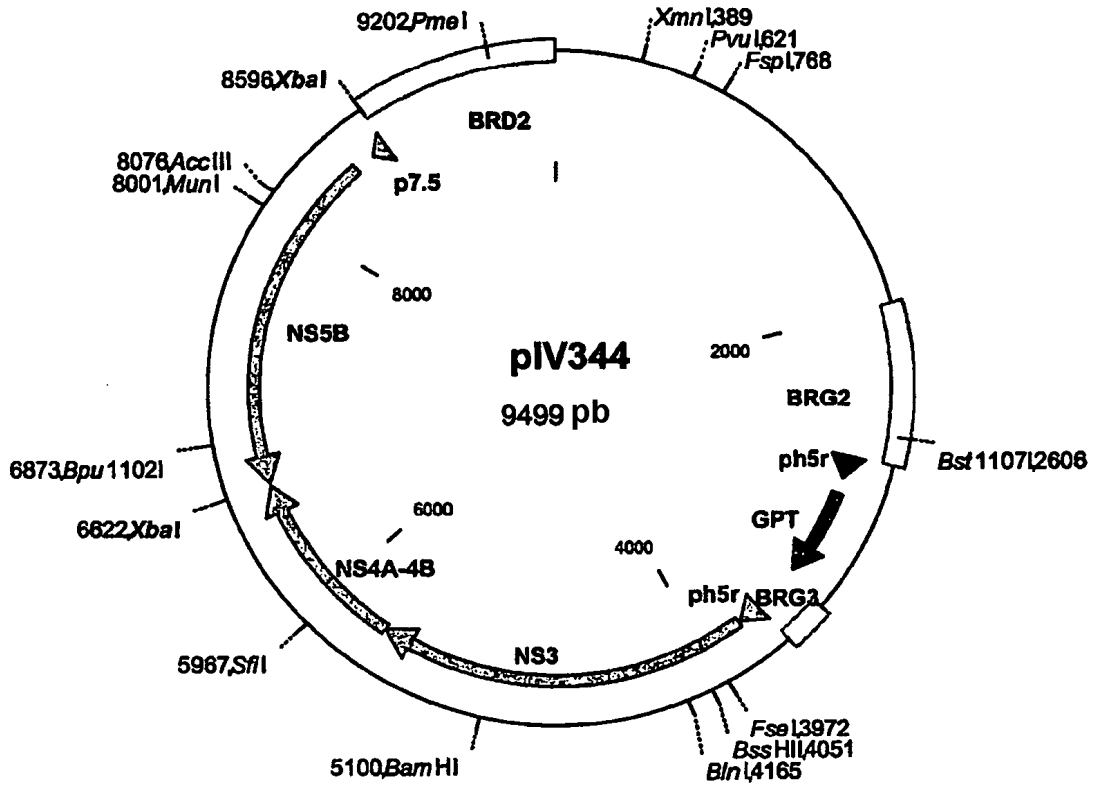


Figura 2H

Figura 3

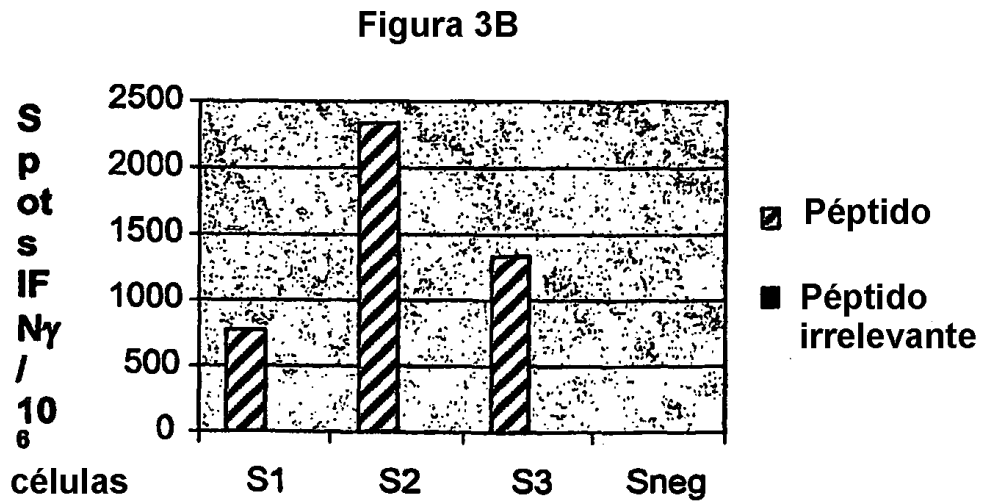
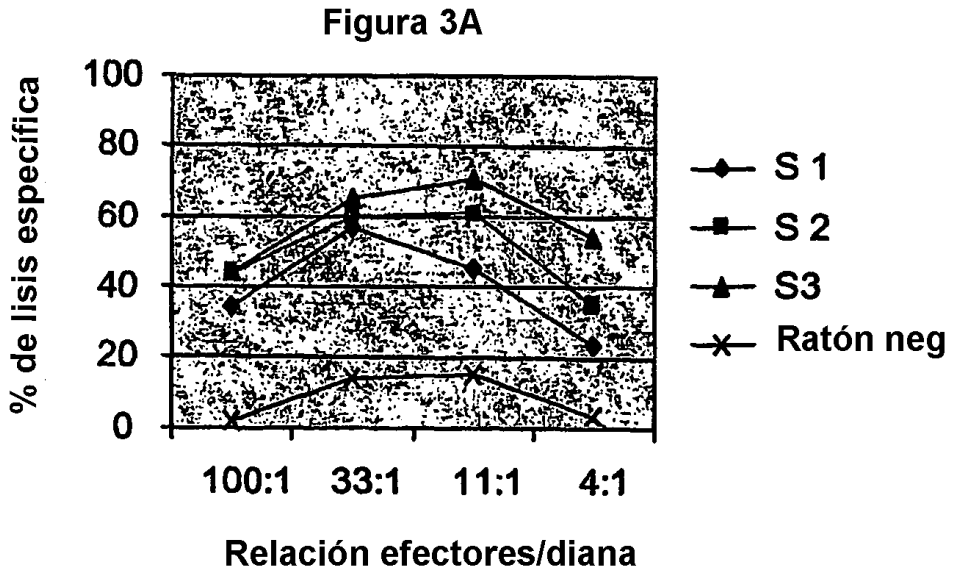


Figura 4

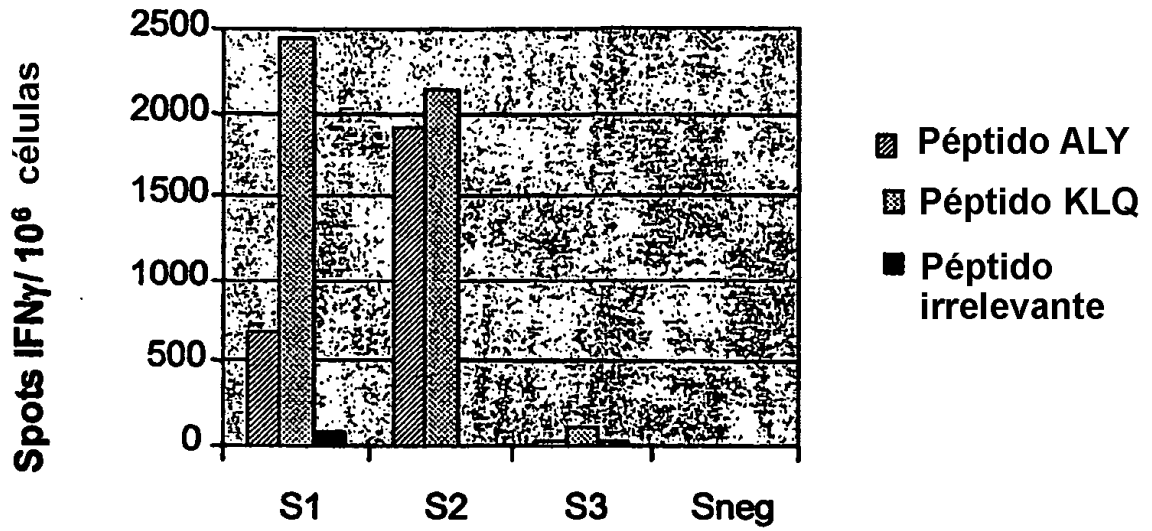


Figura 5

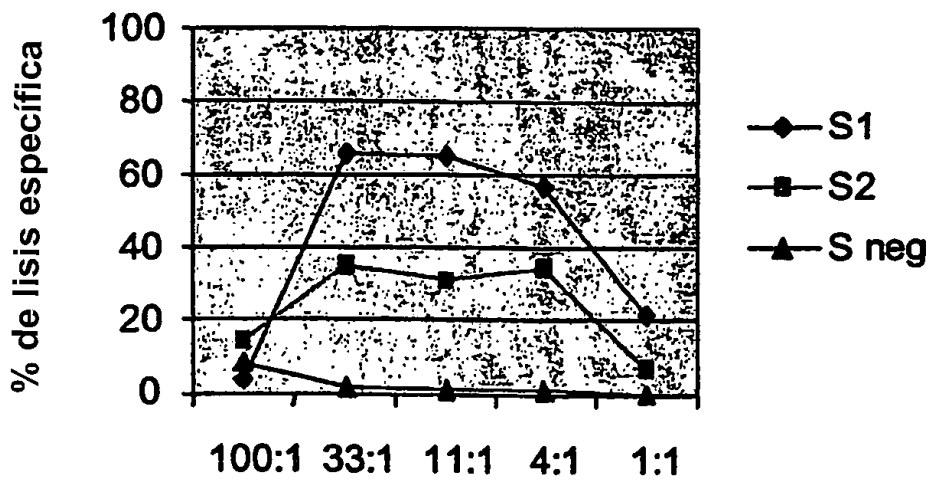


Figura 6

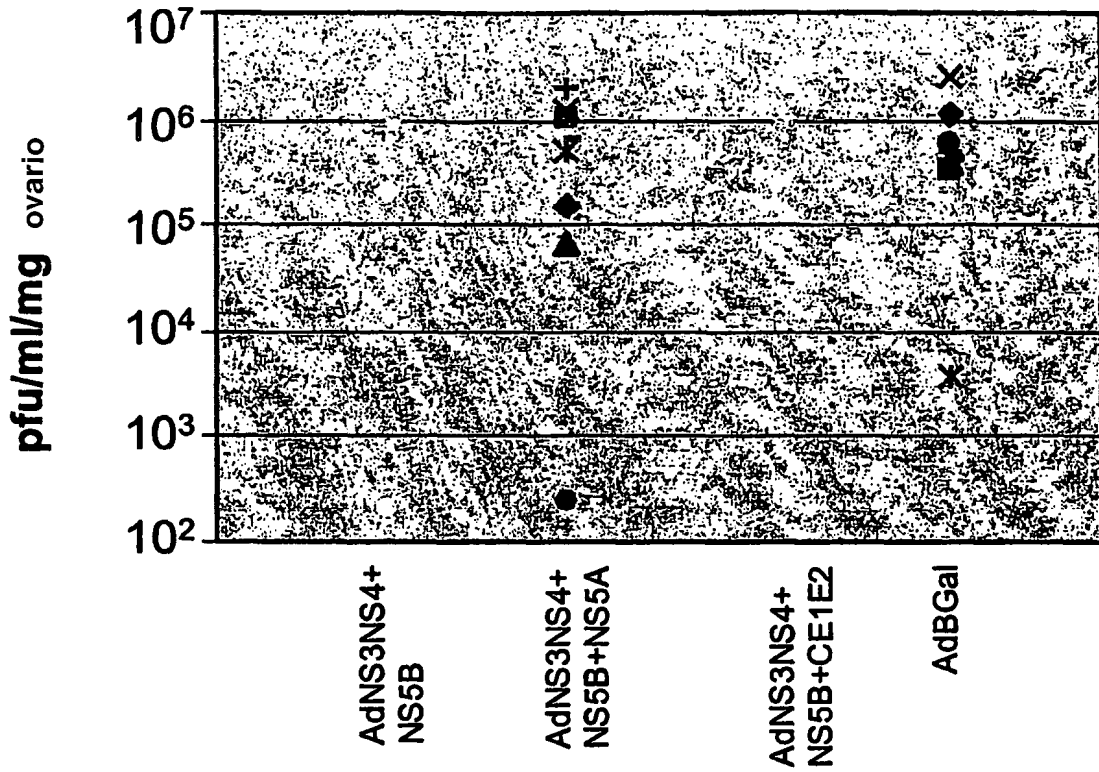


Figura 7

