

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 371 936**

51 Int. Cl.:
C12N 15/40 (2006.01)
C07K 14/18 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
C12Q 1/70 (2006.01)
G01N 33/576 (2006.01)
A61K 39/29 (2006.01)
C12P 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07020248 .6**
96 Fecha de presentación: **15.08.2001**
97 Número de publicación de la solicitud: **1947185**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.07.2008**

54 Título: **ÁCIDO NUCLEICO QUE CODIFICA NS3/4A DE HCV.**

30 Prioridad:
17.08.2000 US 225767 P
29.08.2000 US 229175 P
03.11.2000 US 705547

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
11.01.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
11.01.2012

73 Titular/es:
ChronTech Pharma AB
Hälsövägen 7
141 57 Huddinge, SE

72 Inventor/es:
Sallberg, Matti y
Hultgren, Catharina

74 Agente: **Polo Flores, Carlos**

ES 2 371 936 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

Ácido nucleico que codifica NS3/4A de HCV

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a composiciones para aumentar el efecto de vacunas en animales, tales como especies domésticas, deportivas o mascotas, y en seres humanos. Se realiza la divulgación del uso de ribavirina como adyuvante y de composiciones que tienen ribavirina y un antígeno.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El uso de vacunas para prevenir enfermedades en seres humanos, animales de granja, animales deportivos y mascotas domésticas es una práctica común. Sin embargo, con frecuencia el antígeno usado en una vacuna no es suficientemente inmunogénico para elevar el título de anticuerpos a niveles que sean suficientes para proporcionar protección contra una exposición posterior o para mantener el potencial de disponer de esos niveles durante periodos de tiempo prolongados. Además, muchas vacunas son completamente incapaces de inducir inmunidad mediada por células, que es una defensa inmune primaria contra infecciones bacterianas y víricas. Actualmente se está centrando una cantidad considerable de investigación en el desarrollo de vacunas más potentes y de formas de mejorar la inmunogenicidad de preparaciones que contienen antígenos. (Véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 6.056.961, 6.060.068, 6.063.380, y Li y col., Science 288:2219-2222(2000)).

Entre estas vacunas "débiles" son muy conocidas las vacunas de la hepatitis B. Por ejemplo, vacunas recombinantes contra el virus de la hepatitis B tales como Genhevacb (Pasteur Merieux Serums et Vaccines, 58, Avenue Leclerc 69007 Lyon, Francia), Engerixb (Smith, Kline and Symbol French) y Recombivaxhb (Merck, Sharp, and Dhome) son eficaces sólo después de al menos tres inyecciones en los días 0, 30 y 60 ó 180, seguidas de una dosis de refuerzo obligatoria después de un año. (Chedid y col., Patente de Estados Unidos N° 6.063.380). Además, muchos sujetos que reciben estas vacunas responden de manera deficiente, en caso de hacerlo. Como muchas regiones del mundo son endémicas para la infección por HBV, el poco carácter inmunogénico de las vacunas de HBV existentes se ha convertido en un problema extremadamente grave.

Para obtener una respuesta celular y/o humoral más fuerte, es común administrar la vacuna en un material que aumente la respuesta inmune del paciente al antígeno presente en la vacuna. Los adyuvantes usados más comúnmente para protocolos de vacunas son preparaciones de aceite y alumbre. (Chedid y col., Patente de Estados Unidos N° 6.063.380). Se necesita un mayor repertorio de adyuvantes seguros y eficaces.

En terapias antivirales se han usado mucho análogos de nucleósidos debido a su capacidad de reducir la replicación viral (Hosoya y col., J. Inf. Dis. 168:641-646 (1993)). La ribavirina (1-β-D-ribofuranosil-1,2,4-triazol-3-carboxamida) es un análogo de guanósina sintético que se ha usado para inhibir la replicación de virus de ARN y ADN. (Huffman y col., Antimicrob Agents. Chemother., 3:235(1973); Sidwell y col., Science, 177:705 (1972)). Se ha demostrado que la ribavirina es un inhibidor competitivo de la inositol mono-fosfato (IMP) deshidrogenasa (IMPDH), que convierte el IMP en IMX (que después se convierte en GMP). De Clercq, Anti viral Agents: characteristic activity spectrum depending on the molecular target with which they interact, Academia press, Inc., New York N.Y., páginas 1-55 (1993). Como resultado del tratamiento a largo plazo con ribavirina se han agotado reservas intracelulares de GTP.

Además de la actividad antiviral, los investigadores han observado que algunos análogos de guanósina tienen un efecto sobre el sistema inmune (Patentes de Estados Unidos N° 6.063.772 y 4.950.647). Se ha demostrado que la ribavirina inhibe las respuestas inmunes humorales funcionales (Peavy y col., J. Immunol., 126:861-864, (1981); Powers y col., Antimicrob. Agents. Chemother. 22: 108-114 (1982)) y la modulación mediada por IgE de la secreción de mastocitos. (Marquardt y col., J. Pharmacol. Exp. Therapeutics, 240:145-149 (1987)). Algunos investigadores han indicado que una terapia oral diaria de ribavirina tiene un efecto modulador inmune en seres humanos y ratones (Hultgren y col., J. Gen. Virol., 79:2381-2391 (1998) y Cramp y col., Gastron. Enterol., 118:346-355 (2000)). La comprensión actual de los efectos de la ribavirina sobre el sistema inmune está en sus primeras fases.

55 SUMARIO DE LA INVENCION

La invención es como sigue:

1. Un ácido nucleico purificado o aislado constituido por la SEQ ID NO 16 o el complemento del mismo;
2. Un ácido nucleico purificado o aislado que codifica la secuencia peptídica de SEQ ID NO 17;

60

3. Un ácido nucleico purificado o aislado que comprende la SEQ ID NO 16;
4. Un ácido nucleico purificado o aislado que comprende un ácido nucleico que codifica la secuencia peptídica de SEQ ID NO 17;
5. Un ácido nucleico purificado o aislado que comprende al menos 100, 200, 500 o 1000 nucleótidos consecutivos del ácido nucleico purificado o aislado de uno cualquiera de 1-4;
6. Un vector que comprende el ácido nucleico purificado o aislado de uno cualquiera de 1-5;
7. Una célula aislada que comprende el ácido nucleico purificado o aislado de uno cualquiera de 1-5;
8. Una composición inmunogénica que comprende el ácido nucleico purificado o aislado de uno cualquiera de 1-5;
9. Una composición que comprende el ácido nucleico purificado o aislado de uno cualquiera de 1-5;
10. Una célula aislada que comprende el vector de 6;
11. Una composición inmunogénica que comprende el vector de 6;
12. Una composición que comprende el vector de 6;
13. La composición inmunogénica de 8 u 11 que comprende además un adyuvante.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La FIGURA 1 es un gráfico que muestra la respuesta humoral a 10 y 100 µg de proteína 3 no estructural (NS3) del virus de la hepatitis C (HCV) recombinante, determinada por medio de títulos como criterio de valoración, cuando se coadministró una sola dosis de 1 mg de ribavirina.

La FIGURA 2 es un gráfico que muestra la respuesta humoral a 20 µg de proteína 3 no estructural (NS3) del virus de la hepatitis C (HCV) recombinante, determinada por medio de títulos como criterio de valoración, cuando se coadministró una sola dosis de 0,1, 1,0 ó 10 mg de ribavirina

La FIGURA 3 es un gráfico que muestra los efectos de una sola dosis de 1 mg de ribavirina sobre respuestas proliferativas de ganglios linfáticos específicas de NS3, determinados por respuestas de rellamada *in vitro*.

La FIGURA 4 es un gráfico que muestra el título de anticuerpos en ratones H-2^d contra NS3 en función del tiempo después de la primera inmunización. Los rombos indican el título de anticuerpos en ratones inmunizados con NS3/4A-pVAX y los cuadrados indican el título de anticuerpos en ratones inmunizados con NS3-pVaX.

La FIGURA 5A es un gráfico que muestra el porcentaje de lisis mediada por CTL específicos de células diana SP2/0 en función de la relación entre efector y diana. Como inmunógeno de control se usó solución salina tamponada con fosfato (PBS).

La FIGURA 5B es un gráfico que muestra el porcentaje de lisis mediada por CTL específicos de células diana SP2/0 en función de la relación entre el efector y la diana. Como inmunógeno se usó el plásmido NS3/4A-pVAX.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION Y OTROS ASPECTOS DE LA DIVULGACION

Se ha descubierto que las composiciones que comprenden ribavirina y un antígeno (por ejemplo, una molécula que contiene un epítipo de un patógeno tal como un virus, bacteria, moho, levadura o parásito) aumentan y facilitan la respuesta inmune de un animal al antígeno. Es decir, se descubrió que la ribavirina es un "adyuvante" eficaz que, para los fines de esta descripción, se refiere a un material que tiene la capacidad de aumentar o facilitar una respuesta inmune a un antígeno particular. La actividad adyuvante de la ribavirina se manifestó por un aumento significativo de la protección mediada por el sistema inmune contra el antígeno, un aumento en el título de anticuerpo inducido contra el antígeno y un aumento en las respuestas de células T proliferativas.

En este documento se describen varias composiciones (por ejemplo, vacunas) que comprenden ribavirina y un antígeno o epítipo. Las formulaciones de vacuna que contienen ribavirina, por ejemplo, pueden variar de acuerdo con la cantidad de ribavirina, la forma de ribavirina y el tipo de antígeno. El antígeno puede ser un péptido o un ácido nucleico (por ejemplo, un ARN que codifica un antígeno peptídico o una construcción que expresa un antígeno peptídico cuando se

introduce en un sujeto). Las composiciones pueden comprender ribavirina y un antígeno viral de hepatitis (por ejemplo, antígeno de HAV, antígeno de HBV, antígeno de HCV, un ácido nucleico que codifica estas moléculas o cualquier combinación de los mismos). Se desea al menos un antígeno de HCV o un epítipo presente en la **SEQ ID NO: 1** o un ácido nucleico que codifica dicho antígeno de HCV para mezclar con ribavirina para obtener composiciones. Se dan a conocer composiciones que comprenden ribavirina y un péptido que comprende la **SEQ ID NO: 1**, o un fragmento del mismo que tiene al menos 2500, 2000, 1600, 1200, 800, 400, 200, 100, 50, 10 ó 3 aminoácidos consecutivos de la **SEQ ID NO: 1**. Se dan a conocer también composiciones que comprenden ribavirina y un ácido nucleico que codifica la **SEQ ID NO: 13** o un fragmento del mismo que tiene al menos 9, 12, 15, 20, 30, 50, 75, 100, 200 ó 500 nucleótidos consecutivos de la **SEQ ID NO: 13**.

Las composiciones (por ejemplo, una vacuna) pueden comprender ribavirina y un fragmento específico de la **SEQ ID NO: 1**, donde dicho fragmento corresponde a un dominio particular de HCV. Se dan a conocer fragmentos de HCV que corresponden a los aminoácidos 1-182, 183-379, 380-729, 730-1044, 1045-1657, 1658-1711, 1712-1971 ó 1972-3011 de la **SEQ ID NO: 1** y composiciones que comprenden ribavirina y un ácido nucleico que codifica uno o más de estos fragmentos.

En el trabajo que condujo a la presente invención se ha descubierto una nueva secuencia de HCV. Se clonó un nuevo ácido nucleico y proteína correspondiente al dominio NS3/4A de HCV a partir de un paciente infectado con HCV (**SEQ ID NO: 16**). Una búsqueda en el Genbank reveló que la secuencia clonada tenía la mayor homología con secuencias de HCV, pero sólo tenía una homología del 93% con el pariente de HCV más próximo (nº de acceso AJ 278830). Esta secuencia se da a conocer en *J. Viral. Hepat.*, 7 (6), 2000, 459-465. Se dan a conocer este nuevo péptido (**SEQ ID NO: 17**) y fragmentos del mismo de al menos 3, 4, 6, 8, 10, 12, 15 ó 20 aminoácidos de longitud, ácidos nucleicos que codifican estas moléculas, vectores que tiene dichos ácidos nucleicos y células que tienen dichos vectores, ácidos nucleicos o péptidos. Los aspectos descritos en este documento comprenden ribavirina y este nuevo péptido NS3/4A o un fragmento del mismo de al menos 3, 4, 6, 8, 10, 12, 15 ó 20 aminoácidos de longitud (por ejemplo, **SEQ ID NO: 25**) o un ácido nucleico que codifica una o más de estas moléculas. La presente invención es la materia en cuestión de las reivindicaciones.

También se crearon mutantes del nuevo péptido NS3/4A. Se descubrió que los mutantes truncados (por ejemplo, **SEQ ID NO: 29**) y los mutantes que carecen de un sitio de escisión proteolítica son muy inmunogénicos. Se dan a conocer nuevos péptidos (**SEQ ID NO: 29-32** y **43-49**) y fragmentos de los mismos de al menos 3, 4, 6, 8, 10, 12, 15 ó 20 aminoácidos de longitud (por ejemplo **SEQ ID NO: 26, 27** y **33-42**), ácidos nucleicos que codifican estas moléculas, vectores que tienen dichos ácidos nucleicos y células que tienen dichos vectores, ácidos nucleicos o péptidos. Algunas de las composiciones descritas en este documento comprenden ribavirina y al menos uno de los péptidos mutantes de HCV descritos anteriormente o un fragmento de los mismos de al menos 3, 4, 6, 8, 10, 12, 15 ó 20 aminoácidos de longitud. Se dan a conocer vacunas que comprenden ribavirina y un ácido nucleico (por ejemplo, ADN) que codifica uno o más de los péptidos descritos anteriormente.

Se dan a conocer procedimientos para fabricar y usar las composiciones anteriores. Por ejemplo, las composiciones descritas anteriormente pueden obtenerse proporcionando ribavirina, proporcionando un antígeno (por ejemplo, un péptido que comprende un antígeno de HCV o un ácido nucleico que codifica dicho péptido) y mezclando dicha ribavirina y dicho antígeno para formular una composición que pueda usarse para mejorar o facilitar una respuesta inmune en un sujeto a dicho antígeno. Los procedimientos incluyen la mezcla de un antígeno o epítipo preferido (por ejemplo, un péptido que comprende la **SEQ ID NO: 1, 6, 7** ó **17** o fragmentos específicos de los mismos, tales como los aminoácidos 1-182, 183-379, 380-729, 730-1044, 1045-1657, 1658-1711, 1712-1971 ó 1972-3011 de la **SEQ ID NO: 1** y ácidos nucleicos que codifican estas moléculas) con ribavirina. Otros antígenos o epítopos también pueden mezclarse con ribavirina, incluyendo pero sin limitación, fragmentos de la **SEQ ID NO: 1** que tienen al menos 2500, 2000, 1600, 1200, 800, 400, 200, 100, 50, 10 ó 3 aminoácidos consecutivos y ácidos nucleicos que codifican estos fragmentos. Los procedimientos particularmente preferidos se refieren a la obtención de composiciones de vacuna de la invención que contienen ribavirina y el fragmento NS3/4A descubierto recientemente o un mutante de NS3/4A (por ejemplo, un mutante truncado o un mutante que carece del sitio de escisión proteolítica), o un fragmento del mismo de al menos 4 aminoácidos de longitud o un ácido nucleico que codifica una o más de estas moléculas.

Se dan a conocer procedimientos para aumentar o facilitar la respuesta inmune de un animal, incluyendo seres humanos, a un antígeno. Dichos procedimientos pueden ponerse en práctica, por ejemplo, identificando a un animal que necesite una potente respuesta inmune a un antígeno/epítipo y proporcionando a dicho animal una composición que comprende el antígeno/epítipo y una cantidad de ribavirina que sea eficaz para mejorar o facilitar una respuesta inmune al antígeno/epítipo. La ribavirina y el antígeno pueden administrarse separadamente, en lugar de en una sola mezcla. Preferiblemente, se administra la ribavirina en este caso poco tiempo antes o poco tiempo después de administrar el antígeno. Los procedimientos pueden implicar proporcionar al animal necesitado ribavirina y un antígeno de hepatitis (por ejemplo, un antígeno de HAV, un antígeno de HBV, un antígeno de HCV o un ácido nucleico que codifica estas moléculas, o cualquier combinación de los mismos). Algunos de estos procedimientos implican antígenos de HCV, tal

como un péptido que comprende la **SEQ ID NO: 1**, o un fragmento del mismo que tiene al menos 2500, 2000, 1600, 1200, 800, 400, 200, 100, 50, 10 ó 3 aminoácidos consecutivos de las **SEQ ID NO: 1**. Procedimientos adicionales implican composiciones que comprenden ribavirina y un ácido nucleico que codifica la **SEQ ID NO: 13** o un ácido nucleico que codifica uno o más de los fragmentos descritos anteriormente.

Los procedimientos pueden referirse al uso de una composición (por ejemplo una vacuna) que comprende ribavirina y un péptido que comprende la **SEQ ID NO: 1** o un fragmento específico del mismo, que corresponde a un dominio de HCV que incluye, pero sin limitación, un péptido que comprende los aminoácidos 1-182, 183-379, 380-729, 730-1044, 1045-1657, 1658-1711, 1712-1971 ó 1972-3011 de las **SEQ ID NO: 1**. Los procedimientos pueden referirse al uso de una composición de vacuna que comprende el fragmento NS3/4A de la **SEQ ID NO: 17** o el mutante NS3/4A (por ejemplo, **SEQ ID NO: 29-32** y **43-49**), que carecen de un sitio de escisión proteolítica, o un fragmento del mismo de al menos 3, 4, 6, 8, 10, 12, 15 ó 20 aminoácidos de longitud (por ejemplo las **SEQ ID NO: 26, 27** y **33-42**). También pueden usarse composiciones que comprenden ribavirina y un ácido nucleico que codifica estos fragmentos.

Se dan a conocer procedimientos de tratamiento y prevención de una infección por HCV. En una estrategia, se usan ribavirina y un antígeno o epitopo de HCV para preparar un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de infección por HCV. En otra estrategia, se identifica un individuo que necesita un medicamento que previene y/o trata la infección por HCV y a dicho individuo se le administra un medicamento que comprende ribavirina y un antígeno o epitopo de HCV, preferiblemente un epitopo presente en la **SEQ ID NO: 1**, más preferiblemente un fragmento de la **SEQ ID NO: 1** que tiene al menos 2500, 2000, 1600, 1200, 800, 400, 200, 100, 50, 10 ó 3 aminoácidos consecutivos o, más preferiblemente, un fragmento de la **SEQ ID NO: 1** tal como 1-182, 183-379, 380-729, 730-1044, 1045-1657, 1658-1711, 1712-1971 ó 1972-3011 o un ácido nucleico que codifica la **SEQ ID NO: 1** o dichos fragmentos indicados anteriormente. Los procedimientos pueden referirse al uso de una composición de vacuna que comprende ribavirina y el fragmento NS3/4A de la **SEQ ID NO: 17** o el mutante NS3/4A que carece de un sitio de escisión proteolítica (por ejemplo, las **SEQ ID NO: 29-32** y **43-49**) o un fragmento del mismo de al menos 3, 4, 6, 8, 10, 12, 15 ó 20 aminoácidos de longitud (por ejemplo las **SEQ ID NO: 25-27** y **32-42**) o un ácido nucleico que codifica una o más de estas moléculas. La sección proporcionada a continuación describe el uso de ribavirina como adyuvante con mayor detalle.

Ribavirina

Las composiciones descritas en este documento pueden fabricarse de acuerdo con procedimientos convencionales de farmacia galénica para producir agentes medicinales para administración a animales, por ejemplo mamíferos, incluyendo seres humanos. La ribavirina puede obtenerse a partir de proveedores comerciales (por ejemplo, Sigma e ICN). La ribavirina y/o el antígeno pueden formularse en la vacuna con y sin modificación. Por ejemplo, la ribavirina y/o el antígeno pueden modificarse o derivatizarse para obtener una molécula más estable y/o un adyuvante más potente. Por medio de una estrategia, la estabilidad de la ribavirina y/o un antígeno puede mejorarse acoplado las moléculas a un soporte tal como un polímero hidrófilo (por ejemplo, polietilenglicol).

Pueden generarse muchos más derivados de ribavirina usando técnicas convencionales en el diseño racional de fármacos y en química combinatoria. Por ejemplo, Molecular Simulations Inc. (MSI), así como muchos otros proveedores, proporcionan un software que permite a un experto construir una biblioteca combinatoria de moléculas orgánicas. El programa C2.Analog Builder, por ejemplo, puede integrarse con un juego de MSI de software de diversidad molecular Cerius2 para desarrollar una biblioteca de derivados de ribavirina que pueda usarse con las realizaciones descritas en este documento. (Véase por ejemplo, <http://msi.com/life/products/cerius2/index.html>).

Por medio de una estrategia, la estructura química de la ribavirina se registra en un medio legible por ordenador y se accede a la misma por medio de uno o más programas de aplicación de software de creación de modelos. Por ejemplo, el programa C2.Analog Builder junto con el programa C2Diversity permite al usuario generar una biblioteca virtual muy grande basada en la diversidad de grupos R para cada posición de sustituyente. Después se preparan compuestos que tienen la misma estructura que el derivado de ribavirina modelado creado en la biblioteca virtual usando la química convencional o pueden obtenerse a partir de una fuente comercial.

Los derivados de ribavirina fabricados recientemente después se someten a una selección en ensayos que determinan el grado de actividad adyuvante de la molécula y/o la medida de su capacidad de modular una respuesta inmune. Algunos ensayos pueden implicar el software de selección de fármacos virtual, tal como C2.Ludi. C2.Ludi es un programa de software que permite al usuario explorar bases de datos de moléculas (por ejemplo, derivados de ribavirina) para determinar su capacidad de interactuar con el sitio activo de una proteína de interés (por ejemplo, RAC2 u otra proteína de unión a GTP). Basándose en las interacciones previstas descubiertas con el software de selección de fármacos virtual, los derivados de ribavirina pueden priorizarse para una caracterización adicional en ensayos convencionales que determinan la actividad adyuvante y/o el grado en el que una molécula modula una respuesta inmune. En la medida en que las siguientes secciones marcadas como "ejemplos" pertenecen a la materia en cuestión de las reivindicaciones, en particular a la materia en cuestión de las reivindicaciones independientes 1-5, dichas son

ilustrativas de la invención. Todos los demás aspectos designados se proporcionan con fines de información solo. El *Ejemplo 1* describe varios ensayos que se usaron para evaluar la actividad adyuvante de la ribavirina.

EJEMPLO 1

5 Los siguientes ensayos pueden usarse con cualquier derivado de ribavirina o combinaciones de derivados de ribavirina para determinar el grado de actividad adyuvante de la composición particular. En una primera serie de experimentos, se inmunizaron de tres a cinco ratones Balb/c (BK Universal, Uppsala, Suecia) *i.p* o *s.c* (por ejemplo, en la base de la cola) con 10 µg o 100 µg de proteína 3 no estructural recombinante (rNS3) del virus de la hepatitis C en las semanas cero y cuatro. La rNS3 se disolvió en solución salina tamponada con fosfato (PBS) sola o PBS que contenía 1 mg de ribavirina (obtenida a partir de ICN, Costa Mesa, CA). A los ratones se les inyectó un volumen total de 100 µl por inyección.

15 Dos, cuatro y seis semanas después de la primera inmunización *i.p.*, se extrajo sangre de todos los ratones por medio de extracción de muestras retro-orbital. Se recogieron muestras de suero y se analizaron con respecto a la presencia de anticuerpos contra rNS3. Para determinar el título de anticuerpos, se realizó un inmunoensayo enzimático (EIA). (Véase, por ejemplo, Hultgren y col., *J Gen Virol.* 79:2381-91 (1998) y Hultgren y col., *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 4:630-632 (1997)). Los niveles de anticuerpos se registraron como la mayor dilución en suero que proporcionaba una densidad óptica a 405 nm dos veces mayor que la de los ratones no inmunizados.

20 Los ratones que recibieron 10 µg ó 100 µg de rNS3 mezclado con 1 mg de ribavirina en PBS presentaron uniformemente niveles superiores de anticuerpos contra NS3. El título de anticuerpo que se detectó por EIA dos semanas después de la inmunización se muestra en la **FIGURA 1**. Las formulaciones de vacuna que tenían 1 mg de ribavirina y 10 µg o 100 µg de rNS3 indujeron un título de anticuerpos significativamente mayor que las formulaciones de vacuna compuestas únicamente por rNS3.

25 En una segunda serie de experimentos, grupos de ocho ratones Balb/c en las semanas cero y cuatro se inmunizaron por vía intraperitoneal con 10 ó 50 µg de rNS3 en 100 µl de solución salina tamponada con fosfato que contenía 0 mg, 1 mg, 3 mg ó 10 mg de ribavirina (Sigma). A las cuatro, seis y ocho semanas, se extrajo sangre de los ratones y se separó y congeló el suero. Después de completar el estudio, los sueros se ensayaron con respecto a los niveles de anticuerpos contra NS3 recombinante, como se ha descrito anteriormente. Se compararon los niveles medios de anticuerpo contra rNS3 entre los grupos usando un ensayo t de Student (análisis paramétrico) o Mann-Whitney (análisis no paramétrico) y el paquete de software StatView 4.5 (Abacus Concepts, Berkeley, CA). En la **TABLA 1** se proporciona el efecto adyuvante de ribavirina cuando se añadió en tres dosis a 10 µg de rNS3. En la **TABLA 2** se proporciona el efecto adyuvante de ribavirina cuando se añade en tres dosis a 50 µg de rNS3. En las **TABLAS 3 y 4** se proporcionan, respectivamente, comparaciones paramétricas de los títulos medios de anticuerpo contra rNS3 en ratones que recibían diferentes dosis de 10 µg o 50 µg de rNS3 y diferentes dosis de ribavirina. En las **TABLAS 5 y 6** se proporcionan, respectivamente, comparaciones no paramétricas de títulos medios de anticuerpo contra NS3 en ratones que recibieron diferentes dosis de 10 µg o 50 µg de rNS3 y diferentes dosis de ribavirina. Los valores proporcionados representan títulos contra rNS3 recombinantes como criterios de valoración.

TABLA 1

Cantidad de ribavirina (mg/dosis)	Cantidad de inmunógenos (µg/dosis)	ID de ratón	Título de anticuerpo contra rNS3 en la semana indicada		
			Semana 4	Semana 6	Semana 8
Ninguna	10	5:1	300	1500	1500
Ninguna	10	5:2	<60	7500	1500
Ninguna	10	5:3	<60	1500	300
Ninguna	10	5:4	60	1500	1500
Ninguna	10	5:5	<60	1500	nt
Ninguna	10	5:6	60	1500	1500
Ninguna	10	5:7	<60	7500	7500
Ninguna	10	5:8	300	37500	7500
Título medio de grupo (media±DT)			180±139	7500±12421	3042±3076
1	10	6:1	300	37500	37500
1	10	6:2	<60	1500	1500
1	10	6:3	300	37500	187500
1	10	6:4	300	37500	7500
1	10	6:5	60	nt	nt
1	10	6:6	<60	37500	7500
1	10	6:7	<60	37500	7500
1	10	6:8	300	7500	7500

ES 2 371 936 T3

Cantidad de ribavirina (mg/dosis)	Cantidad de inmunógenos (µg/dosis)	ID de ratón	Título de anticuerpo contra rNS3 en la semana indicada		
Título medio de grupo (media±DT)			252±107	28071±16195	36642±67565
3	10	7:1	60	37500	7500
3	10	7:2	60	37500	37500
3	10	7:3	300	7500	7500
3	10	7:4	300	37500	7500
3	10	7:5	300	37500	37500
3	10	7:6	300	37500	37500
3	10	7:7	60	7500	7500
3	10	7:8	60	37500	37500
Título medio de grupo (media±DT)			180±128	30000±13887	22500±34637
10	10	8:1	300	37500	37500
10	10	8:2	300	37500	37500
10	10	8:3	<60	300	300
10	10	8:4	60	7500	7500
10	10	8:5	<60	300	300
10	10	8:6	<60	37500	37500
10	10	8:7	<60	7500	7500
10	10	8:8	<60	nt	nt
Título medio de grupo (media±DT)			220±139	18300±18199	18300±18199

TABLA 2

Cantidad de ribavirina (mg/dosis)	Cantidad de inmunógenos (µg/dosis)	ID de ratón	Título de anticuerpo contra rNS3 en la semana indicada		
			Semana 4	Semana 6	Semana 8
Ninguna	50	1:1	60	7500	7500
Ninguna	50	1:2	60	7500	7500
Ninguna	50	1:3	60	7500	7500
Ninguna	50	1:4	<60	1500	300
Ninguna	50	1:5	300	37500	37500
Ninguna	50	1:6	60	7500	7500
Ninguna	50	1:7	60	37500	7500
Ninguna	50	1:8	.	.	.
Título medio de grupo (media±DT)			100±98	15214±15380	10757±12094
1	50	2:1	60	7500	7500
1	50	2:2	300	37500	7500
1	50	2:3	60	187500	7500
1	50	2:4	60	37500	187500
1	50	2:5	60	37500	7500
1	50	2:6	60	37500	37500
1	50	2:7	300	37540	7500
1	50	2:8	300	37500	37500
Título medio de grupo (media±DT)			150±124	52500±55549	37500±62105
3	50	3:1	60	37500	7500
3	50	3:2	300	37500	37500
3	50	3:3	300	37500	7500
3	50	3:4	60	37500	7500
3	50	3:5	300	37500	7500
3	50	3:6	60	37500	7500
3	50	3:7	-	7500	37500
3	50	3:8	1500	7500	37500
Título medio de grupo (media±DT)			387±513	30000±13887	18750±15526
10	50	4:1	300	7500	7500
10	50	4:2	300	37500	37500
10	50	4:3	60	7500	7500
10	50	4:4	60	7500	7500
10	50	4:5	60	1500	1500

ES 2 371 936 T3

Cantidad de ribavirina (mg/dosis)	Cantidad de inmunógenos (µg/dosis)	ID de ratón	Título de anticuerpo contra rNS3 en la semana indicada		
10	50	4:6	60	7500	37500
10	50	4:7	-	7500	7500
10	50	4:8	60	37500	7500
Título medio de grupo (media±DT)			140±124	10929±11928	15214±15380

TABLA 3

Grupo	Semana	Media±DT	Grupo	Media±DT	Análisis	Valor de -p
10µg NS3/sin ribavirina	4	180±139	10µg NS3/1 mg ribavirina	252±107	Ensayo-t de Student	0,4071
	6	7500±12421		28071±16195	Ensayo-t de Student	0,0156
	8	3042±3076		36642±67565	Ensayo-t de Student	0,2133
10µg NS3/sin ribavirina	4	180±139	10µg NS3/3 mg ribavirina	180±128	Ensayo-t de Student	1,000
	6	7500±12421		30000±13887	Ensayo-t de Student	0,0042
	8	3042±3076		22500±34637	Ensayo-t de Student	0,0077
10µg NS3/sin ribavirina	4	180±139	10µg NS3/10 mg ribavirina	220±139	Ensayo-t de Student	0,7210
	6	7500±12421		18300±18199	Ensayo-t de Student	0,1974
	8	3042±3076		18300±18199	Ensayo-t de Student	0,0493

TABLA 4

Grupo	Semana	Media±DT	Grupo	Media±DT	Análisis	Valor-p
50µg NS3/sin ribavirina	4	100±98	50µg NS3/1 mg ribavirina	150±124	Ensayo-t de Student	0,4326
	6	15214±15380		52500±55549	Ensayo-t de Student	0,1106
	8	10757±12094		37500±62105	Ensayo-t de Student	0,2847
50µg NS3/sin ribavirina	4	100±98	50µg NS3/3 mg ribavirina	387±513	Ensayo-t de Student	0,2355
	6	15214±15380		30000±13887	Ensayo-t de Student	0,0721
	8	10757±12094		18750±15526	Ensayo-t de Student	0,2915
50µg NS3/sin ribavirina	4	100±98	50µg NS3/10 mg ribavirina	140±124	Ensayo-t de Student	0,5490
	6	15214±15380		10929±11928	Ensayo-t de Student	0,5710
	8	10757±12094		15214±15380	Ensayo-t de Student	0,5579

Niveles significado: NS = no significativo; * = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001

5

TABLA 5

Grupo	Semana	Media±DT	Grupo	Media±DT	Análisis	Valor-p
10µg NS3/sin ribavirina	4	180±139	10µg NS3/1 mg ribavirina	252±107	Mann-Whitney	0,4280
	6	7500±12421		28071±16195	Mann-Whitney	0,0253
	8	3042±3076		36642±67565	Mann-Whitney	0,0245

Grupo	Semana	Media±DT	Grupo	Media±DT	Análisis	Valor-p
10µg NS3/sin ribavirina	4	180±139	10µg NS3/3 mg ribavirina	180±128	Mann-Whitney	0,0736
	6	7500±12421		30000±13887	Mann-Whitney	0,0050
	8	3042±3076		22500±34637	Mann-Whitney	0,0034
10µg NS3/sin ribavirina	4	180±139	10µg NS3/10 mg ribavirina	220±139	Mann-Whitney	0,8986
	6	7500±12421		18300±18199	Mann-Whitney	0,4346
	8	3042±3076		18300±18199	Mann-Whitney	0,2102

TABLA 6

Grupo	Semana	Media±DT	Grupo	Media±DT	Análisis	Valor-p
50µg NS3/sin ribavirina	4	100±98	50µg NS3/1 mg ribavirina	150±124	Mann-Whitney	0,1128
	6	15214±15380		52500±55549	Mann-Whitney	0,0210
	8	10757±12094		37500±62105	Mann-Whitney	0,1883
50µg NS3/sin ribavirina	4	100±98	50µg NS3/3 mg ribavirina	387±513	Mann-Whitney	0,1400
	6	15214±15380		30000±13887	Mann-Whitney	0,0679
	8	10757±12094		18750±15526	Mann-Whitney	0,2091
50µg NS3/no ribavirina	4	100±98	50µg NS3/10 mg ribavirina	140±124	Mann-Whitney	0,4292
	6	15214±15380		10929±11928	Mann-Whitney	0,9473
	8	10757±12094		15214±15380	Mann-Whitney	0,6279

Niveles significación: NS = no significativo; * = p<0,05; **= p<0,01; ***= p<0,001

5 Los datos anteriores demuestran que la ribavirina facilita o mejora una respuesta inmune a un antígeno de HCV o a epitopos de HCV. Se indujo una potente respuesta inmune a rNS3 después de la inmunización con una composición de vacuna que comprendía únicamente 1 mg de ribavirina y 10 µg de antígeno de rNS3. Los datos anteriores también proporcionan pruebas de que la cantidad de ribavirina que es suficiente para facilitar una respuesta inmune a un antígeno está comprendida entre 1 y 3 mg por inyección para un ratón Balb/c de 25-30 g. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que estas cantidades están destinadas a utilizarse únicamente como guía y de ninguna manera deben considerarse limitantes del alcance de la invención. Sin embargo, los datos demuestran que composiciones de vacuna que comprenden dosis de aproximadamente 1 a 3 mg de ribavirina inducen una respuesta inmune que es más de 12 veces mayor que la respuesta inmune inducida en ausencia de ribavirina (**TABLAS 3 y 4**). De esta manera, la ribavirina tiene un efecto adyuvante significativo sobre la respuesta inmune humoral de un animal y, de esta manera, aumenta o facilita la respuesta inmune al antígeno. El ejemplo indicado a continuación describe experimentos que se realizaron para comprender mejor la cantidad de ribavirina necesaria para aumentar o facilitar una respuesta inmune a un antígeno.

EJEMPLO 2

20 Para determinar la dosis de ribavirina que es suficiente para proporcionar un efecto adyuvante, se realizaron los siguientes experimentos. En una primera serie de experimentos se inmunizaron grupos de ratones (tres por grupo) con 20 µg de rNS3 solo o una mezcla de 20 µg de rNS3 y 0,1 mg, 1 mg o 10 mg de ribavirina. Después se determinaron los niveles de anticuerpo contra el antígeno por EIA. Se representaron los títulos medios como criterios de valoración en las semanas 1 y 3 y se muestran en la **FIGURA 2**. Se descubrió que el efecto adyuvante proporcionado por la ribavirina tenía diferentes cinéticas dependiendo de la dosis de ribavirina proporcionada. Por ejemplo, se descubrió que incluso 25 bajas dosis (< 1 mg) de ribavirina aumentaba los niveles de anticuerpo en la semana uno pero no en la semana tres, mientras que se descubrió que a mayores dosis (1-10 mg) aumentaban los niveles de anticuerpo en la semana tres.

También se realizó una segunda serie de experimentos. En estos experimentos, a grupos de ratones se les inyectaron

- 5 composiciones de vacuna que comprendían diversas cantidades de ribavirina y rNS3 y se controló la respuesta de IgG en estos animales. Las composiciones de vacuna comprendían aproximadamente 100 µl de solución salina tamponada con fosfato y 20 µg de rNS3 con o sin 0,1 mg, 1,0 mg o 10 mg de ribavirina (Sigma). Se extrajo sangre de los ratones en la semana seis y se determinaron los niveles de IgG específicos de rNS3 por EIA como se ha descrito previamente. Como se muestra en la **TABLA 7**, los efectos adyuvantes sobre los niveles de anticuerpos sostenidos fueron más evidentes en el intervalo de dosificación de 1-10 mg por inyección para un ratón de 25-30 g.

TABLA 7

Inmunógeno	Cantidad (mg) de ribavirina mezclada con el inmunógeno	ID de ratón	Título de punto final de IgG de rNS3 en la semana indicada		
			Semana 1	Semana 2	Semana 3
20 µg rNS3	Ninguna	1	60	360	360
20 µg rNS3	Ninguna	2	360	360	2160
20 µg rNS3	Ninguna	3	360	2160	2160
		media	260±173	960±1039	1560±1039
20 µg rNS3	0,1	4	2160	12960	2160
20 µg rNS3	0,1	5	60	60	60
20 µg rNS3	0,1	6	<60	2160	2160
			1110±1484	5060±6921	1460±1212
20 µg rNS3	1,0	7	<60	60	12960
20 µg rNS3	1,0	8	<60	2160	2160
20 µg rNS3	1,0	9	360	2160	2160
		media	360	1460±1212	5760±6235
20 µg rNS3	10,0	10	360	12960	77760
20 µg rNS3	10,0	11	<60	2160	12960
20 µg rNS3	10,0	12	360	2160	2160
		media	360	5760±6235	30960±40888

- 10 En una tercera serie de experimentos, se investigó el efecto adyuvante de la ribavirina después de inyecciones primarias y de refuerzo. En estos experimentos, a ratones se les administraron dos inyecciones intraperitoneales de una composición de vacuna que comprendía 10 µg de rNS3 con o sin ribavirina y se controlaron las respuestas de subclase de IgG al antígeno, como se ha indicado anteriormente. Por consiguiente, los ratones se inmunizaron con 100 µl de solución salina tamponada con fosfato que contenía 10 µg de NS3 recombinante solo, con o sin 0,1 ó 1,0 mg de
- 15 ribavirina (Sigma) en las semanas 0 y 4. Se extrajo sangre de los ratones en la semana seis y se determinaron las subclases de IgG específicas de NS3 por EIA como se ha descrito previamente. Como se muestra en la **TABLA 8**, la adición de ribavirina al inmunógeno antes de la inyección no cambia la respuesta de subclase de IgG en la respuesta inmune específica de NS3. De esta manera, el efecto adyuvante de una composición de vacuna que comprende ribavirina y un antígeno no puede explicarse por un cambio en el equilibrio de Th1-Th2. Parece ser que otro mecanismo
- 20 puede ser responsable del efecto adyuvante de la ribavirina.

TABLA 8

Inmunógeno	Cantidad (mg) de ribavirina mezclada con el inmunógeno	ID de ratón	Título de punto final de subclase de IgG de NS3 indicada			
			IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3
10 µg rNS3	Ninguna	1	360	60	<60	60
10 µg rNS3	Ninguna	2	360	<60	<60	60
10 µg rNS3	Ninguna	3	2160	60	<60	360
		media	960±1039	60	-	160±173
10 µg rNS3	0,1	4	360	<60	<60	60
10 µg rNS3	0,1	5	60	<60	<60	<60
10 µg rNS3	0,1	6	2160	60	60	360
			860±1136	60	60	210±212
10 µg rNS3	1,0	7	2160	<60	<60	60
10 µg rNS3	1,0	8	360	<60	<60	<60
10 µg rNS3	1,0	9	2160	<60	<60	60
		media	1560±1039	-	-	60

5 Los datos presentados en este ejemplo verifican adicionalmente que la ribavirina puede administrarse como un adyuvante y establecen que la dosis de ribavirina puede modular la cinética del efecto adyuvante. El ejemplo proporcionado a continuación describe otro ensayo que se realizó para evaluar la capacidad de la ribavirina de aumentar o facilitar una respuesta inmune a un antígeno.

10 EJEMPLO 3

Este ensayo puede usarse con cualquier derivado de ribavirina o combinaciones de derivados de ribavirina para determinar el grado en el que una formulación de vacuna particular modula una respuesta inmune celular. Para determinar las respuestas de células T CD4+ a una vacuna que contiene ribavirina, se inmunizaron grupos de ratones s.c con 100 µg de rNS3 en PBS o 100 µg de rNS3 y 1 mg de ribavirina en PBS. Los ratones se sacrificaron 10 días después de la inmunización y se recogieron sus ganglios linfáticos y se drenaron. Después se realizaron ensayos de rellamada *in vitro*. (Véase, por ejemplo, Hultgren y col., J Gen Virol. 79:2381-91 (1998) y Hultgren y col., Clin. Diagn. Lab. Immunol. 4:360-632 (1997). La cantidad de proliferación de células T CD4+ se determinó a las 96 horas de cultivo por medio de la incorporación de [³H] timidina.

20 Como se muestra en la **FIGURA 3**, los ratones que se inmunizaron con 100 µg de rNS3 mezclados con 1 mg de ribavirina tuvieron una respuesta proliferativa de células T mucho mayor que los ratones que se inmunizaron con 100 µg de rNS3 en PBS. Estos datos proporcionan indicios adicionales de que la ribavirina aumenta o facilita una respuesta inmune celular (por ejemplo, promoviendo el cebado eficaz de células T). La sección proporcionada a continuación describe algunos de los antígenos y epitopos que pueden usarse con las realizaciones descritas en este documento.

25 Antígenos y epitopos

Prácticamente cualquier antígeno que pueda usarse para generar una respuesta inmune en un animal, puede combinarse con ribavirina para preparar las composiciones descritas en este documento. Es decir, los antígenos que pueden incorporarse en estas composiciones (por ejemplo, vacunas) comprenden antígenos o epitopos bacterianos, antígenos o epitopos fúngicos, antígenos o epitopos vegetales, antígenos o epitopos de mohos, antígenos o epitopos virales, antígenos o epitopos de células cancerosas, antígenos o epitopos de toxinas, antígenos o epitopos químicos y autoantígenos o autoepitopos. Aunque muchas de estas moléculas inducen una respuesta inmune significativa sin un adyuvante, la ribavirina puede administrarse junto o combinada con antígenos o epitopos "fuertes" o "débiles" para aumentar o facilitar la respuesta inmune a dicho antígeno o epitopo. Además, el uso de ribavirina como adyuvante puede permitir el uso de menores cantidades de antígenos mientras se mantiene la inmunogenicidad.

Además de antígenos peptídicos, en las composiciones de vacuna descritas en este documento pueden usarse antígenos basados en ácidos nucleicos. Se conocen diversas vacunas basadas en ácidos nucleicos y se contempla que estas composiciones y estrategias de inmunoterapia pueden aumentarse por medio de la reformulación con ribavirina (véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 5.589.466 y 6.235.888). Por medio de una estrategia, por ejemplo, un gen que codifica un antígeno polipeptídico de interés se clona en un vector de expresión capaz de expresar el polipéptido cuando se introduce en un sujeto. La construcción de expresión se introduce en el sujeto en una mezcla de ribavirina o junto con ribavirina (por ejemplo, la ribavirina se administra poco después de la construcción de expresión en

el mismo sitio). Como alternativa, al sujeto se le proporciona un ARN que codifica un antígeno polipeptídico de interés en una mezcla con ribavirina o junto con ribavirina.

5 Cuando el antígeno va a ser un ADN (por ejemplo, la preparación de una composición de vacuna de ADN), los promotores adecuados incluyen promotores del virus de simio 40 (SV40), un promotor del virus de tumor mamario de ratón (MMTV), un promotor del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) tal como el promotor de la repetición terminal larga (LTR) de HIV, del virus de Moloney, de ALV, de citomegalovirus (CMV) tal como el promotor temprano inmediato de CMV, del virus de Epstein Barr (EBV), del virus del sarcoma de Rous (RSV), así como promotores de genes humanos tales como la actina humana, la miosina humana, la hemoglobina humana, la creatina del músculo humano y la metalotioneína humana. Los ejemplos de señales de poliadenilación útiles con algunas realizaciones, especialmente en la producción de una vacuna genética para seres humanos incluyen, pero sin limitación, señales de poliadenilación de SV40 y señales de poliadenilación de LTR. En particular, se usa la señal de poliadenilación de SV40, que está en el plásmido pCEP4 (Invitrogen, San Diego, Calif.), denominada señal de poliadenilación de SV40.

15 Además de los elementos reguladores requeridos para la expresión génica, en una construcción génica también pueden incluirse otros elementos. Estos elementos adicionales incluyen potenciadores. El potenciador puede seleccionarse entre el grupo que incluye, pero sin limitación: actina humana, miosina humana, hemoglobina humana, creatina de músculo humano y potenciadores virales tales como los de CMV, RSV y EBV. Pueden proporcionarse construcciones génicas con un origen de replicación de mamífero para mantener la construcción extracromosómicamente y producir múltiples copias de la construcción en la célula. Los plásmidos pCEP4 y pREP4 de Invitrogen (San Diego, CA) contienen el origen de replicación del virus de Epstein Barr y la región codificante del antígeno nuclear EBNA-1, que produce un alto número de copias de replicación episomal sin integración. Pueden usarse todas las formas de ADN, ya sean replicantes o no replicantes, que no se integran en el genoma y que son expresables. El ejemplo proporcionado a continuación describe el uso de una composición que comprende un antígeno basado en ácido nucleico y ribavirina.

25 **EJEMPLO 4**

A continuación se describe la inmunización de un animal con una vacuna que comprende un antígeno basado en ácido nucleico y ribavirina. Se anestesian ratones Balb/c hembras y machos de cinco a seis semanas de edad por medio de la inyección intraperitoneal de 0,3 ml de Avertina al 2,5%. Se realiza una incisión de 1,5 cm en el muslo anterior y se visualiza directamente el músculo cuádriceps. A un grupo de ratones se les inyectan aproximadamente 20 µg de una construcción de expresión que tiene el gen de gp-120, dirigido por un promotor de citomegalovirus (CMV), y un a segundo grupo de ratones se les inyectan aproximadamente 5 µg de ARN transcrito *in vitro* protegido terminalmente (por ejemplo, SP6, T7 o T3 (Ambion)) que codifica gp-120. Estos dos grupos son controles. A un tercer grupo de ratones se les inyectan aproximadamente 20 µg del vector de expresión que tiene el gen de gp-120 y el promotor de CMV mezclado con 1 mg de ribavirina y a un cuarto grupo de ratones se les inyectan aproximadamente 5 µg de ARN transcrito *in vitro* protegido terminalmente, mezclado con 1 mg de ribavirina. Las vacunas se inyectan en 0,1 ml de solución (PBS) en una jeringa de 1 cc a través de una aguja de calibre 27 durante un minuto, a aproximadamente 0,5 cm del sitio de inserción distal del músculo dentro de la rodilla y a una profundidad de aproximadamente 0,2 cm. Se pone una sutura sobre el sitio de inyección para poder localizarlo en el futuro y después se cierra la piel con grapas de acero inoxidable.

Se obtienen muestras de sangre antes de la inyección (Día 0) y hasta más de 40 días después de la inyección. El suero de cada muestra se diluye en serie y se evalúa en un ensayo de técnica ELISA convencional para la detección de anticuerpos, usando proteína gp-120 recombinante preparada en levadura como antígeno. En todas las muestras se detectarán tanto anticuerpos IgG como IgM específicos para gp-120, sin embargo, los grupos 3 y 4, que contenían la ribavirina, presentarán una mayor respuesta inmune a la gp-120 medida por la cantidad y/o título de anticuerpo detectado en los sueros.

La divulgación realizada comprende ribavirina y un antígeno viral o un epitopo presente en un virus, preferiblemente un virus de la hepatitis. Las composiciones comprenden, por ejemplo, ribavirina y un antígeno de HAV, un antígeno de HBV, un antígeno de HCV o cualquier combinación de estos antígenos o epitopos presentes en uno o más de estos virus. Los antígenos de la hepatitis pueden ser péptidos o ácidos nucleicos. Las composiciones que pueden usarse para vacunar contra la infección por HAV, por ejemplo, comprenden ribavirina y un péptido de HAV con una longitud de al menos 3-10 aminoácidos consecutivos, 10-50 aminoácidos consecutivos, 50-100 aminoácidos consecutivos, 100-200 aminoácidos consecutivos, 200-400 aminoácidos consecutivos, 400-800 aminoácidos consecutivos, 800-1200 aminoácidos consecutivos, 1200-1600 aminoácidos consecutivos, 1600-2000 aminoácidos consecutivos, y 2000-2227 aminoácidos consecutivos de la **SEQ ID NO: 12**.

Además, pueden usarse composiciones que comprenden ribavirina y un ácido nucleico que codifica uno o más de los péptidos de HAV descritos anteriormente para tratar o prevenir la infección por HAV. Los antígenos basados en ácidos nucleicos preferidos incluyen una secuencia de nucleótidos de al menos 9 nucleótidos consecutivos de una secuencia de HAV (por ejemplo, la **SEQ ID NO: 15**). Es decir, un antígeno basado en un ácido nucleico puede comprender al menos 9-

25 nucleótidos consecutivos, 25-50 nucleótidos consecutivos, 50-100 nucleótidos consecutivos, 100-200 nucleótidos consecutivos, 200-500 nucleótidos consecutivos, 500-1000 nucleótidos consecutivos, 1000-2000 nucleótidos consecutivos, 2000-4000 nucleótidos consecutivos, 4000-8000 nucleótidos consecutivos, y 8000-9416 nucleótidos consecutivos de la **SEQ ID NO: 15** o un ARN que corresponde a esas secuencias.

De forma similar, las realizaciones de vacuna de HBV preferidas comprende ribavirina y un péptido de HBV de al menos 3 aminoácidos consecutivos de HBsAg (**SEQ ID NO: 10**) o HbcAg y HBeAg (**SEQ ID NO: 11**). Es decir, algunas realizaciones tienen ribavirina y un péptido de HBV con una longitud de al menos 3-10 aminoácidos consecutivos, 10-50 aminoácidos consecutivos, 50-100 aminoácidos consecutivos, 100-150 aminoácidos consecutivos, 150-200 aminoácidos consecutivos y 200-226 aminoácidos consecutivos de la **SEQ ID NO: 10** o la **SEQ ID NO: 11**.

Además, para tratar o prevenir una infección por HBV pueden usarse composiciones que comprenden ribavirina y un ácido nucleico que codifica uno o más de los péptidos HBV descritos anteriormente. Los antígenos basados en ácidos nucleicos incluyen una secuencia de nucleótidos de al menos 9 nucleótidos consecutivos de un HBV (por ejemplo, **SEQ ID NO: 14**). Es decir, un antígeno basado en ácido nucleico puede comprender al menos 9-25 nucleótidos consecutivos, 25-50 nucleótidos consecutivos, 50-100 nucleótidos consecutivos, 100-200 nucleótidos consecutivos, 200-500 nucleótidos consecutivos, 500-1000 nucleótidos consecutivos, 1000-2000 nucleótidos consecutivos, 2000-4000 nucleótidos consecutivos, 4000-8000 nucleótidos consecutivos y 8000-9416 nucleótidos consecutivos de la **SEQ ID NO: 14** o un ARN que corresponde a estas secuencias. El ejemplo proporcionado a continuación describe el uso de ribavirina junto con una preparación de vacuna de HBV comercial.

EJEMPLO 5

El ejemplo adyuvante de la ribavirina se ensayó cuando se mezcló con dos dosis de una vacuna disponible en el mercado que contenía HBsAg y alumbre. (Engerix, SKB). Se mezclaron aproximadamente 0,2 µg o 2 µg de vacuna Engerix con PBS o con 1 mg de ribavirina en PBS y las mezclas se inyectaron por vía intraperitoneal en grupos de ratones (tres por grupo). Se administró un refuerzo que contenía la misma mezcla en la semana cuatro y se extrajeron muestras de sangre todos los ratones en la semana seis. Las muestras de suero se diluyeron de 1:60 a 1:37500 y las diluciones se ensayaron por EIA, como se ha descrito anteriormente, con la excepción de que se usó HBsAg humano purificada como antígeno de la fase sólida. Como se muestra en la tabla 9, las formulaciones de vacuna que tenían ribavirina aumentaron la respuesta a 2 µg de una vacuna existente a pesar del hecho de que la vacuna ya contenía alumbre. Es decir, añadiendo ribavirina a una dosis de vacuna subóptima (es decir, una que no induce anticuerpos detectables solos), los anticuerpos se volvieron detectables, demostrando que la adición de ribavirina permite el uso de menores cantidades de antígeno en una formulación de vacuna sin comprometer la respuesta inmune.

TABLA 9

Semana	Título de anticuerpo contra HBsAg en EIA como criterio de valoración											
	0,02 µg de Engerix						0,2 µg de Engerix					
	Sin ribavirina			1 mg de ribavirina			Sin ribavirina			1 mg de ribavirina		
	Nº 1	Nº 2	Nº 3	Nº 1	Nº 2	Nº 3	Nº 1	Nº 2	Nº 3	Nº 1	Nº 2	Nº 3
6	<60	<60	<60	<60	<60	<60	<60	<60	<60	300	60	<60

Algunas composiciones de vacuna de HCV comprenden ribavirina y un péptido de HCV de al menos 3 aminoácidos consecutivos de la **SEQ ID NO: 1** o un ácido nucleico que codifica dicho péptido de HCV. Es decir, una composición de vacuna puede comprender ribavirina y uno o más péptidos de HCV con una longitud de al menos 3-10 aminoácidos consecutivos, 10-50 aminoácidos consecutivos, 50-100 aminoácidos consecutivos, 100-200 aminoácidos consecutivos, 200-400 aminoácidos consecutivos, 400-800 aminoácidos consecutivos, 800-1200 aminoácidos consecutivos, 1200-1600 aminoácidos consecutivos, 1600-2000 aminoácidos consecutivos, 2000-2500 aminoácidos consecutivos y 2500-3011 aminoácidos consecutivos de la **SEQ ID NO: 1** o un ácido nucleico que codifica uno o más de dichos fragmentos.

Las composiciones de HCV pueden comprender ribavirina y un péptido de al menos 3 aminoácidos consecutivos de la proteína nuclear de HCV (**SEQ ID NO: 2**), la proteína E1 de HCV (**SEQ ID NO: 3**), la proteína E2 de HCV (**SEQ ID NO: 4**), NS2 de HCV (**SEQ ID NO: 5**), NS3 de HCV (**SEQ ID NO: 6**), NS4A de HCV (**SEQ ID NO: 7**), NS4B de HCV (**SEQ ID NO: 8**) o NS5A/B de HCV (**SEQ ID NO: 9**) o péptidos consistentes en combinaciones de estos dominios. Las vacunas de HCV pueden comprender ribavirina y un péptido con una longitud de al menos 3-10 aminoácidos consecutivos, 10-50 aminoácidos consecutivos, 50-100 aminoácidos consecutivos, 100-200

aminoácidos consecutivos, 200-400 aminoácidos consecutivos, 400-800 aminoácidos consecutivos y 800-1040 aminoácidos consecutivos de una cualquiera o más de las **SEQ ID NO: 2-9**. Estos dominios corresponden a los restos aminoacídicos 1-182, 183-379, 380-729, 730-1044, 1045-1657, 1658-1711, 1712-1971 ó 1972-3011 de la **SEQ ID NO: 1**. La divulgación incluye uno o más de 1-182, 183-379, 380-729, 730-1044, 1045-1657, 1658-1711, 1712-1971 ó 1972-3011 de la **SEQ ID NO: 1** o fragmentos de los mismos.

También se dan a conocer composiciones de vacuna que comprenden ribavirina y un ácido nucleico que codifica uno o más de los péptidos descritos anteriormente. Los antígenos basados en ácidos nucleicos preferidos incluyen una secuencia de nucleótidos de al menos 9 nucleótidos consecutivos de HCV (**SEQ ID NO: 13**). Es decir, un antígeno basado en ácido nucleico puede comprender al menos 9-25 nucleótidos consecutivos, 25-50 nucleótidos consecutivos, 50-100 nucleótidos consecutivos, 100-200 nucleótidos consecutivos, 200-500 nucleótidos consecutivos, 500-1000 nucleótidos consecutivos, 1000-2000 nucleótidos consecutivos, 2000-4000 nucleótidos consecutivos, 4000-8000 nucleótidos consecutivos y 8000-9416 nucleótidos consecutivos de una cualquiera de la **SEQ ID NO: 13** o un ARN que corresponde a esas secuencias. La sección presentada a continuación describe algunas composiciones que contienen ribavirina y un antígeno.

Composiciones que contienen ribavirina y un antígeno

Las composiciones (por ejemplo, vacunas) que comprenden ribavirina y un antígeno o epitopo de un patógeno (por ejemplo, virus, bacteria, moho o levadura) pueden contener otros ingredientes que incluyen, pero sin limitación, adyuvantes, agentes aglutinantes, excipientes tales como estabilizadores (para promover el almacenamiento a largo plazo), emulsionantes, agentes espesantes, sales, conservantes, disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y para retrasar la absorción y similares. Estas composiciones son adecuadas para el tratamiento de animales como una medida preventiva para evitar una enfermedad o afección o como una medida terapéutica para tratar a animales que ya padecen una enfermedad o trastorno.

En la vacuna pueden estar presentes muchos otros ingredientes. Por ejemplo, la ribavirina y el antígeno pueden emplearse mezclados con excipientes convencionales (por ejemplo, vehículos orgánicos o inorgánicos farmacéuticamente aceptables adecuados para aplicación parenteral, entérica (por ejemplo, oral) o tópica, que no reaccionan de forma perjudicial con la ribavirina y/o el antígeno). Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, pero sin limitación, agua, soluciones de sales, alcoholes, goma arábiga, aceites vegetales, alcoholes bencílicos, polietilenglicoles, gelatina, carbohidratos tales como lactosa, amilosa o almidón, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, aceite de perfume, monoglicéridos y diglicéridos de ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos de pentaeritritol, hidroximetilcelulosa, polivinil pirrolidona, etc. En *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 15ª Edición, Easton; Mack Publishing Company, páginas 1405-1412 y 1461-1487 (1975) y *The National Formulary XIV*, 14ª Edición, Washington, American Pharmaceutical Association (1975), se describen muchos más vehículos adecuados.

Las construcciones génicas descritas en este documento pueden formularse o administrarse junto con agentes que aumentan la captación y/o expresión de la construcción génica por las células con respecto a la captación y/o expresión de la construcción génica por las células que tiene lugar cuando se administra una vacuna genética idéntica en ausencia de estos agentes. En los documentos WO 14/16737 y WO95/26718 se describen estos agentes y los protocolos para administrarlos junto con construcciones génicas. Los ejemplos de estos agentes incluyen: CaPO₄, DEAE dextrano, lípidos aniónicos; enzimas activas en la matriz extracelular; saponinas; lectinas; compuestos estrogénicos y hormonas esteroideas; alquilos inferiores hidroxilados; dimetil sulfóxido (DMSO); urea; y anilidas de ésteres del ácido benzoico, amidinas, uretanos y las sales clorhidrato de los mismos tales como las de la familia de los anestésicos locales. Además, las construcciones génicas se encapsulan dentro/administran junto con lípidos/complejos policatiónicos.

Las vacunas pueden esterilizarse y, si se desea, mezclarse con agentes auxiliares, por ejemplo lubricantes, conservantes, estabilizadores, agentes humectantes, emulsionantes, sales para influir en la presión osmótica, tampones, sustancias colorantes, aromatizantes y/o aromáticas y similares, que no reaccionen de forma perjudicial con la ribavirina o el antígeno.

La dosis eficaz y el procedimiento de administración de una formulación de vacuna particular pueden variar basándose en el paciente individual y el tipo y estadio de la enfermedad, así como en otros factores conocidos para el experto en la materia. La eficacia terapéutica y la toxicidad de las vacunas pueden determinarse por procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, por la DE₅₀ (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). Los datos obtenidos a partir de ensayos en cultivos de células y estudios animales pueden usarse para formular un intervalo de dosificación para uso en seres humanos. La dosificación de las vacunas está preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes

que incluyen la DE₅₀ sin toxicidad. La dosificación varía dentro de este intervalo dependiendo del tipo de derivado de ribavirina y antígeno, la forma de dosificación empleada, la sensibilidad del paciente y la vía de administración.

Como la ribavirina se ha comercializado durante varios años, se conocen muchas formas de dosificación y vías de administración. Todas las formas de dosificación y vías de administración conocidas pueden proporcionarse dentro del contexto de las realizaciones descritas en este documento. Preferiblemente, una cantidad de ribavirina que es eficaz para mejorar una respuesta inmune a un antígeno en un animal puede considerarse una cantidad suficiente para conseguir un nivel en suero sanguíneo de antígeno de aproximadamente 0,25-12,5 µg/ml en el animal, preferiblemente aproximadamente 2,8 µg/ml. En algunas realizaciones, la cantidad de ribavirina se determina de acuerdo con el peso corporal del animal que va a recibir la vacuna. Por consiguiente, la cantidad de ribavirina en una formulación de vacuna puede ser de aproximadamente 0,1-1,0 mg/kg de peso corporal. Es decir, algunas realizaciones tienen una cantidad de ribavirina que corresponde a aproximadamente 0,1-1,0 mg/kg, 1,1-2,0 mg/kg, 2,1-3,0 mg/kg, 3,1-4,0 mg/kg, 4,1-5,0 mg/kg, 5,1, y 6,0 mg/kg de peso corporal de un animal. Más convencionalmente, las vacunas contienen aproximadamente 0,25 mg-2000 mg de ribavirina. Es decir, algunas realizaciones tienen aproximadamente 250 µg, 500 µg, 1 mg, 25 mg, 50 mg, 100 mg, 150 mg, 200 mg, 250 mg, 300 mg, 350 mg, 400 mg, 450 mg, 500 mg, 550 mg, 600 mg, 650 mg, 700 mg, 750 mg, 800 mg, 850 mg, 900 mg, 1 g, 1,1 g, 1,2 g, 1,3 g, 1,4 g, 1,5 g, 1,6 g, 1,7 g, 1,8 g, 1,9 g y 2 g de ribavirina.

Las preparaciones de vacuna convencionales pueden modificarse añadiendo una cantidad de ribavirina que sea suficiente para mejorar una respuesta inmune al antígeno. Es decir, las formulaciones de vacuna convencionales existentes pueden modificarse añadiendo simplemente ribavirina a la preparación o administrando la vacuna convencional junto con ribavirina (es decir, poco antes o después de proporcionar el antígeno). Como apreciará un experto en la materia, la cantidad de antígenos en una vacuna puede variar dependiendo del tipo de antígeno y de su inmunogenicidad. La cantidad de antígenos en las vacunas puede variar de acuerdo con esto. Sin embargo, como pauta general, las vacunas pueden tener aproximadamente 0,25 mg-5 mg, 5-10 mg, 10-100 mg, 100-500 mg, y hasta 2000 mg de un antígeno (por ejemplo, un antígeno del virus de la hepatitis).

En algunas estrategias descritas en este documento, el médico individual elige la cantidad exacta de ribavirina y/o antígeno dependiendo del paciente a tratar. Además, las cantidades de ribavirina pueden añadirse en combinación o por separado de la misma cantidad o de una cantidad equivalente de antígeno, y estas cantidades pueden ajustarse durante un protocolo de vacunación particular para proporcionar niveles suficientes a la luz de consideraciones específicas del paciente o específicas del antígeno. A este respecto, los factores específicos del paciente y específicos del antígeno que pueden tenerse en cuenta incluyen, pero sin limitación, la gravedad del estado de enfermedad del paciente, la edad y el peso del paciente, la dieta, el momento y la frecuencia de administración, combinaciones de fármacos, reacciones de sensibilidad y tolerancia/respuesta a la terapia. La siguiente sección describe el descubrimiento de un nuevo gen de HCV y la creación de secuencias mutantes de HCV que pueden usarse con las realizaciones descritas en este documento.

EJEMPLO 6

Nuevas secuencias de NS3/4A y secuencias NS3/4A mutantes

Se clonó un nuevo ácido nucleico y la proteína correspondiente al dominio NS3/4A de HCV a partir de un paciente infectado con HCV (**SEQ ID NO: 16** y **17**). Una búsqueda en el Genbank reveló que la secuencia clonada tenía la mayor homología con secuencias de HCV pero sólo tenía una homología del 93% con el pariente de HCV más próximo (nº de acceso AJ 278830). También se crearon un mutante truncado del nuevo péptido NS3/4A y mutantes de NS3/4A que carecen del sitio de escisión proteolítica. Se descubrió que estos nuevos péptidos y los ácidos nucleicos que codificaban dichos péptidos eran potentes inmunógenos que pueden mezclarse con ribavirina para obtener una composición que proporciona a un receptor una potente respuesta inmune a HCV. La clonación del nuevo dominio NS3/4A y la creación de los diversos mutantes de NS3/4A se describen ahora.

La secuencia de NS3/4A se amplificó a partir del suero de un paciente infectado con HCV (genotipo 1a de HCV) usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se extrajo el ARN total del suero, se realizó la síntesis de ADNc y se realizó una PCR de acuerdo con protocolos convencionales (Chen M y col., J. Med Virol. 43:223-226 (1995)). La síntesis de ADNc se inició usando el cebador antisentido "NS4KR" (5'-CCG TCT AGA TCA GCA CTC TTC CAT TTC ATC-3' (**SEQ ID NO: 18**)). A partir de este ADNc, se amplificó un fragmento de ADN de 2079 pares de bases de HCV, correspondiente a los aminoácidos 1007 a 1711, que incluye los genes NS3 y NS4A. Se usó una polimerasa de alta fidelidad (Expand High Fidelity PCR, Boehringer-Mannheim, Mannheim, Alemania) con el cebador "NS3KF" (5'-CCT GAA TTC ATG GCG CCT ATC ACG GCC TAT-3' (**SEQ ID NO: 19**)) y el cebador NS4KR. El cebador NS3KF contenía un sitio de escisión de la enzima de restricción *EcoRI* y un codón de iniciación, y el cebador NS4KR contenía un sitio de escisión de la enzima de restricción *XbaI* y un codón de parada.

El fragmento amplificado después se secuenció (**SEQ ID NO: 16**). El análisis de comparación de secuencias reveló que el fragmento génico efectivamente se había amplificado a partir de una cepa viral de genotipo 1a. Una búsqueda BLAST computarizada frente a la base de datos del Genbank usando la página web NCBI reveló que el homólogo de HCV más próximo tenía una identidad del 93% en la secuencia de nucleótidos.

El fragmento de ADN amplificado después se digirió con *EcoRI* y *XbaI*, y se insertó en un plásmido pcDNA3.1/His (Invitrogen) digerido con las mismas enzimas. El plásmido NS3/4A-pcDNA3.1 después se digirió con *EcoRI* y *XbaI* y el inserto se purificó usando el kit QiaQuick (Qiagen, Hamburg, Alemania) y se unió a un vector pVAX digerido con *EcoRI* y *XbaI* (Invitrogen) para generar el plásmido NS3/4A-pVAX.

El mutante truncado rNS3 se obtuvo delecionando la secuencia de NS4A del ADN de NS3/4A. Por consiguiente, la secuencia del gen NS3 de NS3/4A-pVAX se amplificó por PCR usando los cebadores NS3KF y 3'*NotI* (5'-CCA CGC GGC CGC GAC GAC CTA CAG-3' (**SEQ ID NO: 20**)) que contenían sitios de restricción de *EcoRI* y *NotI*, respectivamente. El fragmento NS3 (1850 pb) después se unió a un plásmido pVAX digerido con *EcoRI* y *NotI* para generar el vector NS3-pVAX. Los plásmidos se cultivaron en células *E. coli* BL21. Los plásmidos se secuenciaron y se verificaron por escisión de restricción y los resultados fueron los esperados basándose en la secuencia original.

Para cambiar el sitio de escisión proteolítica entre NS3 y NS4A, el plásmido NS3/4A-pVAX se mutagenizó usando el kit de mutagénesis QUICKCHANGE™ (Stratagene), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para generar la mutación "TPT", el plásmido se amplificó usando los cebadores 5'-CTGGAGGTCGTCACGCCTACCTGGGTGCTCGTT-3' (**SEQ ID NO: 21**) y 5'-ACCGAGCACCCAGGTAGGCGTGACGACCTCCAG-3' (**SEQ ID NO: 22**) dando como resultado NS3/4A-TPT-pVAX. Para generar la mutación "RGT", el plásmido se amplificó usando los cebadores 5'-CTGGAGGTCGTC-CGCGGTACCTGGGTGCTCGTT-3' (**SEQ ID NO: 23**) y 5'-ACCGAGCACCCAGGTACC-GCGGACGACCTCCAG-3' (**SEQ ID NO: 24**) dando como resultado NS3/4A-RGT-pVAX.

Todas las construcciones mutagenizadas se secuenciaron para verificar que las mutaciones se habían realizado correctamente. Los plásmidos se cultivaron en células *E. coli* BL21 competentes. El ADN plasmídico usado para la inyección *in vivo* se purificó usando columnas de purificación de ADN Qiagen, de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes (Qiagen GmbH, Hilden, FRG). La concentración del ADN plasmídico resultante se determinó espectrofotométricamente (Dynaquant, Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) y el ADN purificado se disolvió en solución salina tamponada con fosfato (PBS) estéril a concentraciones de 1 mg/ml. Las secuencias de aminoácidos de las uniones de tipo natural y mutadas se muestran en la **TABLA 10**. La siguiente sección describe varios ácidos nucleicos que codifican péptidos de HCV.

TABLA 10

Plásmido	Secuencia de aminoácidos deducida
*NS3/4A-pVAX	TKYMTCMSADLEVV <u>T</u> STWVLVGGVL (SEQ ID NO:25)
NS3/4A-TGT-pVAX	TKYMTCMSADLEVV <u>T</u> GTWVLVGGVL (SEQ ID NO:26)
NS3/4A-RGT-pVAX	TKYMTCMSADLEVV <u>R</u> GTWVLVGGVL (SEQ ID NO:27)
NS3/4A-TPT-pVAX	TKYMTCMSADLEVV <u>T</u> P <u>T</u> WVLVGGVL (SEQ ID NO:33)
NS3/4A-RPT-pVAX	TKYMTCMSADLEVV <u>R</u> P <u>T</u> WVLVGGVL (SEQ ID NO:34)
NS3/4A-RPA-pVAX	TKYMTCMSADLEVV <u>R</u> PAWVLVGGVL (SEQ ID NO:35)
NS3/4A-CST-pVAX	TKYMTCMSADLEVV <u>C</u> STWVLVGGVL (SEQ ID NO:36)
NS3/4A-CCST-pVAX	TKYMTCMSADLEVV <u>C</u> CSTWVLVGGVL (SEQ ID NO:37)
NS3/4A-SSST-pVAX	TKYMTCMSADLEVV <u>S</u> STWVLVGGVL (SEQ ID NO:38)
NS3/4A-SSSSCST-pVAX	TKYMTCMSAD <u>S</u> SSSCSTWVLVGGVL (SEQ ID NO:39)
NS3/4A-VVVVTST-pVAX	TKYMTCMSADVVVV <u>T</u> STM+ILVGGVL (SEQ ID NO:40)
NS5-pVAX	ASEDVVCCS <u>M</u> SYTWTG (SEQ ID NO:41)
NS5A/B-pVAX	SSEDVVCCS <u>M</u> WVLVGGVL (SEQ ID NO:42)

*La secuencia de tipo natural para el fragmento NS3/4A es NS3/4A-pVAX. El punto de rotura de NS3/4A se identifica por un subrayado, donde la posición P1 corresponde a la primera Thr (T) y la posición P1' corresponde al siguiente aminoácido de la secuencia de NS3/4A-pVAX. En la secuencia de NS3/4A de tipo natural la proteasa NS3 escinde entre las posiciones P1 y P1'.

Ácidos nucleicos que codifican péptidos de HCV

Las realizaciones de ácido nucleico incluyen nucleótidos que codifican los péptidos de HCV descritos en este documento (por ejemplo, **SEQ ID NO: 17, 29, 31, 32, y 43-49**) o fragmentos de los mismos de al menos 4, 6, 8, 10, 12, 15 ó 20 aminoácidos de longitud (por ejemplo, las **SEQ ID NO: 25-27 y 33-42**). La divulgación realizada incluye ADN genómico, ARN y ADNc que codifica estos péptidos de HCV. Los nucleótidos de HCV no sólo incluyen las secuencias de ADN mostradas en la lista de secuencias (por ejemplo, **SEQ ID NO: 16**) sino que también incluyen

- 5 secuencias de nucleótidos que codifican las secuencias de aminoácidos mostradas en la lista de secuencias (por ejemplo, **SEQ ID NO: 17**) y cualquier secuencia de nucleótidos que hibride con las secuencias de ADN mostradas en la lista de secuencias en condiciones rigurosas (por ejemplo, hibridación con ADN unido al filtro en NaHPO₄ 0,5 M, dodecil sulfato sódico (SDS) al 7,0%, EDTA 1 mM a 50°C) y lavado en 0,2 X SSC/SDS al 0.2% a 50°C y cualquier secuencia de nucleótidos que hibride con las secuencias de ADN que codifican una secuencia de aminoácidos proporcionada en la lista de secuencias (**SEQ ID NO: 17**) en condiciones menos rigurosas (por ejemplo, hibridación en NaHPO₄ 0,5 M, dodecil sulfato sódico (SDS) al 7,0%, EDTA 1 mM a 37°C y lavado en 0,2X SSC/SDS al 0.2% a 37°C).
- 10 Los ácidos nucleicos también incluyen fragmentos, modificaciones, derivados y variantes de las secuencias descritas anteriormente. Pueden desearse ácidos nucleicos que tienen al menos 12 bases consecutivas de una de las nuevas secuencias de HCV o una secuencia complementaria a la misma y los fragmentos preferidos incluyen al menos 12 bases consecutivas de un ácido nucleico que codifica la molécula de NS3/4A de la **SEQ ID NO: 17** o una secuencia complementaria a la misma.
- 15 Los ácidos nucleicos pueden tener de 12 a aproximadamente 2079 nucleótidos consecutivos. Algunos fragmentos de ADN, por ejemplo, incluyen ácidos nucleicos que tienen al menos 12-15, 15-20, 20-30, 30-50, 50-100, 100-200, 200-500, 500-1000, 1000-1500, 1500-2079 nucleótidos consecutivos de la **SEQ ID NO: 16** o un complemento de los mismos. Los ácidos nucleicos también pueden alterarse por mutación tales como sustituciones, adiciones o deleciones. Debido a la degeneración de las secuencias codificantes de nucleótidos, pueden usarse, por ejemplo, otras secuencias de ADN que codifican sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos de HCV representada en la **SEQ ID NO: 17**. Éstas incluyen, pero sin limitación, secuencias de ácido nucleico que codifican la totalidad o partes de NS3/4A (**SEQ ID NO: 16**) o ácidos nucleicos que complementan la totalidad o parte de esta secuencia que se han alterado por la sustitución de codones diferentes que codifican un resto aminoacídico equivalente funcionalmente dentro de la secuencia, produciendo de esta manera un cambio silencioso, o un resto aminoacídico no equivalente funcionalmente dentro de la secuencia, produciendo de esta manera un cambio detectable.
- 20 Usando las secuencias de ácido nucleico descritas anteriormente, pueden diseñarse sondas que complementan estas moléculas y fabricarse por síntesis de oligonucleótidos. Las sondas deseables comprenden una secuencia de ácido nucleico de la **SEQ ID NO: 16** que es única para este aislado de HCV. Estas sondas pueden usarse para seleccionar ADNc de pacientes para aislar fuentes naturales de HCV, de las que algunas pueden ser nuevas secuencias de HCV por sí mismas. La selección puede realizarse, por ejemplo, por hibridación en filtro o por PCR. Por hibridación en filtro, la sonda marcada preferiblemente contiene al menos 15-30 pares de bases de la secuencia de ácido nucleico de la **SEQ ID NO: 16** que es única para este péptido NS3/4A. Las condiciones de lavado de hibridación usadas preferiblemente son de una rigurosidad media a alta. La hibridación puede realizarse en NaHPO₄ 0,5 M, dodecil sulfato sódico (SDS) al 7,0% y EDTA 1 mM a 42°C durante una noche y el lavado puede realizarse en 0,2X SSC/SDS al 0.2% a 42°C. Como pauta con respecto a estas condiciones véase, por ejemplo, Sambrook y col., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Press, N.Y.; y Ausubel y col., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y.
- 30 También pueden aislarse ácidos nucleicos de HCV de pacientes infectados con HCV usando los ácidos nucleicos descritos en este documento. (Véase también el *Ejemplo 6*). Por consiguiente, el ARN obtenido a partir de un paciente infectado con HCV se transcribe de forma inversa y el ADNc resultante se amplifica usando PCR u otra técnica de amplificación. Los cebadores preferiblemente se obtienen a partir de la secuencia de NS3/4A (**SEQ ID NO: 16**).
- 35 Como revisión de la tecnología de PCR, véase Molecular Cloning to Genetic Engineering, White, B.A. Ed. en Methods in Molecular Biology 67: Humana Press, Totowa (1997) y la publicación titulada "PCR Methods and Applications" (1991, Cold Spring Harbor Laboratory Press). Para la amplificación de ARNm, está dentro del alcance la invención transcribir de forma inversa ARNm en ADNc seguido por PCR (RT-PCR); o usar una sola enzima para las dos etapas como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.322.770. Otra técnica implica el uso de la reacción en cadena de la ligasa con huecos asimétricos mediante la transcriptasa inversa (RT-AGLCR), como se describe por Marshall R.L. y col. (PCR Methods and Applications 4:80-84, 1994).
- 40 En resumen, se aísla ARN siguiendo procedimientos convencionales. Se realiza una reacción de transcripción inversa sobre el ARN usando un cebador oligonucleotídico específico para el extremo más 5' del fragmento amplificado como cebador de síntesis de la primera cadena. Después se añade "una cola" al híbrido de ARN/ADN resultante con guaninas usando una reacción de transferasa terminal convencional. El híbrido después se digiere con ARNasa H, y la síntesis de la segunda cadena se ceba con un cebador poli-C. De esta manera se aíslan fácilmente secuencias de ADNc cadena arriba del fragmento amplificado. Como revisión de las estrategias de clonación que pueden usarse, véase, por ejemplo, Sambrook y col., 1989, supra.
- 45
- 50
- 55
- 60

En cada uno de estos procedimientos de amplificación se añaden cebadores de cada lado de la secuencia a amplificar a una muestra de ácido nucleico preparada de forma conveniente junto con dNTP y una polimerasa termoestable, tal como la Taq polimerasa, la Pfu polimerasa o la Vent polimerasa. El ácido nucleico de la muestra se desnaturaliza y los cebadores se hibridan específicamente con secuencias de ácido nucleico complementarias de la muestra. Después se extienden los cebadores hibridados. Posteriormente se inicia otro ciclo de desnaturalización, hibridación y extensión. Los ciclos se repiten múltiples veces para producir un fragmento amplificado que contiene la secuencia de ácido nucleico entre los sitios cebadores. En varias patentes, incluyendo las Patentes de Estados Unidos N° 4.683.195, 4.683.202 y 4.965.188 se ha descrito adicionalmente la PCR.

Los cebadores se seleccionan de manera que sean sustancialmente complementarios a una parte de la secuencia de ácido nucleico de la **SEQ ID NO: 16** que es única para esta molécula de NS3/4A, permitiendo de esta manera amplificar las secuencias entre los cebadores. Preferiblemente, los cebadores tienen una longitud de al menos 16-20, 20-25 o 25-30 nucleótidos. La formación de híbridos estables depende de la temperatura de fusión (T_m) del ADN. La T_m depende de la longitud del cebador, la fuerza iónica de la solución y el contenido de G+C. Cuanto mayor es el contenido de G+C del cebador, mayor es la temperatura de fusión porque los pares G:C se mantienen por tres enlaces de H mientras que los pares A:T tienen sólo dos. El contenido de G+C de los cebadores de amplificación descritos en este documento preferiblemente varía entre el 10 y el 75%, más preferiblemente entre el 35 y el 60%, y aún más preferiblemente entre el 40 y el 55%. La longitud apropiada para los cebadores en una serie particular de condiciones de ensayo puede determinarse empíricamente por un experto en la materia.

La separación de los cebadores se refiere a la longitud del segmento a amplificar. Los segmentos amplificados que llevan una secuencia de ácido nucleico que codifica péptidos de HCV pueden variar en tamaño desde al menos aproximadamente 25 pb a la longitud entera del genoma de HCV. Son típicos fragmentos de amplificación de 25-1000 pb, se prefieren los fragmentos de 50-1000 pb y son más preferidos los fragmentos de 100-600 pb. Se apreciará que los cebadores de amplificación pueden ser de cualquier secuencia que permita la amplificación específica de la región NS3/4A y, por ejemplo, pueden incluir modificaciones tales como sitios de restricción para facilitar la clonación.

El producto de PCR puede subclonarse y secuenciarse para asegurarse de que las secuencias amplificadas representan las secuencias de un péptido de HCV. El fragmento de PCR después puede usarse para aislar un clon de ADNc de longitud completa por una diversidad de procedimientos. Por ejemplo, el fragmento amplificado puede marcarse y usarse para seleccionar una biblioteca de ADNc tal como una biblioteca de ADNc de bacteriófago. Como alternativa, el fragmento marcado puede usarse para aislar clones genómicos a través de la selección de una biblioteca genómica. Además, puede construirse una biblioteca de expresión utilizando ADNc sintetizado, por ejemplo, a partir de ARN aislado de un paciente infectado. De esta manera, pueden aislarse productos génicos de HCV usando técnicas de selección de anticuerpos convencionales junto con anticuerpos inducidos contra el producto génico de HCV. (Como técnicas de selección véase, por ejemplo, Harlow, E. y Lane, eds., 1988, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor.)

La divulgación también incluye (a) vectores de ADN que contienen cualquiera de las secuencias de ácido nucleico anteriores y/o sus complementos (es decir, antisentido); (b) vectores de expresión de ADN que contienen cualquiera de las secuencias de ácido nucleico anteriores asociadas operativamente con un elemento regulador que dirige la expresión del ácido nucleico; y (c) células hospedadoras modificadas por ingeniería genética que contienen cualquiera de las secuencias de ácido nucleico anteriores asociada operativamente con un elemento regulador que dirige la expresión de las secuencias codificantes en la célula hospedadora. Estas construcciones recombinantes pueden replicarse de forma autónoma en una célula hospedadora. Como alternativa, las construcciones recombinantes pueden integrarse en el ADN cromosómico de una célula hospedadora. Estos polinucleótidos recombinantes típicamente comprenden un polinucleótido de HCV genómico o de ADNc de origen semisintético o sintético, gracias a la manipulación humana. Por lo tanto, se proporcionan ácidos nucleicos recombinantes que comprenden estas secuencias y complementos de las mismas que no son de origen natural.

Aunque pueden emplearse ácidos nucleicos que codifican un péptido de HCV o ácidos nucleicos que tienen secuencias complementarias a un gen de HCV según aparecen en la naturaleza, a menudo se alterarán, por ejemplo, por delección, sustitución o inserción y pueden ir acompañados por una secuencia no presente en seres humanos. Como se usan en este documento, los elementos reguladores incluyen, pero sin limitación, promotores inducibles y no inducibles, potenciadores, operadores y otros elementos conocidos por los expertos en la materia que dirigen y regulan la expresión. Estos elementos reguladores incluyen, pero sin limitación, el gen temprano inmediato de citomegalovirus hCMV, los promotores tempranos o tardíos de adenovirus SV40, el sistema lac, el sistema trp, el sistema TAC, el sistema TRC, las regiones principales del operador y promotor del fago A, las regiones de control de la proteína de la cubierta fd, el promotor para la 3-fosfoglicerato quinasa, los promotores de la fosfatasa ácida y los promotores de los factores de apareamiento de levadura.

Además, pueden modificarse por ingeniería genética secuencias de ácido nucleico que codifican el péptido de HCV recombinante y sus secuencias complementarias para modificar su procesamiento o expresión. Por ejemplo, y no a modo de limitación, los ácidos nucleicos de HCV descritos en este documento pueden combinarse con una secuencia promotora y/o sitio de unión a ribosomas, o puede insertarse una secuencia señal cadena arriba de las secuencias que codifican el péptido de HCV para permitir la secreción del péptido y de esta forma facilitar la recolección o biodisponibilidad. Además, un ácido nucleico de HCV dado puede mutarse *in vitro* o *in vivo* para crear y/o destruir secuencias de traducción, iniciación y/o terminación o para crear variaciones en regiones codificantes y/o formar nuevos sitios de restricción o destruir sitios de restricción preexistentes, o para facilitar adicionalmente la modificación *in vitro*. (Véase el *Ejemplo 6*). Puede usarse cualquier técnica para mutagénesis conocida en la técnica, incluyendo pero sin limitación mutagénesis dirigida *in vitro*. (Hutchinson y col., J. Biol. Chem., 253:6551 (1978)).

Además, pueden unirse ácidos nucleicos que codifican otras proteínas o dominios de otras proteínas a ácidos nucleicos que codifican un péptido de HCV para crear una proteína de fusión. Los nucleótidos que codifican proteínas de fusión pueden incluir, pero sin limitación, una secuencia de NS3/4A de longitud completa (**SEQ ID NO: 16**), una secuencia de NS3/4A truncada o un fragmento peptídico de una secuencia de NS3/4A fusionada a una proteína o péptido no relacionado, tal como por ejemplo poli-histidina, hemaglutinina, una enzima, una proteína fluorescente o una proteína luminiscente, como se describe más adelante.

Sorprendentemente se descubrió que los vectores NS3-pVAX y NS3/4A-pVAX pueden inducir una potente respuesta inmune cuando se inyectan en un mamífero inmunocompetente. El siguiente ejemplo describe estos experimentos con mayor detalle.

EJEMPLO 7 [no ilustrativo de la presente invención]

Para determinar si se indujo una respuesta inmune humoral por los vectores NS3-pVAX y NS3/4A-pVAX, las construcciones de expresión descritas en el *Ejemplo 6* se purificaron usando el sistema de purificación de ADN Qiagen de acuerdo con las instrucciones del fabricante y los vectores de ADN purificados se usaron para inmunizar grupos de cuatro a diez ratones Balb/c. Los plásmidos se inyectaron directamente en músculos tibialis anterior (TA) en regeneración como se ha descrito previamente (Davis y col., Human Gene Therapy 4(6):733 (1993)). En resumen, a los ratones se les inyectaron por vía intramuscular 50 μ l/TA de cardiotoxina 0,01 mM (Latoxan, Rosans, Francia) en NaCl estéril al 0,9%. Cinco días después, en cada músculo TA se inyectaron 50 μ l de PBS que contenía rNS3 o ADN.

Se obtuvieron cepas de ratón endogámicas C57/BL6 (H-2b) Balb/C (H-2d) y CBA (H-2k) a partir de la instalación de cría de Møllegaard Dinamarca, Charles River Uppsala, Suecia, o B&K Sollentuna, Suecia. Todos los ratones eran hembras y se usaron a las 4-8 semanas de edad. Para controlar las respuestas humorales, todos los ratones recibieron una inyección de refuerzo de 50 μ l/TA de ADN plasmídico cada cuatro semanas. Además, algunos ratones recibieron proteína NS3 recombinante (rNS3), que se purificó como se describe en este documento. Los ratones que recibieron rNS3 no se inmunizaron más de dos veces. Se extrajeron muestras de todos los ratones dos veces al mes.

Se usaron ensayos enzimáticos de inmunoabsorbente (EIA) para detectar la presencia de anticuerpos murinos contra NS3. Estos ensayos se realizaron esencialmente como se describe en Chen y col., Hepatology 28(1): 219 (1998)). En resumen, se adsorbió pasivamente rNS3 durante una noche a 4°C en placas de microtitulación de 96 pocillos (Nunc, Copenhagen, Dinamarca) a 1 μ g/ml en tampón carbonato sódico 50 mM (pH 9,6). Las placas después se bloquearon por incubación con tampón de dilución que contenía PBS, suero de cabra al 2% y albúmina de suero bovino al 1% durante una hora a 37°C. Después se incubaron diluciones seriadas de sueros de ratón empezando a 1:60 en las placas durante una hora. Los anticuerpos de suero murino unidos se detectaron por medio de una IgG de cabra anti-ratón conjugada con fosfatasa alcalina (Sigma Cell Products, Saint Louis, MO) seguido de la adición del sustrato pNPP (1 comprimido/5 ml de tampón de dietanolamina 1 M con MgCl₂ 0,5 mM). La reacción se detuvo por la adición de NaOH 1 M y la absorbancia se leyó a 405 nm.

Después de cuatro semanas, cuatro de cinco ratones inmunizados con NS3/4A-pVAX habían desarrollado anticuerpos NS3, mientras que uno de cinco inmunizados con NS3-pVAX habían desarrollado anticuerpos (**FIGURA 4**). Después de seis semanas, cuatro de cinco ratones inmunizados con NS3/4A-pVAX habían desarrollado altos niveles ($>10^4$) anticuerpos NS3 (niveles medios 10800 \pm 4830) y uno tenía un título de 2160. Aunque todos los ratones inmunizados con NS3-pVAX desarrollaron anticuerpos contra NS3, ninguno de ellos desarrolló niveles tan elevados como los producidos por la construcción de NS3/4A-pVAX (niveles medios 1800 \pm 805). Los niveles de anticuerpo inducidos por la construcción de fusión NS3/4A fueron significativamente mayores que los inducidos por los NS3-pVAX a las seis semanas (rangos medios 7,6 frente a 3, 4, $p<0,05$, ensayo de suma de rangos de Mann-Whitney, y $p<0,01$, ensayo t de Student). De esta manera, la inmunización con NS3-pVAX o NS3/4A-pVAX dio

como resultado la producción de anticuerpos anti-NS3, pero el gen de fusión NS3/4A fue un inmunógeno más potente. El siguiente ejemplo describe experimentos que se realizaron para determinar si la construcción NS3/4A-TPT-pVAX podía inducir una respuesta inmune potente.

5 **EJEMPLO 8** [no ilustrativo de la presente invención]

10 Para ensayar si la mayor inmunogenicidad de NS3/4A podía atribuirse únicamente a la presencia de NS4A, o si la proteína de fusión NS3/4A además tenía que escindirse en la unión NS3/4A, se realizaron nuevos experimentos. En un primer experimento, se comparó la inmunogenicidad de los vectores NS3-pVAX, NS3/4A-pVAX y NS3/4A-TPT-pVAX en ratones Balb/c. Los ratones se inmunizaron en la semana cero como se ha descrito anteriormente y, después de dos semanas, se extrajeron muestras de sangre de todos los ratones y se determinó la presencia de anticuerpos contra NS3 a una dilución de suero de 1:60 (**TABLA 11**). De nuevo se extrajeron muestras de sangre de los ratones en la semana 4. Aunque el vector NS3/4A-TPT-pVAX era comparable al vector NS3-pVAX (4/10 frente a 0/10; NS, ensayo exacto de Fisher), el vector NS3/4A pVAX seguía siendo el inmunógeno más potente. De esta manera, todas las construcciones de HCV que se habían introducido en los ratones podían inducir una respuesta inmune contra NS3, sin embargo, la secuencia de NS4A y un sitio de escisión proteolítica funcional entre las secuencias de NS3 y NS4A proporcionó una respuesta inmune más potente.

TABLA 11

Semanas desde la primera inmunización	Nº de respondedores con anticuerpos al inmunógeno respectivo después de una inmunización de 100 µg <i>i.m</i>		
	NS3-pVAX	NS3/4A-pVAX	NS3/4A-TPT-pVAX
2	0/10	17/20	4/10
4	0/10 (<60)	20/20 (2415±3715) 55% > 10 ³ 10% > 10 ⁴	10/10 (390±639) 50% > 10 ² 10% > 10 ³

20 Durante la fase crónica de infección, HCV se replica en hepatocitos y se propaga dentro del hígado. Un factor importante para combatir las infecciones virales crónicas y persistentes es el sistema de defensa inmune mediado por células. Los linfocitos CD4+ y CD8+ se infiltran en el hígado durante la fase crónica de la infección por HCV, pero no pueden eliminar el virus o prevenir la lesión hepática. Además, una infección persistente por HCV está asociada con el inicio del carcinoma hepatocelular (HCC). Los siguientes ejemplos describen experimentos que se realizaron para determinar si las construcciones NS3 y NS3/4A podían inducir una respuesta inmune mediada por células T contra NS3.

30 **EJEMPLO 9** [no ilustrativo de la presente invención]

Para estudiar si las construcciones descritas anteriormente podían inducir una respuesta mediada por células contra NS3, se realizó un ensayo del crecimiento tumoral *in vivo*. Para este fin, se obtuvo una línea de células tumorales SP2/0 transfectada de forma estable con el gen NS3/4A. El plásmido pcDNA3.1 que contenía el gen NS3/4A gene se linealizó por digestión con BglII. Se mezclaron un total de 5 µg de ADN plasmídico linealizado con 60 µg de reactivo de transfección (Superfect, Qiagen, Alemania) y la mezcla se añadió a una capa con una confluencia del 50% de células SP2/0 en una placa de 35 mm. Las células SP2/0 transfectadas (NS3/4ASP2/0) se cultivaron durante 14 días en presencia de 800 µg/ml de geneticina y se aislaron los clones individuales. Se identificó un clon de SP2/0 que expresaba NS3/4A estable usando PCR y RTPCR. La línea celular clonada se mantuvo en DMEM que contenía suero bovino fetal al 10%, L-glutamina y penicilina-estreptomycin.

40 Después se evaluó la cinética de crecimiento *in vivo* de las líneas celulares SP2/0 y NS3/4A-SP2/0 en ratones Balb/c. A los ratones se les inyectaron por vía subcutánea 2 x 10⁶ células tumorales en el costado derecho. Cada día se determinó el tamaño del tumor a través de la piel. Las cinéticas de crecimiento de las dos líneas celulares fueron comparables. Por ejemplo, los tamaños medios del tumor no diferían entre las dos líneas celulares en ningún punto de tiempo (Véase la **TABLA 12**). El siguiente ejemplo describe experimentos que se realizaron para determinar si los ratones inmunizados con las construcciones NS3/4A habían desarrollado una respuesta de células T contra NS3.

TABLA 12

ID de ratón	Línea celular de tumor	Tamaño máximo del tumor <i>in vivo</i> en el punto de tiempo indicado								
		5	6	7	8	11	12	13	14	15
1	SP2/0	1,6	2,5	4,5	6,0	10,0	10,5	11,0	12,0	12,0

ID de ratón	Línea celular de tumor	Tamaño máximo del tumor <i>in vivo</i> en el punto de tiempo indicado								
		1,0	1,0	2,0	3,0	7,5	7,5	8,0	11,5	11,5
2	SP2/0	1,0	1,0	2,0	3,0	7,5	7,5	8,0	11,5	11,5
3	SP2/0	2,0	5,0	7,5	8,0	11,0	11,5	12,0	12,0	13,0
4	SP2/0	4,0	7,0	8,0	10,0	13,0	15,0	16,5	16,5	17,0
5	SP2/0	1,0	1,0	3,0	4,0	5,0	6,0	6,0	6,0	7,0
Media de grupo		1,92	3,3	5,0	6,2	9,3	10,1	10,7	11,6	12,1
6	NS3/4A-SP2/0	1,0	2,0	3,0	3,5	4,0	5,5	6,0	7,0	8,0
7	NS3/4A-SP2/0	2,0	2,5	3,0	5,0	7,0	9,0	9,5	9,5	11,0
8	NS3/4A-SP2/0	1,0	2,0	3,5	3,5	9,5	11,0	12,0	14,0	14,0
9	NS3/4A-SP2/0	1,0	1,0	2,0	6,0	11,5	13,0	14,5	16,0	18,0
10	NS3/4A-SP2/0	3,5	6,0	7,0	10,5	15,0	15,0	15,0	15,5	20,0
Media de grupo		1,7	2,7	3,7	5,7	9,4	10,7	11,4	12,4	14,2
Valor de p de la comparación con ensayo t de Student entre medias de grupos		0,7736	0,6918	0,4027	0,7903	0,9670	0,7986	0,7927	0,7508	0,4623

EJEMPLO 10 [no ilustrativo de la presente invención]

5 Para examinar si se induce una respuesta de células T por la inmunización con NS3/4A, se ensayó la capacidad de un sistema de defensa inmune de ratón inmunizado para atacar la línea celular de tumor que expresa NS3. El protocolo para ensayar la inhibición *in vivo* del crecimiento tumoral de la línea celular de mieloma SP2/0 en ratones Balb/c se ha descrito con detalle previamente (Encke y col., J. Immunol. 161:4917 (1998)). La inhibición del crecimiento tumoral en este modelo depende del cebado de los linfocitos T citotóxicos (CTL). En resumen, se

10 inmunizaron grupos de diez ratones *i.m.* cinco veces con intervalos de un mes con 100 µg de NS3-pVAX o 100 µg de NS3/4A-pVAX. Dos semanas después de la última inmunización, se inyectaron 2×10^6 células SP2/0 o NS3/4A-SP2/0 en el costado derecho de cada ratón. Dos semanas después, los ratones se sacrificaron y se midieron los tamaños máximos de los tumores. No hubo diferencia entre los tamaños medios de los tumores SP2/0 y NS3/4A-SP2/0 en los ratones inmunizados con NS3-pVAX (véase la **TABLA 13**).

TABLA 13

ID de ratón	Inmunógeno	Dosis (µg)	Línea de células tumorales	Crecimiento tumoral	Tamaño máximo del tumor
1	NS3-pVAX	100	SP2/0	Sí	5
2	NS3-pVAX	100	SP2/0	Sí	15
3	NS3-pVAX	100	SP2/0	No	-
4	NS3-pVAX	100	SP2/0	Sí	6
5	NS3-pVAX	100	SP2/0	Sí	13
Total de grupo				4/5	9,75±4,992
6	NS3-pVAX	100	NS3/4A-SP2/0	Sí	9
7	NS3-pVAX	100	NS3/4A-SP2/0	Sí	8
8	NS3-pVAX	100	NS3/4A-SP2/0	Sí	7
9	NS3-pVAX	100	NS3/4A-SP2/0	No	-
10	NS3-pVAX	100	NS3/4A-SP2/0	No	-
				3/5	8,00±1,00

Nota: análisis estadístico (StatView): ensayo t de Student sobre el tamaño máximo del tumor. Los valores de $p < 0,05$ se consideran significativos.

Ensayo t no pareado para el diámetro máximo

Variable de agrupamiento: columna 1

Diferencia hipotetizada = 0

5 **Exclusión de filas: NS3DNA-Tumor-001213**

	Dif. Media	DF	Valor de t	Valor de p
NS3-sp2, NS3-spNS3	1,750	5	0,58	0,584

Info de grupo para el diámetro máximo

Variable de agrupamiento: columna 1

Exclusión de filas: NS3DNA-Tumor-001213

	Recuento	Media	Varianza	Desviación típica	Error típico
NS3-sp2	4	9,750	24,917	4,992	2,496
NS3-spNS3	3	8,000	1,000	1,000	0,57

- 10 En la siguiente serie de experimentos, se evaluó la inhibición del crecimiento tumoral de SP2/0 o NS3/4A-SP2/0 en ratones Balb/c inmunizados con NS3/4A-pVAX. En ratones inmunizados con el plásmido NS3/4A-pVAX, el crecimiento del tumor NS3/4A-SP2/0 se inhibió significativamente en comparación con el crecimiento de las células SP2/0 no transfectadas (Véase la **TABLA 14**). De esta manera, la inmunización con NS3/4A-pVAX induce CTL que inhiben el crecimiento de células que expresan NS3/4A *in vivo*. El siguiente ejemplo describe experimentos que se
- 15 realizaron para analizar la eficacia de diversas composiciones que contenían NS3 en la inducción de una respuesta mediada por células a NS3.

TABLA 14

ID de ratón	Inmunógeno	Dosis (µg)	Línea de células tumorales	Crecimiento tumoral	Tamaño máximo del tumor (mm)
11	NS3/4A-pVAX	100	SP2/0	No	-
12	NS3/4A-pVAX	100	SP2/0	Sí	24
13	NS3/4A-pVAX	100	SP2/0	Sí	9
14	NS3/4A-pVAX	100	SP2/0	Sí	11
15	NS3/4A-pVAX	100	SP2/0	Sí	25
				4/5	17,25±8,421
16	NS3/4A-pVAX	100	NS3/4A-SP2/0	No	-
17	NS3/4A-pVAX	100	NS3/4A-SP2/0	Sí	9
18	NS3/4A-pVAX	100	NS3/4A-SP2/0	Sí	7
19	NS3/4A-pVAX	100	NS3/4A-SP2/0	Sí	5
20	NS3/4A-pVAX	100	NS3/4A-SP2/0	Sí	4
				4/5	6,25±2,217

Nota: análisis estadístico (StatView): ensayo t de Student sobre el tamaño máximo del tumor. Los valores de $p < 0,05$ se consideran significativos.

Ensayo t no pareado para el diámetro máximo

Variable de agrupamiento: columna 1

Diferencia hipotetizada = 0

Exclusión de filas: NS3DNA-Tumor-001213

	Diferencia media	DF	Valor de t	Valor de p
NS3/4-sp2, NS3/4-spNS3	11,000	6	2,526	0,044

5 **Info de grupo para el diámetro máximo**

Variable de agrupamiento: columna 1

Exclusión de filas: NS3DNA-Tumor-001213

	Recuento	Media	Varianza	Desviación típica	Error típico
NS3/4-sp2	4		70,917	8,421	4,211
NS3/4-spNS3	4	17,250 6,250	4,917	2,217	1,109

EJEMPLO 11 [no ilustrativo de la presente invención]

10 Para analizar si la administración de diferentes composiciones que contenían NS3 afectaba a la inducción de una respuesta inmune mediada por células, los ratones se inmunizaron con PBS, rNS3, ADN irrelevante o la construcción NS3/4A, y se determinaron los tamaños de los tumores como se ha descrito anteriormente. Sólo la construcción NS3/4A pudo inducir una respuesta de células T suficiente para producir una reducción estadísticamente significativa en el tamaño del tumor (véase la TABLA 15). El siguiente ejemplo describe
15 experimentos que se realizaron para determinar si la reducción en el tamaño tumoral puede atribuirse a la generación de linfocitos T específicos de NS3.

TABLA 15

ID de ratón	Inmunógeno	Dosis (µg)	Línea celular del tumor	Anti-NS3	Crecimiento tumoral	Tamaño máximo del tumor (mm)
1	NS3-pVAX	10	NS3/4A-SP2/0	<60	+	12,0
2	NS3-pVAX	10	NS3/4A-SP2/0	<60	+	20,0
3	NS3-pVAX	10	NS3/4A-SP2/0	60	+	18,0
4	NS3-pVAX	10	NS3/4A-SP2/0	<60	+	13,0
5	NS3-pVAX	10	NS3/4A-SP2/0	<60	+	17,0
Media de grupos				60	5/5	16,0±3,391
6	NS3-pVAX	100	NS3/4A-SP2/0	2160	+	10,0
7	NS3-pVAX	100	NS3/4A-SP2/0	<60	-	-
8	NS3-pVAX	100	NS3/4A-SP2/0	<60	-	-
9	NS3-pVAX	100	NS3/4A-SP2/0	360	-	-
10	NS3-pVAX	100	NS3/4A-SP2/0	<60	+	12,5
Media de grupos				1260	2/5	11,25±1,768
11	NS3/4A-pVAX	10	NS3/4A-SP2/0	<60	+	10,0
12	NS3/4A-pVAX	10	NS3/4A-SP2/0	<60	-	-
13	NS3/4A-pVAX	10	NS3/4A-SP2/0	<60	-	-
14	NS3/4A-pVAX	10	NS3/4A-SP2/0	<60	+	13,0

ES 2 371 936 T3

ID de ratón	Inmunógeno	Dosis (µg)	Línea celular del tumor	Anti-NS3	Crecimiento tumoral	Tamaño máximo del tumor (mm)
15	NS3/4A-pVAX	10	NS3/4A-SP2/0	<60	+	13,5
Media de grupos				<60	3/5	12,167±1,893
16	NS3/4A-pVAX	100	NS3/4A-SP2/0	60	+	10,0
17	NS3/4A-pVAX	100	NS3/4A-SP2/0	360	-	-
18	NS3/4A-pVAX	100	NS3/4A-SP2/0	2160	+	8,0
19	NS3/4A-pVAX	100	NS3/4A-SP2/0	2160	+	12,0
20	NS3/4A-pVAX	100	NS3/4A-SP2/0	2160	+	7,0
Media de grupos				1380	4/5	9,25±2,217
36	P17-pcADN3	100	NS3/4A-SP2/0	<60	+	20,0
37	P17-pcADN3	100	NS3/4A-SP2/0	<60	+	7,0
38	P17-pcADN3	100	NS3/4A-SP2/0	<60	+	11,0
39	P17-pcADN3	100	NS3/4A-SP2/0	<60	+	15,0
40	P17-pcADN3	100	NS3/4A-SP2/0	<60	+	18,0
Media de grupos				<60	5/5	14,20±5,263
41	rNS3/CFA	20	NS3/4A-SP2/0	>466560	+	13,0
42	rNS3/CFA	20	NS3/4A-SP2/0	>466560	-	-
43	rNS3/CFA	20	NS3/4A-SP2/0	>466560	+	3,5
44	rNS3/CFA	20	NS3/4A-SP2/0	>466560	+	22,0
45	rNS3/CFA	20	NS3/4A-SP2/0	>466560	+	17,0
Media de grupos				466560	4/5	17,333±4,509
46	PBS	-	NS3/4A-SP2/0	<60	+	10,0
47	PBS	-	NS3/4A-SP2/0	<60	+	16,5
48	PBS	-	NS3/4A-SP2/0	60	+	15,0
49	PBS	-	NS3/4A-SP2/0	<60	+	21,0
50	PBS	-	NS3/4A-SP2/0	<60	+	15,0
51	PBS	-	NS3/4A-SP2/0	<60	-	-
Media de grupos				60	5/6	15,50±3,937

Nota: análisis estadístico (StatView): ensayo t de Student sobre el tamaño máximo del tumor. Los valores de p < 0,05 se consideran significativos.

Ensayo t no pareado para el tamaño del tumor más grande

Variable de agrupamiento: grupo

Diferencia hipotetizada = 0

	Dif. Media	DF	Valor de t	Valor de P
p17-sp3-4, NS3-100-sp3-4	2,950	5	0,739	0,4933

	Dif. Media	DF	Valor de t	Valor de P
p17-sp3-4, NS3/4-10-sp3-4	2,033	6	0,628	0,5532
p17-sp3-4, NS3-10-sp3-4	-1,800	8	-0,643	0,5383
p17-sp3-4, NS3/4-100-sp3-4	4,950	7	1,742	0,1250
p17-sp3-4, PBS-sp3-4	-1,300	8	-0,442	0,6700
p17-sp3-4, rNS3-sp3-4	-3,133	6	-0,854	0,4259
NS3-100-sp3-4, NS3/4-10-sp3-4	-0,917	3	-0,542	0,6254
NS3-100-sp3-4, NS3-10-sp3-4	-4,750	5	-1,811	0,1299
NS3-100-sp3-4, NS3/4-100-sp3-4	2,000	4	1,092	0,3360
NS3-100-sp3-4, PBS-sp3-4	-4,250	5	-1,408	0,2183
NS3-100-sp3-4, rNS3-sp3-46	-6,083	3	-1,744	0,1795
NS5/4-10-sp3-4, NS3-10-sp3-4	-3,833	6	-1,763	0,1283
NS3/4-10-sp3-4, NS3/4-100-sp3-4	2,917	5	1,824	0,1277
NS3/4-10-sp3-4, PBS-sp3-4	-3,333	6	-1,344	0,2274
NS3/4-10-sp3-4, rNS3-sp3-4	-5,167	4	-1,830	0,1412
NS3-10-sp3-4, NS3/4-100-sp3-4	6,750	7	3,416	0,0112
NS3-10-sp3-4, PBS-sp3-4	.500	8	0,215	0,8350
NS3-10-sp3-4, rNS3-sp3-4	-1,333	6	-0,480	0,6480
NS3/4-100-sp3-4, PBS-sp3-4	-6,250	7	-2,814	0,0260
NS3/4-100-sp3-4, rNS3-sp3-4	-8,083	5	-3,179	0,0246
PBS-sp3-4, rNS3-sp3-4	-1,833	6	-0,607	0,5662

EJEMPLO 12 [no ilustrativo de la presente invención]

5 Para determinar si se indujeron células T específicas de NS3 por las inmunizaciones con NS3/4A, se empleó un ensayo de lisis de células tumorales mediada por células T *in vitro*. El ensayo se ha descrito con detalle previamente (Townsend y col., J. Virol. 71:3365 (1997)). En resumen, se inmunizaron grupos de cinco ratones Balb/c tres veces con 100 µg NS3/4A-pVAX *i.m.* Dos semanas después de la última inyección, los ratones se sacrificaron y se recogieron los esplenocitos. Se establecieron cultivos de reestimulación con 3×10^6 esplenocitos y 3×10^6 células NS3/4A-SP2/0. Después de cinco días, se realizó un ensayo de liberación de Cr^{51} convencional usando células NS3/4A-SP2/0 o SP2/0 como dianas. El porcentaje de lisis específica se calculó como la relación entre la lisis de células NS3/4A-SP2/0 y la lisis de células SP2/0. Sólo los ratones inmunizados con NS3/4A-pVAX presentaron una lisis específica mayor del 10% en cuatro de cinco ratones ensayados, usando una relación entre efector y diana de 20:1 (véanse las **FIGURAS 5A** y **B**). Por consiguiente, los ratones inmunizados con NS3/4A presentaron una reducción en la proliferación de células cancerosas y/o NS3/4A produjo la lisis de las células cancerosas. La siguiente sección describe con más detalle varios de los polipéptidos de HCV incorporados en las presentes realizaciones.

Péptidos de HCV

20 Los ácidos nucleicos que codifican los péptidos de HCV descritos en la sección previa pueden manipularse usando técnicas convencionales en biología molecular para crear construcciones recombinantes que expresan los péptidos de HCV. Los péptidos de HCV o sus derivados incluyen, pero sin limitación, los que contienen como secuencia de aminoácidos primaria toda la secuencia de aminoácidos sustancialmente representada en la lista de secuencias (**SEQ ID NO: 17, 29-32** y **43-49**) y fragmentos de la misma de al menos cuatro aminoácidos de longitud (por ejemplo, **SEQ ID NO: 25-27** y **33-42**) incluyendo secuencias alteradas en las que restos aminoacídicos funcionalmente equivalentes sustituyen a restos dentro de la secuencia dando como resultado un cambio silencioso. Los fragmentos de una secuencia de la **SEQ ID NO: 17, 29-32** y **43-49** pueden ser de al menos cuatro aminoácidos y comprenden una secuencia de aminoácidos única para el péptido NS3/4A descubierto (**SEQ ID NO: 17**), incluyendo secuencias alteradas en las que restos aminoacídicos funcionalmente equivalentes sustituyen a restos dentro de la secuencia dando como resultado un cambio silencioso. Los péptidos de HCV pueden tener una longitud, por ejemplo, de al menos 12-15, 15-20, 20-25, 25-50, 50-100, 100-150, 150-250, 250-500 o 500-704 aminoácidos. Se dan a conocer también en este documento otros fragmentos (por ejemplo, **SEQ ID NO: 25-27**, y **33-42**).

35 Se dan a conocer también en este documento péptidos de HCV que son sustancialmente idénticos a los descritos anteriormente. Es decir, péptidos de HCV que tienen uno o más restos aminoacídicos dentro de la **SEQ ID NO: 17** y fragmentos de los mismos que se sustituyen por otro aminoácido de una polaridad similar que actúa como un equivalente funcional, dando como resultado una alteración silenciosa. Los sustitutos de un aminoácido dentro de la secuencia pueden seleccionarse entre otros miembros de la clase a la que pertenece el aminoácido. Por ejemplo, los aminoácidos no polares (hidrófobos) incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano

y metionina. Los aminoácidos polares neutros incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina. Los aminoácidos cargados positivamente (básicos) incluyen arginina, lisina e histidina. Los aminoácidos cargados negativamente (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. Los aminoácidos aromáticos incluyen fenilalanina, triptófano y tirosina.

Los péptidos de HCV descritos en este documento pueden prepararse por procedimientos de síntesis química (tales como síntesis de péptidos en fase sólida) usando técnicas conocidas en esta materia tales como las indicadas por Merrifield y col., J. Am. Chem. Soc. 85: 2149 (1964), Houghten y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:51:32 (1985), Stewart y Young (Solid phase peptide synthesis, Pierce Chem Co., Rockford, IL (1984), y Creighton, 1983, Proteins: Structures and Molecular Principles, W. H. Freeman & Co., N.Y. Estos polipéptidos pueden sintetizarse con o sin una metionina en el extremo amino. Los péptidos de HCV sintetizados químicamente pueden oxidarse usando procedimientos indicados en estas referencias para formar enlaces disulfuro.

Aunque los péptidos de HCV descritos en este documento pueden sintetizarse químicamente, puede ser más eficaz producir estos polipéptidos por tecnología de ADN recombinante. Estos procedimientos pueden usarse para construir vectores de expresión que contienen las secuencias de nucleótidos de HCV descritas anteriormente, por ejemplo, y señales de control de la transcripción y la traducción apropiadas. Estos procedimientos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*. Como alternativa, el ARN capaz de codificar secuencias de nucleótidos de HCV puede sintetizarse químicamente usando, por ejemplo, sintetizadores. Véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Oligonucleotide Synthesis, 1984, Gait, M. J. ed., IRL Press, Oxford. Por consiguiente, varias realizaciones se refieren a líneas celulares que se han modificado por ingeniería genética para expresar los péptidos de HCV incorporados en las realizaciones. Por ejemplo, algunas células se obtienen para expresar los péptidos de HCV de las **SEQ ID NO: 17, 29-32 y 43-49** o fragmentos de estas moléculas.

Para expresar los péptidos de HCV incorporados en las realizaciones, pueden utilizarse varios sistemas de hospedador-vector de expresión. Los sistemas de expresión adecuados incluyen, pero sin limitación, microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli* o *B. subtilis*) transformados con vectores de expresión de ADN de bacteriófago recombinante, ADN plasmídico o ADN cosmídico, que contienen secuencias de nucleótidos de HCV; levaduras (por ejemplo, *Saccharomyces*, *Pichia*) transformadas con vectores de expresión de levaduras recombinantes que contienen las secuencias de nucleótidos de HCV; sistemas de células de insecto infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, baculovirus) que contienen las secuencias de HCV; sistemas de células vegetales infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, el virus del mosaico de la coliflor, CaMV; el virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión plasmídicos recombinantes (por ejemplo, el plásmido Ti) que contienen secuencias de HCV; o sistemas de células de mamífero (por ejemplo, COS, CHO, BHK, 293, 3T3) que llevan construcciones de expresión recombinantes que contienen promotores derivados del genoma de células de mamífero (por ejemplo, el promotor de metalotioneína) o de virus de mamíferos (por ejemplo, el promotor tardío de adenovirus; o el promotor 7.5K de virus vaccinia).

En los sistemas bacterianos, pueden seleccionarse ventajosamente varios vectores de expresión dependiendo del uso deseado del producto génico de HCV que se va a expresar. Por ejemplo, cuando se va a producir una gran cantidad de dicha proteína para la generación de composiciones farmacéuticas de péptidos de HCV o para producir anticuerpos contra el péptido de HCV, por ejemplo, pueden ser deseables vectores que dirigen la expresión de altos niveles de productos de proteínas de fusión que se purifican fácilmente. Estos vectores incluyen, pero sin limitación, el vector de expresión de *E. coli* pUR278 (Ruther y col., *EMBO J.*, 2: 1791 (1983), en el que la secuencia codificante de HCV puede unirse individualmente al vector en fase con la región codificante de lacZ de forma que se produzca una proteína de fusión; vectores pIN (Inouye & Inouye, *Nucleic Acids Res.*, 13:3101-3109 (1985); Van Heeke & Schuster, *J. Biol. Chem.*, 264:5503-5509 (1989)); y similares. También pueden usarse vectores pVEX para expresar polipéptidos extraños como proteínas de fusión con glutatión S-transferasa (GST). En general, estas proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse a partir de células lisadas por adsorción en perlas de glutatión-agarosa seguido de elución en presencia de glutatión libre. Los vectores PGEX se diseñan para incluir sitios de escisión de la proteasa de trombina o del factor Xa de forma que el producto génico diana clonado pueda liberarse del resto GST.

En un sistema de insectos, se usa el virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) como vector para expresar genes extraños. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia codificante de HCV puede clonarse individualmente en regiones no esenciales (por ejemplo, el gen de la polihedrina) del virus y ponerse bajo el control de un promotor de virus AcNPV (por ejemplo, el promotor de la polihedrina). La inserción satisfactoria de una secuencia codificante del gen de HCV dará como resultado la inactivación del gen de la polihedrina y la producción de virus recombinantes no ocluidos (es decir, el virus que carece de la cubierta proteica codificada por el gen de la polihedrina). Estos virus recombinantes después se usan para infectar células de *Spodoptera frugiperda* en las que se expresa el gen insertado. (Véase, por ejemplo, Smith y col., *J. Virol.* 46: 584

(1983); y Smith, Patente de Estados Unidos N° 4.215.051).

En células hospedadoras de mamífero, pueden utilizarse varios sistemas de expresión basados en virus. En casos en los que se usa un adenovirus como vector de expresión, la secuencia de nucleótidos de HCV de interés puede unirse a un complejo de control de la transcripción/traducción de adenovirus, por ejemplo, el promotor tardío y la secuencia líder tripartita. Este gen quimérico después puede insertarse en el genoma de adenovirus por recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción en una región no esencial del genoma viral (por ejemplo, región E1 o E3) dará como resultado un virus recombinante que es viable y capaz de expresar el producto del gen de HCV en hospedadores infectados. (Véase, por ejemplo, Logan & Shenk, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3655-3659 (1984)). También pueden requerirse señales de iniciación específicas para la traducción eficaz de secuencias de nucleótidos de HCV insertadas. Estas señales incluyen el codón de iniciación ATG y secuencias adyacentes.

Sin embargo, en casos en los que sólo se inserta una parte de la secuencia codificante de HCV, pueden proporcionarse señales de control de la traducción exógenas, incluyendo, quizás, el codón de iniciación ATG. Además, el codón de iniciación puede estar en fase con la fase de lectura de la secuencia codificante deseada para asegurar la traducción del inserto entero. Estas señales de control de la traducción exógenas y codones de iniciación pueden ser de una diversidad de orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficacia de expresión puede mejorarse por medio de la inclusión de elementos potenciadores de la transcripción apropiados, terminadores de la transcripción, etc. (Véase Bittner y col., Methods in Enzymol., 153:516-544 (1987)).

Además, puede elegirse una cepa de células hospedadoras que module la expresión de las secuencias insertadas o modifique y procese el producto génico de la forma específica deseada. Estas modificaciones (por ejemplo, glicosilación) y procesamiento (por ejemplo, escisión) de productos proteicos son importantes para la función de la proteína. Las diferentes células hospedadoras tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento postraduccional y la modificación de proteínas y productos génicos. Pueden elegirse líneas celulares o sistemas hospedadores apropiados para asegurar la modificación y el procesamiento correctos de la proteína extraña expresada. Para este fin, pueden usarse células hospedadoras eucariotas que poseen la maquinaria celular para el procesamiento apropiado del transcrito primario, glicosilación y fosforilación del producto génico. Estas células hospedadoras de mamífero incluyen, pero sin limitación, CHO, VERO, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3 y WI38.

Para la producción de alto rendimiento a largo plazo de proteínas recombinantes, se prefiere la expresión estable. Por ejemplo, pueden obtenerse por ingeniería genética líneas celulares que expresan de forma estable los péptidos de HCV descritos anteriormente. En lugar de usar vectores de expresión que contienen orígenes de replicación virales, las células hospedadoras pueden transformarse con ADN controlado por elementos de control de la expresión apropiados (por ejemplo, promotores, secuencias potenciadoras, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, etc.), y un marcador selectivo. Después de la introducción del ADN extraño, las células modificadas por ingeniería genética se dejan crecer durante 1-2 días en un medio enriquecido; y después se cambian a un medio selectivo. El marcador selectivo en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite que las células integren de forma estable el plásmido en su cromosoma y se desarrollen para formar focos que a su vez se clonan y expanden en líneas celulares. Este procedimiento se usa ventajosamente para obtener por ingeniería genética líneas celulares que expresan el producto génico de HCV.

Pueden usarse varios sistemas de selección incluyendo, pero sin limitación, los genes de la timidina quinasa del virus del herpes simple (Wigler, y col., Cell 11:223 (1977), la hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (Szybalska & Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:2026 (1962), y la adenina fosforribosiltransferasa (Lowy, y col., Cell 22:817 (1980)) en células tk⁻, hgprt⁻ o aprt⁻, respectivamente. Además, puede usarse resistencia a antimetabolitos como base de la selección para los siguientes genes: dhfr, que confiere resistencia a metotrexato (Wigler, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:3567 (1980); O'Hare, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527 (1981); gpt, que confiere resistencia al ácido micofenólico (Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072 (1981); neo, que confiere resistencia al aminoglicósido G-418 (Colberre-Garapin, y col., J. Mol. Biol. 150:1 (1981); y hygro, que confiere resistencia a higromicina (Santerre, y col., Gene 30:147 (1984)).

Como alternativa, puede purificarse fácilmente cualquier proteína de fusión utilizando un anticuerpo específico para la proteína de fusión que se expresa. Por ejemplo, un sistema descrito por Janknecht y col. permite la fácil purificación de proteínas de fusión no desnaturalizadas expresadas en líneas celulares humanas. (Janknecht, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 8972-8976 (1991)). En este sistema, el gen de interés se subclona en un plásmido de recombinación de vaccinia de tal forma que la fase de lectura abierta del gen se fusione traduccionalmente con una señal amino-terminal compuesta por seis restos de histidina. Se cargan extractos de células infectadas con el virus vaccinia recombinante en columnas de Ni²⁺-ácido nitriloacético-agarosa y se eluyen selectivamente proteínas con señal de histidina con tampones que contienen imidazol. El siguiente ejemplo describe un procedimiento que se usó para expresar los péptidos de HCV codificados por los ácidos nucleicos incorporados en las presentes

realizaciones.

EJEMPLO 13 [no ilustrativo de la presente invención]

5 Para caracterizar la proteína de fusión NS3/4A y las versiones truncadas y mutadas de la misma, las construcciones del vector, descritas en el *Ejemplo 6*, se transcribieron y tradujeron *in vitro* y los polipéptidos resultantes se visualizaron por electroforesis en gel de dodecil sulfato sódico-poliacrilamida (SDS-PAGE). La transcripción y la traducción *in vitro* se realizaron usando el sistema de lisado de reticulocitos acoplado a T7 (Promega, Madison, WI) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Todas las reacciones de traducción *in vitro* de las construcciones de expresión se realizaron a 30°C con metionina marcada con ³⁵S (Amersham International, Plc, Buckinghamshire, UK). Las proteínas marcadas se separaron en geles de SDS-PAGE al 12% y se visualizaron para exponer la película de rayos X (Hyper Film-MP, Amersham) durante 6-18 horas.

15 El análisis *in vitro* reveló que todas las proteínas se expresaban en altas cantidades a partir de sus construcciones de expresión respectivas. La construcción rNS3 (vector NS3-pVAX) produjo un solo péptido de aproximadamente 61 kDa, mientras que la construcción TPT (NS3/4A-TPT-pVAX) y la construcción RGT (NS3/4A-RGT-pVAX) produjeron un solo polipéptido de aproximadamente 67 kDa, que es idéntico al peso molecular del péptido NS3/4A no escindido producido a partir de la construcción NS3/4A-pVAX. El producto escindido producido a partir del péptido NS3/4A expresado tenía aproximadamente 61 kDa, que era idéntico en tamaño al rNS3 producido a partir del vector NS3-pVAX. Estos resultados demostraron que las construcciones de expresión eran funcionales, la construcción NS3/4A era enzimáticamente activa, el rNS3 produjo un péptido del tamaño previsto y las mutaciones TPT y RGT anularon completamente la escisión en la unión NS3-NS4A.

25 Las secuencias, construcciones, vectores, clones y otros materiales que comprenden los ácidos nucleicos de HCV y péptidos incorporados en las presentes realizaciones pueden estar en forma enriquecida o aislada. Como se usa en este documento, "enriquecida" significa que la concentración del material es al menos aproximadamente 2, 5, 10, 100 ó 1000 veces su concentración natural (por ejemplo), ventajosamente del 0,01% en peso, preferiblemente de al menos aproximadamente el 0,1% en peso. También se contemplan preparaciones enriquecidas de aproximadamente el 0,5%, 1%, 5%, 10% y 20% en peso. El término "aislado" requiere que el material se retire de su entorno original (por ejemplo, el entorno natural si se produce de forma natural). Por ejemplo, un polinucleótido natural presente en un animal vivo no está aislado, pero el mismo polinucleótido separado de alguno o todos los materiales coexistentes en el sistema natural está aislado. También es ventajoso que las secuencias estén en forma purificada. El término "purificado" no requiere la pureza absoluta; sino que pretende ser una definición relativa. Las proteínas aisladas se han purificado convencionalmente hasta la homogeneidad electroforética por tinción con Coomassie, por ejemplo. Se contempla expresamente la purificación del material de partida o el material natural en al menos un orden de magnitud, preferiblemente dos o tres órdenes y más preferiblemente cuatro o cinco órdenes de magnitud.

40 El producto del gen de HCV descrito en este documento también puede expresarse en plantas, insectos y animales para crear un organismo transgénico. Los sistemas vegetales transgénicos deseables que tienen un péptido de HCV incluyen *Arabidopsis*, maíz y *Chlamydomonas*. Los sistemas de insecto deseables que tienen un péptido de HCV incluyen, pero sin limitación, *D. melanogaster* y *C. elegans*. Pueden usarse animales de cualquier especie incluyendo, pero sin limitación, anfibios, reptiles, aves, ratones, hámsteres, ratas, conejos, cobayas, cerdos, cerdos enanos, cabras, perros, gatos y primates no humanos, por ejemplo, babuinos, monos y chimpancés, para generar animales transgénicos que tengan una molécula de HCV incorporada en las presentes realizaciones. Estos organismos transgénicos deseablemente presentan transferencia de línea germinal de los péptidos de HCV descritos en este documento.

50 Preferiblemente se usa cualquier técnica conocida en esta materia para introducir el transgen de HCV en animales para producir las líneas fundadoras de animales transgénicos o para inactivar o reemplazar genes de HCV existentes. Estas técnicas incluyen, pero sin limitación, la microinyección pronuclear (Hoppe, P. C. y Wagner, T. E., 1989, Patente de Estados Unidos N° 4.873.191); la transferencia de genes mediados por retrovirus en líneas germinales (Van der Putten y col., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 82:6148-6152 (1985); la dirección de genes en células madre embrionarias (Thompson y col., Cell 56:313-321 (1989); electroporación de embriones (Lo, Mol Cell Biol. 3: 1803-1814 (1983); y transferencia de genes mediada por esperma (Lavitrano y col., Cell 57:717-723 (1989); véase también Gordon, Transgenic Animals, Intl. Rev. Cytol. 115:171-229 (1989). La siguiente sección describe la fabricación de anticuerpos que interaccionan con los péptidos de HCV descritos en este documento.

Anticuerpos Anti-HCV

60 Después de la síntesis, expresión y aislamiento o purificación de los péptidos de HCV, el péptido aislado o purificado puede usarse para generar anticuerpos. Dependiendo del contexto, el término "anticuerpos" puede incluir

anticuerpos policlonales, monoclonales, quiméricos, monocatenarios, fragmentos Fab y fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab. Los anticuerpos que reconocen los péptidos de HCV tienen muchos usos incluyendo, pero sin limitación, aplicaciones biotecnológicas, aplicaciones terapéuticas/profilácticas y aplicaciones de diagnóstico.

5 Para la producción de anticuerpos pueden inmunizarse varios hospedadores no humanos, incluyendo cabras, conejos, ratas y ratones, por inyección con un péptido de HCV. Dependiendo de la especie de hospedador, pueden usarse diversos adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica. Estos adyuvantes incluyen, pero sin limitación, ribavirina, adyuvante de Freund, geles minerales tales como hidróxido de aluminio y sustancias tensoactivas tales como lisolecitina, polioles pluronic, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianina de lapa californiana y dinitrofenol. También son adyuvantes potencialmente útiles BCG (*Bacillus Calmette-Guerin*) y *Corynebacterium parvum*.

15 Los péptidos usados para inducir anticuerpos específicos pueden tener una secuencia de aminoácidos consistente en al menos cuatro aminoácidos, y preferiblemente de al menos 10 a 15 aminoácidos. Por medio de una estrategia, se fusionan tramos cortos de aminoácidos que codifican fragmentos de NS3/4A con los de otra proteína tal como la hemocianina de lapa californiana de tal forma que se produzca un anticuerpo contra la molécula quimérica. Además, a un animal se le administra una composición que comprende ribavirina y NS3/4A (**SEQ ID NO: 17**), un fragmento de la misma de al menos 4, 6, 8, 10, 12, 15 ó 20 aminoácidos de longitud o un ácido nucleico que codifica una o más de estas moléculas. Aunque pueden generarse anticuerpos capaces de reconocer específicamente HCV por inyección de péptidos sintéticos de 3, 10 y 15 unidades que corresponden a un péptido de HCV en ratones, puede generarse una serie más diversa de anticuerpos usando péptidos de HCV recombinantes preparados como se ha descrito anteriormente.

25 Para generar anticuerpos contra un péptido de HCV, se aísla el péptido sustancialmente puro a partir de una célula transfectada o transformada. La concentración del péptido en la preparación final se ajusta, por ejemplo, por concentración en un dispositivo de filtro Amicon, al nivel de unos pocos microorganismos/mililitro. Después pueden prepararse anticuerpos monoclonales o policlonales contra el péptido de interés como se indica a continuación:

30 Pueden prepararse anticuerpos monoclonales contra un péptido de HCV usando cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo por líneas celulares continuas en cultivo. Éstas incluyen, pero sin limitación, la técnica de hibridoma descrita originalmente por Koehler y Milstein (*Nature* 256:495-497 (1975)), la técnica de hibridoma de células B humanas (Kosbor y col. *Immunol Today* 4:72 (1983); Cote et al *Proc Natl Acad Sci* 80:2026-2030 (1983)), y la técnica de hibridoma de EBV (Cole y col. *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss Inc, New York N.Y., pág. 77-96 (1985)). Además, pueden usarse técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos", el corte y empalme de genes de anticuerpo de ratón con genes de anticuerpo humano para obtener una molécula con la especificidad antigénica y la actividad biológica apropiada. (Morrison y col. *Proc Natl Acad Sci* 81:6851-6855 (1984); Neuberger y col. *Nature* 312:604-608(1984); Takeda y col. *Nature* 314:452-454 (1985)). Como alternativa, pueden adaptarse técnicas descritas para la producción de anticuerpos monocatenarios (Patente de Estados Unidos N° 4.946.778) para producir anticuerpos monocatenarios específicos de HCV. También pueden producirse anticuerpos por inducción de la producción *in vivo* de la población de linfocitos o por selección de bibliotecas de inmunoglobulinas recombinantes o paneles de reactivos de unión de alta especificidad como es describe en Orlandi y col., *Proc Natl Acad Sci* 86: 3833-3837 (1989), y Winter G. y Milstein C; *Nature* 349:293-299 (1991).

45 También pueden generarse fragmentos de anticuerpo que contienen sitios de unión específica para un péptido de HCV. Por ejemplo, estos fragmentos incluyen, pero sin limitación, los fragmentos F(ab')₂ que pueden producirse por digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo y los fragmentos Fab que pueden generarse reduciendo los enlaces disulfuro de los fragmentos F(ab')₂. Como alternativa, pueden construirse bibliotecas de expresión de Fab para permitir una identificación rápida y fácil de fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada. (Huse W. D. y col. *Science* 256:1275-1281 (1989)).

55 Por medio de una estrategia, se preparan anticuerpos monoclonales contra un péptido de HCV como se indica a continuación. En resumen, en un ratón se inoculan repetidamente unos pocos microgramos de la proteína seleccionada o péptidos derivados de la misma durante un periodo de unas pocas semanas. Después se sacrifica el ratón y se aíslan las células productoras de anticuerpos del bazo. Las células del bazo se fusionan en presencia de polietilenglicol con células de mieloma de ratón, y las células no fusionadas sobrantes se destruyen por medio del desarrollo del sistema en un medio selectivo que comprende aminopterina (medio HAT). Las células fusionadas satisfactoriamente se diluyen y se ponen alícuotas de la dilución en pocillos de una placa de microtitulación en la que se continúa el desarrollo del cultivo. Se identifican clones productores de anticuerpo por detección de anticuerpos en el líquido sobrenadante de los pocillos por procedimientos de inmunoensayo tales como ELISA, como describió originalmente Engvall, E., *Meth. Enzymol.* 70:419 (1980), y procedimientos derivados de los

Los clones positivos seleccionados pueden expandirse y su producto de anticuerpo monoclonal puede recogerse para el uso. En Davis, L. y col. Basic Methods in Molecular Biology Elsevier, Nueva York, Sección 21-2 se describen procedimientos detallados para la producción de anticuerpos monoclonales.

5 Pueden prepararse antisueros policlonales que contienen anticuerpos contra epitopos heterogéneos de una sola proteína por inmunización de animales adecuados con la proteína expresada o péptidos derivados de la misma como se ha descrito anteriormente, que pueden estar sin modificar o modificados para aumentar la inmunogenicidad. La producción eficaz de anticuerpos policlonales se ve afectada por muchos factores relacionados tanto con el antígeno como con la especie hospedadora. Por ejemplo, las moléculas pequeñas tienden a ser menos inmunogénicas que otras y pueden requerir el uso de vehículos y adyuvantes. Además, los animales hospedadores varían en respuesta al sitio de las inoculaciones y la dosis, dando las dosis inadecuadas o excesivas de antígeno un antisuero de bajo título. Lo más fiable parece ser administrar pequeñas dosis (del nivel de ng) de antígeno en múltiples sitios intradérmicos. Puede encontrarse un protocolo de inmunización eficaz para conejos en Vaitukaitis, J. y col. J. Clin. Endocrinol. Metab. 33:988-991 (1971).

15 Se administran inyecciones de refuerzo a intervalos regulares y se recoge el antisuero cuando empieza a reducirse su título de anticuerpo, determinado semicuantitativamente, por ejemplo, por inmunodifusión doble en agar contra concentraciones conocidas del antígeno. Véase, por ejemplo, Ouchterlony, O. y col., Capítulo 19 en: Handbook of Experimental Immunology D. Wier (ed) Blackwell (1973). La concentración estacionaria de anticuerpo normalmente está en el intervalo de 0,1 a 0,2 mg/ml de suero (aproximadamente 12 μ M). La afinidad del antisuero por el antígeno se determina preparando curvas de unión competitiva, como se describe, por ejemplo, por Fisher, D., Capítulo 42 en: Manual of Clinical Immunology, 2ª Ed. (Rose y Friedman, Eds.) Amer. Soc. For Microbiol., Washington, D.C. (1980)). Las preparaciones de anticuerpo preparadas de acuerdo con cualquier protocolo son útiles en inmunoensayos cuantitativos que determinan las concentraciones de sustancias que llevan antígeno en muestras biológicas; también se usan semicuantitativa o cualitativamente (por ejemplo, en realizaciones de diagnóstico que identifican la presencia de HCV en muestras biológicas). La sección proporcionada a continuación describe con más detalle algunas de las realizaciones de diagnóstico.

30 *Diagnósticos*

En general, los diagnósticos se clasifican de acuerdo con si se usa un ensayo basado en ácido nucleico o en proteínas. Algunos ensayos de diagnóstico detectan la presencia o ausencia de una secuencia de ácido nucleico de HCV incorporada en las realizaciones de la presente invención en una muestra obtenida a partir de un paciente, mientras que otros ensayos pretenden identificar si un péptido de HCV incorporado en las realizaciones de la presente invención está presente en una muestra biológica obtenida a partir de un paciente. Además, también se incorpora en las realizaciones de la presente invención la fabricación de kits que incorporan los reactivos y procedimientos descritos en este documento que permiten la rápida detección e identificación de HCV. Estos kits de diagnóstico pueden incluir, por ejemplo, una sonda de ácido nucleico o anticuerpo incorporado, que detecta específicamente HCV. El componente de detección de estos kits típicamente se suministrará en combinación con uno o más de los siguientes reactivos. A menudo se proporcionará un soporte capaz de absorber o unirse de otra manera al ADN, al ARN o las proteínas. Los soportes disponibles incluyen membranas de nitrocelulosa, nylon, o nylon modificado que puede caracterizarse por llevar una serie de sustituyentes cargados positivamente. En estos kits pueden suministrarse una o más enzimas de restricción, reactivos de control, tampones, enzimas de amplificación y polinucleótidos no humanos tales como ADN de timo de ternero o ADN de esperma de salmón.

45 Los diagnósticos basados en ácidos nucleicos útiles incluyen, pero sin limitación, secuenciación directa de ADN, análisis de transferencia de Southern, análisis dot blot, amplificación de ácidos nucleicos y combinaciones de estas estrategias. El punto de partida para estos análisis es un ácido nucleico aislado o purificado a partir de una muestra biológica obtenida de un paciente que se sospecha que ha contraído HCV o un paciente con riesgo de contraer HCV. El ácido nucleico se extrae de la muestra y puede amplificarse por RT-PCR y/o amplificación de ADN usando cebadores que corresponden a regiones que flanquean las secuencias de ácido nucleico de HCV incorporadas en las realizaciones de la presente invención (por ejemplo, NS3/4A (**SEQ ID NO: 16**)).

55 Se unen sondas de ácido nucleico que hibridan específicamente con secuencias de HCV a un soporte en una serie ordenada, donde las sondas de ácido nucleico se unen a regiones distintas del soporte que no solapan entre sí. Preferiblemente, esta serie ordenada se denomina "dirigible" cuando se registran las distintas localizaciones de la sonda y puede accederse a ellas como parte de un procedimiento de ensayo. Estas sondas se unen a un soporte en diferentes localizaciones conocidas. El conocimiento de la localización precisa de cada sonda de ácido nucleico hace que estas series "dirigibles" sean particularmente útiles en ensayos de unión. Los ácidos nucleicos procedentes de una preparación de varias muestras biológicas después se marcan por estrategias convencionales (por ejemplo, radiactividad o fluorescencia) y las muestras marcadas se aplican a la serie en condiciones que permiten la hibridación.

Si un ácido nucleico presente en las muestras hibrida con una sonda de la serie, entonces se detectará una señal en una posición del soporte que corresponda a la localización del híbrido. Como se conoce la identidad de cada muestra marcada y la región del soporte en el que se aplicó la muestra marcada, puede realizarse rápidamente una identificación de la presencia de la variante polimórfica. Estas estrategias se automatizan fácilmente usando la tecnología conocida para los expertos en la materia de análisis de detección o diagnóstico de alto rendimiento.

Además, puede emplearse una estrategia opuesta a la presentada anteriormente. Los ácidos nucleicos presentes en las muestras biológicas pueden disponerse en un soporte para crear una serie dirigible. Preferiblemente, las muestras se disponen en el soporte en posiciones conocidas que no solapan. La presencia de ácidos nucleicos de HCV en cada muestra se determina aplicando sondas de ácido nucleico marcadas que complementan ácidos nucleicos que codifican péptidos de HCV, en localizaciones de la serie que corresponden a las posiciones en las que se dispusieron las muestras biológicas. Como se conoce la identidad de la muestra biológica y su posición en la serie, puede realizarse rápidamente la identificación de un paciente que se ha infectado con HCV. Estas estrategias también se automatizan fácilmente usando la tecnología conocida para los expertos en la materia de análisis de diagnóstico de alto rendimiento.

Puede emplearse cualquier tecnología de series dirigibles conocida en la técnica. Una realización particular de la series polinucleotídicas se conoce como GenechipsTM, y se ha descrito, en general, en la Patente de Estados Unidos 5.143.854; y en las Publicaciones PCT WO 90/15070 y 92/10092. Estas series generalmente se producen usando procedimientos de síntesis mecánicos o procedimientos de síntesis dirigida por luz, que incorporan una combinación de procedimientos fotolitográficos y síntesis de oligonucleótidos en fase sólida. (Fodor y col., Science, 251:767-777, (1991)). La inmovilización de series de oligonucleótidos en soportes sólidos se ha hecho posible por medio del desarrollo de una tecnología identificada en general como "Very Large Scale Immobilized Polymer Synthesis" (VLSPISTM) (Síntesis en Polímeros Inmovilizados a Escala muy Grande) en la que, típicamente, se inmovilizan sondas en una serie de alta densidad en una superficie sólida de un chip. En las Patentes de Estados Unidos 5.143.854 y 5.412.087, y en las Publicaciones PCT WO 90/15070, WO 92/10092 y WO 95/11995, se proporcionan ejemplos de tecnologías VLSPISTM que describen procedimientos para formar series de oligonucleótidos por medio de técnicas tales como técnicas de síntesis dirigidas por luz. Para diseñar estrategias destinadas a proporcionar series de nucleótidos inmovilizados en soporte sólidos, se desarrollaron otras estrategias de presentación para ordenar y presentar las series de oligonucleótidos en los chips con la intención de maximizar los patrones de hibridación y la información de diagnóstico. Se describen ejemplos de estas estrategias de presentación en las Publicaciones PCT WO 94/12305, WO 94/11530, WO 97/29212 y WO 97/31256.

Los expertos en la materia conocen una amplia diversidad de marcadores y técnicas de conjugación y éstos pueden usarse en diversos ensayos de ácidos nucleicos. Hay varias formas de producir ácidos nucleicos marcados para la hibridación o PCR incluyendo, pero sin limitación, oligomarcaje, desplazamiento de mella, marcaje terminal o amplificación por PCR usando un nucleótido marcado. Como alternativa, un ácido nucleico que codifica un péptido de HCV puede clonarse en un vector para la producción de una sonda de ARNm. Estos vectores se conocen en la técnica, están disponibles en el mercado y pueden usarse para sintetizar sondas de ARN *in vitro* por medio de la adición de una ARN polimerasa apropiada tal como T7, T3 o SP6 y nucleótidos marcados. Varias compañías tales como Pharmacia Biotech (Piscataway N.J.), Promega (Madison Wis.), y U.S. Biochemical Corp (Cleveland, Ohio) suministran kits comerciales y protocolos para usar estos procedimientos. Las moléculas indicadoras o marcadores adecuados incluyen los radionúclidos, enzimas, agentes fluorescentes, quimioluminiscentes o cromogénicos, así como sustratos, cofactores, inhibidores, partículas magnéticas y similares.

La presencia de un péptido de HCV en una muestra proteica obtenida a partir de un paciente puede detectarse usando ensayos convencionales o mediante medios dados a conocer en este documento. Por ejemplo, pueden usarse anticuerpos que son inmunorreactivos con los péptidos de HCV descritos para seleccionar muestras biológicas con respecto a la presencia de una infección por HCV. Se usan anticuerpos que son reactivos con los péptidos de HCV incorporados en las realizaciones de la presente invención para inmunoprecipitar los péptidos de HCV descritos a partir de muestras biológicas, o se usan para reaccionar con proteínas obtenidas a partir de una muestra biológica en transferencias de Western o inmunotransferencias. Las realizaciones de diagnóstico preferidas también incluyen ensayos de inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), radioinmunoensayos (RIA), ensayos inmunoradiométricos (IRMA) y ensayos inmunoenzimáticos (IEMA), incluyendo ensayos de sándwich que usan anticuerpos monoclonales y/o policlonales específicos para los péptidos de HCV descritos. David y col. describen ensayos de sándwich ilustrativos en las Patentes de Estados Unidos N° 4.376.110 y 4.486.530. Otras realizaciones emplean aspectos de la tecnología de tiras inmunes descrita en las Patentes de Estados Unidos N° 5.290.678; 5.604.105; 5.710.008; 5.744.358; y 5.747.274.

En otro diagnóstico basado en proteínas, los anticuerpos descritos en este documento se unen a un soporte en una serie ordenada, donde una pluralidad de anticuerpos se unen a distintas regiones del soporte que no solapan entre

sí. Como ocurre con las series basadas en ácidos nucleicos, las series basadas en proteínas son series ordenadas que están diseñadas para ser “dirigibles” de tal forma que las distintas localizaciones se registren y pueda accederse a ellas como parte de un procedimiento de ensayo. Estas sondas se unen a un soporte en diferentes localizaciones conocidas. El conocimiento de la localización precisa de cada sonda hace que estas series “dirigibles” sea particularmente útil en ensayos de unión. Por ejemplo, una serie dirigible puede comprender un soporte que tiene varias regiones a las que se une una pluralidad de sondas de anticuerpo que reconocen específicamente los péptidos de HCV presentes en una muestra biológica y diferencian el isotipo de HCV identificado aquí.

Por medio de una estrategia, se obtienen proteínas a partir de muestras biológicas y después se marcan por estrategias convencionales (por ejemplo, por radiactividad, colorimetría o fluorescencia). Las muestras marcadas después se aplican a la serie en condiciones que permiten la unión. Si una proteína de la muestra se une a una sonda de anticuerpo de la serie, entonces se detectará una señal en la posición del soporte que corresponde a la localización del complejo anticuerpo-proteína. Como se conoce la identidad de cada muestra marcada y se conoce la región del soporte en la que se aplicó la muestra marcada, puede realizarse rápidamente una identificación de la presencia, concentración y/o nivel de expresión. Es decir, empleando patrones marcados de una concentración conocida de péptido de HCV, un investigador puede determinar de forma precisa la concentración de proteína del péptido particular en una muestra ensayada y también puede evaluar el nivel de expresión del péptido de HCV. También pueden usarse procedimientos convencionales en densitometría para determinar de forma más precisa la concentración o nivel de expresión del péptido de HCV. Estas estrategias se automatizan fácilmente usando la tecnología conocida para los expertos en la materia del análisis de diagnóstico de alto rendimiento.

Puede emplearse una estrategia opuesta a la presentada anteriormente. Las proteínas presentes en muestra biológicas pueden disponerse en un soporte para crear una serie dirigible. Preferiblemente, las muestras de proteínas se disponen en el soporte en posiciones conocidas que no solapan. Después se determina la presencia de un péptido de HCV en cada muestra aplicando sondas de anticuerpo marcadas que reconocen epitopos específicos para el péptido de HCV. Como se conoce la identidad de la muestra biológica y su posición en la serie, puede realizarse rápidamente una identificación de la presencia, concentración y/o nivel de expresión de un péptido de HCV.

Es decir, empleando patrones marcados de una concentración conocida de un péptido de HCV, un investigador puede determinar de forma precisa la concentración de péptido en una muestra y, a partir de esta información, puede evaluar el nivel de expresión del péptido. También pueden usarse procedimientos convencionales en densitometría para determinar de forma más precisa la concentración o nivel de expresión del péptido de HCV. Estas estrategias también se automatizan fácilmente usando tecnologías conocidas para los expertos en la materia del análisis de diagnóstico de alto rendimiento. Como se ha detallado anteriormente, puede emplearse cualquier tecnología de series dirigibles conocida en la técnica. La siguiente sección describe algunas de las composiciones que pueden tener uno o más de los ácidos nucleicos de HCV o péptidos de HCV incorporados en las realizaciones de la presente invención.

Composiciones que comprenden los ácidos nucleicos o péptidos de HCV incorporados en las presentes realizaciones.

Al menos uno de los ácidos nucleicos o péptidos de HCV puede estar unido a un soporte. Preferiblemente, estos soportes se fabrican para crear un agente multimérico. Estos agentes multiméricos proporcionan el péptido o ácido nucleico de HCV de tal manera que se consiga una afinidad suficiente con la molécula. Un agente multimérico que tiene un ácido nucleico o péptido de HCV puede obtenerse uniendo la molécula deseada a un soporte macromolecular. Puede calificarse de “soporte” un vehículo, una proteína, una resina, una membrana celular o cualquier estructura macromolecular usada para unir o inmovilizar estas moléculas. Los soportes sólidos incluyen, pero sin limitación, las paredes de los pocillos de una bandeja de reacción, tubos de ensayo, perlas de poliestireno, perlas magnéticas, tiras de nitrocelulosa, membranas, microparticulas tales como partículas de látex, células animales, Duracyte®, células artificiales y otras. Un ácido nucleico o péptido de HCV también puede unirse a vehículos inorgánicos tales como material de óxido de silicio (por ejemplo, silicagel, zeolita, tierra de diatomeas o vidrio aminado) por ejemplo, por medio de un enlace covalente a través de un grupo hidroxilo, carboxilo o amino y un grupo reactivo en el vehículo.

En varios agentes multiméricos, el soporte macromolecular tiene una superficie hidrófoba que interacciona con una parte del ácido nucleico o péptido de HCV por medio de una interacción no covalente hidrófoba. En algunos casos, la superficie hidrófoba del soporte es un polímero tal como un plástico o cualquier otro polímero en el que se han unido grupos hidrófobos tales como poliestireno, polietileno o polivinilo. Además, el ácido nucleico o péptido de HCV puede unirse covalentemente a vehículos que incluyen proteínas y oligo/polisacáridos (por ejemplo, celulosa, almidón, glucógeno, quitosano o sefarsa aminada). En estos últimos agentes multiméricos se usa un grupo

reactivo en la molécula, tal como un grupo hidroxilo o amino, para la unión a un grupo reactivo en el soporte para crear un enlace covalente. Otros agentes multiméricos adicionales comprenden un soporte que tiene otros grupos reactivos que están químicamente activados para unirse al ácido nucleico o péptido de HCV. Por ejemplo, se usan matrices activadas con bromuro de cianógeno, matrices activadas con epoxi, geles de tio y tiopropilo, enlaces de cloroformiato de nitrofenilo y cloroformiato de N-hidroxi succinimida, o soportes acrílicos de oxirano. (Sigma).

Deseablemente, los vehículos para uso en el cuerpo (por ejemplo, para aplicaciones profilácticas o terapéuticas) son fisiológicos, no tóxicos y preferiblemente no generan respuestas inmunes. Los vehículos adecuados para uso en el cuerpo incluyen poli-L-lisina, poli-D,L-alanina, liposomas y Chromosorb® (Johns-Manville Products, Denver Co.). Se ha ensayado Chromosorb® conjugado con ligando (Synsorb-Pk) en seres humanos para la prevención del síndrome hemolítico-urémico y se ha notificado que no presenta reacciones adversas. (Armstrong y col. J. Infectious Diseases 171:1042-1045 (1995)). Para algunas realizaciones, se administra un vehículo "desnudo" (es decir, que carece de un ácido nucleico o un péptido de HCV unido) que tiene la capacidad de unirse a un ácido nucleico o un péptido de HCV en el cuerpo de un organismo. Por medio de esta estrategia, se prevé una terapia de tipo "pro-fármaco" en la que el vehículo desnudo se administra por separado del ácido nucleico o péptido de HCV y, una vez que los dos están en el cuerpo del organismo, el vehículo y el ácido nucleico o péptido de HCV se ensamblan formando un complejo multimérico.

También se contempla la inserción de enlazadores, tales como enlazadores (por ejemplo "enlazadores λ " obtenidos por ingeniería genética para que se parezcan a las regiones flexibles del fago λ) de una longitud apropiada entre el ácido nucleico o péptido de HCV y el soporte, para mejorar la flexibilidad del péptido de HCV, híbrido o molécula de unión y de esta manera solucionar cualquier impedimento estérico que pueda presentar el soporte. La determinación de una longitud apropiada de enlazador que permita una respuesta celular óptima o la ausencia de la misma puede realizarse seleccionando el ácido nucleico o péptido de HCV con enlazadores variable en los ensayos detallados en la presente descripción.

También se prevé un soporte compuesto que comprende más de un tipo de ácido nucleico o péptido de HCV. Un "soporte compuesto" puede ser un vehículo, una resina o cualquier estructura macromolecular usada para unir o inmovilizar dos o más ácidos nucleicos o péptidos de HCV diferentes. Como se ha indicado anteriormente, también se contempla la inserción de enlazadores, tales como el enlazador λ , de una longitud apropiada entre el ácido nucleico o péptido de HCV y el soporte, para aumentar la flexibilidad en la molécula y de esta manera solucionar cualquier impedimento estérico que se pudiera producir. La determinación de una longitud de enlazador apropiada que permita una respuesta celular óptima o su ausencia puede determinarse seleccionando el ácido nucleico o péptido de HCV con enlazadores variables en los ensayos detallados en la presente descripción.

Los soportes multiméricos y compuestos descritos anteriormente pueden tener unidos ácidos nucleicos o péptidos de HCV multimerizados para crear "soportes multiméricos multimerizados" y "soportes compuestos multimerizados", respectivamente. Un ligando multimerizado puede obtenerse, por ejemplo, por medio del acoplamiento de dos o más ácidos nucleicos o péptidos de HCV en tándem usando técnicas convencionales en biología molecular. La forma multimerizada del ácido nucleico o péptido de HCV puede ser ventajosa para muchas aplicaciones debido, por ejemplo, a la capacidad de obtener un agente con mayor afinidad. También puede ser ventajosa para algunas realizaciones la incorporación de enlazadores o espaciadores, tales como enlazadores λ flexibles, entre los dominios individuales que constituyen el agente multimerizado. La inserción de enlazadores λ de una longitud apropiada entre dominios de unión a proteínas, por ejemplo, puede mejorar la flexibilidad en la molécula y puede solucionar el impedimento estérico. De manera similar, la inserción de enlazadores entre el ácido nucleico o péptido de HCV multimerizado y el soporte puede aumentar la flexibilidad y aumentar el impedimento estérico presentado por el soporte. La determinación de una longitud de enlazador apropiada puede determinarse usando los ácidos nucleicos o péptidos de HCV en los ensayos detallados en esta descripción.

La divulgación incluye vacunas genéticas como se ha descrito anteriormente. Estas composiciones contienen ribavirina y un ácido nucleico que codifica NS3/4A (SEQ ID NO: 17), NS3 (SEQ ID NO: 29), o un mutante (por ejemplo, SEQ ID NO: 30-32 y 43-49) o un fragmento del mismo (por ejemplo, SEQ ID NO: 25-27 y 33-42). El siguiente ejemplo describe la preparación de una vacuna genética adecuada para uso en seres humanos.

EJEMPLO 14

Se diseña un plásmido de expresión de HCV para expresar el péptido NS3/4A. La secuencia codificante de NS3/4A de NS3/4A-pVAX se retira por digestión con *EcoRI* y *XbaI* y el fragmento aislado se inserta en el plásmido A para que esté bajo el control transcripcional del promotor de CMV y el elemento potenciador de RSV. (Véase la Patente de Estados Unidos N° 6.235.888 de Pachuk, y col.). El esqueleto del plásmido A tiene una longitud de 3969 pares de bases; contiene un origen de replicación de PBR para la replicación en *E. coli* y un gen de resistencia a kanamicina. En una región polienlazadora se clonan insertos tales como NS3/4A, poniendo el inserto entre y preferiblemente

unido al promotor y a la señal de poliadenilación. La transcripción de los insertos clonados está bajo el control del promotor de CMV y los elementos potenciadores de RSV. La señal de poliadenilación se proporciona por la presencia de una señal de poli A de SV40 situada justo en la posición 3' del sitio de clonación. Después se obtiene una composición de vacuna que contiene NS3/4A mezclando 500 µg de la construcción rNS3/4A con un 1 mg de ribavirina.

Dicha composición de vacuna puede usarse para inducir anticuerpos en un mamífero (por ejemplo, ratones o conejos) o puede inyectarse por vía intramuscular en un ser humano para inducir anticuerpos, preferiblemente un ser humano que está infectado de forma crónica con el virus de HCV. El destinatario preferiblemente también recibe tres refuerzos de inmunización de la mezcla a intervalos de cuatro semanas. Por medio del tercer refuerzo, el título de anticuerpo específico para HCV aumentará significativamente. Además, en este momento, dicho sujeto experimentará una mayor respuesta inmune mediada por anticuerpos y por células T contra NS3, como se demuestra por una mayor fracción de anticuerpos específicos de NS3 detectados por EIA, y una reducción en la carga viral detectada RT-PCR.

Se dan a conocer en el presente documento proteínas de fusión NS3/4A o ácidos nucleicos que codifican estas moléculas. La producción y la purificación de la proteína recombinante pueden facilitarse por medio de la adición de aminoácidos auxiliares para formar "una señal". Estas señales incluyen, pero sin limitación, His-6, Flag, Myc y GST. Las señales pueden añadirse al extremo C, al extremo N o dentro de la secuencia de aminoácidos de NS3/4A. Otros aspectos de la divulgación incluyen proteínas de fusión NS3/4A con truncamientos amino o carboxi terminales, o deleciones internas, o con secuencias polipeptídicas adicionales añadidas a los extremos amino o carboxi terminales, o añadidas internamente. Otros aspectos incluyen proteínas de fusión NS3/4A, o versiones truncadas o mutadas de las mismas, donde se han sustituido los restos del sitio de escisión proteolítica de NS3/4A. Estas sustituciones incluyen, pero sin limitación, secuencias en las que el sitio P1' es una Ser, Gly o Pro, o la posición P1 es una Arg, o donde la secuencia P8 a P4' es Ser-Ala-Asp-Leu-Glu-Val-Val-Thr-Ser-Thr-Trp-Val (**SEQ ID NO: 28**).

Otros aspectos se refieren a un inmunógeno que comprende la proteína de fusión NS3/4A, o una versión truncada o modificada de la misma, capaz de inducir una respuesta inmune mejorada contra NS3. El inmunógeno puede proporcionarse en una forma sustancialmente purificada, lo que significa que el inmunógeno se ha liberado sustancialmente de otras proteínas, lípidos, carbohidratos u otros compuestos con los que está asociado naturalmente. Se realiza la divulgación de composiciones de vacuna que comprenden la proteína de fusión NS3/4A (**SEQ ID NO: 17**) o una versión truncada o mutada de la misma (por ejemplo, **SEQ ID NO: 29-32** y **43-49**) o un fragmento de la misma (por ejemplo, **SEQ ID NO: 25-27** y **33-42**), y un adyuvante, tal como ribavirina. El siguiente ejemplo describe una estrategia para preparar una composición de vacuna que comprende la proteína de fusión NS3/4A y un adyuvante.

EJEMPLO 15

Para generar una construcción NS3/4A con señal, la secuencia codificante de NS3/4A de NS3/4A-pVAX se retira por digestión con *EcoRI* y *XbaI*, y el fragmento aislado se inserta en un vector Xpress (Invitrogen). El vector Xpress permite la producción de una proteína de fusión recombinante que tiene un péptido líder N-terminal corto que tiene una alta afinidad por cationes divalentes. Usando una resina quelante de níquel (Invitrogen), la proteína recombinante puede purificarse en una etapa y el líder puede retirarse posteriormente por escisión con enteroquinasa. Un vector preferido es el pBlueBacHis2 Xpress. El vector pBlueBacHis2 Xpress es un vector de expresión de Baculovirus que contiene un sitio de clonación múltiple, un gen de resistencia a ampicilina y un gen *lac Z*. Por consiguiente, el fragmento de amplificación digerido se clona en el vector pBlueBacHis2 Xpress y se infectan células SF9. La proteína de expresión después se aísla o purifica de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después se prepara una composición de vacuna que contiene NS3/4A mezclando 100 µg del rNS3/4A con 1 mg de ribavirina.

Dicha composición de vacuna puede usarse para inducir anticuerpos en un mamífero (por ejemplo, ratones o conejos) o puede inyectarse por vía intramuscular en un ser humano para inducir anticuerpos, preferiblemente un ser humano que esté infectado de manera crónica con el virus de HCV. El receptor preferiblemente recibe tres refuerzos de inmunización de la mezcla a intervalos de 4 semanas. Por medio del tercer refuerzo, aumentará significativamente el título de anticuerpo específico para HCV. Además, en este momento, dicho sujeto experimentará una mayor respuesta inmune mediada por anticuerpos y por células T contra NS3, como se demuestra por una mayor fracción de anticuerpos específicos de NS3 detectados por EIA, y una reducción en la carga viral como se detecta por RT-PCR. La siguiente sección proporciona más explicación con respecto a los procedimientos de uso de las composiciones descritas en este documento.

Procedimientos para usar composiciones que comprenden ribavirina y un antígeno

Las rutas de la administración de las vacunas descritas en este documento incluyen, pero sin limitación, transdérmica, parenteral, gastrointestinal, transbronquial y transalveolar. La administración transdérmica puede conseguirse por aplicación de una crema, aclarado, gel u otro compuesto que permita que la ribavirina y el antígeno penetren a través de la piel. Las vías de administración parenteral incluyen, pero sin limitación, inyección eléctrica o directa tal como inyección directa en una línea venosa central, inyección intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intradérmica o subcutánea. Las vías de administración gastrointestinales incluyen, pero sin limitación, la vía por ingestión y rectal. Las vías de administración transbronquial y transalveolar incluyen, pero sin limitación, inhalación a través de la boca o por vía intranasal.

Las composiciones que tienen ribavirina y un antígeno que son adecuadas para la administración transdérmica incluyen, pero sin limitación, suspensiones, aceites, cremas y pomadas farmacéuticamente aceptables aplicadas directamente en la piel o incorporadas en un vehículo protector tal como un dispositivo transdérmico ("parche transdérmico"). Pueden encontrarse ejemplos de cremas, pomadas, etc. adecuadas, por ejemplo, en el Physician's Desk Reference. Por ejemplo, se describen ejemplos de dispositivos transdérmicos adecuados en la Patente de Estados Unidos N° 4.818.540, expedida el 4 de abril de 1989 a Chinen, y col.

Las composiciones que tienen ribavirina y un antígeno que son adecuadas para administración parenteral incluyen, pero sin limitación, soluciones isotónicas estériles farmacéuticamente aceptables. Estas soluciones incluyen, pero sin limitación, solución salina, solución salina tamponada con fosfato y preparaciones oleosas para inyección en una línea venosa central, inyección intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intradérmica o subcutánea.

Las composiciones que tienen ribavirina y un antígeno que son adecuadas para administración transbronquial y transalveolar incluyen, pero sin limitación, diversos tipos de aerosoles para inhalación. También son realizaciones dispositivos adecuados para la administración transbronquial y transalveolar de estas composiciones. Estos dispositivos incluyen, pero sin limitación, atomizadores y vaporizadores. Muchas formas de atomizadores y vaporizadores disponibles actualmente pueden adaptarse fácilmente para administrar vacunas que tienen ribavirina y un antígeno.

Las composiciones que tienen ribavirina y un antígeno que son adecuadas para la administración gastrointestinal incluyen, pero sin limitación, polvos, píldoras o líquidos farmacéuticamente aceptables para ingestión y supositorios para administración rectal.

Las construcciones génicas descritas en este documento, en particular, pueden administrarse por medios que incluyen, pero sin limitación, jeringas tradicionales, dispositivos de inyección sin agujas o "pistolas génicas de bombardeo de microproyectiles". Como alternativa, la vacuna génica puede introducirse por varios medios en células que se extraen del individuo. Estos medios incluyen, por ejemplo, transfección *ex vivo*, electroporación, microinyección y bombardeo de microproyectiles. Después de que la construcción génica se haya captado por las células, se reimplantan en el individuo. Se contempla que células de otra manera no inmunogénicas que tienen construcciones génicas incorporadas pueden implantarse en el individuo incluso si las células vacunadas se extrajeron originalmente de otro individuo.

De acuerdo con algunos aspectos de la divulgación, la construcción génica se administra a un individuo usando un dispositivo de inyección sin aguja. De acuerdo con algunas realizaciones, la construcción génica se administra simultáneamente a un individuo por vía intradérmica, subcutánea e intramuscular usando un dispositivo de inyección sin aguja. Los dispositivos de inyección sin aguja son bien conocidos y están ampliamente disponibles. Una persona con experiencia en la materia puede, siguiendo las enseñanzas del presente documento, usar dispositivos de inyección sin agujas para administrar material genético a las células de un individuo. Los dispositivos de inyección sin agujas son adecuados para administrar material genético a todos los tejidos. Son particularmente útiles para administrar material genético a la piel y a células musculares. En algunos aspectos, puede usarse un dispositivo de inyección sin aguja para empujar un líquido que contiene moléculas de ADN hacia la superficie de la piel del individuo. El líquido se empuja a una velocidad suficiente para que, después del impacto con la piel, el líquido atraviese la superficie de la piel, se infiltre a través de la piel y llegue al tejido muscular por debajo de ésta. De esta manera, el material genético se administra de forma simultánea por vía intradérmica, subcutánea e intramuscular. En algunos aspectos, puede usarse un dispositivo de inyección sin aguja para administrar un material genético en un tejido de otros órganos para introducir una molécula de ácido nucleico en las células de ese órgano.

Las vacunas que contienen ribavirina y un antígeno pueden usarse para tratar y prevenir un amplio espectro de enfermedades y pueden aumentar la respuesta inmune de un animal a un antígeno. Como apreciará un experto en la materia, se han administrado vacunas convencionales a sujetos que necesitan tratamiento o prevención de enfermedades bacterianas, enfermedades víricas, enfermedades fúngicas y cánceres. Como las vacunas descritas en el presente documento incluyen vacunas convencionales que se han modificado por la adición de ribavirina, los procedimientos descritos en el presente documento incluyen el tratamiento y prevención de una enfermedad usando

una vacuna que comprende un antígeno y ribavirina.

Los aspectos dados a conocer preferidos se refieren a procedimientos para tratar o prevenir una infección de hepatitis. En estos aspectos, a un animal que lo necesita se le proporciona un antígeno de hepatitis (un antígeno peptídico o un antígeno basado en ácidos nucleicos) y una cantidad de ribavirina suficiente para presentar una actividad adyuvante en dicho animal. Por consiguiente, un animal podría identificarse como uno que lo necesita por medio del uso de ensayos de diagnóstico disponibles actualmente o evaluación clínica. La serie de antígenos de virus de la hepatitis que pueden usarse con estas realizaciones es diversa. Los antígenos de virus de la hepatitis preferidos incluyen un antígeno de HBV, un antígeno de HAV, un antígeno de HCV, ácidos nucleicos que codifican estos antígenos o cualquier combinación de los mismos. Las realizaciones muy preferidas incluyen un antígeno de HBV seleccionado entre el grupo compuesto por el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg), el antígeno nuclear de hepatitis (HBcAg), y el antígeno e de la hepatitis (HBeAg), en particular, los antígenos basados en ácidos nucleicos y peptídicos descritos anteriormente. La ribavirina y el antígeno pueden proporcionarse por separado o en combinación, y también pueden proporcionarse otros adyuvantes (por ejemplo, aceite, alumbre u otros agentes que aumentan la respuesta inmune) al animal que lo necesita. De esta manera, las realizaciones preferidas incluyen procedimientos para tratar o prevenir la hepatitis en un animal (por ejemplo, HBV) identificando a un animal infectado o un animal con riesgo de infección y proporcionando a dicho animal un antígeno de hepatitis (por ejemplo, HBsAg, HBcAg y HBeAg) y una cantidad de ribavirina suficiente para presentar actividad adyuvante.

Otros aspectos dados a conocer incluyen procedimientos para aumentar una respuesta inmune a un antígeno proporcionando a un animal que lo necesita una cantidad de ribavirina que es eficaz para mejorar dicha respuesta inmune. En estos aspectos, se identifica a un animal que necesita una mayor respuesta inmune a un antígeno por medio del uso de ensayos de diagnóstico o evaluación clínica disponibles actualmente. A menudo, estos individuos padecerán una enfermedad (por ejemplo, bacteriana, fúngica, por mohos, viral o cáncer) o tienen riesgo de contraer la enfermedad. Sin embargo, un animal que necesita una mayor respuesta inmune puede ser un animal que se ha envenenado (por ejemplo, al ser picado por un insecto o animal venenoso) o que se ha expuesto a una toxina u otro compuesto tóxico. Una vez identificados, a estos animales se les proporciona un antígeno apropiado y una cantidad de ribavirina eficaz para aumentar la respuesta inmune en el animal.

Como se ha indicado anteriormente, los antígenos del virus de la hepatitis que pueden usarse con estos aspectos de la divulgación incluyen, pero sin limitación, un antígeno de HBV, un antígeno de HAV, un antígeno de HCV, un ácido nucleico que codifica estas moléculas o cualquier combinación de los mismos. Los aspectos muy preferidos incluyen un antígeno de HBV seleccionado entre el grupo compuesto por el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg), el antígeno nuclear de hepatitis (HBcAg) y el antígeno e de la hepatitis (HBeAg), en particular, los antígenos basados en ácidos nucleicos y péptidos descritos anteriormente. El antígeno y la ribavirina pueden proporcionarse por separado o en combinación, y también pueden proporcionarse otros adyuvantes (por ejemplo, aceite, alumbre u otros agentes que aumentan una respuesta inmune) al animal que lo necesita. De esta manera, los aspectos preferidos incluyen procedimientos para aumentar una respuesta inmune a un antígeno de hepatitis (por ejemplo, HBV) identificando a un animal que lo necesita y proporcionando al animal un antígeno de hepatitis (por ejemplo, HBsAg, HBcAg y HBeAg) y una cantidad de ribavirina que es eficaz para aumentar la respuesta inmune en el animal.

Por medio de una estrategia, por ejemplo, a un individuo no infectado se le proporcionan las composiciones de vacuna mencionadas anteriormente en una cantidad suficiente para inducir una respuesta inmune celular y humoral a NS3, para proteger a dicho individuo de la infección por HCV. En otro aspecto, se identifica un individuo infectado por HCV y se le proporciona una composición de vacuna que comprende ribavirina y NS3 en una cantidad suficiente para aumentar la respuesta inmune celular y humoral contra NS3 para reducir o eliminar la infección por HCV. Dicho individuo puede estar en fase crónica o aguda de la infección. En aún otro aspecto, a un individuo infectado con HCV que padece HCC se le proporciona una composición que comprende ribavirina y el gen de fusión NS3/4A en una cantidad suficiente para inducir una respuesta inmune celular y humoral contra células tumorales que expresan NS3.

La divulgación realizada en el presente documento puede caracterizarse por los siguientes puntos:

1. Una composición que comprende ribavirina y el ácido nucleico de la SEQ ID NO 16.
2. Una composición que comprende ribavirina y el péptido de la SEQ ID NO 17.
3. Una composición que comprende ribavirina y el ácido nucleico de la SEQ ID NO 13 o un fragmento del mismo de al menos 18 nucleótidos consecutivos de longitud.
4. Una composición que comprende ribavirina y el péptido de la SEQ ID NO 1 o un fragmento del mismo

de al menos 6 aminoácidos consecutivos de longitud.

5. Una composición que comprende ribavirina y un antígeno.
- 5 6. La composición de 5, en la que dicho antígeno es un ácido nucleico.
7. La composición de 5, en la que dicho antígeno es un péptido.
8. La composición de 6, en la que dicho ácido nucleico deriva de un virus seleccionado del grupo constituido por virus de la hepatitis A (HAV), virus de la hepatitis B (HBV) y virus de la hepatitis C (HCV).
- 10 9. La composición de 7, en la que dicho péptido deriva de un virus seleccionado del grupo constituido por virus de la hepatitis A (HAV), virus de la hepatitis B (HBV) y virus de la hepatitis C (HCV).
- 15 10. La composición de 5, en la que dicho antígeno es un ácido nucleico o un péptido correspondiente a un antígeno seleccionado del grupo constituido por antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg), antígeno de núcleo de hepatitis (HBcAg) y antígeno E de hepatitis (HBeAg).
- 20 11. La composición de 7, en la que dicho péptido comprende al menos tres aminoácidos consecutivos de una secuencia seleccionada del grupo constituido por las SEQ ID NO 1-12.
12. La composición de 6, en la que dicho ácido nucleico comprende al menos 9 nucleótidos consecutivos de una secuencia seleccionada del grupo constituido por las SEQ ID NO 13-15.
- 25 13. Un procedimiento para mejorar una respuesta inmune a un antígeno de hepatitis C que comprende: identificar a un animal necesitado de una respuesta inmune mejorada a un antígeno de hepatitis C y proporcionar a dicho animal una composición que comprende ribavirina y el ácido nucleico de la SEQ ID NO 16.
- 30 14. Un procedimiento para mejorar una respuesta inmune a un antígeno de hepatitis C que comprende: identificar a un animal necesitado de una respuesta inmune mejorada a un antígeno de hepatitis C y proporcionar a dicho animal una composición que comprende ribavirina y el ácido nucleico de la SEQ ID NO 17.
- 35 15. Un procedimiento para mejorar una respuesta inmune a un antígeno de hepatitis C que comprende: identificar a un animal necesitado de una respuesta inmune mejorada a un antígeno de hepatitis C y proporcionar a dicho animal una composición que comprende ribavirina y el ácido nucleico de la SEQ ID NO 13 o un fragmento del mismo de al menos 18 nucleótidos consecutivos de longitud.
- 40 16. Un procedimiento para mejorar una respuesta inmune a un antígeno de hepatitis C que comprende: identificar a un animal necesitado de una respuesta inmune mejorada a un antígeno de hepatitis C y proporcionar a dicho animal una composición que comprende ribavirina y el péptido de la SEQ ID NO 1 o un fragmento del mismo de al menos 6 aminoácidos consecutivos de longitud.
- 45 17. Un procedimiento de preparación de vacuna que comprende: proporcionar ribavirina, proporcionar el ácido nucleico de la SEQ ID NO 16 y mezclar dicha ribavirina y dicho ácido nucleico de modo que se formule dicha vacuna.
- 50 18. Un procedimiento de preparación de vacuna que comprende: proporcionar ribavirina, proporcionar el péptido de la SEQ ID NO 17 y mezclar dicha ribavirina y dicho péptido de modo que se formule dicha vacuna.
- 55 19. Un procedimiento de preparación de vacuna que comprende: proporcionar ribavirina, proporcionar el ácido nucleico de la SEQ ID NO 13 o un fragmento del mismo de al menos 18 nucleótidos consecutivos de longitud y mezclar dicha ribavirina y dicho ácido nucleico de modo que se formule dicha vacuna.
20. Un procedimiento de preparación de vacuna que comprende: proporcionar ribavirina, proporcionar el péptido de la SEQ ID NO 1 o un fragmento del mismo de al menos 6 aminoácidos consecutivos de longitud y mezclar dicha ribavirina y dicho péptido de modo que se formule dicha vacuna.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> TRIPEP AB
- Matti SALLBERG
- 5 Catharina HULTGREN
- <120> VACUNAS QUE CONTIENEN RIBAVIRINA Y PROCEDIMIENTOS DE USO DE LAS MISMAS
- <130> TRIPEP.023VPC
- <150> US 09/705.547
- 151> 2000-11-03
- 10 <150> US 60/229.175
- <151> 2000-08-29
- <150> US 60/225.767
- <151> 2000-08-17
- <160> 49
- 15 <170> FastSEQ para Windows versión 4.0
- <210> 1
- <211> 3011
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 20 <220>
- <223> Secuencia del virus de la Hepatitis C
- <400> 1

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	Cys	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 Val Pro Ala Ser Ala Tyr
 180 185 190
 Gln Val Arg Asn Ser Ser Gly Leu Tyr His Val Thr Asn Asp Cys Pro
 195 200 205
 Asn Ser Ser Val Val Tyr Glu Ala Ala Asp Ala Ile Leu His Thr Pro
 210 215 220
 Gly Cys Val Pro Cys Val Arg Glu Gly Asn Ala Ser Arg Cys Trp Val
 225 230 235 240
 Ala Val Thr Pro Thr Val Ala Thr Arg Asp Gly Lys Leu Pro Thr Thr
 245 250 255
 Gln Leu Arg Arg His Ile Asp Leu Leu Val Gly Ser Ala Thr Leu Cys
 260 265 270
 Ser Ala Leu Tyr Val Gly Asp Leu Cys Gly Ser Val Phe Leu Val Gly
 275 280 285
 Gln Leu Phe Thr Phe Ser Pro Arg His His Trp Thr Thr Gln Asp Cys
 290 295 300
 Asn Cys Ser Ile Tyr Pro Gly His Ile Thr Gly His Arg Met Ala Trp
 305 310 315 320
 Asn Met Met Met Asn Trp Ser Pro Thr Ala Leu Val Val Ala Gln
 325 330 335
 Leu Leu Arg Ile Pro Gln Ala Ile Met Asp Met Ile Ala Gly Ala His
 340 345 350
 Trp Gly Val Leu Ala Gly Ile Lys Tyr Phe Ser Met Val Gly Asn Trp
 355 360 365
 Ala Lys Val Leu Val Val Leu Leu Leu Phe Ala Gly Val Asp Ala Glu
 370 375 380
 Thr His Val Thr Gly Gly Asn Ala Gly Arg Thr Thr Ala Gly Leu Val
 385 390 395 400
 Gly Leu Leu Thr Pro Gly Ala Lys Gln Asn Ile Gln Leu Ile Asn Thr
 405 410 415
 Asn Gly Ser Trp His Ile Asn Ser Thr Ala Leu Asn Cys Asn Glu Ser
 420 425 430
 Leu Asn Thr Gly Trp Leu Ala Gly Leu Phe Tyr Gln His Lys Phe Asn
 435 440 445
 Ser Ser Gly Cys Pro Glu Arg Leu Ala Ser Cys Arg Arg Leu Thr Asp
 450 455 460
 Phe Ala Gln Gly Trp Gly Pro Ile Ser Tyr Ala Asn Gly Ser Gly Leu
 465 470 475 480
 Asp Glu Arg Pro Tyr Cys Trp His Tyr Pro Pro Arg Pro Cys Gly Ile
 485 490 495
 Val Pro Ala Lys Ser 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 Ala Pro Thr Tyr Ser
 515 520 525
 Trp Gly Ala Asn Asp Thr Asp Val Phe Val Leu Asn Asn Thr Arg Pro
 530 535 540
 Pro Leu Gly Asn Trp Phe Gly Cys Thr Trp Met Asn Ser Thr Gly Phe
 545 550 555 560
 Thr Lys Val Cys Gly Ala Pro Pro Cys Val Ile Gly Gly Val Gly Asn
 565 570 575
 Asn Thr Leu Leu Cys Pro Thr Asp Cys Phe Arg Lys Tyr Pro Glu Ala
 580 585 590
 Thr Tyr Ser Arg Cys Gly Ser Gly Pro Arg Ile Thr Pro Arg Cys Met

	595					600						605							
Val	Asp	Tyr	Pro	Tyr	Arg	Leu	Trp	His	Tyr	Pro	Cys	Thr	Ile	Asn	Tyr				
	610					615					620								
Thr	Ile	Phe	Lys	Val	Arg	Met	Tyr	Val	Gly	Gly	Val	Glu	His	Arg	Leu				
	625				630						635								
Glu	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	Gln	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	Ser	Ile	Ala	Ser	Trp	Ala	Ile	Lys	Trp	Glu	Tyr	Val	Val				
	705			710						715					720				
Leu	Leu	Phe	Leu	Leu	Leu	Ala	Asp	Ala	Arg	Val	Cys	Ser	Cys	Leu	Trp				
				725						730					735				
Met	Met	Leu	Leu	Ile	Ser	Gln	Ala	Glu	Ala	Ala	Leu	Glu	Asn	Leu	Val				
				740				745						750					
Ile	Leu	Asn	Ala	Ala	Ser	Leu	Ala	Gly	Thr	His	Gly	Leu	Val	Ser	Phe				
	755						760					765							
Leu	Val	Phe	Phe	Cys	Phe	Ala	Trp	Tyr	Leu	Lys	Gly	Arg	Trp	Val	Pro				
	770				775						780								
Gly	Ala	Val	Tyr	Ala	Leu	Tyr	Gly	Met	Trp	Pro	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu				
	785				790					795					800				
Leu	Ala	Leu	Pro	Gln	Arg	Ala	Tyr	Ala	Leu	Asp	Thr	Glu	Val	Ala	Ala				
				805						810					815				
Ser	Cys	Gly	Gly	Val	Val	Leu	Val	Gly	Leu	Met	Ala	Leu	Thr	Leu	Ser				
				820				825					830						
Pro	Tyr	Tyr	Lys	Arg	Tyr	Ile	Ser	Trp	Cys	Met	Trp	Trp	Leu	Gln	Tyr				
	835						840						845						
Phe	Leu	Thr	Arg	Val	Glu	Ala	Gln	Leu	His	Val	Trp	Val	Pro	Pro	Leu				
	850					855					860								
Asn	Val	Arg	Gly	Gly	Arg	Asp	Ala	Val	Ile	Leu	Leu	Thr	Cys	Val	Val				
	865				870					875					880				
His	Pro	Ala	Leu	Val	Phe	Asp	Ile	Thr	Lys	Leu	Leu	Leu	Ala	Ile	Phe				
				885					890						895				
Gly	Pro	Leu	Trp	Ile	Leu	Gln	Ala	Ser	Leu	Leu	Lys	Val	Pro	Tyr	Phe				
				900				905						910					
Val	Arg	Val	Gln	Gly	Leu	Leu	Arg	Ile	Cys	Ala	Leu	Ala	Arg	Lys	Ile				
	915						920					925							
Ala	Gly	Gly	His	Tyr	Val	Gln	Met	Ala	Ile	Ile	Lys	Leu	Gly	Ala	Leu				
	930					935					940								
Thr	Gly	Thr	Cys	Val	Tyr	Asn	His	Leu	Ala	Pro	Leu	Arg	Asp	Trp	Ala				
	945				950						955				960				
His	Asn	Gly	Leu	Arg	Asp	Leu	Ala	Val	Ala	Val	Glu	Pro	Val	Val	Phe				
				965						970					975				
Ser	Arg	Met	Glu	Thr	Lys	Leu	Ile	Thr	Trp	Gly	Ala	Asp	Thr	Ala	Ala				
		980						985					990						
Cys	Gly	Asp	Ile	Ile	Asn	Gly	Leu	Pro	Val	Ser	Ala	Arg	Arg	Gly	Gln				
		995					1000					1005							
Glu	Ile	Leu	Leu	Gly	Pro	Ala	Asp	Gly	Met	Val	Ser	Lys	Gly	Trp	Arg				
	1010					1015						1020							
Leu	Leu	Ala	Pro	Ile	Thr	Ala	Tyr	Ala	Gln	Gln	Thr	Arg	Gly	Leu	Leu				
	1025					1030						1035							

Gly Cys Ile Ile Thr Ser Leu Thr Gly Arg Asp Lys Asn Gln Val Glu
 1045 1050 1055
 Gly Glu Val Gln Ile Val Ser Thr Ala Thr Gln Thr Phe Leu Ala Thr
 1060 1065 1070
 Cys Ile Asn Gly Val Cys Trp Thr Val Tyr His Gly Ala Gly Thr Arg
 1075 1080 1085
 Thr Ile Ala Ser Pro Lys Gly Pro Val Ile Gln Thr Tyr Thr Asn Val
 1090 1095 1100
 Asp Gln Asp Leu Val Gly Trp Pro Ala Pro Gln Gly Ser Arg Ser Leu
 1105 1110 1115 1120
 Thr Pro Cys Thr Cys Gly Ser Ser Asp Leu Tyr Leu Val Thr Arg His
 1125 1130 1135
 Ala Asp Val Ile Pro Val Arg Arg Arg Gly Asp Ser Arg Gly Ser Leu
 1140 1145 1150
 Leu Ser Pro Arg Pro Ile Ser Tyr Leu Lys Gly Ser Ser Gly Gly Pro
 1155 1160 1165
 Leu Leu Cys Pro Thr Gly His Ala Val Gly Leu Phe Arg Ala Ala Val
 1170 1175 1180
 Cys Thr Arg Gly Val Ala Lys Ala Val Asp Phe Ile Pro Val Glu Asn
 1185 1190 1195 1200
 Leu Glu Thr Thr Met Arg Ser Pro Val Phe Thr Asp Asn Ser Ser Pro
 1205 1210 1215
 Pro Ala Val Pro Gln Ser Phe Gln Val Ala His Leu His Ala Pro Thr
 1220 1225 1230
 Gly Ser Gly Lys Ser Thr Lys Val Pro Ala Ala Tyr Ala Ala Lys Gly
 1235 1240 1245
 Tyr Lys Val Leu Val Leu Asn Pro Ser Val Ala Ala Thr Leu Gly Phe
 1250 1255 1260
 Gly Ala Tyr Met Ser Lys Ala His Gly Val Asp Pro Asn Ile Arg Thr
 1265 1270 1275 1280
 Gly Val Arg Thr Ile Thr Thr Gly Ser Pro Ile Thr Tyr Ser Thr Tyr
 1285 1290 1295
 Gly Lys Phe Leu Ala Asp Ala Gly Cys Ser Gly Gly Ala Tyr Asp Ile
 1300 1305 1310
 Ile Ile Cys Asp Glu Cys His Ser Thr Asp Ala Thr Ser Ile Ser Gly
 1315 1320 1325
 Ile Gly Thr Val Leu Asp Gln Ala Glu Thr Ala Gly Ala Arg Leu Val
 1330 1335 1340
 Val Leu Ala Thr Ala Thr Pro Pro Gly Ser Val Thr Val Ser His Pro
 1345 1350 1355 1360
 Asn Ile Glu Glu Val Ala Leu Ser Thr Thr Gly Glu Ile Pro Phe Tyr
 1365 1370 1375
 Gly Lys Ala Ile Pro Leu Glu Val Ile Lys Gly Gly Arg His Leu Ile
 1380 1385 1390
 Phe Cys His Ser Lys Lys Lys Cys Asp Glu Leu Ala Ala Lys Leu Val
 1395 1400 1405
 Ala Leu Gly Ile Asn Ala Val Ala Tyr Tyr Arg Gly Leu Asp Val Ser
 1410 1415 1420
 Val Ile Pro Thr Ser Gly Asp Val Val Val Val Ser Thr Asp Ala Leu
 1425 1430 1435 1440
 Met Thr Gly Phe Thr Gly Asp Phe Asp Ser Val Ile Asp Cys Asn Thr
 1445 1450 1455
 Cys Val Thr Gln Thr Val Asp Phe Ser Leu Asp Pro Thr Phe Thr Ile
 1460 1465 1470
 Glu Thr Thr Thr Leu Pro Gln Asp Ala Val Ser Arg Thr Gln Arg Arg

Ala Phe Ala Ser Arg Gly Asn His Val Ser Pro Thr His Tyr Val Pro
 1925 1930 1935
 Glu Ser Asp Ala Ala Ala Arg Val Thr Ala Ile Leu Ser Ser Leu Thr
 1940 1945 1950
 Val Thr Gln Leu Leu Arg Arg Leu His Gln Trp Ile Ser Ser Glu Cys
 1955 1960 1965
 Thr Thr Pro Cys Ser Gly Ser Trp Leu Arg Asp Ile Trp Asp Trp Ile
 1970 1975 1980
 Cys Glu Val Leu Ser Asp Phe Lys Thr Trp Leu Lys Ala Lys Leu Met
 1985 1990 1995 2000
 Pro Gln Leu Pro Gly Ile Pro Phe Val Ser Cys Gln Arg Gly Tyr Arg
 2005 2010 2015
 Gly Val Trp Arg Gly Asp Gly Ile Met His Thr Arg Cys His Cys Gly
 2020 2025 2030
 Ala Glu Ile Thr Gly His Val Lys Asn Gly Thr Met Arg Ile Val Gly
 2035 2040 2045
 Pro Arg Thr Cys Lys Asn Met Trp Ser Gly Thr Phe Phe Ile Asn Ala
 2050 2055 2060
 Tyr Thr Thr Gly Pro Cys Thr Pro Leu Pro Ala Pro Asn Tyr Lys Phe
 2065 2070 2075 2080
 Ala Leu Trp Arg Val Ser Ala Glu Glu Tyr Val Glu Ile Arg Arg Val
 2085 2090 2095
 Gly Asp Phe His Tyr Val Ser Gly Met Thr Thr Asp Asn Leu Lys Cys
 2100 2105 2110
 Pro Cys Gln Ile Pro Ser Pro Glu Phe Phe Thr Glu Leu Asp Gly Val
 2115 2120 2125
 Arg Leu His Arg Phe Ala Pro Pro Cys Lys Pro Leu Leu Arg Glu Glu
 2130 2135 2140
 Val Ser Phe Arg Val Gly Leu His Glu Tyr Pro Val Gly Ser Gln Leu
 2145 2150 2155 2160
 Pro Cys Glu Pro Glu Pro Asp Val Ala Val Leu Thr Ser Met Leu Thr
 2165 2170 2175
 Asp Pro Ser His Ile Thr Ala Glu Ala Ala Gly Arg Arg Leu Ala Arg
 2180 2185 2190
 Gly Ser Pro Pro Ser Met Ala Ser Ser Ser Ala Ser Gln Leu Ser Ala
 2195 2200 2205
 Pro Ser Leu Lys Ala Thr Cys Thr Ala Asn His Asp Ser Pro Asp Ala
 2210 2215 2220
 Glu Leu Ile Glu Ala Asn Leu Ley Trp Arg Gln Glu Met Gly Gly Asn
 2225 2230 2235 2240
 Ile Thr Arg Val Glu Ser Glu Asn Lys Val Val Ile Leu Asp Ser Phe
 2245 2250 2255
 Asp Pro Leu Val Ala Glu Glu Asp Glu Arg Glu Val Ser Val Pro Ala
 2260 2265 2270
 Glu Ile Leu Arg Lys Ser Arg Arg Phe Ala Pro Ala Leu Pro Val Trp
 2275 2280 2285
 Ala Arg Pro Asp Tyr Asn Pro Leu Leu Val Glu Thr Trp Lys Lys Pro
 2290 2295 2300
 Asp Tyr Glu Pro Pro Val Val His Gly Cys Pro Leu Pro Pro Pro Arg
 2305 2310 2315 2320
 Ser Pro Pro Val Pro Pro Pro Arg Lys Lys Arg Thr Val Val Leu Thr
 2325 2330 2335
 Glu Ser Thr Leu Pro Thr Ala Leu Ala Glu Leu Ala Thr Lys Ser Phe
 2340 2345 2350
 Gly Ser Ser Ser Thr Ser Gly Ile Thr Gly Asp Asn Thr Thr Thr Ser

ES 2 371 936 T3

	2355					2360						2365			
Ser	Glu	Pro	Ala	Pro	Ser	Gly	Cys	Pro	Pro	Asp	Ser	Asp	Val	Glu	Ser
	2370					2375					2380				
Tyr	Ser	Ser	Met	Pro	Pro	Leu	Glu	Gly	Glu	Pro	Gly	Asp	Pro	Asp	Leu
2385					2390					2395					2400
Ser	Asp	Gly	Ser	Trp	Ser	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Ala	Asp	Thr	Glu	Asp
				2405					2410					2415	
Val	Val	Cys	Cys	Ser	Met	Ser	Tyr	Ser	Trp	Thr	Gly	Ala	Leu	Val	Thr
				2420				2425						2430	
Pro	Cys	Ala	Ala	Glu	Glu	Gln	Lys	Leu	Pro	Ile	Asn	Ala	Leu	Ser	Asn
		2435					2440					2445			
Ser	Leu	Leu	Arg	His	His	Asn	Leu	Val	Tyr	Ser	Thr	Thr	Ser	Arg	Ser
	2450					2455					2460				
Ala	Cys	Gln	Arg	Lys	Lys	Lys	Val	Thr	Phe	Asp	Arg	Leu	Gln	Val	Leu
2465					2470					2475					2480
Asp	Ser	His	Tyr	Gln	Asp	Val	Leu	Lys	Glu	Val	Lys	Ala	Ala	Ala	Ser
				2485					2490						2495
Lys	Val	Lys	Ala	Asn	Leu	Leu	Ser	Val	Glu	Glu	Ala	Cys	Ser	Leu	Ala
				2500				2505						2510	
Pro	Pro	His	Ser	Ala	Lys	Ser	Lys	Phe	Gly	Tyr	Gly	Ala	Lys	Asp	Val
		2515					2520						2525		
Arg	Cys	His	Ala	Arg	Lys	Ala	Val	Ala	His	Ile	Asn	Ser	Val	Trp	Lys
	2530					2535						2540			
Asp	Leu	Leu	Glu	Asp	Ser	Val	Thr	Pro	Ile	Asp	Thr	Thr	Ile	Met	Ala
2545					2550					2555					2560
Lys	Asn	Glu	Val	Phe	Cys	Val	Gln	Pro	Glu	Lys	Gly	Gly	Arg	Lys	Pro
				2565					2570					2575	
Ala	Arg	Leu	Ile	Val	Phe	Pro	Asp	Leu	Gly	Val	Arg	Val	Cys	Glu	Lys
				2580				2585						2590	
Met	Ala	Leu	Tyr	Asp	Val	Val	Ser	Lys	Leu	Pro	Leu	Ala	Val	Met	Gly
		2595					2600						2605		
Ser	Ser	Tyr	Gly	Phe	Gln	Tyr	Ser	Pro	Gly	Gln	Arg	Val	Glu	Phe	Leu
	2610					2615						2620			
Val	Gln	Ala	Trp	Lys	Ser	Lys	Lys	Thr	Pro	Met	Gly	Leu	Ser	Tyr	Asp
2625					2630					2635					2640
Thr	Arg	Cys	Phe	Asp	Ser	Thr	Val	Thr	Glu	Ser	Asp	Ile	Arg	Thr	Glu
				2645					2650					2655	
Glu	Ala	Ile	Tyr	Gln	Cys	Cys	Asp	Leu	Asp	Pro	Gln	Ala	Arg	Val	Ala
			2660					2665						2670	
Ile	Lys	Ser	Leu	Thr	Glu	Arg	Leu	Tyr	Val	Gly	Gly	Pro	Leu	Thr	Asn
	2675						2680						2685		
Ser	Arg	Gly	Glu	Asn	Cys	Gly	Tyr	Arg	Arg	Cys	Arg	Ala	Ser	Arg	Val
	2690					2695					2700				
Leu	Thr	Thr	Ser	Cys	Gly	Asn	Thr	Leu	Thr	Arg	Tyr	Ile	Lys	Ala	Arg
2705					2710					2715					2720
Ala	Ala	Cys	Arg	Ala	Ala	Gly	Leu	Gln	Asp	Cys	Thr	Met	Leu	Val	Cys
				2725					2730					2735	
Gly	Asp	Asp	Leu	Val	Val	Ile	Cys	Glu	Ser	Ala	Gly	Val	Gln	Glu	Asp
			2740					2745						2750	
Ala	Ala	Ser	Leu	Arg	Ala	Phe	Thr	Glu	Ala	Met	Thr	Arg	Tyr	Ser	Ala
		2755					2760						2765		
Pro	Pro	Gly	Asp	Pro	Pro	Gln	Pro	Glu	Tyr	Asp	Leu	Glu	Leu	Ile	Thr
	2770					2775					2780				
Ser	Cys	Ser	Ser	Asn	Val	Ser	Val	Ala	His	Asp	Gly	Ala	Gly	Lys	Arg
2785					2790					2795					2800

Val Tyr Tyr Leu Thr Arg Asp Pro Thr Thr Pro Leu Ala Arg Ala Ala
 2805 2810 2815
 Trp Glu Thr Ala Arg His Thr Pro Val Asn Ser Trp Leu Gly Asn Ile
 2820 2825 2830
 Ile Met Phe Ala Pro Thr Leu Trp Ala Arg Met Ile Leu Met Thr His
 2835 2840 2845
 Phe Phe Ser Val Leu Ile Ala Arg Asp Gln Leu Glu Gln Ala Leu Asn
 2850 2855 2860
 Cys Glu Ile Tyr Gly Ala Cys Tyr Ser Ile Glu Pro Leu Asp Leu Pro
 2865 2870 2875 2880
 Pro Ile Ile Gln Arg Leu His Gly Leu Ser Ala Phe Ser Leu His Ser
 2885 2890 2895
 Tyr Ser Pro Gly Glu Ile Asn Arg Val Ala Ala Cys Leu Arg Lys Leu
 2900 2905 2910
 Gly Val Pro Pro Leu Arg Ala Trp Arg His Arg Ala Trp Ser Val Arg
 2915 2920 2925
 Ala Arg Leu Leu Ala Arg Gly Gly Lys Ala Ala Ile Cys Gly Lys Tyr
 2930 2935 2940
 Leu Phe Asn Trp Ala Val Arg Thr Lys Leu Lys Leu Thr Pro Ile Thr
 2945 2950 2955 2960
 Ala Ala Gly Arg Leu Asp Leu Ser Gly Trp Phe Thr Ala Gly Tyr Ser
 2965 2970 2975
 Gly Gly Asp Ile Tyr His Ser Val Ser His Ala Arg Pro Arg Trp Phe
 2980 2985 2990
 Trp Phe Cys Leu Leu Leu Leu Ala Ala Gly Val Gly Ile Tyr Leu Leu
 2995 3000 3005
 Pro Asn Arg
 3010

<210> 2

<211> 182

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de la proteína nuclear del virus de la Hepatitis C

<400> 2

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 Cys 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

ES 2 371 936 T3

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
 180

<210> 3

<211> 197

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de la proteína E1 del virus de la Hepatitis C

<400> 3

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

10 <210> 4

<211> 350

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Secuencia de la proteína E2 del virus de la Hepatitis C

<400> 4

```

Gly Val Asp Ala Glu Thr His Val Thr Gly Gly Asn Ala Gly Arg Thr
 1          5          10          15
Thr Ala Gly Leu Val Gly Leu Leu Thr Pro Gly Ala Lys Gln Asn Ile
 20          25          30
Gln Leu Ile Asn Thr Asn Gly Ser Trp His Ile Asn Ser Thr Ala Leu
 35          40          45
Asn Cys Asn Glu Ser Leu Asn Thr Gly Trp Leu Ala Gly Leu Phe Tyr
 50          55          60
Gln His Lys Phe Asn Ser Ser Gly Cys Pro Glu Arg Leu Ala Ser Cys
 65          70          75
Arg Arg Leu Thr Asp Phe Ala Gln Gly Trp Gly Pro Ile Ser Tyr Ala
 85          90          95
Asn Gly Ser Gly Leu Asp Glu Arg Pro Tyr Cys Trp His Tyr Pro Pro
 100         105         110
Arg Pro Cys Gly Ile Val Pro Ala Lys Ser Val Cys Gly Pro Val Tyr
 115         120         125
Cys Phe Thr Pro Ser Pro Val Val Val Gly Thr Thr Asp Arg Ser Gly
 130         135         140
Ala Pro Thr Tyr Ser Trp Gly Ala Asn Asp Thr Asp Val Phe Val Leu
 145         150         155
Asn Asn Thr Arg Pro Pro Leu Gly Asn Trp Phe Gly Cys Thr Trp Met
 165         170         175
Asn Ser Thr Gly Phe Thr Lys Val Cys Gly Ala Pro Pro Cys Val Ile
 180         185         190
Gly Gly Val Gly Asn Asn Thr Leu Leu Cys Pro Thr Asp Cys Phe Arg
 195         200         205
Lys Tyr Pro Glu Ala Thr Tyr Ser Arg Cys Gly Ser Gly Pro Arg Ile
 210         215         220
Thr Pro Arg Cys Met Val Asp Tyr Pro Tyr Arg Leu Trp His Tyr Pro
 225         230         235
Cys Thr Ile Asn Tyr Thr Ile Phe Lys Val Arg Met Tyr Val Gly Gly
 245         250         255
Val Glu His Arg Leu Glu Ala Ala Cys Asn Trp Thr Arg Gly Glu Arg
 260         265         270
Cys Asp Leu Glu Asp Arg Asp Arg Ser Glu Leu Ser Pro Leu Leu Leu
 275         280         285
Ser Thr Thr Gln Trp Gln Val Leu Pro Cys Ser Phe Thr Thr Leu Pro
 290         295         300
Ala Leu Ser Thr Gly Leu Ile His Leu His Gln Asn Ile Val Asp Val
 305         310         315
Gln Tyr Leu Tyr Gly Val Gly Ser Ser Ile Ala Ser Trp Ala Ile Lys
 325         330         335
Trp Glu Tyr Val Val Leu Leu Phe Leu Leu Leu Ala Asp Ala
 340         345         350

```

<210> 5

<211> 315

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de la proteína NS2 del virus de la Hepatitis C

<400> 5

```

Arg Val Cys Ser Cys Leu Trp Met Met Leu Leu Ile Ser Gln Ala Glu
 1          5          10          15
Ala Ala Leu Glu Asn Leu Val Ile Leu Asn Ala Ala Ser Leu Ala Gly
          20          25          30
Thr His Gly Leu Val Ser Phe Leu Val Phe Phe Cys Phe Ala Trp Tyr
          35          40          45
Leu Lys Gly Arg Trp Val Pro Gly Ala Val Tyr Ala Leu Tyr Gly Met
          50          55          60
Trp Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ala Leu Pro Gln Arg Ala Tyr Ala
65          70          75          80
Leu Asp Thr Glu Val Ala Ala Ser Cys Gly Gly Val Val Leu Val Gly
          85          90          95
Leu Met Ala Leu Thr Leu Ser Pro Tyr Tyr Lys Arg Tyr Ile Ser Trp
          100          105          110
Cys Met Trp Trp Leu Gln Tyr Phe Leu Thr Arg Val Glu Ala Gln Leu
          115          120          125
His Val Trp Val Pro Pro Leu Asn Val Arg Gly Gly Arg Asp Ala Val
          130          135          140
Ile Leu Leu Thr Cys Val Val His Pro Ala Leu Val Phe Asp Ile Thr
145          150          155          160
Lys Leu Leu Leu Ala Ile Phe Gly Pro Leu Trp Ile Leu Gln Ala Ser
          165          170          175
Leu Leu Lys Val Pro Tyr Phe Val Arg Val Gln Gly Leu Leu Arg Ile
          180          185          190
Cys Ala Leu Ala Arg Lys Ile Ala Gly Gly His Tyr Val Gln Met Ala
          195          200          205
Ile Ile Lys Leu Gly Ala Leu Thr Gly Thr Cys Val Tyr Asn His Leu
          210          215          220
Ala Pro Leu Arg Asp Trp Ala His Asn Gly Leu Arg Asp Leu Ala Val
225          230          235          240
Ala Val Glu Pro Val Val Phe Ser Arg Met Glu Thr Lys Leu Ile Thr
          245          250          255
Trp Gly Ala Asp Thr Ala Ala Cys Gly Asp Ile Ile Asn Gly Leu Pro
          260          265          270
Val Ser Ala Arg Arg Gly Gln Glu Ile Leu Leu Gly Pro Ala Asp Gly
          275          280          285
Met Val Ser Lys Gly Trp Arg Leu Leu Ala Pro Ile Thr Ala Tyr Ala
          290          295          300
Gln Gln Thr Arg Gly Leu Leu Gly Cys Ile Ile
305          310          315

```

<210> 6

<211> 613

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de la proteína NS3 del virus de la Hepatitis C

<400> 6

```

Thr Ser Leu Thr Gly Arg Asp Lys Asn Gln Val Glu Gly Glu Val Gln
 1          5          10          15
Ile Val Ser Thr Ala Thr Gln Thr Phe Leu Ala Thr Cys Ile Asn Gly

```

ES 2 371 936 T3

			20					25				30			
Val	Cys	Trp	Thr	Val	Tyr	His	Gly	Ala	Gly	Thr	Arg	Thr	Ile	Ala	Ser
			35					40					45		
Pro	Lys	Gly	Pro	Val	Ile	Gln	Thr	Tyr	Thr	Asn	Val	Asp	Gln	Asp	Leu
			50			55					60				
Val	Gly	Trp	Pro	Ala	Pro	Gln	Gly	Ser	Arg	Ser	Leu	Thr	Pro	Cys	Thr
			65			70				75					80
Cys	Gly	Ser	Ser	Asp	Leu	Tyr	Leu	Val	Thr	Arg	His	Ala	Asp	Val	Ile
				85					90					95	
Pro	Val	Arg	Arg	Arg	Gly	Asp	Ser	Arg	Gly	Ser	Leu	Leu	Ser	Pro	Arg
				100				105						110	
Pro	Ile	Ser	Tyr	Leu	Lys	Gly	Ser	Ser	Gly	Gly	Pro	Leu	Leu	Cys	Pro
			115				120							125	
Thr	Gly	His	Ala	Val	Gly	Leu	Phe	Arg	Ala	Ala	Val	Cys	Thr	Arg	Gly
			130			135								140	
Val	Ala	Lys	Ala	Val	Asp	Phe	Ile	Pro	Val	Glu	Asn	Leu	Glu	Thr	Thr
			145			150				155					160
Met	Arg	Ser	Pro	Val	Phe	Thr	Asp	Asn	Ser	Ser	Pro	Pro	Ala	Val	Pro
				165				170							175
Gln	Ser	Phe	Gln	Val	Ala	His	Leu	His	Ala	Pro	Thr	Gly	Ser	Gly	Lys
			180					185						190	
Ser	Thr	Lys	Val	Pro	Ala	Ala	Tyr	Ala	Ala	Lys	Gly	Tyr	Lys	Val	Leu
			195				200					205			
Val	Leu	Asn	Pro	Ser	Val	Ala	Ala	Thr	Leu	Gly	Phe	Gly	Ala	Tyr	Met
			210			215					220				
Ser	Lys	Ala	His	Gly	Val	Asp	Pro	Asn	Ile	Arg	Thr	Gly	Val	Arg	Thr
			225			230				235					240
Ile	Thr	Thr	Gly	Ser	Pro	Ile	Thr	Tyr	Ser	Thr	Tyr	Gly	Lys	Phe	Leu
				245				250							255
Ala	Asp	Ala	Gly	Cys	Ser	Gly	Gly	Ala	Tyr	Asp	Ile	Ile	Ile	Cys	Asp
			260					265						270	
Glu	Cys	His	Ser	Thr	Asp	Ala	Thr	Ser	Ile	Ser	Gly	Ile	Gly	Thr	Val
			275				280							285	
Leu	Asp	Gln	Ala	Glu	Thr	Ala	Gly	Ala	Arg	Leu	Val	Val	Leu	Ala	Thr
			290				295				300				
Ala	Thr	Pro	Pro	Gly	Ser	Val	Thr	Val	Ser	His	Pro	Asn	Ile	Glu	Glu
			305			310				315					320
Val	Ala	Leu	Ser	Thr	Thr	Gly	Glu	Ile	Pro	Phe	Tyr	Gly	Lys	Ala	Ile
				325					330						335
Pro	Leu	Glu	Val	Ile	Lys	Gly	Gly	Arg	His	Leu	Ile	Phe	Cys	His	Ser
			340					345						350	
Lys	Lys	Lys	Cys	Asp	Glu	Leu	Ala	Ala	Lys	Leu	Val	Ala	Leu	Gly	Ile
			355				360							365	
Asn	Ala	Val	Ala	Tyr	Tyr	Arg	Gly	Leu	Asp	Val	Ser	Val	Ile	Pro	Thr
			370			375					380				
Ser	Gly	Asp	Val	Val	Val	Val	Ser	Thr	Asp	Ala	Leu	Met	Thr	Gly	Phe
			385			390				395					400
Thr	Gly	Asp	Phe	Asp	Ser	Val	Ile	Asp	Cys	Asn	Thr	Cys	Val	Thr	Gln
				405					410						415
Thr	Val	Asp	Phe	Ser	Leu	Asp	Pro	Thr	Phe	Thr	Ile	Glu	Thr	Thr	Thr
			420					425							430
Leu	Pro	Gln	Asp	Ala	Val	Ser	Arg	Thr	Gln	Arg	Arg	Gly	Arg	Thr	Gly
			435				440							445	
Arg	Gly	Lys	Pro	Gly	Ile	Tyr	Arg	Phe	Val	Ala	Pro	Gly	Glu	Arg	Pro
			450			455									460

ES 2 371 936 T3

Ser Gly Met Phe Asp Ser Ser Val Leu Cys Glu Cys Tyr Asp Ala Gly
 465 470 475 480
 Cys Ala Trp Tyr Glu Leu Thr Pro Ala Glu Thr Thr Val Arg Leu Arg
 485 490 495
 Ala Tyr Met Asn Thr Pro Gly Leu Pro Val Cys Gln Asp His Leu Gly
 500 505 510
 Phe Trp Glu Gly Val Phe Thr Gly Leu Thr His Ile Asp Ala His Phe
 515 520 525
 Leu Ser Gln Thr Lys Gln Ser Gly Glu Asn Phe Pro Tyr Leu Val Ala
 530 535 540
 Tyr Gln Ala Thr Val Cys Ala Arg Ala Gln Ala Pro Pro Pro Ser Trp
 545 550 555 560
 Asp Gln Met Arg Lys Cys Leu Ile Arg Leu Lys Pro Thr Leu His Gly
 565 570 575
 Pro Thr Pro Leu Leu Tyr Arg Leu Gly Ala Val Gln Asn Glu Val Thr
 580 585 590
 Leu Thr His Pro Ile Thr Lys Tyr Ile Met Thr Cys Met Ser Ala Asp
 595 600 605
 Leu Glu Val Val Thr
 610

<210> 7

<211> 54

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de la proteína NS4A del virus de la Hepatitis C

<400> 7

Ser Thr Trp Val Leu Val Gly Gly Val Leu Ala Ala Leu Ala Ala Tyr
 1 5 10 15
 Cys Leu Ser Thr Gly Cys Val Val Ile Val Gly Arg Ile Val Leu Ser
 20 25 30
 Gly Lys Pro Ala Ile Ile Pro Asp Arg Glu Val Leu Tyr Gln Glu Phe
 35 40 45
 Asp Glu Met Glu Glu Cys
 50

10 <210> 8

<211> 260

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Secuencia de la proteína NS4B del virus de la Hepatitis C

<400> 8

ES 2 371 936 T3

```

Ser Gln His Leu Pro Tyr Ile Glu Gln Gly Met Met Leu Ala Glu Gln
 1          5          10          15
Phe Lys Gln Lys Ala Leu Gly Leu Leu Gln Thr Ala Ser Arg His Ala
          20          25          30
Glu Val Ile Thr Pro Ala Val Gln Thr Asn Trp Gln Lys Leu Glu Val

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

```

<210> 9

<211> 1040

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de la proteína NSSA/B del virus de la Hepatitis C

<400> 9

ES 2 371 936 T3

Cys Ser Gly Ser Trp Leu Arg Asp Ile Trp Asp Trp Ile Cys Glu Val
 1 5 10 15
 Leu Ser Asp Phe Lys Thr Trp Leu Lys Ala Lys Leu Met Pro Gln Leu
 20 25 30
 Pro Gly Ile Pro Phe Val Ser Cys Gln Arg Gly Tyr Arg Gly Val Trp
 35 40 45
 Arg Gly Asp Gly Ile Met His Thr Arg Cys His Cys Gly Ala Glu Ile
 50 55 60
 Thr Gly His Val Lys Asn Gly Thr Met Arg Ile Val Gly Pro Arg Thr
 65 70 75 80
 Cys Lys Asn Met Trp Ser Gly Thr Phe Phe Ile Asn Ala Tyr Thr Thr
 85 90 95
 Gly Pro Cys Thr Pro Leu Pro Ala Pro Asn Tyr Lys Phe Ala Leu Trp
 100 105 110
 Arg Val Ser Ala Glu Glu Tyr Val Glu Ile Arg Arg Val Gly Asp Phe

ES 2 371 936 T3

	115						120					125			
His	Tyr	Val	Ser	Gly	Met	Thr	Thr	Asp	Asn	Leu	Lys	Cys	Pro	Cys	Gln
	130						135					140			
Ile	Pro	Ser	Pro	Glu	Phe	Phe	Thr	Glu	Leu	Asp	Gly	Val	Arg	Leu	His
145					150					155					160
Arg	Phe	Ala	Pro	Pro	Cys	Lys	Pro	Leu	Leu	Arg	Glu	Glu	Val	Ser	Phe
				165						170					175
Arg	Val	Gly	Leu	His	Glu	Tyr	Pro	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	Ala	Ala	Gly	Arg	Arg	Leu	Ala	Arg	Gly	Ser	Pro
	210						215						220		
Pro	Ser	Met	Ala	Ser	Ser	Ser	Ala	Ser	Gln	Leu	Ser	Ala	Pro	Ser	Leu
225					230					235					240
Lys	Ala	Thr	Cys	Thr	Ala	Asn	His	Asp	Ser	Pro	Asp	Ala	Glu	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		
Val	Ala	Glu	Glu	Asp	Glu	Arg	Glu	Val	Ser	Val	Pro	Ala	Glu	Ile	Leu
	290					295					300				
Arg	Lys	Ser	Arg	Arg	Phe	Ala	Pro	Ala	Leu	Pro	Val	Trp	Ala	Arg	Pro
305					310					315					320
Asp	Tyr	Asn	Pro	Leu	Leu	Val	Glu	Thr	Trp	Lys	Lys	Pro	Asp	Tyr	Glu
				325					330						335
Pro	Pro	Val	Val	His	Gly	Cys	Pro	Leu	Pro	Pro	Pro	Arg	Ser	Pro	Pro
			340					345						350	
Val	Pro	Pro	Pro	Arg	Lys	Lys	Arg	Thr	Val	Val	Leu	Thr	Glu	Ser	Thr
	355						360						365		
Leu	Pro	Thr	Ala	Leu	Ala	Glu	Leu	Ala	Thr	Lys	Ser	Phe	Gly	Ser	Ser
	370					375							380		
Ser	Thr	Ser	Gly	Ile	Thr	Gly	Asp	Asn	Thr	Thr	Thr	Ser	Ser	Glu	Pro
385					390					395					400
Ala	Pro	Ser	Gly	Cys	Pro	Pro	Asp	Ser	Asp	Val	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	Ser	Gly	Ala	Asp	Thr	Glu	Asp	Val	Val	Cys
	435						440						445		
Cys	Ser	Met	Ser	Tyr	Ser	Trp	Thr	Gly	Ala	Leu	Val	Thr	Pro	Cys	Ala
	450					455					460				
Ala	Glu	Glu	Gln	Lys	Leu	Pro	Ile	Asn	Ala	Leu	Ser	Asn	Ser	Leu	Leu
465					470						475				480
Arg	His	His	Asn	Leu	Val	Tyr	Ser	Thr	Thr	Ser	Arg	Ser	Ala	Cys	Gln
			485						490						495
Arg	Lys	Lys	Lys	Val	Thr	Phe	Asp	Arg	Leu	Gln	Val	Leu	Asp	Ser	His
			500					505							510
Tyr	Gln	Asp	Val	Leu	Lys	Glu	Val	Lys	Ala	Ala	Ala	Ser	Lys	Val	Lys
	515							520					525		
Ala	Asn	Leu	Leu	Ser	Val	Glu	Glu	Ala	Cys	Ser	Leu	Ala	Pro	Pro	His
	530						535						540		
Ser	Ala	Lys	Ser	Lys	Phe	Gly	Tyr	Gly	Ala	Lys	Asp	Val	Arg	Cys	His
545					550						555				560

Ala Arg Lys Ala Val Ala His Ile Asn Ser Val Trp Lys Asp Leu Leu
565 570 575
Glu Asp Ser Val Thr Pro Ile Asp Thr Thr Ile Met Ala Lys Asn Glu
580 585 590
Val Phe Cys Val Gln Pro Glu Lys Gly Gly Arg Lys Pro Ala Arg Leu
595 600 605
Ile Val Phe Pro Asp Leu Gly Val Arg Val Cys Glu Lys Met Ala Leu
610 615 620
Tyr Asp Val Val Ser Lys Leu Pro Leu Ala Val Met Gly Ser Ser Tyr
625 630 635 640
Gly Phe Gln Tyr Ser Pro Gly Gln Arg Val Glu Phe Leu Val Gln Ala
645 650 655
Trp Lys Ser Lys Lys Thr Pro Met Gly Leu Ser Tyr Asp Thr Arg Cys
660 665 670
Phe Asp Ser Thr Val Thr Glu Ser Asp Ile Arg Thr Glu Glu Ala Ile
675 680 685
Tyr Gln Cys Cys Asp Leu Asp Pro Gln Ala Arg Val Ala Ile Lys Ser
690 695 700
Leu Thr Glu Arg Leu Tyr Val Gly Gly Pro Leu Thr Asn Ser Arg Gly
705 710 715 720
Glu Asn Cys Gly Tyr Arg Arg Cys Arg Ala Ser Arg Val Leu Thr Thr
725 730 735
Ser Cys Gly Asn Thr Leu Thr Arg Tyr Ile Lys Ala Arg Ala Ala Cys
740 745 750
Arg Ala Ala Gly Leu Gln Asp Cys Thr Met Leu Val Cys Gly Asp Asp
755 760 765
Leu Val Val Ile Cys Glu Ser Ala Gly Val Gln Glu Asp Ala Ala Ser
770 775 780
Leu Arg Ala Phe Thr Glu Ala Met Thr Arg Tyr Ser Ala Pro Pro Gly
785 790 795 800
Asp Pro Pro Gln Pro Glu Tyr Asp Leu Glu Leu Ile Thr Ser Cys Ser
805 810 815
Ser Asn Val Ser Val Ala His Asp Gly Ala Gly Lys Arg Val Tyr Tyr
820 825 830
Leu Thr Arg Asp Pro Thr Thr Pro Leu Ala Arg Ala Ala Trp Glu Thr
835 840 845
Ala Arg His Thr Pro Val Asn Ser Trp Leu Gly Asn Ile Ile Met Phe
850 855 860
Ala Pro Thr Leu Trp Ala Arg Met Ile Leu Met Thr His Phe Phe Ser
865 870 875 880
Val Leu Ile Ala Arg Asp Gln Leu Glu Gln Ala Leu Asn Cys Glu Ile
885 890 895
Tyr Gly Ala Cys Tyr Ser Ile Glu Pro Leu Asp Leu Pro Pro Ile Ile
900 905 910
Gln Arg Leu His Gly Leu Ser Ala Phe Ser Leu His Ser Tyr Ser Pro
915 920 925
Gly Glu Ile Asn Arg Val Ala Ala Cys Leu Arg Lys Leu Gly Val Pro
930 935 940
Pro Leu Arg Ala Trp Arg His Arg Ala Trp Ser Val Arg Ala Arg Leu
945 950 955 960
Leu Ala Arg Gly Gly Lys Ala Ala Ile Cys Gly Lys Tyr Leu Phe Asn
965 970 975
Trp Ala Val Arg Thr Lys Leu Lys Leu Thr Pro Ile Thr Ala Ala Gly
980 985 990
Arg Leu Asp Leu Ser Gly Trp Phe Thr Ala Gly Tyr Ser Gly Gly Asp

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

- <210> 12
- <211> 2227
- <212> PRT
- 5 <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Secuencia del virus de la Hepatitis A
- <400> 12

Met Asn Met Ser Lys Gln Gly Ile Phe Gln Thr Val Gly Ser Gly Leu
 1 5 10 15
 Asp His Ile Leu Ser Leu Ala Asp Ile Glu Glu Glu Gln Met Ile Gln
 20 25 30
 Ser Val Asp Arg Thr Ala Val Thr Gly Ala Ser Tyr Phe Thr Ser Val
 35 40 45
 Asp Gln Ser Ser Val His Thr Ala Glu Val Gly Ser His Gln Ile Glu
 50 55 60
 Pro Leu Lys Thr Ser Val Asp Lys Pro Gly Ser Lys Lys Thr Gln Gly
 65 70 75 80
 Glu Lys Phe Phe Leu Ile His Ser Ala Asp Trp Leu Thr Thr His Ala
 85 90 95
 Leu Phe His Glu Val Ala Lys Leu Asp Val Val Lys Leu Leu Tyr Asn

Gln Gln Leu Asn Asp Pro Val Leu Ala Lys Lys Val Pro Glu Thr Phe
 545 550 555 560
 Pro Glu Leu Lys Pro Gly Glu Ser Arg His Thr Ser Asp His Met Ser
 565 570 575
 Ile Tyr Lys Phe Met Gly Arg Ser His Phe Leu Cys Thr Phe Thr Phe
 580 585 590
 Asn Ser Asn Asn Lys Glu Tyr Thr Phe Pro Ile Thr Leu Ser Ser Thr
 595 600 605
 Ser Asn Pro Pro His Gly Leu Pro Ser Thr Leu Arg Trp Phe Phe Asn
 610 615 620
 Leu Phe Gln Leu Tyr Arg Gly Pro Leu Asp Leu Thr Ile Ile Ile Thr
 625 630 635 640
 Gly Ala Thr Asp Val Asp Gly Met Ala Trp Phe Thr Pro Val Gly Leu
 645 650 655
 Ala Val Asp Pro Trp Val Glu Lys Glu Ser Ala Leu Ser Ile Asp Tyr
 660 665 670
 Lys Thr Ala Leu Gly Ala Val Arg Phe Asn Thr Arg Arg Thr Gly Asn
 675 680 685
 Ile Gln Ile Arg Leu Pro Trp Tyr Ser Tyr Leu Tyr Ala Val Ser Gly
 690 695 700
 Ala Leu Asp Gly Leu Gly Asp Lys Thr Asp Ser Thr Phe Gly Leu Phe
 705 710 715 720
 Leu Phe Glu Ile Ala Asn Tyr Asn His Ser Asp Glu Tyr Leu Ser Phe
 725 730 735
 Ser Cys Tyr Leu Ser Val Thr Glu Gln Ser Glu Phe Tyr Phe Pro Arg
 740 745 750
 Ala Pro Leu Asn Ser Asn Ala Met Leu Ser Thr Glu Ser Met Met Ser
 755 760 765
 Arg Ile Ala Ala Gly Asp Leu Glu Ser Ser Val Asp Asp Pro Arg Ser
 770 775 780
 Glu Glu Asp Arg Arg Phe Glu Ser His Ile Glu Cys Arg Lys Pro Tyr
 785 790 795 800
 Lys Glu Leu Arg Leu Glu Val Gly Lys Gln Arg Leu Lys Tyr Ala Gln
 805 810 815
 Glu Glu Leu Ser Asn Glu Val Leu Pro Pro Pro Arg Lys Met Lys Gly
 820 825 830
 Leu Phe Ser Gln Ala Lys Ile Ser Leu Phe Tyr Thr Glu Glu His Glu
 835 840 845
 Ile Met Lys Phe Ser Trp Arg Gly Val Thr Ala Asp Thr Arg Ala Leu
 850 855 860
 Arg Arg Phe Gly Phe Ser Leu Ala Ala Gly Arg Ser Val Trp Thr Leu
 865 870 875 880
 Glu Met Asp Ala Gly Val Leu Thr Gly Arg Leu Ile Arg Leu Asn Asp
 885 890 895
 Glu Lys Trp Thr Glu Met Lys Asp Asp Lys Ile Val Ser Leu Ile Glu
 900 905 910
 Lys Phe Thr Ser Asn Lys Tyr Trp Ser Lys Val Asn Phe Pro His Gly
 915 920 925
 Met Leu Asp Leu Glu Glu Ile Ala Ala Asn Ser Lys Asp Phe Pro Asn
 930 935 940
 Met Ser Glu Thr Asp Leu Cys Phe Leu Leu His Trp Leu Asn Pro Lys
 945 950 955 960
 Lys Ile Asn Leu Ala Asp Arg Met Leu Gly Leu Ser Gly Val Gln Glu
 965 970 975
 Ile Lys Glu Gln Gly Val Gly Leu Ile Ala Glu Cys Arg Thr Phe Leu

Ser Asp Asp Asp Asn Asp Ser Ala Val Ala Glu Phe Phe Gln Ser Phe
 1425 1430 1435 1440
 Pro Ser Gly Glu Pro Ser Asn Trp Lys Leu Ser Ser Phe Phe Gln Ser
 1445 1450 1455
 Val Thr Asn His Lys Trp Val Ala Val Gly Ala Ala Val Gly Ile Leu
 1460 1465 1470
 Gly Val Leu Val Gly Gly Trp Phe Val Tyr Lys His Phe Ser Arg Lys
 1475 1480 1485
 Glu Glu Glu Pro Ile Pro Ala Glu Gly Val Tyr His Gly Val Thr Lys
 1490 1495 1500
 Pro Lys Gln Val Ile Lys Leu Asp Ala Asp Pro Val Glu Ser Gln Ser
 1505 1510 1515 1520
 Thr Leu Glu Ile Ala Gly Leu Val Arg Lys Asn Leu Val Gln Phe Gly
 1525 1530 1535
 Val Gly Glu Lys Asn Gly Cys Val Arg Trp Val Met Asn Ala Leu Gly
 1540 1545 1550
 Val Lys Asp Asp Trp Leu Leu Val Pro Ser His Ala Tyr Lys Phe Glu
 1555 1560 1565
 Lys Asp Tyr Glu Met Met Glu Phe Tyr Phe Asn Arg Gly Gly Thr Tyr
 1570 1575 1580
 Tyr Ser Ile Ser Ala Gly Asn Val Val Ile Gln Ser Leu Asp Val Gly
 1585 1590 1595 1600
 Phe Gln Asp Val Val Leu Met Lys Val Pro Thr Ile Pro Lys Phe Arg
 1605 1610 1615
 Asp Ile Thr Gln His Phe Ile Lys Lys Gly Asp Val Pro Arg Ala Leu
 1620 1625 1630
 Asn Arg Leu Ala Thr Leu Val Thr Thr Val Asn Gly Thr Pro Met Leu
 1635 1640 1645
 Ile Ser Glu Gly Pro Leu Lys Met Glu Glu Lys Ala Thr Tyr Val His
 1650 1655 1660
 Lys Lys Asn Asp Gly Thr Val Asp Leu Thr Val Asp Gln Ala Trp
 1665 1670 1675 1680
 Arg Gly Lys Gly Glu Gly Leu Pro Gly Met Cys Gly Gly Ala Leu Val
 1685 1690 1695
 Ser Ser Asn Gln Ser Ile Gln Asn Ala Ile Leu Gly Ile His Val Ala
 1700 1705 1710
 Gly Gly Asn Ser Ile Leu Val Ala Lys Leu Val Thr Gln Glu Met Phe
 1715 1720 1725
 Gln Asn Ile Asp Lys Lys Ile Glu Ser Gln Arg Ile Met Lys Val Glu
 1730 1735 1740
 Phe Thr Gln Cys Ser Met Asn Val Val Ser Lys Thr Leu Phe Arg Lys
 1745 1750 1755 1760
 Ser Pro Ile His His His Ile Asp Lys Thr Met Ile Asn Phe Pro Ala
 1765 1770 1775
 Ala Met Pro Phe Ser Lys Ala Glu Ile Asp Pro Met Ala Met Met Leu
 1780 1785 1790
 Ser Lys Tyr Ser Leu Pro Ile Val Glu Glu Pro Glu Asp Tyr Lys Glu
 1795 1800 1805
 Ala Ser Val Phe Tyr Gln Asn Lys Ile Val Gly Lys Thr Gln Leu Val
 1810 1815 1820
 Asp Asp Phe Leu Asp Leu Asp Met Ala Ile Thr Gly Ala Pro Gly Ile
 1825 1830 1835 1840
 Asp Ala Ile Asn Met Asp Ser Ser Pro Gly Phe Pro Tyr Val Gln Glu
 1845 1850 1855
 Lys Leu Thr Lys Arg Asp Leu Ile Trp Leu Asp Glu Asn Gly Leu Leu

				1860						1865				1870	
Leu	Gly	Val	His	Pro	Arg	Leu	Ala	Gln	Arg	Ile	Leu	Phe	Asn	Thr	Val
				1875						1880				1885	
Met	Met	Glu	Asn	Cys	Ser	Asp	Leu	Asp	Val	Val	Phe	Thr	Thr	Cys	Pro
				1890						1895				1900	
Lys	Asp	Glu	Leu	Arg	Pro	Leu	Glu	Lys	Val	Leu	Glu	Ser	Lys	Thr	Arg
1905						1910				1915				1920	
Ala	Ile	Asp	Ala	Cys	Pro	Leu	Asp	Tyr	Thr	Ile	Leu	Cys	Arg	Met	Tyr
				1925						1930				1935	
Trp	Gly	Pro	Ala	Ile	Ser	Tyr	Phe	His	Leu	Asn	Pro	Gly	Phe	His	Thr
				1940						1945				1950	
Gly	Val	Ala	Ile	Gly	Ile	Asp	Pro	Asp	Arg	Gln	Trp	Asp	Glu	Leu	Phe
				1955						1960				1965	
Lys	Thr	Met	Ile	Arg	Phe	Gly	Asp	Val	Gly	Leu	Asp	Leu	Asp	Phe	Ser
1970						1975				1980					
Ala	Phe	Asp	Ala	Ser	Leu	Ser	Pro	Phe	Met	Ile	Arg	Glu	Ala	Gly	Arg
1985						1990				1995				2000	
Ile	Met	Ser	Glu	Leu	Ser	Gly	Thr	Pro	Ser	His	Phe	Gly	Thr	Ala	Leu
				2005						2010				2015	
Ile	Asn	Thr	Ile	Ile	Tyr	Ser	Lys	His	Leu	Leu	Tyr	Asn	Cys	Cys	Tyr
				2020						2025				2030	
His	Val	Cys	Gly	Ser	Met	Pro	Ser	Gly	Ser	Pro	Cys	Thr	Ala	Leu	Leu
				2035						2040				2045	
Asn	Ser	Ile	Ile	Asn	Asn	Ile	Asn	Leu	Tyr	Tyr	Val	Phe	Ser	Lys	Ile
				2050						2055				2060	
Phe	Gly	Lys	Ser	Pro	Val	Phe	Phe	Cys	Gln	Ala	Leu	Arg	Ile	Leu	Cys
2065						2070				2075				2080	
Tyr	Gly	Asp	Asp	Val	Leu	Ile	Val	Phe	Ser	Arg	Asp	Val	Gln	Ile	Asp
				2085						2090				2095	
Asn	Leu	Asp	Leu	Ile	Gly	Gln	Lys	Ile	Val	Asp	Glu	Phe	Lys	Lys	Leu
				2100						2105				2110	
Gly	Met	Thr	Ala	Thr	Ser	Ala	Asp	Lys	Asn	Val	Pro	Gln	Leu	Lys	Pro
				2115						2120				2125	
Val	Ser	Glu	Leu	Thr	Phe	Leu	Lys	Arg	Ser	Phe	Asn	Leu	Val	Glu	Asp
				2130						2135				2140	
Arg	Ile	Arg	Pro	Ala	Ile	Ser	Glu	Lys	Thr	Ile	Trp	Ser	Leu	Met	Ala
2145						2150				2155				2160	
Trp	Gln	Arg	Ser	Asn	Ala	Glu	Phe	Glu	Gln	Asn	Leu	Glu	Asn	Ala	Gln
				2165						2170				2175	
Trp	Phe	Ala	Phe	Met	His	Gly	Tyr	Glu	Phe	Tyr	Gln	Lys	Phe	Tyr	Tyr
				2180						2185				2190	
Phe	Val	Gln	Ser	Cys	Leu	Glu	Lys	Glu	Met	Ile	Glu	Tyr	Arg	Leu	Lys
				2195						2200				2205	
Ser	Tyr	Asp	Trp	Trp	Arg	Met	Arg	Phe	Tyr	Asp	Gln	Cys	Phe	Ile	Cys
				2210						2215				2220	
Asp	Leu	Ser													
2225															

- <210> 13
- <211> 9416
- <212> ADN
- 5 <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Secuencia del virus de la Hepatitis C
- <400> 13

gccagccccc tgatgggggc gacactccac catgaatcac tcccctgtga ggaactactg 60
 tcttcacgca gaaagcgtct agccatggcg ttagtatgag tgtcgtgcag cctccaggac 120
 cccccctccc gggagagcca tagtggtctg cggaaaccgg gagtacaccg gaattgccag 180
 gacgaccggg tcctttcttg gataaacccg ctcaatgcct ggagatttgg gcggtgcccc 240
 gcaagactgc tagccgagta gtgttgggtc gcgaaaggcc ttgtgggtact gcctgatagg 300
 gtgcttgcca gtgccccggg aggtctcgtg gaccgtgcac catgagcaag aatcctaacc 360
 ctcaaagaaa aaccaaactg aacaccaacc gtgcgccaca ggacgtcaag tccccgggtg 420
 gcggtcagat cgttggtgga gtttacttgt -tgccgcgcag gggccctaga ttgggtgtgc 480
 gcgcgacgag gaagacttcc gagcggtcgc aacctcgagg tagacgtcag cctatcccc 540
 aggcacgtcg gcccgagggc aggacctggg ctccagcccg gtacccttgg cccctctatg 600
 gcaatgaggg ttgcgggtgg gcgggatggc tctctgtctcc ccgtggctct cggcctagct 660
 ggggccccac agacccccgg cgtaggctgc gcaatttggg taaggtcac gataccctta 720
 cgtgcccgtt cgcgcacctc atggggatca taccgctcgt cggcgcacct cttggaggcg 780
 ctgccagggc cctggcgcac ggcgtccggg ttctggaaga cggcgtgaac tatgcaacag 840
 ggaaccttcc tggttgctct ttctctatct tcttctggc cctgctctct tgccctgactg 900
 tgcccgttcc agcctaccaa gtgcgcaatt cctcggggct ttaccatgtc accaatgatt 960
 gccctaactc gactgttggg tacgaggcgg ccgatgccat cctgcacact ccgggggtgtg 1020
 tcccctgctg tcgcgagggt aacgcctcga ggtgttgggt ggcggtgacc cccacgggtg 1080
 ccaccagggc cggcaaacct cccacaacgc agcttcgacg tcatatcgat ctgcttctg 1140
 ggagcggcac cctctgctcg gccctctacg tgggggacct gtgcgggtct gtcttcttg 1200
 ttggtcaact gtttaccttc tctcccaggc accactggac gacgcaagac tgcaattgtt 1260
 ctatctatcc cggccatata acgggtcabc gcatggcatg gaatatgat atgaactgg 1320
 cccctacggc agcgttgggt gtagctcagc tgctccgaat cccacaagcc atcatggaca 1380
 tgatcgctgg cgcacctggg ggagtcctgg cgggcataaa gtatttctcc atggtgggga 1440
 actgggcgaa ggtcctggta gtgctgctgc tatttgccgg cgtcgacgcg gaaaccacg 1500
 tcaccggggg aaatgcgggc cgcaccacgc ctgggcttgt ttggtctcct acaccaggcg 1560
 ccaagcagaa catccaactg atcaacacca acggcagttg gcacatcaat agcacggcct 1620
 tgaactgcaa tgaagcctt aacaccgggt ggttagcagg gctctctat cagcacaat 1680
 tcaactcttc agcctgtcct gagaggctg ccagctgccg acgccttacc gattttgccc 1740
 agggctgggg tctatcagt tatgccaacg gaagcggcct cgacgaacgc ccctatgct 1800
 ggcactacc tccaagacct tgtggcattg tgcccgcaa gagcgtgtgt ggcccgggtat 1860
 attgcttcc tcccagcccc gtgggtgggt gaacgaccga caggctgggc gcgcctacct 1920
 acagctgggg tgcaaatgat acggatgtct tcgtccttaa caacaccagg ccaccgctgg 1980
 gcaattgggt cggttgtacc tggatgaact caactggatt caccaaagtg tgccggagcg 2040
 ccccttgtgt catcggaggg gtgggcaaca acacctgct ctgccccact gattgcttcc 2100
 gcaaatatcc ggaagccaca tactctcggg gcggctccgg tcccaggatt acaccagggt 2160
 gcatggtcga ctacccgat aggccttggc actatccttg taccatcaat tacaccatat 2220
 tcaaagttag gatgtacgtg ggaggggtcg agcacaggct ggaagcggcc tgcaactgga 2280
 cgcggggcga acgctgtgat ctggaagaca gggacaggtc cgagctcagc ccgttgcctg 2340
 tgtccaccac acagtggcag gtccttccgt gttcttccac gacctgcca gccttgtcca 2400
 ccggcctcat ccacctccac cagaacattg tggacgtgca gtactgtac ggggtagggt 2460
 caagcaterc gtccctgggc attaatggg agtacgtcgt tctcctgttc cttctgctt 2520
 cagacgcgcg cgtctgttcc tgccttggga tgatgttact catatccca gcgaggcg 2580
 ctttgagaaa cctcgttaata ctcaatgcag catccctggc cgggacgcac ggtcttgtg 2640
 ccttctcctg gtctctctgc tttgcgtggt atctgaagg taggtgggtg cccggagcgg 2700
 tctacgccct ctacgggatg tggcctctcc tctgctcct gctggcgtt cctcagcggg 2760
 catacgcact ggacacggag gtggccgcgt cgtgtggcgg cgttgttctt gtcgggttaa 2820
 tggcgtgac tctgtgcca tattacaag gctatatcag ctggtgcatg tgggtgctc 2880
 agtattttct gaccagagta gaagcgcac tgcacgtgtg ggttcccccc ctcaacgtcc 2940
 gggggggcgc cgatgcccgc atcttactca cgtgtgtagt acaccggcc ctggtattt 3000
 acatcaccaa actactcctg gccatcttcc gaccttctg gattcttcaa gccagtttgc 3060
 ttaaagtccc ctacttctg cgcgttcaag gcttctccg gatctgcgc ctagcgcgga 3120

ES 2 371 936 T3

agatagccgg aggtcattac gtgcaaat^ggg ccatcatcaa gttagggggc cttactggca 3180
 cctgtgtgta taaccatctc gtcctctctc gagactgggc gcacaacggc ctgcgagatc 3240
 tggccgtggc tgtggaacca gtctctctct cccgaatgga gaccaagctc atcacgtggg 3300
 gggcagatac cgccgcgtgc ggtgacatca tcaacggctt gcccgctctc gcccgtaggg 3360
 gccaggagat actgcttggg ccagccgacg gaatggctct caaggggtgg aggttgctgg 3420
 cgcccatcac ggcgtagccc cagcagacga gaggcctcct aggggtgata atcaccagcc 3480
 tgactggccg ggacaaaaac caagtggagg gtgaggtcca gatcgtgtca actgctaccc 3540
 agaccttctt ggcaacgtgc atcaatgggg tatgctggac tgtctaccac ggggcccggaa 3600
 cgaggaccat cgcatacccc aagggtcctg tcatccagac gtataccaat gtggatcaag 3660
 acctcgtggg ctggcccgtc cctcaagggt cccgctcatt gacaccctgc acctgcccgt 3720
 cctcggacct ttacctggtc acgaggcacg ccgatgtcat tcccgctgcg cggcgagggtg 3780
 atagcagggg tagcctgctt tcgccccggc ccatttctta cttgaaaggc tctcgggggg 3840
 gtccgctgtt gtgccccacg ggacacgcgc tgggctatt cagggcccgc gtgtgcaccc 3900
 gtggagtggc taaggcgggtg gactttatcc ctgtggagaa cctagagaca acctagagat 3960
 ccccggtgtt caccggacaac tcctctccac cagcagtgcc ccagagcttc caggtggccc 4020
 acctgcatgc tcccaccggc agcggtaaga gcaccaaggt cccggctgcg cccggcaca 4080
 agggctacaa ggtgttgggt ctcaaccct ctgttctgc aacactgggc tttgggtcct 4140
 acatgtccaa ggcccatggg gttgatccta atatcaggac cggggtgaga acaattacca 4200
 ctggcagccc catcacgtac tccacctacg gcaagttcct tgccgaogcc ggggtgctcag 4260
 gaggtgctta tgacataata atttgtgacg agtgccactc cacggatgcc acatccatct 4320
 cgggcatcgg cactgtcctt gaccaagcag agactgcggg ggcgagactg gttgtgctcg 4380
 ccactgctac cctcctgggc tccgtcactg tgtcccatcc taacatcgag gaggttgctc 4440
 tgtccaccac cggagagatc ccttttta^gg gcaaggctat cccctcagag gtgatcaagg 4500
 ggggaagaca tctcatcttc tgccactcaa agaagaagtg cgacgagctc gccgcgaagc 4560
 tggctgcatt gggcatcaat gccgtggcct actaccgcgg tcttgacgtg tctgtcatcc 4620
 cgaccagcgg cgatgttctc gtctgtctga ccgatgctct catgactggc tttaccggcg 4680
 acttcgactc tgtgatagac tgcaaacacgt gtgtcactca gacagtogat tttagccttg 4740
 accctacctt taccattgag acaaccacgc tccccagga tgctgtctcc aggactcaac 4800
 gccggggcag gactggcagg ggggaagccag gcatctatag atttgtggca cggggggagc 4860
 gccctccgg catgttcgac togtccgtcc tctgtgagtg ctatgacgcg ggtgtgctt 4920
 ggtatgagct cacgcccggc gagactacag ttaggtacg agcgtacatg aacaccccgg 4980
 ggcttccgt gtgccaggac catcttggat tttgggaggg cgtctttacg ggcctcactc 5040
 atatagatgc ccactttcta tcccagacaa agcagagtgg ggagaacttt ccttacctgg 5100
 tagcgtacca agccaccgtg tgcgttaggg ctcaagccc tccccatcg tgggacatac 5160
 tgcggaagtg tttgatccgc cttaaaccba cctccatgg gccaacacc ctgctataca 5220
 gactgggggc tgttcagaat gaagtcaccc tgacgcaccc aatcaccaaa tacatcatga 5280
 catgcatgtc ggccgacctg gaggtcgtca cgagcacctg ggtgctcgtt gggggcgtcc 5340
 tggctgctct ggccgcgtat tgctgtcaa caggctgctg ggtcatagtg ggcaggatcg 5400
 tcttgtccgg gaagccggca attatacctg acagggaggt tctctaccag gagttcagat 5460
 agatggaaga gtgctctcag cacttacctg acatcgagca agggatgatg ctcgctgagc 5520
 agttcaagca gaaggccctc ggctcctgc agaccgcgtc ccgccatgca gaggttatca 5580
 ccctgctgtt ccagaccaac tggcagaaac tcgaggtctt ttgggcgaag cacatgtgga 5640
 atttcatcag tgggatacaa tacttggcgg gccctgtcaac gctgcctggg aaccccgcc 5700
 ttgcttcatt gatggctttt acagctgccg tcaccagccc actaaccact ggccaaacc 5760
 tcctcttcaa catattgggg ggggtgggtg ctgcccagct cgcgcctccc ggtgccccta 5820
 cgcctttgt gggcgctggc ttagctggg^g ccgcactcga cagcgttggga ctggggaagg 5880
 tcctcgtgga cattcttgca ggctatggcg cgggcgtggc gggagctctt gtggcattca 5940
 agatcatgag cggtgaggtc cctccacgg aggacctggg caatctgctg cccgccatcc 6000
 tctcacctgg agcccttgca gtccgtgtgg tctttgcate aatactgcgc cggcgtgttg 6060
 gcccgggcga gggggcagtg caatggatga accggcta^{at} agccttcgcc tcccggggga 6120
 accatgtttc ccccacacac tacgtgccgg agagcgatgc agccgcccgc gtcactgcc 6180
 tactcagcag cctcactgta acccagctcc tgaggcgact gcatcagtgg ataagctcgg 6240
 agtgtaacc^a tccatgctcc ggttccctggc taaggacat ctgggactgg atatcgaggg 6300
 tctgagcga ctttaagacc tggctgaaag ccaagctcat gccacaactg cctgggatcc 6360
 cctttgtgtc ctgccagcgc gggatatagg ggtctggtgg aggagacggc attatgcaca 6420

```

ctcgtgcca ctgtggagct gagatcactg gacatgtcaa aaacgggacg atgaggatcg 6480
teggtcctag gacctgcaag aacatgtgga gtgggacgtt ctccattaat gcctacacca 6540
cgggcccctg tactcccctt cctgcgccga actataagtt cgcgctgtgg aggggtgtctg 6600
cagaggaata cgtggagata aggcgggtgg gggacttcca ctacgtatcg ggcatgacta 6660
ctgacaatct caaatgcccg tgccagatcc catcgcccga atttttcaca gaattggacg 6720
gggtgcgccct acataggttt gcgcccctt gcaagccctt gctgcgggag gaggtatcat 6780
tcagagtagg actccacgag tacccggtgg ggtcgcaatt accttgcgag cccgaaccgg 6840
acgtagccgt gttgacgtcc atgetcactg atocctccca tataacagca gaggcggccg 6900
ggagaaggtt ggcgagaggg tcaccccctt ctatggccag ctccctcggt agccagctgt 6960
ccgctccatc tctcaaggca acttgcaccg ccaaccatga ctcccctgac gccgagctca 7020
tagaggctaa cctcctgtgg aggcaggaga tgggcgga catcaccagg gttgagtcat 7080
agaacaaagt ggtgattctg gactcctctg atccgcttgt ggcagaggag gatgagcggg 7140
aggtctccgt acccgcagaa attctgcgga agtctcggag attcgccccca gccctgcccg 7200
tctgggcccg gccggactac aaccccctgc tagtagagac gtggaaaaag cctgactacg 7260
aaccacctgt ggtccatggc tgcccgtac cacctccacg gtcccctcct gtgcccctcg 7320
ctcggaaaaa gcgtaagggt gtccctcaccg aatcaaccct acctactgcc ttggccgagc 7380
ttgccaccaa aagttttggc agctcctcaa ctccggcat tacgggagac aatacgaca 7440
catcctctga gcccgcccct tctggctgcc ccccagctc cgacgttgag tccattctt 7500
ccatgcccc cctggagggg gagcctgggg atccggatct cagcgacggg tcatggtcga 7560
cggtcagtag tggggccgac acggaagatg tctgtgtctg ctcaatgtct tattcctgga 7620
caggcgcact cgtcaccccg tgcgctcggg aggaacaaaa actgcccatc aacgcactga 7680
gcaactcgtt gctacgccat cacaatctgg tgtattccac cacttcaagc agtgcttgcc 7740
aaaggaagaa gaaagtcaca tttgacagac tgcaagttct ggacagccat taccaggacg 7800
tgctcaagga ggtcaaagca gcggcgtcaa aagtgaaggc taacttgcta tccgtagagg 7860
aagcttgca cctgggccc ccacattcag ccaaatccaa gtttggtat ggggcaaaag 7920
acgtccgttg ccatgccaga aaggccgtag cccacatcaa ctccgtgtgg aaagacctc 7980
tggaagacag tgtaacacca atagacacta ccatcatggc caagaacgag gttttctgcg 8040
ttcagcctga gaaggggggt cgtagccag ctctctcat cgtgttcccc gacctggcg 8100
tgcgctgtg cgagaagatg gccctgtacg acgtggttag caagctcccc ttggccgtga 8160
tgggaagctc ctacggatcc caatactcac caggacagcg ggttgaattc ctctgcaag 8220
cgtggaagtc caagaagacc ccgatggggc tctcgtatga taccgctgt tttgactcca 8280
cagtcactga gagcgacatc cgtacggagg aggcaattta ccaatgttgt gacctggacc 8340
cccaagccc cgtggccatc aagtcctca ctgagaggct ttatggtggg ggcctctta 8400
ctaattcaag gggggaaaac tgcggctacc gcaggtgccg cgcgagcaga gtactgacaa 8460
ctagctgtgg taacaccctc actcgtaca tcaaggcccg ggcagcctgt cgagccgcag 8520
ggctccagga ctgcaccatg ctctgtgtg ggcagcactt agtctgtatc tgtgaaagtg 8580
cgggggtcca ggaggacgcy gcgagcctga gagccttccac ggaggctatg accaggctact 8640
ccgccccccc cggggacccc ccacaaccag aatacagact ggagcttata acatcatgct 8700
ctccaacgt gtcagtcgcc cagcagggcy ctggaaagag ggtctactac cttaccctg 8760
accctacaac cccctcgcg agagccgct gggagacagc aagacacact ccagtcaatt 8820
cctggctagg caacataatc atgtttgcc ccacactgtg ggcgaggatg atactgatga 8880
cccacttctt tagcgtctc atagccagg atcagcttga acaggctctc aactgcgaga 8940
tctacggagc ctgctactcc atagaaccac tggatctacc tccaatcatt caaagactcc 9000
atggcctcag cgcattttca ctccacagtt actctccagg tgaatataat aggggtggccg 9060
catgcctcag aaaacttggg gtcccgcct tgcgagcttg gagacaccgg gcctggagcg 9120
tccgctag gcttctggcc agaggaggca aggctgccat atgtggcaag tacctcttca 9180
actgggcagt aagaacaaaag ctcaaactca ctccgataac ggccgctggc cggtggact 9240
tgtccggctg gttcacggct ggctacagcg ggggagacat ttatcacage gtgtctcatg 9300
cccgccccg ctggttctgg ttttgctac tccctgctgc tgcaggggta ggcactctacc 9360
tctccccaa ccgatgaaga ttgggctaac cactccaggc caataggcca ttcct 9416

```

- <210> 14
- <211> 3182
- <212> ADN
- 5 <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Secuencia del virus de la Hepatitis B
- <400> 14

ES 2 371 936 T3

aattccacaa	cettccacca	aactctgcaa	gatcccagag	tgagaggcct	gtatttcct	60
gctgggtggt	ccagttcagg	aacagtaaac	cctgttctga	ctactgcctc	tcccttatcg	120
tcaatcttct	cgaggattgg	ggaccctgcg	ctgaacatgg	agaacatcac	atcaggattc	180
ctaggacccc	ttctcgtggt	acaggcgggg	tttttcttgt	tgacaagaat	cctcacaata	240
ccgcagagtc	tagactcgtg	gtggacttct	ctcaattttc	tagggggaac	taccgtgtgt	300
cttggccaaa	attcgcagtc	cccaacctcc	aatcaactcac	caacctcttg	tcctccaact	360
tgctcctggt	atcgcctggat	gtgtctgcgg	cgttttatca	tcttctctct	catcctgctg	420
ctatgcctca	tcttcttgggt	ggttcttctg	gactatcaag	gtatgttgcc	cgtttgcct	480
ctaattccag	gatcctcaac	aaccagcaag	ggaccatgcc	ggacctgcat	gactactgct	540
caaggaacct	ctatgtatcc	ctcctgttgc	tgtaccaaac	cttcggacgg	aaattgcacc	600
tgtattocca	tcccatcctc	ctgggcttcc	ggaaaattcc	tatgggagtg	ggcctcagcc	660
cgtttctcct	ggctcagttt	actagtgcca	tttgttcagt	ggttcgtagg	gctttcccc	720
actgtttggc	tttcagttat	atggatgatg	tggtattggg	ggccaagtct	gtacagcatc	780
ttgagtcctt	ttttaccgct	gttaccaatt	ttcttttgtc	tttgggtata	catttaaacc	840
ctaacaaaac	aaagagatgg	ggttactctc	taaattttat	gggttatgtc	attggatggt	900
atgggtcctt	gccacaagaa	cacatcatac	aaaaaatcaa	agaatgtttt	agaaaacttc	960
ctattacacag	gcctattgat	tggaaagtat	gtcaacgaat	tgtgggtcct	ttgggttttg	1020
ctgccccttt	tacacaatgt	ggttatcctg	cgttgatgcc	tttgtatgca	tgtattcaat	1080
ctaagcaggc	tttcaactttc	tgcaccaactt	acaaggcctt	tctgtgtaaa	caatacctga	1140
acctttacc	cgttgcccgg	caacggccag	gtctgtgcca	agtgtttgct	gacgcaacct	1200
ccactggctg	gggcttggtc	atgggccatc	agcgcctgcg	tggaaacctt	tgggctctc	1260
tgccgatcca	tactgcccga	ctcctagccg	cttgttttgc	tgcagcagg	tctggagcaa	1320
acattatcgg	gactgataac	tctgttctcc	tatcccgcaa	atatacatcg	tttccatggc	1380
tgctaggctg	tgctgccaac	tggatcctgc	gogggacgct	ctttgtttac	gtcccgtcgg	1440
cgctgaatcc	tgccgacgac	ccttctcggg	gtcgttggg	actctctcgt	ccccttctcc	1500
gtctccggtt	ccgaccgacc	acggggcgca	cctctcttta	cgccgactcc	ccgtctgtgc	1560
cttctcatct	gcccggaccgt	gtgcactctg	gtcaccctct	gcacgtcgca	tgagaccac	1620
cgtgaacgcc	caccaaatac	tgcaccaagt	cttacataag	aggactcttg	gactctcagc	1680
aatgtcaacg	accgaacctg	aggcatactt	caaagactgt	ttgtttaaag	actgggagga	1740
gttggggggg	gagattaggt	taaaggtcct	tgtactagga	ggctgtaggc	ataaattggt	1800
ctgcccacca	gcaccatgca	actttttcac	ctctgcctaa	tcactctctg	ttcatgtcct	1860
actgttcaag	cctccaagct	gtgccttggg	tggccttggg	gcatggacat	cgacccttat	1920
aaagaatttg	gagctactgt	ggagttactc	tgcgttttgc	cttctgactt	ctttccttca	1980
gtacgagatc	ttctagatac	cgccctcagct	ctgtatcggg	aagccttaga	gtctcctgag	2040
cattgttcac	ctcaccatac	tgcactcagg	caagcaattc	tttgcctggg	ggaactaatg	2100
actctagcta	ctcgggtggg	tgttaatttg	gaagatccag	cgtctagaga	cctagtagtc	2160
agttatgtca	acactaatat	ggccttaaag	tccaggcaac	tcttgtgggt	tcacatttct	2220
tgtctcactt	ttggaagaga	aacagttata	gagtatgttg	tgtcttctcg	agtgtggatt	2280
cgcaactctc	cagcttatag	accaccaa	gcccctatcc	tatcaaacct	tccggagact	2340
actgttggtt	gacgacgagg	caggtcccct	agaagaagaa	ctccctcgcc	tgcagacga	2400
aggctctcaat	cgccgcgtcg	cagaagatct	caatctcggg	aatctcaatg	ttagtattcc	2460
ttggactcat	aagggtgggga	actttactgg	gctttattct	tctactgtac	ctgtctttaa	2520
tcctcattgg	aaaacaccat	cttttcttaa	tatacattta	caccaagaca	ttatcaaaaa	2580
atgtgaacag	tttgtaggcc	cactcacagt	taatgagaaa	agaagattgc	aattgattat	2640
gcctgccagg	ttttatccaa	aggttaccaa	atattttacca	ttggataagg	gtattaaacc	2700
ttattatcca	gaacatctag	ttaatcatta	cttccaaact	agacactatt	tacacactct	2760
atggaaggcg	ggtatattat	ataagagaga	aaacacacat	agcgcctcat	tttgtgggtc	2820
accatattct	tgggaacaag	atctacagca	tggggcagaa	tctttccacc	agcaatcctc	2880
tggtattctt	tcccgaccac	cagttggatc	cagccttcag	agcaaacacc	gcaaatccag	2940
attgggactt	caatcccaac	aaggacacct	ggccagacgc	caacaaggta	ggagctggag	3000
cattcgggct	gggtttcacc	ccaccgcacg	gaggcctttt	gggggtggagc	cctcaggctc	3060
agggcatact	acaaactttg	ccagcaaatc	cgctctctgc	ctccaccaat	cgccagtcag	3120
gaaggcagcc	taccccgtg	tctccacctt	tgagaaacac	tcactctcag	gccatgcagt	3180
gg						3182

<210> 15
 <211> 7478
 <212> ADN

5

ES 2 371 936 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia del virus de la Hepatitis A

<400> 15

```

ttcaagaggg gtctccggag gtttccggag cccctottgg aagtccatgg tgaggggact 60
tgatacctca ccgccgtttg cctaggetat aggetaaatt tcccttccc tgtccctccc 120
ttatttccct ttgttttgct tgtaaatatt aattcctgca gggtcagggg tctttaatct 180
gtttctctat aagaacactc aattttcacg ctttctgtct tctttcttcc agggctctcc 240
ccttgcccta ggctctggcc gtgcgcccg ggggggtcaa ctccatgatt agcatggagc 300
tgtaggagtc taaattgggg acgcagatgt ttgggacgtc acctgcagt gttaaacttg 360
ctctcatgaa cctctttgat cttccacaag ggttaggcta cgggtgaaac ctcttaggct 420
aatacttcta tgaagagatg ctttggatag ggtaacagcg gcggatattg gtgagttggt 480
aagacaaaaa ccattcaacg ccggaggact ggctctcatc cagtggatgc attgagtgga 540
ttgattgtca gggctgtctc taggtttaat ctcagacctc tctgtgctta gggcaaacac 600
catttgccct taaatgggat cctgtgagag ggggtccctc cattgacagc tggactgttc 660
tttggggcct tatgtggtgt ttgcctctga ggtactcagg ggcatttagg ttttccctca 720
ttcttaaaca ataatgaata tgtccaaaaca aggaattttc cagactgttg ggagtgccct 780
tgaccacatc ctgtccttgg cagatattga ggaagagcaa atgattcagt ccgttgatag 840
gactgcagtg actggagcct cttacttccac ttctgtggac caatctcag ttcatactgc 900
tgaggttggc tcacatcaaa ttgaaacctt gaaaacctct gttgataaac ctggttctaa 960
gaaaactcag ggggaaaagt ttttctgat- tcattctgct gattggctca ctacacatgc 1020
tctctttcat gaagtgtgcaa aattggatgt ggtgaaacta ctgtataatg agcagtttgc 1080
cgtccaaggt ttgttgagat accatacata tgcaagattt ggcattgaga ttcaagttca 1140
gataaatccc acaccctttc agcaaggagg actaatttgt gccatggttc ctgggtacca 1200
aagttatggt tcaatagcat ccttgactgt ttatcctcat ggtctgttaa attgcaatat 1260
caacaatgta gttagaataa aggttccatt tatttatact agaggtgctt atcattttaa 1320
agatccacag taccagttt ggggaattgac aatcagagtt tggtcagagt tgaatattgg 1380
aacaggaact tcagcttaca ctctactcaa tgttttagct aggtttacag atttgagtt 1440
gcatggatta actcctcttt ctacacagat gatgagaaat gaatttaggg tcagtactac 1500
tgaaaatggt gtaaatttgt caaattatga agatgcaagg gcaaaaatgt cttttgcttt 1560
ggatcaggaa gattggaagt ctgatccttc ccaagggtgg ggaattaaaa ttactcattt 1620
tactacctgg acatccattc caaccttagc tgctcagttt ccatttaatg cttcagattc 1680
agttggacaa caaattaaag ttattccagt ggaccatac tttttcaaaa tgacaaacac 1740
taatcctgat caaaaatgta taactgcctt ggctcttatt tgtcagatgt tctgcttttg 1800
gaggggagat cttgtttttg attttcaggt ttttccaacc aaatatcatt caggtagact 1860
gttgttttgt tttgttcctg ggaatgagtt aatagatggt actggaatta cattaaaaca 1920
ggcaactact gctccttggt cagtgatgga cattacagga gtgcagtcaa ccttgagatt 1980
tcgtgttctt tggatttctg atacacctta tcgagtgaat aggtacacga agtcagcaca 2040
tcaaaaaggt gagtacactg ccattgggaa gcttattgtg tattgttata acagactgac 2100
ttctccttct aatgttgccct ctcatgttag agttaatggt tatctttcag caattaattt 2160
ggaatgtttt gctcctcttt accatgctat ggatgttact acacaggttg gagatgattc 2220
aggaggtttc tcaacaacag tttctacaga gcagaatggt cctgatcccc aagttgggat 2280
aacaaccatg agggatttaa aaggaaaagc caatagggga aagatggatg tttcaggagt 2340

```

gcaagcacct cgtgggagct atcagcaaca attgaacgat ccagtttttag caaagaaagt 2400
acctgagaca tttcctgaat tgaagcctgg agagtccaga catacatcag atcacatgtc 2460
tatttataaa ttcattgggaa ggtctcattt tttgtgcact tttactttca attcaaataa 2520
taaagagtac acatttccaa taacctgtc ttcgacttct aatcctcctc atggtttacc 2580
atcaacatta aggtggttct tcaatttggt tcagttgtat agaggacat tggatttaac 2640
aattataatc acaggagcca ctgatgtgga tggatggcc tggtttactc cagtgggcct 2700
tgctgtcgac ccttgggtgg aaaaggagtc agctttgtct attgattata aaactgccct 2760
tggagctggt agatttaata caagaagaac aggaaacatt caaattagat tgcctgggta 2820
ttcttatttg tatgccgtgt ctggagcact ggatggcttg ggggataaga cagattctac 2880
atgttgattg tttctattcg agattgcaaa ttacaatcat tctgatgat atttgcctt 2940
cagttgttat ttgtctgtca cagagcaatc agagttctat tttcctagag ctccattaaa 3000
ttcaaatgct atgttgtcca ctgaatccat gatgagtaga attgcagctg gagacttgga 3060
gtcatcagtg gatgatccca gatcagagga ggatagaaga ttgagagtc atatagaatg 3120
taggaaacca tcaaaagaat tgagactgga ggttgggaaa caaagactca aatattgctca 3180
ggaagagtta tcaaatgaag tgcttccacc tcctaggaaa atgaaggggt tattttcaca 3240
agctaaaatt tctctttttt atactgagga gcatgaaata atgaagtttt ctgggagagg 3300
agtgactgct gatactaggg ctttgagaag atttggattc tctctggctg ctggtagaag 3360
tgtgtggact cttgaaatgg atgctggagt tcttactgga agattgatca gattgaatga 3420
tgagaaatgg acagaaatga aggatgataa gattgtttca ttaattgaaa agttcacaag 3480
caataaatat tgggtctaaag tgaattttcc acatggaatg ttggatcttg aagaaattgc 3540
tgccaattct aaggattttc caaatatgtc tgagacagat ttgtgtttcc tgttacattg 3600
gctaaatcca aagaaaatca atttagcaga tagaatgctt ggattgtctg gatgacagga 3660
aattaagaaa cagggtgttg gactgatagc agagtgtaga actttcttgg attctattgc 3720
tgggactttg aaatctatga tgtttgggtt tcatcattct gtgactgttg aaattataaa 3780
tactgtgctt tgttttggtt agagtggaaat cctgctttat gtcatacaac aattgaacca 3840
agatgaacac tctcacataa ttggtttggt gagagttatg aattatgcag atattggctg 3900
ttcagttatt tcatgtggta aagttttttc caaaatggtt gaaacagttt ttaattggca 3960
aatggattct agaattgatg agctgaggac tcagagcttc tctaattggg taagagatat 4020
ttgttcagga attactattt ttaaagttt taaggatgcc atatatggg tatatacaaa 4080
attgaaggat ttttatgaag taaattatgg caagaaaaag gatattctta atattctcaa 4140
agataatcag caaaaaatag aaaaagccat tgaagaagca gacaattttt gcattttgca 4200
aattcaagat gttagagaaat ttgatcagta tcagaaaggg gttgatttaa taaaaagct 4260
gagaactgtc cattcaatgg cgcaagttga cccaatttg ggggttcatt tgcacctct 4320
cagagattgc atagcaagag tccacaaaaa gctcaagaat cttggatcta taaatcaggc 4380
catggtaaca agatgtgagc cagtgtgttg ctatttgtat ggcaaaagag ggggagggaa 4440
aagcttgact tcaattgcat tggcaaccaa aatttgtaaa cactatggtg ttgaacctga 4500
gaaaaatatt tacaccaaac ctgtggcctc agattattgg gatggatata gtggacaatt 4560
agtttgcatt attgatgata ttggccaaaa cacaacagat gaagattggg cagatttttg 4620
tcaattagtg tcaggatgcc caatgagatt gaatatggct tctctagagg agaagggcag 4680
acatttttcc tctcctttta taatagcaac ttcaaatgg tcaaatccaa gtccaaaaac 4740
agtttatggt aaggaagcaa ttgatcgtag gcttcatttt aaggttgaag ttaacctgc 4800
ttcatttttt aaaaatctc acaatgatg gttgaatggt aatttggcca aaacaaatga 4860
tgcaattaag gacatgtctt gtgttgattt aataatggat ggacacaata tttcattgat 4920
ggatttactt agttccttag tgatgacagt tgaattagg aaacagaata tgagtgaatt 4980
catggagttg tggctcagg gaatttcaga tgatgacaat gatagtgcag tggctgagt 5040
tttccagctc tttccatctg gtgaaccatc aatttggag ttatctagt ttttccaatc 5100
tgtcactaat cacaaagtggg ttgctgtggg agctgcagtt ggcattcttg gagtgcctgt 5160
gggaggatgg tttgtgtata agcatttttc ccgcaaaag gaagaaccaa tccagctga 5220
aggggtttat catggcgtga ctaagcccaa acaagtgatt aaattggatg cagatccagt 5280
agagtccag tcaactctag aaatagcagg attagttagg aaaaatctgg ttcagtttg 5340
agttggtgag aaaaatggat gtgtgagatg ggtcatgaaat gccttaggag tgaaggatga 5400
ttgttggtta gtacctctc atgcttataa atttgaaaag gattatgaaa tgatggagtt 5460
ttacttcaat agaggtggaa ctactattc aatttcagct ggtaatgttg ttattcaatc 5520
tttagatgtg ggatttcaag atgttggttt aatgaaggtt cctacaattc ccaagtttag 5580
agatattact caacacttta ttaagaaagg agatgtgcct agagccttaa atcgcttggc 5640

ES 2 371 936 T3

aacattagtg acaaccggtta atggaactcc tatgttaatt tctgagggac cattaagat 5700
 ggaagaaaaa gccacttatg ttcataagaa gaatgatggt actacagttg atttgactgt 5760
 agatcaggca tggagaggaa aaggctgaag tcttcctgga atgtgtggtg gggccctagt 5820
 gtcatacaat cagtccatac agaatgcaat tttgggtatt catgttgctg gagaaaattc 5880
 aattcttctg gcaaagctgg ttactcaaga aatgtttcaa aacattgata agaaaattga 5940
 aagtcagaga ataatgaaag tggaaattac tcaatgttca atgaatgtag tctccaaaac 6000
 gcttttttaga aagagtccca ttcatacaca cattgataaa accatgatta attttctctg 6060
 agctatgcct tctctctaaag ctgaaattga tccaatggct atgatgttgt ccaaatattc 6120
 attacctatt gtggaggaac cagaggatta caaggaagct tcagtttttt atcaaaaaca 6180
 aatagtaggc aagactcagc tagttgatga ctttttagat cttgatattg ctattacagg 6240
 ggctccaggc attgatgcta tcaatatgga ttcactctct gggtttctct atgttcaaga 6300
 aaaattgacc aaaagagatt taatttggtt ggatgaaaat ggtttgctgt taggagttca 6360
 cccaagattg gccagagaa ttttatttaa tactgtcatg atggaaaatt gttctgactt 6420
 agatgttgtt tttaacaact gtccaaaaga tgaattgaga ccattagaga aagttttgga 6480
 atcaaaaaca agagccattg atgcttctcc tttggattat acaattctat gtcgaatgta 6540
 ttgggtcca gctatcagtt atttccattt gaatccaggg tttcacacag gtgttgctat 6600
 tggcatagat cctgatagac agtgggatga attatttaa acaatgataa gatttgagga 6660
 tgttggtctt gatttagatt tctctgcttt tgatgccagt cttagtccat ttatgattag 6720
 ggaagcaggt agaatcatga gtgaattatc tggaaacacca tctcattttg gaacagctct 6780
 tatcaatact atcattttat ctaaaccatct gctgtacaac tgtttgttatc atgtttgtgg 6840
 ttcaatgcct tctgggtctc cttgcacagc tttgttgaat tcaattatta ataataataa 6900
 tctgtattat gtgttttcta aaatatttg aaagtctcca gttttctttt gtcaagcttt 6960
 gaggatcctt tgttacggag atgatgtttt gatagttttt tccagagatg ttcaaattga 7020
 caatcttgac ttgattggac agaaaattgt agatgagttc aaaaaacttg gcatgacagc 7080
 cacctcagct gataaaaatg tgcctcaact gaagccagtt tcagaattga cttttctcaa 7140
 aagatcttcc aatttggtgg aggatagaat tagacctgca atttcagaaa agacaatttg 7200
 gtctttgatg gcttggcaga gaagtaacgc tgagtttgag cagaatttag aaaatgctca 7260
 gtggtttgct tttatgcatg gctatgagtt ctatcagaaa ttttattatt ttgttcagtc 7320
 ctgtttggag aaagagatga tagaatatag acttaaatct tatgattggt ggagaatgag 7380
 attttatgac cagtgtttca tttgtgacct ttcattgatt gtttaaaaaa attttcttac 7440
 tctttctgag gtttgtttat tcttttctc cgctaact 7478

<210> 16

<211> 2061

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Región codificante de NS3/4A del virus de la Hepatitis C

<400> 16

atggcgcta tcacggccta tgcccagcag acaaggggcc ttttgggatg cataatcacc 60
 agcttgaccg gccgggacaa aaaccagggtg gagggtgagg ttcagatcgt gtcaactgct 120
 gccagactt tcttggcaac ctgcattaa- ggggtgtggt ggactgtcta ccatggagcc 180
 ggaacaagga ccattgcgtc acctaagggt cctgttatcc agatgtacac caatgtggac 240
 caagacctcg taggctggcc cgtcccca ggtgcccgt cattaacacc atgcacttgc 300
 ggctectcgg acctttacct ggtcacgagg cacgccgatg tcattcctgt gcgcccagcg 360
 ggtgatggca ggggcagcct gcttctgccc cggcctatct ctacttgaa aggctcctcg 420
 ggaggccctc tgctgtgccc cgcaggacat gccgtaggca tattcagagc cgcggtatgc 480
 acccgtaggag tggctaaggc ggtggacttc atccccgtag agagcttaga gacaacctg 540
 aggtccccgg tgttctcaga caactcctcc ccaccagcag tgccccagag ctaccaagtg 600
 gccacactgc atgctccac cggcagcggg aagagcacca aggtccccgc cgcatacgc 660
 gtcagggt acaagggtgct ggtgctcaac cctcctgtg ctgcaacaat gggctttggt 720

```

gcttacatgt ccaaggccca tgggattgat cctaacaatca ggactgggggt gaggacaatt 780
actactggca gcccgatcac gtattccacc tacggcaagt tccttgccga cggcgggtgt 840
tcaggggggtg cttatgacat aataatattgt gacgagtgcc actccaagga tgcaacatcc 900
atcttgggca ttggcactgt ccttgacca gacagagacc cgggggagag actgactgtg 960
ctcggcaccg ctaccctcc gggctccgtc actgtgcccc atcctaacat cgaggaggtt 1020
gctctgtcca ctaccggaga gatccccttt tatggcaagg ctattcccct tgaagcaatt 1080
aaggggggga gacatctcat cttctgccac tcaaagaaga agtgcgacga gctcgcgca 1140
aaactggctc cgttgggct caatgccgtg gcttactacc gggccttga tgtgtccgtc 1200
atcccgacca gtgggtgacgt tgtcgtcgtg gcaactgacg cctcatgac cggctttacc 1260
ggcgacttcg attcggtgat agactgcaac acgtgtgtca cccagacagt cgacttcagc 1320
cttgacccta ccttcaccat tgagacaatc acgcttcccc aggatgctgt ctcccgtact 1380
caacgtcggg gtaggactgg cagaggggag ccaggcatct acagatttgt ggcaccgggg 1440
gagcgtcctt ctggcatgtt tgactcgtct gtcctctgcg agtgctatga cgcgggttgt 1500
gcttggatg agcttacgcc cggcagagacc acagttaggc tacgagcata catgaacacc 1560
ccgggacttc ccgtgtgcca agaccatctt gaattttggg agggcgtctt tacgggtctc 1620
accacatag acgcccactt cctatcccag acaaagcaga gtggggaaaa ccttccttat 1680
ctggtagcgt accaagccac cgtgtgcgct agagctcaag cccctcccc gtcgtgggac 1740
cagatgtgga agtgcttgat ccgtctcaag cccaccctcc atgggccaac acctctgcta 1800
tatagactgg gcgctgtcca gaatgaagtc acctgacgc acccagtcac caagtatata 1860
atgacatgta tgtcggctga cctggaggtc gtcacgagta cctgggtgct cgttggcggc 1920
gttctggctg ctttggcgc gtattgccta tccacaggct gcgtggatcat agtaggtagg 1980
attgtcttgt ccggaagcc ggcaatcata cccgacaggg aagtcctcta ccgggagttc 2040
gatgaaatgg aagagtgtg a 2061

```

<210> 17

<211> 686

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido NS3/4A del virus de la Hepatitis C

<400> 17

```

Met Ala Pro Ile Thr Ala Tyr Ala 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 Glu Gly
                20                    25                    30
Glu Val Gln Ile Val Ser Thr Ala Ala Gln Thr Phe Leu Ala Thr Cys
                35                    40                    45
Ile Asn Gly Val Cys Trp Thr Val Tyr His Gly Ala Gly Thr Arg Thr
 50                    55                    60
Ile Ala Ser Pro Lys Gly Pro Val Ile Gln Met Tyr Thr Asn Val Asp
 65                    70                    75                    80
Gln Asp Leu Val Gly Trp Pro Ala Pro Gln Gly Ala Arg Ser Leu 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 Gly Arg Gly Ser Leu Leu
                115                    120                    125
Ser Pro Arg Pro Ile Ser Tyr Leu Lys Gly Ser Ser Gly Gly Pro Leu
 130                    135                    140
Leu Cys Pro Ala Gly His Ala 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 Leu
                165                    170                    175

```

Glu Thr Thr Met Arg Ser Pro Val Phe Ser Asp Asn Ser Ser Pro Pro
 180 185 190
 Ala Val Pro Gln Ser Tyr 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 Met Gly Phe Gly
 225 230 235 240
 Ala Tyr Met Ser Lys Ala His Gly Ile Asp Pro Asn Ile Arg Thr Gly
 245 250 255
 Val Arg Thr Ile Thr Thr Gly Ser 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 Ala Thr Ser Ile Leu Gly Ile
 290 295 300
 Gly Thr Val Leu Asp Gln Ala Glu Thr Ala Gly Ala Arg Leu Thr Val
 305 310 315 320
 Leu Ala Thr Ala Thr Pro Pro Gly Ser Val Thr Val Pro His Pro Asn
 325 330 335
 Ile Glu Glu Val Ala Leu Ser Thr Thr Gly Glu Ile Pro Phe Tyr Gly
 340 345 350
 Lys Ala Ile Pro Leu 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 Val Ala
 370 375 380
 Leu Gly Val 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 Ile Thr Leu Pro Gln Asp Ala Val Ser Arg Thr Gln Arg Arg Gly
 450 455 460
 Arg Thr Gly Arg Gly Lys Pro Gly Ile Tyr Arg Phe Val Ala 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 Met Asn Thr Pro Gly Leu Pro Val Cys Gln Asp
 515 520 525
 His Leu Glu Phe Trp Glu Gly Val Phe Thr Gly Leu Thr His Ile Asp
 530 535 540
 Ala His Phe Leu Ser Gln Thr Lys Gln Ser Gly Glu Asn Leu 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 Val Thr Leu Thr His Pro Val Thr Lys Tyr Ile Met Thr Cys Met

ES 2 371 936 T3

	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	Ser	Thr	Gly	Cys	Val	Val
					645					650					655	
	Ile	Val	Gly	Arg	Ile	Val	Leu	Ser	Gly	Lys	Pro	Ala	Ile	Ile	Pro	Asp
			660						665					670		
	Arg	Glu	Val	Leu	Tyr	Arg	Glu	Phe	Asp	Glu	Met	Glu	Glu	Cys		
			675					680					685			

- <210> 18
- <211> 30
- <212> ADN
- 5 <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> oligonucleótido de clonación
- <400> 18
- ccgtctagat cagcactctt ccatttcac 30
- 10 <210> 19
- <211> 30
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- 15 <223> oligonucleótido de clonación
- <400> 19
- cctgaattca tggcgcctat cacggcctat 30
- <210> 20
- <211> 24
- 20 <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> oligonucleótido de clonación
- <400> 20
- 25 ccacgcggcc gcgacgacct acag 24
- <210> 21
- <211> 33
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- 30 <220>
- <223> oligonucleótido de clonación
- <400> 21
- ctggaggctc tcacgcctac ctgggtgctc gtt 33
- <210> 22
- <211> 33
- 35 <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> oligonucleótido de clonación
- <400> 22
- 40 accgagcacc caggtaggcg tgacgacctc cag 33
- <210> 23
- <211> 33
- <212> ADN
- 45 <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> oligonucleótido de clonación
- <400> 23

ES 2 371 936 T3

ctggaggtcg tccgcggtac ctgggtgctc gtt 33
 <210> 24
 <211> 33
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido de clonación
 <400> 24
 accgagcacc caggtaccgc ggacgacctc cag 33
 10 <210> 25
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> Péptido NS3/4A del virus de la Hepatitis C
 <400> 25

Thr Lys Tyr Met Thr Cys Met Ser Ala Asp Leu Glu Val Val Thr Ser
 1 5 10 15
 Thr Trp Val Leu Val Gly Gly Val Leu
 20 25

<210> 26
 <211> 25
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Péptido NS3/4A del virus de la Hepatitis C mutante
 <400> 26

Thr Lys Tyr Met Thr Cys Met Ser Ala Asp Leu Glu Val Val Thr Gly
 1 5 10 15
 Thr Trp Val Leu Val Gly Gly Val Leu
 20 25

25 <210> 27
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> Péptido NS3/4A del virus de la Hepatitis C mutante
 <400> 27

Thr Lys Tyr Met Thr Cys Met Ser Ala Asp Leu Glu Val Val Arg Gly
 1 5 10 15
 Thr Trp Val Leu Val Gly Gly Val Leu
 20 25

35 <210> 28
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Péptido NS3/4A del virus de la Hepatitis C
 40 <400> 28

ES 2 371 936 T3

Ser Ala Asp Leu Glu Val Val Thr Ser Thr Trp Val
 1 5 10

<210> 29

<211> 632

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial del péptido NS3 del virus de la Hepatitis C

<220>

<223> Péptido NS3 del virus de la Hepatitis C

<400> 29

Met Ala Pro Ile Thr Ala Tyr Ala 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 Glu Gly
 20 25 30
 Glu Val Gln Ile Val Ser Thr Ala Ala Gln Thr Phe Leu Ala Thr Cys
 35 40 45
 Ile Asn Gly Val Cys Trp Thr Val Tyr His Gly Ala Gly Thr Arg Thr
 50 55 60
 Ile Ala Ser Pro Lys Gly Pro Val Ile Gln Met Tyr Thr Asn Val Asp
 65 70 75 80

Gln Asp Leu Val Gly Trp Pro Ala Pro Gln Gly Ala Arg Ser Leu 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 Gly Arg Gly Ser Leu Leu
 115 120 125
 Ser Pro Arg Pro Ile Ser Tyr Leu Lys Gly Ser Ser Gly Gly Pro Leu
 130 135 140
 Leu Cys Pro Ala Gly His Ala 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 Leu
 165 170 175
 Glu Thr Thr Met Arg Ser Pro Val Phe Ser Asp Asn Ser Ser Pro Pro
 180 185 190
 Ala Val Pro Gln Ser Tyr 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 Met Gly Phe Gly
 225 230 235 240
 Ala Tyr Met Ser Lys Ala His Gly Ile Asp Pro Asn Ile Arg Thr Gly
 245 250 255
 Val Arg Thr Ile Thr Thr Gly Ser 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 Ala Thr Ser Ile Leu Gly Ile
 290 295 300
 Gly Thr Val Leu Asp Gln Ala Glu Thr Ala Gly Ala Arg Leu Thr Val
 305 310 315 320
 Leu Ala Thr Ala Thr Pro Pro Gly Ser Val Thr Val Pro His Pro Asn
 325 330 335
 Ile Glu Glu Val Ala Leu Ser Thr Thr Gly Glu Ile Pro Phe Tyr Gly
 340 345 350
 Lys Ala Ile Pro Leu 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 Val Ala
 370 375 380
 Leu Gly Val 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 Ile Thr Leu Pro Gln Asp Ala Val Ser Arg Thr Gln Arg Arg Gly
 450 455 460
 Arg Thr Gly Arg Gly Lys Pro Gly Ile Tyr Arg Phe Val Ala 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 Met Asn Thr Pro Gly Leu Pro Val Cys Gln Asp

ES 2 371 936 T3

```

                515                520                525
His Leu Glu Phe Trp Glu Gly Val Phe Thr Gly Leu Thr His Ile Asp
   530                535                540
Ala His Phe Leu Ser Gln Thr Lys Gln Ser Gly Glu Asn Leu 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 Val Thr Leu Thr His Pro Val Thr Lys Tyr Ile Met Thr Cys Met
                610                615                620
Ser Ala Asp Leu Glu Val Val Thr
625                630

```

<210> 30

<211> 54

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido NS4A del virus de la Hepatitis C

<400> 30

```

Ser Thr Trp Val Leu Val Gly Gly Val Leu Ala Ala Leu Ala Ala Tyr
 1                5                10                15
Cys Leu Ser Thr Gly Cys Val Val Ile Val Gly Arg Ile Val Leu Ser
                20                25                30
Gly Lys Pro Ala Ile Ile Pro Asp Arg Glu Val Leu Tyr Arg Glu Phe
                35                40                45
Asp Glu Met Glu Glu Cys
50

```

10 <210> 31

<211> 686

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> NS3/4A del virus de la Hepatitis C mutante

<400> 31

```

Met Ala Pro Ile Thr Ala Tyr Ala 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 Glu Gly
                20                25                30
Glu Val Gln Ile Val Ser Thr Ala Ala Gln Thr Phe Leu Ala Thr Cys
                35                40                45
Ile Asn Gly Val Cys Trp Thr Val Tyr His Gly Ala Gly Thr Arg Thr
                50                55                60
Ile Ala Ser Pro Lys Gly Pro Val Ile Gln Met Tyr Thr Asn Val Asp
65                70                75                80

```

Gln Asp Leu Val Gly Trp Pro Ala Pro Gln Gly Ala Arg Ser Leu 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 Gly Arg Gly Ser Leu Leu
 115 120 125
 Ser Pro Arg Pro Ile Ser Tyr Leu Lys Gly Ser Ser Gly Gly Pro Leu
 130 135 140
 Leu Cys Pro Ala Gly His Ala 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 Leu
 165 170 175
 Glu Thr Thr Met Arg Ser Pro Val Phe Ser Asp Asn Ser Ser Pro Pro
 180 185 190
 Ala Val Pro Gln Ser Tyr 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 Met Gly Phe Gly
 225 230 235 240
 Ala Tyr Met Ser Lys Ala His Gly Ile Asp Pro Asn Ile Arg Thr Gly
 245 250 255
 Val Arg Thr Ile Thr Thr Gly Ser 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 Ala Thr Ser Ile Leu Gly Ile
 290 295 300
 Gly Thr Val Leu Asp Gln Ala Glu Thr Ala Gly Ala Arg Leu Thr Val
 305 310 315 320
 Leu Ala Thr Ala Thr Pro Pro Gly Ser Val Thr Val Pro His Pro Asn
 325 330 335
 Ile Glu Glu Val Ala Leu Ser Thr Thr Gly Glu Ile Pro Phe Tyr Gly
 340 345 350
 Lys Ala Ile Pro Leu 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 Val Ala
 370 375 380
 Leu Gly Val 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 Ile Thr Leu Pro Gln Asp Ala Val Ser Arg Thr Gln Arg Arg Gly
 450 455 460
 Arg Thr Gly Arg Gly Lys Pro Gly Ile Tyr Arg Phe Val Ala 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 Met Asn Thr Pro Gly Leu Pro Val Cys Gln Asp

	515					520	-					525			
His	Leu	Glu	Phe	Trp	Glu	Gly	Val	Phe	Thr	Gly	Leu	Thr	His	Ile	Asp
	530					535					540				
Ala	His	Phe	Leu	Ser	Gln	Thr	Lys	Gln	Ser	Gly	Glu	Asn	Leu	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	Val	Thr	Leu	Thr	His	Pro	Val	Thr	Lys	Tyr	Ile	Met	Thr	Cys	Met
	610					615						620			
Ser	Ala	Asp	Leu	Glu	Val	Val	Thr	Gly	Thr	Trp	Val	Leu	Val	Gly	Gly
625					630					635					640
Val	Leu	Ala	Ala	Leu	Ala	Ala	Tyr	Cys	Leu	Ser	Thr	Gly	Cys	Val	Val
				645					650					655	
Ile	Val	Gly	Arg	Ile	Val	Leu	Ser	Gly	Lys	Pro	Ala	Ile	Ile	Pro	Asp
			660					665						670	
Arg	Glu	Val	Leu	Tyr	Arg	Glu	Phe	Asp	Glu	Met	Glu	Glu	Cys		
	675					680						685			

<210> 32

<211> 686

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido NS3/4A del virus de la Hepatitis C mutante

<400> 32

Met	Ala	Pro	Ile	Thr	Ala	Tyr	Ala	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	Glu	Gly
			20					25					30		
Glu	Val	Gln	Ile	Val	Ser	Thr	Ala	Ala	Gln	Thr	Phe	Leu	Ala	Thr	Cys
		35					40					45			
Ile	Asn	Gly	Val	Cys	Trp	Thr	Val	Tyr	His	Gly	Ala	Gly	Thr	Arg	Thr
50						55					60				
Ile	Ala	Ser	Pro	Lys	Gly	Pro	Val	Ile	Gln	Met	Tyr	Thr	Asn	Val	Asp
65					70					75					80
Gln	Asp	Leu	Val	Gly	Trp	Pro	Ala	Pro	Gln	Gly	Ala	Arg	Ser	Leu	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	Gly	Arg	Gly	Ser	Leu	Leu
		115					120					125			
Ser	Pro	Arg	Pro	Ile	Ser	Tyr	Leu	Lys	Gly	Ser	Ser	Gly	Gly	Pro	Leu
		130				135						140			
Leu	Cys	Pro	Ala	Gly	His	Ala	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	Leu
				165					170					175	
Glu	Thr	Thr	Met	Arg	Ser	Pro	Val	Phe	Ser	Asp	Asn	Ser	Ser	Pro	Pro

ES 2 371 936 T3

			180					185				190			
Ala	Val	Pro	Gln	Ser	Tyr	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	Met	Gly	Phe	Gly
225					230					235					240
Ala	Tyr	Met	Ser	Lys	Ala	His	Gly	Ile	Asp	Pro	Asn	Ile	Arg	Thr	Gly
				245					250					255	
Val	Arg	Thr	Ile	Thr	Thr	Gly	Ser	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	Ala	Thr	Ser	Ile	Leu	Gly	Ile
	290					295					300				
Gly	Thr	Val	Leu	Asp	Gln	Ala	Glu	Thr	Ala	Gly	Ala	Arg	Leu	Thr	Val
305					310					315					320
Leu	Ala	Thr	Ala	Thr	Pro	Pro	Gly	Ser	Val	Thr	Val	Pro	His	Pro	Asn
					325				330					335	
Ile	Glu	Glu	Val	Ala	Leu	Ser	Thr	Thr	Gly	Glu	Ile	Pro	Phe	Tyr	Gly
			340					345					350		
Lys	Ala	Ile	Pro	Leu	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	Val	Ala
	370					375					380				
Leu	Gly	Val	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	Ile	Thr	Leu	Pro	Gln	Asp	Ala	Val	Ser	Arg	Thr	Gln	Arg	Arg	Gly
	450					455					460				
Arg	Thr	Gly	Arg	Gly	Lys	Pro	Gly	Ile	Tyr	Arg	Phe	Val	Ala	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	Met	Asn	Thr	Pro	Gly	Leu	Pro	Val	Cys	Gln	Asp
		515					520					525			
His	Leu	Glu	Phe	Trp	Glu	Gly	Val	Phe	Thr	Gly	Leu	Thr	His	Ile	Asp
	530					535					540				
Ala	His	Phe	Leu	Ser	Gln	Thr	Lys	Gln	Ser	Gly	Glu	Asn	Leu	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	Val	Thr	Leu	Thr	His	Pro	Val	Thr	Lys	Tyr	Ile	Met	Thr	Cys	Met
	610					615						620			

ES 2 371 936 T3

Ser Ala Asp Leu Glu Val Val Arg Gly Thr Trp Val Leu Val Gly Gly
 625 630 635 640
 Val Leu Ala Ala Leu Ala Ala Tyr Cys Leu Ser Thr Gly Cys Val Val
 645 650 655
 Ile Val Gly Arg Ile Val Leu Ser Gly Lys Pro Ala Ile Ile Pro Asp
 660 665 670
 Arg Glu Val Leu Tyr Arg Glu Phe Asp Glu Met Glu Glu Cys
 675 680 685

- <210> 33
- <211> 25
- <212> PRT
- 5 <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Péptido NS3/4A del virus de la Hepatitis C mutante
- <400> 33

Thr Lys Tyr Met Thr Cys Met Ser Ala Asp Leu Glu Val Val Thr Pro
 1 5 10 15
 Thr Trp Val Leu Val Gly Gly Val Leu
 20 25

- 10 <210> 34
- <211> 25
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- 15 <223> Péptido NS3/4A del virus de la Hepatitis C mutante
- <400> 34

Thr Lys Tyr Met Thr Cys Met Ser Ala Asp Leu Glu Val Val Arg Pro
 1 5 10 15
 Thr Trp Val Leu Val Gly Gly Val Leu
 20 25

- 20 <210> 35
- <211> 25
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Péptido NS3/4A del virus de la Hepatitis C mutante
- <400> 35

Thr Lys Tyr Met Thr Cys Met Ser Ala Asp Leu Glu Val Val Arg Pro
 1 5 10 15
 Ala Trp Val Leu Val Gly Gly Val Leu
 20 25

- 25 <210> 36
- <211> 25
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- 30 <220>
- <223> Péptido NS3/4A del virus de la Hepatitis C mutante
- <400> 36

ES 2 371 936 T3

Thr Lys Tyr Met Thr Cys Met Ser Ala Asp Leu Glu Val Val Cys Ser
 1 5 10 15
 Thr Trp Val Leu Val Gly Gly Val Leu
 20 25

<210> 37
 <211> 25
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Péptido NS3/4A del virus de la Hepatitis C mutante
 <400> 37

Thr Lys Tyr Met Thr Cys Met Ser Ala Asp Leu Glu Val Cys Cys Ser
 1 5 10 15
 Thr Trp Val Leu Val Gly Gly Val Leu
 20 25

10 <210> 38
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> Péptido NS3/4A del virus de la Hepatitis C mutante
 <400> 38

Thr Lys Tyr Met Thr Cys Met Ser Ala Asp Leu Glu Val Ser Ser Ser
 1 5 10 15
 Thr Trp Val Leu Val Gly Gly Val Leu
 20 25

20 <210> 39
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Péptido NS3/4A del virus de la Hepatitis C mutante
 <400> 39

Thr Lys Tyr Met Thr Cys Met Ser Ala Asp Ser Ser Ser Ser Cys Ser

1 5 10 15
 Thr Trp Val Leu Val Gly Gly Val Leu
 20 25

25 <210> 40
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> Péptido NS3/4A del virus de la Hepatitis C mutante
 <400> 40

ES 2 371 936 T3

Thr Lys Tyr Met Thr Cys Met Ser Ala Asp Val Val Val Val Thr Ser
 1 5 10 15
 Thr Trp Val Leu Val Gly Gly Val Leu
 20 25

- <210> 41
- <211> 16
- <212> PRT
- 5 <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Péptido NS5 del virus de la Hepatitis C
- <400> 41

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

- 10 <210> 42
- <211> 18
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- 15 <223> Péptido NSSA/B del virus de la Hepatitis C mutante
- <400> 42

Ser Ser Glu Asp Val Val Cys Cys Ser Met Trp Val Leu Val Gly Gly
 1 5 10 15
 Val Leu

- 20 <210> 43
- <211> 686
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> NS3/4A del virus de la Hepatitis C mutante
- <400> 43

Met Ala Pro Ile Thr Ala Tyr Ala 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 Glu Gly
20 25 30
Glu Val Gln Ile Val Ser Thr Ala Ala Gln Thr Phe Leu Ala Thr Cys
35 40 45
Ile Asn Gly Val Cys Trp Thr Val Tyr His Gly Ala Gly Thr Arg Thr
50 55 60
Ile Ala Ser Pro Lys Gly Pro Val Ile Gln Met Tyr Thr Asn Val Asp
65 70 75 80
Gln Asp Leu Val Gly Trp Pro Ala Pro Gln Gly Ala Arg Ser Leu 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 Gly Arg Gly Ser Leu Leu
115 120 125
Ser Pro Arg Pro Ile Ser Tyr Leu Lys Gly Ser Ser Gly Gly Pro Leu
130 135 140
Leu Cys Pro Ala Gly His Ala 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 Leu
165 170 175
Glu Thr Thr Met Arg Ser Pro Val Phe Ser Asp Asn Ser Ser Pro Pro
180 185 190
Ala Val Pro Gln Ser Tyr 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 Met Gly Phe Gly
225 230 235 240
Ala Tyr Met Ser Lys Ala His Gly Ile Asp Pro Asn Ile Arg Thr Gly
245 250 255
Val Arg Thr Ile Thr Thr Gly Ser 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 Ala Thr Ser Ile Leu Gly Ile
290 295 300
Gly Thr Val Leu Asp Gln Ala Glu Thr Ala Gly Ala Arg Leu Thr Val
305 310 315 320
Leu Ala Thr Ala Thr Pro Pro Gly Ser Val Thr Val Pro His Pro Asn
325 330 335
Ile Glu Glu Val Ala Leu Ser Thy Thr Gly Glu Ile Pro Phe Tyr Gly
340 345 350
Lys Ala Ile Pro Leu 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 Val Ala
370 375 - 380
Leu Gly Val 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	Ile	Thr	Leu	Pro	Gln	Asp	Ala	Val	Ser	Arg	Thr	Gln	Arg	Arg	Gly	
	450					455					460					
Arg	Thr	Gly	Arg	Gly	Lys	Pro	Gly	Ile	Tyr	Arg	Phe	Val	Ala	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	Met	Asn	Thr	Pro	Gly	Leu	Pro	Val	Cys	Gln	Asp	
		515					520					525				
His	Leu	Glu	Phe	Trp	Glu	Gly	Val	Phe	Thr	Gly	Leu	Thr	His	Ile	Asp	
	530					535						540				
Ala	His	Phe	Leu	Ser	Gln	Thr	Lys	Gln	Ser	Gly	Glu	Asn	Leu	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	Val	Thr	Leu	Thr	His	Pro	Val	Thr	Lys	Tyr	Ile	Met	Thr	Cys	Met	
	610					615						620				
Ser	Ala	Asp	Leu	Glu	Val	Val	Thr	Pro	Thr	Trp	Val	Leu	Val	Gly	Gly	
625					630						635				640	
Val	Leu	Ala	Ala	Leu	Ala	Ala	Tyr	Cys	Leu	Ser	Thr	Gly	Cys	Val	Val	
				645						650				655		
Ile	Val	Gly	Arg	Ile	Val	Leu	Ser	Gly	Lys	Pro	Ala	Ile	Ile	Pro	Asp	
			660					665						670		
Arg	Glu	Val	Leu	Tyr	Arg	Glu	Phe	Asp	Glu	Met	Glu	Glu	Cys			
		675						680						685		

- <210> 44
- <211> 686
- <212> PRT
- 5 <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> NS3/4A del virus de la Hepatitis C mutante
- <400> 44

Met	Ala	Pro	Ile	Thr	Ala	Tyr	Ala	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	Glu	Gly	
			20					25					30			
Glu	Val	Gln	Ile	Val	Ser	Thr	Ala	Ala	Gln	Thr	Phe	Leu	Ala	Thr	Cys	
		35					40					45				
Ile	Asn	Gly	Val	Cys	Trp	Thr	Val	Tyr	His	Gly	Ala	Gly	Thr	Arg	Thr	
	50					55					60					
Ile	Ala	Ser	Pro	Lys	Gly	Pro	Val	Ile	Gln	Met	Tyr	Thr	Asn	Val	Asp	
65					70					75					80	
Gln	Asp	Leu	Val	Gly	Trp	Pro	Ala	Pro	Gln	Gly	Ala	Arg	Ser	Leu	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	Gly	Arg	Gly	Ser	Leu	Leu
		115					120					125			
Ser	Pro	Arg	Pro	Ile	Ser	Tyr	Leu	Lys	Gly	Ser	Ser	Gly	Gly	Pro	Leu
						135					140				
Leu	Cys	Pro	Ala	Gly	His	Ala	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	Leu
				165				170						175	
Glu	Thr	Thr	Met	Arg	Ser	Pro	Val	Phe	Ser	Asp	Asn	Ser	Ser	Pro	Pro
			180					185					190		
Ala	Val	Pro	Gln	Ser	Tyr	Gln	Val	Ala	His	Leu	His	Ala	Pro	Thr	Gly
							200					205			
Ser	Gly	Lys	Ser	Thr	Lys	Val	Pro	Ala	Ala	Tyr	Ala	Ala	Gln	Gly	Tyr
						215					220				
Lys	Val	Leu	Val	Leu	Asn	Pro	Ser	Val	Ala	Ala	Thr	Met	Gly	Phe	Gly
225					230					235					240
Ala	Tyr	Met	Ser	Lys	Ala	His	Gly	Ile	Asp	Pro	Asn	Ile	Arg	Thr	Gly
					245				250						255
Val	Arg	Thr	Ile	Thr	Thr	Gly	Ser	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	Ala	Thr	Ser	Ile	Leu	Gly	Ile
		290				295					300				
Gly	Thr	Val	Leu	Asp	Gln	Ala	Glu	Thr	Ala	Gly	Ala	Arg	Leu	Thr	Val
305					310					315					320
Leu	Ala	Thr	Ala	Thr	Pro	Pro	Gly	Ser	Val	Thr	Val	Pro	His	Pro	Asn
					325				330					335	
Ile	Glu	Glu	Val	Ala	Leu	Ser	Thr	Thr	Gly	Glu	Ile	Pro	Phe	Tyr	Gly
			340					345					350		
Lys	Ala	Ile	Pro	Leu	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	Val	Ala
		370				375					380				
Leu	Gly	Val	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	Ile	Thr	Leu	Pro	Gln	Asp	Ala	Val	Ser	Arg	Thr	Gln	Arg	Arg	Gly
		450				455					460				
Arg	Thr	Gly	Arg	Gly	Lys	Pro	Gly	Ile	Tyr	Arg	Phe	Val	Ala	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	Met	Asn	Thr	Pro	Gly	Leu	Pro	Val	Cys	Gln	Asp
		515					520						525		

```

His Leu Glu Phe Trp Glu Gly Val Phe Thr Gly Leu Thr His Ile Asp
 530                               535                               540
Ala His Phe Leu Ser Gln Thr Lys Gln Ser Gly Glu Asn Leu 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 Val Thr Leu Thr His Pro Val Thr Lys Tyr Ile Met Thr Cys Met
 610                               615                               620
Ser Ala Asp Leu Glu Val Val Arg Pro Thr Trp Val Leu Val Gly Gly
625                               630                               635                               640
Val Leu Ala Ala Leu Ala Ala Tyr Cys Leu Ser Thr Gly Cys Val Val
                               645                               650                               655
Ile Val Gly Arg Ile Val Leu Ser Gly Lys Pro Ala Ile Ile Pro Asp
 660                               665                               670
Arg Glu Val Leu Tyr Arg Glu Phe Asp Glu Met Glu Glu Cys
 675                               680                               685

```

<210> 45

<211> 686

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> NS3/4A del virus de la Hepatitis C mutante

<400> 45

```

Met Ala Pro Ile Thr Ala Tyr Ala 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 Glu Gly
 20                               25                               30
Glu Val Gln Ile Val Ser Thr Ala Ala Gln Thr Phe Leu Ala Thr Cys
 35                               40                               45
Ile Asn Gly Val Cys Trp Thr Val Tyr His Gly Ala Gly Thr Arg Thr
 50                               55                               60
Ile Ala Ser Pro Lys Gly Pro Val Ile Gln Met Tyr Thr Asn Val Asp
65                               70                               75                               80
Gln Asp Leu Val Gly Trp Pro Ala Pro Gln Gly Ala Arg Ser Leu 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 Gly Arg Gly Ser Leu Leu
 115                              120                              125
Ser Pro Arg Pro Ile Ser Tyr Leu Lys Gly Ser Ser Gly Gly Pro Leu
 130                              135                              140
Leu Cys Pro Ala Gly His Ala 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 Leu
 165                              170                              175
Glu Thr Thr Met Arg Ser Pro Val Phe Ser Asp Asn Ser Ser Pro Pro
 180                              185                              190

```

Ala Val Pro Gln Ser Tyr 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 Met Gly Phe Gly
 225 230 235 240
 Ala Tyr Met Ser Lys Ala His Gly Ile Asp Pro Asn Ile Arg Thr Gly
 245 250 255
 Val Arg Thr Ile Thr Thr Gly Ser 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 Ala Thr Ser Ile Leu Gly Ile
 290 295 300
 Gly Thr Val Leu Asp Gln Ala Glu Thr Ala Gly Ala Arg Leu Thr Val
 305 310 315 320
 Leu Ala Thr Ala Thr Pro Pro Gly Ser Val Thr Val Pro His Pro Asn
 325 330 335
 Ile Glu Glu Val Ala Leu Ser Thr Thr Gly Glu Ile Pro Phe Tyr Gly
 340 345 350
 Lys Ala Ile Pro Leu 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 Val Ala
 370 375 380
 Leu Gly Val 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 Ile Thr Leu Pro Gln Asp Ala Val Ser Arg Thr Gln Arg Arg Gly
 450 455 460
 Arg Thr Gly Arg Gly Lys Pro Gly Ile Tyr Arg Phe Val Ala 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 Met Asn Thr Pro Gly Leu Pro Val Cys Gln Asp
 515 520 525
 His Leu Glu Phe Trp Glu Gly Val Phe Thr Gly Leu Thr His Ile Asp
 530 535 540
 Ala His Phe Leu Ser Gln Thr Lys Gln Ser Gly Glu Asn Leu 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 Val Thr Leu Thr His Pro Val Thr Lys Tyr Ile Met Thr Cys Met
 610 615 620
 Ser Ala Asp Leu Glu Val Val Arg Pro Ala Trp Val Leu Val Gly Gly

```

625              630              635              640
Val Leu Ala Ala Leu Ala Ala Tyr Cys Leu Ser Thr Gly Cys Val Val
              645              650              655
Ile Val Gly Arg Ile Val Leu Ser Gly Lys Pro Ala Ile Ile Pro Asp
              660              665              670
Arg Glu Val Leu Tyr Arg Glu Phe Asp Glu Met Glu Glu Cys
              675              680,              685
    
```

- <210> 46
- <211> 686
- <212> PRT
- 5 <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> NS3/4A del virus de la Hepatitis C mutante
- <400> 46

```

Met Ala Pro Ile Thr Ala Tyr Ala 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 Glu Gly
              20              25              30
Glu Val Gln Ile Val Ser Thr Ala Ala Gln Thr Phe Leu Ala Thr Cys
              35              40              45
Ile Asn Gly Val Cys Trp Thr Val Tyr His Gly Ala Gly Thr Arg Thr
50              55              60
Ile Ala Ser Pro Lys Gly Pro Val Ile Gln Met Tyr Thr Asn Val Asp
65              70              75              80
Gln Asp Leu Val Gly Trp Pro Ala Pro Gln Gly Ala Arg Ser Leu 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 Gly Arg Gly Ser Leu Leu
              115              120              125
Ser Pro Arg Pro Ile Ser Tyr Leu Lys Gly Ser Ser Gly Gly Pro Leu
130              135              140
Leu Cys Pro Ala Gly His Ala 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 Leu
              165              170              175
Glu Thr Thr Met Arg Ser Pro Val Phe Ser Asp Asn Ser Ser Pro Pro
              180              185              190
Ala Val Pro Gln Ser Tyr 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 Met Gly Phe Gly
225              230              235              240
Ala Tyr Met Ser Lys Ala His Gly Ile Asp Pro Asn Ile Arg Thr Gly
              245              250              255
Val Arg Thr Ile Thr Thr Gly Ser 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 Ala Thr Ser Ile Leu Gly Ile
    
```

290						295						300			
Gly	Thr	Val	Leu	Asp	Gln	Ala	Glu	Thr	Ala	Gly	Ala	Arg	Leu	Thr	Val
305					310					315					320
Leu	Ala	Thr	Ala	Thr	Pro	Pro	Gly	Ser	Val	Thr	Val	Pro	His	Pro	Asn
				325					330					335	
Ile	Glu	Glu	Val	Ala	Leu	Ser	Thr	Thr	Gly	Glu	Ile	Pro	Phe	Tyr	Gly
			340					345					350		
Lys	Ala	Ile	Pro	Leu	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	Val	Ala
370					375					380					
Leu	Gly	Val	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	Ile	Thr	Leu	Pro	Gln	Asp	Ala	Val	Ser	Arg	Thr	Gln	Arg	Arg	Gly
450					455							460			
Arg	Thr	Gly	Arg	Gly	Lys	Pro	Gly	Ile	Tyr	Arg	Phe	Val	Ala	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	Met	Asn	Thr	Pro	Gly	Leu	Pro	Val	Cys	Gln	Asp
		515					520						525		
His	Leu	Glu	Phe	Trp	Glu	Gly	Val	Phe	Thr	Gly	Leu	Thr	His	Ile	Asp
530					535							540			
Ala	His	Phe	Leu	Ser	Gln	Thr	Lys	Gln	Ser	Gly	Glu	Asn	Leu	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	Val	Thr	Leu	Thr	His	Pro	Val	Thr	Lys	Tyr	Ile	Met	Thr	Cys	Met
		610				615						620			
Ser	Ala	Asp	Leu	Glu	Val	Val	Cys	Ser	Thr	Trp	Val	Leu	Val	Gly	Gly
625					630					635					640
Val	Leu	Ala	Ala	Leu	Ala	Ala	Tyr	Cys	Leu	Ser	Thr	Gly	Cys	Val	Val
			645						650					655	
Ile	Val	Gly	Arg	Ile	Val	Leu	Ser	Gly	Lys	Pro	Ala	Ile	Ile	Pro	Asp
		660						665					670		
Arg	Glu	Val	Leu	Tyr	Arg	Glu	Phe	Asp	Glu	Met	Glu	Glu	Cys		
		675					680					685			

<210> 47
 <211> 686
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 371 936 T3

<220>

<223> NS3/4A del virus de la Hepatitis C mutante

<400> 47

```

Met Ala Pro Ile Thr Ala Tyr Ala 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 Glu Gly
      20                25                30
Glu Val Gln Ile Val Ser Thr Ala Ala Gln Thr Phe Leu Ala Thr Cys
      35                40                45
Ile Asn Gly Val Cys Trp Thr Val Tyr His Gly Ala Gly Thr Arg Thr
      50                55                60
Ile Ala Ser Pro Lys Gly Pro Val Ile Gln Met Tyr Thr Asn Val Asp
65                70                75                80
Gln Asp Leu Val Gly Trp Pro Ala Pro Gln Gly Ala Arg Ser Leu 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 Gly Arg Gly Ser Leu Leu
      115               120               125
Ser Pro Arg Pro Ile Ser Tyr Leu Lys Gly Ser Ser Gly Gly Pro Leu
      130               135               140
Leu Cys Pro Ala Gly His Ala 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 Leu
      165                170                175
Glu Thr Thr Met Arg Ser Pro Val Phe Ser Asp Asn Ser Ser Pro Pro
      180                185                190
Ala Val Pro Gln Ser Tyr 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 Met Gly Phe Gly
225                230                235                240
Ala Tyr Met Ser Lys Ala His Gly Ile Asp Pro Asn Ile Arg Thr Gly
      245                250                255
Val Arg Thr Ile Thr Thr Gly Ser 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 Ala Thr Ser Ile Leu Gly Ile
      290                295                300
Gly Thr Val Leu Asp Gln Ala Glu Thr Ala Gly Ala Arg Leu Thr Val
305                310                315                320
Leu Ala Thr Ala Thr Pro Pro Gly Ser Val Thr Val Pro His Pro Asn
      325                330                335
Ile Glu Glu Val Ala Leu Ser Thr Thr Gly Glu Ile Pro Phe Tyr Gly
      340                345                350
Lys Ala Ile Pro Leu 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 Val Ala
      370                375                380
Leu Gly Val 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 Ile Thr Leu Pro Gln Asp Ala Val Ser Arg Thr Gln Arg Arg Gly
 450 455 460
 Arg Thr Gly Arg Gly Lys Pro Gly Ile Tyr Arg Phe Val Ala 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 Met Asn Thr Pro Gly Leu Pro Val Cys Gln Asp
 515 520 525
 His Leu Glu Phe Trp Glu Gly Val Phe Thr Gly Leu Thr His Ile Asp
 530 535 540
 Ala His Phe Leu Ser Gln Thr Lys Gln Ser Gly Glu Asn Leu 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 Val Thr Leu Thr His Pro Val Thr Lys Tyr Ile Met Thr Cys Met
 610 615 620
 Ser Ala Asp Leu Glu Val Cys Cys Ser Thr Trp Val Leu Val Gly Gly
 625 630 635 640
 Val Leu Ala Ala Leu Ala Ala Tyr Cys Leu Ser Thr Gly Cys Val Val
 645 650 655
 Ile Val Gly Arg Ile Val Leu Ser Gly Lys Pro Ala Ile Ile Pro Asp
 660 665 670
 Arg Glu Val Leu Tyr Arg Glu Phe Asp Glu Met Glu Glu Cys
 675 680 685

- <210> 48
- <211> 686
- <212> PRT
- 5 <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> NS3/4A del virus de la Hepatitis C mutante
- <400> 48

Met Ala Pro Ile Thr Ala Tyr Ala 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 Glu Gly
 20 25 30
 Glu Val Gln Ile Val Ser Thr Ala Ala Gln Thr Phe Leu Ala Thr Cys
 35 40 45
 Ile Asn Gly Val Cys Trp Thr Val Tyr His Gly Ala Gly Thr Arg Thr
 50 55 60

Ile Ala Ser Pro Lys Gly Pro Val Ile Gln Met Tyr Thr Asn Val Asp
65 70 75 80
Gln Asp Leu Val Gly Trp Pro Ala Pro Gln Gly Ala Arg Ser Leu 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 Gly Arg Gly Ser Leu Leu
115 120 125
Ser Pro Arg Pro Ile Ser Tyr Leu Lys Gly Ser Ser Gly Gly Pro Leu
130 135 140
Leu Cys Pro Ala Gly His Ala 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 Leu
165 170 175
Glu Thr Thr Met Arg Ser Pro Val Phe Ser Asp Asn Ser Ser Pro Pro
180 185 190
Ala Val Pro Gln Ser Tyr 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 Met Gly Phe Gly
225 230 235 240
Ala Tyr Met Ser Lys Ala His Gly Ile Asp Pro Asn Ile Arg Thr Gly
245 250 255
Val Arg Thr Ile Thr Thr Gly Ser 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 Ala Thr Ser Ile Leu Gly Ile
290 295 300
Gly Thr Val Leu Asp Gln Ala Glu Thr Ala Gly Ala Arg Leu Thr Val
305 310 315 320
Leu Ala Thr Ala Thr Pro Pro Gly Ser Val Thr Val Pro His Pro Asn
325 330 335
Ile Glu Glu Val Ala Leu Ser Thr Thr Gly Glu Ile Pro Phe Tyr Gly
340 345 350
Lys Ala Ile Pro Leu 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 Val Ala
370 375 380
Leu Gly Val 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 Ile Thr Leu Pro Gln Asp Ala Val Ser Arg Thr Gln Arg Arg Gly
450 455 460
Arg Thr Gly Arg Gly Lys Pro Gly Ile Tyr Arg Phe Val Ala 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

ES 2 371 936 T3

```

          500                      505                      510
Arg Leu Arg Ala Tyr Met Asn Thr Pro Gly Leu Pro Val Cys Gln Asp
      515                      520                      525
His Leu Glu Phe Trp Glu Gly Val Phe Thr Gly Leu Thr His Ile Asp
      530                      535                      540
Ala His Phe Leu Ser Gln Thr Lys Gln Ser Gly Glu Asn Leu 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 Val Thr Leu Thr His Pro Val Thr Lys Tyr Ile Met Thr Cys Met
      610                      615                      620
Ser Ala Asp Leu Glu Val Ser Ser Ser Thr Trp Val Leu Val Gly Gly
625                      630                      635                      640
Val Leu Ala Ala Leu Ala Ala Tyr Cys Leu Ser Thr Gly Cys Val Val
      645                      650                      655
Ile Val Gly Arg Ile Val Leu Ser Gly Lys Pro Ala Ile Ile Pro Asp
      660                      665                      670
Arg Glu Val Leu Tyr Arg Glu Phe Asp Glu Met Glu Glu Cys
      675                      680                      685

```

<210> 49

<211> 686

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> NS3/4A del virus de la Hepatitis C mutante

<400> 49

```

Met Ala Pro Ile Thr Ala Tyr Ala 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 Glu Gly
      20                      25                      30
Glu Val Gln Ile Val Ser Thr Ala Ala Gln Thr Phe Leu Ala Thr Cys
      35                      40                      45
Ile Asn Gly Val Cys Trp Thr Val Tyr His Gly Ala Gly Thr Arg Thr
      50                      55                      60
Ile Ala Ser Pro Lys Gly Pro Val Ile Gln Met Tyr Thr Asn Val Asp
65                      70                      75                      80
Gln Asp Leu Val Gly Trp Pro Ala Pro Gln Gly Ala Arg Ser Leu 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 Gly Arg Gly Ser Leu Leu
      115                      120                      125
Ser Pro Arg Pro Ile Ser Tyr Leu Lys Gly Ser Ser Gly Gly Pro Leu
      130                      135                      140
Leu Cys Pro Ala Gly His Ala 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 Leu

```

				165					170					175	
Glu	Thr	Thr	Met	Arg	Ser	Pro	Val	Phe	Ser	Asp	Asn	Ser	Ser	Pro	Pro
			180					185					190		
Ala	Val	Pro	Gln	Ser	Tyr	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	Met	Gly	Phe	Gly
225					230						235				240
Ala	Tyr	Met	Ser	Lys	Ala	His	Gly	Ile	Asp	Pro	Asn	Ile	Arg	Thr	Gly
				245					250					255	
Val	Arg	Thr	Ile	Thr	Thr	Gly	Ser	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	Ala	Thr	Ser	Ile	Leu	Gly	Ile
	290					295					300				
Gly	Thr	Val	Leu	Asp	Gln	Ala	Glu	Thr	Ala	Gly	Ala	Arg	Leu	Thr	Val
305					310					315					320
Leu	Ala	Thr	Ala	Thr	Pro	Pro	Gly	Ser	Val	Thr	Val	Pro	His	Pro	Asn
				325					330					335	
Ile	Glu	Glu	Val	Ala	Leu	Ser	Thr	Thr	Gly	Glu	Ile	Pro	Phe	Tyr	Gly
			340					345					350		
Lys	Ala	Ile	Pro	Leu	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	Val	Ala
	370					375					380				
Leu	Gly	Val	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	Ile	Thr	Leu	Pro	Gln	Asp	Ala	Val	Ser	Arg	Thr	Gln	Arg	Arg	Gly
	450					455					460				
Arg	Thr	Gly	Arg	Gly	Lys	Pro	Gly	Ile	Tyr	Arg	Phe	Val	Ala	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	Met	Asn	Thr	Pro	Gly	Leu	Pro	Val	Cys	Gln	Asp
	515						520					525			
His	Leu	Glu	Phe	Trp	Glu	Gly	Val	Phe	Thr	Gly	Leu	Thr	His	Ile	Asp
	530					535						540			
Ala	His	Phe	Leu	Ser	Gln	Thr	Lys	Gln	Ser	Gly	Glu	Asn	Leu	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			

ES 2 371 936 T3

Glu	Val	Thr	Leu	Thr	His	Pro	Val	Thr	Lys	Tyr	Ile	Met	Thr	Cys	Met
	610					615					620				
Ser	Ala	Asp	Ser	Ser	Ser	Ser	Cys	Ser	Thr	Trp	Val	Leu	Val	Gly	Gly
625					630					635					640
Val	Leu	Ala	Ala	Leu	Ala	Ala	Tyr	Cys	Leu	Ser	Thr	Gly	Cys	Val	Val
				645					650					655	
Ile	Val	Gly	Arg	Ile	Val	Leu	Ser	Gly	Lys	Pro	Ala	Ile	Ile	Pro	Asp
			660					665					670		
Arg	Glu	Val	Leu	Tyr	Arg	Glu	Phe	Asp	Glu	Met	Glu	Glu	Cys		
	675						680					685			

REIVINDICACIONES

1. Un ácido nucleico purificado o aislado constituido por la SEQ ID NO 16 o el complemento del mismo.
- 5 2. Un ácido nucleico purificado o aislado que codifica la secuencia peptídica de SEQ ID NO 17.
3. Un ácido nucleico purificado o aislado que comprende la SEQ ID NO 16.
- 10 4. Un ácido nucleico purificado o aislado que comprende un ácido nucleico que codifica la secuencia peptídica de SEQ ID NO 17.
- 5 5. Un ácido nucleico purificado o aislado que comprende al menos 100, 200, 500 o 1000 nucleótidos consecutivos del ácido nucleico purificado o aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2.
- 15 6. Un vector que comprende el ácido nucleico purificado o aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
- 20 7. Una célula aislada que comprende el ácido nucleico purificado o aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
- 25 8. Una composición inmunogénica que comprende el ácido nucleico purificado o aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
9. Una composición que comprende el ácido nucleico purificado o aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
- 30 10. Una célula aislada que comprende el vector de la reivindicación 6.
11. Una composición inmunogénica que comprende el vector de la reivindicación 6.
12. Una composición que comprende el vector de la reivindicación 6.
13. La composición inmunogénica de la reivindicación 8 u 11 que comprende además un adyuvante.

Figura 1

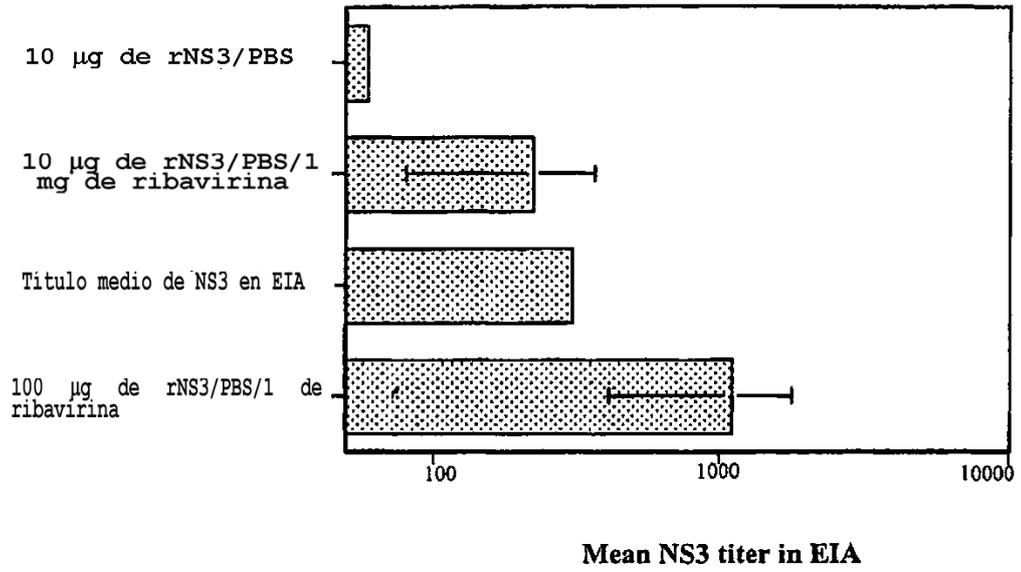


Figura 2

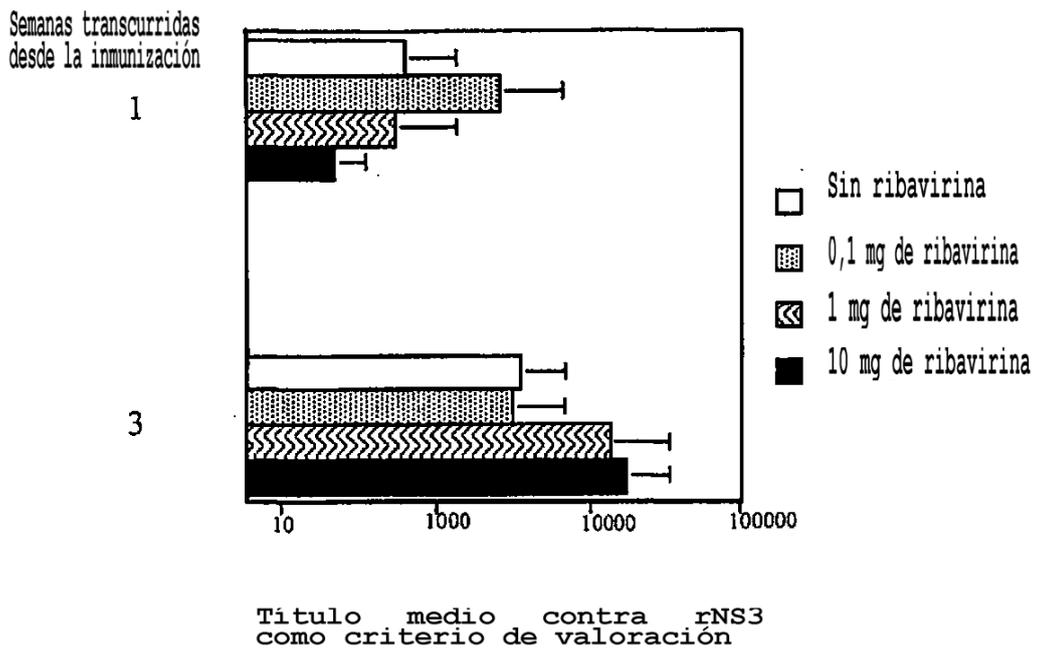


Figura 3

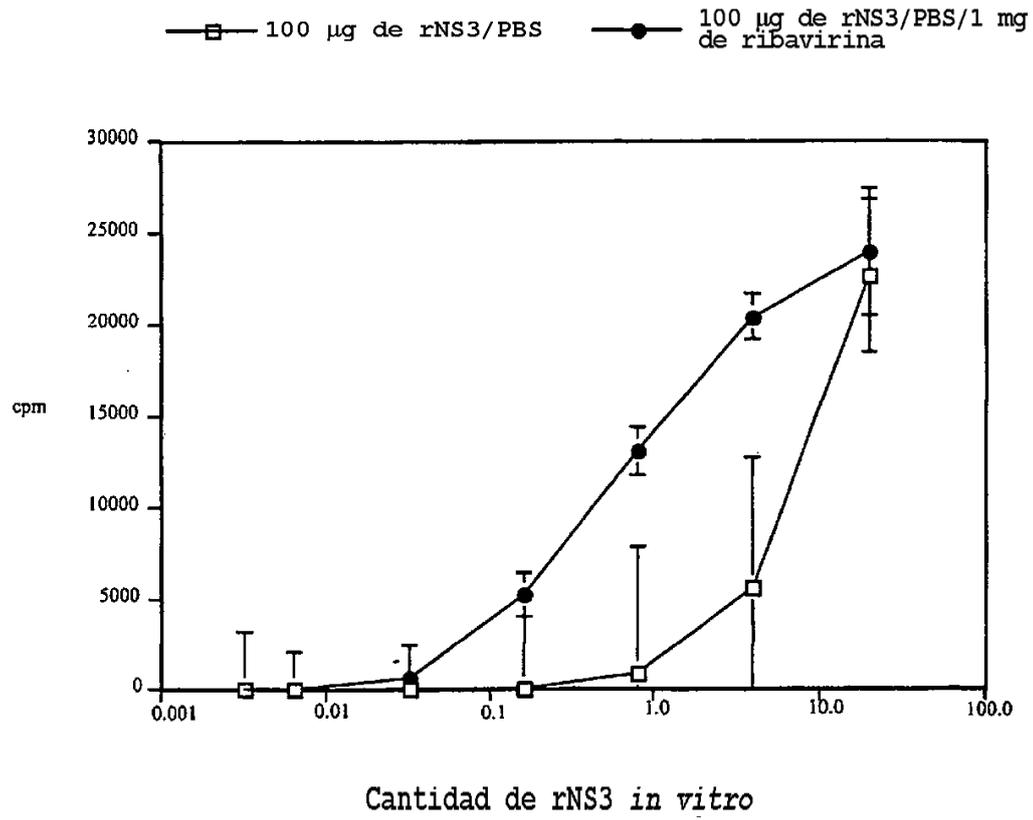


Figura 4

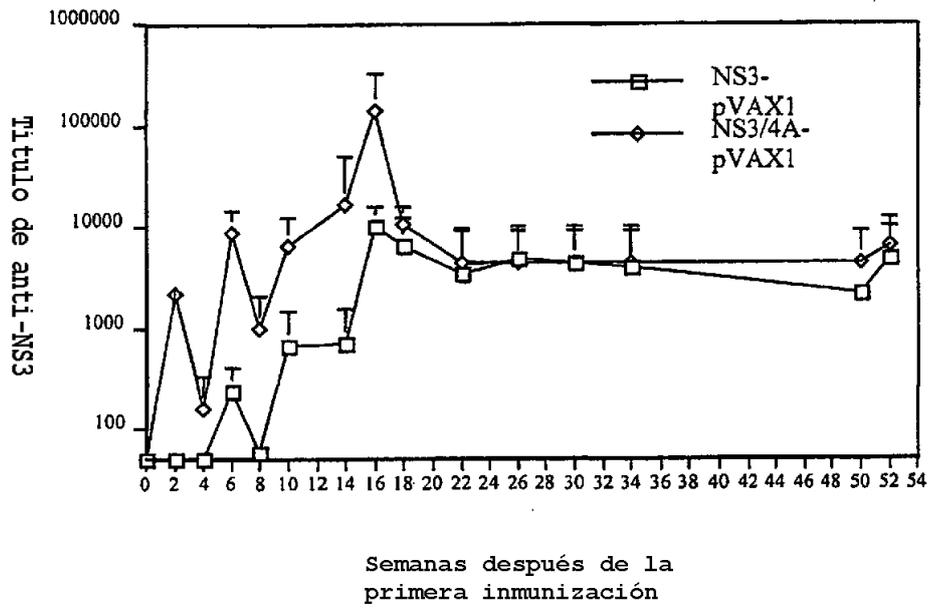


Fig. 5A

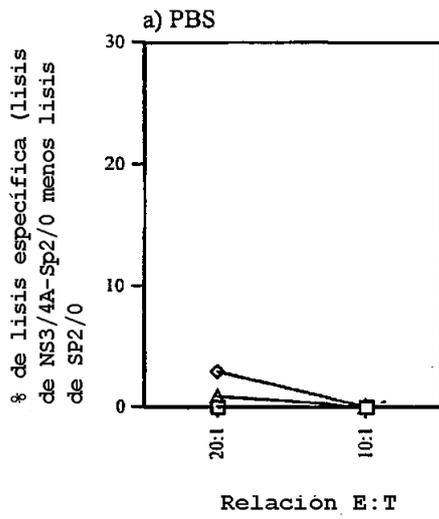


Fig. 5B

