

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 585 735**

51 Int. Cl.:

C12N 7/04	(2006.01)
C07K 14/02	(2006.01)
C07K 14/18	(2006.01)
A61K 39/29	(2006.01)
A61K 39/295	(2006.01)
C12N 15/62	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.06.2009 E 09766080 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.03.2016 EP 2285952**

54 Título: **Nuevas proteínas de fusión y su aplicación para la preparación de vacunas contra la hepatitis C**

30 Prioridad:

17.06.2008 FR 0803377

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

07.10.2016

73 Titular/es:

**UNIVERSITÉ FRANÇOIS RABELAIS DE TOURS
(100.0%)
3, rue Tanneurs, BP 4103
37041 Tours Cedex 1, FR**

72 Inventor/es:

**ROINGEARD, PHILIPPE;
HOURIOUX, CHRISTOPHE y
PATIENT, ROMUALD**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 585 735 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

Nuevas proteínas de fusión y su aplicación para la preparación de vacunas contra la hepatitis C.

- 5 La invención tiene por objeto nuevas proteínas de fusión y su aplicación, en particular para la preparación de vacunas destinadas a la prevención y/o al tratamiento profiláctico de la hepatitis C, o para la prevención y/o el tratamiento profiláctico de la hepatitis C y de la hepatitis B. La presente invención se refiere también a la obtención de partículas de envolturas sub-virales quiméricas entre las proteínas de envoltura del virus humano de la hepatitis B (HBV, por virus de la hepatitis B) y del virus de la hepatitis C (HCV, por virus de la hepatitis C).
- 10 El virus de la hepatitis C, identificado en 1989, después de clonado y secuenciado, representa todavía en la actualidad un problema real de salud pública debido a su amplia distribución a través del mundo y de la evolución frecuente de la enfermedad hacia la cronicidad. En el 2000, la OMS estimaba que aproximadamente el 3% de la población mundial, es decir, aproximadamente 170 millones de personas, estaba infectada por el HCV.
- 15 El HCV genera unas hepatitis crónicas que pueden evolucionar hacia la cirrosis y el carcinoma hepatocelular. El interferón y la ribavirina forman el tratamiento de base de las hepatitis crónicas inducidas por el HCV, pero estos tratamientos no son suficientemente eficaces y tienen unos efectos secundarios importantes. Los tratamientos disponibles sigue siendo costosos, relativamente tóxicos y son eficaces sólo en la mitad de los casos de infección.
- 20 A pesar de que la totalidad del genoma y que las proteínas virales son conocidos desde hace numerosos años, su estructura y su morfogénesis siguen siendo hipotéticos. En la actualidad todavía no existe ninguna vacuna contra la hepatitis C, y la búsqueda de tal candidato de vacuna es actualmente muy activa, [Houghton, M., y Abrignami, S. (2005). Prospects for a vaccine against the hepatitis C virus. *Nature* 436 (7053), 961-6].
- 25 En el caso de una vacuna profiláctica, la casi totalidad de los candidatos potenciales se basan en la utilización de una de las dos o de las dos proteínas de envoltura del HCV, comúnmente denominadas proteínas E1 y E2, y susceptibles de general al mismo tiempo una respuesta inmunitaria celular, y una respuesta humoral neutralizante.
- 30 Sin embargo, las proteínas E1 y E2 del HCV no se auto-ensamblan en partículas sub-virales como puede ser el caso para otros virus. Por otro lado, debido a una fuerte retención de su región transmembranaria en el retículo endoplásmico, su purificación necesita solubilizarlas con detergentes. Resultan unos rendimientos decepcionantes y la pureza de las fracciones obtenidas es mediocre (Forns, X., Bukh, J., y Purcell, R. H. (2002). The challenge of developing a vaccine against hepatitis C virus. *J Hepatol* 37(5), 684-95).
- 35 La alternativa que consiste en recurrir a las proteínas de envoltura con deleciones de su dominio transmembranario permite favorecer la secreción de E1 y E2 en el exterior de la célula, pero el cambio de conformación tridimensional que resulta puede mostrarse indeseable debido a una calidad antigénica disminuida frente a proteínas salvajes.
- 40 El virus HBV existe en dos formas: en forma de viriones infecciosos, y en forma de partículas de exceso de envoltura que se encuentra en la sangre de los sujetos infectados en cantidad mucho más importante que el virus en sí. Este fenómeno se debe a la capacidad de la proteínas S del HBV en auto-ensamblarse y para brotar en partículas sub-virales (o excesos de envoltura) que no contienen proteína de cápside ni ácido nucleico (Moriarty, A. M., Hoyer, B. H., Shih, J. W., Gerin, J. L., y Hamer, D. H. (1981). Expression of the hepatitis B virus surface antigen gene in cell culture by using a simian virus 40 vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78(4), 2606-10). La proteína S salvaje del HBV comprende cuatro dominios transmembranarios. Las partículas sub-virales que resultan del auto-ensamblaje de la proteínas S salvaje son no infecciosas pero muy inmunogénicas: se consideran como un buen candidato de vacuna contra la hepatitis B desde mediados de los años 70. En efecto, han servido de fundamento para la elaboración de vacunas que han demostrado su eficacia para generar una respuesta inmunitaria protectora de la infección por el HBV.
- 50 El documento WO 2008025067 describe unas proteínas de fusión que comprenden la proteína S del virus de la hepatitis B del pato (DHBV).
- 55 La utilización de partículas sub-virales de envoltura de HBV como vector de proteínas extrañas para el virus de la hepatitis B ha sido objeto de trabajos anteriores. Así, la solicitud de patente n° US2004/0145629 titulada " HBV /HCV virus like particle" describe la obtención de quimeras de envoltura HBV-HCV que comprende, por un lado, sistemáticamente la totalidad de la proteína S del virus HBV y, por otro lado, según los ejemplos, un fragmento del ectodominio de una de las proteínas de envoltura E1 o E2 de HVC, injertado en el extremo N-terminal de la proteína S del virus HBV (Mark Selby, Edward Glazer y Michael Houghton "HBV/HCV virus-like particle" patente US n° 2004/01465529)
- 60 Sin embargo, no se ha demostrado que estas construcciones puedan generar la formación de partículas sub-virales bien estructuradas, y que son susceptibles de inducir una respuesta antigénica de calidad.
- 65 En respuesta a los inconvenientes de la técnica anterior, la presente invención tiene como objetivo proporcionar una

proteína de fusión HCV-HBV capaz de formar unas partículas sub-virales no infecciosas, bien estructuradas y eficazmente segregadas, y que contienen la casi totalidad de E1 y/o E2.

5 Uno de los objetivos de la invención es asimismo proporcionar una vacuna contra la hepatitis C y/o contra la hepatitis B.

Un interés suplementario de la invención viene del hecho de que puede fácilmente adaptarse a las cadenas existentes de producción industriales de las vacunas contra la hepatitis B actualmente comercializados.

10 La invención, en su sentido más amplio, es tal como se define en las reivindicaciones independientes.

La invención tiene por objeto una proteína de fusión inmunogénica que comprende por lo menos los dos péptidos siguientes:

15 a) en el lado C-terminal, un primer péptido constituido:

- por la secuencia de aminoácidos de la proteína S de un aislado del virus humano de la hepatitis B (HBV), proteínas S la cual está delecionada de su dominio transmembranario situado en su extremo N-terminal, conservando dicha secuencia de aminoácidos la capacidad en formar unas partículas sub-virales no infecciosas inmunogénicas frente al virus humano de la hepatitis B, o

20 - por una secuencia de aminoácidos que presenta un porcentaje de identidad de por lo menos el 91%, en particular de por lo menos el 93%, particularmente de por lo menos el 95%, y más particularmente de por lo menos el 97%, con dicha secuencia de aminoácidos de la proteína S con deleciones en N-terminal, con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos esté también delecionada del dominio transmembranario situado en el extremo N-terminal de la proteína S de HBV, y que conserva la capacidad para formar unas partículas sub-virales no infecciosas inmunogénicas frente al virus humano de la hepatitis B, o,

25 - por la secuencia de aminoácidos de una variante sintética derivada de dicha secuencia de aminoácidos de dicha proteína S con deleciones, con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos de dicha variante sintética esté también delecionada del dominio transmembranario situado en el extremo N-terminal de la proteína S de HBV, y que conserva la capacidad para formar unas partículas sub-virales no infecciosas inmunogénicas frente al virus humano de la hepatitis B, y

30 b) en el lado N-terminal, un segundo péptido constituido:

- por la secuencia de aminoácidos del dominio transmembranario y del ectodominio de por lo menos una proteína de envoltura de un aislado del virus de la hepatitis C (HCV), o

35 - por una secuencia de aminoácidos que presenta un porcentaje de identidad de por lo menos el 78%, en particular de por lo menos el 80%, particularmente de por lo menos el 85% y más particularmente de por lo menos el 90%, con dicha secuencia de aminoácidos del dominio transmembranario y del ectodominio de una proteína de envoltura de un aislado del virus de la hepatitis C, con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos conserve las propiedades de dicho dominio transmembranario y las propiedades inmunogénicas frente al virus de la hepatitis C, o

40 - por la secuencia de aminoácidos de una variante sintética derivada de dicha secuencia de aminoácidos del dominio transmembranario y del ectodominio de la proteína E1 o E2 de HCV, con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos conserve las propiedades de dicho dominio transmembranario y las propiedades inmunogénicas frente al virus de la hepatitis C, siendo dicha proteína de envoltura de un aislado del virus de la hepatitis C seleccionada de entre la proteína E1, la proteína E2 o un péptido de fusión que comprende la proteína E1 y la proteína E2.

45 Se entiende por "proteína de fusión" cualquier proteína que comprende por lo menos la proteína S delecionada de su dominio transmembranario situado en su extremo N-terminal de un aislado del HBV (Sd), y la casi totalidad de una proteína de envoltura de una proteína de envoltura E1 y/o E2 de un aislado de HCV, cuyo dominio transmembranario se sustituye con el delecionado en N-terminal de S del HBV (figuras 3B, 3C, 4D y 4E).

50 Se entiende por "proteína inmunogénica" cualquier proteína, en particular cualquier proteína de fusión según la invención así como cualquier fragmento de cualquier proteína de fusión descrita aquí, dotada de propiedades antigénicas y capaces de generar una reacción o una respuesta inmunitaria. En particular, una proteína se considera como inmunogénica frente a HCV y/o HBV si genera respectivamente después de la inmunización una respuesta humoral anti-E1, anti-E2 y/o anti-S, detectada por ejemplo según un protocolo descrito:

55 - por Huzly *et al.*, 2008, en lo que se refiere a HBV, (Huzly D, Schenk T, Jilg W, Neumann-Haefelin D.

Comparison of nine commercially available assays for quantification of antibody response to hepatitis B virus surface antigen. J Clin Microbiol. 2008 Apr, 46(4):1298-306), o

- por Hamed *et al.*, 2008, en lo que se refiere a HCV, (Hamed MR, Tarr AW, McClure CP, Ball JK, Hicklirig TP, Irving WL. Association of antibodies to hepatitis C virus glycoproteins 1 and 2 (anti-E1E2) with HCV disease. J Viral Hepat. 2008 May, 15(5):339-45).

Se entiende por "capacidad para formar unas partículas sub-virales" la aptitud de cualquier proteína, en particular la proteína S del HBV, particularmente de la proteína S delecionada de su dominio transmembranario N-terminal, y más particularmente de una proteína de fusión de la invención que comprende la proteína S delecionada de N-terminal, para ensamblarse en presencia de la proteína Sa salvaje o, llegado el caso, para auto-ensamblarse, en partículas sub-virales filamentosas o esféricas; pudiendo dicha capacidad para formar unas partículas sub-virales por lo menos ser puestas en evidencia por observación según en particular un análisis en microscopia electrónica, y en particular mediante el ensayo descrito en el ejemplo 1 y 2 (§I-5 et §II-7) de este documento y en particular ilustrado por las figuras 7D, 7G, 11B a 11D.

Se entiende por "partícula sub-viral no infecciosa" cualquier partícula filamentosas o esférica, que resulta del ensamblaje de la proteína S salvaje de HBV (figura 2B) y/o de la proteína S delecionada de su dominio transmembranario N-terminal, estando dicha partícula desprovista del genoma viral, y en particular sintetizada y segregada en muy amplio exceso, y que puede ser analizado mediante cualquier protocolo que permite poner en evidencia la ausencia de fragmentos nucleotídicos específicos de HBV o de HCV, tal como en particular por la amplificación por PCR anteriormente descrita por ejemplo:

- en lo que se refiere a HCV, por (Halfon P, Bourlière M, Ouzan D, Sène D, Saadoun D, Khiri H, Pénaranda G, Martineau A, Oulès V, Cacoub P. Occult HCV infection revisited with ultra-sensitive real-time PCR assay. J. Clin. Microbiol. 30 de abril de 2008),
- en lo que se refiere a HCV, por (Thibault V, Pichoud C, Mullen C, Rhoads J, Smith JB, Bitbol A, Thamm S, Zoulim F. Characterization of a new sensitive PCR assay for quantification of viral DNA isolated from patients with hepatitis B virus infections. J. Clin. Microbiol. Diciembre de 2007. 45(12):3948-53),

y cuyo resultado es negativo.

Se entiende por "aislado del virus HCV" cualquier aislado miembro de la familia de los *Flaviviridae* y que pertenece al género *Hepacivirus* y constituido por una poliproteína de más de 3000 aminoácidos del virus HCV, esquematizada en la figura 1 (Choo, Q. L., Kuo, G., Weiner, A. J., Overby, L. R., Bradley, D. W., y Houghton, M (1989). Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. Science 244(4902), 359-362; Choo *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991) v88:2451-2455; Han *et al.* Characterization of the terminal regions of hepatitis C viral RNA: identification of conserved sequences in the 5' untranslated region and poly(A) tails at the 3' end. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991) 88:1711-1715); o cualquier aislado clasificado por el International Committee for the Taxonomy of Viruses (ICTV) como estando emparejado con el HCV.

Se entiende por "aislado del virus HBV" cualquier aislado miembro de la familia de los *Hepadnaviridae* y que pertenece al género *Orthohepadnavirus*, o cualquier aislado clasificado por el International Committee for the Taxonomy of Viruses (ICTV) como estando emparentado con el HBV (Schaefer S. Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. World J Gastroenterol. 7 de enero de 2007: 13(1):14-21).

Se entiende por "proteínas S" o por "proteínas S salvajes" (S):

- la proteína de envoltura de un aislado del virus HBV que comprende en particular 226 aminoácidos y que comprende cuatro dominios transmembranarios (figura 2A), y en particular la proteína de envoltura del aislado HBV adw, o
- la variante natural procedente de un aislado del virus HBV, o la variante sintética de la proteína antes mencionada.

Se entiende por "ensamblaje" la capacidad de una proteína para formar unas partículas sub-virales asociándose con la proteína S salvaje. Se entiende por "auto-ensamblaje" la capacidad de una proteína para formar por sí misma unas partículas sub-virales.

Se entiende por "proteína S delecionada de su dominio transmembranario situado en su extremo N-terminal" o por "proteína S delecionada de N-terminal" o por "proteína S delecionada" (Sd):

- la proteína S antes definida, delecionada de la región comprendido el aminoácido en la posición 1 al aminoácido en la posición 19, o en la posición 1 con el aminoácido en la posición 20, o en la posición 1 con el aminoácido en la posición 21, y preferentemente en la posición 1 con el aminoácido en la posición 22 de la

proteína S de un aislado del virus HBV, o

- la proteína S antes mencionada que presenta un porcentaje de identidad de por lo menos un 91%, en particular de por lo menos un 93%, particularmente de por lo menos un 95%, y más particularmente de por lo menos un 97%, con dicha región de la proteína S delecionada, o
- la "variante natural" procedente de un aislado del virus HBV, o la "variante sintética" de la proteína S delecionada antes mencionada.

Se entiende por "proteína de envoltura de un aislado del virus de la hepatitis C" la casi totalidad de una de las dos proteínas E1 y E2, constituidas por su ectodominio y por su dominio transmembranario (figuras 4B y 4C), y que corresponden:

* a los fragmentos peptídicos de la proteína del virus HCV, y en particular del aislado HCV-1a del virus HCV, localizados en las regiones comprendidas:

- del aminoácido en la posición 192 al aminoácido en la posición 383, o en particular del aminoácido en la posición 192 al aminoácido en la posición 380, en lo que se refiere a la proteína E1, y
- del aminoácido en la posición 384 al aminoácido en la posición 746, o en particular del aminoácido en la posición 384 al aminoácido en la posición 743, en lo que se refiere a la proteína E2; o

* los fragmentos que presentan un porcentaje de identidad de por lo menos un 75%, en particular de por lo menos un 80%, particularmente de por lo menos un 85%, y más particularmente de por lo menos un 90%, con dicha región E1 antes mencionada, o

* los fragmentos que presentan un porcentaje de identidad de por lo menos un 78%, en particular de por lo menos un 80%, particularmente de por lo menos un 85%, y más particularmente de por lo menos un 90% con dicha región E2 antes mencionada, o

* las variantes naturales o variantes sintéticas de la poliproteína de un aislado del virus HCV.

Se entiende por "ectodominio de las proteínas de envoltura del virus de la hepatitis C"

* las partes de fragmentos peptídicos de E1 o E2, procedentes de la poliproteína del virus HCV, y en particular del aislado HCV-1a del virus HCV, localizados en las regiones comprendidas:

- del aminoácido en la posición 192 al aminoácido en la posición 352, o en particular del aminoácido en la posición 192 al aminoácido en la posición 352, en lo que se refiere al ectodominio de la proteína E1, y
- del aminoácido en la posición 384 al aminoácido en la posición 717, en particular del aminoácido en la posición 384 al aminoácido en la posición 717, en lo que se refiere al ectodominio de la proteína E2; o

* a fragmentos que presentan un porcentaje de identidad de por lo menos un 75%, en particular de por lo menos un 80%, particularmente de por lo menos un 85%, y más particularmente de por lo menos un 90%, con dicha región E1 antes mencionada, o

* a fragmentos que presentan un porcentaje de identidad de por lo menos un 78%, en particular de por lo menos un 80%, particularmente de por lo menos un 85%, y más particularmente de por lo menos un 90%, con dicha región E2 antes mencionada, o

* a variantes naturales o a variantes sintéticas de la poliproteína de un aislado del virus HCV.

Se entiende por "dominios transmembranarios de las proteínas de envoltura del virus de la hepatitis C",

* las partes de fragmentos peptídicos de E1 o E2, procedentes de la poliproteína del virus HCV, y en particular del aislado HCV-1a del virus HCV, localizados en las regiones comprendidas:

- del aminoácido en la posición 353 al aminoácido en la posición 383, y ventajosamente del aminoácido en la posición 353 al aminoácido en la posición 380, en lo que se refiere al dominio transmembranario de la proteína E1, y
- del aminoácido en la posición 718 al aminoácido en la posición 746, y ventajosamente del aminoácido en la posición 718 al aminoácido en la posición 743, en lo que se refiere al dominio transmembranario de la proteína E2, o

* los fragmentos que presentan un porcentaje de identidad de por lo menos un 75%, en particular de por lo menos un 80%, particularmente de por lo menos un 85%, y más particularmente de por lo menos un 90%, con dicha región E1 antes mencionada, o

5 * los fragmentos que presentan un porcentaje de identidad de por lo menos un 78%, en particular de por lo menos un 80%, particularmente de por lo menos un 85%, y más particularmente de por lo menos un 90%, con dicha región E2 antes mencionada, o

* las variantes naturales o variantes sintéticas de la poliproteína de un aislado del virus HCV.

10 Se entiende por "porcentaje de identidad" el porcentaje determinado por comparación directa de dos secuencias de moléculas polipeptídicas, determinando el número de restos de aminoácidos en las dos secuencias, después dividiéndolo por el número de restos de aminoácidos de la secuencia más larga de las dos, y multiplicando el resultado por 100.

15 Un objeto de la presente invención se refiere a una proteína de fusión, tal como se reivindica, que comprende cualquier secuencia peptídica de un aislado cualquiera del virus HCV y/o del virus HBV, sea cual sea el porcentaje de identidad antes mencionado de dicha secuencia frente a secuencias específicas mencionadas aquí.

20 El término "variante natural" hace referencia a cualquier variabilidad, cualquier polimorfismo, cualquier diversidad, de una secuencia de ADN, de un alelo, o de una secuencia de proteína, entre aislados de una misma especie o de una misma población. Se determina el "porcentaje de variabilidad natural" por comparación directa de dos moléculas polipeptídicas, o polinucleotídicas, derivado de una molécula de referencia salvaje y dotadas de propiedades biológicas de interés, tales como propiedades inmunogénicas y/o la capacidad para formar unas partículas sub-virales. Se cuantifica determinando el número exacto de restos de aminoácidos, o de ácidos nucleicos, idénticos entre las dos secuencias, después dividiéndolos por el número de restos de aminoácidos, o de ácidos nucleicos, de la secuencia más corta de las dos, y multiplicando el resultado por 100.

30 Dicho porcentaje de variabilidad entre dos secuencias es particularmente versátil ya que depende en particular del virus considerado, del genotipo considerado, del fragmento de secuencia considerado - siendo la región del ectodominio del HCV por ejemplo más variable que la región del dominio transmembranario -, etc. Así, el porcentaje de variabilidad de las proteínas E1 y E2 del HCV es del 88% en nucleótidos, y del 90% en aminoácidos, entre cepas de un mismo genotipo. Pero cae al 55% en nucleótido, y al 59% en aminoácidos entre cepas de diferentes genotipos. HBV es un virus de ADN, por lo tanto es mucho menos variable que el HCV (Zhang M, Gaschen B, Blay W, Foley B, Haigwood N, Kuiken C, Korber B. Tracking global patterns of N-linked glycosylation site variation in highly variable viral glycoproteins: HIV, SIV, and HCV envelopes and influenza hemagglutinin. *Glycobiology*. diciembre de 14(12):1229-46).

40 Un objeto de la presente invención se refiere a una proteína de fusión y/o una molécula de ácidos nucleicos híbridos, tal como se reivindica y que comprende cualquier variante natural o cualquier fragmento de variante natural, dotada de una secuencia peptídica y/o nucleotídica procedente de cualquier aislado del virus HCV y/o del virus HBV humano, sea cual sea el porcentaje de variabilidad natural y/o sintético, antes mencionado de dicha secuencia frente a las secuencias específicas descritas aquí.

45 El término "variante sintética" se refiere a cualquier molécula polipeptídica, o polinucleotídica según la invención, o cualquier fragmento de molécula polipeptídica, o polinucleotídica descrita aquí, derivado por recombinación de una molécula salvaje de referencia, bien por adición, delección, sustitución, de dicha molécula salvaje de referencia, con la condición de que conserve las propiedades biológicas de interés, tales como propiedades inmunogénicas y/o la capacidad para formar unas partículas sub-virales. Se determina el "porcentaje de variabilidad sintética" por comparación directa de dicha molécula derivada de dicha molécula salvaje de referencia, y determinando el número exacto de restos de aminoácidos, o de ácidos nucleicos, idénticos entre las dos secuencias, frente a su posición y a su naturaleza, y después dividiendo por el número de restos de aminoácidos, o de ácidos nucleicos, de la secuencia más corta de las dos, y multiplicando el resultado por 100.

55 Un objeto de la presente invención se refiere a una proteína de fusión, tal como se reivindica, y que comprende cualquier variante sintética o cualquier fragmento de variante sintética, dotada de una secuencia nucleotídica y/o peptídica derivada de un aislado cualquiera del virus HCV y/o del virus HBV.

60 Según un aspecto particularmente ventajoso de la invención, los dominios transmembranarios de E1 y/p de E2, y que constituyen una parte de la proteína de fusión, son delecionados de por lo menos uno de los tres últimos aminoácidos, y en particular de los tres últimos aminoácidos, situados en la posición C-terminal, de manera que dichos dominios transmembranarios delecionados de E1 y/o de E2 presentan un porcentaje de identidad con los dominios transmembranarios de E1 y/o E2 salvajes, de por lo menos un 91%, en lo que se refiere a E1 y de por lo menos un 90% en lo que se refiere a E2.

65 Dicha delección de por lo menos uno de los tres aminoácidos, y en particular de los tres últimos aminoácidos, en la

posición C-terminal, presenta la ventaja de inactivar el sitio de escisión de las peptidasas representado en la figura 1 por el símbolo ✂, y que es necesario para la maduración de la poliproteína del HCV, pero que es indeseable en el ámbito de las construcciones quiméricas de la presente invención.

5 [1] La invención tiene por objeto una proteína de fusión inmunogénica que comprende por lo menos los dos péptidos siguientes:

a) en el lado C-terminal, un primer péptido constituido:

- 10 - por la secuencia de aminoácidos de la proteína S de un aislado del virus humano de la hepatitis B (HBV), proteína S que está delecionada de su dominio transmembranario situado en su extremo N-terminal, conservando dicha secuencia de aminoácidos la capacidad de formar unas partículas sub-virales no infecciosas inmunogénicas frente al virus humano de la hepatitis B, o
- 15 - por una secuencia de aminoácidos que presentan un porcentaje de identidad de por lo menos un 91%, en particular de por lo menos un 93%, particularmente de por lo menos un 95%, y más particularmente de por lo menos un 97%, con dicha secuencia de aminoácidos de la proteína S delecionada de extremo N, con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos esté también delecionada del dominio transmembranario situado en el extremo N-terminal de la proteína S de HBV, y que conserve la capacidad de formar unas partículas sub-virales no infecciosas, inmunogénicas frente al virus humano de la hepatitis B, o
- 20 - por la secuencia de aminoácidos de una variante sintética derivada de dicha secuencia de aminoácidos de la proteína S delecionada, con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos de dicha variante sintética esté también delecionada del dominio transmembranario situado en el extremo N-terminal de la proteína S de HBV, y que conserve la capacidad de formar unas partículas sub-virales no infecciosas, inmunogénicas frente al virus humano de la hepatitis B, y

b) en el lado N-terminal, un segundo péptido constituido:

- 30 - por la secuencia de aminoácidos del dominio transmembranario y del ectodominio de por lo menos una proteína de envoltura de un aislado del virus de la hepatitis C (HCV), o
- 35 - por una secuencia de aminoácidos que presenta un porcentaje de identidad de por lo menos un 78%, en particular de por lo menos un 80%, particularmente de por lo menos un 85%, y más particularmente de por lo menos un 90%, con dicha secuencia de aminoácidos del dominio transmembranario y del ectodominio de una proteína de un aislado del virus de la hepatitis C, con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos conserve las propiedades de dicho dominio transmembranario, la capacidad para formar unas partículas sub-virales no infecciosas, y las propiedades inmunogénicas frente al virus de la hepatitis C, o
- 40 - por la secuencia de aminoácidos de una variante sintética derivada de dicha secuencia de aminoácidos del dominio transmembranario y del ectodominio de la proteína E1 o E2 de HCV, con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos conserve las propiedades de dicho dominio transmembranario y las propiedades inmunogénicas frente al virus de la hepatitis C, siendo dicha proteína de envoltura de un aislado del virus de la hepatitis C seleccionada de entre la proteína E1, la proteína E2, o un péptido de fusión que comprende la proteína E1 y la proteína E2.

El objeto de la presente invención se refiere en particular a una proteína de fusión que comprende por lo menos:

- 50 - por un lado, la proteína S de HBV delecionada (Sd), esencialmente constituida por sus tres dominios transmembranarios situados en el extremo C-terminal (figuras 2A y 3A), conservando dicha proteína S delecionada la capacidad de ensamblaje en partículas sub-virales, y conservando las propiedades inmunogénicas contra el virus HBV humano, y
- 55 - por otro lado, la casi totalidad de la secuencia de una de las proteínas E1 y E2, que conservan también las propiedades inmunogénicas contra el virus HCV,

de manera que dicha proteína de fusión, representada en particular por las figuras 3B o 3C, sea capaz de ensamblarse en partículas sub-virales, en presencia de la proteína S salvaje, y sea susceptible de inducir una inmunización contra los virus HBV y/o HCV, y en particular inducir una doble inmunización contra los virus HBV y HCV.

65 [1a] Ventajosamente, la presente invención tiene por objeto una proteína de fusión inmunogénica antes mencionada, que comprende en el extremo N-terminal de dicho segundo péptido (E1 o E2) un tercer péptido constituido por la

secuencia de aminoácidos de un péptido de iniciación de transferencia (PIT) de un aislado del virus de la hepatitis C.

Se entiende por "péptido de iniciación de transferencia" una proteína E1 o E2 (respectivamente PIT1 o PIT2) o de una proteína de fusión según la invención,

- 5 * el fragmento peptídico de la poliproteína del virus HCV, y en particular del aislado HCV-1a, localizado en la región comprendida:
 - 10 - del aminoácido en la posición 166 al de la posición 191 en lo que se refiere a la proteína E1, y
 - del aminoácido en la posición 366 al de la posición 383 en lo que se refiere a la proteína E2, o
- * la variante natural procedente de un aislado del virus HCV, o la variante sintética de dicho fragmento peptídico antes mencionado, o
- 15 * cualquier fragmento peptídico injertado en el extremo N-terminal de dicho segundo péptido,

con la condición de que dicho fragmento peptídico, cuando constituye una parte de la proteína de fusión de la presente invención, conserva la capacidad de dirigir, después de la traducción, dicha proteína de fusión al retículo endoplásmico de manera que sea correctamente glicosilada y que su conformación tridimensional, y/o sus calidades antigénicas, sean lo mejor conservadas posible frente a proteínas salvajes.

[2] Según otro aspecto particularmente ventajoso, la presente invención tiene por objeto una proteína de fusión inmunogénica antes mencionada, en la que el segundo péptido situado en el lado N-terminal, está constituido:

- 25 - por la totalidad de la secuencia de aminoácidos del dominio transmembranario y del ectodominio de la proteína de envoltura E1, o
- 30 - por una secuencia de aminoácidos que presenta un porcentaje de identidad de por lo menos un 75%, en particular de por lo menos un 80%, particularmente de por lo menos un 85%, y más particularmente de por lo menos un 90% con dicha secuencia de aminoácidos del dominio transmembranario y del ectodominio de la proteína de envoltura E1, con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos conserve las propiedades de dicho dominio transmembranario y las propiedades inmunogénicas frente al virus de la hepatitis C, o
- 35 - por la secuencia de aminoácidos de una variante sintética derivada de dicha proteína E1; con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos conserve las propiedades de dicho dominio transmembranario y las propiedades inmunogénicas frente al virus de la hepatitis C.

Un objeto particular de la invención reside en la proteína de fusión E1-Sd, de la cual se encuentra una representación esquemática en la figura 3B, y que comprende la casi totalidad de la proteína E1 del HCV, injertada en el extremo N-terminal de la proteína S delecionada de HBV.

(3). Ventajosamente, la presente invención tiene particularmente por objeto una proteína de fusión inmunogénica antes mencionada en la que el segundo péptido situado en el lado N-terminal, está constituido:

- 45 - por la totalidad de la secuencia de aminoácidos del dominio transmembranario y del ectodominio de la proteína de envoltura E2, o
- 50 - por una secuencia de aminoácidos que presenta un porcentaje de identidad de por lo menos un 78%, en particular de por lo menos un 80%, particularmente de por lo menos un 85%, y más particularmente de por lo menos un 90%, con dicha secuencia de aminoácidos del dominio transmembranario y del ectodominio de la proteína de envoltura E2, con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos conserve las propiedades de dicho dominio transmembranario y las propiedades inmunogénicas frente al virus de la hepatitis C, o
- 55 - por la secuencia de aminoácidos de una variante sintética derivada de dicha proteína E2, con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos conserve las propiedades de dicho dominio transmembranario y las propiedades inmunogénicas frente al virus de la hepatitis C.

Un objeto particular de la invención reside en la proteína de fusión E2-Sd, de la cual se encuentra una representación esquemática en la figura 3C, y que comprende la casi totalidad de la proteína E2 de HCV, injertada en el extremo N-terminal de la proteína S delecionada de HBV.

(3b). En este aspecto, la invención se refiere más particularmente a una proteína de fusión inmunogénica tal como se reivindica, y que comprende los tres péptidos siguientes:

- 65 a)- en el lado C-terminal, un primer péptido constituido:

- 5
- por la secuencia de aminoácidos de la proteína S delecionada de su dominio transmembranario del extremo N-terminal de un aislado del virus humano de la hepatitis B, conservando dicha secuencia de aminoácidos la capacidad de formar unas partículas sub-virales no infecciosas inmunogénicas frente al virus humano de la hepatitis B, o
- 10
- por una secuencia de aminoácidos que presenta un porcentaje de identidad de por lo menos un 91%, en particular de por lo menos un 93%, particularmente de por lo menos un 95%, y más particularmente de por lo menos un 97%, con dicha secuencia de aminoácidos de la proteína S delecionada del extremo N-terminal, con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos esté también delecionada del dominio transmembranario situado en el extremo N-terminal de la proteína S de HBV, y que conserve la capacidad de formar unas partículas sub-virales no infecciosas, inmunogénicas frente al virus humano de la hepatitis B, o
- 15
- por la secuencia de aminoácidos de una variante sintética derivada de dicha la secuencia de aminoácidos de la proteína S delecionada del extremo N-terminal, con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos esté también delecionada del dominio transmembranario situado en el extremo N-Terminal de la proteína S de HBV, y que conserve la capacidad de formar unas partículas sub-virales no infecciosas, inmunogénicas frente al virus humano de la hepatitis B;
- 20
- b)- un segundo péptido de secuencia constituido:
- por la totalidad de la secuencia de aminoácidos del dominio transmembranario y del ectodominio de una proteína de envoltura E2 de un aislado del virus de la hepatitis C, o
- 25
- por una secuencia de aminoácidos que presenta un porcentaje de identidad de por lo menos un 78%, en particular de por lo menos un 80%, particularmente de por lo menos un 85%, y más particularmente de por lo menos un 90%, con dicha secuencia de aminoácidos del dominio transmembranario y del ectodominio de dicha proteína de envoltura, con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos conserve las propiedades de dicho dominio transmembranario y las propiedades inmunogénicas frente al virus de la hepatitis C, o
- 30
- por la secuencia de aminoácidos de una variante sintética derivada de dicha secuencia de aminoácidos de la proteína E2, con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos conserve las propiedades de dicho dominio transmembranario y las propiedades inmunogénicas frente al virus de la hepatitis C, y,
- 35
- c)- en el lado N-terminal, un tercer péptido de secuencia constituido
- por la totalidad de la secuencia de aminoácidos del dominio transmembranario y del ectodominio de una proteína de envoltura E1, de un aislado del virus de la hepatitis C, o
- 40
- por una secuencia de aminoácidos que presenta un porcentaje de identidad de por lo menos un 75%, en particular de por lo menos un 80%, particularmente de por lo menos un 85%, y más particularmente de por lo menos un 90%, con dicha secuencia de aminoácidos del dominio transmembranario y del ectodominio de dicha proteína de envoltura, con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos conserve las propiedades de dicho dominio transmembranario y las propiedades inmunogénicas frente al virus de la hepatitis C, o
- 45
- por la secuencia de aminoácidos
- 50
- por una variante sintética, derivada de dicha secuencia de aminoácidos de una proteína E1, con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos conserve las propiedades de dicho dominio transmembranario y las propiedades inmunogénicas frente al virus de la hepatitis C,
- 55
- estando dicho segundo péptido situado entre el primer y el tercer péptido, siendo los primero, segundo y tercer péptidos preferentemente contiguos.

60 Un objeto particular de la invención reside en la proteína de fusión E1-E2-Sd, que comprende el ectodominio de E1 del HCV injertado en el extremo N-terminal de la casi totalidad de la proteína E2, ella misma injertada en el extremo N-terminal de la proteína S delecionada de HBV.

65 Un objeto particular de la invención reside también en la proteína de fusión E2-E1-Sd, y que comprende el ectodominio de E2 de HCV injertado en el extremo N-terminal de la casi totalidad de la proteína E1, ella misma injertada en el extremo N-terminal de la proteína S delecionada de HBV.

(4). Según un aspecto particularmente ventajoso de la invención, el primer péptido y el segundo péptido que

constituyen la proteína de fusión inmunogénica son contiguos, y el extremo C-terminal del segundo péptido está unido de manera covalente al extremo N-terminal del primer péptido.

5 Ventajosamente, según la invención, las proteínas E1 o E2 del virus HCV, o los fragmentos de una proteína de fusión de la invención PIT1-E1, PIT2-E2, E1-E2, o PIT1-E1-E2 están unidos de manera covalente y contigua a la proteína S delecionada del virus HBV.

10 Según otro aspecto ventajoso de la invención, un péptido de unión une el primer y el segundo péptido que constituyen la proteína de fusión antes mencionada, estando dicho péptido de unión constituido por el aminoácido, o por 2 aminoácidos, o por 3 aminoácidos, o por 4 aminoácidos, o por 5 aminoácidos; con la condición de que dicha proteína de fusión inmunogénica conserve la capacidad de ensamblarse en partículas sub-virales, en presencia de la proteína S salvaje, y las propiedades inmunogénicas frente al virus HCV, o el virus HBV, o los virus HCV y HBV.

15 (5). La invención tiene también por objeto particular, una proteína de fusión inmunogénica antes mencionada, en la que el primer péptido en la posición C-terminal está constituido:

20 - por una secuencia de aminoácidos delimitada por los aminoácidos contiguos situados en la región comprendida desde el aminoácido en la posición 23 al de la posición 226 de la proteína S del virus HBV, y particularmente del aislado HBV adw,

y en particular por la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 2, conservando dicha secuencia de aminoácidos la capacidad de formar unas partículas sub-virales no infecciosas inmunogénicas frente al virus humano de la hepatitis B, o

25 - por una secuencia de aminoácidos que presenta un porcentaje de identidad de por lo menos un 91%, en particular de por lo menos un 93%, particularmente de por lo menos un 95%, y más particularmente de por lo menos un 97%, con dicha secuencia de aminoácidos contiguos de la proteína S, con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos esté también delecionada del dominio transmembranario situado en el extremo N-terminal de la proteína S de HBV, y que conserve la capacidad de formar unas partículas sub-virales no infecciosas, inmunogénicas frente al virus humano de la hepatitis B, o

30 - por la secuencia de aminoácidos de una variante sintética, derivada de dicha secuencia de aminoácidos de la proteína S, con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos de dicha variante natural o sintética esté también delecionada del dominio transmembranario situado en el extremo N-terminal de la proteína S de HBV, y que conserve la capacidad de formar unas partículas sub-virales no infecciosas, inmunogénicas frente al virus humano de la hepatitis B.

40 Un objeto más particular de la invención reside en la proteína de fusión E1-Sd o E2-Sd, o E1-E2-Sd, para la cual la proteína S delecionada es la del aislado HBVadw y tiene por secuencia la SEC ID nº 2 (véase la tabla 1).

(6). La invención tiene también por objeto particular una proteína de fusión inmunogénica antes mencionada, en la que el segundo péptido en la posición N-terminal está constituido:

45 - por una secuencia de aminoácidos del dominio transmembranario y del ectodominio de una proteína de envoltura de un aislado del virus de la hepatitis C (HCV) y delimitada por los aminoácidos contiguos situados en la región comprendida desde el aminoácido en la posición 192 al de la en la posición 380 de la proteína E1 de HCV, y particularmente del aislado HCV-1a, y en particular de la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 4, o

50 - por una secuencia de aminoácidos que presenta un porcentaje de identidad de por lo menos un 75%, en particular de por lo menos un 80%, particularmente de por lo menos un 85%, y más particularmente de por lo menos un 90%, con dicha secuencia de aminoácidos contiguos de la citada proteína E1, con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos conserve las propiedades de dicho dominio transmembranario y las propiedades inmunogénicas frente al virus de la hepatitis C, o

55 - por la secuencia de aminoácidos de una variante sintética derivada de dicha secuencia de aminoácidos contiguos del dominio transmembranario y del ectodominio de dicha proteína E1, con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos conserve las propiedades de dicho dominio transmembranario y las propiedades inmunogénicas frente al virus de la hepatitis C.

60 La invención tiene también por objeto particular, una proteína de fusión para la cual la secuencia de proteína E1 procede del aislado HCV-1a, y corresponde específicamente a la región antes mencionada, tal como, en particular, las proteínas de fusión E1-Sd de SEC ID nº 4 o E1-E2-Sd, PIT1-E1-E2-Sd (véase la tabla 1).

65 (7) La invención se refiere particularmente a una proteína de fusión inmunogénica mencionada anteriormente, en la que el primer y el segundo péptido son contiguos, estando dicha proteína de fusión constituida por:

- la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 8, o
- una secuencia de aminoácidos que presenta un porcentaje de identidad de por lo menos un 88%, en particular de por lo menos un 90%, particularmente de por lo menos un 92%, y más particularmente de por lo menos un 95%, con SEC ID nº 8, con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos esté también delecionada del dominio transmembranario situado en el extremo N-terminal de la proteína S de HBV, conserve las propiedades del dominio transmembranario de la proteína de envoltura de HCV y conserve la capacidad de formar unas partículas sub-virales, no infecciosas e inmunogénicas frente a HCV y/o frente a HBV humano, o
- la secuencia de aminoácidos de una variante sintética derivada de dicha secuencia SEC ID nº 8, con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos de dicha variante sintética esté también delecionada del dominio transmembranario situado en el extremo N-terminal de la proteína S de HBV, conserve las propiedades del dominio transmembranario de la proteína de envoltura de HCV y que conserve la capacidad de formar unas partículas sub-virales, no infecciosas e inmunogénicas frente a HCV y/o frente a HBV humano.

La invención tiene también por objeto una proteína de fusión E1-Sd para la cual la secuencia de proteína E1 procede del aislado HCV-1a, y está dotada de la secuencia SEC ID nº 8 mencionada anteriormente, correspondiendo dicha secuencia a la SEC ID nº 2 de Sd, injertada arriba de la SEC ID nº 4 de E1.

(7b). En este aspecto, la invención tiene más particularmente por objeto una proteína de fusión inmunogénica antes mencionada, que comprende un tercer péptido de inicio de transferencia situado en el lado N-terminal del segundo péptido, estando dicha proteína de fusión representada por:

- la SEC ID nº 12, o
- una secuencia de aminoácidos que presenta una homología de identidad de por lo menos un 83%, en particular de por lo menos un 85%, particularmente de por lo menos un 90%, y más particularmente de por lo menos un 95%, con dicha SEC ID nº 12, con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos esté también delecionada del dominio transmembranario situado en el extremo N-terminal de la proteína S de HBV, conserve las propiedades del dominio transmembranario de la proteína de envoltura de HCV y que conserve la capacidad de formar unas partículas sub-virales, no infecciosas e inmunogénicas frente al virus de la hepatitis B humano y/o frente al virus de la hepatitis C, o
- de la secuencia de aminoácidos de una variante sintética derivada de dicha SEQ ID nº12, con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos de dicha variante sintética esté también delecionada del dominio transmembranario situado en el extremo N-terminal de la proteína S de HBV, conserve las propiedades del dominio transmembranario de la proteína de envoltura de HCV y conserve la capacidad de formar unas partículas sub-virales, no infecciosas e inmunogénicas frente al virus de la hepatitis B humano y/o frente al virus de la hepatitis C.

La invención tiene también por objeto una proteína de fusión PIT1-E1-Sd para la cual la secuencia de proteína E1 procede de HCV, y particularmente del aislado HCV-1a, y está dotada de la secuencia SEQ ID nº12 mencionada anteriormente, correspondiendo dicha secuencia a la SEC ID nº 2 de Sd, injertada en el extremo N-terminal de la SEC ID nº 4 de E1, ella misma injertada en N-terminal de la secuencia de aminoácidos del péptido de inicio de transferencia de la proteína E1 (PIT1) comprendido en la región constituida desde el aminoácido en la posición 166 al de la posición 191 de HCV.

La inserción de un péptido de inicio de transferencia en el extremo N-terminal de la proteína de fusión E1-Sd mencionada anteriormente tiene como ventaja particular dirigir esta última una vez traducida al retículo endoplásmico, de manera que esté correctamente glicosilada y que su conformación tridimensional y/o que sus cualidades antigénicas no presenten alteración sustancial frente a proteínas salvajes.

(8). La invención tiene también por objeto una proteína de fusión inmunogénica antes mencionada, en la que el segundo péptido en la posición N-terminal está constituido:

- por una secuencia de aminoácidos del dominio transmembranario y del ectodominio de una proteína de envoltura de un aislado del virus de la hepatitis C (HCV) y delimitada por los aminoácidos contiguos situados desde el aminoácido en la posición 384 al de la posición 743 de la proteína E2 de HCV, y particularmente del aislado HCV-1a,
- y en particular por la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 6, o
- por una secuencia de aminoácidos que presenta un porcentaje de identidad de por lo menos un 78%, en

particular de por lo menos un 80%, particularmente de por lo menos un 85%, y más particularmente de por lo menos un 90%, con dicha secuencia de aminoácidos contiguos de proteína E2, con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos conserve dicho dominio transmembranario y las propiedades inmunogénicas frente al virus de la hepatitis C, o

- 5
- por la secuencia de aminoácidos de una variante sintética, derivada de dicha secuencia de aminoácidos contiguos del dominio transmembranario y del ectodominio de dicha proteína E2, con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos conserve las propiedades de dicho dominio transmembranario y las propiedades inmunogénicas frente al virus de la hepatitis C.

10 La invención tiene también por objeto la proteína de fusión E2-Sd o E1-E2-Sd, para la cual secuencia de proteína E2 procede del HCV, y particularmente del aislado HCV-1a, y corresponde específicamente a la región de la secuencia mencionada anteriormente de la proteína E2.

15 (9). La invención se refiere particularmente a una proteína de fusión inmunogénica antes mencionada, en la que el primer y el segundo péptidos son contiguos, estando dicha proteína de fusión constituida por:

- la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 10, o
- una secuencia de aminoácidos que presenta un porcentaje de identidad de por lo menos un 86%, en particular de por lo menos un 88%, particularmente de por lo menos un 90%, y más particularmente de por lo menos un 95%, con la SEC ID nº 10, con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos esté también delecionada del dominio transmembranario situado en el extremo N-terminal de la proteína S de HBV, conserve las propiedades del dominio transmembranario de la proteína de envoltura de HCV y que conserve la capacidad de formar unas partículas sub-virales, no infecciosas e inmunogénicas frente al virus de la hepatitis B humano y/o frente al virus de la hepatitis C, o

- la secuencia de aminoácidos de una variante sintética derivada de dicha SEQ ID nº10,

30 con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos de dicha variante sintética esté también delecionada del dominio transmembranario situado en el extremo N-terminal de la proteína S de HBV, conserve las propiedades del dominio transmembranario de la proteína de envoltura de HCV y conserve la capacidad de formar unas partículas sub-virales, no infecciosas e inmunogénicas frente al virus de la hepatitis B humano y/o frente al virus de la hepatitis C.

35 La invención tiene también por objeto la proteína de fusión E2-Sd para la cual secuencia de la proteína E2 procede del aislado HCV-1a, y está dotada de la secuencia SEC ID nº 10 mencionada anteriormente, correspondiendo dicha secuencia a la SEC ID nº 2 de Sd, injertada secuencia arriba de la SEC ID nº 6 de E2.

40 (9b). A este efecto, la invención tiene más particularmente por objeto una proteína de fusión inmunogénica antes mencionada (PIT2-E2-Sd), que comprende un tercer péptido de inicio de transferencia situado en el lado N-terminal del segundo péptido, estando dicha proteína de fusión representada por:

- la SEC ID nº 14, o
- una secuencia de aminoácidos que presenta una homología de identidad de por lo menos un 82%, en particular de por lo menos un 85%, particularmente de por lo menos un 90%, y más particularmente de por lo menos un 95%, con dicha SEC ID nº 14, o

- de la secuencia de aminoácidos de una variante sintética derivada de dicha SEQ ID nº 14, con la condición de que dicha SEQ ID nº 14 esté también delecionada del dominio transmembranario situado en el extremo N-terminal de la proteína S de HBV, conserve las propiedades del dominio transmembranario de la proteína de envoltura de HCV y conserve la capacidad de formar unas partículas sub-virales, no infecciosas e inmunogénicas frente al virus de la hepatitis B humano y/o frente al virus de la hepatitis C.

55 La invención tiene también por objeto la proteína de fusión PIT2-E2-Sd para la cual la secuencia de proteína E2 procede del aislado HCV-1a, y está dotada de la secuencia mencionada anteriormente SEQ ID nº 14, correspondiendo dicha secuencia a la SEC ID nº 2 de Sd, injertada en el extremo N-terminal de la SEC ID nº 6 de E2, ella misma injertada en el extremo N-terminal de la secuencia de aminoácidos del péptido de inicio de transferencia de la proteína E2 (PIT2) comprendido en la región constituida desde el aminoácido en la posición 366 al de la posición 383 de HCV.

60 La invención tiene también por objeto la proteína de fusión E1-E2-Sd o PIT1-E1-E2-Sd. La invención tiene también por objeto las proteínas de fusión mencionada anteriormente en forma purificada.

65 La invención se refiere también a una molécula de ácidos nucleicos híbrida que codifica para cualquiera de las

proteínas de fusión mencionadas anteriormente.

Se entiende mediante la expresión "molécula de ácido nucleico híbrida", cualquier molécula de ácido nucleico que comprende por lo menos una secuencia que codifica para la proteína S delecionada de su dominio transmembranario situado en su extremo N-terminal de un aislado del virus humano de la hepatitis B, y por lo menos una secuencia que codifica para la casi totalidad de una proteína de envoltura de un aislado del virus de la hepatitis C, o cualquier molécula procedente de una molécula definida anteriormente, y modificada tras la degeneración natural de su código genético.

Ventajosamente, la invención se refiere a una molécula de ácidos nucleicos híbrida mencionada anteriormente, que codifica para una proteína de fusión definida anteriormente, que comprende las tres secuencias de ácidos nucleicos siguientes:

a) en el lado 3', una primera secuencia de ácidos nucleicos que codifican para la proteína S delecionada de su dominio transmembranario situado en su extremo N-terminal, de un aislado del virus humano de la hepatitis B, o

- de una secuencia de ácidos nucleicos que presenta una homología de por lo menos un 91%, en particular de por lo menos un 93%, particularmente de por lo menos un 95%, y más particularmente de por lo menos un 97%, con dicha secuencia de ácidos nucleicos de la proteína S delecionada de N-terminal, con la condición de que la proteína codificada por dicha secuencia de ácidos nucleicos conserve la capacidad de formar unas partículas sub-virales no infecciosas, inmunogénicas frente al virus humano de la hepatitis B, o

- de la secuencia de ácidos nucleicos de una variante sintética, derivada de una secuencia de ácidos nucleicos de dicha proteína S delecionada de N-terminal, con la condición de que la proteína codificada por dicha secuencia de ácidos nucleicos conserve la capacidad de formar unas partículas sub-virales no infecciosas, inmunogénicas frente al virus humano de la hepatitis B, y,

b)- en el lado 5' de la primera secuencia, una segunda secuencia de ácidos nucleicos que codifica para el dominio transmembranario y el ectodominio de por lo menos una proteína, de envoltura E1 o E2 de un aislado del virus de la hepatitis C, o

- de una secuencia de ácidos nucleicos que presenta una homología de identidad de por lo menos un 78%, en particular de por lo menos un 80%, particularmente de por lo menos un 85%, y más particularmente de por lo menos un 90%, con dicha secuencia de ácidos nucleicos que codifican para una de dichas proteínas E1 o E2 de un aislado del virus de la hepatitis C, con la condición de que la proteína codificada por dicha secuencia de ácidos nucleicos conserve las propiedades de dicho dominio transmembranario y las propiedades inmunogénicas frente al virus de la hepatitis C,

- de la secuencia de ácidos nucleicos variante sintética, derivada de dicha secuencia de ácidos nucleicos de una de dichas proteínas E1 o E2, con la condición de que la proteína codificada por dicha secuencia de ácidos nucleicos conserve las propiedades inmunogénicas frente al virus de la hepatitis C, siendo dicha segunda secuencia seleccionada de entre las secuencias que codifican para la proteína E1, para la proteína E2 o para un péptido de fusión que comprende la proteína E1 y la proteína E2, y,

c)- en el lado 5' de la segunda secuencia, una tercera secuencia de ácidos nucleicos que codifica para un péptido de inicio de transferencia de una proteína de envoltura E1 o E2 de un aislado del virus de la hepatitis C (PIT), o

- una secuencia de ácidos nucleicos de una variante natural procedente de un aislado del virus HCV, o de una variante sintética, derivada de dicha secuencia de ácidos nucleicos de la proteína que codifica para un péptido de inicio de transferencia (PIT), con la condición de que el péptido de inicio de transferencia codificado por dicha secuencia de ácidos nucleicos, conserve la capacidad de dirigir, después de la traducción, dicha proteína de fusión al retículo endoplásmico de manera que esté correctamente glicosilada y que su conformación tridimensional presente la menor alteración posible, y/o que sus cualidades antigénicas estén lo mejor preservadas frente a proteínas salvajes, o,

- cualquier secuencia de ácidos nucleicos que codifica para un péptido capaz de dirigir, después de la traducción, dicha proteína de fusión al retículo endoplásmico de manera que esté correctamente glicosilada y que su conformación tridimensional presente las menos alteraciones posibles, y/o que sus cualidades antigénicas estén lo mejor preservadas frente a proteínas salvajes.

Ventajosamente, la presente invención tiene por objeto una molécula de ácidos nucleicos híbrida mencionada anteriormente (en particular las moléculas e1-sd o e2-sd, o e1-e2-sd, pit1-e1-sd o pit2-e2-sd, tales como se definen en la tabla 1 más adelante), que codifica para una proteína de fusión mencionada anteriormente (en particular E1-Sd

o E2-Sd, o E1-E2-Sd, PIT1-E1-Sd o PIT2-E2-Sd), que comprende respectivamente de su extremo 5' a su extremo 3', una secuencia de ácidos nucleicos que codifica para un péptido de inicio de transferencia (PIT) de un aislado del virus de la hepatitis C, una secuencia de ácidos nucleicos que codifica para una proteína E1 o E2 de un aislado del virus HCV, una secuencia de ácidos nucleicos que codifican para la proteína S delecionada de un aislado del virus HBV.

La inserción de una secuencia de ácidos nucleicos que codifican para dicho péptido de inicio de transferencia injertado en N-terminal de la proteína de fusión mencionada anteriormente (en particular E1-Sd o E2-Sd, o E1-E2-Sd) tiene como ventaja particular que esta última, una vez traducida, se dirige al retículo endoplásmico, de manera que esté correctamente glicosilada y que su conformación tridimensional y/o sus cualidades antigénicas no presenten una alteración sustancial frente a proteínas salvajes.

La presente invención tiene también por objeto una molécula de ácidos nucleicos híbrida mencionada anteriormente que comprende sólo las dos primeras secuencias de ácidos nucleicos mencionadas anteriormente y desprovistas de secuencia de ácidos nucleicos que codifica para un péptido de inicio de transferencia.

El objeto de la presente invención se refiere en particular a una molécula de ácidos nucleicos híbrida mencionada anteriormente que codifica para una proteína de fusión de la invención, que comprende por lo menos:

- la secuencia de ácidos nucleicos que codifican para la proteína S de HBV delecionada (Sd), esencialmente constituida por sus tres dominios transmembranarios situados en el extremo C-terminal (figuras 2A y 3A), conservando dicha proteína S delecionada la capacidad de ensamblaje en partículas sub-virales, y conservando las propiedades inmunogénicas contra el virus HBV humano, y
- la secuencia de ácidos nucleicos que codifican para la casi totalidad de la secuencia de una de las proteínas E1 y E2 (figuras 3B y 3C), que conserva también las propiedades inmunogénicas contra el virus HCV,
- la secuencia de ácidos nucleicos que codifica para un péptido de inicio de transferencia de la invención, que conserva la capacidad de dirigir después de la traducción dicha proteína de fusión al retículo endoplásmico de manera que esté correctamente glicosilada y que su conformación tridimensional presente las menores alteraciones posibles, y/o que las cualidades antigénicas estén preservadas lo mejor posible frente a proteínas salvajes,

de manera que la proteína de fusión codificada por dicha molécula de ácidos nucleicos híbrida mencionada anteriormente, conserve la capacidad de formar unas partículas sub-virales, y las propiedades inmunogénicas frente al virus HBV y/o HCV, y en particular la propiedad para inducir una doble inmunización contra los virus HBV y HCV.

Se entiende por "porcentaje de homología" el porcentaje determinado por comparación directa de dos secuencias de moléculas polinucleotídicas, determinando el número de restos de ácidos nucleicos de las dos secuencias, después dividiéndolo por el número de restos de ácidos nucleicos de la secuencia más larga de las dos, y multiplicando el resultado por 100.

Según un aspecto particularmente ventajoso de la invención, las secuencias de ácidos nucleicos que codifican para los dominios transmembranarios de E1 y/o de E2, están delecionados de por lo menos uno de los nueve últimos ácidos nucleicos, y preferentemente de los nueve últimos ácidos nucleicos, situados en la posición 3', de manera que las secuencias de ácidos nucleicos que codifican para los dominios transmembranarios de E1 y/o de E2 correspondan:

- a los fragmentos nucleotídicos del genoma de un aislado de HCV, localizados en las regiones comprendidas:
 - * del ácido nucleico en la posición 1398 al de la posición 1490 y, ventajosamente, del ácido nucleico en la posición 1398 al de la posición 1481 en lo que se refiere a la secuencia de ácidos nucleicos que codifica para los dominios transmembranarios de E1, o
 - * del ácido nucleico en la posición 2493 al de la posición 2579 y, ventajosamente, del ácido nucleico en la posición 2493 al de la posición 2570 en lo que se refiere a la secuencia de ácidos nucleicos que codifica para los dominios transmembranarios de E2, o
- a los fragmentos nucleotídicos del genoma de un aislado de HCV que presenta un porcentaje de homología con dichos fragmentos nucleotídicos salvajes del genoma de HCV antes mencionados, de por lo menos un 91%, en lo que se refiere a E1 y de por lo menos un 90%, en lo que se refiere a E2, o
- a los fragmentos nucleotídicos procedentes de variantes naturales del virus HCV, y/o procedentes de variantes sintéticas de dichos fragmentos nucleotídicos salvajes del genoma de un aislado de HCV.

La expresión "dominios transmembranarios de E1 y/o de E2 delecionados de por lo menos uno de los nueve últimos

ácidos nucleicos situados en la posición 3''' se refiere a deleciones de 3 ácidos nucleicos, o de 6 ácidos nucleicos, o de 9 ácidos nucleicos situados en la posición 3' de dichos dominios transmembranarios.

5 Ventajosamente, La primera y la segunda secuencia de ácidos nucleicos de la molécula de ácidos nucleicos híbrida mencionada anteriormente, y que codifica para la proteína de fusión inmunogénica antes mencionada son contiguas, y el extremo 5' de la primera secuencia de ácidos nucleicos está unida de manera covalente al extremo 3' de la segunda secuencia de ácidos nucleicos.

10 Según un aspecto particularmente ventajoso, la molécula de ácidos nucleicos híbrida definida anteriormente corresponde por ejemplo a las moléculas siguientes: e1-sd, e2-sd, o pit1-e1-sd o pit 2-e2-sd, que codifican respectivamente para las proteínas de fusión siguientes: E1-Sd, E2-Sd, PIT1-E1-Sd o PIT2-E2-Sd).

15 Según otro aspecto ventajoso de la invención, una secuencia nucleotídica que codifica para un péptido de unión, une dichas primera y segunda secuencias nucleotídicas mencionadas anteriormente, estando dicha secuencia nucleotídica constituida

- por 3 ácidos nucleicos, o de 6 ácidos nucleicos, o de 9 ácidos nucleicos, o de 12 ácidos nucleicos, o de 15 ácidos nucleicos, o
- 20 - por cualquier secuencia nucleotídica que codifica para cualquier péptido de unión;

25 con la condición de que la proteína de fusión inmunogénica codificada por la molécula de ácidos nucleicos híbrida y que comprende dicho péptido de unión, en sí mismo codificado por dicha secuencia nucleotídica, conserve la capacidad de ensamblarse en partículas sub-virales no infecciosas, en presencia de la proteína S salvaje, y conserve las propiedades inmunogénicas frente al virus HCV, y/o, del virus HBV.

30 Para ello, la invención tiene particularmente por objeto una molécula de ácidos nucleicos híbrida mencionada anteriormente, en la que la primera secuencia de ácidos nucleicos que codifica para la proteína S delecionada de N-terminal, de HBV, y particularmente del aislado HBVadw, está situada en el lado 3' de dicha molécula de ácidos nucleicos híbrida, y está constituida:

- por una secuencia de ácidos nucleicos delimitada por los ácidos nucleicos contiguos situados desde la posición 1630 a la posición 2241 del genoma de HBV, y en particular,
- 35 - por la secuencia de ácidos nucleicos representada por la SEC ID nº 1, o
- por una secuencia de ácidos nucleicos que presenta una homología de por lo menos un 91%, en particular de por lo menos un 93%, particularmente de por lo menos un 95%, y más particularmente de por lo menos un 97%, con dicha secuencia de ácidos nucleicos que codifica para dicha proteína S delecionada del extremo N-terminal, con la condición de que la proteína codificada por dicha secuencia de ácidos nucleicos conserve la capacidad de formar unas partículas sub-virales no infecciosas, inmunogénicas frente al virus de la hepatitis B, o,
- 40 - por la secuencia de ácidos nucleicos de una variante natural procedente de un aislado del virus HBV o de una variante sintética, derivada de dicha secuencia de ácidos nucleicos que codifica para dicha proteína S delecionada del extremo N-terminal, con la condición de que la proteína codificada por dicha secuencia de ácidos nucleicos, conserve la capacidad de formar unas partículas sub-virales no infecciosas, inmunogénicas frente al virus de la hepatitis B.
- 45

50 Un objeto más particular de la invención se refiere a una molécula de ácidos nucleicos híbrida mencionada anteriormente (en particular e1-sd o e2-sd, o e1-e2-sd, pit1-e1-sd o pit2-e2-sd, o pit1-e1-e2-sd) que codifica para una proteína de fusión mencionada anteriormente (en particular E1-Sd o E2-Sd, o E1-E2-Sd, PIT1-E1-Sd o PIT2-E2-Sd, o PIT1-E1-E2-Sd) para la cual dicha secuencia de ácidos nucleicos que codifican para la proteína S delecionada del HCV es la del aislado HBVadw, y tiene como secuencia SEC ID nº 1.

55 Para ello también, la invención se refiere más particularmente a una molécula de ácidos nucleicos híbrida mencionada anteriormente, en la que la segunda secuencia de ácidos nucleicos que codifica para el dominio transmembranario y el ectodominio de la proteína E1 de HCV, y particularmente del aislado HCV-1a, está situada en el lado 5' de dicha molécula de ácidos nucleicos híbrida, y está constituida:

- por una secuencia de ácidos nucleicos delimitada por los ácidos nucleicos contiguos situados desde la posición 915 a la posición 1490, y particularmente desde la posición 915 a la posición 1481, del genoma de HCV, y particularmente del aislado HCV-1a,
- 60
- 65 - y en particular por la secuencia de ácidos nucleicos representada por la SEC ID nº 3, o

5 - por una secuencia de ácidos nucleicos que presenta una homología de por lo menos un 75%, en particular de por lo menos un 80%, particularmente de por lo menos un 85%, y más particularmente de por lo menos un 90%, con dicha secuencia de ácidos nucleicos de la proteína E1, con la condición de que la proteína codificada por dicha secuencia de ácidos nucleicos conserve las propiedades inmunogénicas frente al virus de la hepatitis C, o

10 - por la secuencia de ácidos nucleicos de una variante natural procedente de un aislado del virus HCV o de una variante sintética derivada de dicha secuencia de ácidos nucleicos de la proteína E1, con la condición de que la proteína codificada por dicha secuencia de ácidos nucleicos conserve las propiedades inmunogénicas frente al virus de la hepatitis C.

15 Un objeto más particular de la invención se refiere a una molécula de ácidos nucleicos híbrida mencionada anteriormente (en particular e1-sd o pit1-e1-sd, o e1-e2-sd, o pit1-el-e2-sd) que codifica para una proteína de fusión (en particular E1-Sd o PIT1-E1-Sd, o E1-E2-Sd, o PIT1-E1-E2-Sd), para la cual dicha secuencia de ácidos nucleicos que codifican para la proteína E1 es la del aislado HCV-1a, es la secuencia SEC ID nº 3.

20 La invención se refiere particularmente a una molécula de ácidos nucleicos híbrida mencionada anteriormente, que codifica para una proteína de fusión mencionada anteriormente, que comprende un péptido de inicio de transferencia situado en el lado N-terminal, estando dicha molécula de ácidos nucleicos híbrida representada por:

20 - la SEC ID nº 11, o

25 - una secuencia de ácidos nucleicos que presenta una homología de identidad de por lo menos un 78%, en particular de por lo menos un 80%, particularmente de por lo menos un 85%, y más particularmente de por lo menos un 90%, con dicha SEC ID nº 11, con la condición de que la proteína codificada por dicha secuencia de ácidos nucleicos esté también delecionada del dominio transmembranario situado en el extremo N-terminal de la proteína S de HBV, conserve las propiedades del dominio transmembranario de la proteína de envoltura de HCV y que conserve las propiedades inmunogénicas frente a HCV y/o de HBV humano, o

30 - la secuencia de ácidos nucleicos de una variante sintética, derivada de dicha SEC ID nº 11, con la condición de que la proteína codificada por dicha secuencia de ácidos nucleicos de dicha variante sintética esté también delecionada del dominio transmembranario situado en el extremo N-terminal de la proteína S de HBV, conserve las propiedades del dominio transmembranario de la proteína de envoltura de HCV y que conserve las propiedades inmunogénicas frente a HCV y/o de HBV humano.

35 La secuencia de ácidos nucleicos SEC ID nº 11, también denominada pit1-e1-sd, codifica para la proteína de fusión PIT1-E1-Sd de SEC ID nº 12 (véase la tabla 1).

40 La invención tiene también por objeto una molécula de ácidos nucleicos híbrida (en particular pit1-e1-sd de SEC ID nº 11) para la cual:

40 - la secuencia de ácidos nucleicos que codifica para la proteína E1 procede de HCV, y particularmente del aislado HCV-1a, y es la secuencia SEQ ID nº 3 mencionada anteriormente, y

45 - la secuencia de ácidos nucleicos que codifica para la proteína S procede de HBV, y particularmente del aislado HBV adw, y es la secuencia SEQ ID nº 1 mencionada anteriormente, siendo dicha SEC ID nº 1 injertada en 5' de la SEC ID nº 3 de E1, ella misma injertada en 5' de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica para el péptido de inicio de transferencia de la proteína E1 (PIT1) comprendido en la región constituida del ácido nucleico en la posición 837 al de la posición 914 de HCV.

50 Para ello, el objeto de la invención se refiere más particularmente a una molécula de ácidos nucleicos híbrida mencionada anteriormente, en la que la segunda secuencia de ácidos nucleicos que codifica para el dominio transmembranario y el ectodominio de la proteína E2 de HCV, y particularmente del aislado HCV-1a, está situada en el lado 5' de dicha molécula, y está constituida:

55 - por una secuencia de ácidos nucleicos delimitada por los ácidos nucleicos contiguos situados desde la posición 1491 a la posición 2579, y particularmente desde la posición 1491 a la posición 2570, del genoma de HCV, y particularmente del aislado HCV-1a,

60 - y en particular por la secuencia de ácidos nucleicos representada por la SEC ID nº 5, o

65 - por una secuencia de ácidos nucleicos que presenta una homología de por lo menos un 78%, en particular de por lo menos un 80%, particularmente de por lo menos un 85%, y más particularmente de por lo menos un 90%, con dicha secuencia de ácidos nucleicos de la proteína E2, con la condición de que la proteína codificada por dicha secuencia de ácidos nucleicos conserve las propiedades inmunogénicas frente al virus de la hepatitis C, o

- por la secuencia de ácidos nucleicos de una variante natural procedente de un aislado del virus HCV o de una variante sintética, derivado de dicha SEC ID nº 5, con la condición de que la proteína codificada por dicha secuencia de ácidos nucleicos conserve las propiedades inmunogénicas frente al virus de la hepatitis C.

5 Un objeto más particular de la invención se refiere a una molécula de ácidos nucleicos híbrida mencionada anteriormente (en particular e2-sd o pit2-e2-sd) que codifica para una proteína de fusión (en particular E2-Sd o PIT2-E2-Sd).

10 La invención se refiere particularmente a una molécula de ácidos nucleicos híbrida mencionada anteriormente, que codifica para una proteína de fusión de la invención, que comprende un péptido de inicio de transferencia situado en el lado N-terminal, siendo dicha molécula de ácidos nucleicos híbrida representada por:

- la SEC ID nº 13, o
- una secuencia de ácidos nucleicos que presenta una homología de identidad de por lo menos un 80%, en particular de por lo menos un 85%, particularmente de por lo menos un 90%, y más particularmente de por lo menos un 95%, con dicha SEC ID nº 13, con la condición de que la proteína codificada por dicha secuencia de ácidos nucleicos esté también delecionada del dominio transmembranario situado en el extremo N-terminal de la proteína S de HBV, conserve las propiedades del dominio transmembranario de la proteína de envoltura de HCV y que conserve las propiedades inmunogénicas frente al virus HCV y/o de HBV humano, o
- de la secuencia de ácidos nucleicos derivada de una variante sintética, derivada de dicha SEC ID nº 13, con la condición de que la proteína codificada por dicha secuencia de ácidos nucleicos de dicha variante sintética esté también delecionada del dominio transmembranario situado en el extremo N-terminal de la proteína S de HBV, conserve las propiedades del dominio transmembranario de la proteína de envoltura de HCV y que conserve las propiedades inmunogénicas frente al virus HCV y/o de HBV humano.

20 La secuencia de ácidos nucleicos SEC ID nº 13, también denominada pit2-e2-sd, codifica para la proteína de fusión PIT2-E2-Sd de SEC ID nº 14 (véase la tabla 1).

La invención tiene también por objeto una molécula de ácidos nucleicos híbrida (en particular pit2-e2-sd de SEC ID nº 13) para la cual:

- la secuencia de ácidos nucleicos que codifica para la proteína E2 procede de HCV, y particularmente del aislado HCV-1a, y es la secuencia SEQ ID nº 5 mencionada anteriormente y para la cual:
- la secuencia de ácidos nucleicos que codifica para la proteína S procede de HBV, y particularmente del aislado HBVadw, y es la secuencia SEC ID nº 1 mencionada anteriormente, siendo dicha SEC ID nº 1 injertada en 5' de la SEC ID nº 5 de E2, ella misma injertada en 5' de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica para el péptido de inicio de transferencia de la proteína E2 (PIT2) comprendido en la región constituida por el ácido nucleico en la posición 1437 al de la posición 1490 de HCV.

45 La invención tiene también por objeto un vector que comprende una molécula de ácidos nucleicos híbrida mencionada anteriormente que codifica para una proteína de fusión mencionada anteriormente, así como los medios necesarios para su expresión relacionados de manera operacional con dicha molécula de ácidos nucleicos híbrida.

50 A título de expresión que es conveniente para los fines de la invención, se pueden citar por ejemplo los plásmidos, los vectores virales de tipo lentivirales, Semliki, adenovirus, poxvirus, virus de la vacuna, baculovirus, los vectores bacterianos de tipo salmonela, BCG.

55 Se entiende por "medio necesario a la expresión" de una proteína, siendo el término proteína utilizado para cualquier molécula de aminoácidos, tal como proteína, proteína de fusión, fragmento de proteína, péptido, poliproteína, polipéptido, etc., cualquier medio que permite obtener la proteína, tal como en particular un promotor, un terminador de transcripción, un origen de replicación y preferentemente un marcador de selección. Los medios necesarios para la expresión de un péptido están unidos de manera operacional a la secuencia de ácido nucleico que codifica para el péptido de interés.

60 Por-"unidos de manera operacional" se entiende una yuxtaposición de dichos elementos necesarios para la expresión y del gen que codifica para el péptido de interés, los cuales están en una relación tal que les permite funcionar de manera esperada. Por ejemplo, pueden existir unas bases suplementarias entre el promotor y el gen de interés mientras que su relación funcional está preservada.

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

Preferentemente, el promotor utilizado en el vector Semliki y el vector lentiviral utilizados como vector de expresión, es un promotor homólogo y es un promotor del citomegalovirus (CMV).

5 Unos ejemplos no limitativos de promotores heterólogos comprenden en particular (i) los promotores virales tales como el promotor SV40 (Virus simien 40), el promotor del gen de la timidina-cinasa del virus simplex del herpes (TK-HSV-1), el LTR del virus de la sarcoma de Rous (RSV), el promotor del citomegalovirus (CMV) y el promotor último mayor adenoviral (MLP), así como (ii) cualquier promotor celular que controla la transcripción de los genes que codifican para unos péptidos en eucariotas superiores, tal como el promotor del gen de fosfoglicerato-cinasa (PGK)
 10 constitutivo (Adra *et al.*, 1987, Gene, 60: 65-74), el promotor de los genes específicos del hígado alfa-antitripsina y FIX y el promotor SM22 específico de las células del músculo liso (Moessler *et al.*, 1996, Development, 122: 2415-2425).

15 La invención se refiere particularmente a un vector antes mencionado, que comprende además un vector lentiviral

Un vector lentiviral mencionado anteriormente, puede ser el vector pLenti.

Este último se ha descrito antes particularmente por Naldini, L., Blomer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F. H., Verma, I. M., y Trono, D. (1996). *In vivo* gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. Science 272(5259), 263-7.
 20

La invención tiene también por objeto un vector mencionado anteriormente, que comprende además un vector viral defectivo derivado del genoma del virus del bosque Semliki.

25 Estos últimos se han descrito antes particularmente por Schlesinger, S., y T. M. Dubensky, Jr. 1999. Alphavirus vectors for gene expression and vaccines. Curr. Opin. Biotechnol. 10:434-439.

La invención tiene en particular por objeto un vector mencionado anteriormente, en el que el vector viral defectivo que deriva del genoma del virus del bosque Semliki es el vector SFV1, siendo este último en particular
 30 comercializado por Invitrogen.

Para este propósito, la invención tiene más particularmente por objeto un vector mencionado anteriormente, en el que la molécula de ácidos nucleicos híbrida está constituida:

- 35 - por la secuencia de ácidos nucleicos representada por SEC ID nº 11, o
- por una secuencia de ácidos nucleicos que presenta una homología de por lo menos un 78%, en particular de por lo menos un 80%, particularmente de por lo menos un 85%, y más particularmente de por lo menos un 90%, con dicha secuencia SEC ID nº 11, con la condición de que la proteína codificada por dicha secuencia
 40 de ácidos nucleicos codifica para una proteína de fusión capaz de formar unas partículas sub-virales, no infecciosas e inmunogénicas frente a HCV y/o HBV,
- estando dicho vector representado en particular por la SEC ID nº 15, o
- 45 - por la secuencia de ácidos nucleicos de una variante sintética derivada de secuencia de ácidos nucleicos representada por SEC ID nº 11, con la condición de que la proteína codificada por dicha secuencia de ácidos nucleicos codificada para una proteína de fusión capaz de formar unas partículas sub-virales, no infecciosas e inmunogénicas frente a HCV y/o HBV.

50 La invención tiene también por objeto un vector derivado de pSFV de secuencia SEC ID nº 15, que comprende una molécula de ácidos nucleicos híbrida (en particular pit1-e1-sd de SEC ID nº 11) que codifica para la proteína de fusión mencionada anteriormente (en particular PIT1-E1-Sd de SEC ID nº 12), y para la cual:

- 55 - la secuencia de ácidos nucleicos que codifica para la proteína E1 procede de HCV, y particularmente del aislado HCV-1a, y es la secuencia SEQ ID nº 3 mencionada anteriormente y para la cual
- la secuencia de ácidos nucleicos que codifica para la proteína S procede de HBV, y particularmente del aislado HBV_{adw}, y es la secuencia SEQ ID nº 1 mencionada anteriormente, siendo dicha SEC ID nº 1 injertada en 5' de la SEC ID nº 3 de E1, ella misma injertada en 5' de la secuencia de ácidos nucleicos que
 60 codifica para el péptido de inicio de transferencia de la proteína E1 (PIT1) comprendido en la región constituida por el ácido nucleico en la posición 837 al de la posición 914 de HCV.

Para ello, la invención tiene más particularmente por objeto uno de los vectores mencionados anteriormente, en el que la molécula de ácidos nucleicos híbrida está constituida:

- 65 - por la secuencia de ácidos nucleicos representada por SEC ID nº 13, o

- 5 - por una secuencia de ácidos nucleicos que presenta una homología de por lo menos un 80%, particularmente de por lo menos un 85%, más particularmente de por lo menos un 90%, y más particularmente de por lo menos un 95%, con dicha secuencia SEC ID nº 13, con la condición de que dicha secuencia de ácidos nucleicos codifique para un péptido capaz de formar unas partículas sub-virales, no infecciosas e inmunogénicas frente al virus de HBV y/o HCV,
- estando dicho vector representado en particular por la SEC ID nº 16,
- 10 - por la secuencia de ácidos nucleicos de una variante sintética, derivada de dicha SEC ID nº 13, con la condición de que la proteína codificada por dicha secuencia de ácidos nucleicos codifique para un péptido capaz de formar unas partículas sub-virales, no infecciosas e inmunogénicas frente al virus de HBV y/o HCV.

15 La invención tiene también por objeto un vector de SEC ID nº 16, que comprende una molécula de ácidos nucleicos híbrida (en particular pit1-e1-sd de SEC ID nº 13) que codifica para la proteína de fusión mencionada anteriormente (en particular PIT1-E1-Sd de SEC ID nº 14), y para la cual:

- 20 - la secuencia de ácidos nucleicos que codifica para la proteína E2 procede de HCV, y particularmente del aislado HCV-1a, y es la secuencia SEC ID nº 5 mencionada anteriormente, y para la cual
- la secuencia de ácidos nucleicos que codifica para la proteína S procede de HBV, y particularmente del aislado HBVadw, y es la secuencia SEC ID nº 1 mencionada anteriormente,
- 25 - siendo dicha SEC ID nº 1 injertada en 5' de la SEC ID nº 5 de E2, ella misma injertada en 5' de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica para el péptido de inicio de transferencia de la proteína E2 (PIT2) comprendido en la región constituida por el ácido nucleico en la posición 1437 al de la posición 1490 de HCV.

30 La invención se refiere también a un vector mencionado anteriormente, que comprende una molécula de ácidos nucleicos híbrida constituida por las tres secuencias de ácidos nucleicos siguientes:

- 35 a)- en el lado 3', una primera secuencia de ácidos nucleicos que codifica para la proteína S delecionada de su dominio transmembranario situado en su extremo N-terminal (Sd), de un aislado del virus de la hepatitis B, o
 - de una secuencia de ácidos nucleicos que presenta una homología de por lo menos un 91 %, en particular de por lo menos un 93%, particularmente de por lo menos un 95%, y más particularmente de por lo menos un 97%, con dicha secuencia de ácidos nucleicos de la proteína S delecionada de N-terminal, con la condición de que dicha secuencia de ácidos nucleicos codifique para un péptido capaz de formar unas partículas sub-virales, no infecciosas e inmunogénicas frente al virus de HBV, o
 - 40 - de la secuencia de ácidos nucleicos de una variante natural procedente de un aislado del virus HCV o de una variante sintética derivada de dicha secuencia de ácidos nucleicos que codifican para la proteína S delecionada (Sd), con la condición de que la proteína codificada por dicha secuencia de ácidos nucleicos codifique para un péptido capaz de formar unas partículas sub-virales, no infecciosas e inmunogénicas frente al virus de HBV, y,
 - 45 b)- en el extremo 5' de dicha primera secuencia de ácidos nucleicos, una segunda secuencia de ácidos nucleicos que codifica para el dominio transmembranario y el ectodominio de por lo menos una proteína de envoltura E1 o E2, de un aislado del virus de la hepatitis C, o
 - 50 - de una secuencia de ácidos nucleicos que presenta una homología de por lo menos un 78%, en particular de por lo menos un 80%, particularmente de por lo menos un 85%, y más particularmente de por lo menos un 90%, con dicha secuencia de ácidos nucleicos que codifican para una de dichas proteínas E1 o E2, de un aislado del virus de la hepatitis C, con la condición de que la proteína codificada por dicha secuencia de ácidos nucleicos codifique para un péptido inmunógeno frente al virus de la hepatitis C, o
 - 55 - de la secuencia de ácidos nucleicos de una variante natural procedente de un aislado del virus HCV o de una variante sintética derivada de dicha segunda secuencia de ácidos nucleicos que codifica para una proteína de envoltura E1 o E2, con la condición de que la proteína codificada por dicha secuencia de ácidos nucleicos codifique para un péptido inmunogénico frente al virus de la hepatitis C,
 - 60 - siendo dicha segunda secuencia seleccionada de entre las secuencias que codifican para la proteína E1, para la proteína E2 o para un péptido de fusión que comprende la proteína E1 y la proteína E2, y,
 - 65 c)- en el extremo 5' de dicha segunda secuencia de ácidos nucleicos, una tercera secuencia de ácidos nucleicos que codifica para un péptido de inicio de transferencia (PIT) de un aislado del virus de la hepatitis Ci, o

- una secuencia de ácidos nucleicos de una variante natural procedente de un aislado del virus HCV, o de una variante sintética, derivada de dicha secuencia de ácidos nucleicos de la proteína que codifica para un péptido de inicio de transferencia (PIT), con la condición de que el péptido de inicio de transferencia codificado por dicha secuencia de ácidos nucleicos, conserve la capacidad de dirigir, después de la traducción, dicha proteína de fusión al retículo endoplásmico de manera que esté correctamente glicosilada y que su conformación tridimensional presente la menos alteración posible, y/o que sus cualidades antigénicas estén lo mejor preservadas frente a proteínas salvajes, o,
- cualquier secuencia de ácidos nucleicos que codifica para un péptido capaz de dirigir, después de la traducción, dicha proteína de fusión al retículo endoplásmico de manera que esté correctamente glicosilada y que su conformación tridimensional presente las menores alteraciones posibles, y/o que sus cualidades antigénicas estén lo mejor preservadas frente a proteínas salvajes.

Ventajosamente, la invención tiene también por objeto un vector mencionado anteriormente, en el que la primera y la segunda secuencia de ácidos nucleicos de la molécula de ácidos nucleicos híbrida mencionada anteriormente (en particular e1-sd o e1-e2-sd) y que codifica para la proteína de fusión inmunogénica antes mencionada (en particular E1-Sd o E2-Sd) son contiguas, y el extremo 5' de la primera secuencia de ácidos nucleicos está unida de manera covalente al extremo 3' de la segunda secuencia de ácidos nucleicos.

Según otro aspecto ventajoso, la invención se refiere al vector mencionado anteriormente (en particular un vector lentiviral, tal como el vector pLenti, o un vector viral defectivo derivado del genoma del virus del bosque Semliki, tal como el vector pSFV1) para el cual una secuencia nucleotídica, que codifica para un péptido de unión, une dichas primera y segunda secuencias nucleotídicas que codifican para la proteína de fusión inmunogénica antes mencionada (en particular E1-Sd o E2-Sd), estando dicha secuencia nucleotídica constituida

- por 3 ácidos nucleicos, o por 6 ácidos nucleicos, o por 9 ácidos nucleicos, o por 12 ácidos nucleicos, o por 15 ácidos nucleicos, con la condición de que dicha secuencia nucleotídica, que codifica para un péptido de unión, no altere la capacidad de la proteína de fusión inmunogénica antes mencionada (en particular E1-Sd o E2-Sd), en ensamblarse en partículas sub-virales, en presencia de la proteína S salvaje, y que esta última conserve también las propiedades inmunogénicas frente al virus HCV, y/o, del virus HBV.

Ventajosamente, el vector mencionado anteriormente comprende la primera secuencia de ácidos nucleicos que codifican para la proteína S delecionada de N-terminal, de HBV, y en particular del aislado HBV_{adw} del virus de la hepatitis B, siendo dicha secuencia:

- una secuencia de ácidos nucleicos delimitada por los ácidos nucleicos contiguos situados en las posiciones 1630 a 2241 de HBV, y particularmente del aislado HBV_{adw},
- y en particular de la secuencia de ácidos nucleicos representada por la SEC ID nº 1, o
- una secuencia de ácidos nucleicos que presenta una homología de por lo menos un 91%, en particular de por lo menos un 93%, particularmente de por lo menos un 95%, y más particularmente de por lo menos un 97%, con dicha SEC ID nº 1, con la condición de que la proteína codificada por dicha secuencia de ácidos nucleicos conserve la capacidad de formar unas partículas sub-virales no infecciosas, inmunogénicas frente al virus de la hepatitis B, o
- de la secuencia de ácidos nucleicos de una variante natural procedente de un aislado del virus HBV o de una variante sintética derivada de la SEC ID nº 1, con la condición de que la proteína codificada por dicha secuencia de ácidos nucleicos conserve la capacidad de formar unas partículas sub-virales no infecciosas, inmunogénicas frente al virus de la hepatitis B.

Un objeto más particular de la invención reside en el vector mencionado anteriormente (en particular un vector lentiviral, tal como el vector pLenti, o un vector viral defectivo derivado del genoma del virus del bosque Semliki, tal como el vector pSFV1) que comprende una molécula de ácidos nucleicos híbrida mencionada anteriormente (en particular e1-sd o e2-sd, o e1-e2-sd, pit1-e1-sd o pit2-e2-sd) que codifica para una proteína de fusión (en particular E1-Sd o E2-Sd, o E1-E2-Sd, PIT1-E1-Sd o PIT2-E2-Sd) para la cual dicha secuencia de ácidos nucleicos que codifican para la proteína S delecionada de HBV es la del aislado HBV_{adw}, y tiene por secuencia SEC ID nº 1.

Según un aspecto particular de la invención, el vector mencionado anteriormente comprende la segunda secuencia de ácidos nucleicos que codifica para el dominio transmembranario y el ectodominio de la proteína E1 de HCV, y particularmente del aislado HCV-1a, que está situada en el lado 5' de dicha molécula, y que está constituida:

- por una secuencia de ácidos nucleicos delimitada por los ácidos nucleicos contiguos situados de la posición 915 a la posición 1490, y particularmente de la posición 915 a la posición 1481, del genoma de HCV, y particularmente del aislado HCV-1a,

- y en particular por la secuencia de ácidos nucleicos representada por la SEC ID nº 3, o
- por una secuencia de ácidos nucleicos que presenta una homología de por lo menos un 75%, en particular de por lo menos un 80%, particularmente de por lo menos un 85%, y más particularmente de por lo menos un 90%, con dicha secuencia de ácidos nucleicos que codifican para la proteína E1, con la condición de que la proteína codificada por dicha secuencia de ácidos nucleicos conserve las propiedades inmunogénicas frente al virus de la hepatitis C, o
- por la secuencia de ácidos nucleicos de una variante natural procedente de un aislado del virus HCV o de una variante sintética, derivado de dicho ácidos nucleicos que codifica para dicha proteína E1, con la condición de que la proteína codificada por dicha secuencia de ácidos nucleicos conserve las propiedades inmunogénicas frente al virus de la hepatitis C.

Un objeto más particular de la invención reside en el vector mencionado anteriormente (en particular un vector lentiviral, tal como el vector pLenti, o un vector viral defectivo derivado del genoma del virus del bosque Semliki, tal como el vector pSFV1) que comprende una molécula de ácidos nucleicos híbrida mencionada anteriormente (en particular e1-sd, o e1-e2-sd, pit1-e1-sd) que codifica para una proteína de fusión (en particular E1-Sd, o E1-E2-Sd, PIT1-E1-Sd) para la cual dicha secuencia de ácidos nucleicos que codifican para la proteína E1 de HCV es la del aislado HCV-1a, y tiene por secuencia SEC ID nº 3.

Conforme a un aspecto ventajoso de la invención, el vector mencionado anteriormente comprende la segunda secuencia de ácidos nucleicos que codifica para el dominio transmembranario y el ectodominio de la proteína E2 de HCV, y particularmente del aislado HCV-1a, que está situada en el lado 5' de dicha molécula, y que está constituida:

- por una secuencia de ácidos nucleicos delimitada por los ácidos nucleicos contiguos situados de la posición 1491 a la posición 2579, y particularmente de la posición 1491 a la posición 2570, del genoma de HCV, y particularmente del aislado HCV-1a,
- y en particular por la secuencia de ácidos nucleicos representada por la SEC ID nº 5, o
- por una secuencia de ácidos nucleicos que presenta una homología de por lo menos un 78%, en particular de por lo menos un 80%, particularmente de por lo menos un 85%, y más particularmente de por lo menos un 90%, con dicha secuencia de ácidos nucleicos que codifican para la proteína E2, con la condición de que la proteína codificada por dicha secuencia de ácidos nucleicos conserve las propiedades inmunogénicas frente al virus de la hepatitis C, o
- por la secuencia de ácidos nucleicos de una variante natural, procedente de un aislado del virus HCV, o de una variante sintética derivada de la misma de ácidos nucleicos que codifica para dicha proteína E2, con la condición de que la proteína codificada por dicha secuencia de ácidos nucleicos conserve las propiedades inmunogénicas frente al virus de la hepatitis C.

Un objeto más particular de la invención reside en el vector mencionado anteriormente (en particular un vector lentiviral, tal como el vector pLenti, o un vector viral defectivo derivado del genoma del virus del bosque Semliki, tal como el vector pSFV1) que comprende una molécula de ácidos nucleicos híbrida mencionada anteriormente (en particular e2-sd, o e1-e2-sd, pit2-e2-sd) que codifica para una proteína de fusión (en particular E2-Sd, o E1-E2-Sd, PIT2-E2-Sd) para la cual dicha secuencia de ácidos nucleicos que codifican para la proteína E2 de HCV es la del aislado HCV-1a, y tiene por secuencia SEC ID nº 5.

La invención tiene también por objeto una partícula de envoltura sub-viral, quimera, inmunogénica y no infecciosa, que comprende las proteínas siguientes:

- la proteína constituida por la proteína S salvaje del antígeno de superficie de un aislado del virus de la hepatitis B, y,
- por lo menos una proteína de fusión inmunogénica antes mencionada.

Se entiende por la expresión "partículas sub-viral quiméricas", cualquier partícula sub-viral que comprende por lo menos la proteína S salvaje de HBV y una proteína de fusión inmunogénica antes mencionada que resulta del auto-ensamblaje de la proteína S salvaje, o del ensamblaje de una proteína de fusión mencionada anteriormente, en presencia de la proteína S salvaje.

Ventajosamente, la proteína de fusión inmunogénica de la partícula sub-viral quimérica inmunogénica mencionada anteriormente, es:

- la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 8, o

- una secuencia de aminoácidos que presenta un porcentaje de identidad de por lo menos un 88%, en particular de por lo menos un 90%, particularmente de por lo menos un 92%, y más particularmente de por lo menos un 95%, con dicha SEC ID nº 8, con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos esté también delecionada del dominio transmembranario situado en el extremo N-terminal de la proteína S de HBV, conserve las propiedades del dominio transmembranario de la proteína de envoltura de HCV y conserve la capacidad de formar unas partículas sub-virales, no infecciosas e inmunogénicas frente a HCV y/o frente a HBV humano, o
- de la secuencia de aminoácidos de una variante sintética, derivada de dicha SEC ID nº 8, con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos de dicha variante sintética esté también delecionada del dominio transmembranario situado en el extremo N-terminal de la proteína S de HBV, conserve las propiedades del dominio transmembranario de la proteína de envoltura de HCV y conserve la capacidad de formar unas partículas sub-virales, no infecciosas e inmunogénicas frente a HCV y/o frente a HBV humano.

La invención tiene también por objeto una partícula sub-viral quimérica inmunogénica mencionada anteriormente que comprende una proteína de fusión mencionada anteriormente, y en particular la proteína de fusión E1-Sd de SEC ID nº 8, o E1-E2-Sd, y para la cual la secuencia de la proteína E1 es en particular la SEC ID nº 4 mencionada anteriormente, y está en particular injertada en C-terminal de la secuencia de aminoácidos de la proteína S delecionada (Sd) de secuencia SEC ID nº 2.

Según un aspecto particular de la invención, la proteína de fusión inmunogénica de la partícula sub-viral quimérica inmunogénica antes mencionada, está constituida por:

- la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 10, o
- una secuencia de aminoácidos que presenta un porcentaje de identidad de por lo menos un 86%, en particular de por lo menos un 88%, particularmente de por lo menos un 92%, y más particularmente de por lo menos un 95%, con SEC ID nº 10, con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos esté también delecionada del dominio transmembranario situado en el extremo N-terminal de la proteína S de HBV, conserve las propiedades del dominio transmembranario de la proteína de envoltura de HCV y conserve la capacidad de formar unas partículas sub-virales, no infecciosas e inmunogénicas frente al virus de la hepatitis B humano y/o frente al virus de la hepatitis C, o
- la secuencia de aminoácidos de una variante sintética, derivada de la SEC ID nº 10, con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos de dicha variante sintética esté también delecionada del dominio transmembranario situado en el extremo N-terminal de la proteína S de HBV, conserve las propiedades del dominio transmembranario de la proteína de envoltura de HCV y conserve la capacidad de formar unas partículas sub-virales, no infecciosas e inmunogénicas frente al virus de la hepatitis B humano y/o frente al virus de la hepatitis C.

La invención tiene también por objeto, una partícula sub-viral quimérica inmunogénica mencionada anteriormente que comprende una proteína de fusión mencionada anteriormente, y en particular la proteína de fusión E1-Sd de SEC ID nº 10, o E1-E2-Sd, y para la cual la secuencia de la proteína E1 es en particular la SEC ID nº 6 mencionada anteriormente, y está en particular injertada en C-terminal de la secuencia de aminoácidos de la proteína S delecionada (Sd) de secuencia SEC ID nº 2.

Conforme a un aspecto ventajoso de la invención, la partícula sub-viral quimérica inmunogénica mencionado anteriormente, que comprende las dos proteínas de fusión siguientes:

- la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 8, o
- una secuencia de aminoácidos que presenta un porcentaje de identidad de por lo menos un 88%, en particular de por lo menos un 90%, particularmente de por lo menos un 92%, y más particularmente de por lo menos un 95%, con dicha SEC ID nº 8, con la condición de que dicha SEC ID nº 8 codifique para una proteína que está también delecionada del dominio transmembranario situado en el extremo N-terminal de la proteína S de HBV, conserve las propiedades del dominio transmembranario de la proteína de envoltura de HCV y conserve la capacidad de formar unas partículas sub-virales, no infecciosas e inmunogénicas frente al virus de la hepatitis B humano y/o frente al virus de la hepatitis C, o
- la secuencia de aminoácidos de una variante sintética, derivada de la SEC ID nº 8, con la condición de que dicha SEC ID nº 8 codifique para una proteína que está también delecionada del dominio transmembranario situado en el extremo N-terminal de la proteína S de HBV, conserve las propiedades del dominio transmembranario de la proteína de envoltura de HCV y conserve la capacidad de formar unas partículas sub-virales, no infecciosas e inmunogénicas frente al virus de la hepatitis B humano y/o frente al virus de la hepatitis C, y

- la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 10, o
- una secuencia de aminoácidos que presenta un porcentaje de identidad de por lo menos un 86%, en particular de por lo menos un 88%, particularmente de por lo menos un 90%, y más particularmente de por lo menos un 95%, con SEC ID nº 10, con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos esté también delecionada del dominio transmembranario situado en el extremo N-terminal de la proteína S de HBV, conserve las propiedades del dominio transmembranario de la proteína de envoltura de HCV y conserve la capacidad de formar unas partículas sub-virales, no infecciosas e inmunogénicas frente al virus de la hepatitis B humano y/o frente al virus de la hepatitis C, o

- de la secuencia de aminoácidos de una variante sintética, derivada de la SEC ID nº 10, con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos de dicha variante sintética esté también delecionada del dominio transmembranario situado en el extremo N-terminal de la proteína S de HBV, conserve las propiedades del dominio transmembranario de la proteína de envoltura de HCV y conserve la capacidad de formar unas partículas sub-virales, no infecciosas e inmunogénicas frente al virus de la hepatitis B humano y/o frente al virus de la hepatitis C.

La invención tiene también por objeto una partícula sub-viral quimérica inmunogénica mencionada anteriormente que comprende dos proteínas de fusión mencionada anteriormente (en particular E1-Sd de SEC ID nº 8, o E1-E2-Sd; y E2-Sd de SEC ID nº 10).

La invención se refiere también a una partícula sub-viral quimérica inmunogénica mencionada anteriormente, en la que la proteína de fusión inmunogénica comprende por lo menos una de las proteínas de envoltura (E1) de un aislado del virus de la hepatitis C, siendo dicha proteína constituida:

- por una secuencia de aminoácidos que corresponde a los restos de aminoácidos situados en la región que comprende el aminoácido de la posición 192 al de la posición 380 de la proteína salvaje de HCV, y particularmente del aislado HCV-1a, o
- por una secuencia de aminoácidos que presenta un porcentaje de identidad de por lo menos un 75%, en particular de por lo menos un 80%, particularmente de por lo menos un 85%, y más particularmente de por lo menos un 90%, con dicha secuencia de la proteína E1 salvaje de un aislado de HCV, con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos conserve las propiedades de dicho dominio transmembranario y las propiedades inmunogénicas frente al virus de la hepatitis C, o
- por la secuencia de aminoácidos de una variante natural procedente de un aislado del virus HCV o de una variante sintética, derivado de dicha proteína E1, con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos conserve las propiedades de dicho dominio transmembranario y las propiedades inmunogénicas frente al virus de la hepatitis C.

La invención tiene también por objeto una partícula sub-viral quimérica inmunogénica mencionada anteriormente que comprende una proteína de fusión mencionada anteriormente (en particular E1-Sd, o E1-E2-Sd o PIT1-E1-E2-Sd, o PIT2-E2-E1-Sd), para la mencionada secuencia de la proteína E1 procede del aislado HCV-1a.

La invención tiene también por objeto una partícula sub-viral quimérica inmunogénica mencionada anteriormente, en la que la proteína de fusión inmunogénica comprende por lo menos una de las proteínas de envoltura de un aislado del virus de la hepatitis C, siendo dicha proteína constituida por secuencias de aminoácidos seleccionadas de entre las siguientes:

- una secuencia de aminoácidos que corresponde a los restos de aminoácidos situados en la región que comprende el aminoácido de la posición 384 al de la posición 743 de la proteína salvaje E2 de HCV, y particularmente del aislado HCV-1a, o
- una secuencia de aminoácidos que presenta un porcentaje de identidad de por lo menos un 78%, en particular de por lo menos un 80%, particularmente de por lo menos un 85%, y más particularmente de por lo menos un 90%, con dicha secuencia de la proteína E2 salvaje de dicho aislado HCV, con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos conserve las propiedades de dicho dominio transmembranario y las propiedades inmunogénicas frente al virus de la hepatitis C, o
- la secuencia de aminoácidos de una variante natural procedente de un aislado del virus HCV o de una variante sintética, derivada de dicha proteína E2, con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos conserve las propiedades de dicho dominio transmembranario y las propiedades inmunogénicas frente al virus de la hepatitis C.

La invención tiene también por objeto una partícula sub-viral quimérica inmunogénica mencionada anteriormente que comprende una proteína de fusión mencionada anteriormente (en particular E2-Sd, o E1-E2-Sd o PIT1-E1-E2-Sd), para la mencionada secuencia de la proteína E2 procede del aislado HCV-1a.

Según un aspecto particular, la invención se refiere también a una partícula sub-viral quimérica inmunogénica mencionada anteriormente, que comprende las dos proteínas de fusión siguientes:

- 5 - la proteína de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos constituida por el aminoácido de la posición 192 al de la posición 383, y particularmente de la posición 192 al de la posición 380 de la proteína salvaje E1 de HCV, y particularmente por el aislado HCV-1a; o
- 10 - de una secuencia de aminoácidos que presenta un porcentaje de identidad de por lo menos un 75%, en particular de por lo menos un 80%, particularmente de por lo menos un 85%, y más particularmente de por lo menos un 90%, con dicha secuencia de la proteína E1 salvaje de un aislado de HCV, con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos conserve las propiedades de dicho dominio transmembranario y las propiedades inmunogénicas frente al virus de la hepatitis C, o
- 15 - de la secuencia de aminoácidos de una variante natural procedente de un aislado del virus HCV o de una variante sintética, derivado de dicha proteína E1, con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos conserve las propiedades de dicho dominio transmembranario y las propiedades inmunogénicas frente al virus de la hepatitis C, y
- 20 - la proteína de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos constituida del aminoácido de la posición 384 al de la posición 746, y particularmente de la posición 384 al de la posición 743 de la proteína salvaje E2 de HCV, y particularmente del aislado HCV-1a, o
- 25 - una secuencia de aminoácidos que presenta un porcentaje de identidad de por lo menos un 78%, en particular de por lo menos un 80%, particularmente de por lo menos un 85%, y más particularmente de por lo menos un 90%, con dicha secuencia de la proteína E2 salvaje de dicho aislado HCV, con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos conserve las propiedades de dicho dominio transmembranario y las propiedades inmunogénicas frente al virus de la hepatitis C, o
- 30 - de la secuencia de aminoácidos de una variante natural procedente de un aislado del virus HCV o de una variante sintética, derivada de dicha proteína E2, con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos conserve las propiedades de dicho dominio transmembranario y las propiedades inmunogénicas frente al virus de la hepatitis C.

35 La invención tiene también por objeto una partícula sub-viral quimérica inmunogénica mencionada anteriormente que comprende dos proteínas de fusión mencionadas anteriormente (en particular E1-Sd, o PIT1-E1-Sd o E2-Sd o PIT1-E1-Sd o E1-E2-Sd o PIT1-E1-E2-Sd).

40 La invención tiene también por objeto una composición inmunogénica que comprende como sustancia activa por lo menos un compuesto seleccionado de entre:

- una proteína de fusión mencionada anteriormente,
- una molécula de ácidos nucleicos híbrida descrita anteriormente,
- 45 - un vector mencionado anteriormente que comprende dicha molécula de ácidos nucleicos híbrida,
- una partícula sub-viral quimérica descrita anteriormente,
- 50 - y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

55 Según un modo de realización particular de la invención, la composición farmacéutica contiene también un vehículo farmacéuticamente apropiado cuyo experto en la materia determinará fácilmente la naturaleza y la cantidad a utilizar en función de parámetros habituales y de los constituyentes de la composición farmacéutica, la forma farmacéutica y el modo de administración deseado.

Las composiciones farmacéuticas de la invención son apropiadas para la administración oral, sublingual, subcutánea, intramuscular, intravenosa, tópica, local, intratraqueal, intranasal, transdérmica, rectal, intraocular, intra-auricular, pudiendo dicho principio activo ser administrado en forma unitaria de administración.

60 Las formas unitarias de administración pueden ser, por ejemplo, unos comprimidos, unas cápsulas duras, unos granulados, unos polvos, unas soluciones inyectables o suspensiones orales, unos parches transdérmicos (patch), unas formas de administración sublingual, bucal, intratraqueal, intraocular, intranasal, intra-auricular, por inhalación, unas formas de administración tópica, transdérmica, subcutánea, intramuscular o intravenosa, unas formas de administración rectal o unos implantes. Para la administración tópica, se pueden considerar unas cremas, geles, pomadas, lociones o colirios.

Ventajosamente, la composición inmunogénica mencionada anteriormente, comprende una sustancia activa seleccionada de entre por lo menos uno de los tres compuestos siguientes:

- 5 a)- una proteína de fusión mencionada anteriormente constituida por:
- * la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 8, o
 - * una secuencia de aminoácidos que presenta un porcentaje de identidad de por lo menos un 88%, en particular de por lo menos un 90%, particularmente de por lo menos un 92%, y más particularmente de por lo menos un 95%, con SEC ID nº 8, con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos esté también delecionada del dominio transmembranario situado en el extremo N-terminal de la proteína S de HBV, conserve las propiedades del dominio transmembranario de la proteína de envoltura de HCV y conserve la capacidad de formar unas partículas sub-virales, no infecciosas e inmunogénicas frente al virus humano de la hepatitis B y/o frente al virus de la hepatitis C, o
 - * la secuencia de aminoácidos de una variante sintética, derivada de la SEC ID nº 8, con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos de dicha variante sintética esté también delecionada del dominio transmembranario situado en el extremo N-terminal de la proteína S de HBV, conserve las propiedades del dominio transmembranario de la proteína de envoltura de HCV y conserve la capacidad de formar unas partículas sub-virales, no infecciosas e inmunogénicas frente al virus humano de la hepatitis B y/o frente al virus de la hepatitis C,
- 25 b)- una molécula de ácidos nucleicos híbrida constituida por:
- * la secuencia de ácidos nucleicos representada por SEC ID nº 11, o
 - * una secuencia de ácidos nucleicos que presenta una homología de por lo menos un 78%, en particular de por lo menos un 80%, particularmente de por lo menos un 85%, y más particularmente de por lo menos un 90%, con dicha secuencia SEC ID nº 11, con la condición de que la proteína codificada por dicha secuencia de ácidos nucleicos esté también delecionada del dominio transmembranario situado en el extremo N-terminal de la proteína S de HBV, conserve las propiedades del dominio transmembranario de la proteína de envoltura de HCV y conserve la capacidad de formar unas partículas sub-virales, no infecciosas e inmunogénicas frente al virus humano de la hepatitis B y/o frente al virus de la hepatitis C, o
 - * la secuencia de ácidos nucleicos de una variante sintética, derivada de la SEC ID nº 11, con la condición de que la proteína codificada por dicha secuencia de ácidos nucleicos de una variante sintética esté también delecionada del dominio transmembranario situado en el extremo N-terminal de la proteína S de HBV, conserve las propiedades del dominio transmembranario de la proteína de envoltura de HCV y conserve la capacidad de formar unas partículas sub-virales, no infecciosas e inmunogénicas frente al virus humano de la hepatitis B y/o frente al virus de la hepatitis C, o un vector mencionado anteriormente que comprende dicha molécula de ácidos nucleicos híbrida,
- 45 c)- una partícula sub-viral quimérica, que comprende la proteína de fusión inmunogénica constituida por:
- * la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 8, o
 - * una secuencia de aminoácidos que presenta un porcentaje de identidad de por lo menos un 88%, en particular de por lo menos un 90%, particularmente de por lo menos un 92%, y más particularmente de por lo menos un 95%, con SEC ID nº 8, con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos esté también delecionada del dominio transmembranario situado en el extremo N-terminal de la proteína S de HBV, conserve las propiedades del dominio transmembranario de la proteína de envoltura de HCV y conserve la capacidad de formar unas partículas sub-virales, no infecciosas e inmunogénicas frente a HBV humano y de HCV, o
 - * la secuencia de aminoácidos de una variante sintética, derivada de la SEC ID nº 8, con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos de dicha variante sintética esté también delecionada del dominio transmembranario situado en el extremo N-terminal de la proteína S de HBV, conserve las propiedades del dominio transmembranario de la proteína de envoltura de HCV y conserve la capacidad de formar unas partículas sub-virales, no infecciosas e inmunogénicas frente a HBV humano y de HCV.

Un objeto particular de la invención se refiere a uno de los tres compuestos siguientes:

- 65 a)- la proteína de fusión mencionada anteriormente que comprende la proteína E1 (en particular E1-Sd, PIT1-E1-Sd, E1-E2-Sd, PIT1-E1-E2-Sd), de la cual se encuentra una representación esquemática en la figura 3B, y que comprende la casi totalidad de la proteína E1 del HCV, injertada en N-terminal de la proteína S

deleccionada de HBV, o

b)- la molécula de ácidos nucleicos híbrida mencionada anteriormente que comprende la secuencia de ácidos nucleico que codifica para la proteína E1 (en particular e1-sd, pit1-e1-sd, e1-e2-sd, pit1-el-e2-sd), y que comprende la casi totalidad de la secuencia de ácidos nucleico que codifica para la proteína E1 de HCV, injertada en 5' de la secuencia de ácidos nucleico que codifica para la proteína S deleccionada de HBV, o

c)- la partícula sub-viral mencionada anteriormente que comprende la proteína E1 (en particular E1-Sd, PIT1-E1-Sd, E1-E2-Sd, PIT1-E1-E2-Sd), de la cual se encuentra una representación esquemática en la figura 3B, y que comprende la casi totalidad de la proteína E1 de HCV, injertada en N-terminal de la proteína S deleccionada de HBV.

Según un aspecto particular de la invención, la composición inmunogénica mencionada anteriormente, comprende una sustancia activa seleccionada de entre por lo menos uno de los compuestos siguientes:

a)- una proteína de fusión constituida por:

* la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 10, o

* una secuencia de aminoácidos que presenta un porcentaje de identidad de por lo menos un 86%, en particular de por lo menos un 88%, particularmente de por lo menos un 90%, y más particularmente de por lo menos un 95%, con SEC ID nº 10, con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos esté también deleccionada del dominio transmembranario situado en el extremo N-terminal de la proteína S de HBV, conserve las propiedades del dominio transmembranario de la proteína de envoltura de HCV y conserve la capacidad de formar unas partículas sub-virales, no infecciosas e inmunogénicas frente al virus humano de la hepatitis B y/o frente al virus de la hepatitis C, o

* la secuencia de aminoácidos de una variante sintética, derivada de la SEC ID nº 10, con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos de dicha variante sintética esté también deleccionada del dominio transmembranario situado en el extremo N-terminal de la proteína S de HBV, conserve las propiedades del dominio transmembranario de la proteína de envoltura de HCV y conserve la capacidad de formar unas partículas sub-virales, no infecciosas e inmunogénicas frente al virus humano de la hepatitis B y frente al virus de la hepatitis C,

b)- una molécula de ácidos nucleicos híbrida constituida por:

* la secuencia de ácidos nucleicos representada por SEC ID nº 13, o

* una secuencia de ácidos nucleicos que presenta una homología de por lo menos un 80%, en particular de por lo menos un 85%, particularmente de por lo menos un 90%, y más particularmente de por lo menos un 95%, con dicha SEC ID nº 13, con la condición de que la proteína codificada por dicha secuencia de ácidos nucleicos esté también deleccionada del dominio transmembranario situado en el extremo N-terminal de la proteína S de HBV, conserve las propiedades del dominio transmembranario de la proteína de envoltura de HCV y conserve la capacidad de formar unas partículas sub-virales, no infecciosas e inmunogénicas frente al virus humano de la hepatitis B y/o frente al virus de la hepatitis C, o

* la secuencia de ácidos nucleicos de una variante sintética, derivada de la SEC ID nº 13, con la condición de que la proteína codificada por dicha secuencia de ácidos nucleicos de dicha variante sintética esté también deleccionada del dominio transmembranario situado en el extremo N-terminal de la proteína S de HBV, conserve las propiedades del dominio transmembranario de la proteína de envoltura de HCV y conserve la capacidad de formar unas partículas sub-virales, no infecciosas e inmunogénicas frente al virus humano de la hepatitis B y/o frente al virus de la hepatitis C; o

* un vector mencionado anteriormente que comprende dicha molécula de ácidos nucleicos híbrida,

c)- una partícula sub-viral quimérica, que comprende la proteína de fusión inmunogénica constituida por:

* la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 10, o

* una secuencia de aminoácidos que presenta un porcentaje de identidad de por lo menos un 86%, en particular de por lo menos un 88%, particularmente de por lo menos un 90%, y más particularmente de por lo menos un 95%, con SEC ID nº 10, con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos esté también deleccionada del dominio transmembranario situado en el extremo N-terminal de la proteína S de HBV, conserve las propiedades del dominio transmembranario de la proteína de envoltura de HCV y conserve la capacidad de formar unas partículas sub-virales, no infecciosas e inmunogénicas frente al virus humano de la hepatitis B y/o frente al virus de la hepatitis C, o

- * la secuencia de aminoácidos de una variante sintética, derivada de la SEC ID nº 10, con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos de dicha variante sintética esté también delecionada del dominio transmembranario situado en el extremo N-terminal de la proteína S de HBV, conserve las propiedades del dominio transmembranario de la proteína de envoltura de HCV y conserve la capacidad de formar unas partículas sub-virales, no infecciosas e inmunogénicas frente al virus humano de la hepatitis B y/o frente al virus de la hepatitis C.

Un objeto particular de la invención se refiere a uno de los tres compuestos siguientes:

- a)- la proteína de fusión mencionada anteriormente que comprende la proteína E2 (en particular E2-Sd, PIT2-E2-Sd, E1-E2-Sd, PIT1-E1-E2-Sd), de la cual se encuentra una representación esquemática en la figura 3C, y que comprende la casi totalidad de la proteína E2 de HCV, injertada en N-terminal de la proteína S delecionada de HBV, o
- b)- la molécula de ácidos nucleicos híbrida mencionada anteriormente que comprende la secuencia de ácidos nucleico que codifica para la proteína E2 (en particular e2-sd, pit2-e2-sd, e1-e2-sd, pit1-el-e2-sd), y que comprende la casi totalidad de la secuencia de ácidos nucleico que codifica para la proteína E1 de HCV, injertada en 5' de la secuencia de ácidos nucleico que codifica para la proteína S delecionada de HBV, o
- c)- la partícula sub-viral mencionada anteriormente que comprende la proteína E1 (en particular E1-Sd, PIT-E1-Sd, E1-E2-Sd, PIT-E1-E2-Sd), y que comprende la casi totalidad de la proteína E2 de HCV, injertada en N-terminal de la proteína S delecionada de HBV.

Conforme a un aspecto ventajoso de la invención, la composición inmunogénica mencionada anteriormente comprende como sustancia activa una partícula sub-viral quimérica, que comprende por lo menos las dos proteínas de fusión inmunogénicas constituidas por:

- la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 8, o
- una secuencia de aminoácidos que presenta un porcentaje de identidad de por lo menos un 88%, en particular de por lo menos un 90%, particularmente de por lo menos un 92%, y más particularmente de por lo menos un 95%, con dicha SEC ID nº 8, con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos esté también delecionada del dominio transmembranario situado en el extremo N-terminal de la proteína S de HBV, conserve las propiedades del dominio transmembranario de la proteína de envoltura de HCV y conserve la capacidad de formar unas partículas sub-virales, no infecciosas e inmunogénicas frente al virus humano de la hepatitis B y/o frente al virus de la hepatitis C, o
- la secuencia de aminoácidos de una variante sintética, derivada de la SEC ID nº 8, con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos de dicha variante sintética esté también delecionada del dominio transmembranario situado en el extremo N-terminal de la proteína S de HBV, conserve las propiedades del dominio transmembranario de la proteína de envoltura de HCV y conserve la capacidad de formar unas partículas sub-virales, no infecciosas e inmunogénicas frente al virus humano de la hepatitis B y/o frente al virus de la hepatitis C, y,
- la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 10, o
- una secuencia de aminoácidos que presenta un porcentaje de identidad de por lo menos un 86%, en particular de por lo menos un 88%, particularmente de por lo menos un 90%, y más particularmente de por lo menos un 95%, con SEC ID nº 10 de E2-Sd, con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos esté también delecionada del dominio transmembranario situado en el extremo N-terminal de la proteína S de HBV, conserve las propiedades del dominio transmembranario de la proteína de envoltura de HCV y conserve la capacidad de formar unas partículas sub-virales, no infecciosas e inmunogénicas frente al virus humano de la hepatitis B y/o frente al virus de la hepatitis C, o
- la secuencia de aminoácidos de una variante sintética, derivada de la SEC ID nº 10, con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos de dicha variante sintética esté también delecionada del dominio transmembranario situado en el extremo N-terminal de la proteína S de HBV, conserve las propiedades del dominio transmembranario de la proteína de envoltura de HCV y conserve la capacidad de formar unas partículas sub-virales, no infecciosas e inmunogénicas frente al virus humano de la hepatitis B y/o frente al virus de la hepatitis C.

Un objeto particular de la invención se refiere a la partícula sub-viral mencionada anteriormente que comprende dos proteínas de fusión mencionadas anteriormente, comprendiendo una:

- la proteína E1 de HCV (en particular E1-Sd, PIT1-E1-Sd, E1-E2-Sd, PIT-E1-E2-Sd), y la proteína E2 de HCV,

injetada en N-terminal de la proteína S delecionada de HBV, y la otra

- la proteína E2 de HCV (en particular E2-Sd, PIT2-E2-Sd, E1-E2-Sd, PIT-E1-E2-Sd), injertada en N-terminal de la proteína S delecionada de HBV.

5 Según un aspecto particularmente ventajoso de la invención, la sustancia activa de la composición inmunogénica mencionada anteriormente está constituida por la mezcla que comprende:

- por lo menos dos proteínas de fusión siguiente:

10 * una constituida por:

- la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 8, o

- una secuencia de aminoácidos que presenta un porcentaje de identidad de por lo menos un 88%, en particular de por lo menos un 90%, particularmente de por lo menos un 92%, y más particularmente de por lo menos un 95%, con SEC ID nº 8, con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos esté también delecionada del dominio transmembranario situado en el extremo N-terminal de la proteína S de HBV, conserve las propiedades del dominio transmembranario de la proteína de envoltura de HCV y conserve la capacidad de formar unas partículas sub-virales, no infecciosas e inmunogénicas frente al virus humano de la hepatitis B y/o frente al virus de la hepatitis C, o

- la secuencia de aminoácidos de una variante sintética, derivada de la SEC ID nº 8, con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos de dicha variante sintética esté también delecionada del dominio transmembranario situado en el extremo N-terminal de la proteína S de HBV, conserve las propiedades del dominio transmembranario de la proteína de envoltura de HCV y conserve la capacidad de formar unas partículas sub-virales, no infecciosas e inmunogénicas frente al virus humano de la hepatitis B y/o frente al virus de la hepatitis C;

25 * la otra constituida por:

- la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 10, o

- una secuencia de aminoácidos que presenta un porcentaje de identidad de por lo menos un 86%, en particular de por lo menos un 88%, particularmente de por lo menos un 90%, y más particularmente de por lo menos un 95%, con SEC ID nº 10, con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos esté también delecionada del dominio transmembranario situado en el extremo N-terminal de la proteína S de HBV, conserve las propiedades del dominio transmembranario de la proteína de envoltura de HCV y conserve la capacidad de formar unas partículas sub-virales, no infecciosas e inmunogénicas frente al virus humano de la hepatitis B y/o frente al virus de la hepatitis C, o

- la secuencia de aminoácidos de una variante sintética, derivada de la SEC ID nº 10, con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos de dicha variante sintética esté también delecionada del dominio transmembranario situado en el extremo N-terminal de la proteína S de HBV, conserve las propiedades del dominio transmembranario de la proteína de envoltura de HCV y conserve la capacidad de formar unas partículas sub-virales, no infecciosas e inmunogénicas frente al virus humano de la hepatitis B y/o frente al virus de la hepatitis C.

- por lo menos dos moléculas de ácidos nucleicos híbridas siguientes:

50 * una constituida por:

- la secuencia de ácidos nucleicos representada por SEC ID nº 11, o

- una secuencia de ácidos nucleicos que presenta una homología de por lo menos un 78%, en particular de por lo menos un 80%, particularmente de por lo menos un 85%, y más particularmente de por lo menos un 90%, con dicha secuencia SEC ID nº 11, con la condición de que la proteína codificada por dicha secuencia de ácidos nucleicos esté también delecionada del dominio transmembranario situado en el extremo N-terminal de la proteína S de HBV, conserve las propiedades del dominio transmembranario de la proteína de envoltura de HCV y conserve la capacidad de formar unas partículas sub-virales, no infecciosas e inmunogénicas frente a HCV y/o HBV humano, o

- la secuencia de ácidos nucleicos de una variante sintética derivado de dicha secuencia SEC ID nº 11, con la condición de que la proteína codificada por dicha secuencia de ácidos nucleicos de dicha variante sintética esté también delecionada del dominio transmembranario situado en el extremo N-terminal de la proteína S de HBV, conserve las propiedades del dominio transmembranario de la

proteína de envoltura de HCV y conserve la capacidad de formar unas partículas sub-virales, no infecciosas e inmunogénicas frente a HCV y/o HBV humano, o un vector mencionado anteriormente que comprende dicha molécula de ácidos nucleicos híbrida,

- 5 * la otra constituida por:
- la secuencia de ácidos nucleicos representada por SEC ID nº 13, o
 - una secuencia de ácidos nucleicos que presenta una homología de por lo menos un 80%, particularmente de por lo menos un 85%, más particularmente de por lo menos un 90%, y más particularmente de por lo menos un 95%, con dicha secuencia SEC ID nº 13, con la condición de que la proteína codificada por dicha secuencia de ácidos nucleicos esté también delecionada del dominio transmembranario situado en el extremo N-terminal de la proteína S de HBV, conserve las propiedades del dominio transmembranario de la proteína de envoltura de HCV y conserve la capacidad de formar unas partículas sub-virales, no infecciosas e inmunogénicas frente a HCV y/o HBV humano, o
 - la secuencia de ácidos nucleicos de una variante sintética, derivada de dicha secuencia SEC ID nº 13, con la condición de que la proteína codificada por dicha secuencia de ácidos nucleicos de dicha variante sintética esté también delecionada del dominio transmembranario situado en el extremo N-terminal de la proteína S de HBV, conserve las propiedades del dominio transmembranario de la proteína de envoltura de HCV y conserve la capacidad de formar unas partículas sub-virales, no infecciosas e inmunogénicas frente a HCV y/o HBV humano o un vector mencionado anteriormente que comprende dicha molécula de ácidos nucleicos híbrida;
- 10
- 15
- 20
- 25
- por lo menos dos partículas sub-virales quiméricas siguientes:
 - * una que comprende la proteína de fusión inmunogénica constituida por:
 - la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 8, o
 - una secuencia de aminoácidos que presenta un porcentaje de identidad de por lo menos un 88%, en particular de por lo menos un 90%, particularmente de por lo menos un 92%, y más particularmente de por lo menos un 95%, con dicha SEC ID nº 8, con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos esté también delecionada del dominio transmembranario situado en el extremo N-terminal de la proteína S de HBV, conserve las propiedades del dominio transmembranario de la proteína de envoltura de HCV y conserve la capacidad de formar unas partículas sub-virales, no infecciosas e inmunogénicas frente a HCV y/o frente a HBV humano, o
 - la secuencia de aminoácidos de una variante sintética, derivada de dicha SEC ID nº 8, con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos de dicha variante sintética esté también delecionada del dominio transmembranario situado en el extremo N-terminal de la proteína S de HBV, conserve las propiedades del dominio transmembranario de la proteína de envoltura de HCV y conserve la capacidad de formar unas partículas sub-virales, no infecciosas e inmunogénicas frente a HCV y/o frente a HBV humano,
 - * una que comprende la proteína de fusión inmunogénica constituida por:
 - la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 10, o
 - una secuencia de aminoácidos que presenta un porcentaje de identidad de por lo menos un 86%, en particular de por lo menos un 88%, particularmente de por lo menos un 92%, y más particularmente de por lo menos un 95%, con SEC ID nº 10, con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos esté también delecionada del dominio transmembranario situado en el extremo N-terminal de la proteína S de HBV, conserve las propiedades del dominio transmembranario de la proteína de envoltura de HCV y conserve la capacidad de formar unas partículas sub-virales, no infecciosas e inmunogénicas frente a HCV y/o frente a HBV humano, o
 - la secuencia de aminoácidos a una variante sintética, derivada de la SEC ID nº 10,

30

35

40

45

50

55

60

con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos de dicha variante sintética esté también delecionada del dominio transmembranario situado en el extremo N-terminal de la proteína S de HBV, conserve las propiedades del dominio transmembranario de la proteína de envoltura de HCV y conserve la capacidad de formar unas partículas sub-virales, no infecciosas e inmunogénicas frente a HCV y/o frente a HBV humano.

65 Un objeto particular de la invención se refiere a la mezcla que comprende los compuestos siguientes:

- 5 a)- por lo menos dos proteínas de fusión mencionada anteriormente, una que comprende la proteína E1 (en particular E1-Sd de secuencia SEC ID nº 8, o PIT1-E1-Sd, o E1-E2-Sd, o PIT1-E1-E2-Sd) la otra que comprende la proteína E2 (en particular E2-Sd de secuencia SEC ID nº 10, o PIT2-E2-Sd, o E1-E2-Sd, o PIT1-E1-E2-Sd) del HCV, siendo estas últimas injertadas en N-terminal de la proteína S delecionada de HBV, o
- 10 b)- por lo menos dos moléculas de ácidos nucleicos híbridas mencionada anteriormente, una que comprende la secuencia de ácidos nucleico que codifica para la proteína E1 (en particular pit1-e1-sd de secuencia SEC ID nº 11, o e1-sd, o e1-e2-Sd, o pit1-e1-e2-sd), la otra que comprende la secuencia de ácidos nucleico que codifica para la proteína E1 (en particular pit2-e2-sd de secuencia SEC ID nº 13, o e2-sd, o e1-e2-Sd, o pit1-e1-e2-sd), siendo estas últimas injertadas en 5' de la secuencia de ácidos nucleico que codifica para la proteína S delecionada de HBV, o
- 15 c)- por lo menos dos partículas sub-virales mencionadas anteriormente, una que comprende la proteína E1 (en particular E1-Sd de secuencia SEC ID nº 8, o PIT1-E1-Sd, o E1-E2-Sd, o PIT1-E1-E2-Sd) la otra que comprende la proteína E2 (en particular E2-Sd de secuencia SEC ID nº 10, o PIT2-E2-Sd, o E1-E2-Sd, o PIT1-E1-E2-Sd) de HCV, siendo estas últimas injertadas en N-terminal de la proteína S delecionada de HBV.
- 20 La invención tiene también por objeto la utilización de una composición inmunogénica mencionada anteriormente, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento profiláctico y/o para la prevención de la hepatitis C.
- La presente invención se refiere también a la utilización de una composición inmunogénica mencionada anteriormente, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento profiláctico y/o para la prevención de la hepatitis B.
- 25 Ventajosamente el objeto de la presente invención se refiere a la utilización de una composición inmunogénica mencionada anteriormente, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento profiláctico y/o para la prevención de la hepatitis B y de la hepatitis C.
- 30 La invención tiene también por objeto una línea celular que expresa unas partículas sub-virales quiméricas, inmunogénicas no infecciosas descritas anteriormente.
- 35 A título de ejemplos de microorganismos que convienen a los fines de la invención, se pueden citar las levaduras, tales como las de las familias siguientes: *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Kluveromyces*, *Pichia*, *Hanseluna*, *Yarrowia*, *Schwaniomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces carlsbergensis*, y *Kluveromyces lactis* siendo preferidas; y las bacterias, tales como *E. coli* y las de las familias siguientes: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Salmonella*, *Streptococcus*, *Bacillus* y *Streptomyces*.
- 40 A título de células eucariotas, se pueden citar las células que provienen de animales tales como los mamíferos, los reptiles, los insectos y equivalentes. Las células eucariotas preferidas son las células que provienen del hámster chino (células CHO), del simio (células COS y Vero), del riñón del hámster enano (células BHK), del riñón del cerdo (células PK 15) y del riñón del conejo (células RK13, las líneas celulares humanas del osteosarcoma (células 143 B), las líneas celulares humanas HeLa y las líneas celulares humanas del hepatoma (del tipo células Hep G2), así como las líneas celulares de insecto (por ejemplo de *Spodoptera frugiperda*).
- 45 Ventajosamente el objeto de la presente invención se refiere a una línea celular mencionada anteriormente, la cual es la línea de ovarios de hámster chino denominada CHO.
- 50 Estas últimas se han descrito anteriormente en particular por Michel ML, Pontisso P, Sobczak E, Malpièce Y, Streeck RE, Tiollais P. Synthesis in animal cells of hepatitis B superficie antigen particles carrying a receptor for polymerized human serum albumin. Proc Natl Acad Sci U S A. Dicimbre de 1984; 81(24):7708-12:
- 55 La presente invención se refiere también a una línea celular mencionada anteriormente, la cual es una levadura, pudiendo dicha levadura ser en particular *Saccharomyces Cerevisae*.
- La invención tiene también por objeto una línea celular descrita anteriormente, la cual es la línea celular de riñón de hámster recién nacido (BHK), y es particularmente la línea celular de riñón de hámster recién nacido (BHK-21).
- 60 Estas últimas se han descrito anteriormente en particular por Goldman RD, Follett EA. Biréfringent filamentous organelle in BHK-21 cells and its possible role in cell spreading and motility. Science. 17 de julio de 1970; 169(942):286-8.
- 65 Según un aspecto particular, la invención se refiere también a un método de producción de las partículas sub-virales quiméricas, inmunogénicas no infecciosas mencionadas anteriormente, a partir de una línea celular mencionada anteriormente, que comprende las etapas siguientes:

- 1- una etapa de TRANSDUCCIÓN de las células de la línea celular con un vector lentiviral que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica para la proteína S salvaje de un aislado del virus de la hepatitis B,
- 2- una etapa de CULTIVO de dichas células con el fin de producir una línea celular capaz de expresar las partículas sub-virales de envoltura salvaje del virus de la hepatitis B,
- 3- una etapa de SELECCIÓN de un clon que presenta una secreción óptima de partículas sub-virales de envoltura salvaje del virus de la hepatitis B,
- 4- una etapa de SOBRE-TRANSDUCCIÓN de dicho clon con un vector mencionado anteriormente,
- 5- una etapa de CULTIVO de dichas células con el fin de producir una línea celular capaz de expresar las partículas sub-virales quiméricas, inmunogénicas no infecciosas mencionadas anteriormente,
- 6- una etapa de SELECCIÓN de dichas células capaces de segregar de manera óptima las partículas sub-virales quiméricas, inmunogénicas no infecciosas mencionadas anteriormente,
- 7- una etapa de CULTIVO de dicho clon para la producción de las partículas sub-virales quiméricas, inmunogénicas no infecciosas mencionadas anteriormente, y
- 8- una etapa de PURIFICACIÓN de las partículas sub-virales a partir del medio de cultivo recogido (centrifugación, ultracentrifugación sobre gradientes, recogida de las fracciones positivas para las partículas sub-virales quiméricas, diálisis).

La tabla 1 proporciona una lista de las secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos descritas en la presente invención. Por convención, las secuencias de ácidos nucleicos están formuladas en minúsculas y las secuencias de aminoácidos están formuladas en mayúsculas.

Tabla 1: LISTADO DE SECUENCIAS

Ácidos nucleicos	Aminoácidos
SEC ID nº 1: sd	SEC ID nº 2: Sd
SEC ID nº 3: e1	SEC ID nº 4: E1
SEC ID nº 5: e2	SEC ID nº 6: E2
SEC ID nº 7: e1-sd	SEC ID nº 8: E1-Sd
SEC ID nº 9: e2-sd	SEC ID nº 10: E2-Sd
SEC ID nº 11: pit1-e1-sd	SEQ.ID N° 12: PIT1-E1-Sd
SEC ID nº 13: pit2-e2-sd	SEC ID nº 14: PIT2-E2-Sd
SEC ID nº 15: Vector con pit1-e1-sd	/
SEC ID nº 16: Vector con pit2-e2-sd	/

Otras características y ventajas de la invención aparecerán más claramente a la lectura de la descripción siguiente de un modo de realización preferido, dado a título de simple ejemplo ilustrativo y no limitativo, y unas figuras anexas, entre las que:

La figura 1 esquematiza la topología de un fragmento de la poliproteína del virus HCV de más de 3000 aminoácidos. Las escisiones efectuadas por las peptidasas celulares (\propto), llevan a la maduración de dicha poliproteína en particular en proteínas estructurales (cápside, cubierta E1 y E2). Los números indican la posición de los restos de aminoácidos que delimitan los dominios de las diferentes proteínas estructurales de la poliproteína.

Las figuras 2A y 2B esquematizan la tipología transmembranaria de la proteína S salvaje del virus HBV.

La figura 2A esquematiza los 226 restos de aminoácidos de la proteína S salvaje del virus HBV que comprende en particular cuatro dominios transmembranarios, representados por unos rectángulos verticales grises, y cuyos extremos N- y C-terminales están orientados hacia la luz de RE. En el caso del aislado HBVadw, esta proteína de aproximadamente 25 kD comprende 226 restos de aminoácidos.

La figura 2B representa una partícula sub-viral obtenida tras el auto-ensamblaje de dicha proteína S salvaje.

Las figuras 3A a 3C representan la co-expresión de las proteínas de fusión E1-Sd (figura 3B) o E2-Sd (figura 3C) que, en presencia de la proteína S salvaje (figura 3B) se ensamblan en partículas sub-virales quiméricas de la presente invención.

La figura 3A representa la proteína S salvaje de HBV que se auto-ensambla en partículas sub-virales.

La figura 3B representa la proteína de fusión E1-Sd que resulta de la sustitución del dominio transmembranario situado en el extremo N-terminal de la proteína S salvaje por el dominio transmembranario de la proteína de envoltura E1 del virus HCV, representado por un rectángulo vertical negro, y por el ectodominio de E1, representado por unas líneas discontinuas; después esquematiza el ensamblaje de dicha proteína de fusión E1-Sd, en presencia de la proteína S salvaje, en partículas sub-virales S + E1-Sd.

Según el modo de realización particular pero no limitativo de la invención, la proteína de fusión E1-Sd de aproximadamente 50 kD comprende 393 restos de aminoácidos procedentes de la proteína E1 y del dominio S. Los restos 192 a 380 de la proteína completa E1 están unidos en el extremo N-terminal de la proteína S delecionada constituida por los restos 23 a 226 de la proteína S salvaje.

La figura 3C representa la proteína de fusión E2-Sd que resulta de la sustitución del dominio transmembranario situado en el extremo N-terminal de la proteína S salvaje por el dominio transmembranario de la proteína de envoltura E2 del virus HCV, representado por un rectángulo vertical blanco, y por el ectodominio de E2, representado por unas líneas discontinuas; después esquematiza el ensamblaje de dicha proteína de fusión E2-Sd, en presencia de la proteína S salvaje, en partículas sub-virales S + E2-Sd.

Según el modo de realización particular pero no limitativo de la invención, la proteína de fusión E2-Sd de aproximadamente 85 kD comprende 564 restos de aminoácidos procedentes de la proteína E2 y del dominio S. Los restos 384 a 743 de la proteína completa E2 están enlazados al extremo N-terminal de la proteína S delecionada constituida por los restos 23 a 226 de la proteína S salvaje.

Las figuras 4A a 4E esquematizan la topología de las proteínas de envoltura S salvaje del HBV, E1 y E2 del HCV, así como las proteínas de fusión E1-Sd y E2-Sd.

La figura 4A representa la topología de la proteína de envoltura salvaje E1 del HCV que está constituida por un dominio transmembranario único (rectángulo vertical negro) y un amplio ectodominio orientado hacia la luz de RE. En el caso del aislado HCV 1a, esta proteína de aproximadamente 35 kD y comprende 192 restos de aminoácidos.

La figura 4B representa la topología de la proteína de envoltura salvaje E2 del HCV que está constituida por un dominio transmembranario único (rectángulo vertical blanco) y un amplio ectodominio orientado hacia la luz de RE. En el caso del aislado HCV 1a, esta proteína de aproximadamente 70 kD y comprende 363 restos de aminoácidos.

La figura 4C representa la topología de la proteína de envoltura salvaje S de HBV que comprende en particular cuatro dominios transmembranarios (rectángulos verticales grises).

La figura 4D representa la secuencia de ADNc de la molécula de ácidos nucleicos híbrida pit1-e1-sd, constituida de su extremo 5' a 3':

- por la secuencia que codifica para el péptido de inicio de transferencia PIT1 del virus HCV,
- por la secuencia que codifica para la totalidad del ectodominio de la proteína E1 y la secuencia que codifica para el dominio transmembranario de la proteína E1 delecionada de los 3 últimos codones del extremo 3' del virus HCV,
- por la secuencia que codifica para la proteína S delecionada del virus HBV,
- y su utilización para la producción de la proteína de fusión E1-Sd de la invención.

La figura 4E representa la secuencia de ADNc de la molécula de ácidos nucleico híbrida pit2-e2-sd, constituida de su extremo 5' a 3':

- por la secuencia que codifica para el péptido de inicio de transferencia PIT2 del virus HCV,
- por la secuencia que codifica para la totalidad del ectodominio de la proteína E2, la secuencia que codifica para el dominio transmembranario de la proteína E2 delecionada de los 3 últimos codones del extremo 3'-del virus HCV,
- por la secuencia que codifica para la proteína S delecionada del virus HBV,
- y su utilización para la producción de la proteína de fusión E2-Sd de la invención.

- 5 La figura 5 esquematiza el protocolo utilizado para la obtención de los ADNc que codifican para las proteínas de fusión de la invención. La secuencia que codifica para las proteínas E1 y E2 está representada por una línea negra (secuencia A). La secuencia que codifica para la proteína S delecionada está representada por una línea gris (secuencia B), el sitio de restricción BamHI está representado por un rombo negro. Los cebadores sentido y antisentido utilizados para la amplificación de las secuencias de ácidos nucleicos e1-sd A, e1-sd B, e2-sd A y e2-sd B están clasificados en la tabla x.
- 10 Las figuras 6A y 6B proponen una representación esquemática del protocolo experimental de producción transitoria de una de las proteínas de fusión de la invención E1-Sd o E2-Sd en sistema Semliki/células BHK-21.
- 15 La figura 6A muestra que el ARN derivado del plásmido pSFV1-E1-Sd está transfectado en células BHK-21 con el objetivo de obtener la producción de partículas sub-virales de envoltura quiméricas E1-Sd.
- 20 La figura 6B muestra que el ARN derivado del plásmido pSFV1-E2-Sd está transfectado en células BHK-21 con el objetivo de obtener la producción de partículas sub-virales de envoltura quiméricas E2-Sd.
- 25 Las figuras 6C y 6D muestran las transferencias Western reveladas bien por un anticuerpo anti-S (6C), bien por un anticuerpo anti-E1 y anti-E2 (6D), sobre los lisados de las células transfectadas por los ARN derivados de los plásmidos pSFV1-E1-Sd y pSFV1-E2-Sd.
- 30 La figura 6C muestra que las proteínas de fusión E1-Sd y E2-Sd (bandas enmarcadas) están detectadas en los tamaños de 50 kD y 85 kD respectivamente, y que corresponden a los tamaños teóricos. M: marcador de peso molecular (kD).
- 35 La figura 6D muestra que las proteínas de fusión E1-Sd y E2-Sd (bandas enmarcadas) están detectadas en los tamaños de 50 kD y 85 kD respectivamente, por el anticuerpo anti-E1 y anti-E2 respectivamente. M: marcador de peso molecular (kD).
- 40 Las figuras 7A a 7B muestran la co-producción de la proteína S salvaje del HBV y de las dos proteínas de fusión E1-Sd y E2-Sd en sistema Semliki/células BHK-21.
- 45 Leyenda: M: marcador de peso molecular (kD); las pistas β -gal, E1E2 o E1E2 y S representan los lisados celulares control procedentes de transfecciones de células BHK-21 por los ARN SFV correspondientes.
- 50 La figura 7A propone una representación esquemática del protocolo experimental. Los ARN derivados de los plásmidos pSFV1-E1-Sd y pSFV1-E2-Sd son co-transfectados individualmente en unas células BHK-21 con el ARN derivado del plásmido pSFV1-S con el objetivo de obtener la producción de dos tipos de partículas sub-virales de envoltura quiméricas S+E1-Sd y S+E2-Sd, la primera que comprende la proteína S salvaje y la proteína de fusión E1-Sd, la segunda que comprende la proteína S salvaje y la proteína de fusión E2-Sd.
- 55 La figura 7B muestra una transferencia Western revelada por un anticuerpo anti-E1 sobre las partículas intracelulares purificadas a partir de las células transfectadas por los ARN derivados de los vectores pSFV1-E1-Sd y pSFV1-S. Los resultados muestran que la proteína de fusión E1-Sd (banda enmarcada) está detectada en el tamaño de 50 kD que corresponde al tamaño teórico.
- 60 La figura 7C muestra una transferencia Western revelada por un anticuerpo anti-S sobre las partículas intracelulares purificadas a partir de las células transfectadas por los ARN derivados de los vectores pSFV1-E1-Sd y pSFV1-S. Los resultados muestran que la proteína de fusión E1-Sd (banda enmarcada) está detectada en el tamaño de 50 kD que corresponde al tamaño teórico.
- 65 La figura 7D muestra una micrografía en microscopio electrónico de transmisión por coloración negativa sobre las partículas intracelulares purificadas a partir de las células transfectadas por los ARN derivados de los plásmidos pSFV1-E1-Sd y pSFV1-S. Barra: 100 nm.
- La figura 7E muestra una transferencia Western revelada por un anticuerpo anti-E2 sobre las partículas intracelulares purificadas a partir de las células transfectadas por los ARN derivados de los plásmidos pSFV1-E2-Sd y pSFV1-S. Los resultados muestran que la proteína de fusión E2-Sd (banda enmarcada) está detectada en el tamaño de 85 kD que corresponde al tamaño teórico.
- La figura 7F muestra una transferencia Western revelada por un anticuerpo anti-S sobre las partículas intracelulares purificadas a partir de las células transfectadas por los ARN derivados de los plásmidos pSFV1-E2-Sd y pSFV1-S. Los resultados muestran que la proteína quimérica E2-Sd (banda enmarcada) está detectada en el tamaño de 85 kD que corresponde al tamaño teórico.
- La figura 7G muestra una micrografía en microscopio electrónico de transmisión por coloración negativa sobre las partículas intracelulares purificadas a partir de las células transfectadas por los ARN derivados de los

plásmidos pSFV1-E2-Sd y pSFV1-S. Barra: 100 nm.

La figura 8 representa el protocolo de obtención de las líneas clonales CHO que producen la proteína S salvaje y las proteínas de fusión de la invención. Esquematiza como a partir de una línea celular CHO, la transducción por un lentivirus (LV) que contiene un gen de resistencia a la higromicina (*hph*) así como el gen que codifica para la proteína S salvaje de HBV ha permitido el desarrollo de un primer clon celular denominado CHO-S y productor de la proteína S salvaje. Después, este clon se ha sobre-transducido por un lentivirus (LV) que contiene el gen de la GFP (*gfp*) así como el gen que codifica para una de las dos proteínas de fusión E1-Sd-ou E2-Sd. Esta segunda transducción ha permitido el desarrollo de otros dos clones celulares denominados CHO-S/E1-Sd y -S/E2-Sd.

La figura 9 muestra un análisis por transferencia Western de la producción intracelular de la proteína S salvaje y las proteínas de fusión de la invención en los diferentes clones estables CHO. Muestra que las proteínas intracelulares de los clones CHO-S, CHO-S/E1-Sd y CHO-S/E2-Sd son revelados con la ayuda de un anticuerpo anti-E1, anti-E2 y anti-S. Las proteínas de fusión buscadas son indicadas en cuadros negros. M: marcador de peso molecular (kD); pistas β -gal, E1E2 y S: lisados celulares control procedentes de transfecciones de células BHK-21 por los ARN SFV correspondientes.

La figura 10 representa un histograma de cuantificación de la proteína S salvaje por ELISA en las fracciones recogidas a partir del gradiente de CsCl. La abscisa muestra las diferentes fracciones recogidas, la ordenada indica la densidad óptica a 290 nm de cada una de ella. A partir de los sobrenadantes de cultivo de los clones CHO-S, CHO-S/E1-Sd y CHO-S/E2-Sd, las partículas sub-virales S y quiméricas están purificadas por ultracentrifugación en CsCl. Se recogen unas fracciones a partir del vértice del gradiente (fracción 1) y se ha evaluado la cantidad de proteína S salvaje por ELISA. El histograma negro representa la distribución de la proteína S salvaje en las fracciones del clon CHO-S, el histograma gris claro representa la distribución de la proteína S salvaje en las fracciones del clon CHO-S/E1-Sd y el histograma gris oscuro representa la distribución de la proteína S salvaje en las fracciones del clon CHO-S/E2-Sd.

La figura 11A muestra que el contenido proteico de las partículas purificadas por CsCl se ha analizado por transferencia Western con la ayuda de anticuerpos anti-E1, anti-E2 y anti-S. La proteína S salvaje se detecta en sus dos estados de glicosilación (24 y 27 kD) en los tres tipos de partículas sub-virales. Las proteínas de fusión E1-Sd o E2-Sd son detectadas en los tamaños que corresponden al tamaño teórico respectivamente de 50 y 85 kD en sus partículas respectivas. M: marcador de peso molecular (kD).

La figura 11B muestra el análisis en coloración negativa por microscopio electrónico de transmisión de la purificación, a partir del sobrenadante del clon CHO-S, de partículas sub-virales que resultan del auto-ensamblaje de la proteína S salvaje de tipo esférico de aproximadamente 20 nm de diámetro. Barra: 20 nm.

La figura 11C muestra el análisis en coloración negativa por microscopio electrónico de transmisión de la purificación, a partir del sobrenadante del clon CHO-S/E1-Sd, de partículas sub-virales quiméricas que resultan del ensamblaje de la proteína de fusión E1-Sd en presencia de la proteína S salvaje. Estas partículas de tipo esférico tienen aproximadamente 20 nm de diámetro. Barra: 20 nm.

La figura 11D muestra el análisis en coloración negativa por microscopio electrónico de transmisión de la purificación, a partir del sobrenadante del clon CHO-S/E2-Sd, de partículas sub-virales quiméricas que resultan del ensamblaje de la proteína de fusión E1-Sd en presencia de la proteína S salvaje. Estas partículas de tipo esférico tienen aproximadamente 20 nm de diámetro. Barra: 20 nm.

A título de ejemplo no limitativo, se presenta a continuación un modo de realización particular de la invención, para la obtención de partículas sub-virales de envoltura del virus de la hepatitis C (HCV) en sistema Semliki (véanse las figuras 4 a 7).

Este modo de realización se basa en la obtención de proteínas de fusión inmunogénicas de la invención y en particular de las proteínas de fusión E1-Sd o E2-Sd, que comprende por un lado la proteína de envoltura S delecionada de N-terminal de su dominio transmembranario (Sd), del virus de la hepatitis B (HBV) y por otro lado la casi totalidad de una de las proteínas de envoltura E1 o E2 del HCV. Este modo de realización transitorio demuestra la capacidad de ensamblaje de dicha proteína S delecionada (Sd), en presencia de la proteína S salvaje, permite obtener unas partículas sub-virales quiméricas mencionadas anteriormente, gracias en particular al alto nivel de expresión del vector basado en las propiedades de replicación del virus del bosque de Semliki (vector pSFV), antes de proceder a la obtención de clones estables y productores de dichas partículas utilizando los vectores lentivirales.

Ejemplo I: Obtención de partículas sub-virales quimérica de envoltura del virus de la hepatitis C en sistema Semliki (pSFV)

I.1) Construcción de los plásmidos pSFV1-E1-Sd y pSFV1-E2-Sd.

El vector pSFV1 (Invitrogen) que posee una estructura bicistrónica de 11033 pb se utiliza para las construcciones siguientes. Este vector está dotado de una secuencia promotora de la SP6-ARN-polimerasa, insertada en 5' del primer cistrón, con el fin de poder iniciar la síntesis de un ARN completo de polaridad positiva (ARN denominado 42S(+)) por transcripción *in vitro*. Después de la transfección en las células de mamífero, estos ARN recombinantes tapados *in vitro* se autorreplican en presencia de la replicasa nsP1-4 del SFV y sirven para la producción de proteínas de interés por medio de un ARNm secundario denominado 26S(+).

La obtención del ADN complementario (ADNc) salvaje o de una molécula de ácidos nucleicos híbrida que codifica para una proteína de fusión de la invención se efectúa realizando varias series de amplificaciones por reacciones de polimerización en cadena (PCR). A partir del plásmido pSFV1-E1E2 (que consiste en un vector SFV que contiene la secuencia que codifica para las dos proteínas E1 y E2 del HCV), una primera PCR, denominada PCR A, ha permitido la amplificación de las secuencias que codifican para las proteínas de envoltura E1 o E2 del HCV con su dominio transmembranario y precedidas de las secuencias que codifican para su péptido de inicio de transferencia respectivo de direccionamiento al retículo endoplásmico. A partir del plásmido pHBV1.5 descrito anteriormente (Patient, R., Hourieux, C., Sizaret, P.Y., Trassard, S., Sureau, C., y Roingard, P., (2007) Hepatitis B Virus Subviral Envelope Particle Morphogenesis and Intracellular Trafficking *J Virol*, 81(8), 3842-51), una segunda PCR, denominada PCR B ha permitido la amplificación de la secuencia que codifica para la proteína S deletcionada del HBV. Las partes «HCV» de las secuencias que codifica para las proteínas de fusión según la invención se han denominado «A» y las partes «HBV» se han denominado «B» (figura 5). Los productos de las PCR A y B se han cuantificado y purificado sobre gel para ser después incluidos a partes iguales en PCR finales. La utilización de cebadores bivalentes HCV-HBV ha permitido la síntesis de productos de PCR A y B que poseen unos dominios que se solapan en sus extremos que permiten, al final, obtener las secuencias de ADNc completas que codifican para las proteínas de fusión de la invención.

11.1) Amplificación de las secuencias de ADNc que codifica para las proteínas de fusión de la invención (en particular E1-Sd y E2-Sd):

Las amplificaciones por PCR se efectúan en un medio de reacción de 50 µl que contiene 50 ng de ADN, 15 pmoles de cada par de cebadores (Proligo), 200 µM de cada uno de los desoxiribonucleótidos dNTP (Invitrogen) y 10 unidades de Taq-ADN-polimerasa (Takara) que comprenden una actividad correctora con el fin de minimizar los errores relacionados con las amplificaciones sucesivas (figura 5). Con la ayuda de los programas «Vector NTI Advance 10» (Invitrogen) y «Primer premier» (Biosoft International), los cebadores «sentido» de las secuencias A y los cebadores «anti-sentido» de las secuencias B se han definido con el fin de generar un sitio BamHI en los extremos respectivos 5' y 3' de los fragmentos de ADN amplificados.

La tabla 2 "oligonucleótidos utilizados para la amplificación génica de las secuencias A y B constitutivas de las secuencias quiméricas" a continuación indica las secuencias de cebadores utilizadas.

Las secuencias que corresponden al HCV están representadas escritas en negro, las que corresponden al HBV escritas en negro subrayado, las que corresponden al sitio de restricción BamHI escritas en cursiva subrayada, las que corresponden al codón ATG de iniciación de la traducción escritas en negrita, las que corresponden al codón ATT de terminación de la traducción escritas en negrita.

Tabla 2 "oligonucleótidos utilizados para la amplificación génica de las secuencias A y B constitutivas de las secuencias quiméricas".

Fragmento de ADNc amplificado	Par de cebador	Secuencia del cebador
e1-sd A	sentido anti-sentido	5' - ATAGGATCCATGACAGGGAACCTTCCTGGTTGC - 3' 3' - AACGACAAGCGGTCGTTCTTAGGAGT - 5'
e1-sd B	sentido anti-sentido	5' - GCTGTTCGCCAGCACAAGAATCCTC - 3' 3' - TAAAAGAAAAACAGAGACCCATATGTAATTCCTAGGATA - 5'
e2-sd A	sentido anti-sentido	5' - ATAGGATCCATGGGGAACCTGGGCGAAGGT - 3' 3' - ACGATGAGTATAGGGTTTGTTCCTTAGGAGTGTATGG - 5'
e2-sd B	sentido anti-sentido	5' - GCTACTCATATCCCAAACAAGAATCCTCACAATACC - 3' 3' - TAAAAGAAAAACAGAGACCCATATGTAATTCCTAGGATA - 5'

Estas reacciones de amplificación efectuadas en termociclador "iCycler" (Biorad) han consistido en una desnaturalización inicial de 5 minutos a 95°C, seguida de 25 ciclos que comprenden una desnaturalización de 1 minuto a 95°C, una hibridación de 1 minuto a 60°C y una elongación 1 minuto a 69°C. Los 25 ciclos son seguidos de una elongación final de 10 minutos a 69°C. Los fragmentos amplificados por las PCR A y B son purificados sobre gel de agarosa al 1% con la ayuda del sistema "Wizard SV Gel y PCR Clean-Up System" (promena) según las recomendaciones del fabricante. Los fragmentos purificados de las PCR A y B son después hibridados por una PCR denominada PCRHYB en ausencia de cebadores durante 10 ciclos y después son amplificados por una PCR final denominada PCRFIN durante 25 ciclos en presencia de los cebadores "sentido" de las secuencias A y los cebadores

"anti-sentido" de las secuencias B. Los programas de los ciclos de estas dos últimas PCR son similares a los utilizados para las PCR A y B. Los fragmentos amplificados de moléculas de ácidos nucleicos híbridas de la invención así obtenidos son purificados sobre gel como anteriormente.

5 I.1.2) clonación de las secuencias de ADNc híbridas en el vector DSFV1

Los productos de PCRFIN purificados son clonados en el vector pGEM-T® ("pGEM-T Easy Vector System", Promega) según las recomendaciones del fabricante. Los fragmentos de moléculas de ácidos nucleicos híbridas de la invención son liberados del pGEM-T® por restricción con la enzima BamHI (Biolabs) después clonados a nivel del sitio BamHI del plásmido SFV1. Los diferentes plásmidos que comprenden las proteínas de fusión de la invención (en particular los plásmidos pSFV1-E1-Sd y pSFV1-E2-Sd) son amplificados por transformación bacteriana y después purificados por maxipreparación de ADN al fenol/cloroformo. La orientación del inserto se verifica por restricción enzimática y el conjunto de las construcciones se verifica por secuenciación.

15 I-2) Obtención de línea celular transfectada transitoriamente por los ARN de las diferentes construcciones SFV

Los procedimientos de cultivo de las células de riñón de hámster recién nacido (BHK-21) así como los protocolos de transcripción *in vitro* de los plásmidos matrices SFV y de transfección de los ARN recombinantes auto-replicativos eran idénticos a los descritos anteriormente (Patient, R., Hourieux, C., Sizaret, P.Y., Trassard, S., Sureau, C., y Roingeard, P., (2007) Hepatitis B Virus Subviral Envelope Particle Morphogenesis and Intracellular Trafficking J Virol, 81(8), 3842-51). La construcción pSFV-S, que expresa la proteína S salvaje del HBV y anteriormente descrita en el artículo anterior, se ha utilizado como control.

25 I-3) Análisis de la producción intracelular de las proteínas de envoltura salvajes y quiméricas

Los procedimientos de análisis bioquímicos de las proteínas de interés (en particular S, Sd, E1, E2, E1-Sd, E2-Sd etc.) por inmunofluorescencia en microscopio confocal y por transferencia Western, los procedimientos de análisis ultra-estructurales de las células transfectadas en microscopio electrónico de transmisión así como los procedimientos de cuantificación (ELISA)/purificación (gradiente de sacarosa y después cromatografía de afinidad) de las partículas sub-virales de envoltura quiméricas HCV-HBV son los descritos anteriormente (Patient, R., Hourieux, C., Sizaret, P.Y., Trassard, S., Sureau, C., y Roingeard, P., (2007) Hepatitis B Virus Subviral Envelope Particle Morphogenesis and Intracellular Trafficking J Virol, 81(8), 3842-51).

La detección de las proteínas salvajes E1 y E2 de HCV y de las proteínas de fusión de la invención se realiza con la ayuda de un anticuerpo monoclonal murino anti-E1 (A4, proporcionado por el Dr Harry Greenberg, Universidad de Stanford, California) (Dubuisson, J., Hsu, H. H., Cheung, R. C., Greenberg, H. B., Russell, D. G., y Rice, C. M. (1994). Formation and intracellular localization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia and Sindbis viruses. J Virol 68(10), 6147-60) o anti-E2 (H52, proporcionado por el Dr Jean Dubuisson, Instituto Pasteur de Lille) (Deleersnyder, V., Pillez, A., Wychowski, C., Blight, K., Xu, J., Hahn, Y. S., Rice, C. M., y Dubuisson, J. (1997). Formation of native hepatitis C virus glycoprotein complexes. J Virol 71(1), 697-704).

45 I-4) Análisis del sobrenadante de cultivo.

Después de la transfección, el sobrenadante de cultivo de aproximadamente 10^7 células transfectadas se limpia mediante una centrifugación de 10 minutos a 1500 g y después se ultracentrifuga a 4 °C durante 16 horas a 35.000 rpm con la ayuda de un rotor SW41 (L70 Ultracentrifuge, Beckman), el pelete a está con 50 µl del tampón de lisis y después se analiza por transferencia Western.

50 I.5) Producción de proteínas de fusión E1-Sd y E2-Sd de la invención

Diez y seis horas después de la transfección por los plásmidos pSFV1 que comprenden las moléculas de ácidos nucleicos híbridas de la invención, pit1-e1-sd, pit2-e2-sd, las células BHK-21 se lisaron y después se analizaron por transferencia Western con la ayuda de anticuerpos monoclonales anti-E1 y anti-E2. Después de la producción transitoria en célula BHK-21, el tamaño de las proteínas de fusión E1-Sd y E2-Sd son de aproximadamente 50 kD para la proteína E1-Sd y de aproximadamente 85 kD para la proteína E2-Sd. Estos resultados, correlacionados con la intensa inmunofluorescencia obtenida por la detección de dichas proteínas de fusión de la invención con unos anticuerpos anti-E1, anti-E2 y anti-S, muestran que están correctamente producidas, correctamente glicosiladas, y por lo tanto dispuestas según la topología transmembranaria deseada (figuras 6A a 6D).

Con el fin de restaurar la capacidad de secreción de las diferentes proteínas de fusión de la invención, se realizan unas co-transfecciones aportando en *trans* la forma salvaje de la proteína S del HBV a cada una de las proteínas de fusión de la invención (figura 7A). Diez y seis horas después de la transfección, las células co-transfectadas son trituradas y las partículas sub-virales intracelulares se purificaron por gradiente de sacarosa y después cromatografía de afinidad, como se ha descrito anteriormente (Patient, R., Hourieux, C., Sizaret, P.Y., Trassard, S., Sureau, C., y Roingeard, P., (2007) Hepatitis B Virus Subviral Envelope Particle Morphogenesis and Intracellular-Trafficking J

Viol, 81(8), 3842-51). En todos los casos, las partículas sub-virales se estudiaron por microscopio electrónico de transmisión y por transferencia Western utilizando los anticuerpos anti-S, anti-E1 o anti-E2 descritos anteriormente en el ejemplo 1.3 (figuras 7B a 7G).

5 Las imágenes de microscopía electrónica de transmisión muestran que en todos estos experimentos de co-producción de la proteína S salvaje con una de las proteínas de fusión de la invención, es posible producir una cantidad importante de partículas sub-virales, esféricas y filamentosas. Los análisis en transferencia Western muestran que estas partículas sub-virales más o menos filamentosas son ricas en proteínas de fusión de la invención.

10 La realización según el ejemplo 1 de la presente invención en sistema "Semliki" muestra que las proteínas de fusión de la invención que contienen la casi totalidad de las proteínas E1 o E2 de HCV (subsistiendo su dominio transmembranario al situado en N-terminal de la proteína S del HBV) se ensamblan en partículas sub-virales quiméricas de misma naturaleza que las partículas sub-virales utilizadas en la producción de vacunas contra la hepatitis B, facilitando así la purificación de dichas partículas sub-virales quiméricas de la invención, y potencialmente el desarrollo de una aplicación industrial de una vacuna contra el HCV, calcado sobre la de la vacuna contra el HBV.

15 La realización según el ejemplo 1 de la presente invención muestra también la producción de proteínas de fusión que comprenden las proteínas E1 y/o E2 no truncadas de HCV. Esta característica puede resultar dominante para inducir una respuesta inmunitaria neutralizante y celular óptima.

20 Sin embargo, en sistema "Semliki" las partículas sub-virales quimeras son producidas por transfección transitoria de las células. En efecto, la fuerte citotoxicidad de estos vectores no permite obtener una secreción eficaz a largo plazo de las partículas sub-virales quiméricas. Por otro lado, la purificación de dichas partículas a partir del triturado de las células cotransfectadas necesita una realización relativamente pesada, mal adaptada a una producción industrial.

25 A título no limitativo se presenta, en relación con las figuras 8 a 11, un modo de realización de obtención de partículas sub-virales de envoltura del virus de la hepatitis C a partir de líneas de tipo CHO que expresan de manera estable la proteína salvaje S del HBV así como la proteína de fusión E1-Sd o la proteína de fusión E2-Sd. La obtención de estos clones estables de CHO está hecha posible por la utilización de vectores integrativos de tipo lentiviral. Una de las ventajas de este sistema es que la producción de proteínas recombinantes, tales como las proteínas de fusión de la invención, no tiene efectos citotóxicos mayores a corto plazo tales como los encontrados con el sistema SFV.

30 Uno de los objetivos de este modo de realización es también obtener un sistema celular de producción de partículas sub-virales quimeras de la invención próximo de aquel utilizado para la fabricación industrial de la vacuna contra la hepatitis B.

40 **Ejemplo II: Obtención de partículas sub-virales de envoltura del virus de la hepatitis C en sistema lentiviral**

La utilización de vectores lentivirales ha permitido desarrollar unos clones celulares que producen de manera estable la proteína S salvaje de HBV asociada a una de las proteínas de fusión E1-Sd y/o E2-Sd.

45 II-1) Vectores plasmídicos lentivirales pLENTI

El plásmido pLENTI^{hph} de 9955 pb, que comprende el gen de selección *hph* y que codifica para una proteína de resistencia a la higromicina como marcador de selección se ha utilizado para las siguientes construcciones (Naldini, L., Blomer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F. H., Verma, I. M., y Trono, D. (1996). *In vivo* gene delivery and stable transducción of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272(5259), 263-7).

50 En un primer tiempo, la secuencia de ácido nucleico que codifica para la proteína S salvaje se libera de pSFV1-S descrito anteriormente (Patient, R., Hourieux, C., Sizaret, P.Y., Trassard, S., Sureau, C., y Roingeard, P., (2007) Hepatitis B Virus Subviral Envelope Particle Morphogenesis and Intracellular Trafficking *J Virol*, 81(8), 3842-51) por restricción con la enzima *Bam*HI (Biolabs), después purificado sobre gel de agarosa al 1% con la ayuda del sistema "Wizard SV Gel y PCR Clean-Up System" (Promega) según las recomendaciones del fabricante. Este fragmento purificado se ha clonado después a nivel del sitio *Bam*HI comprendido en el sitio de clonación múltiple del plásmido pLENTI^{hph} con la ayuda de una T4-ADN-ligasa (Biolabs) según las recomendaciones del fabricante. Finalmente, el plásmido pLENTI^{hph}-S se ha amplificado por transformación bacteriana y después se ha purificado por maxipreparación de ADN con la ayuda del sistema "Nucleobond PC 500 Kit" (Qiagen) según las recomendaciones del fabricante. La orientación del inserto se ha verificado por restricción enzimática.

60 De la misma manera, las diferentes moléculas de ácidos nucleicos híbridas de la invención de ADNc que codifican para las proteínas de fusión de la invención (en particular E1-Sd y E2-Sd) son clonadas a nivel del sitio *Bam*HI del plásmido pLENTI^{gfp}. Los plásmidos así obtenidos (en particular pLENTI^{gfp}- E1-Sd y E2-Sd) son después amplificados, purificados y secuenciados (véase II-1).

II-2) Producción de lentivirus recombinantes.

Veinte y cuatro horas antes de la transfección de los plásmidos lentivirales, se han inoculado las células HEK 293T, a razón de $3 \cdot 10^6$ células por frasco de 75 cm² (Falcon) en medio DMEM-glutamax (Invitrogen) suplementado por el 10% de suero fetal de ternera descomplementado (ATGC), 100 UI/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina. Estas células se cultivaron bajo el 5% de CO₂ y el medio de cultivo se cambió 4 horas antes de la transfección. Un pmol de cada plásmido p8.74, pVSV-G y pLENTI (pLENTI^{hph}-S, pLENTI^{gfp}-E1-Sd, E2-Sd) se ha transfectado simultáneamente en las células HEK 293T con la ayuda del sistema "Calcium Fosfato Transfección Kit" (Invitrogen) según las recomendaciones del fabricante. El medio de cultivo se cambia 24 horas después de la transfección y recolectan 48 horas y 72 horas después de la transfección. Los medios recogidos son filtrados a 0,45 µm y después concentrados por ultracentrifugación sobre cojín de sacarosa al 20% a 4°C durante 90 minutos a 100.000 g. El residuo que contiene los lentivirus recombinantes se recoge en 500 µl de tampón fosfato (PBS) y conservado a -80 °C. Unos lotes de vectores lentivirales recombinantes de la invención son generados, de los cuales en particular los vectores lentivirales LVh^{hph}-S, LV^{gfp}-E1-Sd, LV^{gfp}-E2-Sd. La titración de las unidades lentivirales de transducción (TU) de cada lote se determina a partir de la determinación de la proteína p24 y con la ayuda del sistema "Innotest HIV Kit" (Innogenetics) según las recomendaciones del fabricante.

II-3) Cultivo celular y transducción.

La línea utilizada para la producción estable y constitutiva de las partículas sub-virales quiméricas HCV-HBV es una línea de ovario de hámster chino denominada CHO. Esta línea ya se ha validado perfectamente para la producción de proteínas recombinantes de interés médico, y en particular para la vacuna contra la hepatitis B "GenHevac B Pasteur®" (Sanofi Pasteur MSD). Estas células CHO son cultivadas bajo un 5% de CO₂ en medio DMEM-F12 (Invitrogen) suplementado por un 10% de suero fetal de ternera descomplementado (ATGC), 100 UI/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina. Veinte y cuatro horas antes de la transducción, las células CHO son inoculadas en una placa de 6 pocillos (Falcon) a razón de 105 células por pocillo. Después, son transducidas en un medio nuevo con una multiplicidad de infección de 2,5 (es decir una relación de unidades de transducción (TU) por célula de 2,5) en presencia de 4 µg/ml de polibreno (Sigma-Aldrich) y después cultivadas durante 24 horas. Al día siguiente, se retira el medio de transducción, las células obtenidas según la realización de la presente invención son aclaradas en tampón PBS y después mantenidas normalmente en cultivo durante otros 2 días.

II-3.1) Generación de un clon CHO estable productor de la proteína S salvaje.

La línea CHO utilizada está transducida con el lentivirus LV^{hph}-S según el protocolo descrito anteriormente, y esquematizado en la figura 8. La eficacia de transducción se verifica por inmunofluorescencia con la ayuda de un anticuerpo dirigido contra la proteína S salvaje según un protocolo descrito anteriormente (Patient, R., Hourieux, C., Sizaret, P.Y., Trassard, S., Sureau, C., y Roingeard, P., (2007) Hepatitis B Virus Subviral Envelope Particle Morphogenesis and Intracellular Trafficking J Virol, 81(8), 3842-51). Tres días después de la transducción, las células son tripsinadas, re-inoculadas en una caja de cultivo de 10 cm de diámetro (Falcon) en presencia de 1 mg/ml de higromicina (Euromedex) y mantenida en cultivo durante tres semanas. Los clones celulares que aparecen son recuperados por cilindro de clonación (Invitrogen) y después amplificados en placa de 24 pocillos (Falcon). El clon CHO utilizado se selecciona después de la cuantificación en el sobrenadante de cultivo de la proteína S salvaje por ELISA (Patient, R., Hourieux, C., Sizaret, P.Y., Trassard, S., Sureau, C., y Roingeard, P., (2007) Hepatitis B Virus Subviral Envelope Particle Morphogenesis and Intracellular Trafficking J Virol, 81(8), 3842-51). Este clon celular se ha denominado CHO-S.

II-3.2) Generación de clones CHO estables productores de la proteína S salvaje del virus HBV y de las proteínas de fusión de la invención E1-Sd y E2-Sd.

El clon celular CHO-S está después sobre-transducido con el lentivirus recombinante LV^{gfp} que codifica para la proteína GFP como marcador de selección, y que comprende una molécula de ácidos nucleicos híbrida de la invención, en particular el vector lentivirus LV^{gfp}-PIT1-E1-Sd o LV^{gfp}-PIT2-E2-Sd según el protocolo descrito anteriormente en el párrafo II-3.1. (figura 8). De por la presencia de la proteína GFP, la eficacia de transducción se verifica con la ayuda de un citómetro de flujo FACScalibur (Becton-Dickinson). Tres días después de la transducción, las células son tripsinadas, re-inoculadas en dilución límite en una placa de 96 pocillos (Falcon) a razón de 1 célula por pocillo y se mantienen en cultivo durante tres semanas. Los clones celulares emergentes GFP+ son recuperados y después amplificados en gran cantidad. Los clones celulares así obtenidos son denominados en particular CHO-E1-Sd o CHO-E2-Sd.

II-4) Análisis de la producción intracelular de las proteínas de envoltura salvaje y quiméricas del HBV y del HCV.

Los procedimientos de análisis bioquímicos por inmunofluorescencia y por transferencia Western de las proteínas de interés S, E1-Sd o E2-Sd de cada clon celular se han descrito ya anteriormente para el ejemplo I en el párrafo I-4.

II-5) Purificación y análisis de las partículas sub-virales quiméricas procedentes del sobrenadante de cultivo.

Aproximadamente 200 ml de sobrenadante de cultivo para cada clon seleccionado se clarifica por centrifugación a 4°C durante 10 minutos a 1500 g. Las proteínas son precipitadas por adición de una solución de (NH₄)₂SO₄ (pH 7,5; 45% final) y después centrifugación a 4°C durante 15 minutos a 10.000 g. El residuo se recoge en un volumen mínimo de tampón TNE (10 mM Tris/HCl pH 7,5 / 100 mM NaCl / 1 mM EDTA). Después de una serie de diálisis en tampón TNE, se añade CsCl hasta obtener una densidad de aproximadamente 1,22 g/cm³ y después se realizan dos ultracentrifugaciones isopícnicas sucesivas a 15 °C durante 48 horas a 40.000 rpm con la ayuda de un rotor 45Ti (L70 Ultracentrifuge, Beckman). Se recogen unas fracciones a partir del vértice del gradiente y la proteína S salvaje se cuantifica por ELISA (Patient, R. Hourieux, C., Sizaret, P.Y., Trassard, S., Sureau, C., y Roingeard, P., (2007) Hepatitis B Virus Subviral Envelope Particle Morphogenesis and Intracellular Trafficking J Virol, 81(8), 3842-51). Las fracciones positivas se han mezclado y dializado a 4 °C en tampón TNE.

Las preparaciones purificadas se analizaron por transferencia Western y por microscopio electrónico de transmisión como se ha descrito anteriormente en el ejemplo I en el párrafo I-4.

II-6 1 Producción intracelular de la proteína S y de las proteínas de fusión.

Tras su expansión, se analizaron los clones celulares CHO-S, CHO-E1-Sd y CHO-E2-Sd por inmunofluorescencia y después transferencia Western con la ayuda de anticuerpos dirigidos contra las proteínas Sd, E1 o E2 (véase: ejemplo I en el párrafo I-4 y la figura 9). Como se espera, el conjunto de los clones permite una producción intensa de la proteína S salvaje del HBV bajo dos de sus estados de glicosilación (p24 y gp27). Asimismo, los clones CHO-E1-Sd y CHO-E2-Sd permiten una producción intensa y citoplásmica de las proteínas de fusión de la invención de tamaños esperados. Estos resultados muestran por lo tanto que todas las proteínas de fusión de la invención están correctamente producidas en la línea CHO.

II-7) Purificación de las partículas

Se realiza un primer ensayo de purificación a partir de 200 ml de sobrenadante de cultivo del clon CHO-S, CHO-E1-Sd o CHO-E2-Sd. Estos sobrenadantes, de los cuales la concentración en proteína S salvaje se evalúa por ELISA a aproximadamente 100 ng/ml para los tres clones, son ultracentrifugados sobre un gradiente isopícnico de CsCl. Las fracciones de cada gradiente formado se analizan después por una cuantificación de la proteína S salvaje (figura 10). Para los tres tipos de partículas sub-virales quiméricas purificadas (S, E1-Sd y E2-Sd), el pico de concentración de proteína S salvaje se ha podido observar en la fracción n° 9, que corresponde a una densidad comprendida entre 1,17 y 1,18. Las fracciones n° 8, 9 y 10 de cada preparación son entonces reunidas para ser dializadas y después analizadas por transferencia Western con la ayuda de anticuerpos dirigidos contra las proteínas S salvaje, E1 o E2 (véase: ejemplo I en el párrafo I-4 y (figura 11A) y por microscopio electrónico de transmisión en coloración negativa (figuras 11B a 11D).

Se realiza un depósito que corresponde a un µg de proteína S salvaje para cada purificación para el análisis en gel de acrilamida. Esto permite mostrar que las proteínas de fusión de la invención E1-Sd y E2-Sd están detectadas en el tamaño esperado y en cantidad respetable en su preparación respectiva por los anticuerpos anti-E1 o anti-E2. Asimismo, las dos formas de glicosilación esperadas de la proteína S salvaje están detectadas en cada preparación. El análisis por coloración negativa en microscopio electrónico de transmisión ha permitido confirmar la presencia de partículas sub-virales de envoltura esféricas de aproximadamente 20 nm de diámetro en las tres preparaciones estudiadas.

Ejemplo III: Obtención de partículas sub-virales de envoltura que comprenden las dos proteínas de fusión E1-Sd y E2-Sd.

Un nuevo plásmido pLENTI^{gluc} que comprende el gen de selección *gluc* de *Gaussia princeps*, en lugar y sitio del gen *gfp*, se realiza y codifica para una luciferasa (GLuc) segregada como marcador de selección. El fragmento de ADNc que codifica para la proteína de fusión E1-Sd se clona a nivel del sitio *Bam*HI del plásmido pLENTI^{gluc}. El plásmido pLENTI^{gluc}-E1-Sd así obtenido se amplifica, purifica y secuencía (véase II-1).

III.1. Producción de lentivirus recombinantes.

Veinte y cuatro horas antes de la transfección de los plásmidos lentivirales, se han inoculado las células HEK 293T a razón de 3.10⁶ células por frasco de 75 cm² (Falcon) en medio DMEM-glutamax (Invitrogen) suplementado por 10% de suero fetal de ternera descomplementado, (ATGC), 100 UI/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin. Estas células se cultivan bajo un 5% de CO₂ y el medio de cultivo se cambia 4 horas antes de la transfección. Un pmol de cada plásmido p8.74, pVSV-G y pLENTI^{gluc}-E1-Sd se transfecta simultáneamente en las células HEK 293T con la ayuda del sistema "Calcium Fosfato Transfección Kit" (Invitrogen) según las recomendaciones del fabricante. El medio de cultivo se cambia 24 horas después de la transfección y se recoge 48 horas y 72 horas después de la transfección. Los medios recogidos son filtrados a 0,45 µm y después concentrados por ultracentrifugación sobre cojín de sacarosa 20% a 4°C durante 90 minutos a 100.000 g. El residuo que contiene los lentivirus recombinantes se recoge en 500 µl de tampón fosfato (PBS) y se conserva a -80°C. Se genera así un nuevo lote de lentivirus

recombinantes: LV^{gluc}-E1-Sd. La titración de las unidades lentivirales de transducción (TU) de este lote se determina a partir de la determinación de la proteína p24 y con la ayuda del sistema "Innotest HIV Kit" (Innogenetics) según las recomendaciones del fabricante.

5 III.2. Generación de un clon CHO estable productor de la proteína S salvaje del virus HBV, de las proteína de fusión de la invención E2-Sd y E1-Sd.

10 El cultivo de las células CHO y el método de transducción expuesto y utilizado para el ejemplo II se adapta a este ejemplo. Después de una primera transducción con el lentivirus LV^{hph}-S, que permite la obtención del clon celular CHO-S, se efectúa una segunda transducción con el lentivirus LV^{gfp}-E2-Sd según el protocolo descrito para el ejemplo II, que permite la obtención del clon celular CHO-E2-Sd.

15 Este último se traduce de nuevo con el lentivirus LV^{gluc}-E1-Sd según el protocolo descrito anteriormente. Tres días después de la transducción, las células son tripsinadas y re-inoculadas en dilución límite en una placa de 96 pocillos (Falcon) a razón de 1 célula por pocillo. Las células son mantenidas en cultivo durante tres semanas al final de las cuales se recoge el sobrenadante de los clones celulares emergentes. En estos sobrenadantes, la presencia de la luciferasa es detectada mediante la medición de su actividad enzimática enzymatique con la ayuda del sistema "Gaussia Luciferase Assay Kit" (Biolabs) según las recomendaciones del fabricante. La medición de la luz emitida por la reacción enzimática se realiza con la ayuda de un luminómetro Centro LB 960 (Berthold Technologies). Los clones celulares que corresponden a los sobrenadantes GLuc+ son recuperados y después amplificados en gran cantidad. El clon así obtenido se denomina CHO-S/E2-Sd/E1-Sd.

Ejemplo IV: Análisis *in vivo* de la actividad inmunológica de las partículas sub-virales quiméricas

25 Se purifican 5 a 10 miligramos de partículas sub-virales quiméricas para cada tipo de partícula (S+E1-Sd, S+E2-Sd, S sola del HBV) a partir del sobrenadante de cultivo celular según el método descrito anteriormente.

Se utilizan cuatro grupos de ratones y de conejos para una serie de inmunización.

30 La inmunización se efectúa mediante tres inyecciones 10 microgramos del inmunógeno según el método clásico.

El primer grupo se inmuniza mediante las partículas S+E1-Sd.

35 El segundo grupo se inmuniza mediante las partículas S+E2-Sd.

El tercer grupo se inmuniza mediante la partícula HBV S sola.

40 El cuarto grupo se inmuniza mediante la mezcla de partículas sub-virales quiméricas S+E1-Sd y de partículas sub-virales quiméricas S+E2-Sd.

La respuesta humoral global producida en estos animales se detecta mediante el análisis ELISA y transferencia Westerns. Para los anticuerpos anti-S, unos ELISA comerciales (Abbott, Roche) permiten determinar el número de unidades internacionales (UI) de anticuerpo anti-S, que son conocidos por tener unas propiedades neutralizantes contra el VHB. Una concentración por lo menos igual a 10 UI está considerada como protectora contra el VHB (Jilg W, *et al.* Hepatitis B-vaccination: Strategy for booster doses in high risk population groups. Progress in Hepatitis B Immunization. Eds. P. Coursaget *et al.* Colloque Inserm. 1990; 190: 419-427). Para los anticuerpos anti-E1 y anti-E2, se utiliza la transferencia Western para evaluar si una respuesta anticuerpo anti-E1 y anti-E2 está generada. Si es el caso, este análisis está completado de un análisis de la presencia de anticuerpos anti-E1 y anti-E2 que neutralizan el virus. El análisis de la neutralización de HCV por estos anticuerpos se realiza en el sistema JFH-1 (Wakita *et al.*, Nat Med 2005) que permite propagar una cepa de HCV de genotipo 2 *in vitro*, o por la utilización de las cepas virales quiméricas que comprenden las proteínas estructurales del HCV de genotipo 1 o 3.

Listado de secuencias

55 <110> UNIVERSITE FRANCOIS RABELAIS DE TOURS Roingeard, Philippe Hourieux, Christophe Patient, Romuald

<120> NUEVAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN Y SU APLICACIÓN COMO VACUNAS CONTRA LA HEPATITIS C

60 <130> IFB 08 TOU VACC

<160> 16

<170> PatentIn versión 3.5

65 <210> 1

<211> 612

ES 2 585 735 T3

<212> ADN
 <213> Virus de la hepatitis B

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(612)
 <400> 1

5

```

aca aga atc ctc aca ata ccg cag agt cta gac tcg tgg tgg act tct      48
Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu Asp Ser Trp Trp Thr Ser
1          5          10          15

ctc aat ttt cta ggg gga tct ccc gtg tgt ctt ggc caa aat tcg cag      96
Leu Asn Phe Leu Gly Gly Ser Pro Val Cys Leu Gly Gln Asn Ser Gln
          20          25          30

tcc cca acc tcc aat cac tca cca acc tcc tgt cct cca att tgt cct      144
Ser Pro Thr Ser Asn His Ser Pro Thr Ser Cys Pro Pro Ile Cys Pro
          35          40          45

ggg tat cgc tgg atg tgt ctg cgg cgt ttt atc ata ttc ctc ttc atc      192
Gly Tyr Arg Trp Met Cys Leu Arg Arg Phe Ile Ile Phe Leu Phe Ile
          50          55          60

ctg ctg cta tgc ctc atc ttc tta ttg gtt ctt ctg gat tat caa ggt      240
Leu Leu Leu Cys Leu Ile Phe Leu Leu Val Leu Leu Asp Tyr Gln Gly
65          70          75          80

atg ttg ccc gtt tgt cct cta att cca gga tca aca aca acc agt acg      288
Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Thr Thr Thr Ser Thr
          85          90          95

gga cca tgc aaa acc tgc acg act cct gct caa ggc aac tct atg ttt      336
Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Asn Ser Met Phe
          100          105          110

ccc tca tgt tgc tgt aca aaa cct acg gat gga aat tgc acc tgt att      384
Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Thr Asp Gly Asn Cys Thr Cys Ile
          115          120          125

ccc atc cca tcg tcc tgg gct ttc gca aaa tac cta tgg gag tgg gcc      432
Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Ala Lys Tyr Leu Trp Glu Trp Ala
          130          135          140

tca gtc cgt ttc tct tgg ctc agt tta cta gtg cca ttt gtt cag tgg      480
Ser Val Arg Phe Ser Trp Leu Ser Leu Leu Val Pro Phe Val Gln Trp
145          150          155          160

ttc gta ggg ctt tcc ccc act gtt tgg ctt tca gct ata tgg atg atg      528
Phe Val Gly Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu Ser Ala Ile Trp Met Met
          165          170          175

tgg tat tgg ggg cca agt ctg tac agc atc gtg agt ccc ttt ata ccg      576
Trp Tyr Trp Gly Pro Ser Leu Tyr Ser Ile Val Ser Pro Phe Ile Pro
          180          185          190

ctg tta cca att ttc ttt tgt ctc tgg gta tac att      612
Leu Leu Pro Ile Phe Phe Cys Leu Trp Val Tyr Ile
          195          200
    
```

10

<210> 2
 <211> 204
 <212> PRT
 <213> Virus de la hepatitis B

15

<400> 2

ES 2 585 735 T3

Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu Asp Ser Trp Trp Thr Ser
1 5 10 15

Leu Asn Phe Leu Gly Gly Ser Pro Val Cys Leu Gly Gln Asn Ser Gln
20 25 30

Ser Pro Thr Ser Asn His Ser Pro Thr Ser Cys Pro Pro Ile Cys Pro
35 40 45

Gly Tyr Arg Trp Met Cys Leu Arg Arg Phe Ile Ile Phe Leu Phe Ile
50 55 60

Leu Leu Leu Cys Leu Ile Phe Leu Leu Val Leu Leu Asp Tyr Gln Gly
65 70 75 80

Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Thr Thr Thr Ser Thr
85 90 95

Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Asn Ser Met Phe
100 105 110

Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Thr Asp Gly Asn Cys Thr Cys Ile
115 120 125

Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Ala Lys Tyr Leu Trp Glu Trp Ala
130 135 140

Ser Val Arg Phe Ser Trp Leu Ser Leu Leu Val Pro Phe Val Gln Trp
145 150 155 160

Phe Val Gly Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu Ser Ala Ile Trp Met Met
165 170 175

Trp Tyr Trp Gly Pro Ser Leu Tyr Ser Ile Val Ser Pro Phe Ile Pro
180 185 190

Leu Leu Pro Ile Phe Phe Cys Leu Trp Val Tyr Ile
195 200

- <210> 3
- 5 <211> 576
- <212> ADN
- <213> Virus de la hepatitis C
- <220>
- 10 <221> CDS
- <222> (1)..(576)
- <400> 3

ES 2 585 735 T3

tac caa gta cgc aac tcc tcg ggc ctt tac cat gtc acc aat gat tgc Tyr Gln Val Arg Asn Ser Ser Gly Leu Tyr His Val Thr Asn Asp Cys 1 5 10 15	48
cct aac tcg agt att gtg tac gag acg gcc gat acc atc cta cac tct Pro Asn Ser Ser Ile Val Tyr Glu Thr Ala Asp Thr Ile Leu His Ser 20 25 30	96
ccg ggg tgt gtc cct tgc gtt cgc gag ggc aat gcc tca aaa tgt tgg Pro Gly Cys Val Pro Cys Val Arg Glu Gly Asn Ala Ser Lys Cys Trp 35 40 45	144
gtg gcg gtg gcc cct aca gtc gcc acc aga gac gcc aag ctc ccc aca Val Ala Val Ala Pro Thr Val Ala Thr Arg Asp Gly Lys Leu Pro Thr 50 55 60	192
acg cag ctt cga cgt cac atc gat ctg ctc gtc agg agc gcc acc ctc Thr Gln Leu Arg Arg His Ile Asp Leu Leu Cys Gly Ser Ala Thr Leu 65 70 75 80	240
tgc tcg gcc ctc tat gtg ggg gac ttg tgc ggg tcc gtc ttc ctc gtc Cys Ser Ala Leu Tyr Val Gly Asp Leu Cys Gly Ser Val Phe Leu Val 85 90 95	288
ggc caa ctg ttc acc ttc tcc ccc agg cgc cac tgg aca acg caa gac Gly Gln Leu Phe Thr Ser Pro Arg Arg His Trp Thr Thr Gln Asp 100 105 110	336
tgc aac tgt tcc atg tac ccc gcc cat ata acg ggt cac cgt atg gca Cys Asn Cys Ser Met Tyr Pro Gly His Ile Thr Gly His Arg Met Ala 115 120 125	384
tgg gac atg atg atg aac tgg tcc cct acg aca gcg ctg gta gta gct Trp Asp Met Met Met Asn Trp Ser Pro Thr Thr Ala Leu Val Val Ala 130 135 140	432
cag ctg ctc agg gtc ccg caa gcc atc ttg gac atg atc gct ggt gcc Gln Leu Leu Arg Val Pro Gln Ala Ile Leu Asp Met Ile Ala Gly Ala 145 150 155 160	480
cac tgg gga gtc cta gcg gcc ata gcg tat ttc tcc atg gtg ggg aac His Trp Gly Val Leu Ala Gly Ile Ala Tyr Phe Ser Met Val Gly Asn 165 170 175	528
tgg gcg aag gtc ctg gtg gtg ctg ttg ctg ttc gcc agc gtc gat gcg Trp Ala Lys Val Leu Val Val Leu Leu Leu Phe Ala Ser Val Asp Ala 180 185 190	576

<210> 4

5 <211> 192

<212> PRT

<213> Virus de la hepatitis C

<400> 4

10

ES 2 585 735 T3

Tyr Gln Val Arg Asn Ser Ser Gly Leu Tyr His Val Thr Asn Asp Cys
 1 5 10 15

Pro Asn Ser Ser Ile Val Tyr Glu Thr Ala Asp Thr Ile Leu His Ser
 20 25 30

Pro Gly Cys Val Pro Cys Val Arg Glu Gly Asn Ala Ser Lys Cys Trp
 35 40 45

Val Ala Val Ala Pro Thr Val Ala Thr Arg Asp Gly Lys Leu Pro Thr
 50 55 60

Thr Gln Leu Arg Arg His Ile Asp Leu Leu Val Arg Ser Ala Thr Leu
 65 70 75 80

Cys Ser Ala Leu Tyr Val Gly Asp Leu Cys Gly Ser Val Phe Leu Val
 85 90 95

Gly Gln Leu Phe Thr Phe Ser Pro Arg Arg His Trp Thr Thr Gln Asp
 100 105 110

Cys Asn Cys Ser Met Tyr Pro Gly His Ile Thr Gly His Arg Met Ala
 115 120 125

Trp Asp Met Met Met Asn Trp Ser Pro Thr Thr Ala Leu Val Val Ala
 130 135 140

Gln Leu Leu Arg Val Pro Gln Ala Ile Leu Asp Met Ile Ala Gly Ala
 145 150 155 160

His Trp Gly Val Leu Ala Gly Ile Ala Tyr Phe Ser Met Val Gly Asn
 165 170 175

Trp Ala Lys Val Leu Val Val Leu Leu Leu Phe Ala Ser Val Asp Ala
 180 185 190

- 5 <210> 5
- <211> 1089
- <212> ADN
- <213> Virus de la hepatitis C

- 10 <220>
- <221> CDS
- <222> (1)..(1089)

<400> 5

ES 2 585 735 T3

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

ES 2 585 735 T3

cca ccg ttg ggc aat tgg ttc ggt tgc acc tgg atg aac tca tct gga 528
 Pro Pro Leu Gly Asn Trp Phe Gly Cys Thr Trp Met Asn Ser Ser Gly
 165 170 175

ttc acc aaa gtg tgc gga ggc cct ccc tgt gcc atc gga gga gtg ggc 576
 Phe Thr Lys Val Cys Gly Ala Pro Pro Cys Ala Ile Gly Gly Val Gly
 180 185 190

aat aac acc ttg cgc tgt ccc act gac tgt ttc cgc aag cat ccg gaa 624
 Asn Asn Thr Leu Arg Cys Pro Thr Asp Cys Phe Arg Lys His Pro Glu
 195 200 205

gct aca tac tct cga tgt ggc tcc ggt ccc tgg atc acg ccc agg tgc 672
 Ala Thr Tyr Ser Arg Cys Gly Ser Gly Pro Trp Ile Thr Pro Arg Cys
 210 215 220

ctg gtc gac tat cct tat agg ctc tgg cat tat cct tgc act gtc aac 720
 Leu Val Asp Tyr Pro Tyr Arg Leu Trp His Tyr Pro Cys Thr Val Asn
 225 230 235 240

tac acc ctg ttt aaa atc agg atg tac gtg gga ggg gtc gag cac agg 768
 Tyr Thr Leu Phe Lys Ile Arg Met Tyr Val Gly Gly Val Glu His Arg
 245 250 255

cta caa gct gct tgc aac tgg acg cgg ggc gag cgt tgt gat ctg gac 816
 Leu Gln Ala Ala Cys Asn Trp Thr Arg Gly Glu Arg Cys Asp Leu Asp
 260 265 270

gac agg gac agg tcc gag ctc agc ccg ctg ctg ctg tcc acc acg cag 864
 Asp Arg Asp Arg Ser Glu Leu Ser Pro Leu Leu Leu Ser Thr Thr Gln
 275 280 285

tgg cag gtc ctt ccg tgt tct ttc acg acc ttg cca gcc ttg acc acc 912
 Trp Gln Val Leu Pro Cys Ser Phe Thr Thr Leu Pro Ala Leu Thr Thr
 290 295 300

ggc ctc atc cac ctc cat cag aac atc gtg gac gtg caa tat ttg tac 960
 Gly Leu Ile His Leu His Gln Asn Ile Val Asp Val Gln Tyr Leu Tyr
 305 310 315 320

ggg gtg ggg tca agc att gtg tcc tgg gcc atc aag tgg gag tac gtc 1008
 Gly Val Gly Ser Ser Ile Val Ser Trp Ala Ile Lys Trp Glu Tyr Val
 325 330 335

att ctc ttg ttt ctc ctg ctt gca gac gcg cgc atc tgc tcc tgc ttg 1056
 Ile Leu Leu Phe Leu Leu Leu Ala Asp Ala Arg Ile Cys Ser Cys Leu
 340 345 350

tgg atg atg cta ctc ata tcc caa gcg gag gcg 1089
 Trp Met Met Leu Leu Ile Ser Gln Ala Glu Ala
 355 360

<210> 6
 <211> 363
 5 <212> PRT
 <213> Virus de la hepatitis C

<400> 6

Glu Thr Tyr Thr Thr Gly Gly Ser Ile Ala Lys Thr Val Gln Gly Phe

10

ES 2 585 735 T3

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

ES 2 585 735 T3

Leu Gln Ala Ala Cys Asn Trp Thr Arg Gly Glu Arg Cys Asp Leu Asp
 260 265 270

Asp Arg Asp Arg Ser Glu Leu Ser Pro Leu Leu Leu Ser Thr Thr Gln
 275 280 285

Trp Gln Val Leu Pro Cys Ser Phe Thr Thr Leu Pro Ala Leu Thr Thr
 290 295 300

Gly Leu Ile His Leu His Gln Asn Ile Val Asp Val Gln Tyr Leu Tyr
 305 310 315 320

Gly Val Gly Ser Ser Ile Val Ser Trp Ala Ile Lys Trp Glu Tyr Val
 325 330 335

Ile Leu Leu Phe Leu Leu Leu Ala Asp Ala Arg Ile Cys Ser Cys Leu
 340 345 350

Trp Met Met Leu Leu Ile Ser Gln Ala Glu Ala
 355 360

<210> 7

<211> 1182

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> derivada de HCV y HBV

10

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1182)

15 <400> 7

tac caa gta cgc aac tcc tcg ggc ctt tac cat gtc acc aat gat tgc 48
 Tyr Gln Val Arg Asn Ser Ser Gly Leu Tyr His Val Thr Asn Asp Cys
 1 5 10 15

cct aac tcg agt att gtg tac gag acg gcc gat acc atc cta cac tct 96
 Pro Asn Ser Ser Ile Val Tyr Glu Thr Ala Asp Thr Ile Leu His Ser
 20 25 30

ccg ggg tgt gtc cct tgc gtt cgc gag ggc aat gcc tca aaa tgt tgg 144
 Pro Gly Cys Val Pro Cys Val Arg Glu Gly Asn Ala Ser Lys Cys Trp
 35 40 45

gtg gcg gtg gcc cct aca gtc gcc acc aga gac ggc aag ctc ccc aca 192
 Val Ala Val Ala Pro Thr Val Ala Thr Arg Asp Gly Lys Leu Pro Thr
 50 55 60

acg cag ctt cga cgt cac atc gat ctg ctc gtc agg agc gcc acc ctc 240

ES 2 585 735 T3

Thr Gln Leu Arg Arg His Ile Asp Leu Leu Val Arg Ser Ala Thr Leu	
65	70 75 80
.tgc tgc gcc ctc tat gtg ggg gac ttg tgc ggg tcc gtc ttc ctc gtc	288
Cys Ser Ala Leu Tyr Val Gly Asp Leu Cys Gly Ser Val Phe Leu Val	
	85 90 95
ggt caa ctg ttc acc ttc tcc ccc agg cgc cac tgg aca acg caa gac	336
Gly Gln Leu Phe Thr Phe Ser Pro Arg Arg His Trp Thr Thr Gln Asp	
	100 105 110
tgc aac tgt tcc atg tac ccc ggc cat ata acg ggt cac cgt atg gca	384
Cys Asn Cys Ser Met Tyr Pro Gly His Ile Thr Gly His Arg Met Ala	
	115 120 125
tgg gac atg atg atg aac tgg tcc cct acg aca gcg ctg gta gta gct	432
Trp Asp Met Met Met Asn Trp Ser Pro Thr Thr Ala Leu Val Val Ala	
	130 135 140
cag ctg ctc agg gtc ccg caa gcc atc ttg gac atg atc gct ggt gcc	480
Gln Leu Leu Arg Val Pro Gln Ala Ile Leu Asp Met Ile Ala Gly Ala	
	145 150 155 160
cac tgg gga gtc cta gcg ggc ata gcg tat ttc tcc atg gtg ggg aac	528
His Trp Gly Val Leu Ala Gly Ile Ala Tyr Phe Ser Met Val Gly Asn	
	165 170 175
tgg gcg aag gtc ctg gtg gtg ctg ttg ctg ttc gcc agc aca aga atc	576
Trp Ala Lys Val Leu Val Val Leu Leu Leu Phe Ala Ser Thr Arg Ile	
	180 185 190
ctc aca ata ccg cag agt cta gac tgc tgg tgg act tct ctc aat ttt	624
Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe	
	195 200 205
cta ggg gga tct ccc gtg tgt ctt ggc caa aat tgc cag tcc cca acc	672
Leu Gly Gly Ser Pro Val Cys Leu Gly Gln Asn Ser Gln Ser Pro Thr	
	210 215 220
tcc aat cac tca cca acc tcc tgt cct cca att tgt cct ggt tat cgc	720
Ser Asn His Ser Pro Thr Ser Cys Pro Pro Ile Cys Pro Gly Tyr Arg	
	225 230 235 240
tgg atg tgt ctg cgg cgt ttt atc ata ttc ctc ttc atc ctg ctg cta	768
Trp Met Cys Leu Arg Arg Phe Ile Ile Phe Leu Phe Ile Leu Leu Leu	
	245 250 255
tgc ctc atc ttc tta ttg gtt ctt ctg gat tat caa ggt atg ttg ccc	816
Cys Leu Ile Phe Leu Leu Val Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Met Leu Pro	
	260 265 270
gtt tgt cct cta att cca gga tca aca aca acc agt acg gga cca tgc	864
Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Thr Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys	
	275 280 285
aaa acc tgc acg act cct gct caa ggc aac tct atg ttt ccc tca tgt	912
Lys Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Asn Ser Met Phe Pro Ser Cys	
	290 295 300
tgc tgt aca aaa cct acg gat gga aat tgc acc tgt att ccc atc cca	960
Cys Cys Thr Lys Pro Thr Asp Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro	

ES 2 585 735 T3

305	310	315	320	
tcg tcc tgg gct ttc gca aaa tac cta tgg gag tgg gcc tca gtc cgt				1008
Ser Ser Trp Ala Phe Ala Lys Tyr Leu Trp Glu Trp Ala Ser Val Arg	325	330	335	
ttc tct tgg ctc agt tta cta gtg cca ttt gtt cag tgg ttc gta ggg				1056
Phe Ser Trp Leu Ser Leu Leu Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Val Gly	340	345	350	
ctt tcc ccc act gtt tgg ctt tca gct ata tgg atg atg tgg tat tgg				1104
Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu Ser Ala Ile Trp Met Met Trp Tyr Trp	355	360	365	
ggg cca agt ctg tac agc atc gtg agt ccc ttt ata ccg ctg tta cca				1152
Gly Pro Ser Leu Tyr Ser Ile Val Ser Pro Phe Ile Pro Leu Leu Pro	370	375	380	
att ttc ttt tgt ctc tgg gta tac att taa				1182
Ile Phe Phe Cys Leu Trp Val Tyr Ile	385	390		

<210> 8

<211> 393

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<400> 8

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

ES 2 585 735 T3

Cys Asn Cys Ser Met Tyr Pro Gly His Ile Thr Gly His Arg Met Ala
 115 120 125

Trp Asp Met Met Met Asn Trp Ser Pro Thr Thr Ala Leu Val Val Ala
 130 135 140

Gln Leu Leu Arg Val Pro Gln Ala Ile Leu Asp Met Ile Ala Gly Ala
 145 150 155 160

His Trp Gly Val Leu Ala Gly Ile Ala Tyr Phe Ser Met Val Gly Asn
 165 170 175

Trp Ala Lys Val Leu Val Val Leu Leu Leu Phe Ala Ser Thr Arg Ile
 180 185 190

Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe
 195 200 205

Leu Gly Gly Ser Pro Val Cys Leu Gly Gln Asn Ser Gln Ser Pro Thr
 210 215 220

Ser Asn His Ser Pro Thr Ser Cys Pro Pro Ile Cys Pro Gly Tyr Arg
 225 230 235 240

Trp Met Cys Leu Arg Arg Phe Ile Ile Phe Leu Phe Ile Leu Leu Leu
 245 250 255

Cys Leu Ile Phe Leu Leu Val Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Met Leu Pro
 260 265 270

Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Thr Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys
 275 280 285

Lys Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Asn Ser Met Phe Pro Ser Cys
 290 295 300

Cys Cys Thr Lys Pro Thr Asp Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro
 305 310 315 320

Ser Ser Trp Ala Phe Ala Lys Tyr Leu Trp Glu Trp Ala Ser Val Arg
 325 330 335

Phe Ser Trp Leu Ser Leu Leu Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Val Gly
 340 345 350

Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu Ser Ala Ile Trp Met Met Trp Tyr Trp
 355 360 365

Gly Pro Ser Leu Tyr Ser Ile Val Ser Pro Phe Ile Pro Leu Leu Pro
 370 375 380

Ile Phe Phe Cys Leu Trp Val Tyr Ile
 385 390

- <210> 9
- 5 <211> 1695
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- 10 <223> derivada de HCV y HBV

ES 2 585 735 T3

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1695)

5 <400> 9

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

ES 2 585 735 T3

aac tgg ggt gag aat gat acg gac gtc ttc gtc ctc aat aac acc agg Asn Trp Gly Glu Asn Asp Thr Asp Val Phe Val Leu Asn Asn Thr Arg 145 150 155 160	480
cca ccg ttg ggc aat tgg ttc ggt tgc acc tgg atg aac tca tct gga Pro Pro Leu Gly Asn Trp Phe Gly Cys Thr Trp Met Asn Ser Ser Gly 165 170 175	528
ttc acc aaa gtg tgc gga gcg cct ccc tgt gcc atc gga gga gtg ggc Phe Thr Lys Val Cys Gly Ala Pro Pro Cys Ala Ile Gly Gly Val Gly 180 185 190	576
aat aac acc ttg cgc tgt ccc act gac tgt ttc cgc aag cat ccg gaa Asn Asn Thr Leu Arg Cys Pro Thr Asp Cys Phe Arg Lys His Pro Glu 195 200 205	624
gct aca tac tct cga tgt ggc tcc ggt ccc tgg atc acg ccc agg tgc Ala Thr Tyr Ser Arg Cys Gly Ser Gly Pro Trp Ile Thr Pro Arg Cys 210 215 220	672
ctg gtc gac tat cct tat agg ctc tgg cat tat cct tgc act gtc aac Leu Val Asp Tyr Pro Tyr Arg Leu Trp His Tyr Pro Cys Thr Val Asn 225 230 235 240	720
tac acc ctg ttt aaa atc agg atg tac gtg gga ggg gtc gag cac agg Tyr Thr Leu Phe Lys Ile Arg Met Tyr Val Gly Gly Val Glu His Arg 245 250 255	768
cta caa gct gct tgc aac tgg acg cgg ggc gag cgt tgt gat ctg gac Leu Gln Ala Ala Cys Asn Trp Thr Arg Gly Glu Arg Cys Asp Leu Asp 260 265 270	816
gac agg gac agg tcc gag ctc agc ccg ctg ctg ctg tcc acc acg cag Asp Arg Asp Arg Ser Glu Leu Ser Pro Leu Leu Leu Ser Thr Thr Gln 275 280 285	864
tgg cag gtc ctt ccg tgt tct ttc acg acc ttg cca gcc ttg acc acc Trp Gln Val Leu Pro Cys Ser Phe Thr Thr Leu Pro Ala Leu Thr Thr 290 295 300	912
ggc ctc atc cac ctc cat cag aac atc gtg gac gtg caa tat ttg tac Gly Leu Ile His Leu His Gln Asn Ile Val Asp Val Gln Tyr Leu Tyr 305 310 315 320	960
ggg gtg ggg tca agc att gtg tcc tgg gcc atc aag tgg gag tac gtc Gly Val Gly Ser Ser Ile Val Ser Trp Ala Ile Lys Trp Glu Tyr Val 325 330 335	1008
att ctc ttg ttt ctc ctg ctt gca gac gcg cgc atc tgc tcc tgc ttg Ile Leu Leu Phe Leu Leu Leu Ala Asp Ala Arg Ile Cys Ser Cys Leu 340 345 350	1056
tgg atg atg cta ctc ata tcc caa aca aga atc ctc aca ata ccg cag Trp Met Met Leu Leu Ile Ser Gln Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln 355 360 365	1104
agt cta gac tcg tgg tgg act tct ctc aat ttt cta ggg gga tct ccc Ser Leu Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly Ser Pro 370 375 380	1152
gtg tgt ctt ggc caa aat tcg cag tcc cca acc tcc aat cac tca cca	1200

ES 2 585 735 T3

Val Cys Leu Gly Gln Asn Ser Gln Ser Pro Thr Ser Asn His Ser Pro
 385 390 395 400

acc tcc tgt cct cca att tgt cct ggt tat cgc tgg atg tgt ctg cgg 1248
 Thr Ser Cys Pro Pro Ile Cys Pro Gly Tyr Arg Trp Met Cys Leu Arg
 405 410 415

cgt ttt atc ata ttc ctc ttc atc ctg ctg cta tgc ctc atc ttc tta 1296
 Arg Phe Ile Ile Phe Leu Phe Ile Leu Leu Leu Cys Leu Ile Phe Leu
 420 425 430

ttg gtt ctt ctg gat tat caa ggt atg ttg ccc gtt tgt cct cta att 1344
 Leu Val Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile
 435 440 445

cca gga tca aca aca acc agt acg gga cca tgc aaa acc tgc acg act 1392
 Pro Gly Ser Thr Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Thr
 450 455 460

cct gct caa ggc aac tct atg ttt ccc tca tgt tgc tgt aca aaa cct 1440
 Pro Ala Gln Gly Asn Ser Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro
 465 470 475 480

acg gat gga aat tgc acc tgt att ccc atc cca tgc tcc tgg gct ttc 1488
 Thr Asp Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe
 485 490 495

gca aaa tac cta tgg gag tgg gcc tca gtc cgt ttc tct tgg ctc agt 1536
 Ala Lys Tyr Leu Trp Glu Trp Ala Ser Val Arg Phe Ser Trp Leu Ser
 500 505 510

tta cta gtg cca ttt gtt cag tgg ttc gta ggg ctt tcc ccc act gtt 1584
 Leu Leu Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro Thr Val
 515 520 525

tgg ctt tca gct ata tgg atg atg tgg tat tgg ggg cca agt ctg tac 1632
 Trp Leu Val Ala Ile Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly Pro Ser Leu Tyr
 530 535 540

agc atc gtg agt ccc ttt ata ccg ctg tta cca att ttc ttt tgt ctc 1680
 Ser Ile Val Ser Pro Phe Ile Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe Cys Leu
 545 550 555 560

tgg gta tac att taa 1695
 Trp Val Tyr Ile

- <210> 10
- <211> 564
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> Construcción sintética
- <400> 10

Glu Thr Tyr Thr Thr Gly Gly Ser Ile Ala Lys Thr Val Gln Gly Phe
 1 5 10 15

ES 2 585 735 T3

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

ES 2 585 735 T3

Leu Gln Ala Ala Cys Asn Trp Thr Arg Gly Glu Arg Cys Asp Leu Asp
 260 265 270

Asp Arg Asp Arg Ser Glu Leu Ser Pro Leu Leu Leu Ser Thr Thr Gln
 275 280 285

Trp Gln Val Leu Pro Cys Ser Phe Thr Thr Leu Pro Ala Leu Thr Thr
 290 295 300

Gly Leu Ile His Leu His Gln Asn Ile Val Asp Val Gln Tyr Leu Tyr
 305 310 315 320

Gly Val Gly Ser Ser Ile Val Ser Trp Ala Ile Lys Trp Glu Tyr Val
 325 330 335

Ile Leu Leu Phe Leu Leu Leu Ala Asp Ala Arg Ile Cys Ser Cys Leu
 340 345 350

Trp Met Met Leu Leu Ile Ser Gln Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln
 355 360 365

Ser Leu Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly Ser Pro
 370 375 380

Val Cys Leu Gly Gln Asn Ser Gln Ser Pro Thr Ser Asn His Ser Pro
 385 390 395 400

Thr Ser Cys Pro Pro Ile Cys Pro Gly Tyr Arg Trp Met Cys Leu Arg
 405 410 415

Arg Phe Ile Ile Phe Leu Phe Ile Leu Leu Leu Cys Leu Ile Phe Leu
 420 425 430

Leu Val Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile
 435 440 445

Pro Gly Ser Thr Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Thr
 450 455 460

Pro Ala Gln Gly Asn Ser Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro
 465 470 475 480

Thr Asp Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe
 485 490 495

Ala Lys Tyr Leu Trp Glu Trp Ala Ser Val Arg Phe Ser Trp Leu Ser
 500 505 510

Leu Leu Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro Thr Val
 515 520 525

Trp Leu Ser Ala Ile Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly Pro Ser Leu Tyr
 530 535 540

Ser Ile Val Ser Pro Phe Ile Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe Cys Leu
 545 550 555 560

Trp Val Tyr Ile

<210> 11

5 <211> 1263

ES 2 585 735 T3

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> derivada de HCV y HBV

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1263)

10 <400> 11

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

ES 2 585 735 T3

gtg ggg gac ttg tgc ggg tcc gtc ttc ctc gtc ggt caa ctg ttc acc Val Gly Asp Leu Cys Gly Ser Val Phe Leu Val Gly Gln Leu Phe Thr 115 120 125	384
ttc tcc ccc agg cgc cac tgg aca acg caa gac tgc aac tgt tcc atg Phe Ser Pro Arg Arg His Trp Thr Thr Gln Asp Cys Asn Cys Ser Met 130 135 140	432
tac ccc ggc cat ata acg ggt cac cgt atg gca tgg gac atg atg atg Tyr Pro Gly His Ile Thr Gly His Arg Met Ala Trp Asp Met Met Met 145 150 155 160	480
aac tgg tcc cct acg aca gcg ctg gta gta gct cag ctg ctc agg gtc Asn Trp Ser Pro Thr Thr Ala Leu Val Val Ala Gln Leu Leu Arg Val 165 170 175	528
ccg caa gcc atc ttg gac atg atc gct ggt gcc cac tgg gga gtc cta Pro Gln Ala Ile Leu Asp Met Ile Ala Gly Ala His Trp Gly Val Leu 180 185 190	576
gcg ggc ata gcg tat ttc tcc atg gtg ggg aac tgg gcg aag gtc ctg Ala Gly Ile Ala Tyr Phe Ser Met Val Gly Asn Trp Ala Lys Val Leu 195 200 205	624
gtg gtg ctg ttg ctg ttc gcc agc aca aga atc ctc aca ata ccg cag Val Val Leu Leu Leu Phe Ala Ser Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln 210 215 220	672
agt cta gac tcg tgg tgg act tct ctc aat ttt cta ggg gga tct ccc Ser Leu Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly Ser Pro 225 230 235 240	720
gtg tgt ctt ggc caa aat tcg cag tcc cca acc tcc aat cac tca cca Val Cys Leu Gly Gln Asn Ser Gln Ser Pro Thr Ser Asn His Ser Pro 245 250 255	768
acc tcc tgt cct cca att tgt cct ggt tat cgc tgg atg tgt ctg cgg Thr Ser Cys Pro Pro Ile Cys Pro Gly Tyr Arg Trp Met Cys Leu Arg 260 265 270	816
cgt ttt atc ata ttc ctc ttc atc ctg ctg cta tgc ctc atc ttc tta Arg Phe Ile Ile Phe Leu Phe Ile Leu Leu Leu Cys Leu Ile Phe Leu 275 280 285	864
ttg gtt ctt ctg gat tat caa ggt atg ttg ccc gtt tgt cct cta att Leu Val Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile 290 295 300	912
cca gga tca aca aca acc agt acg gga cca tgc aaa acc tgc acg act Pro Gly Ser Thr Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Thr 305 310 315 320	960
cct gct caa ggc aac tct atg ttt ccc tca tgt tgc tgt aca aaa cct Pro Ala Gln Gly Asn Ser Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro 325 330 335	1008
acg gat gga aat tgc acc tgt att ccc atc cca tcg tcc tgg gct ttc Thr Asp Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe 340 345 350	1056
gca aaa tac cta tgg gag tgg gcc tca gtc cgt ttc tct tgg ctc agt	1104

ES 2 585 735 T3

Ala Lys Tyr Leu Trp Glu Trp Ala Ser Val Arg Phe Ser Trp Leu Ser
 355 360 365

tta cta gtg cca ttt gtt cag tgg ttc gta ggg ctt tcc ccc act gtt 1152
 Leu Leu Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro Thr Val
 370 375 380

tgg ctt tca gct ata tgg atg atg tgg tat tgg ggg cca agt ctg tac 1200
 Trp Leu Ser Ala Ile Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly Pro Ser Leu Tyr
 385 390 395 400

agc atc gtg agt ccc ttt ata ccg ctg tta cca att ttc ttt tgt ctc 1248
 Ser Ile Val Ser Pro Phe Ile Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe Cys Leu
 405 410 415

tgg gta tac att taa 1263
 Trp Val Tyr Ile
 420

<210> 12

<211> 420

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<400> 12

Met Thr Gly Asn Leu Pro Gly Cys Ser Phe Ser Ile Phe Leu Leu Ala
 1 5 10 15

Leu Leu Ser Cys Leu Thr Val Pro Ala Ser Ala Tyr Gln Val Arg Asn
 20 25 30

Ser Ser Gly Leu Tyr His Val Thr Asn Asp Cys Pro Asn Ser Ser Ile
 35 40 45

Val Tyr Glu Thr Ala Asp Thr Ile Leu His Ser Pro Gly Cys Val Pro
 50 55 60

Cys Val Arg Glu Gly Asn Ala Ser Lys Cys Trp Val Ala Val Ala Pro
 65 70 75 80

Thr Val Ala Thr Arg Asp Gly Lys Leu Pro Thr Thr Gln Leu Arg Arg
 85 90 95

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

Val Gly Asp Leu Cys Gly Ser Val Phe Leu Val Gly Gln Leu Phe Thr
 115 120 125

ES 2 585 735 T3

Phe Ser Pro Arg Arg His Trp Thr Thr Gln Asp Cys Asn Cys Ser Met
 130 135 140

Tyr Pro Gly His Ile Thr Gly His Arg Met Ala Trp Asp Met Met Met
 145 150 155 160

Asn Trp Ser Pro Thr Thr Ala Leu Val Val Ala Gln Leu Leu Arg Val
 165 170 175

Pro Gln Ala Ile Leu Asp Met Ile Ala Gly Ala His Trp Gly Val Leu
 180 185 190

Ala Gly Ile Ala Tyr Phe Ser Met Val Gly Asn Trp Ala Lys Val Leu
 195 200 205

Val Val Leu Leu Leu Phe Ala Ser Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln
 210 215 220

Ser Leu Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly Ser Pro
 225 230 235 240

Val Cys Leu Gly Gln Asn Ser Gln Ser Pro Thr Ser Asn His Ser Pro
 245 250 255

Thr Ser Cys Pro Pro Ile Cys Pro Gly Tyr Arg Trp Met Cys Leu Arg
 260 265 270

Arg Phe Ile Ile Phe Leu Phe Ile Leu Leu Leu Cys Leu Ile Phe Leu
 275 280 285

Leu Val Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile
 290 295 300

Pro Gly Ser Thr Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Thr
 305 310 315 320

Pro Ala Gln Gly Asn Ser Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro
 325 330 335

Thr Asp Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe
 340 345 350

Ala Lys Tyr Leu Trp Glu Trp Ala Ser Val Arg Phe Ser Trp Leu Ser
 355 360 365

Leu Leu Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro Thr Val
 370 375 380

Trp Leu Ser Ala Ile Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly Pro Ser Leu Tyr
 385 390 395 400

Ser Ile Val Ser Pro Phe Ile Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe Cys Leu
 405 410 415

Trp Val Tyr Ile
 420

<210> 13

ES 2 585 735 T3

<211> 1752
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> derivada de HCV y HBV

<220>
 <221> CDS

10 <222> (1)..(1752)

<400> 13

atg ggg aac tgg gcg aag gtc ctg gtg gtg ctg ttg ctg ttc gcc agc	48
Met Gly Asn Trp Ala Lys Val Leu Val Val Leu Leu Leu Phe Ala Ser	
1 5 10 15	
gtc gat gcg gaa acc tac acc acc ggg ggg agt att gcc aaa acc gtg	96
Val Asp Ala Glu Thr Tyr Thr Thr Gly Gly Ser Ile Ala Lys Thr Val	
20 25 30	
caa gga ttc acc agt ttt ttt acc cca ggc gcc aag cag gac atc cag	144
Gln Gly Phe Thr Ser Phe Phe Thr Pro Gly Ala Lys Gln Asp Ile Gln	
35 40 45	
ctg atc aac acc aac ggc agt tgg cac atc aat cgc acg gcc ttg aac	192
Leu Ile Asn Thr Asn Gly Ser Trp His Ile Asn Arg Thr Ala Leu Asn	
50 55 60	
tgt aat gcg agc ctc gaa acc ggc tgg ata gcg ggg ctc ttc tac tac	240
Cys Asn Ala Ser Leu Glu Thr Gly Trp Ile Ala Gly Leu Phe Tyr Tyr	
65 70 75 80	
aac aaa ttc aac tcc tca ggc tgc ccc gag agg atg gcc agc tgc aaa	288
Asn Lys Phe Asn Ser Ser Gly Cys Pro Glu Arg Met Ala Ser Cys Lys	
85 90 95	
ccg ctt gcc tat ttc gcc caa ggc tgg ggc cct atc agc cat gtc aac	336
Pro Leu Ala Tyr Phe Ala Gln Gly Trp Gly Pro Ile Ser His Val Asn	
100 105 110	
gga agc ggc ccc gaa cag cgc ccc tac tgc tgg cac tac gcc cca agg	384
Gly Ser Gly Pro Glu Gln Arg Pro Tyr Cys Trp His Tyr Ala Pro Arg	
115 120 125	

ES 2 585 735 T3

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

ES 2 585 735 T3

tcc tgc ttg tgg atg atg cta ctc ata tcc caa aca aga atc ctc aca 1152
 Ser Cys Leu Trp Met Met Leu Leu Ile Ser Gln Thr Arg Ile Leu Thr
 370 375 380

ata ccg cag agt cta gac tcg tgg tgg act tct ctc aat ttt cta ggg 1200
 Ile Pro Gln Ser Leu Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly
 385 390 395 400

gga tct ccc gtg tgt ctt ggc caa aat tcg cag tcc cca acc tcc aat 1248
 Gly Ser Pro Val Cys Leu Gly Gln Asn Ser Gln Ser Pro Thr Ser Asn
 405 410 415

cac tca cca acc tcc tgt cct cca att tgt cct ggt tat cgc tgg atg 1296
 His Ser Pro Thr Ser Cys Pro Pro Ile Cys Pro Gly Tyr Arg Trp Met
 420 425 430

tgt ctg cgg cgt ttt atc ata ttc ctc ttc atc ctg ctg cta tgc ctc 1344
 Cys Leu Arg Arg Phe Ile Ile Phe Leu Phe Ile Leu Leu Leu Cys Leu
 435 440 445

atc ttc tta ttg gtt ctt ctg gat tat caa ggt atg ttg ccc gtt tgt 1392
 Ile Phe Leu Leu Val Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Met Leu Pro Val Cys
 450 455 460

cct cta att cca gga tca aca aca acc agt acg gga cca tgc aaa acC 1440
 Pro Leu Ile Pro Gly Ser Thr Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr
 465 470 475 480

tgc acg act cct gct caa ggc aac tct atg ttt ccc tca tgt tgc tgt 1488
 Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Asn Ser Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys
 485 490 495

aca aaa cct acg gat gga aat tgc acc tgt att ccc atc cca tcg tcc 1536
 Thr Lys Pro Thr Asp Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser
 500 505 510

tgg gct ttc gca aaa tac cta tgg gag tgg gcc tca gtc cgt ttc tct 1584
 Trp Ala Phe Ala Lys Tyr Leu Trp Glu Trp Ala Ser Val Arg Phe Ser
 515 520 525

tgg ctc agt tta cta gtg cca ttt gtt cag tgg ttc gta ggg ctt tcc 1632
 Trp Leu Ser Leu Leu Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser
 530 535 540

ccc act gtt tgg ctt tca gct ata tgg atg atg tgg tat tgg ggg cca 1680
 Pro Thr Val Trp Leu Ser Ala Ile Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly Pro
 545 550 555 560

agt ctg tac agc atc gtg agt ccc ttt ata ccg ctg tta cca att ttc 1728
 Ser Leu Tyr Ser Ile Val Ser Pro Phe Ile Pro Leu Leu Pro Ile Phe
 565 570 575

ttt tgt ctc tgg gta tac att taa 1752
 Phe Cys Leu Trp Val Tyr Ile
 580

<210> 14

<211> 583

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<400> 14

ES 2 585 735 T3

Met Gly Asn Trp Ala Lys Val Leu Val Val Leu Leu Leu Phe Ala Ser
 1 5 10 15

Val Asp Ala Glu Thr Tyr Thr Thr Gly Gly Ser Ile Ala Lys Thr Val
 20 25 30

Gln Gly Phe Thr Ser Phe Phe Thr Pro Gly Ala Lys Gln Asp Ile Gln
 35 40 45

Leu Ile Asn Thr Asn Gly Ser Trp His Ile Asn Arg Thr Ala Leu Asn
 50 55 60

Cys Asn Ala Ser Leu Glu Thr Gly Trp Ile Ala Gly Leu Phe Tyr Tyr
 65 70 75 80

Asn Lys Phe Asn Ser Ser Gly Cys Pro Glu Arg Met Ala Ser Cys Lys
 85 90 95

Pro Leu Ala Tyr Phe Ala Gln Gly Trp Gly Pro Ile Ser His Val Asn
 100 105 110

Gly Ser Gly Pro Glu Gln Arg Pro Tyr Cys Trp His Tyr Ala Pro Arg
 115 120 125

Pro Cys Gly Ile Val Ser Ala Gln Thr Val Cys Gly Pro Val Tyr Cys
 130 135 140

Phe Thr Pro Ser Pro Val Val Val Gly Thr Thr Asp Lys Leu Gly Ala
 145 150 155 160

Pro Thr Tyr Asn Trp Gly Glu Asn Asp Thr Asp Val Phe Val Leu Asn
 165 170 175

Asn Thr Arg Pro Pro Leu Gly Asn Trp Phe Gly Cys Thr Trp Met Asn
 180 185 190

Ser Ser Gly Phe Thr Lys Val Cys Gly Ala Pro Pro Cys Ala Ile Gly
 195 200 205

Gly Val Gly Asn Asn Thr Leu Arg Cys Pro Thr Asp Cys Phe Arg Lys
 210 215 220

ES 2 585 735 T3

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

ES 2 585 735 T3

Pro Leu Ile Pro Gly Ser Thr Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr
465 470 475 480

Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Asn Ser Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys
485 490 495

Thr Lys Pro Thr Asp Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser
500 505 510

Trp Ala Phe Ala Lys Tyr Leu Trp Glu Trp Ala Ser Val Arg Phe Ser
515 520 525

Trp Leu Ser Leu Leu Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser
530 535 540

Pro Thr Val Trp Leu Ser Ala Ile Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly Pro
545 550 555 560

Ser Leu Tyr Ser Ile Val Ser Pro Phe Ile Pro Leu Leu Pro Ile Phe
565 570 575

Phe Cys Leu Trp Val Tyr Ile
580

<210> 15

<211> 10855

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Lentivirus que contiene unas secuencias derivadas de HCV y HBV

10

<400> 15

ttaattccgt gtattctata gtgtcaccta aatcgtatgt gtatgataca taaggttatg	60
tattaattgt agccgcgttc taacgacaat atgtacaagc ctaattgtgt agcatctggc	120
ttactgaagc agaccctatc atctctctcg taaactgccg tcagagtcgg tttggttggg	180
cgaaccttct gagtttctgg taacgccgtc ccgcaccgg aaatggtcag cgaaccaatc	240
agcagggtea tcgctagcca gatcctctac gccggacgca tcgtggccgg catcacggc	300
gccacagtg cggttgctgg cgcttatatc gccgacatca ccgatgggga agatcgggct	360
cgccacttcg ggctcatgag cgcttgttc gccgtgggta tgggtggcagg ccccgaggcc	420
gggggactgt tgggcgccat ctcttgcat gcaccattcc ttgcggcggc ggtgctcaac	480
ggcctcaacc tactactggg ctgcttccta atgcaggagt cgcataaggg agagcgtcga	540
atggtgcact ctcagtacaa tctgctctga tgccgcatag ttaagccagc cccgacaccc	600

ES 2 585 735 T3

gccaacaccc gctgacgccc cctgacgggc ttgtctgctc ccggcatccg cttacagaca 660
 agctgtgacc gtctccggga gctgcatgtg tcagaggttt tcaccgtcat caccgaaacg 720
 cgcgagacga aagggcctcg tgatacgctt atttttatag gttaatgtca tgataataat 780
 ggtttcttag acgtcaggtg gcacttttcg gggaaatgtg cgcggaaccc ctatttgttt 840
 atttttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga caataaccct gataaatgct 900
 tcaataatat tgaaaaagga agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg cccttattcc 960
 cttttttgcy gcattttgcc ttctgtttt tgctcaccca gaaacgctgg tgaagtaaa 1020
 agatgctgaa gatcagttgg gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc tcaacagcgg 1080
 taagatcctt gagagttttc gccccgaaga acgttttcca atgatgagca cttttaagt 1140
 tctgctatgt ggcgcggtat tatcccgat tgacgcgggg caagagcaac tcggtcgccg 1200
 catacactat tctcagaatg acttggttga gtactcacca gtcacagaaa agcatcttac 1260
 ggatggcatg acagtaagag aattatgcag tgctgccata accatgagtg ataactctgc 1320
 ggccaactta cttctgacaa cgatcggagg accgaaggag ctaaccgctt tttgacaaa 1380
 catgggggat catgtaactc gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg aagccatacc 1440
 aaacgacgag cgtgacacca cgatgctgt agcaatggca acaacgttgc gcaaactatt 1500
 aactggcgaa ctacttactc tagcttcccg gcaacaatta atagactgga tggaggcggg 1560
 taaagttgca ggaccactc tgcgctcggc ccttccggct ggctggttta ttgctgataa 1620
 atctggagcc ggtgagcgtg ggtctcggg tatcattgca gcaactgggc cagatggtaa 1680
 gcctcccgat atcgtagtta tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa 1740
 tagacagatc gctgagatag gtgctcact gattaagcat tggtaactgt cagaccaagt 1800
 ttactcatat atactttaga ttgatttaa acttcatttt taatttaaaa ggatctaggt 1860
 gaagatcctt tttgataatc tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt cgttccactg 1920
 agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatccttttt ttctgcgct 1980
 aatctgctgc ttgcaacaa aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttggt tgccgatca 2040
 agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga taccaaatc 2100
 tgccttcta gtgtagcctt agttaggcca ccacttcaag aactctgtag caccgcctac 2160
 atacetogct ctgctaacc tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata agtctgtct 2220
 taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg 2280
 gggttcgtgc acacagcca gcttgagcg aacgacctac accgaactga gataacctaca 2340
 gcgtgagcat tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt 2400
 aagcggcagc gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa acgcctggt 2460

ES 2 585 735 T3

tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc	2520
gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac ggttcctggc	2580
cttttgctgg ccttttgctc acatgttctt tctcgcgta tcccctgatt ctgtggataa	2640
ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgtcgcgccg agccgaacga ccgagcgcag	2700
cgagtcagt agcgaggaag cggaagagcg cccaatacgc aaaccgcctc tccccgcgcg	2760
ttggccgatt cattaatgca gctgtggaat gtgtgtcagt taggggtgtg aaagtcccca	2820
ggctccccag caggcagaag tatgcaaagc atgcatctca attagtcagc aaccagggtg	2880
ggaaagtccc caggctcccc agcaggcaga agtatgcaaa gcatgcatct caattagtca	2940
gcaacctag tcccgccct aactccgcc atcccgcc taactccgcc cagttccgcc	3000
cattctccgc cccatggctg actaattttt tttattatg cagaggccga ggcgcctcg	3060
gcctctgagc tattccagaa gtagtgagga ggctttttg gaggcctagg cttttgcaaa	3120
aagcttgac acaagacagg cttgcgagat atgtttgaga ataccacttt atcccgcgtc	3180
agggagaggc agtgcgtaaa aagacgcgga ctcatgtgaa atactggtt ttagtgcgcc	3240
agatctctat aatctcgcgc aacctatttt ccctcgaac actttttaag ccgtagataa	3300
acaggctggg acacttcaca tgagcgaaaa atacatcgtc acctgggaca tgttgagat	3360
ccatgcacgt aaactcga ggcgactgat gcctctgaa caatggaaag gcattattgc	3420
cgtaagccgt ggcggtctgt accgggtgcg ttactggcgc gtgaactggg tattcgtcat	3480
gtcgataccg tttgtatttc cagctacgat cagcacaacc agcgcgagct taaagtctg	3540
aaacgcgcag aaggcgatg cgaaggcttc atcgttattg atgacctggt ggataccggt	3600
ggtactgcg ttgcgattcg tgaatgtat ccaaaagcgc actttgtcac catcttcgca	3660
aaaccgctg gtgcctcct ggttgatgac tatgttgtg atatcccgca agatacctgg	3720
attgaacagc cgtgggatat gggcgtcgt ttcgtcccgc caatctccgg tcgctaact	3780
tttcaacgcc tggcaactgcc gggcgttgt ctttttaact tcaggcgggt tacaatagtt	3840
tccagtaagt attctggagg ctgcatccat gacacaggca aacctgagcg aaacctggt	3900
caaacccgc tttaaacatc ctgaaacctc gacgctagtc cgccgcttta atcacggcg	3960
acaaccgct gtgcagtcg cccttgatg taaaacctc cctcaactgt atcgcagat	4020
taaccgctg atgtggatct ggcgcgcat tgaccacgc gaaatcctcg acgtccaggc	4080
acgtattgtg atgagcagtg ccgaacgtac cgacgatgat ttatacgata cggtgattgg	4140
ctaccgtg gcgaactgga tttatgagt ggccccgat ctttgtgaag gaaccttact	4200
tctgtggtgt gacataattg gacaaactac ctacagagat ttaaagctct aaggtaata	4260

ES 2 585 735 T3

taaaat	ttttt	aagtgtataa	tgtgttaa	actgattct	aattgtttgt	gtat	ttttaga	4320	
ttccaac	cta	tggaa	actgat	gaatgggagc	agtggtggaa	tgctt	taagagg	4380	
tg	tttgctc	agaagaa	atg	ccatctagt	atgatgaggc	tactgctgac	tctcaacatt	4440	
ctactc	ctcc	aaaaa	agaag	agaaggtag	aagaccccaa	ggactttcct	tcagaattgc	4500	
taag	ttttt	gagtc	atgct	gtgttagta	atagaactct	tgcttgcttt	gctatttaca	4560	
ccaca	aaagga	aaaagctgca	ctgctataca	agaaaattat	ggaaaaat	tctgtaac	ct	4620	
ttata	agtag	gcataacagt	tataatcata	acatactgtt	ttttcttact	ccacacaggc		4680	
atag	agtgtc	tgctattaat	aactatgctc	aaaattgtg	tacctttagc	tttttaattt		4740	
gta	agggg	taataaggaa	tatttgatgt	atagtgcctt	gactagagat	cataatcagc		4800	
cata	ccacat	ttgtagaggt	tttacttgct	ttaaaaaac	tcccacac	ctcccctgac		4860	
ctg	aaacata	aatgaatgc	aattgttgtt	gttaactgtt	ttattgcagc	ttataatgg		4920	
taca	aaataa	gcaatagcat	cacaaatttc	acaaataaag	catttttttc	actgcattct		4980	
ag	ttgtggtt	tg	tccaaact	catcaatgta	tcttatcatg	tctggatcaa	ctggataact	5040	
ca	agctaacc	aaaatcatcc	caaacttccc	acccataacc	ctattaccac	tgccaattac		5100	
ct	agtgg	ttt	tactct	aaacctgtga	ttcctctgaa	ttattttcat	tttaaagaaa	5160	
tt	gtat	ttgt	ttaa	atgta	ctacaaactt	agtagttgga	agggctaatt	5220	
ga	agacaaga	tatccttgat	ctgtggatct	accacacaca	aggctacttc	cctgattagc		5280	
aga	actacac	accagggcca	ggggctcagat	atccactgac	ctttggatgg	tgctacaagc		5340	
tag	taccagt	tgagccagat	aaggtagaag	aggccaataa	aggagagaac	accagcttgt		5400	
tac	acctgt	gagcctgcat	gggatggatg	acccggagag	agaagtgtta	gagtggaggt		5460	
tt	gacagccg	cctagcattt	catcacgtgg	cccgagagct	gcatccggag	tacttcaaga		5520	
act	gctgata	tcgagcttgc	tacaagggac	tttccgctgy	ggactttcca	gggaggcgtg		5580	
gc	ctggg	ggg	gactgggag	tg	cgagccc	tcagatcctg	catataagca	5640	
gc	ctgtactg	ggtctctctg	gttagaccag	atctgagcct	gggagctctc	tg	gctaacta	5700	
gg	gaaccac	tgcttaagcc	tcaataaagc	ttgccttgag	tgcttcaagt	agtgtgtgcc		5760	
cg	tctgttgt	gtgactctgg	taactagaga	tcctcagac	ccttttagtc	agtgtggaaa		5820	
at	ctctagca	gtggcgccc	aacagggact	tgaaagcgaa	agggaaacca	gaggagctct		5880	
ct	cgacgcag	gactcggctt	gctgaagcgc	gcacggcaag	aggcgagggg	cg	gcgactgg	5940	
tg	agtacgcc	aaaaat	tttg	actagcggag	gctagaagga	gagagatggg	tg	cgagagcg	6000
tc	agtattaa	gcgggggaga	attagatcgc	gatgggaaaa	aattcgggta	aggccagggg		6060	
gaa	agaaaa	atataaatta	aaacatatag	tatgggcaag	cagggagcta	gaacgattcg		6120	

ES 2 585 735 T3

cagttaatcc tggcctgtta gaaacatcag aaggctgtag acaaatactg ggacagctac 6180
 aaccatccct tcagacagga tcagaagaac ttagatcatt atataataca gtagcaaccc 6240
 tctattgtgt gcatcaaagg atagagataa aagacaccaa ggaagcttta gacaagatag 6300
 aggaagagca aaacaaaagt aagaccaccg cacagcaagc ggccgctgat cttcagacct 6360
 ggaggaggag atatgagggg caattggaga agtgaattat ataaatataa agtagtaaaa 6420
 attgaacat taggagtagc acccaccaag gcaaagagaa gagtgggtgca gagagaaaaa 6480
 agagcagtgg gaataggagc ttgttcctt ggttcttgg gagcagcagg aagcactatg 6540
 ggcgcagcgt caatgacgct gacggtacag gccagacaat tattgtctgg tatagtgcag 6600
 cagcagaaca atttgcgtgag ggctattgag gcgcaacagc atctgttgca actcacagtc 6660
 tggggcatca agcagctcca ggcaagaatc ctggctgtgg aaagatacct aaaggatcaa 6720
 cagctcctgg ggatttggg ttgctctgga aaactcattt gcaccactgc tgtgccttgg 6780
 aatgctagtt ggagtaataa atctctggaa cagatttggg atcacacgac ctggatggag 6840
 tgggacagag aaattaacaa ttacacaagc ttaatacact ccttaattga agaategcaa 6900
 aaccagcaag aaaagaatga acaagaatta ttggaattag ataatgggc aagtttggg 6960
 aattggttta acataacaaa ttggctgtgg tatataaaat tattcataat gatagtagga 7020
 ggcttggtag gtttaagaat agtttttgtg gtactttcta tagtgaatag agttaggcag 7080
 ggatattcac cattatcgtt tcagacccac ctcccaaccc cgagggggacc cgacaggccc 7140
 gaaggaatag aagaagaagg tggagagaga gacagagaca gatccattcg attagtgaac 7200
 ggatctcgac ggtatcgccg aattcacaaa tggcagtatt catccacaat ttaaaagaa 7260
 aaggggggat tgggggttac agtgcagggg aaagaatagt agacataata gcaacagaca 7320
 taaaaactaa agaattacaa aaacaaatta caaaaattca aaattttcgg gtttattaca 7380
 gggacagcag agatccactt tatcgataag cttgggagtt ccgcggtaca taacttacgg 7440
 taaatggccc gcctggctga ccgccaacg acccccgcc attgacgtca ataatgacgt 7500
 atgttcccat agtaacgcca atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac 7560
 ggtaaaactgc ccaactggca gtacatcaag tgtatcatat gccaaagtacg cccctattg 7620
 acgtcaatga cggtaaatgg cccgcctggc attatgcca gtacatgacc ttacgggact 7680
 ttctacttg gcagtacatc tacgtattag tcatcgctat taccatgggtg atgcggtttt 7740
 ggcagtacac caatgggctg ggatagcggg ttgactcacg gggatttcca agtctccacc 7800
 ccattgacgt caatgggagt ttgttttggc accaaaatca acgggacttt ccaaaatgc 7860
 gtaacaactc cgccccattg acgcaaatgg gcggtaggcg tgtacggtgg gaggtctata 7920

ES 2 585 735 T3

taagcagagc tcglttagtg aaccgtcaga tcgctggag acgcatcca cgcigtgttg	7980
acctccatag aagacaccga ctctagctag aggatccatg taccaagtac gcaactcctc	8040
gggcctttac catgtcacca atgattgcc taactcgagt attgtgtacg agacggccga	8100
taccatccta cactctccgg ggtgtgtccc ttgcgttcgc gagggcaatg cctcaaaatg	8160
ttgggtggcg gtggccccta cagtcgccac cagagacggc aagctcccca caacgcagct	8220
tcgacgtcac atcgatctgc tcgtcaggag cgcaccctc tgctcggccc tctatgtggg	8280
ggacttgtgc gggtcctct tccctcgcg tcaactgttc acctctccc ccaggcgcca	8340
ctggacaacg caagactgca actgttccat gtacccccgc catataacgg gtcaccgtat	8400
ggcatgggac atgatgatga actggcccc taagacagcg ctggtagtag ctacgtgct	8460
cagggccccg caagccatct tggacatgat cgcctgtgcc cactggggag tcctagcggg	8520
catagcgtat ttctccatgg tggggaactg ggcgaaggtc ctgggtgtgc tgttgctgtt	8580
cgccagcaca agaatcctca caataccgca gagtctagac tcgtggtgga ctctctcaa	8640
ttttctaggg ggatctcccg tgtgtcttgg ccaaaattcg cagtccccaa cctccaatca	8700
ctcaccaacc tctgtcctc caattgtcc tggttatcgc tggatgtgc tgcggcgttt	8760
tatcatattc ctctcatcc tcgtctatg cctcatcttc ttattggttc ttctggatta	8820
tcaaggtatg ttgccggtt gtctctaat tccaggatca acaacaacca gtacgggacc	8880
atgcaaaacc tgcacgactc ctgctcaagg caactctatg tttccctcat gttgctgtac	8940
aaaacctagc gatggaatt gcacctgtat tcccatcca tcgtcctggg ctttcgcaa	9000
atacctatgg gagtggcct cagtcctgtt ctcttggctc agttactag tgccattgt	9060
tcagtgttc gtagggcttt cccccactgt ttggcttca gctatatgga tgatgtgga	9120
ttgggggcca agtctgtaca gcacgtgag tccctttata ccgctgttac caattttctt	9180
ttgtctctg gtatacattt aataaggatc cggactagta actcaggcc cctctccctc	9240
ccccccct aacgttactg gccgaagccg cttggaataa ggccggtgtg cgtttgtcta	9300
tatgttattt tccaccatat tgccgtctt tggcaatgtg agggcccga aacctggccc	9360
tgtctcttg acgagcattc ctagggtct tcccctctc gccaaaggaa tgcaaggtct	9420
gttgaatgtc gtgaaggaag cagttcctct ggaagcttct tgaagacaaa caacgtctgt	9480
agcgaccctt tgcaggcagc ggaaccccc acctggcgac aggtgcctct gcgccaata	9540
gccacgtgta taagatacac ctgcaaaggc ggcacaacc cagtgccacg ttgtgagttg	9600
gatagttgtg gaaagagtca aatggctctc ctcaagcgt taacaagg ggctgaagga	9660
tgccagaag gtacccatt gtatgggac tgatctggg cctcgttaca catgctttac	9720
atgtgttag tcgaggttaa aaaaactct aggcccccg aaccacggg acgtgtttt	9780

ES 2 585 735 T3

cctttgaaaa acacgatgat aatatggcca caacatggt gagcaagggc gaggagctgt 9840
 .tcaccggggt ggtgcccac cctggtcgagc tggacggcga cgtaaacggc cacaagttca 9900
 gcgtgtccgg cgagggcgag ggcgatgcca cctacggcaa gctgaccctg aagtcatct 9960
 gcaccaccgg caagctgccc gtgccctggc ccacctcgt gaccaccctg acctacggcg 10020
 tgcagtgctt cagccgctac cccgaccaca tgaagcagca cgacttcttc aagtccgcca 10080
 tgcccgaagg ctacgtccag gagcgacca tcttcttcaa ggacgacggc aactacaaga 10140
 cccgcgcca ggtgaagttc gagggcgaca ccctggtgaa ccgcatcgag ctgaagggca 10200
 tcgacttcaa ggaggacggc aacatcctgg ggcacaagct ggagtacaac tacaacagcc 10260
 acaacgtcta tatcatggcc gacaagcaga agaacggcat caaggtgaac ttcaagatcc 10320
 gccacaacat cgaggacggc agcgtgcagc tcgccgacca ctaccagcag aacaccccca 10380
 tcggcgacgg ccccgctgtg ctgcccgaca accactacct gagcaccag tccgccctga 10440
 gcaaagacc caacgagaag cgcgatcaca tggctctgct ggagttcgtg accgcccgg 10500
 ggatcactct cggcatggac gagctgtaca agtaagtoga ggaattcga gctcggtaac 10560
 tttaaacca atgacttaca aggcagctgt agatcttagc cactttttaa aagaaaagg 10620
 gggactgaa gggctaattc actcccaacg aagacaagat ctttttgcct gtactgggtc 10680
 tctctggtta gaccagatct gagcctggga gctctctggc taactagga acccaactgt 10740
 taagcctcaa taaagcttc cttgagtgct tcaagtagtg tgtgcccgtc tgttgtgtga 10800
 ctctggtaac tagagatccc tcagaccctt ttagtcagtg tggaaaatct ctaga 10855

<210> .16
 <211> 11368
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Lentivirus que contiene secuencias derivadas de HCV y HBV

10 <400> 16

ttaattccgt gtattctata gtgtcaccta aatcgtatgt gtatgatata taaggttatg 60
 tattaattgt agccgcgttc taacgacaat atgtacaagc ctaattgtgt agcatctggc 120
 ttactgaagc agaccctatc atctctctcg taaactgccg tcagagtcgg tttggttga 180
 cgaaccttct gagtttctgg taacgccgtc ccgaccccg aaatggtcag cgaaccaatc 240
 agcagggtea tcgctagcca gatcctctac gccggacgca tcgtggccgg catcaccggc 300
 gccacaggtg cggttgctgg cgcctatata gccgacatca ccgatgggga agatcgggct 360
 cgccacttcg ggetcatgag cgcttgttc gccgtgggta tgggtggcagg ccccggtggc 420

ES 2 585 735 T3

gggggactgt tgggcgcat ctcccttgcac gcaccattcc ttgcggcggc ggtgctcaac 480
 ggcctcaacc tactactggg ctgcttccta atgcaggagt cgcataaggg agagcgtcga 540
 atggtgcaact ctcaagtaca tctgctctga tgccgcatag ttaagccagc cccgacaccc 600
 gccaacaccc gctgacgcgc cctgacgggc ttgtctgctc ccggcatccg cttacagaca 660
 agctgtgacc gtctccggga gctgcatgtg tcagaggttt tcaccgtcat caccgaaacg 720
 cgcgagacga aaggccctcg tgatacgcct atttttatag gtaaatgtca tgataataat 780
 ggtttcttag acgtcaggtg gcacttttcg gggaaatgtg cgcggaaccc ctatttgttt 840
 atttttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga caataaccct gataaatgct 900
 tcaataatat tgaaaaagga agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg cccttattec 960
 cttttttcgc gcaattttgc ttccctgtttt tgctcaccca gaaacgctgg tgaaagtaaa 1020
 agatgctgaa gatcagttgg gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc tcaacagcgg 1080
 taagatcctt gagagttttc gccccgaaga acgttttcca atgatgagca cttttaaagt 1140
 tctgctatgt ggcgcggtat tatcccgtat tgacgcgggg caagagcaac tcggtcgccc 1200
 catacactat tctcagaatg acttggttga gtactacca gtcacagaaa agcatcttac 1260
 ggatggcatg acagtaagag aattatgcag tgctgccata accatgagtg ataactctgc 1320
 ggccaactta cttctgacaa cgatcggagg accgaaggag ctaaccgctt ttttgacaa 1380
 catgggggat catgtaactc gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg aagccatacc 1440
 aaacgacgag cgtgacacca cgatgcctgt agcaatggca acaacgttgc gaaactatt 1500
 aactggcga ctaactactc tagcttcccg gcaacaatta atagactgga tggaggcggg 1560
 taaagttgca ggaccacttc tgcgctcggc ccttccggct ggctggttta ttgctgataa 1620
 atctggagcc ggtgagcgtg ggtctcggc tatcattgca gcaactgggc cagatggtaa 1680
 gccctcccgt atcgtagtta tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa 1740
 tagacagatc gctgagatag gtgcctcact gattaagcat tggtaactgt cagaccaagt 1800
 ttactcatat atactttaga ttgatttaa acttcatttt taatttaaaa ggatctaggt 1860
 gaagatcctt tttgataatc tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt cgttccactg 1920
 agcgtcagac ccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatccttttt ttctgcgct 1980
 aatctgctgc ttgcaacaa aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttggt tgccggatca 2040
 agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga taccaaatc 2100
 tgccttcta gtgtagccgt agttaggcca ccaactcaag aactctgtag caccgcctac 2160
 atacctcgt ctgctaatcc tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct 2220
 taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg 2280

ES 2 585 735 T3

gggttcgtgc acacagccca gcttggagcg aacgacctac accgaactga gataacctaca 2340
 .gcgtgagcat tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt 2400
 aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa acgcctggta 2460
 tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc 2520
 gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac ggttcctggc 2580
 cttttgctgg ccttttgctc acatgttctt tctgcgtta tcccctgatt ctgtggataa 2640
 ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcgccgc agccgaacga ccgagcgag 2700
 cgagtcagt agcgaggaag cggagagcg cccaatacgc aaaccgcctc tcccgcgcg 2760
 ttggccgatt cattaatgca gctgtggaat gtgtgtcagt tagggtgtgg aaagtcccca 2820
 ggctccccag caggcagaag tatgcaaagc atgcatctca attagtcagc aaccaggtgt 2880
 ggaaagtccc caggctcccc agcaggcaga agtatgcaa gcattgcatct caattagtca 2940
 gcaaccatag tcccgccctt aactccgcc atcccgcctt taactccgcc cagttccgcc 3000
 cattctccgc cccatggctg actaattttt tttatttatg cagaggccga ggccgcctcg 3060
 gcctctgagc tattccagaa gtagtgagga ggcttttttg gaggcctagg cttttgcaa 3120
 aagcttgac acaagacagg cttgcgagat atgtttgaga ataccacttt atcccgcgtc 3180
 agggagaggg agtgcgtaaa aagacgcgga ctcattgtaa atactggttt ttagtgccc 3240
 agatctctat aatctcgcgc aacctatttt cccctcgaac actttttaag ccgtagataa 3300
 acaggctggg acacttcaca tgagcgaaaa atacatcgtc acctgggaca tgttgcagat 3360
 ccattgcacgt aaactcga ggcgactgat gcctctgaa caatggaaag gcattattgc 3420
 cgtaagccgt ggcggtctgt accgggtgcg ttactggcgc gtgaactggg tattegtcat 3480
 gtcgataacc tttgtatttc cagctacgat cagcaaac agcgcgagct taaagtgtg 3540
 aaacgcgag aaggcgatgg cgaagcttc atcgttattg atgacctggt ggataccggt 3600
 ggtactgagg ttgcgattcg tgaatgtat caaaagcgc actttgtcac catcttcgca 3660
 aaaccggctg gtgcgctc ggttgatgac tatgtgttg atatcccga agatacctgg 3720
 attgaacagc cgtgggatat ggcgctcgt ttcgtcccgc caatctccgg tcgctaact 3780
 tttcaacgcc tggcactgcc ggcggttgtt ctttttaact tcaggcgggt tacaatagtt 3840
 tccagtaagt attctggagg ctgcatccat gacacaggca aacctgagcg aaaccctgtt 3900
 caaacccgc tttaaacatc ctgaaacctc gacgctagtc cgccgcttta atcacggcgc 3960
 acaaccgct gtgcagtcgg cccttgatgg taaaaccatc cctcactggt atcgcatgat 4020
 taaccgtctg atgtggatct ggcgggcat tgaccacgc gaaatcctcg acgtccaggc 4080

ES 2 585 735 T3

acgtatttg atgagcgatg ccgaacgtac cgacgatgat ttatacgata cggtgattgg 4140
 ctaccgtggc ggcaactgga tttatgagtg ggccccgat ctttgtgaag gaaccttact 4200
 tctgtggtgt gacataattg gacaaactac ctacagagat ttaaagctct aaggtaaata 4260
 taaaattttt aagtgtataa tgtgttaaac tactgattct aattgtttgt gtattttaga 4320
 ttccaaccta tggaaactgat gaatgggagc agtgggtgaa tgcctttaat gaggaaaacc 4380
 tgttttgctc agaagaaatg ccatctagtg atgatgaggc tactgctgac tctcaacatt 4440
 ctactcctcc aaaaaagaag agaaagtag aagaccccaa ggactttcct tcagaattgc 4500
 taagtttttt gagtcatgct gtgtttagta atagaactct tgcttgcttt gctatttaca 4560
 ccacaaagga aaaagctgca ctgctataca agaaaattat ggaaaaatat tctgtaacct 4620
 ttataagtag gcataacagt tataatcata acatactggt ttttcttact ccacacaggc 4680
 atagagtgtc tgctattaat aactatgctc aaaaattgtg tacctttagc tttttaattt 4740
 gtaaaggggt taataaggaa tatttgatgt atagtgcctt gactagagat cataatcagc 4800
 cataccacat ttgtagaggt tttacttgct ttaaaaaacc tcccacacct cccctgaac 4860
 ctgaaacata aatgaatgc aattgttgtt gttaacttgt ttattgcagc ttataatggt 4920
 tacaataaa gcaatagcat cacaaatttc acaataaag ctttttttc actgcattct 4980
 agttgtggtt tgtccaaact catcaatgta tcttatcatg tctggatcaa ctggataact 5040
 caagctaacc aaaatcatcc caaacttccc accccatacc ctattaccac tgccaattac 5100
 ctagtgggtt catttactct aaacctgtga ttcctctgaa ttattttcat ttaaagaaa 5160
 ttgtatttgt taaatatgta ctacaaactt agtagttgga agggctaatt cactcccaaa 5220
 gaagacaaga tatccttgat ctgtggatct accacacaca aggctacttc cctgattagc 5280
 agaactacac accagggcca ggggtcagat atcactgac ctttggatgg tgctacaagc 5340
 tagtaccagt tgagccagat aaggtagaag aggccaataa aggagagaac accagcttgt 5400
 tacaccctgt gagcctgcat gggatggatg acccgagag agaaagtgtta gagtggaggt 5460
 ttgacagccg cctagcattt catcacgtgg cccgagagct gcatccggag tacttcaaga 5520
 actgctgata tcgagcttgc tacaaggac tttcogctgg ggactttcca gggaggcgtg 5580
 gcctgggagg gactggggag tggcgagccc tcagatcctg catataagca gctgcttttt 5640
 gcctgtactg ggtctctctg gttagaccag atctgagcct gggagctctc tggctaacta 5700
 ggaaccac tgcttaagcc tcaataaagc ttgccttgag tgcttcaagt agtgtgtgcc 5760
 cgtctgttgt gtgactctgg taactagaga tcctcagac ccttttagtc agtgtgaaa 5820
 atctctagca gtggcgcccg aacagggact tgaagcgaa agggaaacca gaggagctct 5880
 ctgcagcag gactcggctt gctgaagcgc gcacggcaag aggcgagggg cggcgactgg 5940

ES 2 585 735 T3

tgagtacgcc aaaaattttg actagcggag gctagaagga gagagatggg tgcgagagcg	6000
tcagtattaa gcgggggaga attagatcgc gatgggaaaa aattcgggta aggccagggg	6060
gaaagaaaa atataaatta aaacatatag tatgggcaag cagggagcta gaacgattcg	6120
cagttaatcc tggcctgtta gaaacatcag aaggctgtag acaaatactg ggacagctac	6180
aaccatccct tcagacagga tcagaagaac ttagatcatt atataatata gtagcaaccc	6240
tctattgtgt gcatcaaagg atagagataa aagacaccaa ggaagcttta gacaagatag	6300
aggaagagca aaacaaaagt aagaccaccg cacagcaagc gcccgtgat cttcagacct	6360
ggaggaggag atatgaggga caattggaga agtgaattat ataaatataa agtagtaaaa	6420
attgaacctat taggagtgc acccaccaag gcaagagaa gagtggtgca gagagaaaa	6480
agagcagtgg gaataggagc tttgttcctt gggttcttgg gagcagcagg aagcactatg	6540
ggcgcagcgt caatgacgct gacggtagc gccagacaat tattgtctgg tatagtgcag	6600
cagcagaaca atttgctgag ggctattgag gcgcaacagc atctgttgca actcacagtc	6660
tggggcatca agcagctcca ggcaagaatc ctggctgtgg aaagatacct aaaggatcaa	6720
cagctcctgg ggatttgggg ttgctctgga aaactcattt gcaccactgc tgtgccttgg	6780
aatgctagtt ggagtaataa atctctggaa cagatttggg atcacacgac ctggatggag	6840
tgggacagag aaattaacaa ttacacaagc ttaatacact ccttaattga agaatcgcaa	6900
aaccagcaag aaaagaatga acaagaatta ttggaattag ataaatgggc aagtttgtgg	6960
aattggttta acataacaaa ttggctgtgg tatataaaat tattcataat gatagtagga	7020
ggcttggtag gtttaagaat agtttttgcg gtactttcta tagtgaatag agttaggcag	7080
ggatattcac cattatcgtt tcagaccac ctcccaaccc cgaggggacc cgacaggccc	7140
gaaggaatag aagaagaag tggagagaga gacagagaca gatccattcg attagtgaac	7200
ggatctcgac ggtatgccg aattcacaaa tggcagtatt catccacaat tttaaaagaa	7260
aaggggggat tgggggttac agtgcagggg aaagaatagt agacataata gcaacagaca	7320
tacaaactaa agaattacaa aaacaaatta caaaaattca aaattttcgg gtttattaca	7380
gggacagcag agatccactt tatcgataag cttgggagtt ccgcgttaca taacttacgg	7440
taaatggccc gcctggctga ccgcccaacg acccccgcc attgacgtca ataatgacgt	7500
atgttcccat agtaacgcca atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac	7560
ggtaaactgc cacttggca gtacatcaag tgtatcatat gccaaagtacg ccccctattg	7620
acgtcaatga cggtaaattg cccgctggc attatgcca gtacatgacc ttacgggact	7680
ttcctacttg gcagtacatc tacgtattag tcatcgctat taccatgggtg atgcggtttt	7740

ES 2 585 735 T3

ggcagtacac caatgggctt ggatagcggg ttgactcacc gggatttcca agtctccacc 7800
 ccattgacgt caatgggagt ttgttttggc accaaaatca acgggacttt ccaaaatgtc 7860
 gtaacaactc cgccccattg acgcaaattg gcggtaggcg tgtacgggtg gaggtctata 7920
 taagcagagc tcgttttagt aaccgtcaga tcgcctggag acgccatcca cgctgttttg 7980
 acctccatag aagacaccga ctctagctag aggatccatg gaaacctaca ccaccggggg 8040
 gagtattgcc aaaaccgtgc aaggattcac cagttttttt accccaggcg ccaagcagga 8100
 catccagctg atcaacacca acggcagttg gcacatcaat cgcacggcct tgaactgtaa 8160
 tgcgagcctc gaaaccggct ggatagcggg gctcttttac tacaacaaat tcaactcctc 8220
 aggtgcccc gagaggatgg ccagctgcaa accccttgcc tatttcgccc aaggctgggg 8280
 ccctatcagc catgtcaacg gaagcggccc cgaacagcgc ccctactgct ggcaactcgc 8340
 cccaaggcct tgtggtatcg tgcagcaca gacagtatgt ggcccagtgt attgtttcac 8400
 tcctagcccc gtgggtggtg ggacgaccga caagttgggc gcgcctacct acaactgggg 8460
 tgagaatgat acggacgtct tcgtctcaa taacaccagc ccaccgttg gcaattggtt 8520
 cggttgacc tggatgaact catctggatt caccaaagtg tgcggagcgc ctccctgtgc 8580
 catcggagga gtgggcaata acaccttgcg ctgtcccact gactgtttcc gcaagcatcc 8640
 ggaagctaca tactctcgat gtggtccgg tccttgatc acgcccaggt gcctggtcga 8700
 ctatccttat aggtctggc attatccttg cactgtcaac tacaccctgt ttaaaatcag 8760
 gatgtacgtg ggaggggtcg agcacaggct acaagctgct tgcaactgga cgcggggcga 8820
 gcggtgtgat ctggacgaca gggacaggtc cgagctcagc ccgctgctgc tgtccaccac 8880
 gcagtggcag gtcctccgt gttctttcac gaccttgcca gccttgacca ccggcctcat 8940
 ccacctccat cagaacatcg tggacgtgca atattgtac ggggtgggt caagcattgt 9000
 gtctggggc atcaagtgg agtacgtcat tctctgttt ctctgcttg cagacgcgcg 9060
 catctgctcc tgctgtgga tgatgctact catatccaa acaagaatcc tcacaatacc 9120
 gcagagtcta gactcgtggt ggacttctct caattttcta ggggatctc ccgtgtgtct 9180
 tggccaaaat tcgagctccc caacctccaa tcaactacca acctcctgtc ctccaattg 9240
 tcctggttat cgctggatgt gtctgcggcg ttttatcata ttctcttca tcctgctgct 9300
 atgcctcacc ttcttattgg ttcttctgga ttatcaaggt atggtgccc tttgtctct 9360
 aattocagga tcaacaacaa ccagtacggg accatgcaa acctgcacga ctctgctca 9420
 aggcaactct atgtttccct catgttgctg taaaaacct acggatgaa attgcacctg 9480
 tattccatc ccacgtcct gggctttcgc aaaataccta tgggagtgg cctcagtcg 9540
 tttctcttg ctcagtttac tagtgccatt tgttcagtg ttcgtaggc tttccccac 9600

ES 2 585 735 T3

tgtttggctt tcagctatat ggatgatgtg gtattggggg ccaagtctgt acagcatcgt	9660
,gagtcacctt ataccgctgt taccaatfff cttttgtctc tgggtataca tttaataag	9720
atccggacta gtaactcgag gccctctcc cccccccc cctaacgta ctggccgaag	9780
ccgcttgaa taaggccgt gtgcgtttgt ctatatgta tttccacca tattgccgtc	9840
ttttggcaat gtgagggccc ggaaacctgg ccctgtctc ttgacgagca ttctagggg	9900
tcttccct ctcgcaaag gaatgaag tctgtgaat gtcgtgaag aagcagttcc	9960
tctggaagct tctgaagac aaacaacgtc tgtagcgacc cttgcaggc agcgaacct	10020
cccacctggc gacaggtgcc tctgcggcca aaagccacgt gtataagata cacctgcaa	10080
ggcggcacia cccagtgcc acgttgtag ttggatagt gtggaagag tcaaatggct	10140
ctctcaagc gtattcaaca aggggctgaa ggatgccag aaggtacccc attgtatgg	10200
atctgatctg ggcctcgg acacatgctt tacatgtgt tagtcgaggt taaaaaacg	10260
tctaggcccc ccgaaccacg gggacgtgt tttcctttga aaaacacgat gataatatg	10320
ccacaacct ggtgagcaag ggcgaggagc tgttaccgg ggtggtgcc atcctggtcg	10380
agctggacg cgacgtaaac ggccacaagt tcagcgtgc cggcgaggc gagggcgatg	10440
ccacctcgg caagctgacc ctgaagtcca tctgcaccac cggcaagctg cccgtgccct	10500
ggcccacct cgtgaccacc ctgacctag gcgtgcagt cttcagccgc taccctgacc	10560
acatgaagca gcacgacttc tcaagtccg ccattgccga aggtctcgtc caggagcgca	10620
ccatctctt caaggacgac ggcaactaca agaccgcgc cgaggtaag ttcgagggcg	10680
acaccctggt gaaccgcatc gagctgaag gcatcgactt caaggaggac ggcaacatcc	10740
tggggcacia gctggagtac aactacaaca gccacaact ctatatcatg gccgacaagc	10800
agaagaacgg catcaaggtg aactcaaga tccgccaaa catcgaggac ggcagcgtgc	10860
agctcggca ccaactaccag cagaaccccc ccattggcga cggccccgtg ctgctgccc	10920
acaaccacta cctgagcacc cagtccccc tgagcaaaga cccaacgag aagcgcgatc	10980
acatggtcct gctggagttc gtgaccgccc cgggatcac tctcggcatg gacgagctgt	11040
acaagtaagt cgagggaatt cgagctcgg acctttaaga ccaatgactt acaaggcagc	11100
tgtagatctt agccactttt taaaagaaaa ggggggactg gaagggctaa ttcactccca	11160
acgaagacia gatctttttg cttgtaactg gtctctctg ttagaccaga tctgagcctg	11220
ggagctctct ggtaactag ggaaccact gcttaagcct caataaagct tgccttgagt	11280
gcttcaagta gtgtgtgccc gtctgtgtg tgactctggt aactagagat ccctcagacc	11340
cttttagtca gtgtggaaaa tctctaga	11368

REIVINDICACIONES

1. Proteína de fusión inmunogénica que comprende por lo menos los dos péptidos siguientes:

- 5 a)- en el lado C-terminal, un primer péptido constituido:
- por la secuencia de aminoácidos de la proteína S de un aislado del virus humano de la hepatitis B (HBV), estando dicha proteína S delecionada de su dominio transmembranario situado en su extremo N-terminal, conservando dicha secuencia de aminoácidos la capacidad de formar unas partículas sub-virales no infecciosas inmunogénicas frente al virus humano de la hepatitis B, o
 - 10 - por una secuencia de aminoácidos que presenta un porcentaje de identidad de por lo menos un 91%, en particular de por lo menos un 93%, particularmente de por lo menos un 95%, y más particularmente de por lo menos un 97%, con dicha secuencia de aminoácidos de la proteína S delecionada de N-terminal, con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos esté también delecionada del dominio transmembranario situado en el extremo N-terminal de la proteína S de HBV, y de que conserve la capacidad de formar unas partículas sub-virales no infecciosas inmunogénicas frente al virus humano de la hepatitis B, o,
 - 15 - por la secuencia de aminoácidos de una variante sintética derivada de dicha secuencia de aminoácidos de dicha proteína S delecionada, con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos de dicha variante sintética esté también delecionada del dominio transmembranario situado en el extremo N-terminal de la proteína S de HBV, y de que conserve la capacidad de formar unas partículas sub-virales no infecciosas inmunogénicas frente al virus humano de la hepatitis B, y,
 - 20 - por la secuencia de aminoácidos de una variante sintética derivada de dicha secuencia de aminoácidos de dicha proteína S delecionada, con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos de dicha variante sintética esté también delecionada del dominio transmembranario situado en el extremo N-terminal de la proteína S de HBV, y de que conserve la capacidad de formar unas partículas sub-virales no infecciosas inmunogénicas frente al virus humano de la hepatitis B, y,
 - 25 b)- en el lado N-terminal, un segundo péptido constituido:
 - por la secuencia de aminoácidos del dominio transmembranario y del ectodominio de por lo menos una proteína de envoltura de un aislado del virus de la hepatitis C (HCV), o
 - 30 - por una secuencia de aminoácidos que presenta un porcentaje de identidad de por lo menos un 78%, en particular de por lo menos un 80%, particularmente de por lo menos un 85%, y más particularmente de por lo menos un 90%, con dicha secuencia de aminoácidos del dominio transmembranario y del ectodominio de una proteína de envoltura de un aislado del virus de la hepatitis C, con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos conserve las propiedades de dicho dominio transmembranario y las propiedades inmunogénicas frente al virus de la hepatitis C, o
 - 35 - por la secuencia de aminoácidos de una variante sintética derivada de dicha secuencia de aminoácidos del dominio transmembranario y del ectodominio de la proteína E1 o E2 de HCV, con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos conserve las propiedades de dicho dominio transmembranario y las propiedades inmunogénicas frente al virus de la hepatitis C, siendo dicha proteína de envoltura de un aislado del virus de la hepatitis C seleccionada de entre la proteína E1, la proteína E2 o un péptido de fusión que comprende la proteína E1 y la proteína E2.
 - 40

45 2. Proteína de fusión inmunogénica según la reivindicación 1, en la que el segundo péptido situado en el lado N-terminal, está constituido:

- por la totalidad de la secuencia de aminoácidos del dominio transmembranario y del ectodominio de la proteína de envoltura E1, o
- 50 - por una secuencia de aminoácidos que presenta un porcentaje de identidad de por lo menos un 75%, en particular de por lo menos un 80%, particularmente de por lo menos un 85%, y más particularmente de por lo menos un 90%, con dicha secuencia de aminoácidos del dominio transmembranario y del ectodominio de la proteína de envoltura E1, con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos conserve las propiedades de dicho dominio transmembranario y las propiedades inmunogénicas frente al virus de la hepatitis C, o
- 55 - por la secuencia de aminoácidos de una variante sintética derivada de dicha proteína E1; con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos conserve las propiedades de dicho dominio transmembranario y las propiedades inmunogénicas frente al virus de la hepatitis C.
- 60

3. Proteína de fusión inmunogénica según la reivindicación 1, en la que el segundo péptido situado en el lado N-terminal, está constituido:

- por la totalidad de la secuencia de aminoácidos del dominio transmembranario y del ectodominio de la proteína de envoltura E2, o
- 65

- por una secuencia de aminoácidos que presenta un porcentaje de identidad de por lo menos un 78%, en particular de por lo menos un 80%, particularmente de por lo menos un 85%, y más particularmente de por lo menos un 90%, con dicha secuencia de aminoácidos del dominio transmembranario y del ectodominio de la proteína de envoltura E2, con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos conserve las propiedades de dicho dominio transmembranario y las propiedades inmunogénicas frente al virus de la hepatitis C, o
 - por la secuencia de aminoácidos de una variante sintética derivada de dicha proteína E2, con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos conserve las propiedades de dicho dominio transmembranario y las propiedades inmunogénicas frente al virus de la hepatitis C.
4. Proteína de fusión inmunogénica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el primer y el segundo péptido que constituyen la proteína de fusión inmunogénica son contiguos, y el extremo C-terminal del segundo péptido está unido de manera covalente al extremo N-terminal del primer péptido.
5. Proteína de fusión inmunogénica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el primer péptido en la posición C-terminal está constituido:
- por una secuencia de aminoácidos delimitada por los aminoácidos contiguos situados en la región comprendida desde el aminoácido en la posición 23 al de la posición 226 de la proteína S, de HBV, y particularmente del aislado HBVadw,
 - y en particular por la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 2, conservando dicha secuencia de aminoácidos la capacidad de formar unas partículas sub-virales no infecciosas inmunogénicas frente al virus humano de la hepatitis B, o
 - por una secuencia de aminoácidos que presenta un porcentaje de identidad de por lo menos un 91%, en particular de por lo menos un 93%, particularmente de por lo menos un 95%, y más particularmente de por lo menos un 97%, con dicha secuencia de aminoácidos contiguos de la proteína S, con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos esté también delecionada del dominio transmembranario situado en el extremo N-terminal de la proteína S de HBV, y de que conserve la capacidad de formar unas partículas sub-virales no infecciosas, inmunogénicas frente al virus humano de la hepatitis B, o
 - por la secuencia de aminoácidos de una variante sintética, derivada de dicha secuencia de aminoácidos de dicha proteína S; con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos de dicha variante sintética esté también delecionada del dominio transmembranario situado en el extremo N-terminal de la proteína S de HBV, y de que conserve la capacidad de formar unas partículas sub-virales no infecciosas, inmunogénicas frente al virus humano de la hepatitis B.
6. Proteína de fusión inmunogénica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el segundo péptido en la posición N-terminal está constituido:
- por una secuencia de aminoácidos del dominio transmembranario y del ectodominio de una proteína de envoltura de un aislado del virus de la hepatitis C (HCV) y delimitada por los aminoácidos contiguos situados en la región comprendida desde el aminoácido en la posición 192 al aminoácido en la posición 380 de la proteína E1 de HCV, y particularmente del aislado HCV-1a,
 - y en particular por la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 4, o
 - por una secuencia de aminoácidos que presenta un porcentaje de identidad de por lo menos un 75%, en particular de por lo menos un 80%, particularmente de por lo menos un 85%, y más particularmente de por lo menos un 90%, con dicha secuencia de aminoácidos contiguos de dicha proteína E1, con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos conserve las propiedades de dicho dominio transmembranario y las propiedades inmunogénicas frente al virus de la hepatitis C, o
 - por la secuencia de aminoácidos de una variante sintética derivada de dicha secuencia de aminoácidos contiguos del dominio transmembranario y del ectodominio de dicha proteína E1, con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos conserve las propiedades de dicho dominio transmembranario y las propiedades inmunogénicas frente al virus de la hepatitis C.
7. Proteína de fusión inmunogénica según una de las reivindicaciones 5 o 6, en la que el primer y el segundo péptidos son contiguos, estando dicha proteína de fusión constituida por:
- la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 8, o
 - una secuencia de aminoácidos que presenta un porcentaje de identidad de por lo menos un 88%, en particular de por lo menos un 90%, particularmente de por lo menos un 92%, y más particularmente de por lo

menos un 95%, con SEC ID nº 8, con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos esté también delecionada del dominio transmembranario situado en el extremo N-terminal de la proteína S de HBV, conserve las propiedades del dominio transmembranario de la proteína de envoltura de HCV y conserve la capacidad de formar unas partículas sub-virales, no infecciosas e inmunogénicas frente a HCV y frente a HBV humano, o

- la secuencia de aminoácidos de una variante sintética derivada de dicha SEC ID nº 8, con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos de dicha variante sintética esté también delecionada del dominio transmembranario situado en el extremo N-terminal de la proteína S de HBV, conserve las propiedades del dominio transmembranario de la proteína de envoltura de HCV y conserve la capacidad de formar unas partículas sub-virales, no infecciosas e inmunogénicas frente a HCV y frente a HBV humano.

8. Proteína de fusión inmunogénica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el segundo péptido en la posición N-terminal está constituido:

- por una secuencia de aminoácidos del dominio transmembranario y del ectodominio de una proteína de envoltura de un aislado del virus de la hepatitis C (HCV) y delimitada por los aminoácidos contiguos situados desde el aminoácido en la posición 384 al de la posición 743 de la proteína E2 de HCV, y particularmente del aislado HCV-1a,

y en particular por la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 6, o

- por una secuencia de aminoácidos que presenta un porcentaje de identidad de por lo menos un 78%, en particular de por lo menos un 80%, particularmente de por lo menos un 85%, y más particularmente de por lo menos un 90%, con dicha secuencia de aminoácidos contiguos de proteína E2, con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos conserve las propiedades de dicho dominio transmembranario y las propiedades inmunogénicas frente al virus de la hepatitis C, o
- por la secuencia de aminoácidos de una variante sintética derivada de dicha secuencia de aminoácidos contiguos del dominio transmembranario y del ectodominio de dicha proteína E2, con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos conserve las propiedades de dicho dominio transmembranario y las propiedades inmunogénicas frente al virus de la hepatitis C.

9. Proteína de fusión inmunogénica según una de las reivindicaciones 5 u 8, en la que el primer y el segundo péptidos son contiguos, estando dicha proteína de fusión constituida por:

- la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 10, o
- una secuencia de aminoácidos que presenta un porcentaje de identidad de por lo menos un 86%, en particular de por lo menos un 88%, particularmente de por lo menos un 92%, y más particularmente de por lo menos un 95%, con SEC ID nº 10, con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos esté también delecionada del dominio transmembranario situado en el extremo N-terminal de la proteína S de HBV, conserve las propiedades del dominio transmembranario de la proteína de envoltura de HCV y conserve la capacidad de formar unas partículas sub-virales, no infecciosas e inmunogénicas frente al virus de la hepatitis B humano y frente al virus de la hepatitis C, o
- la secuencia de aminoácidos de una variante sintética derivada de dicha SEQ ID nº10, con la condición de que dicha secuencia de aminoácidos de dicha variante sintética esté también delecionada del dominio transmembranario situado en el extremo N-terminal de la proteína S de HBV, conserve las propiedades del dominio transmembranario de la proteína de envoltura de HCV y conserve la capacidad de formar unas partículas sub-virales, no infecciosas e inmunogénicas frente al virus de la hepatitis B humano y frente al virus de la hepatitis C.

10. Molécula de ácidos nucleicos híbrida que codifica para cualquiera de las proteínas de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

11. Molécula de ácidos nucleicos híbrida según la reivindicación 10, en la que una primera secuencia de ácidos nucleicos codifica para dicho primer péptido, una segunda secuencia de ácidos nucleicos codifica para dicho segundo péptido, la primera y la segunda secuencia de ácidos nucleicos son contiguas, y el extremo 5' de la primera secuencia de ácidos nucleicos está unido de manera covalente al extremo 3' de la segunda secuencia de ácidos nucleicos.

12. Molécula de ácidos nucleicos híbrida según cualquiera de las reivindicaciones 10 y 11, que codifica para una proteína de fusión mencionada anteriormente que comprende un péptido de inicio de transferencia situado en el lado N-terminal, estando dicha molécula de ácidos nucleicos híbrida representada por:

- la SEC ID nº 11, o
 - una secuencia de ácidos nucleicos que presenta una identidad de por lo menos un 78%, en particular de por lo menos un 80%, particularmente de por lo menos un 85%, y más particularmente de por lo menos un 90%, con dicha SEC ID nº 11.
- 5
13. Molécula de ácidos nucleicos híbrida según cualquiera de las reivindicaciones 10 y 11, que codifica para una proteína de fusión mencionada anteriormente que comprende un péptido de inicio de transferencia situado en el lado N-terminal, estando dicha molécula de ácidos nucleicos híbrida representada por:
- 10
- la SEC ID nº 13, o
 - una secuencia de ácidos nucleicos que presenta una identidad de por lo menos un 80%, en particular de por lo menos un 85%, particularmente de por lo menos un 90%, y más particularmente de por lo menos un 95%, con dicha SEC ID nº 13.
- 15
14. Vector que comprende una molécula de ácidos nucleicos híbrida según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, así como los medios necesarios para su expresión.
- 20
15. Vector según la reivindicación 14, que comprende además un vector lentiviral.
16. Vector según una de las reivindicaciones 14 a 15, en el que la molécula de ácidos nucleicos híbrida es una molécula de ácidos nucleicos según la reivindicación 12 o 13.
- 25
17. Partícula de envoltura sub-viral, quimérica, inmunogénica y no infecciosa, que comprende las proteínas siguientes:
- la proteína constituida por la proteína S salvaje del antígeno de superficie de un aislado del virus de la hepatitis B, y,
 - por lo menos una proteína de fusión inmunogénica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
- 30
18. Partícula sub-viral quimérica inmunogénica según la reivindicación 17, en la que la proteína de fusión inmunogénica está constituida por:
- 35
- la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 8, o
 - una secuencia de aminoácidos que presenta un porcentaje de identidad de por lo menos un 88%, en particular de por lo menos un 90%, particularmente de por lo menos un 92%, y más particularmente de por lo menos un 95%, con dicha SEC ID nº 8.
- 40
19. Partícula sub-viral quimérica inmunogénica según la reivindicación 17, en la que la proteína de fusión inmunogénica está constituida por:
- 45
- la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 10, o
 - una secuencia de aminoácidos que presenta un porcentaje de identidad de por lo menos un 86%, en particular de por lo menos un 88%, particularmente de por lo menos un 92%, y más particularmente de por lo menos un 95%, con la SEC ID nº 10.
- 50
20. Partícula sub-viral quimérica inmunogénica según la reivindicación 17, que comprende las dos proteínas de fusión siguientes:
- 55
- la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 8, o
 - una secuencia de aminoácidos que presenta un porcentaje de identidad de por lo menos un 88%, en particular de por lo menos un 90%, particularmente de por lo menos un 92%, y más particularmente de por lo menos un 95%, con dicha SEC ID nº 8, y
- 60
- la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 10, o
 - una secuencia de aminoácidos que presenta un porcentaje de identidad de por lo menos un 86%, en particular de por lo menos un 88%, particularmente de por lo menos un 90%, y más particularmente de por lo menos un 95%, con la SEC ID nº 10.
- 65
21. Composición inmunogénica que comprende como sustancia activa por lo menos un elemento seleccionado de

entre:

- una proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9,
- 5 - una molécula de ácidos nucleicos híbrida según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13,
- un vector según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, que comprende dicha molécula de ácidos nucleicos híbrida,
- 10 - una partícula sub-viral quimérica según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 20, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

22. Composición inmunogénica según la reivindicación 21, en la que la sustancia activa es por lo menos uno de los tres compuestos siguientes:

- 15 a)- una proteína de fusión según la reivindicación 7,
- b)- una molécula de ácidos nucleicos híbrida según la reivindicación 12, o un vector que comprende dicha molécula de ácidos nucleicos híbrida;
- 20 c)- una partícula sub-viral quimérica según la reivindicación 18.

23. Composición inmunogénica según la reivindicación 21, en la que la sustancia activa es por lo menos uno de los compuestos siguientes:

- 25 a)- una proteína de fusión según la reivindicación 9,
- b)- una molécula de ácidos nucleicos híbrida según la reivindicación 13, o un vector que comprende dicha molécula de ácidos nucleicos híbrida;
- 30 c)- una partícula sub-viral quimérica, según la reivindicación 19.

24. Composición inmunogénica según la reivindicación 21, en la que la sustancia activa es una partícula sub-viral quimérica, que comprende por lo menos las dos proteínas de fusión inmunogénicas según las reivindicaciones 7 y 9.

25. Composición inmunogénica según la reivindicación 21, en la que la sustancia activa está constituida por la mezcla que comprende:

- 40 - por lo menos dos proteínas de fusión siguientes:
 - * una según la reivindicación 7;
 - * la otra según la reivindicación 9;
- 45 - por lo menos dos moléculas de ácidos nucleicos híbridas siguientes:
 - * una según la reivindicación 12, o un vector que comprende dicha molécula de ácidos nucleicos híbrida;
 - * la otra según la reivindicación 13, o un vector que comprende dicha molécula de ácidos nucleicos híbrida;
- 50 - por lo menos dos partículas sub-virales quiméricas siguientes:
 - * una según la reivindicación 18,
 - * la otra según la reivindicación 19.

26. Utilización de una composición inmunogénica según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 25, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento profiláctico y/o para la prevención de la hepatitis C.

27. Utilización de una composición inmunogénica según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 25, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento profiláctico y/o para la prevención de la hepatitis B.

28. Utilización de una composición inmunogénica según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 25, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento profiláctico y/o para la prevención de la hepatitis B y de la hepatitis C.

29. Línea celular que expresa unas partículas sub-virales quiméricas, inmunogénicas no infecciosas según las reivindicaciones 17 a 20, comprendiendo dicha línea el vector según las reivindicaciones 14 a 16.

30. Línea celular según la reivindicación 29, la cual es la línea de ovario de hámster chino denominada CHO.

31. Línea celular según la reivindicación 29, la cual es una levadura, pudiendo dicha levadura ser en particular *Saccharomyces Cerevisae*.

5

FIGURA 1

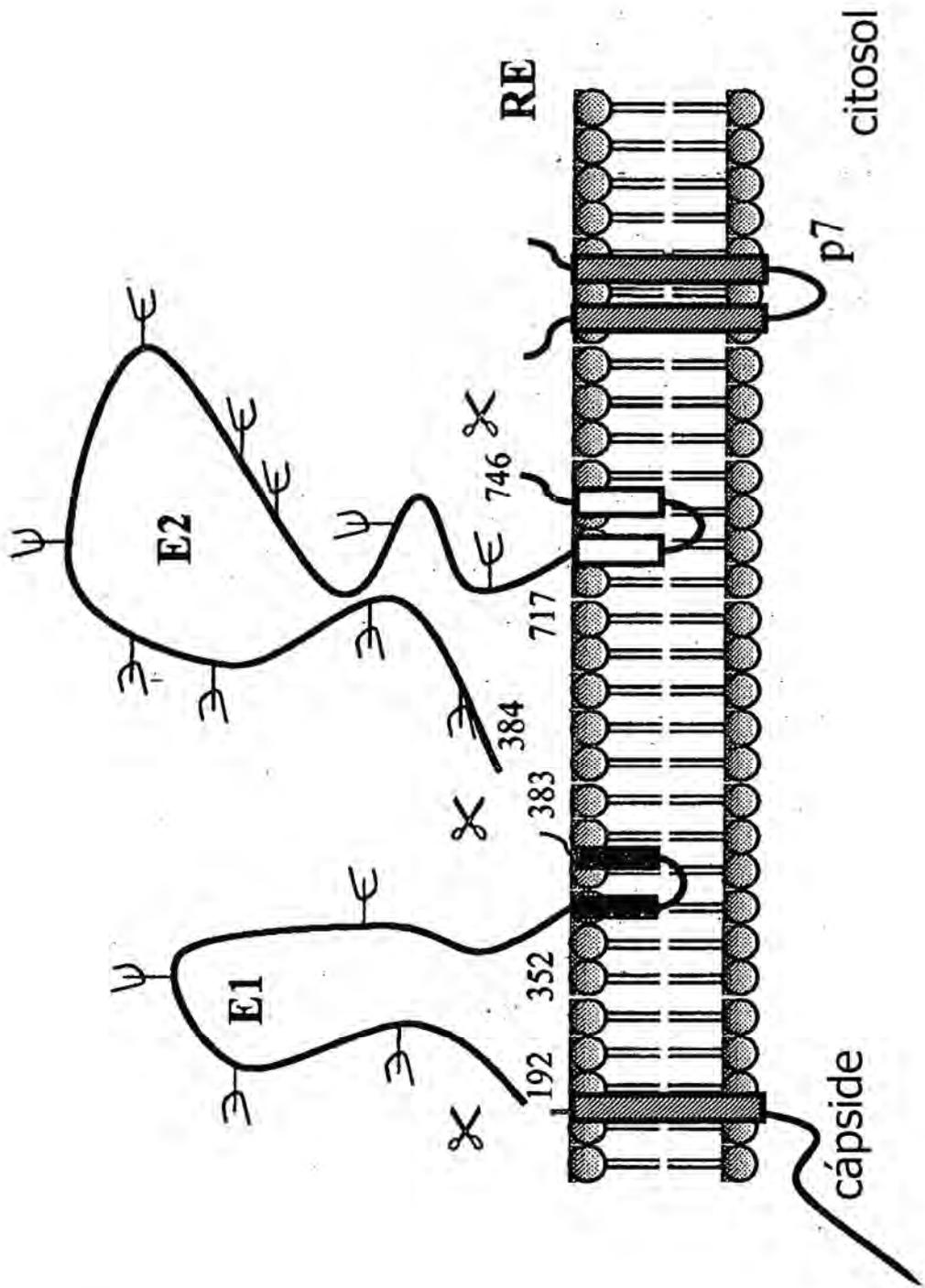


FIGURA 2B

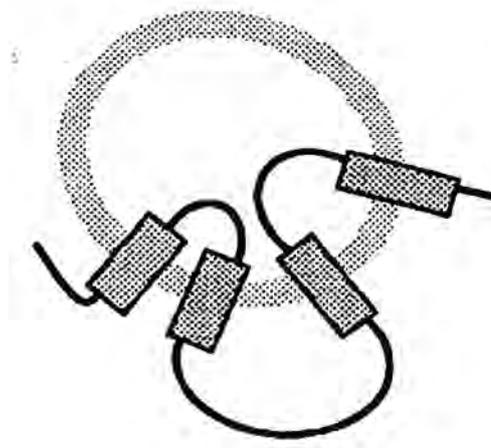
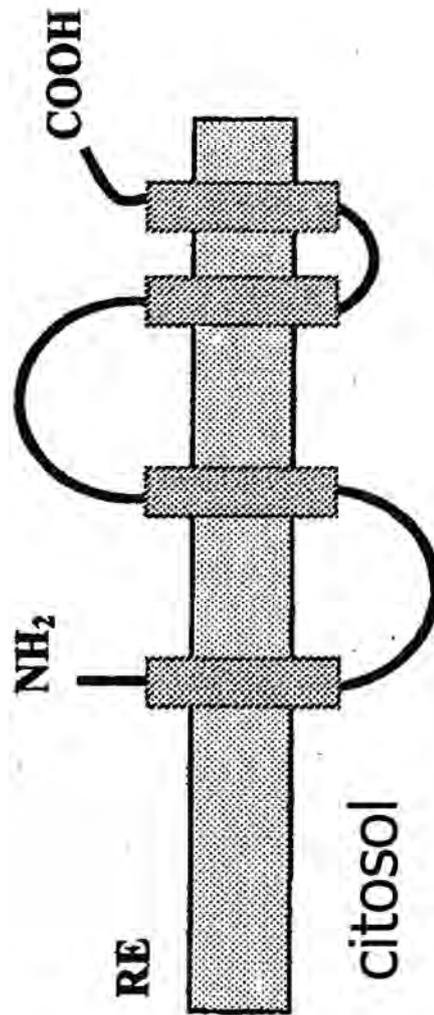


FIGURA 2A



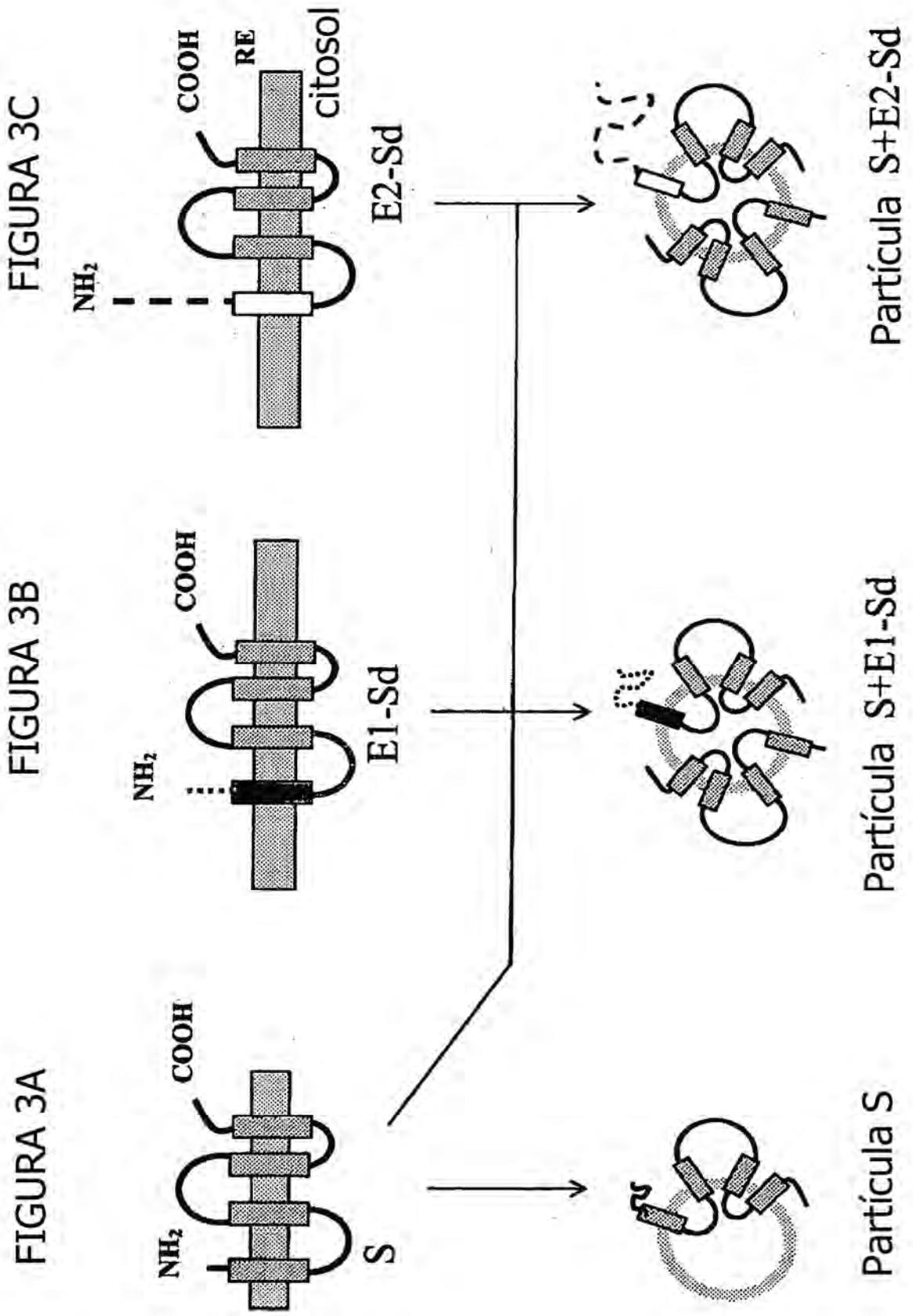


FIGURA 4A

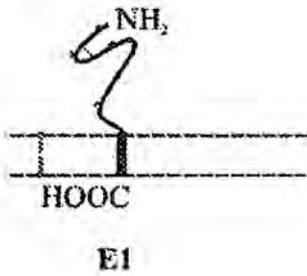


FIGURA 4B

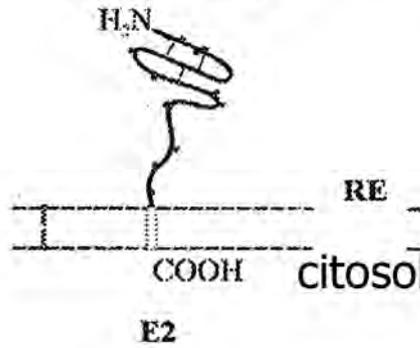


FIGURA 4C

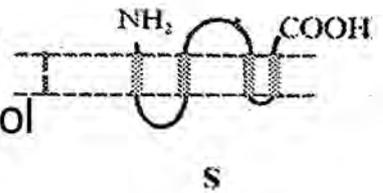
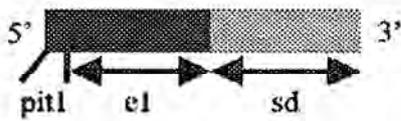


FIGURA 4D

ADNc pit1-e1-sd



producción

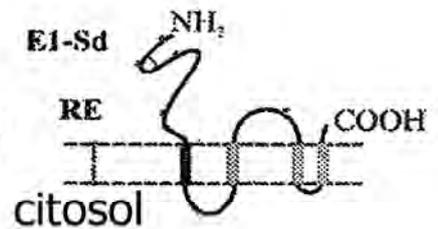
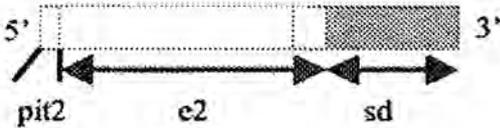


FIGURA 4E

ADNc pit2-e2-sd



producción

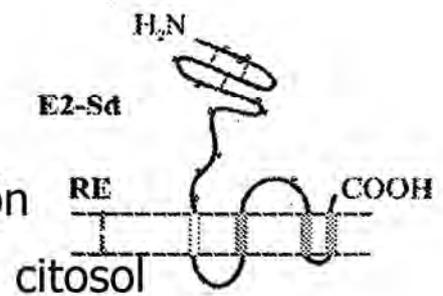


FIGURA 5

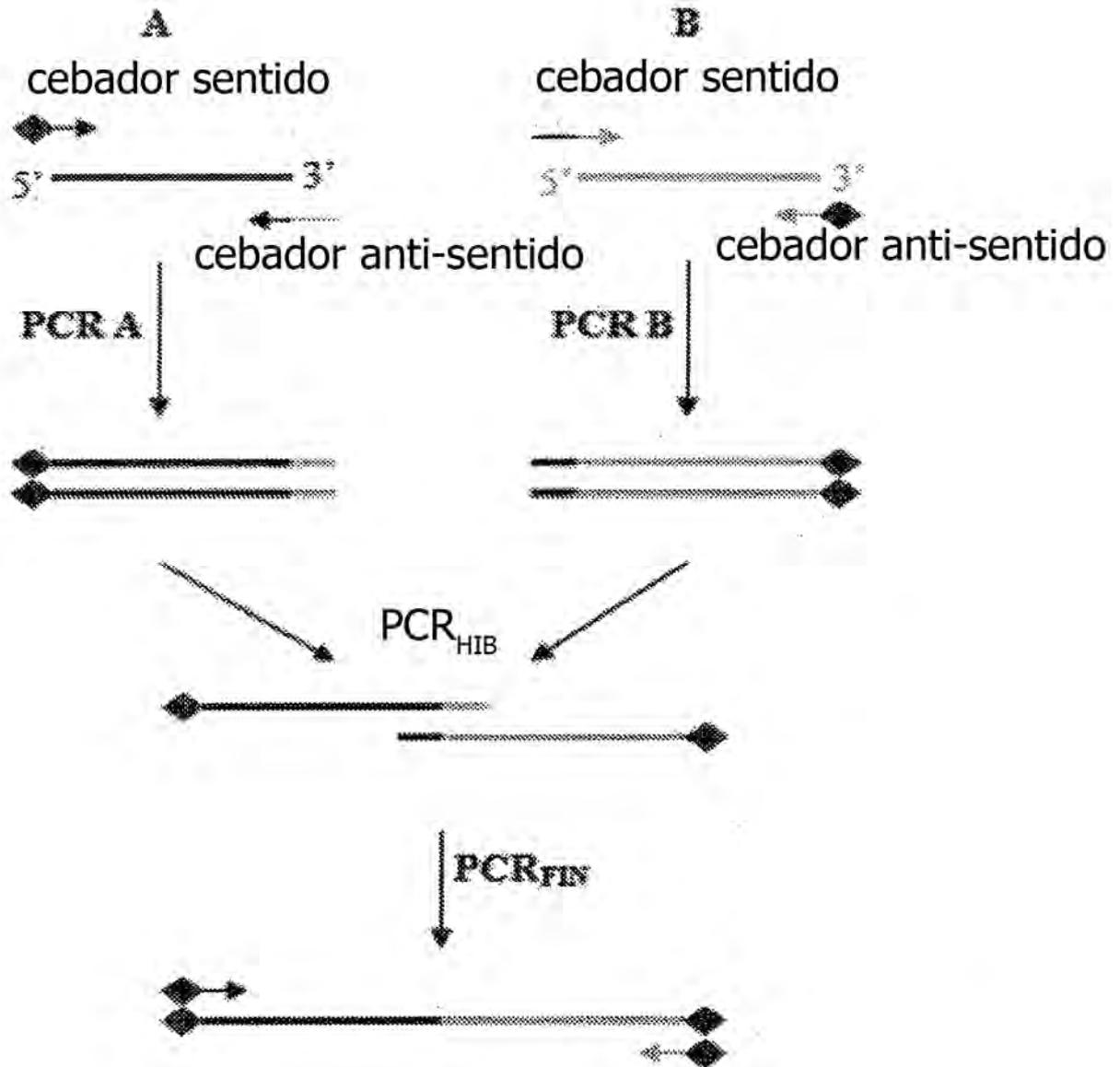


FIGURA 6A

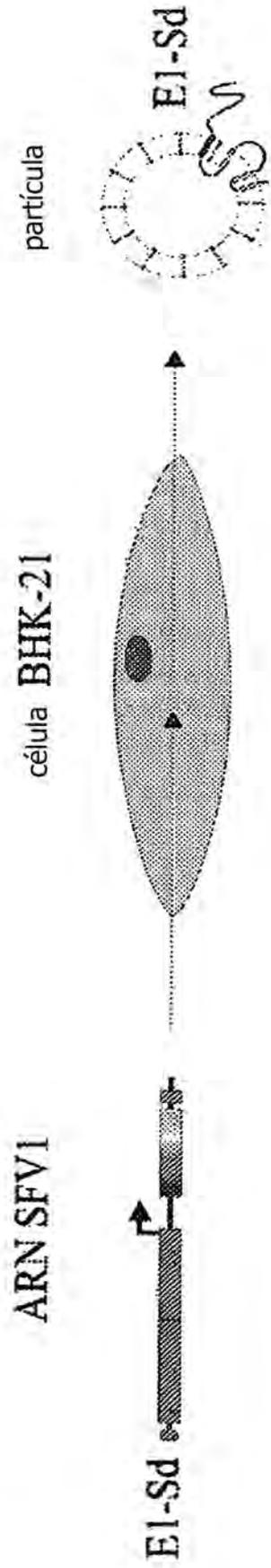


FIGURA 6B

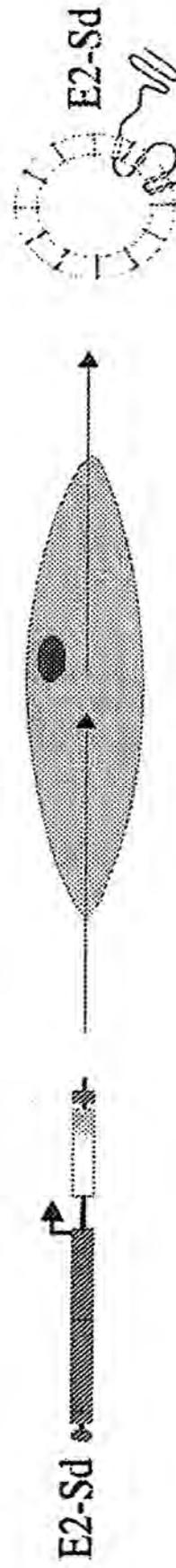


FIGURA 6D

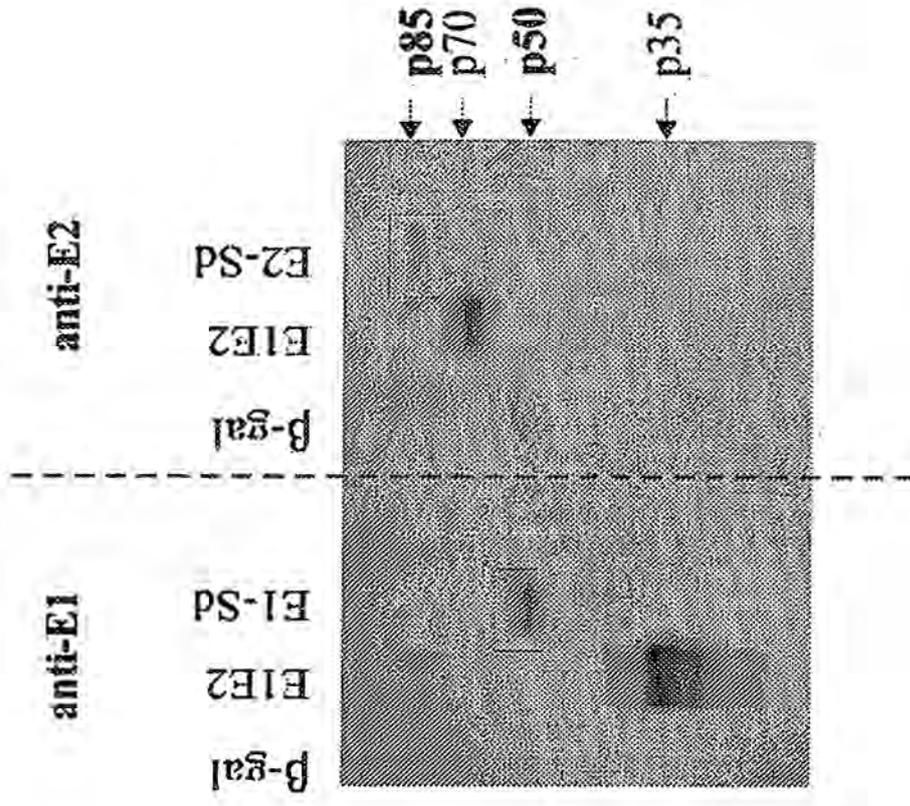


FIGURA 6C

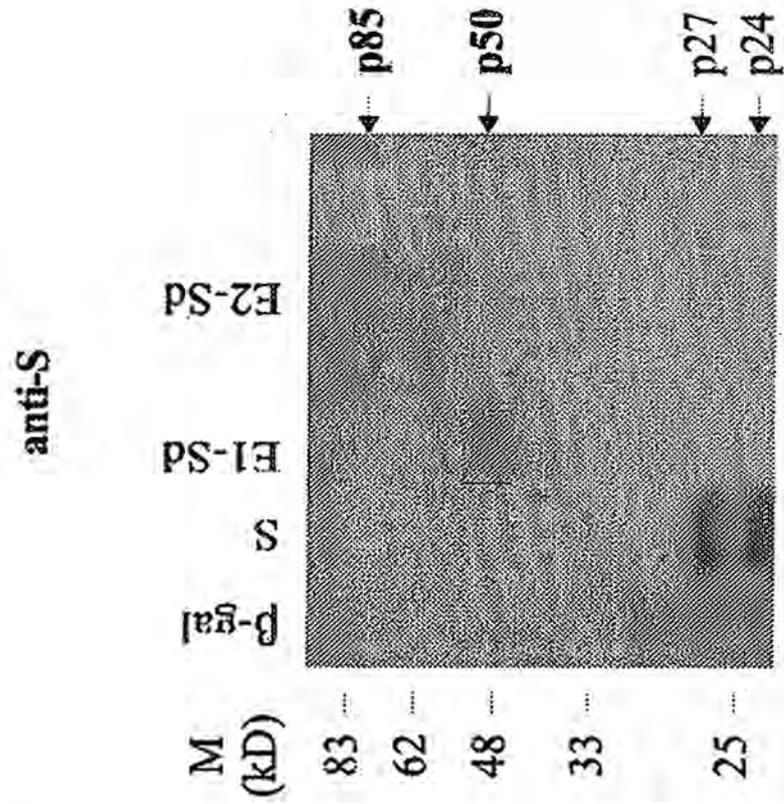
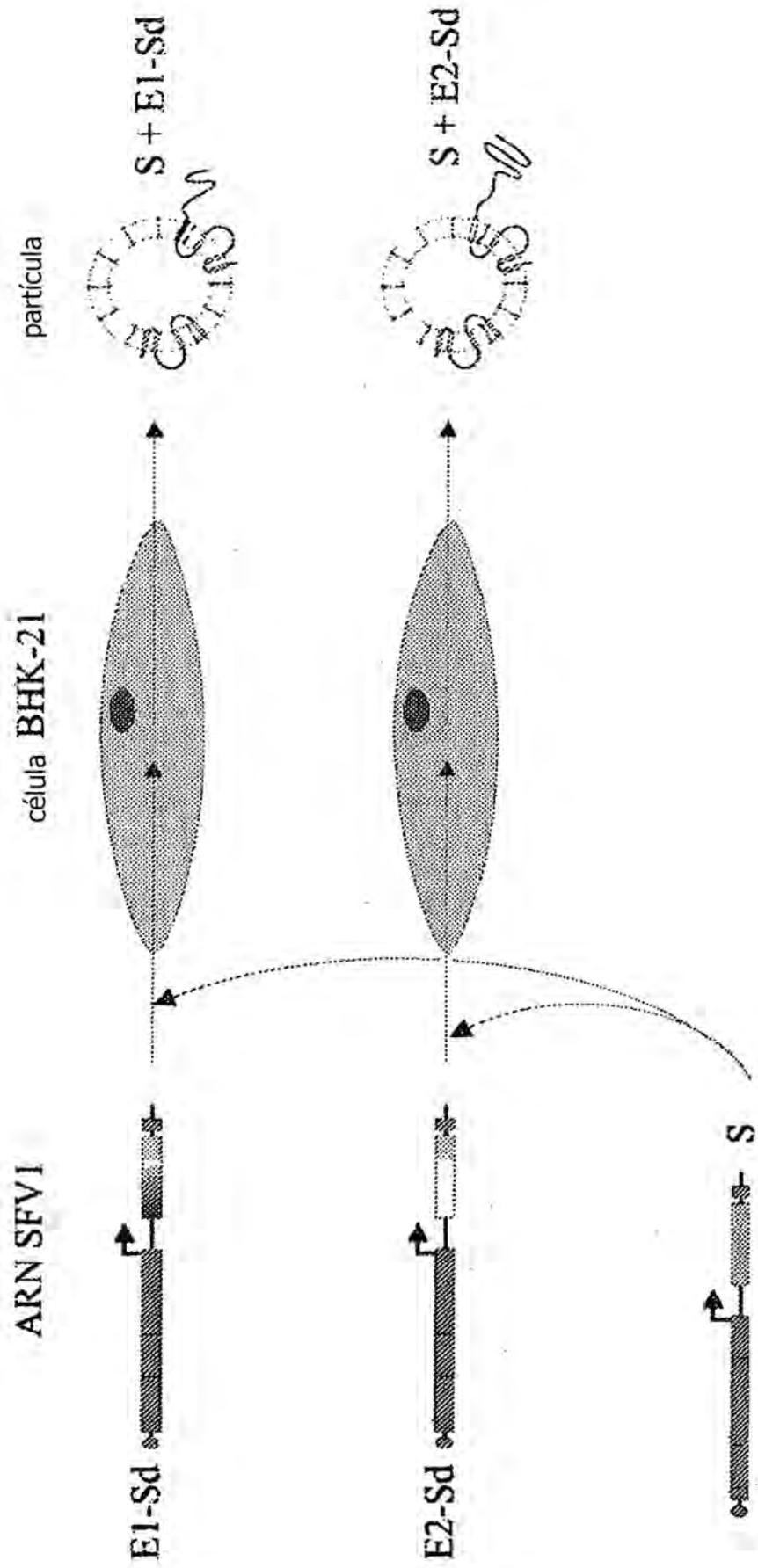


FIGURA 7A



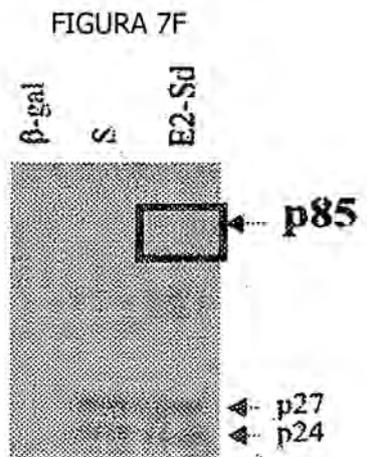
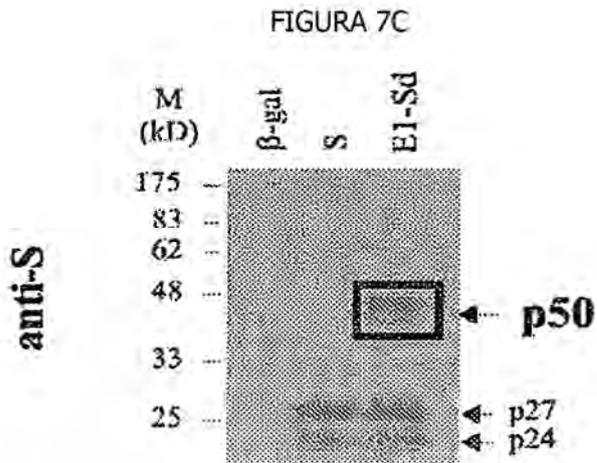
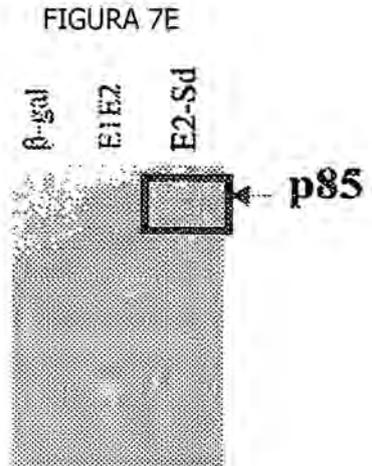
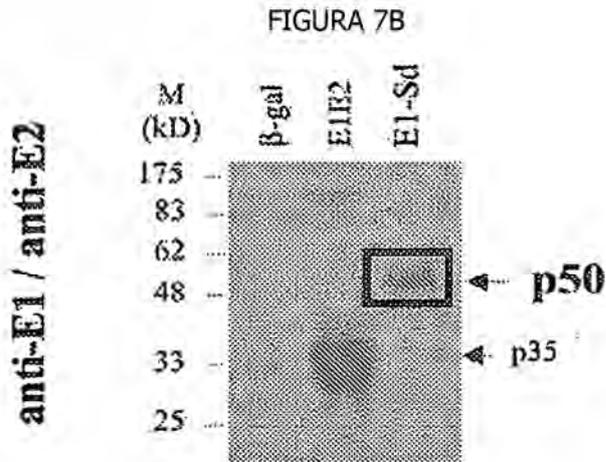


FIGURA 7D



FIGURA 7G

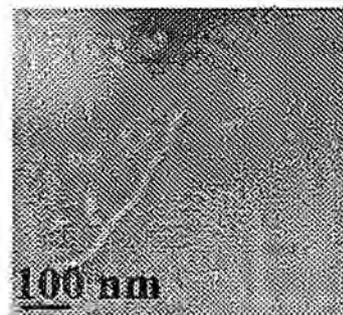


FIGURA 8

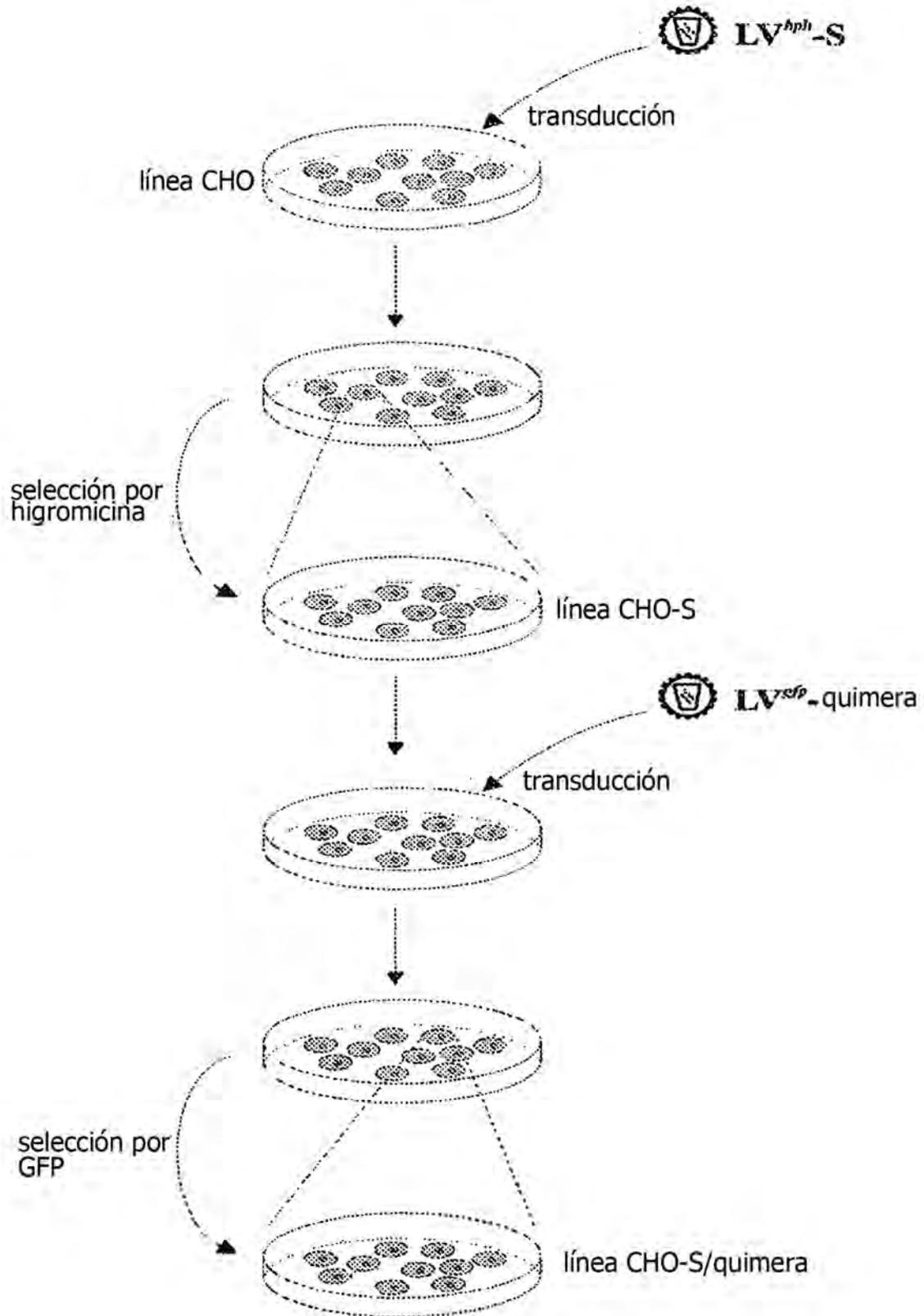


FIGURA 9

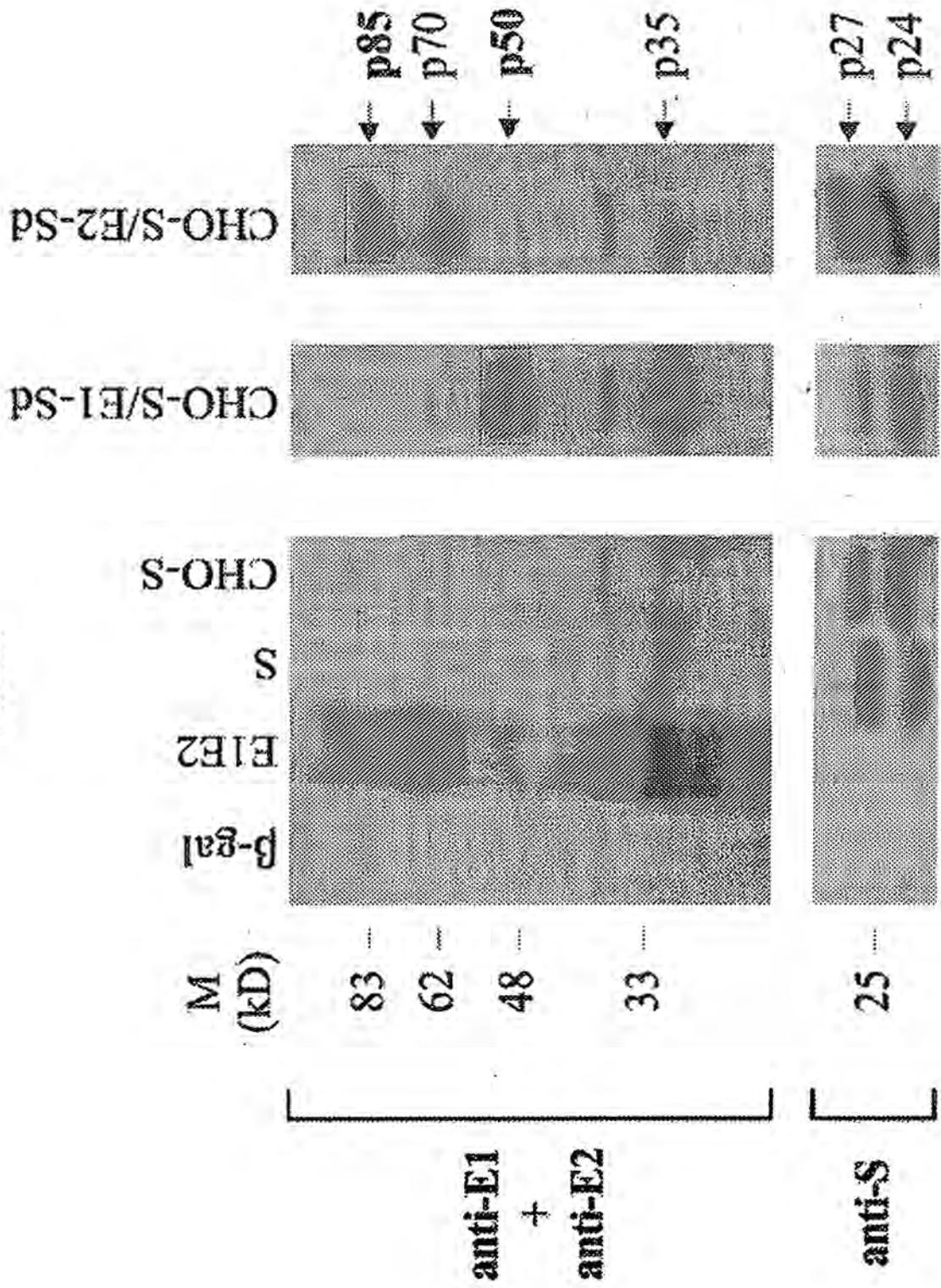


FIGURA 10

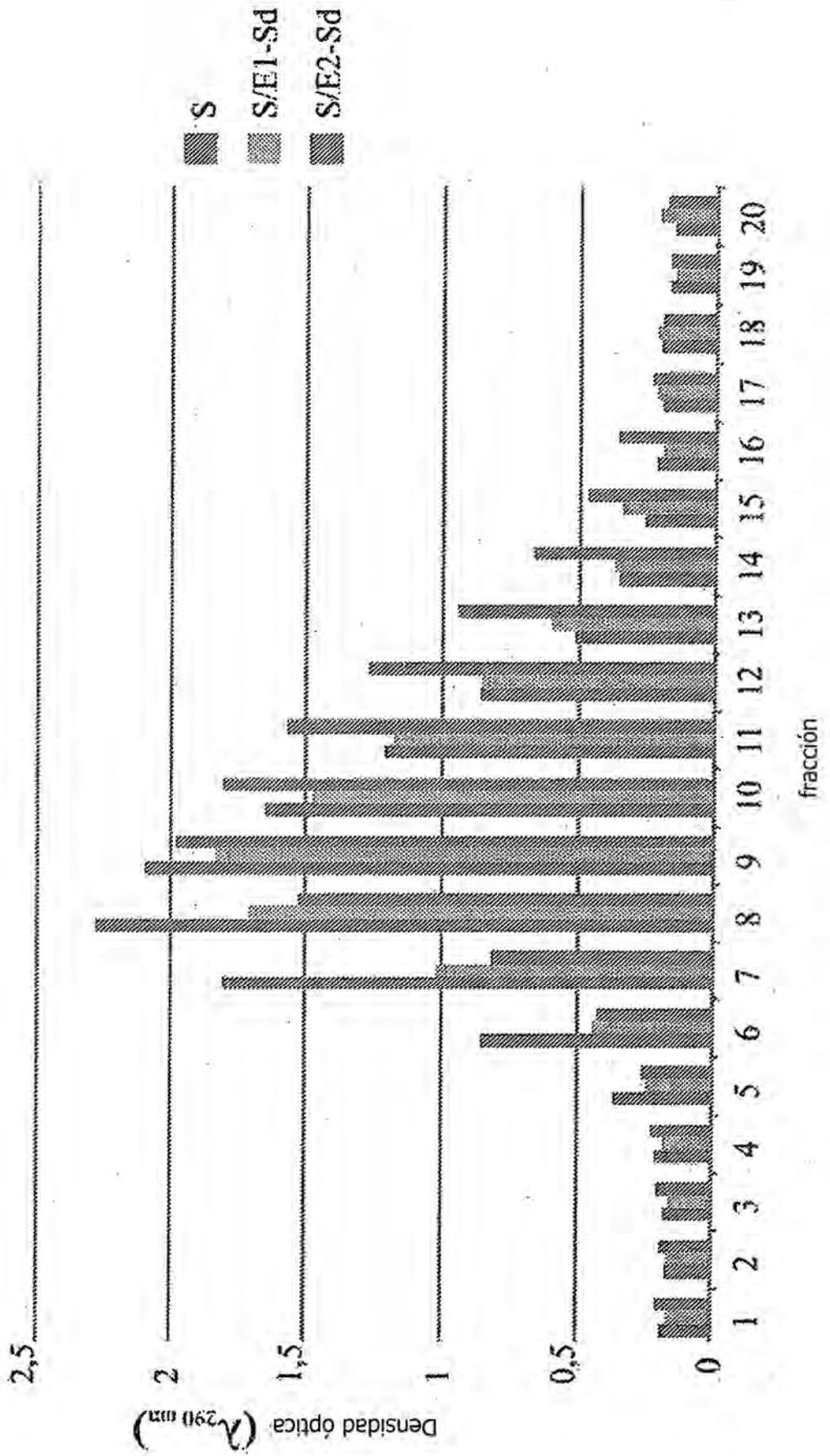


FIGURA 11A

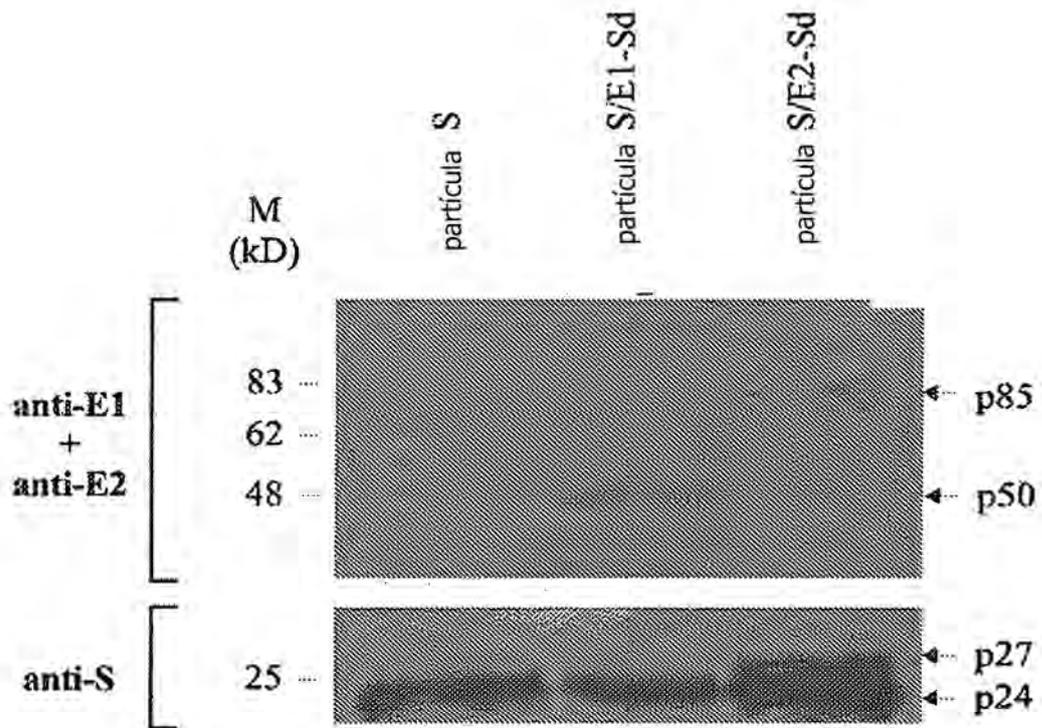


FIGURA 11B

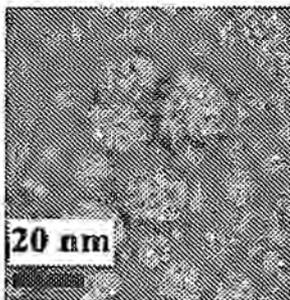


FIGURA 11C

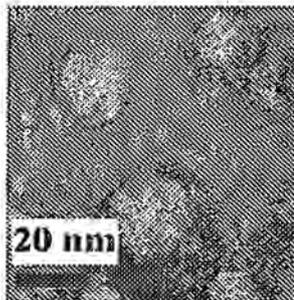


FIGURA 11D

