



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 360 808**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09 (2006.01)

A61K 39/29 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

C12Q 1/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05781421 .2**

96 Fecha de presentación : **24.08.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1801209**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.06.2007**

54 Título: **ARN genómico del virus humano modificado de la hepatitis C con capacidad replicativa autónoma.**

30 Prioridad: **24.08.2004 JP 2004-243975**
01.10.2004 JP 2004-290801
11.03.2005 JP 2005-69725
11.03.2005 JP 2005-69527

73 Titular/es: **TOKYO METROPOLITAN
ORGANIZATION FOR MEDICAL RESEARCH**
8-1, Nishishinjuku 2-chome
Shinjuku-ku, Tokyo 163-8001, JP
TORAY INDUSTRIES, Inc.

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
09.06.2011

72 Inventor/es: **Wakita, Takaji;**
Kato, Takanobu;
Date, Tomoko;
Miyamoto, Michiko;
Bartenschlager, Ralf;
Tanabe, Jun-Ichi y
Sone, Saburo

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
09.06.2011

74 Agente: **Aznárez Urbieto, Pablo**

ES 2 360 808 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

ARN genómico del virus humano modificado de la hepatitis C con capacidad replicativa autónoma

Campo de la Técnica

5 La presente invención se refiere a: un método para replicar de forma autónoma el virus humano de la hepatitis C (VHC) con diversos genotipos en un sistema celular cultivado; al ARN genómico del VHC modificado utilizado para ello; y a células que replican el ARN genómico del VHC descrito anteriormente.

Antecedentes de la Técnica

10 Como resultado de estudios recientes, ha quedado claro que el virus de la hepatitis C se clasifica en un gran número de tipos, dependiendo del genotipo o serotipo. De acuerdo con el método de filoanálisis de Simmonds y col., que utiliza secuencias de nucleótidos de cepas de VHC, método que se está utilizando actualmente como principal método para la clasificación de los genotipos del VHC, el VHC se clasifica en los 6 tipos siguientes: genotipo 1a, genotipo 1b, genotipo 2a, genotipo 2b, genotipo 3a y genotipo 3b (Documento de No-Patente 1). Estos tipos se clasifican además en varios subtipos. Se han determinado también las secuencias de nucleótidos de los genomas de longitud completa de numerosos genotipos del VHC (Documento de Patente 1 y Documentos de No-Patente 2 a 4).

15 El VHC provoca hepatitis crónica como consecuencia de una infección persistente. Una causa principal de la hepatitis crónica, reconocida a escala global, es la infección persistente por VHC. De hecho, aproximadamente un 50% de pacientes infectados persistentemente desarrolla hepatitis crónica y aproximadamente un 20% de los pacientes evoluciona a hepatocirrosis a partir de 10 a 20 años. Además, algunos de estos pacientes desarrollan condiciones patológicas fatales, por ejemplo cáncer de hígado.

20 Actualmente, los principales tratamientos contra la hepatitis C incluyen la utilización de interferón- α o interferón- β y la utilización combinada de interferón- α con ribavirina, que es un derivado del nucleósido purina. Sin embargo, aunque se aplican estos tratamientos en pacientes, sólo se observan sus efectos terapéuticos en aproximadamente un 60% de tales pacientes. Cuando los tratamientos se terminan después de haber obtenido dichos efectos terapéuticos, más de la mitad de los pacientes desarrolla la enfermedad recurrente. Se ha sabido que los efectos terapéuticos del interferón dependen del genotipo de VHC. Esto es, se dice que los efectos del interferón son escasos en el genotipo 1b y que sus efectos son elevados en el genotipo 2a (Documento de No-Patente 5). Además, la especificidad de sustrato de la proteasa del VHC varía dependiendo del genotipo. La actividad inhibitoria de un inhibidor desarrollado mediante la proteasa NS3 del genotipo 1b es 50 veces inferior o más a la que se desarrolla mediante las proteasas NS3 de otros genotipos (Documento de No-Patente 6). En consecuencia, con el fin de desarrollar un agente terapéutico del VHC eficaz, se requiere desarrollar el agente al mismo tiempo que se confirma la reactividad de cada uno de los genotipos del VHC.

25 Recientemente, se ha obtenido un replicón de ARN subgenómico de VHC como un ARN derivado de VHC que se puede replicar de forma autónoma (Documentos de Patente 2 y 3 y Documentos de No-Patente 7 a 9). Por este medio, ya es posible analizar los mecanismos de replicación del VHC utilizando células cultivadas. Dicho replicón de ARN subgenómico de VHC se obtiene mediante la sustitución de una proteína estructural presente aguas abajo del IRES del VHC, en la región no traducida 5' del ARN genómico del VHC, con un gen de resistencia a la neomicina, y el EMCV-IRES que está ligado aguas abajo al mismo. Este replicón de ARN se introdujo en células humanas de cáncer de hígado Huh7 y luego se cultivaron las células en presencia de neomicina. Como consecuencia, se demostró que el replicón de ARN se replicaba de forma autónoma en las células Huh7. Además, también se demostró que varios replicones de ARN subgenómico de VHC se replicaban de forma autónoma en células distintas de Huh7, tales como células humanas de cáncer cervical HeLa o células humanas de cáncer de hígado HepG2 (Documento de Patente 3).

30 Sin embargo, dichos sistemas de replicación de ARN intracelular del VHC se ha obtenido para genotipos limitados, o más bien, se han obtenido dichos sistemas sólo por medio de ARN genómico de un número limitado de cepas de VHC. Por tanto, con respecto al VHC con un gran número de genotipos, resulta extremadamente difícil analizar las diferencias en los efectos terapéuticos de los agentes terapéuticos desarrollados contra el VHC que son provocados por diferencias en los genotipos de los agentes mencionados anteriormente. Dicho replicón de ARN es un sistema experimental que sólo sirve para evaluar la replicación del ARN del virus durante el proceso de crecimiento y replicación del virus VHC. Por tanto, es imposible que dicho replicón de ARN evalúe procesos tales como la formación de partículas del virus VHC en una célula infectada, la liberación del mismo fuera de la célula o la infección de una nueva célula.

35 Actualmente, la aplicación de un método para evaluar procesos tales como la formación de partículas del virus VHC, la liberación del mismo fuera de la célula y la infección de nuevas células se limita a un sistema experimental empleando animales, por ejemplo chimpancés (Documento de No-Patente 10). Sin embargo, este sistema experimental en el que se utilizan directamente cuerpos de

animales vivos implica operaciones complicadas y, por tanto, es extremadamente difícil llevar a cabo análisis con dicho sistema experimental. En consecuencia, con el fin de analizar procesos tales como la formación de partículas del virus VHC, la liberación del mismo fuera de la célula y la infección de nuevas células, o con el fin de desarrollar un agente anti-VHC que utilice la inhibición de estos procesos como mecanismo de acción, es necesario elaborar un sistema experimental extremadamente simplificado capaz de replicar estos procesos; a saber, un sistema de replicación de partículas del virus VHC que utilice un sistema de células cultivadas.

Si fuera posible suministrar de forma estable partículas del virus VHC procedentes de dicho sistema de células cultivadas, el virus podría ser atenuado, o podría producirse un virus VHC no infeccioso por medios basados en la biología molecular, utilizando así dichos virus como vacunas. Sin embargo, debido a que las secuencias proteicas del VHC son diferentes según el genotipo, la antigenicidad del VHC también es diferente según el genotipo. De hecho, la presencia de varios genotipos constituye un impedimento significativo a la producción de vacunas contra el VHC (Documento de No-Patente 11). Por tanto, con el fin de producir eficazmente vacunas contra el VHC también se desea que las partículas del virus VHC con varios genotipos se produzcan de forma estable en un sistema de células cultivadas.

Es sabido que el VHC es una partícula esférica de un tamaño de entre 55 y 65 nm que existe en la sangre de un paciente infectado por HVC. Como método para purificar el VHC presente en el suero humano, se conoce la cromatografía de afinidad que utiliza lectina (Documento de No-Patente 12) y la cromatografía que utiliza heparina (Documento de No-Patente 13). Sin embargo, mediante estos métodos, sólo se puede purificar menos de 1 ml de virus a una concentración de aproximadamente 1M copias/ml. Por tanto, estos métodos no son aplicables industrialmente.

Se han diseñado hasta la fecha diversos métodos para purificar partículas virales distintas del VHC (Documentos de Patente 4, 5, y 6, por ejemplo). Sin embargo, como queda claro a partir de estas publicaciones, las partículas virales tienen diferentes propiedades y, por tanto, las partículas no dan una información útil sobre cuál sería un método óptimo para purificar el virus humano de la hepatitis C. El Documento de Patente 7 describe que el virus de la hepatitis A humana, que es también un virus de la hepatitis, se puede purificar mediante la eliminación de ADN según cromatografía de intercambio iónico. Sin embargo, aunque el virus de la hepatitis A es también un virus de la hepatitis, es un virus que tiene ADN como gen. Como queda claro a partir del hecho de que el virus de la hepatitis C tiene ARN como gen, no existen similitudes relevantes entre el virus de la hepatitis A y el virus de la hepatitis C y, por tanto, no se da ninguna información con respecto a métodos relevantes de purificación. Con el fin de utilizar partículas virales de la hepatitis C humana como vacunas o similares en el campo industrial en el futuro, se requiere purificar a alto nivel dichas partículas en un gran volumen. En estas circunstancias, se anticipa el desarrollo de un método de purificación.

Documento de Patente 1: Publicación de Patente JP (Kokai) N° 2002-171978 A

Documento de Patente 2: Publicación de Patente JP (Kokai) N° 2001-17187 A

Documento de Patente 3: WO2004/104198A1

Documento de Patente 4: Patente Japonesa N° 3313117

Documento de Patente 5: Publicación de Patente JP (Kohyo) N° 2002-503484 A

Documento de Patente 6: Publicación de Patente JP (Kohyo) N° 2000-510682 A

Documento de Patente 7: Publicación de Patente JP (Kokoku) N° 6-48980 B (1994)

Documento de No-Patente 1: Simmonds P. y col., *Hepatology*, 10 (1994) pp. 1321-1324

Documento de No-Patente 2: Choo Q. L. y col., *Science*, 244 (1989) pp. 359-362

Documento de No-Patente 3: Okamoto H. y col., *J. Gen. Virol.*, 73 (1992) pp. 673-679

Documento de No-Patente 4: Mori S. y col., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 183 (1992) pp. 334-342

Documento de No-Patente 5: Yoshioka K. y col., *Hepatology*, 16 (1992) pp. 293-299

Documento de No-Patente 6: Thibeault D. y col., *J. Virol.*, 78 (2004) pp. 7352-7359

Documento de No-Patente 7: Blight y col., *Science*, 290 (2000) pp. 1972-1974

Documento de No-Patente 8: Friebe y col., *J. Virol.*, 75 (2001) pp. 12047-12057

Documento de No-Patente 9: Kato T. y col., *Gastroenterology*, 125 (2003) pp. 1808-1817

Documento de No-Patente 10: Kolykhalov y col., Science, 277 (1997) pp. 570-574

Documento de No-Patente 11: Farci P. y col., Semin Liver Dis 20 (2000) pp. 103-126

Documento de No-Patente 12: Virology, 196 (1993) pp. 354-357

Documento de No-Patente 13: Journal of General Virology 86 (2005) pp. 677-685

5 Descripción de la Invención

Es un objeto de la presente invención proporcionar un método para replicar y amplificar el virus de la hepatitis C con varios genotipos en un sistema de células cultivadas.

10 Como resultado de intensivos estudios dirigidos a la consecución del objeto mencionado anteriormente, los presentes inventores han producido ARN genómico del virus modificado de la hepatitis C mediante la combinación de ARN genómico de una cepa JFH1 de VHC, que se puede replicar de forma autónoma con el ARN genómico de una cepa de VHC, que no se puede replicar de forma autónoma *in vitro*. Los inventores han descubierto que el ARN genómico así producido se puede replicar de forma autónoma en un sistema de células cultivadas. Específicamente, con respecto a la invención mencionada
15 comprendida entre la secuencia codificadora de la proteína NS3 de la cepa JFH1 y el terminal 3' de la misma permite la modificación del ARN genómico del VHC 1b, que no se puede replicar de forma autónoma *in vitro*, para resultar en un ARN que se puede replicar de forma autónoma en un sistema de células cultivadas.

20 Es decir, la presente invención se refiere a ARN genómico del virus modificado de la hepatitis C que comprende secuencias de nucleótidos de porciones de ARN genómico de dos o más tipos de virus de hepatitis C, comprendiendo una región no traducida 5', una secuencia codificadora de la proteína del núcleo, una secuencia codificadora de la proteína E1, una secuencia codificadora de la proteína E2, una secuencia codificadora de la proteína p7, una secuencia codificadora de la proteína NS2, secuencias codificadoras de las proteínas NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B de una cepa JFH1 y una región no
25 traducida 3', y que se puede replicar de forma autónoma, donde una de las cepas del virus de la hepatitis C es un virus del genotipo 1b.

Específicamente, en una realización, la presente invención se proporciona el ARN genómico del virus modificado de la hepatitis C, que es producido por la sustitución de una porción del ARN genómico del virus 1b de la hepatitis C comprendido entre una secuencia codificadora de la proteína NS3 y una
30 secuencia codificadora de la proteína NS5B, que es una secuencia genómica en el terminal 3', con una secuencia parcial de ARN que codifica las proteínas NS3, NS4, NS5A y NS5B de una cepa JFH1 mostrada en la SEQ ID NO:1 (secuencia de ARN obtenida mediante la sustitución de T por U en una secuencia correspondiente a 3867-9678 de la secuencia de ADN depositada bajo el N° de Acceso al GenBank AB047639), y que se puede replicar de forma autónoma.

35 En otra realización, la presente invención proporciona ARN genómico del virus modificado de la hepatitis C, que es producido por la sustitución de la secuencia codificadora de la proteína NS5B del ARN genómico del virus de la hepatitis C por la secuencia codificadora de la proteína NS5B de la cepa JFH1 mostrada en la SEQ ID NO:2 y que se puede replicar de forma autónoma, donde una de las cepas del virus de la hepatitis C es un virus del genotipo 1b.

40 Las cepas de los dos o más tipos de virus de la hepatitis C utilizados aquí incluyen un virus de la hepatitis C con genotipo 1b y un virus de la hepatitis C con genotipo 2a. Ejemplos de cepas virales con genotipo 1b pueden incluir una cepa con1 de VHC, una cepa TH de VHC, una cepa J de VHC, una cepa JT de VHC y una cepa BK de VHC. La cepa viral con genotipo 2a es una cepa JFH1 de VHC.

45 El ARN genómico del virus modificado de la hepatitis C de la presente invención puede comprender además al menos un gen marcador selectivo y/o al menos un gen reporter y al menos una secuencia IRES.

En este caso, el ARN genómico del virus modificado de la hepatitis C comprende la región no traducida 5' descrita anteriormente, al menos un gen marcador selectivo y/o al menos un gen reporter, al menos una secuencia IRES, una secuencia codificadora de la proteína del núcleo, una secuencia
50 codificadora de la proteína E1, una secuencia codificadora de la proteína E2, una secuencia codificadora de la proteína p7, una secuencia codificadora de la proteína NS2, una secuencia codificadora de la proteína NS3, una secuencia de la proteína NS4A, una secuencia codificadora de la proteína NS4B, una secuencia codificadora de la proteína NS5A, una secuencia codificadora de la proteína NS5B y una región no traducida 3', en este orden, en la dirección desde el terminal 5' al terminal 3'.

55 A modo de ejemplo de ARN genómico del virus modificado de la hepatitis C mencionado anteriormente, la presente especificación describe un ARN genómico del virus modificado de la hepatitis C, que comprende:

- (a) un ARN con la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO:11; o
- (b) un ARN con una secuencia de nucleótidos que comprende una delección, sustitución o adición de uno o más, preferentemente 100, en particular 50 y especialmente 10 nucleótidos, con respecto a la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO:11 y que se puede replicar de forma autónoma y generar partículas virales de la hepatitis C.

Además, la presente invención también proporciona una célula en la que se introduce el ARN genómico del virus modificado de la hepatitis C de la presente invención y que replica el ARN genómico del virus de la hepatitis C descrito anteriormente y puede generar partículas virales. Aquí, como célula huésped se utiliza preferentemente una célula proliferativa. Ejemplos particularmente preferentes de tales células huésped pueden incluir células eucariotas, incluyendo células procedentes del hígado humano tales como células Huh7, células HepG2, células IMY-N9, células HeLa o células 293, células cervicales humanas y células procedentes del riñón fetal humano.

Además, la presente invención proporciona también: un método para producir partículas virales de la hepatitis C caracterizado porque comprende el cultivo de la célula mencionada anteriormente y la recuperación de las partículas virales del cultivo; y las partículas virales de la hepatitis C producidas por el método anterior.

Además, la presente invención proporciona asimismo: un método para producir una célula infectada por el virus de la hepatitis C que se caracteriza porque el método comprende el cultivo de la célula mencionada anteriormente y la infección de otra célula por partículas virales contenidas en el cultivo; y una célula infectada por el virus de la hepatitis C producida por el método anterior. En la presente invención, dichas partículas de VHC son purificadas mediante cromatografía en columna y/o centrifugación en gradiente de densidad, para obtener partículas de VHC con una pureza que permite su utilización industrial en productos farmacéuticos. La cromatografía utilizada aquí consiste en uno o más tipos de cromatografía seleccionados de entre cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel y cromatografía de afinidad. La centrifugación en gradiente de densidad se lleva a cabo con uno o más solutos seleccionados de entre cloruro de cesio, sacarosa y polímeros de azúcar, para purificar el VHC.

Adicionalmente, la presente invención proporciona también un método para cribar ("screening") una sustancia viral anti-hepatitis C utilizando la célula de la presente invención o una célula infectada por el virus de la hepatitis C. Este método se caracteriza porque comprende el cultivo de la célula de la presente invención, o una célula infectada por el virus de la hepatitis C, en presencia de una sustancia de prueba y la detección del ARN viral de la hepatitis C o de partículas virales en el cultivo, evaluando así los efectos del virus anti-hepatitis C en la sustancia de prueba descrita anteriormente.

También, la presente invención proporciona asimismo un método para producir una vacuna contra la hepatitis C mediante las partículas virales de la hepatitis C de la presente invención, o una porción de las mismas, como antígenos.

Además, la presente invención proporciona también: un método para replicar y/o expresar un gen extraño en una célula, que se caracteriza porque el método comprende la inserción del ARN que codifica el gen extraño en el ARN genómico del virus modificado de la hepatitis C de la presente invención y la introducción del ARN genómico en una célula de interés, para replicar o expresar el gen extraño en su interior; y un vector viral dirigido a la célula hepática, que comprende el ARN genómico del virus modificado de la hepatitis C de la presente invención.

De acuerdo con la presente invención, pueden producirse partículas virales del VHC infecciosas utilizando un sistema de células cultivadas. Además, aún en el caso de una cepa de VHC que no puede replicarse de forma autónoma y que se aísla de pacientes, una región de la misma correspondiente a la región desde la región NS3 hasta el terminal 3' se sustituye por ARN genómico del virus de JFH1, o la región NS5B se sustituye por NS5B de JFH1, de modo que la cepa de VHC anterior se puede replicar de forma autónoma *in vitro*. En consecuencia, se pueden producir partículas virales del VHC con varios genotipos en un sistema de células cultivadas y estas partículas virales se utilizan eficazmente para estudios relacionados con el proceso de infección por VHC o para la producción de un sistema de screening para diversas sustancias que afectan a dicho proceso de infección por VHC y una vacuna contra el VHC.

Breve Descripción de las Figuras

Figura 1: vista esquemática que muestra los procedimientos para construir la plantilla de ADN utilizada para producir el ARN genómico del VHC de la presente invención. La figura muestra la estructura de un clon plásmido pJFH1 obtenido mediante la inserción del genoma de longitud completa del VHC aguas abajo de un promotor T7. Los símbolos mostrados en la figura tienen los siguientes significados: T7: promotor de ARN T7; 5'-UTR: región no traducida 5'; C: proteína del núcleo; E1, E2: proteínas de envoltura; NS2, NS3, NS4A NS4B, NS5A, NA5B: proteínas no estructurales; 3'-UTR: región no traducida

3'; Agel, Pmel, Xbal: sitios de clivaje de las enzimas de restricción de Agel, Pmel y Xbal; y GDD: la posición de un motivo GDD de los aminoácidos que corresponde al centro activo de una proteína NS5B.

Figura 2: fotografía que muestra los resultados del análisis Northern blot indicando la replicación de rJFH1 en células Huh7 en las que se ha introducido el rJFH1, es decir, el ARN genómico del VHC.

5 Figura 3: resultados de la detección de una proteína núcleo del VHC, una proteína NS3, una proteína NS5A y una proteína E2, en un medio.

Figura 4: resultados del curso temporal de los cambios en la liberación de una proteína núcleo de las células en las que se ha introducido el ARN genómico del VHC, en un medio.

Figura 5: incluye gráficos, mostrando cada uno la cantidad de proteína núcleo del VHC y la cantidad de ARN genómico del VHC en cada fracción obtenida mediante fraccionamiento en gradiente de densidad de sacarosa del sobrenadante de cultivo de células Huh7 en las que se ha introducido rJFH1. El círculo relleno representa una proteína núcleo (núcleo) del VHC y el círculo vacío representa el ARN genómico del VHC. La Figura 5A muestra los resultados para células no tratadas Huh7 con rJFH1 introducido. La Figura 5B muestra los resultados de células Huh7 con rJFH1 introducido tratadas con RNAsa. La Figura 5C muestra los resultados de células Huh7 con rJFH1 introducido tratadas con NP40. La Figura 5D muestra los resultados de células Huh7 con rJFH1 introducido tratadas con NP40+RNAsa.

10

15

Figura 6: muestra la capacidad infecciosa de las partículas virales secretadas de la solución de cultivo de células Huh7 con rJFH1 introducido. La Figura 6A incluye fotografías que muestran los resultados de una inmunotinción con un anticuerpo anti-núcleo (izquierda) y con un anticuerpo anti-NS5A (derecha). La Figura 6B es un gráfico que muestra el número de células positivas teñidas con un anticuerpo anti-núcleo. La Figura 6C incluye gráficos que muestran el cambio con el tiempo del nivel de ARN de VHC en las células (izquierda) y en el sobrenadante (derecha).

20

Figura 7: muestra la capacidad de infección de las partículas virales secretadas de la solución de cultivo de células Huh7 con rJCH1/NS5B(jfh 1) introducidos. La Figura 7A es un gráfico que muestra el aumento del ARN de VHC de las partículas virales secretadas en la solución de cultivo de las células Huh7 con rJCH1/NS5B(jfh 1) introducidos, en células nativas Huh7. La Figura 7B es un gráfico que muestra el número de células positivas teñidas con un anticuerpo anti-núcleo.

25

Figura 8: muestra la estructura de un replicón quimérico de TH/JFH.

Figura 9: muestra los resultados referentes a la formación de colonias mediante transfección del ARN del replicón quimérico de rTH/JFH1.

30

Figura 10: muestra los resultados referentes a la formación de colonias mediante la infección por el sobrenadante de cultivo del replicón quimérico de TH/JFH1.

Figura 11: muestra los perfiles de elución de la cromatografía de filtración en gel. El eje vertical representa la absorbancia a una longitud de onda de 490 nm. S-300, S-400 y S-500 representan Sephacryl(R) S-300, S-400 y S-500 respectivamente. El eje horizontal representa la cantidad de elución eluída de la columna.

35

Figura 12: muestra los perfiles de elución de la cromatografía de intercambio iónico. El eje vertical representa la cantidad de proteína núcleo en las partículas de VHC.

Figura 13: muestra los perfiles de elución de la cromatografía de afinidad con lectina. El eje vertical representa la cantidad de proteína núcleo en las partículas de VHC.

40

Figura 14: muestra los perfiles de elución en dos tipos de cromatografía de afinidad utilizando heparina y celulofina sulfatada. El eje vertical representa la absorbancia a una longitud de onda de 490 nm.

Figura 15: muestra el perfil de elución de la cromatografía de afinidad con tinción azul. El eje vertical representa la cantidad de proteína núcleo en las partículas de VHC.

45

Figura 16: muestra los perfiles de purificación que implican la utilización combinada de cromatografía en columna con centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa. El eje vertical representa la cantidad de proteína núcleo en las partículas de VHC. Con respecto a la centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa, la densidad de cada fracción de solución así como la cantidad de proteína núcleo en VHC se muestran en el eje vertical.

50

Esta especificación incluye el contenido tal como se describe en la especificación y/o figuras de las Solicitudes de Patentes Japonesas N° 2004-243975, 2004-290801, 2005-69527 y 2005-69725, que son documentos de prioridad de la presente solicitud.

Forma de Realización de la Invención

La presente invención se describe detalladamente a continuación.

1. ARN genómico viral modificado quimérico de la hepatitis C

5 El genoma de un virus de la hepatitis C (VHC) es un ARN de una sola hebra, es decir hebra (+), que se compone de aproximadamente 9.600 nucleótidos. Este ARN genómico comprende una región no traducida 5' (denominada también 5'-NTR o 5'-UTR), una región traducida compuesta de una región estructural y una región no estructural y una región no traducida 3' (denominada también 3'-NTR o 3'-UTR). La región estructural codifica proteínas estructurales de VHC y la región no estructural codifica diversas proteínas no estructurales.

10 Dichas proteínas estructurales del VHC (núcleo, E1 y E2) y proteínas no estructurales del VHC (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B) son traducidas como una poliproteína continua procedente de la región traducida. A continuación, la poliproteína es sometida a digestión limitada con proteasa de modo que las proteínas se puedan liberar y generar. Entre estas proteínas estructurales y no estructurales (a saber, proteínas del virus VHC), el núcleo es una proteína núcleo y E1 y E2 son proteínas de envoltura. 15 La proteína no estructural es una proteína asociada a la replicación de un virus *per se*. Es sabido que NS2 tiene actividad metaloproteasa y que NS3 tiene actividad serina-proteasa (un tercio del lado N-terminal) así como la actividad helicasa (dos tercios del lado C-terminal). Además, se ha reportado también que NS4A es un cofactor de la actividad proteasa de NS3 y que NS5B tiene actividad ARN polimerasa dependiente del ARN.

20 Actualmente, se sabe que los genotipos del VHC se clasifican al menos en el tipo 1 hasta el tipo 6. El VHC se clasifica en varios genotipos (VHC1a, VHC1b, VHC2a, VHC2b, etc.) dependiendo de su secuencia, de acuerdo con la clasificación internacional de Simmonds y col. (véase Simmonds P. y col., Hepatology, (1994) 10, pp. 1321-1324). En la presente invención, el ARN genómico del VHC que no se puede replicar de forma autónoma no se limita a los tipos de virus conocidos mencionados anteriormente, 25 sino que incluye todos los tipos de ARN genómico de VHC que no se pueden replicar de forma autónoma, es decir, con capacidad para liberar partículas infecciosas fuera de la célula. En la presente invención, la expresión "ARN que se puede replicar de forma autónoma" o "que se replica de forma autónoma" pretende significar que cuando se introduce ARN genómico de VHC en una célula, el ARN genómico del VHC se replica de forma autónoma, es decir puede liberar partículas infecciosas fuera de la célula.

30 En la presente especificación, el ARN que incluye el ARN genómico del VHC mencionado anteriormente que se puede replicar de forma autónoma en un sistema de células cultivadas se denomina "ARN replicón" o "replicón de ARN". En la presente especificación, el ARN replicón de la presente invención, que comprende el ARN replicón de longitud completa, se denomina "ARN replicón de VHC de longitud completa". El ARN replicón de VHC de longitud completa de la presente invención tiene la capacidad de generar partículas virales. Además, el ARN genómico del virus modificado de la hepatitis C 35 de la presente invención es ARN replicón de VHC de longitud completa.

El ARN genómico del virus modificado de la hepatitis C de la presente invención incluye un ARN genómico modificado de la hepatitis C que tiene las secuencias de nucleótidos de porciones de ARN genómico de dos o más tipos de virus de la hepatitis C, comprendiendo una región no traducida 5', una 40 secuencia codificadora de la proteína del núcleo, una secuencia codificadora de la proteína E1, una secuencia codificadora de la proteína E2, una secuencia codificadora de la proteína p7, una secuencia codificadora de la proteína NS2, la secuencia codificadora de la proteína de cada una de NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B de una cepa JFH1 y una región no traducida 3', y se puede replicar de forma autónoma. Específicamente, en una realización, la presente invención incluye ARN genómico del virus 45 modificado de la hepatitis C que se produce mediante la sustitución de una porción del ARN genómico del virus de la hepatitis C que comprende desde la secuencia codificadora de la proteína NS3 hasta la secuencia codificadora de la proteína NS5B, es decir una secuencia del genoma en el terminal 3', por una secuencia parcial de ARN que codifica las proteínas NS3, NS4, NS5A y NS5B de la cepa JFH1 mostrada en la SEQ ID NO:1 (secuencia de ARN obtenida mediante la sustitución de T por U en una secuencia que 50 corresponde a 3867-9678 de la secuencia de ADN depositada bajo el N° de Acceso al GenBank AB047639), y que se puede replicar de forma autónoma.

En otra realización, la presente invención proporciona ARN genómico del virus modificado de la hepatitis C producido mediante la sustitución de la secuencia codificadora de la proteína NS5B del ARN genómico del virus de la hepatitis C por la secuencia codificadora de la proteína NS5B de la cepa JFH1 55 mostrada en la SEQ ID NO:2, y que se puede replicar de forma autónoma.

Preferentemente, la presente invención incluye ARN genómico del virus modificado de la hepatitis C obtenido mediante virus de hepatitis C con los genotipos 1b y 2a, teniendo una secuencia de nucleótidos que comprende una región no traducida 5', una secuencia codificadora de la proteína del núcleo, una secuencia codificadora de la proteína E1, una secuencia codificadora de la proteína E2, una 60 secuencia codificadora de la proteína p7, una secuencia codificadora de la proteína NS2, la secuencia

codificadora de la proteína de cada una de NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B de la cepa JFH1 y una región no traducida 3', y que se puede replicar de forma autónoma.

5 El ARN genómico del virus modificado de la hepatitis C descrito anteriormente puede comprender además al menos un gen marcador selectivo y/o al menos un gen reporter, y al menos una secuencia IRES.

10 En la presente invención, utilizando una cepa de VHC que se puede replicar de forma autónoma en un sistema de células cultivadas con la combinación de una cepa de VHC que no se puede replicar de forma autónoma en dicho sistema de células cultivadas, debido a dos o más tipos de virus de la hepatitis C, la cepa del VHC que no se puede replicar de forma autónoma se puede modificar para que se convierta en replicada de forma autónoma. De otro modo, una cepa viral que se replica eficazmente de forma autónoma se puede modificar para convertirse en replicada de forma autónoma muy eficazmente.

15 Ejemplos específicos de cepas conocidas de VHC de tipo 1a puede incluir una cepa VHC-1, una cepa VHC-H y una cepa VHC-J1. Ejemplos específicos de cepas conocidas de VHC de tipo 1b puede incluir una cepa VHC-con1, una cepa VHC-TH, una cepa VHC-J, una cepa VHC-JT y una cepa VHC-BK. Ejemplos específicos de cepas conocidas de VHC de tipo 2a pueden incluir una cepa VHC-J6, una cepa JFH-1 y una cepa JCH1. Un ejemplo de cepa conocida de VHC de tipo 2b puede ser una cepa HC-J8. Un ejemplo de cepa conocida de VHC de tipo 3a puede ser una cepa E-b1. La estructura de estos virus se compone básicamente de 5'-UTR, núcleo, E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a, NS5b y 3'-UTR (tal como se ha descrito anteriormente). Se ha determinado la secuencia de nucleótidos de cada región de cada cepa del VHC mencionadas anteriormente. Por ejemplo, se han determinado las secuencias de nucleótidos de las regiones que corresponden al núcleo, E1, E2, p7 y NS2 en la secuencia de longitud completa de la cepa TH. Además, en la secuencia de la cepa VHC-JT, se han determinado las regiones que corresponden al núcleo, E1, E2, p7 y NS2. Un ejemplo de ARN replicón de la presente invención puede ser ARN del replicón quimérico de VHC, que se obtiene mediante una cepa JFH1 del tipo 2a del VHC y otras cepas distintas de la cepa JFH1 del tipo 2a del VHC, tal como una cepa de VHC, una cepa VHC-H, una cepa VHC-J1, una cepa VHC-con1, una cepa VHC-TH (Wakita y col., J. Biol. Chem. (1994), 269, pp. 14205-14210; y Moradpour y col., Biochem. Biophys. Res. Commun., (1998) 246, pp. 920-924), una cepa VHC-J, una cepa VHC-JT, una cepa VHC-BK, una cepa VHC-J6, una cepa JCH1, una cepa HC-J8 o una cepa E-b1.

30 Además, un ejemplo preferente del ARN genómico de VHC modificado de la presente invención puede ser un ARN genómico de VHC obtenido mediante la sustitución de una región que corresponde a la región desde la región NS3 hasta el lado 3'-terminal del ARN genómico de VHC de la cepa JFH1 del virus de la hepatitis C por ARN genómico viral de JFH 1, o mediante la sustitución de la secuencia codificadora de la proteína NS5B por la secuencia codificadora de la proteína NS5B de otro ARN genómico de VHC o por la inserción aquí de la secuencia anterior. Por ejemplo, en el caso de JCH1 (ref) del ARN genómico de VHC, que se conoce por no ser capaz de replicarse *in vitro*, una región que corresponde a la región desde la región NS3 de la misma hasta el lado 3'-terminal es sustituida por ARN genómico viral de JFH1 con el fin de que el ARN genómico del VHC se pueda modificar para resultar en un ARN genómico de VHC que pueda replicarse de forma autónoma.

40 Además, en el caso del clon Con-1 (ref) del ARN genómico del VHC con genotipo 1b de VHC (Nº de Acceso a EMBL AJ238799), una porción de secuencia del ARN del mismo que codifica las proteínas NS3, NS4, NS5A y NS5B es sustituida por la secuencia de ARN de una cepa JFH1 que codifica las proteínas NS3, NS4, NS5A y NS5B, o sólo la porción de secuencia de ARN que codifica la proteína NS5B del clon Con-1 (ref) con genotipo 1b del VHC es sustituida por la secuencia de ARN que codifica la proteína NS5B de la cepa JFH1, de forma que el ARN genómico del VHC se puede modificar para resultar en un ARN genómico de VHC que se puede replicar de forma autónoma.

50 El replicón de longitud completa que utiliza un gen del clon Con-1 puede ser replicado de forma autónoma, pero no forma partículas de VHC (véase Pietschmann y col., Journal of Virology, (2002) 76, pp. 4008-4021). Sin embargo, tal como se describe en el ejemplo de la presente invención, dichas partículas de VHC se pueden formar mediante la sustitución de una porción de la secuencia de ARN que codifica las proteínas NS3, NS4, NS5A y NS5B por la secuencia de ARN que codifica las proteínas NS3, NS4, NS5A y NS5B de la cepa JFH1. Es decir, según el método de la presente invención, el ARN genómico del virus de la hepatitis C que puede replicarse de forma autónoma pero que es incapaz de formar partículas de VHC se puede convertir en ARN genómico del virus modificado de la hepatitis C capaz de formar partículas.

60 Además, aún en el caso de un VHC que es incapaz de producir un replicón que se pueda replicar de forma autónoma, tal como una cepa TH o una cepa JCH, se forman partículas de VHC mediante la producción de un gen quimérico del mismo con la cepa JFH-1, tal como se describe en el ejemplo de la presente invención. En consecuencia, la presente invención permite la conversión del ARN genómico del VHC que no puede replicarse de forma autónoma en un ARN genómico del virus modificado de la hepatitis C que puede formar partículas de VHC.

Además, mediante la introducción de una mutación en NS5B de la porción de secuencia de ARN de la cepa JFH1, el crecimiento del ARN genómico del VHC finaliza y también lo hace la generación de partículas de VHC. Por tanto, aparentemente, la NS5B desempeña un papel importante en permitir que el ARN genómico del VHC se replique de forma autónoma y genere partículas.

5 Actualmente, el VHC se clasifica en varios genotipos (VHC1a, VHC1b, VHC2a, VHC2b, etc.) dependiendo de su secuencia, de acuerdo con la clasificación internacional de Simmonds y col., (véase Simmonds P. y col., *Hepatology*, (1994) 10, pp. 1321-1324). En la presente invención, el ARN genómico del VHC que no se puede replicar de forma autónoma no se limita a los tipos de virus conocidos mencionados anteriormente, sino que incluye todos los tipos de ARN genómico de VHC que no se
10 pueden replicar de forma autónoma.

En la presente invención, la secuencia codificadora de la proteína NS5B es una secuencia codificadora de la proteína NS5B derivada de la cepa JFH1 (SEQ ID NO:3), pero tiene la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO:2. Sin embargo, la secuencia codificadora de la proteína NS5B de la presente invención incluye también secuencias de nucleótidos que pueden hibridarse con la secuencia
15 de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO:2 bajo condiciones astringentes, siempre que dichas secuencias de nucleótidos codifiquen los aminoácidos que funcionan como una proteína NS5B (por ejemplo, una proteína NS5B que comprende una sustitución conservadora).

El término "condiciones astringentes" pretende indicar, por ejemplo, condiciones que consisten en una concentración de sodio de entre 300 y 2.000 mM y una temperatura entre 40°C y 75°C, preferentemente una concentración de sodio entre 600 y 900 mM y una temperatura de 65°C. Los especialistas en la técnica pueden obtener fácilmente el homólogo de NS5B mencionado anteriormente, con referencia a la clonación molecular (Sambrook J. y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 10 Skyline Drive Plainview, NY (1989)).

20 El ARN genómico del VHC de la presente invención tiene una porción de secuencia de ARN que codifica las proteínas NS3, NS4, NS5A y NS5B en el ARN genómico del VHC con JFH1 o una secuencia codificadora de la proteína NS5B.

En una realización, el ARN genómico del VHC de la presente invención es un ARN que tiene una secuencia de nucleótidos que incluye una región no traducida 5', una secuencia codificadora de la proteína del núcleo, una secuencia codificadora de la proteína E1, una secuencia codificadora de la proteína E2, una secuencia codificadora de la proteína NS2, una secuencia codificadora de la proteína NS3, una secuencia codificadora de la proteína NS4A, una secuencia codificadora de la proteína NS4B, una secuencia codificadora de la proteína NS5A, una secuencia codificadora de la proteína NS5B y una región no traducida 3' en el ARN genómico de la cepa viral de la hepatitis C. Además, en el ARN anterior, la porción de secuencia del ARN mencionado anteriormente que codifica las proteínas NS3, NS4, NS5A y
30 NS5B es una porción de secuencia de ARN que codifica las proteínas NS3, NS4, NS5A y NS5B que procede del ARN genómico de VHC con JFH1 introducido de forma extraña. Preferentemente, se trata de ARN en el que la secuencia codificadora de la proteína NS5B del mismo es una secuencia codificadora de la proteína NS5B derivada de ARN genómico del VHC con JFH1 introducido de forma extraña.

En la especificación de la presente invención, "región no traducida 5' (5'-NTR o 5'-UTR)", "secuencia codificadora de la proteína del núcleo (región del núcleo o región C)", "secuencia codificadora de la proteína E1 (región E1)", "secuencia codificadora de la proteína E2 (región E2)", "secuencia codificadora de la proteína NS2 (región NS2)", "secuencia codificadora de la proteína NS3 (región NS3)", "secuencia codificadora de la proteína NS4A (región NS4A)", "secuencia codificadora de la proteína NS4B (región NS4B)", "secuencia codificadora de la proteína NS5A (región NS5A)", "secuencia codificadora de la proteína NS5B (región NS5B)", "región no traducida 3' (3'-NTR o 3'-UTR)" y otras regiones o sitios
40 específicos ya son conocidos en varios genotipos. Las regiones o sitios mencionados anteriormente de una cepa de VHC desconocida se pueden determinar fácilmente mediante la alineación de la secuencia de ARN genómico de longitud completa de un VHC conocido con aquella de la cepa de VHC anterior.

El término "gen marcador selectivo" se utiliza en la presente invención en referencia a un gen que puede conferir a las células selectividad para seleccionar solamente aquellas células en las que se ha expresado el gen. Un ejemplo común de dicho gen marcador selectivo puede ser un gen de resistencia a antibióticos. Ejemplos de tal gen marcador selectivo que se pueden utilizar preferentemente en la presente invención pueden incluir un gen de resistencia a la neomicina, un gen de la timidina-quinasa, un gen de resistencia a la canamicina, un gen de resistencia a la piritiamina, un gen de adenilil-transferasa, un gen de resistencia a la zeocina y un gen de resistencia a la puromicina. De entre ellos, son preferentes el gen de resistencia a la neomicina y el gen de la timidina-quinasa, siendo especialmente preferente un gen resistente a la neomicina. Sin embargo, los genes marcadores selectivos utilizados en la presente invención no se limitan a los mismos.

El término "gen reporter" se utiliza en la presente invención en referencia a un gen marcador que
60 codifica un producto genético que actúa como indicador de la expresión del gen. Un ejemplo común de dicho gen reporter puede ser un gen estructural de una enzima que cataliza una reacción luminosa o una

reacción de tinción. Ejemplos de genes reporter que se pueden utilizar preferentemente en la presente invención pueden incluir un gen de la cloramfenicol-acetiltransferasa derivado del transposón Tn9, un gen de la β -glucuronidasa o β -galactosidasa derivado de *Escherichia coli*, un gen de la luciferasa, un gen de la proteína verde fluorescente, un gen de la aequorina derivado de la medusa y una forma secretada del gen de la fosfatasa alcalina placentaria humana (SEAP). Sin embargo, los genes reporter utilizados en la presente invención no se limitan a los mismos.

Uno de los genes marcadores selectivos y reporter mencionados anteriormente puede estar incluido en el ARN del replicón, o ambos pueden estar incluidos también dentro del mismo. Con respecto a dicho gen marcador selectivo o gen reporter, el gen puede estar incluido en el ARN genómico del virus modificado de la hepatitis C o dos o varios genes pueden estar contenidos también dentro del mismo.

El ARN genómico del VHC de la presente invención puede comprender además un ARN que codifica cualquier gen extraño que deba expresarse en las células en las que se introduce el ARN genómico del VHC de longitud completa. Este ARN que codifica un gen extraño puede estar ligado aguas abajo de la región no traducida 5' o puede estar ligado aguas arriba de la región no traducida 3'. Asimismo, dicho ARN puede ser insertado en cualquier espacio de entre una secuencia codificadora de la proteína del núcleo, una secuencia codificadora de la proteína E1, una secuencia codificadora de la proteína E2, una secuencia codificadora de la proteína NS2, una secuencia codificadora de la proteína NS3, una secuencia codificadora de la proteína NS4A, una secuencia codificadora de la proteína NS4B, una secuencia codificadora de la proteína NS5A y una secuencia codificadora de la proteína NS5B.

Cuando el ARN genómico del VHC que comprende el ARN que codifica un gen extraño se traduce en las células en las que se ha introducido el ARN, esto permite que se exprese un producto genético codificado por el gen extraño. En consecuencia, dicho ARN genómico del VHC que comprende un ARN que codifica un gen extraño se puede utilizar preferentemente también con el propósito de generar el producto genético del gen extraño en las células.

En el ARN genómico del VHC de la presente invención, las secuencias codificadoras de las proteínas virales mencionadas anteriormente, el gen extraño y otros están ligados entre sí de modo que pueden ser traducidos a partir del ARN genómico del VHC utilizando un marco de lectura correcto. Las proteínas codificadas por el ARN genómico del VHC están ligadas preferentemente entre sí a través de sitios de clivaje para la proteasa o similares, de modo que las proteínas se traducen en forma de un polipéptido continuo y se deja que se exprese, y de modo tal que el polipéptido se segmenta entonces con la proteasa dentro de cada proteína y luego se libera.

El ARN genómico del VHC así producido, que comprende una parte de la secuencia de ARN que codifica las proteínas NS3, NS4, NS5A y NS5B de la cepa JFH1, se introduce en las células huésped adecuadas para obtener células recombinantes que pueden replicar de forma autónoma el ARN genómico del VHC, y preferentemente pueden replicar persistentemente de forma autónoma el ARN genómico del VHC (es decir que pueden replicar el ARN genómico del VHC). En lo que sigue en la presente especificación, dichas células recombinantes que pueden replicar el ARN genómico del VHC que comprende una parte de la secuencia de ARN que codifica las proteínas NS3, NS4, NS5A y NS5B de la cepa JFH1 se denominan "células replicantes del ARN genómico del VHC".

El tipo de células huésped utilizado para dichas "células replicantes del ARN genómico del VHC" no está particularmente limitado, siempre que puedan ser subcultivadas. Las células eucariotas son preferentes. Son especialmente preferentes células humanas y en particular células humanas derivadas del hígado, células cervicales humanas y células humanas derivadas del riñón fetal. Además, son preferentes las células proliferativas que incluyen cepas de células de cáncer o cepas de células madre. Entre otras, son particularmente preferentes las células Huh7, células HepG2, células IMY-N9, células HeLa, células 293 y similares. Se pueden utilizar como tales células comerciales o se pueden obtener dichas células de instituciones depositarias de células. De otro modo, se pueden utilizar células constituidas a partir de cualquier célula (células cancerosas o células madre, por ejemplo).

Se puede introducir el ARN genómico del VHC en las células huésped mediante cualquier técnica conocida. Ejemplos de tales métodos de introducción pueden incluir electroporación, bombardeo de partículas, lipofección, fosfato de calcio, microinyección y DEAE-sefarsa. De entre ellos, es particularmente preferente un método que implique electroporación.

El ARN genómico del VHC se puede introducir por separado o se puede mezclar con otro ácido nucleico y luego ser introducido. Con el fin de cambiar la cantidad de ARN genómico del VHC introducido mientras se mantiene constante la cantidad de ARN introducido, se puede mezclar cierta cantidad de ARN genómico del VHC con ARN celular total extraído de las células en las que se debe introducir el ARN genómico del VHC, para preparar cierta cantidad total de ARN, la cantidad total de ARN se puede introducir en células. La cantidad de ARN genómico del VHC introducido en las células se puede determinar dependiendo del método de introducción utilizado. La cantidad de dicho ARN genómico del VHC introducido oscila preferentemente entre 1 picogramo y 100 microgramos, en particular entre 10 picogramos y 10 microgramos.

La replicación del ARN genómico del VHC en las “células replicantes de ARN genómico del VHC” puede ser confirmada mediante cualquier método de detección de ARN conocido. Por ejemplo, el ARN total extraído de las células se somete al método de hibridación Northern por medio de un fragmento de ADN específico del ARN genómico del VHC introducido como sonda, o al método RT-PCR con cebadores específicos del ARN genómico del VHC introducido.

Además, cuando se detecta una proteína de VHC en las proteínas extraídas de “células replicantes de ARN genómico del VHC”, se puede determinar qué células replican el ARN genómico del VHC. Dicha proteína del VHC puede ser detectada mediante cualquier método conocido para detectar la proteína. Por ejemplo, dicha proteína del VHC puede ser detectada dejando que un anticuerpo reaccione con una proteína del VHC que se debe expresar a partir del ARN genómico del VHC introducido, para que reaccione con una proteína extraída de las células. De forma más específica, una muestra de proteína extraída de las células se somete a Blot sobre una membrana de nitrocelulosa, se deja entonces que un anticuerpo de la proteína de anti-VHC (por ejemplo, un anticuerpo específico de la anti-NS3 o un antisuero extraído de un paciente con hepatitis C) reaccione con el mismo, y entonces, por ejemplo, se detecta el anticuerpo de la proteína del anti-VHC.

El hecho de que el ARN genómico del VHC pueda ser replicado de forma autónoma se puede confirmar, por ejemplo, transfectando células Huh7 con ARN como diana, cultivando las células Huh7 y sometiendo el ARN extraído de las células del cultivo obtenido a hibridación Northern Blot con una sonda capaz de detectar específicamente el ARN introducido, pero dicho método de confirmación no se limita a esto. Las operaciones específicas para confirmar que el ARN puede ser replicado de forma autónoma se encuentran en descripciones referentes a la confirmación de la expresión de la proteína de VHC o la detección del ARN genómico del VHC en el ejemplo de la presente especificación.

2. Producción de partículas de VHC

Las células replicantes de ARN genómico del VHC producidas tal como se ha descrito anteriormente son capaces de generar partículas virales de VHC *in vitro*. Es decir, las células replicantes del ARN genómico del VHC de la presente invención se cultivan en un medio adecuado y las partículas virales generadas se cosechan entonces del cultivo (preferentemente, una solución de cultivo), obteniéndose así fácilmente partículas de VHC.

La capacidad de generar partículas virales de las células replicantes del ARN genómico del VHC se puede confirmar mediante cualquier método de detección viral conocido. Por ejemplo, una solución de cultivo que contiene células que generan presumiblemente partículas virales se fracciona según gradiente de densidad de sacarosa y se miden entonces tanto la densidad, concentración de proteínas del núcleo del VHC, como la cantidad de ARN genómico del VHC de cada fracción. Como consecuencia, cuando el pico de la proteína del núcleo del VHC corresponde al del ARN genómico del VHC y cuando la densidad de una fracción en la que se detecta el pico es inferior a la densidad de la misma fracción, que es fraccionada después de tratar el sobrenadante de cultivo con un 0,25% de NP40 (polioxietileno(9)octilfenil éter) (por ejemplo entre 1,15 mg y 1,22 mg), se puede confirmar que las células tienen capacidad de generar partículas virales.

Las partículas virales de VHC liberadas en la solución de cultivo pueden detectarse también por reacción de un anticuerpo con una proteína del núcleo, una proteína E1 o una proteína E2. Además, es posible también detectar indirectamente la existencia de partículas virales de VHC por el aumento del ARN genómico del VHC contenido en las partículas virales de VHC en la solución de cultivo y detectando luego el producto amplificado siguiendo el método RT-PCR con cebadores específicos.

3. Infección de otras células con las partículas del VHC de la presente invención

Las partículas virales de VHC generadas por el método de la presente invención tienen capacidad para infectar células (preferentemente células sensibles al VHC). La presente invención también proporciona un método para producir una célula infectada por el virus de la hepatitis C que comprende el cultivo de células replicantes de ARN genómico del VHC y después la infección de otras células (preferentemente células sensibles al VHC) con partículas virales contenidas en el cultivo obtenido (preferentemente una solución de cultivo). El término “células sensibles al VHC” se utiliza aquí con referencia a las células que tienen capacidad de ser infectadas por VHC. Dichas células sensibles al VHC son preferentemente células hepáticas o células linfocitarias, sin limitarse a las mismas. Ejemplos específicos de tales células hepáticas pueden incluir células hepáticas primarias, células Huh7, células HepG2, células IMY-N9, células HeLa y células 293. Ejemplos específicos de células linfocitarias pueden incluir células Molt4, células HPB-Ma y células Daudi. Sin embargo, sin limitarse a las mismas.

Cuando las células (por ejemplo células sensibles al VHC) son infectadas por partículas de VHC generadas en las células replicantes del ARN genómico del VHC de la presente invención, el ARN genómico del VHC se replica en las células infectadas y se forman entonces partículas virales. A continuación, al dejar que las células se infecten con partículas virales generadas en las células

replicantes del ARN genómico del VHC de la presente invención, el ARN genómico del VHC se puede replicar en las células, y después se pueden producir partículas virales.

5 Cuando los animales que pueden infectarse con el virus VHC, por ejemplo chimpancés, son infectados por partículas virales del VHC generadas en las células replicantes del ARN genómico del VHC de la presente invención, las partículas pueden causar una hepatitis derivada del VHC en los animales.

4. Purificación de partículas de VHC

10 Se puede derivar una solución que contenga virus de VHC utilizada en la purificación de partículas de VHC de una o más seleccionadas de entre sangre procedente de un paciente infectado por VHC, células cultivadas infectadas por VHC, un medio de cultivo celular que contiene células que generan partículas de VHC como consecuencia de una recombinación genética y una solución obtenida del homogenado celular.

15 La solución que contiene virus de VHC se somete a centrifugación y/o filtración por un filtro para eliminar células y residuos celulares. La solución obtenida mediante la eliminación de estos residuos se puede concentrar a una ampliación de entre 10 y 100 veces utilizando una membrana de ultrafiltración con un límite de peso molecular entre 100.000 y 500.000.

20 La solución que contiene el VHC de la que se han eliminado los residuos puede purificarse mediante cromatografía o centrifugación en gradiente de densidad tal como se describe más abajo, o mediante el uso combinado de cromatografía con centrifugación en gradiente de densidad, en cualquier orden. Se describirán posteriormente los métodos representativos de cromatografía y de centrifugación en gradiente de densidad, pero la presente invención no se limita a los mismos.

Se puede utilizar una cromatografía de filtración en gel para purificar las partículas de VHC, preferentemente con un soporte cromatográfico que tiene, como matriz de gel, un polímero reticulado compuesto de alildextrano y N,N'-metilen-bisacrilamida, y en particular con Sephacryl(R) S-300, S-400 y S-500.

25 Se puede utilizar una cromatografía de intercambio iónico para purificar las partículas de VHC, preferentemente mediante Q-Sefarosa(R) como resina de intercambio iónico y preferentemente con SP Sefarosa(R) como resina de intercambio catiónico.

30 Se puede utilizar una cromatografía de afinidad para purificar las partículas de VHC utilizando como soporte, preferentemente, una resina a modo de ligando a la que se permite que se una a un sustrato seleccionado de entre heparina, celulofina sulfatada, lectina y diversos pigmentos. Se puede utilizar esta cromatografía de afinidad para purificar partículas de VHC preferentemente con heparina HP(R) HiTrap, azul HiTrap HP(R), Benzamidina FF(R) HiTrap, celulofina sulfatada o soportes a los que se unen LCA, ConA, RCA-120 y WGA. Dicha cromatografía de afinidad se puede utilizar para purificar partículas de VHC preferentemente con celulofina sulfatada como soporte. Inesperadamente, las partículas de VHC se purifican con un aumento de 30 veces, con respecto al coeficiente de masa proteica total en solución, con relación al número de copias de ARN de VHC antes y después de la purificación.

40 En la purificación por centrifugación en gradiente de densidad, como soluto que forma un gradiente de densidad se utiliza preferentemente cloruro de cesio, sacarosa, Nycodenz(R) o un polímero de azúcar tal como Ficoll(R) o Percoll(R). En particular, se utiliza sacarosa. Además, como disolvente a utilizar aquí, es preferente el agua o una solución tampón tal como un tampón fosfato, un tampón Tris, un tampón acetato o un tampón glicina.

La temperatura aplicada a la purificación oscila preferentemente entre 0°C y 40°C, en particular entre 0°C y 25°C y especialmente entre 0°C y 10°C.

45 En un método de purificación que implica la centrifugación en gradiente de densidad, la fuerza centrífuga aplicada a la purificación oscila preferentemente entre 1×10^4 y 1×10^9 g, en particular entre 5×10^4 y 1×10^7 g y especialmente entre 5×10^4 y 5×10^5 g.

50 Con respecto al uso combinado de los métodos de purificación, se pueden combinar en cualquier orden la centrifugación en gradiente de densidad y la cromatografía en columna. Preferentemente, tras haber purificado las partículas de VHC mediante múltiples tipos de cromatografía en columna, el resultado se somete a centrifugación en gradiente de densidad. En particular, se lleva a cabo una cromatografía de intercambio iónico en columna y luego una cromatografía de afinidad para obtener una fracción que contiene partículas de VHC y, a continuación, se purifica la fracción obtenida mediante centrifugación en gradiente de densidad. Especialmente, una fracción que contiene partículas de VHC obtenida mediante cromatografía en columna utilizando Q-Sefarosa(R) se purifica además en una columna con celulofina sulfatada y, a continuación, la fracción obtenida que contiene partículas de VHC se purifica mediante centrifugación en gradiente de densidad. Además, se puede llevar a cabo una diálisis o ultrafiltración entre el proceso de cromatografía en columna y el proceso de centrifugación en gradiente de densidad para

sustituir un soluto en la solución que contiene partículas de VHC y/o para concentrar las partículas de VHC.

5. Otras realizaciones de la presente invención

5 El ARN genómico del VHC se replica con gran eficacia en las células replicantes de ARN genómico del VHC de la presente invención. En consecuencia, utilizando las células replicantes de ARN genómico de VHC de la presente invención se puede producir un ARN genómico de VHC con alto rendimiento.

10 En la presente invención, se cultivan las células replicantes de ARN genómico del VHC y el ARN se extrae del cultivo (células cultivadas y/o medio de cultivo). Luego, se somete a electroforesis el ARN extraído para aislar y purificar el ARN genómico del VHC separado, obteniéndose así ARN genómico de VHC. El ARN así producido comprende una secuencia genómica de VHC. Al proporcionar dicho método para producir el ARN que comprende la secuencia genómica del VHC, se posibilita el análisis más detallado del genoma del VHC.

15 Además, las células replicantes del ARN genómico del VHC de la presente invención pueden utilizarse preferentemente para producir una proteína de VHC. Dicha proteína de VHC puede obtenerse mediante cualquier método conocido. Por ejemplo, se introduce el ARN genómico del VHC en las células para producir células recombinantes. A continuación, se cultivan las células recombinantes y se recupera la proteína del cultivo obtenido (células cultivadas y/o medio de cultivo) por los métodos habituales.

20 Las partículas virales de VHC pueden estar dirigidas a células hepáticas. Por tanto, puede producirse un vector viral dirigido a células hepáticas por medio del ARN genómico del VHC de la presente invención. Este vector viral se utiliza preferentemente para la terapia genética. En la presente invención, el ARN que codifica un gen extraño se incorpora en el ARN genómico del VHC y luego se introduce el ARN en las células, para introducir el gen extraño mencionado anteriormente en las células. A continuación, el gen extraño puede replicarse y luego expresarse en las células.

25 Además, el ARN se produce mediante intercambio de la secuencia codificadora de la proteína E1 y/o de la proteína E2 en el ARN genómico del VHC con la proteína de envoltura de un virus procedente de otras especies vivas. El ARN producido se introduce entonces en las células, para producir partículas virales. Así, se posibilita que las células de varias especies vivas puedan ser infectadas por el ARN. En este caso también se incorpora un gen extraño en el ARN genómico del VHC y el ARN obtenido se puede utilizar como vector viral dirigido a las células, de forma que el gen extraño pueda expresarse en varios tipos de células, dependiendo de la directividad de una proteína de envoltura del virus recombinante.

30 La presente invención se refiere también a un método para producir un vector viral que contiene un gen extraño, el cual comprende la inserción del ARN que codifica el gen extraño en el ARN genómico del VHC, la introducción del ARN genómico en las células y el cultivo de las mismas para que las células puedan generar partículas virales.

35 La presente invención también proporciona un método para producir una vacuna contra la hepatitis C o una vacuna contra el virus utilizado para la recombinación genética de una proteína de envoltura utilizando las partículas de VHC de la presente invención o una parte de las mismas, como antígeno, o utilizando partículas producidas por recombinación genética de la proteína de envoltura del virus para alterar la directividad de las células o una parte de las mismas, como antígeno. Además, se puede producir también un anticuerpo neutralizante de la infección por VHC utilizando las partículas de VHC de la presente invención o una parte de las mismas, como antígeno, o utilizando partículas producidas por recombinación genética de la proteína de envoltura del virus para alterar la directividad de las células o una parte de las mismas, como antígeno.

40 Las células replicantes del ARN genómico del VHC de la presente invención, o células infectadas por VHC que están infectadas por partículas virales generadas en las células replicantes del ARN genómico de VHC, se pueden utilizar, por ejemplo, para la replicación del VHC o para la reconstrucción de partículas virales, o como sistema de ensayo para el screening de una sustancia que favorezca o inhiba la liberación de partículas virales (sustancia antiviral de la hepatitis C). Específicamente, por ejemplo, dichas células se cultivan en presencia de una sustancia de prueba y se detectan en el cultivo obtenido el ARN genómico de VHC o partículas virales. A continuación, se determina si la sustancia de prueba mencionada anteriormente favorece o no, o inhibe o no, la replicación del ARN del replicón o del ARN genómico del VHC, la formación de dichas partículas virales o la liberación de las mismas, buscando así una sustancia que favorezca o inhiba el desarrollo de los virus de la hepatitis C. En este caso, el ARN genómico del VHC contenido en el cultivo se puede detectar midiendo la cantidad de ARN genómico de VHC en el ARN extraído de las células mencionadas anteriormente, la proporción del mismo o su presencia o ausencia. Las partículas virales contenidas en el cultivo (principalmente, una solución de cultivo) se pueden detectar midiendo la cantidad de proteína de VHC contenida en la solución de cultivo, la proporción de la misma o su presencia o ausencia.

Las partículas de VHC generadas en las células replicantes del ARN genómico del VHC de la presente invención, así como las células sensibles al VHC, se pueden utilizar como sistemas de ensayo para el screening de una sustancia que favorezca o inhiba la unión del VHC a las células. Específicamente, por ejemplo, las células sensibles al VHC se cultivan conjuntamente con partículas de VHC generadas en las células replicantes de ARN genómico del VHC de la presente invención en presencia de una sustancia de prueba. A continuación, el ARN genómico del VHC o las partículas virales se detectan en el cultivo obtenido. Se determina si la sustancia de prueba mencionada anteriormente favorece o no, o inhibe o no, la replicación del ARN genómico del VHC o la formación de partículas virales, investigando así una sustancia que favorezca o inhiba el desarrollo de virus de la hepatitis C.

10 Dicho ARN genómico del VHC o partículas virales pueden ser detectadas según los medios mencionados anteriormente o los ejemplos que se describen más adelante. El sistema de prueba descrito anteriormente se puede utilizar para la producción o evaluación de un agente preventivo, un agente terapéutico, o un agente de diagnóstico de infección por el virus de la hepatitis C.

15 Se presentan a continuación ejemplos específicos de utilización del sistema de prueba de la presente invención mencionado anteriormente.

(1) *Screening de una sustancia que inhibe el desarrollo del VHC y la infección que le acompaña*

20 Ejemplos de sustancias que inhiben el desarrollo de VHC y la infección que le acompaña pueden incluir: un compuesto orgánico que afecte directa o indirectamente al desarrollo del VHC y la infección que le acompaña; y un oligonucleótido antisentido que se hibrida con la secuencia diana del genoma del VHC o una hebra complementaria del mismo, para afectar directa o indirectamente al desarrollo del VHC o a la traducción de una proteína del VHC.

(2) *Evaluación de diversas sustancias con actividad antiviral en el cultivo celular*

25 Un ejemplo de las diferentes sustancias mencionadas anteriormente puede ser una sustancia obtenida mediante el diseño racional de fármacos o cribado de alta capacidad (por ejemplo, enzima aislada y purificada).

(3) *Identificación de una nueva diana que debe ser atacada, utilizada para el tratamiento de pacientes infectados por VHC*

30 Con el fin de identificar una proteína de célula huésped que desempeña un papel importante en la replicación de un virus VHC, se pueden utilizar por ejemplo las células replicantes del ARN genómico del VHC de la presente invención.

(4) *Evaluación de la capacidad del virus VHC para adquirir resistencia a agentes o similares, e identificación de la mutación asociada a dicha resistencia*

35 (5) *Producción de la proteína viral utilizada como antígeno que se puede utilizar para el desarrollo, producción y evaluación de un agente de diagnóstico o del agente terapéutico para la infección por el virus de la hepatitis C*

(6) *Producción de la proteína viral y del VHC atenuado utilizados como antígenos que se pueden utilizar para el desarrollo, producción y evaluación de una vacuna contra la infección por el virus de la hepatitis C*

40 Ejemplos

La presente invención se describe de forma más específica en base a los siguientes ejemplos y figuras. Sin embargo, estos ejemplos no pretenden limitar el alcance técnico de la presente invención.

Ejemplo 1: Producción de ARN genómico de VHC

1. *Construcción del vector de expresión*

45 Se obtuvo el ADN correspondiente a la región genómica total del virus de una cepa JFH1 del virus de la hepatitis C (genotipo 2a) aislado de pacientes que padecen hepatitis fulminante a partir de un clon de JFH1 que comprendía el ADNc genómico de longitud total de la citada cepa viral (Kato T. y col., J. Med. Virol. 64 (2001) pp. 334-339). El ADN obtenido se insertó entonces aguas abajo de una secuencia promotora de ARN de T7 que había sido insertada en un plásmido pUC19. Específicamente, un fragmento de RT-PCR obtenido mediante amplificación del ARN viral de la cepa JFH1 se clonó en un vector pGEM-T EASY (Promega), para obtener varios ADN de plásmido tales como pGEM1-258, pGEM44-486, pGEM317-849, pGEM617-1323, pGEM1141-2367, pGEM2285-3509, pGEM3471-4665, pGEM4547-5970, pGEM5883-7003, pGEM6950-8035, pGEM7984-8892, pGEM8680-9283, pGEM9231-9634, y pGEM9594-9678 (Kato T. y col., Gastroenterology, 125 (2003) pp. 1808-1817). El ADNc

genómico del virus contenido en cada plásmido se ligó uno con otro por el método PCR y utilizando enzimas de restricción y así se clonó el ADNc genómico de longitud total. Una secuencia promotora de ARN de T7 se insertó aguas arriba del mismo, para obtener un clon JFH1 (pJFH1) (Figura 1). Se debe observar que la secuencia de ADNc de longitud completa del pJFH ha sido registrada en el International DNA Databank (DDBJ/ EMBL/GenBank) bajo el N° de acceso AB047639.

Posteriormente, con respecto a una región de NS5B en el pJFH1 (secuencia de nucleótidos: SEQ ID NO:2; secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO:3), un motivo GDD de los aminoácidos correspondiente al centro activo de ARN polimerasa codificada por la región anterior se mutó a GND, para producir un clon plásmido mutante pJFH1/GND. Como la secuencia de aminoácidos del centro activo de una proteína NS5B codificada por el clon plásmido mutante pJFH1/GND es mutada, este clon no puede expresar una proteína NS5B activa, necesaria para la replicación del ARN del VHC.

Posteriormente, se suprimió una región E1 y una región E2 de JFH1 para producir pJFH1/ΔE1-E2. Además, el ADNc de longitud total del VHC de una cepa J6CF (N° de Acceso del GenBank AF177036) diferente de la cepa JFH1 y el de una cepa JCH1 (Kato T., y col., J. Med. Virol. 64 (2001) pp. 334-339) se insertaron aguas abajo de una secuencia promotora del ARN de T7 que había sido insertada en un plásmido pUC19, para producir pJ6CF y pJCH1, respectivamente. Además, la región codificante de NS5B del pJCH1 fue sustituida por la NS5B del JFH1, para producir pJCH1/NS5B (jfh1).

2. Producción de ARN genómico de VHC

Con el fin de producir un ADN plantilla utilizado para la síntesis de ARN, cada uno de pJFH1, pJFH1/GND, pJFH1/ΔE1-E2, pJ6CF, pJCH1 y pJCH1/NS5B (jfh1) fue segmentado con la enzima de restricción XbaI. A continuación, de 10 a 20 μg de cada uno de estos fragmentos de clivaje con XbaI se incubó con 20 U de Mung Bean Nuclease (cantidad total de solución de reacción: 50 μ) a 30°C durante 30 minutos. La Mung Bean Nuclease es una enzima que cataliza una reacción de digestión selectiva de una parte de una sola hebra de un ADN de dos hebras. En general, cuando el ARN se sintetiza directamente utilizando el fragmento de clivaje con XbaI mencionado anteriormente como plantilla, se sintetiza el ARN del replicón, a cuyo terminal 3' se añaden de forma redundante 4 nucleótidos CUGA que constituyen una parte de una secuencia de reconocimiento de XbaI. Así, en el presente ejemplo, dicho fragmento de clivaje con XbaI fue tratado con Mung Bean Nuclease para eliminar los 4 nucleótidos CUGA del fragmento de clivaje con XbaI. A continuación, la solución así tratada con Mung Bean Nuclease que contenía un fragmento de clivaje con XbaI se sometió a un tratamiento de eliminación de proteínas de acuerdo con métodos comunes, para que el fragmento de clivaje con XbaI, del que se habían eliminado los 4 nucleótidos CUGA, pudiera ser purificado. El fragmento purificado se utilizó como ADN plantilla.

Posteriormente, el ARN fue sintetizado *in vitro* a partir del ADN plantilla anterior. Dicho ARN fue sintetizado sometiendo a reacción 20 μl de una solución de reacción que contenía de 0,5 a 1,0 μg del ADN plantilla a 37°C durante 3 a 16 horas, mediante MEGAscript fabricado por Ambion.

A la finalización de la síntesis de ARN, se añadió a la solución de reacción DNAsa (2U) y se dejó reaccionar la mezcla a 37°C durante 15 minutos. A continuación, se extrajo el ARN con ácido fenólico y se eliminó el ADN plantilla. Así, los diversos tipos de ARN del VHC sintetizados a partir del ADN plantilla mencionado anteriormente procedente de pJFH1 y pJFH1/GND se denominaron rJFH1, rJFH1/GND, rJFH1/ΔE1-E2, rJ6CF, rJCH1 y rJCH1/NS5B(jfh1).

Con respecto al ARN de VHC así obtenido, rJFH1 es ARN producido mediante ADN bajo el N° de Acceso del GenBank AB047639 como plantilla; JFH1/GND es ARN producido utilizando, como plantilla, ADN obtenido mediante la sustitución de G en el nucleótido 8618 por A, con respecto al ADN bajo el N° de Acceso del GenBank AB047639; rJFH1/ΔE1-E2 es ARN producido utilizando, como plantilla, ADN que comprende una delección de la parte 989-2041 de la secuencia de ADN, con respecto al ADN bajo el N° de Acceso del GenBank AB047639; rJ6CF es ARN producido por medio de ADN bajo el N° de Acceso del GenBank AF177036 como plantilla; rJCH1 es ARN producido por medio de ADN bajo el N° de Acceso del GenBank AB047640 como plantilla; y rJCH1/NS5B (jfh1) es ARN producido utilizando, como plantilla, ADN obtenido ligando la parte 1-3866 de la secuencia de ADN del ADN bajo el N° de Acceso del GenBank AB047640, a la parte 3867-9678 de la secuencia de ADN del ADN bajo el N° de Acceso al GenBank AB047639, por medio del sitio AvrII de la enzima de restricción. Las secuencias de nucleótidos de estos ARN se pueden confirmar. Este último ARN genómico del virus modificado de la hepatitis C es una realización de la presente invención.

Ejemplo 2: Generación de células replicantes de ARN genómico de VHC y de partículas virales en células

1. Replicación del genoma del VHC y generación de partículas virales en células

Cada uno de los ARN genómicos del VHC de longitud completa sintetizados anteriormente (rJFH1 y rJFH1/GND) se ajustó para que el nivel total de ARN alcanzase 10 μg. Posteriormente, se introdujeron los ARN mezclados en células Huh7 por el método de electroporación. Las células Huh7

tratadas por electroporación se inocularon en una placa de cultivo y luego se cultivaron durante 12 horas, 24 horas, 48 horas, y 72 horas. A continuación, se recuperaron las células y entonces se extrajo el ARN de las mismas. El ARN extraído se analizó por el método Northern blot. Dicho análisis Northern blot se llevó a cabo de acuerdo con Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd edition, J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989). El ARN extraído de las células se sometió a electroforesis desnaturalizada en agarosa. A la finalización de la electroforesis, el ARN se transcribió en una membrana de nylon de carga positiva. Una sonda de ARN o ADN etiquetada con ³²P producida a partir de pJFH1 se dejó hibridar con el ARN transcrito en la membrana, tal como se ha descrito anteriormente. A continuación, se lavó la membrana y luego se expuso a una película, detectándose así una banda de ARN específica del genoma del VHC.

Como se muestra en la Figura 2, cuando las células fueron transfectadas con JFH1/GND, la banda de ARN introducida se confirmó en forma de una señal débil 4 horas después de la transfección. Sin embargo, dicha señal era una atenuación dependiente del tiempo y, 24 horas más tarde, no se confirmó casi ninguna banda de señal.

Por otra parte, cuando las células se transfectaron con rJFH1, 4 a 12 horas después de la transfección la intensidad de la señal de la banda de ARN introducido fue casi la misma que en el caso de la introducción de JFH1/GND. A continuación, la señal se atenuó una vez, pero se confirmó una señal clara de la banda de ARN a partir de 24 horas en adelante. Esta señal era específica del VHC. En otras palabras, se consideró que una parte del ARN de rJFH1 introducido se replicó y se desarrolló. Dicha replicación no se observó en el rJFH1/GND obtenido mediante la mutación del motivo activo de NS5B, que era una enzima replicante de ARN. Así, se confirmó que la actividad de NS5B era importante para la replicación del ARN de longitud total del VHC. Se llevó a cabo el mismo experimento utilizando la cepa JCH1 (Kato T. y col., J. Med. Virol. 69 (2001) pp. 334-339), que había sido aislada de pacientes con hepatitis crónica por los presentes inventores. En el caso de esta cepa, no se confirmó en absoluto la replicación del ARN del VHC.

2. Detección de la proteína del VHC

Se extrajo una proteína de una forma dependiente del curso temporal de células transfectadas con ARN de rJFH1 o rJFH1/GND de acuerdo con los métodos habituales y se analizó entonces por SDS-PAGE y Western blot. Para dicho análisis, células Huh7 se transfectaron transitoriamente con ADN de plásmido de expresión que incluía un gen de NS3, NS5A, núcleo o E2, y el extracto celular obtenido se utilizó como control positivo (proteína NS3). Además, se utilizó como control negativo una proteína extraída de células Huh7 no transfectadas. Una muestra de proteína extraída de cada clon celular se sometió a Blot sobre una membrana de PVDF (Immobilon-P, fabricado por Millipore). A continuación, un anticuerpo específico de la anti-NS3 (suministrado por el Dr. Moradpour; Wolk B. y col., J. Virology. 2000; 74: 2293-2304), un anticuerpo específico de la anti-NS5A (producido mediante la inserción de la región de NS5A de JFH1 en un vector de expresión y su utilización con un ratón de acuerdo con los procedimientos de inmunización con ADN), un anticuerpo específico del anti-núcleo (anticuerpo 2H9 del clon) y un anticuerpo específico de la anti-E2 (producido mediante síntesis del péptido de GTTTVGGAVARSTN (SEQ ID NO:4) en la región de E2 de JFH1 y el péptido de CDLEDRDRSQLSPL (SEQ ID NO:5) dentro, y luego mediante la inmunización de un conejo con los dos péptidos sintéticos), se utilizaron para detectar las proteínas NS3, NS5A, núcleo y E2 codificadas por el ARN de JFH1. Además, como control intrínseco, se detectó una proteína actina mediante un anticuerpo anti-actina.

Como se muestra en la Figura 3, en las células transfectadas con rJFH1, a partir de 24 horas después de la transfección se detectaron las proteínas NS3, NS5A, núcleo y E2, y se confirmó que el incremento del nivel de expresión dependía del tiempo. Por contraste, en las células transfectadas con rJFH1/GND, o en las células Huh7 no transfectadas, no se detectó ninguna de dichas proteínas NS3, NS5A, núcleo, y E2. Se descubrió que estas proteínas se expresaban dentro como consecuencia de la replicación autónoma del rJFH1 transfectado.

A partir de los resultados obtenidos en los puntos 1 y 2 anteriores, se confirmó que rJFH1 se replica en células constituidas por la transfección con rJFH1.

3. Detección de la proteína de núcleo de VHC en un medio de cultivo de células transfectadas

Se inocularon células Huh7, en las que se habían introducido por electroporación rJFH1, rJFH1/GND, rJFH1/ΔE1-E2, rJ6CF y rJCH1, en una placa de cultivo. Las células se cultivaron entonces en su interior durante 2 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas y 72 horas. A continuación, se midió la proteína núcleo del VHC contenida en el medio de cultivo. Dicha medición se llevó a cabo mediante la prueba IRMA con antígeno del VHC Ortho (Aoyagi y col., J. Clin. Microbiol., 37(1999) pp. 1802-1808).

Como se muestra en la Figura 4, se detectó una proteína núcleo en el medio de cultivo 48 a 72 horas después de la transfección con rJFH1. Por otra parte, en el medio de cultivo de las células transfectadas con rJFH1/GND, rJ6CF y rJCH1 no se detectaron proteínas de núcleo del VHC. En el medio

de cultivo de las células transfectadas con rJFH1/ Δ E1-E2 se detectó una pequeña cantidad de proteína núcleo del VHC. rJFH1/GND, rJ6CF, y rJCH1 no se pueden replicar de forma autónoma en células Huh7, mientras que rJFH1 y rJFH1/ Δ E1-E2 pueden replicarse de forma autónoma. Así, se descubrió que la replicación autónoma del ARN del VHC introducido es esencial para la liberación de dicha proteína núcleo y, además, que E1 y E2 son necesarias para que una gran cantidad de proteína núcleo pueda liberarse establemente fuera de las células.

4. Detección de partículas de VHC en medio de cultivo de células transfectadas

Con el fin de analizar si la proteína núcleo liberada dentro del medio de cultivo en el ejemplo mencionado anteriormente era o no secretada en forma de partículas virales, el medio de cultivo obtenido 6 días después de la transfección con rJFH1 se fraccionó en gradiente de densidad de sacarosa. Esto es, 2 ml de una solución de sacarosa al 60% (peso/peso) (disuelta en 50 mM Tris, pH 7,5 / 0,1M NaCl / 1 mM EDTA), 1 ml de una solución de sacarosa al 50%, 1 ml de una solución de sacarosa al 40%, 1 ml de una solución de sacarosa al 30%, 1 ml de una solución de sacarosa al 20% y 1 ml de una solución de sacarosa al 10% se laminaron en un tubo centrífugo y después 4 ml del sobrenadante de cultivo de una muestra se laminó encima. Este tubo se centrifugó entonces a 400.000 r.p.m. a 4°C durante 16 horas utilizando un rotor Beckmann SW41Ti. Al finalizar la centrifugación, 0,5 ml de cada una de las fracciones se recuperó del fondo del tubo centrífugo. La densidad, la concentración de proteína del núcleo de VHC y el número de copias de ARN de VHC se sometieron a prueba para cada fracción. La detección del ARN del replicón mediante RT-PCR cuantitativa se llevó a cabo mediante detección de ARN en la región no traducida 5' del ARN de VHC de acuerdo con el método de Takeuchi y col. (Takeuchi T. y col., Gastroenterology 116: 636-642 (1999)). Específicamente, el ARN del replicón contenido en el ARN extraído de las células se amplificó por PCR utilizando los siguientes cebadores sintéticos y el kit EZ rTth RNA PCR (Applied Biosystems), y se detectó entonces utilizando el sistema detector de secuencias ABI Prism 7700 (Applied Biosystems).

R6-130-S17: 5'-CGGGAGAGCCATAGTGG-3' (SEQ ID NO:6)

R6-290-R19: 5'-AGTACCACAAGGCCTTTCG-3' (SEQ ID NO:7)

Sonda TaqMan, R6-148-S21FT: 5'-CTGCGGAACCGGTGAGTACAC-3' (SEQ ID NO:8)

Como se muestra en la Figura 5A, el pico de la proteína núcleo correspondía al del ARN de VHC en una fracción de 1,17 mg/ml. Se descubrió que la densidad de esta fracción era de aproximadamente 1,17 mg/ml. Se trataba de una gravedad específica más ligera que la de un producto unido consistente en una proteína núcleo y ácido nucleico, que se había reportado anteriormente. Si la proteína núcleo y el ARN del VHC existentes en la fracción de 1,17 mg/ml forman una estructura de partículas de VHC, se considera que esta fracción es resistente a la nucleasa. Por tanto, una solución de cultivo obtenida 6 días después de la transfección con JFH1 fue tratada con 10 μ g/ml de RNasa A durante 20 minutos y se fraccionó entonces en gradiente de densidad de sacarosa.

Como consecuencia, tal como se muestra en la Figura 5B, el ARN del VHC se descompuso y el pico de la proteína núcleo y el del ARN del VHC se detectaron en una fracción de 1,17 mg/ml, como en el caso de no ser tratada con RNasa A. Es decir, se confirmó que la proteína núcleo y el ARN de VHC existentes en la fracción de 1,17 mg/ml formaban una estructura de tipo partícula de VHC.

A continuación, se sometió la solución de cultivo al mismo fraccionamiento que el descrito anteriormente, después de haber sido tratada con un 0,25% de NP40. Como consecuencia, el pico de la proteína núcleo y el del ARN de VHC cambiaron a 1,28 mg/ml (Figura 5C). Después, cuando la solución de cultivo fue tratada simultáneamente con un 0,25% de NP40 así como con RNasa A, el pico del ARN de VHC desapareció (Figura 5D). Por tanto, se consideró que una membrana superficial con baja gravedad específica conteniendo lípidos había sido exfoliada de las partículas virales como consecuencia del tratamiento con NP40, de modo que las partículas se convirtieron en partículas de núcleo consistentes solamente en ácido nucleico y una proteína núcleo que no tenían una estructura de tipo viral, resultando en un incremento de la gravedad específica.

A partir de estos resultados, se confirmó que el ARN viral se había replicado mediante transfección de las células Huh7 con rJFH1 y que las partículas virales se forman por este medio y se liberan en la solución de cultivo.

5. Experimento con respecto a la infectividad de partículas virales en el medio de cultivo

Se transfectaron células Huh7 con rJFH1 y se examinó la infectividad de las partículas de VHC secretadas en un medio de cultivo. Se recuperó el sobrenadante del cultivo 3 días después de la transfección de las células Huh7 con rJFH1 o rJFH1/ Δ E1-E2. Se centrifugó el medio de cultivo recuperado y se recuperó el sobrenadante centrifugado, seguido de filtración por un filtro de 0,45 μ m. En presencia de este medio de cultivo, se cultivaron las células Huh7 que no habían sido transfectadas con ARN. 48 horas más tarde, las células fueron inmunoteñidas de forma fluorescente con un anticuerpo anti-núcleo o un

anticuerpo anti-NS5A. Como se muestra en la Figura 6A, en el caso de las células cultivadas en presencia de un medio de cultivo obtenido mediante transfección de células Huh7 con rJFH1, se observó en las células la expresión de una proteína núcleo y de una proteína NS5A. Por otra parte, en el caso de las células cultivadas en presencia de un medio de cultivo obtenido mediante transfección de células Huh7 con rJFH1/ Δ E1-E2, no se observó en las células dicha expresión de una proteína núcleo y de una proteína NS5A (datos no mostrados).

Posteriormente, se recuperó un sobrenadante de cultivo 3 días después de la transfección de células rHuh7 con JFH1 y se concentró entonces a una ampliación de 30 veces utilizando un ultrafiltro (límite: 1×10^5 Da). Las células Huh7 que no habían sido transfectadas con ARN se cultivaron en un medio de cultivo que contenía partículas de VHC concentradas en un cubreobjetos de 15 mm. 48 horas más tarde, se inmunotñeron las células con un anticuerpo anti-núcleo y entonces se contó el número de células positivas teñidas con el anticuerpo anti-núcleo, a saber, las células infectadas. Como consecuencia, tal como se muestra en la Figura 6B, se confirmaron $394,0 \pm 26,5$ células infectadas (aproximadamente un 0,51% de las células totales). A continuación, se confirmó si esta infección se debía o no a partículas del VHC que habían sido secretadas en el medio de cultivo como resultado de la transfección de las células Huh7 con rJFH1. Es decir, utilizando un medio de cultivo preparado sometiendo una solución de cultivo utilizada para el tratamiento de infección por UV y otro medio de cultivo preparado sin la etapa de transfección con ARN, las células Huh7 que no habían sido transfectadas con ARN se cultivaron en un cubreobjetos de 15 mm. 48 horas más tarde, se inmunotñeron las células con un anticuerpo anti-núcleo y se contó entonces el número de células infectadas. Como resultado, en el caso en el que las células estaban tratadas con UV, el número de células infectadas se redujo drásticamente. En el caso del medio de cultivo preparado sin la etapa de transfección con ARN, no se observaron células infectadas.

Además, se examinó si las partículas infecciosas por VHC amplificaban o no el ARN en las células y liberaban entonces nuevas partículas de VHC en el medio de cultivo. Las células Huh7 que no habían sido transfectadas con ARN se cultivaron en un medio de cultivo que contenía partículas de VHC preparadas mediante la concentración de un medio de cultivo obtenido 48 horas después de la transfección de las células Huh7 con rJFH1. A continuación, las células y el medio de cultivo se recuperaron cada día y se recuperó el ARN del mismo. La cantidad de ARN de VHC se sometió a prueba por el método mencionado anteriormente. Como consecuencia, tal como se muestra en la Figura 6C, el ARN de VHC se amplificó hasta cierta cantidad en las células y la cantidad de ARN de VHC aumentó de forma dependiente del tiempo en el sobrenadante. Por otra parte, se llevó a cabo el mismo examen utilizando una solución de cultivo obtenida mediante la transfección de células Huh7 con rJFH1/ Δ E1-E2. Sin embargo, no se detectó ARN de VHC en las células ni en la solución de cultivo.

A partir de estos resultados, se confirmó que las partículas de VHC secretadas en el medio de cultivo tienen infectividad como consecuencia de la transfección de las células Huh7 con rJFH1 y también tienen la capacidad de amplificar el ARN de VHC en las células infectadas y producir nuevas partículas de VHC.

6. Producción de partículas virales de VHC por rJCH1/NS5B(jfh1)

Se examinó si las partículas de VHC son o no secretadas en un medio de cultivo como resultado de la transfección de las células Huh7 con rJCH1/NS5B(jfh1), o si las partículas de VHC secretadas presentan o no infectividad. Una solución de cultivo obtenida 6 días después de la transfección de células Huh7 con rJCH1/NS5B(jfh1) se concentró por el método descrito en el apartado 5 anterior. En presencia de este medio de cultivo, se cultivaron células Huh7 que no habían sido transfectadas con ARN y se sometieron a prueba los cambios dependientes del tiempo de la cantidad de ARN de VHC en las células. A las 12 horas del inicio del cultivo, la cantidad de ARN de VHC en las células aumentó de forma dependiente del tiempo (Figura 7A). Además, las células Huh7 que no habían sido transfectadas con ARN se cultivaron en un cubreobjetos de 15 mm, y se cultivaron entonces las células en presencia del medio de cultivo concentrado. 48 horas más tarde, se inmunotñeron las células con un anticuerpo anti-núcleo y entonces se contó el número de células positivas teñidas con el anticuerpo anti-núcleo, a saber, las células infectadas. Como consecuencia, tal como se muestra en la Figura 7B, se observaron las células infectadas. A partir de estos resultados, se descubrió que las partículas de VHC secretadas en un medio de cultivo adquieren infectividad como consecuencia de la transfección de las células Huh7 con rJCH1/NS5B(jfh1) y que tienen la capacidad también de amplificar el ARN de VHC en las células infectadas y producir nuevas partículas de VHC.

En consecuencia, aún en el caso de una cepa que no puede replicarse de forma autónoma *in vitro*, tal como una cepa de VHC aislada de pacientes, la sustitución de la región HS5B de la misma por NS5B de rJFH1 permite la replicación autónoma de la misma en un sistema celular de cultivo así como la generación de partículas de VHC.

Ejemplo 3**1. Producción de partículas virales de VHC por Con1/C-NS2/JFH-1**

Se transfectaron células Huh7 con ARN de VHC quimérico que comprendía la parte NS5B de una cepa Con-1 con el genotipo 1b del VHC y la de JFH-1 y luego se investigó si las partículas de VHC eran o no secretadas en una solución de cultivo y si las partículas de VHC secretadas presentan o no infectividad.

La secuencia de una cepa Con-1 con genotipo1b del VHC correspondiente a 1 hasta 1.026 (regiones del núcleo, E1, E2, p7 y NS2 de la cepa Con1) se ligó aguas abajo de 5'-UTR de una cepa JFH-1. A continuación, la región 1.031-3.030 de la cepa JFH-1 (de NS3 a NS5b) se ligó también aguas abajo de la misma. Después, la 3'-UTR de la cepa JFH-1 se ligo también aguas abajo de la misma, para producir un constructo. Utilizando este constructo, se produjo ARN de VHC quimérico de rCon1/C-NS2/JFH-1 por el método descrito en el Ejemplo 1-2 anterior. A continuación, las células Huh7 se transfectaron con el ARN anterior por el método descrito en el Ejemplo 2-1 anterior. Las células Huh7 se transfectaron con ARN de VHC y se midió con el tiempo la proteína núcleo contenida en el sobrenadante. Desde aproximadamente 48 horas en adelante, se detectó en el sobrenadante dicha proteína núcleo y, por tanto, se pudo confirmar que las partículas de VHC fueron generadas en el sobrenadante celular. Posteriormente, se concentró el sobrenadante a un aumento de 20 veces mediante ultrafiltración y luego se añadió el concentrado a las células Huh7. 48 horas después del cultivo, se tiñeron las células con un anticuerpo de conejo anti-NS3.

Como consecuencia, no se observó en la simulación ninguna célula positiva del anticuerpo anti-NS3 ni rJFH1/ Δ E1-E2, pero dichas células positivas del anticuerpo anti-NS3 se detectaron en rJFH-1 y rCon1/C-NS2/JFH-1. A partir de estos resultados, se pudo confirmar que rCon1/C-NS2/JFH-1 puede generar partículas infecciosas de VHC, como con JFH-1.

Ejemplo 4: Producción de ARN del replicón de VHC quimérico de longitud total derivado de ARN genómico de VHC quimérico de longitud total**1. Construcción del vector de expresión**

El ADN (clon JFH-1: SEQ ID NO:9) que contenía el ADNc genómico de longitud total de una cepa JFH-1 (genotipo 2a), que es un virus de la hepatitis C aislado de pacientes que padecen hepatitis fulminante, se insertó aguas abajo de una secuencia promotora de ARN de T7 en un plásmido pUC19, para producir ADN de plásmido.

Específicamente, un fragmento de RT-PCR obtenido mediante amplificación del ARN viral de la cepa JFH-1 se clonó en un vector pGEM-T EASY (Promega), para obtener varios ADN de plásmido tales como pGEM1-258, pGEM44-486, pGEM317-849, pGEM617-1323, pGEM1141-2367, pGEM2285-3509, pGEM3471-4665, pGEM4547-5970, pGEM5883-7003, pGEM6950-8035, pGEM7984-8892, pGEM8680-9283, pGEM9231-9634 y pGEM9594-9678 (Kato y col., Gastroenterology, (2003) 125:pp. 1808-1817). El ADNc derivado del ARN genómico del virus contenido en cada plásmido se ligó uno con otro por PCR y utilizando enzimas de restricción, y así se clonó el ADNc genómico de longitud total. Una secuencia promotora de ARN de T7 se insertó aguas arriba del genoma del virus de longitud total. En adelante, el ADN de plásmido así construido se denomina pJFH1. Se debe observar que la producción del clon JFH-1 mencionado anteriormente se describe en la Publicación de Patente Japonesa (Kokai) N° 2002-171978 A y el documento de Kato y col. (Kato y col., J. Med. Virol., (2001) 64(3): pp. 334-339). Además, la secuencia de nucleótidos del ADNc de longitud completa del clon JFH-1 ha sido registrada en el International DNA Databank (DDBJ/ EMBL/GenBank) bajo el N° de acceso AB047639.

Posteriormente, EMCV-IRES (sitio interno de entrada al ribosoma para el virus de la encefalomiocarditis) y un gen de resistencia a la neomicina (neo; también denominado gen de la neomicina-fosfotransferasa) se insertaron entre la región no traducida 5' y la región de núcleo de pJFH1, que era ADN de plásmido, para construir pFGREP-JFH1, que era ADN de plásmido. Dicha construcción se llevó a cabo de acuerdo con los procedimientos de Ikeda y col. (Ikeda y col., J. Virol., (2002) 76(6):pp. 2997-3006).

2. Construcción del vector de expresión quimérico

La cepa JFH1 es VHC derivado de VHC de tipo 2a. Una cepa TH derivada de VHC de tipo 1b (Wakita y col., J. Biol. Chem., (1994) 269, pp. 14205-14210; y Moradpour y col., Biochem. Biophys. Res. Commun., (1998) 246, pp. 920-924) se utilizó para producir un vector de VHC quimérico. Las partes de núcleo, E1, E2, y p7 del pFGREP-JFH1 tal como se produjo anteriormente se sustituyeron por las de la cepa TH, para producir VHC quimérico, pFGREP-TH/JFH1.

En la presente especificación, la secuencia de ARN de longitud completa de la cepa JFH-1 mencionada anteriormente (derivada de un clon JFH-1) y la secuencia parcial de ARN de la cepa TH

utilizada para producir el cuerpo quimérico anterior (ARN genómico parcial (1-3748) que comprende una parte correspondiente a la región desde la región no traducida 5' de la cepa TH de VHC hasta la región NS3 de la misma), se muestran en las SEQ ID NO: 9 y 10, respectivamente. En la secuencia de ARN genómico de longitud completa de la cepa JFH-1 (SEQ ID NO: 9) mencionada anteriormente, la "región no traducida 5'" corresponde a 1-340, la "secuencia codificante de la proteína núcleo" corresponde a 341-913, la "secuencia codificante de la proteína E1" corresponde a 914-1489, la "secuencia codificante de la proteína E2" corresponde a 1490-2590, la "secuencia codificante de la proteína NS2" corresponde a 2780-3430, la "secuencia codificante de la proteína NS3" corresponde a 3431-5323, la "secuencia codificante de la proteína NS4A" corresponde a 5324-5486, la "secuencia codificante de la proteína NS4B" corresponde a 5487-6268 la "secuencia codificante de la proteína NS5A" corresponde a 6269-7663 y la "secuencia codificante de la proteína NS5B" corresponde a 7664-9442.

3. Producción de ARN del replicón de VHC quimérico de longitud completa

Con el fin de producir ADN plantilla utilizado para la síntesis de ARN del replicón de VHC quimérico de longitud completa, el vector de expresión pFGREP-TH/JFH1 tal como se construyó más arriba se clivó con la enzima de restricción XbaI. A continuación, 10 a 20 µg del fragmento de clivaje de XbaI se mezclaron en 50 µl de una solución de reacción y la mezcla obtenida se incubó con 20 U de Mung Bean Nuclease a 30°C durante 30 minutos. La Mung Bean Nuclease es una enzima que cataliza una reacción de digestión selectiva de una parte de una sola hebra en ADN de dos hebras. En general, cuando el ARN se sintetiza directamente utilizando el fragmento de clivaje con XbaI mencionado anteriormente como plantilla, se sintetiza el ARN del replicón, a cuyo terminal 3' se añaden de forma redundante 4 nucleótidos CUGA que constituyen una parte de una secuencia de reconocimiento de XbaI. Así, en el presente ejemplo, dicho fragmento de clivaje con XbaI fue tratado con Mung Bean Nuclease, para eliminar los 4 nucleótidos CUGA del fragmento con XbaI. A continuación, la solución así tratada con Mung Bean Nuclease que contenía el fragmento de clivaje con XbaI se sometió a un tratamiento de eliminación de proteínas de acuerdo con los métodos habituales, para que el fragmento de clivaje con XbaI, del que se habían eliminado los 4 nucleótidos CUGA, se purificara. El fragmento purificado se utilizó como ADN plantilla.

Posteriormente, el ARN fue sintetizado *in vitro* a partir del ADN plantilla utilizando ARN polimerasa de T7. Se utilizó MEGAscript fabricado por Ambion para dicha síntesis de ARN. 20 µl de una solución de reacción que contenía de 0,5 a 1,0 µg del ADN plantilla se dejó reaccionar de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

A la finalización de la síntesis de ARN, se añadió a la solución de reacción DNasa (2U) y la mezcla obtenida se sometió a reacción a 37°C durante 15 minutos. A continuación, se extrajo el ARN con ácido fenólico y se eliminó el ADN plantilla. Así, el ARN sintetizado a partir del ADN plantilla mencionado anteriormente procedente de pFGREP-TH/JFH1 se denominó rFGREP-TH/JFH1. La secuencia de nucleótidos del ARN genómico del VHC quimérico en rFGREP-TH/JFH1 se muestra en la SEQ ID NO: 11. Dicho rFGREP-TH/JFH1 es un ejemplo del ARN del replicón del VHC quimérico de longitud total de la presente invención.

40 Ejemplo 5: Producción de células replicantes del ARN del replicón del VHC quimérico de longitud total y constitución del clon celular

1. Introducción del ARN genómico del VHC quimérico de longitud total en células

Distintas cantidades del ARN genómico del VHC quimérico de longitud total (rFGREP-TH/JFH1) tal como se sintetizó anteriormente se mezclaron con ARN celular total extraído de células Huh7, resultando la cantidad total de ARN en 10 µg. Posteriormente, se introdujo el ARN mezclado en células Huh7 por el método de electroporación. Tras haber sido cultivadas las células durante 16 a 24 horas, se añadió G418 al mismo en distintas cantidades. El cultivo continuó mientras la solución de cultivo se cambiaba por una solución fresca dos veces a la semana. A la finalización del cultivo durante 21 días, se tiñeron las células supervivientes con violeta cristal. Se contó el número de colonias teñidas y entonces se calculó el número de colonias obtenidas por peso de ARN utilizado para la transfección. Además, en varias placas de cultivo, se clonaron las colonias de células supervivientes y el cultivo continuó. Se extrajo ARN, ADN genómico y una proteína de las células clonadas y, a continuación, se investigó la detección de ARN del replicón de VHC quimérico de longitud completa, la presencia o ausencia de incorporación de un gen de resistencia a la neomicina en el ADN genómico y la expresión de una proteína de VHC. Se muestran los resultados en detalle más abajo.

55 2. Capacidad de formación de colonias

Como consecuencia de la transfección mencionada anteriormente, la formación de colonias por las células se observó aún en un caso donde la concentración de G418 era de 1,0 mg/ml. Se consideró que el ARN del replicón de rFGREP-TH/JFH1 se replicaba de forma autónoma en las células Huh7 transfectadas con el ARN del replicón de rFGREP-TH/JFH1, y que un gen de resistencia a la neomicina

se expresaba persistentemente para mantener la resistencia al G418. Así, las células podían desarrollarse y las células Huh7 adquirir la capacidad de formación de colonias.

Ejemplo 6: Infectividad del virus quimérico VHC en el sobrenadante de cultivo

Experimento referente a la infectividad de partículas virales del VHC quimérico en sobrenadante de cultivo

- 5 Se transfectaron células Huh7 con rFGREP-TH/JFH1 y se recuperó entonces el sobrenadante de cultivo que contenía clones de células replicantes del ARN del replicón del VHC quimérico de longitud completa. Se añadió el sobrenadante de cultivo a células Huh7 que no habían sido infectadas, de modo tal que las células Huh7 se infectaron con partículas virales en el sobrenadante de cultivo. Al día siguiente a la infección, se añadieron 0,3 mg/ml de G418 al medio de cultivo que contenía las células Huh7
10 infectadas y luego se cultivó la mezcla durante 21 días. A la finalización del cultivo, se fijaron las células y luego se tiñeron con violeta cristal. Como resultado, se observó la formación de colonias en las células infectadas con el sobrenadante de cultivo que contenía clones de células replicantes de ARN del replicón del VHC quimérico de longitud completa obtenidos mediante transfección con rFGREP-TH/JFH1. Esto muestra que los clones de células replicantes de ARN del replicón del VHC quimérico de longitud
15 completa obtenidos por transfección con rFGREP-TH/JFH1 generan VHC infeccioso y también que el VHC presenta infectividad a nuevas células.

Ejemplo 7: Purificación de partículas de VHC

1. Filtración en gel

- 20 La Figura 11 muestra la distribución de partículas de VHC en cada fracción mediante cromatografía de filtración en gel. Los soportes de gel utilizados fueron Sephacryl(R) S300, S400 y S500. Una solución que contiene partículas de VHC utilizada para la cromatografía en columna se purificó por cromatografía en una columna que contenía cada uno de los soportes de gel anteriores. El tampón utilizado para la purificación comprendía 10 mM de Tris-clorhidrato, 1 mM ácido etilendiaminotetraacético y 100 mM cloruro de sodio (pH 8,0). Como consecuencia, en el caso de utilizar Sephacryl(R) S-300, se
25 obtuvieron partículas de VHC a una fracción pasante denominada fracción de vacío. Así, utilizando Sephacryl(R) S-300, se separaron las partículas de VHC de las proteínas de pequeño peso molecular, de modo que pudo cambiarse la concentración de sal de la solución. La relación entre la proteína núcleo de VHC y la masa de proteína total era de 3,78 cuando se comparó con las partículas de VHC antes de la purificación en columna y, por tanto, la relación entre las partículas de VHC y la proteína total aumentó.
30 Por otra parte, en el caso de utilizar Sephacryl(R) S-400 y S-500, como se obtuvieron las partículas de VHC a una fracción eluida dependiendo del peso molecular, las partículas se pueden separar de otras proteínas con distintos pesos moleculares.

2. Cromatografía de intercambio iónico

- 35 La Figura 12 muestra la distribución de partículas de VHC en cada fracción mediante cromatografía de intercambio iónico. Los soportes de gel utilizados fueron SP Sefarosa HP(R) y Q Sefarosa HP(R).

- En el caso de una columna utilizando SP Sefarosa HP(R), la columna se equilibró con 50 mM de un tampón de ácido cítrico (pH 6,2). Se añadió a la columna una solución que contenía partículas de VHC que había sido concentrada mediante un ultrafiltro con un peso molecular fraccional situado entre 100.000
40 y 500.000 y luego diluida con 50 mM de un tampón de ácido cítrico (pH 6,2). A continuación, se hizo pasar por la columna 50 mM de un tampón de ácido cítrico (pH 6,2) a un caudal aproximadamente 10 veces superior al de la columna. Posteriormente, 50 mM de tampón de ácido cítrico (pH 6,2) a los que se había añadido 0,1M NaCl, 0,3M NaCl y 1M NaCl, se hicieron pasar sucesivamente por la columna a un volumen aproximadamente 3 veces superior al de la columna. A continuación, 50 mM de un tampón de ácido
45 cítrico (pH 6,2) al que se había añadido 1M NaCl pasó por la columna a un volumen aproximadamente 5 veces superior al de la columna (fracción 1M de NaCl). Como resultado, las partículas de VHC se eluyeron en la fracción de 50 mM de tampón de ácido cítrico (pH 6,2) al que se había añadido 0,1M NaCl.

- En el caso de una columna utilizando Q Sefarosa HP(R), la columna se equilibró con 50 mM de un tampón de Tris-HCl (pH 8,0). Se añadió a la columna una solución que contenía partículas de VHC que había sido concentrada mediante un ultrafiltro con un peso molecular fraccional situado entre 100.000
50 y 500.000 y luego diluida con 50 mM de tampón de Tris-HCl (pH 8,0). A continuación, 50 mM de un tampón de Tris-HCl (pH 8,0) pasó por la columna, a un volumen aproximadamente 10 veces superior al de la columna. Posteriormente, 50 mM de tampones de Tris-HCl (pH 8,0) a los que se había añadido 0,1M NaCl, 0,3M NaCl y 1M NaCl pasaron sucesivamente por la columna, a un volumen
55 aproximadamente 3 veces superior al de la columna. A continuación, 50 mM de un tampón de Tris-HCl (pH 8,0) al que se había añadido 1M NaCl, pasó por la columna a un volumen aproximadamente 5 veces superior al de la columna (fracción 1M de NaCl). Como resultado, las partículas de VHC se eluyeron en la fracción de 50 mM de tampón de Tris-HCl (pH 8,0), al que se había añadido 0,3M NaCl. La relación entre la proteína núcleo del VHC y la masa de proteína total era de 2,32 cuando se comparó con las

partículas de VHC antes de la purificación en columna y, por tanto, la relación entre las partículas de VHC y la proteína total aumentó.

3. Cromatografía de afinidad

5 La Figura 13 muestra la distribución de partículas de VHC en cada fracción mediante cromatografía de afinidad con lectina. En la cromatografía de afinidad se utilizaron soportes a los que se unen cada uno de RCA-120, ConA, LCA y WGA.

10 En el caso de cromatografía de afinidad con ConA, LCA y WGA, la columna se equilibró con una solución salina tamponada con fosfato. Se añadió a la columna una solución que contenía partículas de VHC que había sido concentrada mediante un ultrafiltro con un límite de peso molecular situado entre 100.000 y 500.000 y luego diluida con una solución salina tamponada con fosfato. A continuación, la solución salina tamponada con fosfato pasó por la columna a un volumen aproximadamente 10 veces superior al de la columna. Posteriormente, una solución salina tamponada con fosfato a la que se había añadido 0,35M lactosa pasó por la columna, a un volumen aproximadamente 3 veces superior al de la columna. A continuación, una solución salina tamponada con fosfato a la que se había añadido 0,5M lactosa pasó por la columna, a un volumen aproximadamente 5 veces superior al de la columna. Como resultado, en el caso de la cromatografía de afinidad con LCA y ConA, no se observó ninguna unión específica al soporte. En el caso de la cromatografía de afinidad con WGA, las partículas de VHC se eluyeron en la fracción de solución salina tamponada con fosfato a la que se había añadido 0,35M lactosa.

20 En el caso de cromatografía de afinidad con RCA-120, la columna se equilibró con una solución salina tamponada con fosfato. Se añadió a la columna una solución que contenía partículas de VHC que había sido concentrada por un ultrafiltro con un peso molecular fraccional situado entre 100.000 y 500.000 y luego diluida con una solución salina tamponada con fosfato. A continuación, la solución salina tamponada con fosfato pasó por la columna a un volumen aproximadamente 10 veces superior al de la columna. Posteriormente, la solución salina tamponada con fosfato a la que se había añadido 0,38M lactosa pasó por la columna, a un volumen aproximadamente 3 veces superior al de la columna. A continuación, una solución salina tamponada con fosfato a la que se había añadido 0,38M lactosa pasó por la columna, a un volumen aproximadamente 5 veces superior al de la columna. Como resultado, en el caso de la cromatografía de afinidad con RCA-120, las partículas de VHC se eluyeron en la fracción de solución salina tamponada con fosfato a la que se había añadido 0,38M lactosa.

La Figura 14 muestra la distribución de partículas de VHC en cada fracción mediante cromatografía de afinidad con heparina y celulofina sulfatada.

35 En cada cromatografía de afinidad, la columna se equilibró con 20 mM de un tampón fosfato (pH 7,0). Se añadió a la columna una solución que contenía partículas de VHC que había sido concentrada mediante un ultrafiltro con un límite de peso molecular situado entre 100.000 y 500.000 y luego diluida con 20 mM de tampón fosfato (pH 7,0). A continuación, el tampón fosfato (pH 7,0) pasó por la columna a un volumen aproximadamente 10 veces superior al de la columna. Posteriormente, tampones fosfato (pH 7,0) a los que se habían añadido uno cualquiera de 0,1M, 0,3M, 0,5M y 1M de NaCl pasaron sucesivamente por la columna a un volumen aproximadamente 3 veces superior al de la columna. A continuación, 20 mM de un tampón fosfato (pH 7,0) al que se había añadido 1M NaCl pasó por la columna a un volumen aproximadamente 5 veces superior al de la columna. Como resultado, en el caso de la cromatografía de afinidad con heparina, las partículas de VHC se eluyeron en la fracción de 20 mM de tampón fosfato (pH 7,0) al que se había añadido 0,3M NaCl. La relación entre la proteína núcleo del VHC y la masa de proteína total fue de 0,36 cuando se comparó con las partículas de VHC antes de la purificación en columna y, por tanto, la relación entre las partículas de VHC y la proteína total se redujo. En el caso de la cromatografía de afinidad con celulofina sulfatada, las partículas de VHC se eluyeron en la fracción de 20 mM de tampón fosfato (pH 7,0) a la que se había añadido 0,1M NaCl.

La Figura 15 muestra la distribución de partículas de VHC en cada fracción mediante cromatografía de afinidad por tinción azul.

50 En la cromatografía de afinidad por tinción azul, se utilizó para la columna un soporte obtenido mediante la unión de Azul Cibacrón F3G-A a partículas de agarosa. La columna se equilibró con 20 mM de tampón fosfato (pH 7,0). Se añadió a la columna una solución que contenía partículas de VHC que había sido concentrada mediante un ultrafiltro con un límite de peso molecular situado entre 100.000 y 500.000 y luego diluida con 20 mM de un tampón fosfato (pH 7,0). A continuación, una solución salina tamponada con fosfato pasó por la columna a un volumen aproximadamente 10 veces superior al de la columna. Posteriormente, 20 mM de tampones fosfato (pH 7,0) a los que se habían añadido 1M ó 2M NaCl pasaron sucesivamente por la columna, a un volumen aproximadamente 3 veces superior al de la columna. A continuación, 20 mM de un tampón fosfato (pH 7,0) al que se había añadido 2M NaCl pasó por la columna, a un volumen aproximadamente 5 veces superior al de la columna. Como resultado, las partículas de VHC se eluyeron en una fracción no ligante de la columna. La relación entre la proteína núcleo del VHC y la masa de proteína total fue de 3,33 cuando se comparó con las partículas de VHC

antes de la purificación en columna y, por tanto, la relación entre las partículas de VHC y la proteína total aumentó.

4. Centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa

5 Se purificaron las partículas de VHC mediante la utilización combinada de cromatografía en columna y centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa con referencia a los ejemplos mencionados anteriormente.

10 En primer lugar, se purificaron las partículas de VHC utilizando Q Sefarosa HP(R). La columna se equilibró con 50 mM de un tampón de Tris-HCl (pH 8,0). Se añadió a la columna una solución que contenía partículas de VHC que había sido concentrada mediante un ultrafiltro con un peso molecular fraccional situado entre 100.000 y 500.000 y luego diluida con 50 mM de un tampón de Tris-HCl (pH 8,0). A continuación, 50 mM de un tampón de Tris-HCl (pH 8,0) pasó por la columna a un volumen aproximadamente 10 veces superior al de la columna. Posteriormente, 50 mM del tampón de Tris-HCl (pH 8,0) al que se había añadido cada uno de 0,1M NaCl, 0,3M NaCl y 1M NaCl pasaron sucesivamente por la columna, a un volumen aproximadamente 3 veces superior al de la columna. A continuación, 50 mM de un tampón de Tris-HCl (pH 8,0) al que se había añadido 1M NaCl pasó por la columna, a un volumen aproximadamente 5 veces superior al de la columna (fracción 1M de NaClW). Como resultado, tal como se muestra en la Figura 16A, las partículas de VHC se eluyeron en la fracción de 50 mM del tampón de Tris-HCl (pH 8,0) a la que se había añadido 0,3M NaCl; la fracción de 50 mM del tampón de Tris-HCl (pH 8,0) a la que se había añadido 1M NaCl; y la fracción 1M de NaClW. Se recogieron las fracciones que contenían las partículas de VHC. La relación entre la proteína núcleo del VHC y la masa de proteína total fue de 2,29 cuando se comparó con las partículas de VHC antes de la purificación en columna y, por tanto, la relación entre las partículas de VHC y la proteína total aumentó.

25 En segundo lugar, las partículas de VHC se purificaron mediante cromatografía en celulofina sulfatada. En cada cromatografía, la columna se equilibró con 20 mM de un tampón fosfato (pH 7,0). Se añadió a la columna una solución que contenía partículas de VHC obtenida mediante la concentración por un ultrafiltro con un límite de peso molecular situado entre 100.000 y 500.000 conteniendo las fracciones partículas de VHC purificadas con Q Sefarosa HP(R), y luego dilución del resultado con 20 mM de tampón fosfato (pH 7,0). A continuación, el tampón fosfato (pH 7,0) pasó por la columna a un volumen aproximadamente 10 veces superior al de la columna. Posteriormente, 20 mM de tampones fosfato (pH 7,0) a los que se habían añadido 0,25M ó 1M NaCl pasaron sucesivamente por la columna, a un volumen aproximadamente 3 veces superior al de la columna. A continuación, 20 mM de un tampón fosfato (pH 7,0) al que se había añadido 1M NaCl pasó por la columna, a un volumen aproximadamente 5 veces superior al de la columna. Como resultado, tal como se muestra en la Figura 16B, partículas de VHC se eluyeron principalmente en 20 mM de tampón fosfato (pH 7,0) al que se había añadido 1M NaCl. La relación entre la proteína núcleo del VHC y la masa de proteína total en 20 mM del tampón fosfato (pH 7,0) al que se había añadido 1M NaCl fue de 31,4 cuando se comparó con las partículas de VHC antes de la purificación en columna. Por tanto, la relación entre las partículas de VHC y la proteína total aumentó.

40 Además, se purificaron partículas de VHC mediante centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa. La fracción de 20 mM del tampón fosfato (pH 7,0) a la que se había añadido 1M NaCl mediante cromatografía en celulofina sulfatada se concentró mediante un ultrafiltro con un límite de peso molecular situado entre 100.000 y 500.000 y luego se diluyó con un tampón TEN (10 mM de tampón Tris-HCl (pH 8,0), 0,1M cloruro de sodio y 1 mM ácido etilendiaminotetraacético (pH 8,0)). Una solución que contenía partículas de VHC se laminó sobre una solución obtenida por laminación de soluciones de sacarosa al 60%, 50%, 40%, 30%, 20% y 10%, y la solución obtenida se centrifugó a 390 kg durante 18 horas a 4°C. 45 Como las partículas de VHC se agruparon en una fracción con una gravedad específica de aproximadamente 1,2, se recogió la fracción. La relación entre la proteína núcleo del VHC y la masa de proteína total en la fracción recogida fue de 1,69 cuando se comparó con las partículas de VHC antes de la purificación en columna. Por tanto, la relación entre las partículas de VHC y la proteína total aumentó.

50 En la fracción que contenía partículas de VHC purificadas mediante centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa, la relación entre la proteína núcleo del VHC y la masa de proteína total fue aproximadamente de 120 veces la purificada cuando se comparó con la relación antes del inicio de la cromatografía en columna. La fracción final contenía 10^9 copias/ml de partículas de VHC.

Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patentes citadas aquí se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

55 Aplicación Industrial

La presente invención permite la producción de partículas virales de VHC con varios genotipos en un sistema de células cultivadas. Es decir, aún en el caso de una cepa de VHC que no puede replicarse de forma autónoma *in vitro*, tal como las cepas de VHC aisladas de pacientes, la parte de la secuencia de ARN de las mismas que codifica las proteínas NS3, NS4, NS5A y NS5B se sustituye por 60 una parte de la secuencia de ARN que codifica las proteínas NS3, NS4, NS5A y NS5B de JFH1, de modo

- tal que la cepa HSV anterior puede replicarse de forma autónoma en un sistema de células cultivadas, produciendo así partículas de VHC. Las partículas de VHC purificadas por la presente invención se pueden utilizar directamente como vacuna para uso médico. El ARN genómico del VHC o las partículas virales proporcionadas por la presente invención se pueden utilizar también como vector viral para un gen extraño. Además, el método de la presente invención también se puede utilizar para estudios referentes a un proceso de infección por VHC o para la producción de un sistema de cribado para varias sustancias que afectan a dicho proceso de infección por VHC.

Texto Libre del Listado de Secuencias

	SEQ ID NO: 1	secuencia que codifica las proteínas NS3 a NS5 de JFH1 (secuencia de ADNc)
10	SEQ ID NO: 2	secuencia que codifica las proteínas NS3 a NS5 de JFH1 (secuencia de ADNc)
	SEQ ID NO: 3	proteína NS5B de JFH1
	SEQ ID NO: 4	Péptido sintético diseñado en base a un fragmento E2 de JFH1
	SEQ ID NO: 5	Péptido sintético diseñado en base a un fragmento E2 de JFH1
	SEQ ID NO: 6	Cebador (R6-130-S17)
15	SEQ ID NO: 7	Cebador (R6-290-R19)
	SEQ ID NO: 8	Sonda TaqMan (R6-148-S21FT)
	SEQ ID NO: 9	ARN genómico del virus de la Hepatitis C de longitud completa derivado de la cepa JFH1 (clon JFH-1)
20	SEQ ID NO: 10	Secuencia de ARN genómico que comprende la región 5' UTR a NS3 de la cepa TH1
	SEQ ID NO: 11	ARN genómico del virus de la Hepatitis C quimérico derivado de la cepa JFH1 del VHC (clon JFH-1) y de la cepa TH del VHC

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Tokyo Metropolitan Organization for Medical Research Toray Industries Inc.
- <120> ARN genómico del virus de la hepatitis C que se puede replicar de forma autónoma
- <130> PH-2565-PCT
- 5 <140>
- <141>
- <150> JP 2004-290801
- <151> 01.10.2004
- <150> JP 2004-243975
- 10 <151> 24.08.2004
- <150> JP 2005-069527
- <151> 11.03.2005
- <150> JP 2005-069725
- <151> 11.03.2005
- 15 <160> 11
- <170> PatentIn Ver. 3.1
- <210> 1
- <211> 6013
- <212> ADN
- 20 <213> Virus de la hepatitis C
- <220>
- <223> Inventor: Wakita, Takaji
- Inventor: Kato, Takanobu
- Inventor: Date, Tomoko
- 25 Inventor: Bartenchlager, Ralf
- Inventor: Tanabe, Junichi
- Inventor: Sone, Saburou
- <220>
- <223> secuencia que codifica las proteínas NS3 a NS5 de JFH1 (secuencia de ADNc)
- 30 <400> 1

gctcccatca	ctgcttatgc	ccagcaaaca	cgaggcctcc	tgggcgccat	agtggtgagt	60
atgacggggc	gtgacaggac	agaacaggcc	ggggaagtcc	aaatcctgtc	cacagtctct	120
cagtccttcc	tcggaacaac	catctcgggg	gttttggtga	ctgtttacca	cggagctggc	180
aacaagactc	tagccggctt	acgggggtccg	gtcacgcaga	tgtactcgag	tgtctgagggg	240
gacttggtag	gctggcccag	ccccctggg	accaagtctt	tggagccgtg	caagtgtgga	300
gccgtcgacc	tatatctggt	cacgcggaac	gctgatgtca	tcccggctcg	gagacgcggg	360
gacaagcggg	gagcattgct	ctccccgaga	cccatttcga	ccttgaaggg	gtctcggggg	420
gggccgggtg	tctgccctag	gggccacgtc	gttgggctct	tccgagcagc	tgtgtgctct	480
cggggcgtgg	ccaaatccat	cgatttcate	cccgttgaga	cactcgacgt	tgttacaagg	540
tctcccactt	tcagtgacaa	cagcacgcca	ccggctgtgc	cccagaccta	tcaggtcggg	600
tacttgcatt	ctccaactgg	cagtggaaag	agcaccaagg	tccctgtcgc	gtatgccgcc	660
caggggtaca	aagtactagt	gcttaacccc	tcggtagctg	ccaccctggg	gtttggggcg	720
tacctatcca	aggcacatgg	catcaatccc	aacattagga	ctggagtcag	gaccgtgatg	780
accggggagg	ccatcacgta	ctccacatat	ggcaaatttc	tcgccgatgg	gggctgcgct	840
agcggcgctt	atgacatcat	catatgcgat	gaatgccacg	ctgtggatgc	tacctcatt	900
ctcggcatcg	gaacggctct	tgatcaagca	gagacagccg	gggtcagact	aactgtgctg	960
gctacggcca	caccccccg	gtcagtgaca	acccccatc	ccgatataga	agaggtaggc	1020
ctcgggcggg	agggtgagat	ccccttctat	gggagggcga	ttcccctatc	ctgcatcaag	1080
ggagggagac	acctgatttt	ctgccactca	aagaaaaagt	gtgacgagct	cgcggcggcc	1140
cttcggggca	tgggcttgaa	tgccgtggca	tactatagag	ggttggacgt	ctccataata	1200
ccagctcagg	gagatgtggt	ggtcgtcgc	accgacgccc	tcatgacggg	gtacactgga	1260
gactttgact	ccgtgatcga	ctgcaatgta	gcggtcacc	aagctgtcga	cttcagcctg	1320
gacccacct	tcactataac	cacacagact	gtcccacaag	acgtgtctc	acgcagtcag	1380
cgcgcggggc	gcacaggtag	aggaagacag	ggcacttata	ggtatgttc	cactggtgaa	1440
cgagcctcag	gaatgtttga	cagtgtagt	ctttgtgagt	gctacgacgc	aggggctgcg	1500
tggtacgata	tcacaccagc	ggagaccacc	gtcaggctta	gagcgtattt	caacacgccc	1560
ggcctaccg	tgtgtcaaga	ccatctttaa	ttttgggagg	cagttttcac	cggcctcaca	1620
cacatagacg	cccacttct	ctcccaaaca	aagcaagcgg	gggagaactt	cgcgtacct	1680

gtagcctacc	aagctacggt	gtgcgccaga	gccaaaggccc	ctcccccgtc	ctgggacgcc	1740
atgtggaagt	gcctggcccc	actcaagcct	acgcttgccg	gccccacacc	tctcctgtac	1800
cgtttgggcc	ctattaccaa	tgaggtcacc	ctcacacacc	ctgggacgaa	gtacatcgcc	1860
acatgcatgc	aagctgacct	tgaggcatg	accagcacgt	gggtcctagc	tggaggagtc	1920
ctggcagccc	tcgccgcata	ttgcctggcg	actggatgcg	tttccatcat	cggccgcttg	1980
cacgtcaacc	agcgagtcgt	cgttgcgccg	gataaggagg	tcttgtatga	ggcttttgat	2040
gagatggagg	aatgcgcctc	tagggcggct	ctcatcgaag	aggggcagcg	gatagccgag	2100
atgttgaagt	ccaagatcca	aggcttgctg	cagcaggcct	ctaagcaggc	ccaggacata	2160
caaccocgcta	tgcaggcttc	atggcccaaa	gtggaacaat	tttgggccag	acacatgtgg	2220
aacttcatta	gcggcatacca	atacctcgca	ggattgtcaa	cactgccagg	gaaccccgcg	2280
gtggcttcca	tgatggcatt	cagtccgcc	ctcaccagtc	cgttgtcgac	cagtaccacc	2340
atccttctca	acatcatggg	aggctggtta	gcgtcccaga	tcgaccacc	cgcgggggcc	2400
accggctttg	tcgtcagtg	cctgggtggg	gctgccgtgg	gcagcatagg	cctgggtaag	2460
gtgctggtgg	acatcctggc	aggatatggt	gcgggcattt	cgggggcct	cgctgcattc	2520
aagatcatgt	ctggcgagaa	gccctctatg	gaagatgtca	tcaatctact	gctgggatc	2580
ctgtctccgg	gagccctggt	ggtgggggtc	atctgcgcgg	ccattctgcg	ccgccacgtg	2640
ggaccggggg	agggcgcggt	ccaatggatg	aacaggctta	ttgcctttgc	ttccagagga	2700
aaccacgtcg	cccctactca	ctacgtgacg	gagtcggatg	cgctgcagcg	tgtgacccaa	2760
ctacttggct	ctcttactat	aaccagccta	ctcagaagac	tccacaattg	gataactgag	2820
gactgcccc	tcccatgctc	cggatcctgg	ctccgcgacg	tgtgggactg	ggtttgcacc	2880
atcttgacag	acttcaaaaa	ttggctgacc	tctaaattgt	tccccaaagt	gcccggcctc	2940
cccttcatct	cttgtcaaaa	ggggtacaag	ggtgtgtggg	ccggcactgg	catcatgacc	3000
acgcgctgcc	cttgcggcgc	caacatctct	ggcaatgtcc	gcctgggctc	tatgaggatc	3060
acagggccta	aaacctgcat	gaacacctgg	caggggacct	ttcctatcaa	ttgctacacg	3120
gagggccagt	gcgcgccgaa	acccccacg	aactacaaga	ccgccatctg	gaggggtggc	3180
gcctcggagt	acgcggaggt	gacgcagcat	gggtcgtact	cctatgtaac	aggactgacc	3240
actgacaatc	tgaaaattcc	ttgccaaacta	ccttctccag	agtttttctc	ctgggtggac	3300
ggtgtgcaga	tccatagggt	tgcaccaca	caaagccgt	ttttccggga	tgaggtctcg	3360
ttctgcgttg	ggcttaattc	ctatgctgtc	gggtcccagc	ttccctgtga	acctgagccc	3420
gacgcagacg	tattgaggtc	catgctaaca	gatccgcccc	acatcacggc	ggagactgcg	3480
gcgcggcgct	tggcacgggg	atcacctcca	tctgaggcga	gctcctcagt	gagccagcta	3540
tcagcacctg	cgctgcgggc	cacctgcacc	accacagca	acacctatga	cgtggacatg	3600
gtcgatgcca	acctgctcat	ggagggcggg	gtggctcaga	cagagcctga	gtccaggggtg	3660
cccgttctgg	actttctcga	gccaatggcc	gaggaagaga	gcgaccttga	gccctcaata	3720
ccatcggagt	gcatgctccc	caggagcggg	tttccacggg	ccttaccggc	ttgggcacgg	3780
cctgactaca	accgcgcgct	cgtggaatcg	tggaggaggc	cagattacca	accgcccacc	3840
gttgctggtt	gtgctctccc	ccccccaag	aaggccccga	cgctcccc	aaggagacgc	3900
cggacagtgg	gtctgagcga	gagcaccata	tcagaagccc	tccagcaact	ggccatcaag	3960
acctttggcc	agccccctc	gagcggatg	gcaggctcgt	ccacgggggc	gggcgcgcc	4020
gaatccggcg	gtccgacgtc	ccctgggtgag	ccggccccct	cagagacagg	ttccgcctcc	4080
tctatgcccc	ccctcgaggg	ggagcctgga	gatccggacc	tggagtctga	tcaggtagag	4140
cttcaacctc	ccccccaggg	gggggggta	gctcccgggt	cgggctcggg	gtcttgggtct	4200
acttgctccg	aggaggacga	taccaccgtg	tgctgctcca	tgtcactctc	ctggaccggg	4260
gctctaataa	ctccctgtag	ccccgaagag	gaaaagtgtc	caatcaacc	tttgagtaac	4320
tcgctgttgc	gataccataa	caaggtgtac	tgtacaacat	caaagagcgc	ctcacagagg	4380

ES 2 360 808 T3

gctaaaaagg taacttttga caggacgcaa gtgctcgacg cccattatga ctcagtctta 4440
aaggacatca agctagcggc ttccaaggtc agcgcaaggc tcctcacctt ggaggaggcg 4500
tgccagttga ctccaccca ttctgcaaga tccaagtatg gattcggggc caaggaggtc 4560
cgcagctigt cggggagggc cgtaaccac atcaagtcgg tgtggaagga cctcctggaa 4620
gacccacaaa caccaattcc cacaaccatc atggccaaaa atgagggtgt ctgctgtggac 4680
cccgccaagg ggggtaagaa accagctcgc ctcatcgttt accctgacct cggcgtccgg 4740
gtctgcgaga aaatggccct ctatgacatt acacaaaagc tcctcaggc ggtaatggga 4800
gcttcctatg gcttccagta ctcccctgcc caacgggtgg agtatctctt gaaagcatgg 4860
gcgaaaaaga aggaccccat gggtttttcg tatgataccc gatgcttcca ctcaaccgtc 4920
actgagagag acatcaggac cgaggagtcc atataccagg cctgctccct gcccgaggag 4980
gcccgcactg ccatacactc gctgactgag agactttacg taggaggggc catgttcaac 5040
agcaagggtc aaacctgcgg ttacagacgt tgccgcgcca gcggggtgct aaccactagc 5100
atgggtaaca ccatcacatg ctatgtgaaa gccctagcgg cctgcaaggc tgcggggata 5160
gttgcgcca caatgctggt atgcgcgat gacctagtag tcatctcaga aagccagggg 5220
actgaggagg acgagcggaa cctgagagcc ttacggagg ccatgaccag gtactctgcc 5280
cctcctggtg atccccccag accggaatat gacctggagc taataacatc ctgttctca 5340
aatgtgtctg tggcgttggg ccgcggggc cgccgcagat actacctgac cagagacca 5400
accactccac tcgcccgggc tgctgggaa acagttagac actcccctat caattcatgg 5460
ctgggaaaca tcatccagta tgctccaacc atatgggttc gcatggctct aatgacacac 5520

ttcttctcca ttctcatggt ccaagacacc ctggaccaga acctcaactt tgagatgtat 5580
ggatcagtat actccgtgaa tcctttggac cttccagcca taattgagag gttacacggg 5640
cttgacgcct tttctatgca cacatactct caccacgaac tgacgcgggt ggcttcagcc 5700
ctcagaaaac ttggggcgcc acccctcagg gtgtggaaga gtcgggctcg cgcagtcagg 5760
gcgtccctca tctcccgtgg agggaaagcg gccgtttgcg gccgatatct cttcaattgg 5820
gcggtgaaga ccaagctcaa actcactcca ttgccggagg cgcgcctact ggacttatcc 5880
agttggttca ccgtcggcgc cggcggggc gacattttc acagcgtgtc gcgcgccga 5940
ccccgctcat tactcttcgg cctactccta cttttcgtag gggtaggcct ctctctactc 6000
cccgtcgggt aga 6013

<210> 2

<211> 1773

5 <212> ADN

<213> Virus de la hepatitis C

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (1773)

10 <220>

<223> secuencia que codifica las proteínas NS3 a NS5 de JFH1 (secuencia de ADNc)

<400> 2

ES 2 360 808 T3

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

tcc cgt gga ggg aaa gcg gcc gtt tgc ggc cga tat ctc ttc aat tgg 1584
 Ser Arg Gly Gly Lys Ala Ala Val Cys Gly Arg Tyr Leu Phe Asn Trp
 515 520 525

gcg gtg aag acc aag ctc aaa ctc act cca ttg ccg gag gcg cgc cta 1632
 Ala Val Lys Thr Lys Leu Lys Leu Thr Pro Leu Pro Glu Ala Arg Leu
 530 535 540

ctg gac tta tcc agt tgg ttc acc gtc ggc gcc ggc ggg ggc gac att 1680
 Leu Asp Leu Ser Ser Trp Phe Thr Val Gly Ala Gly Gly Gly Asp Ile
 545 550 555 560

ttt cac agc gtg tcg cgc gcc cga ccc cgc tca tta ctc ttc ggc cta 1728
 Phe His Ser Val Ser Arg Ala Arg Pro Arg Ser Leu Leu Phe Gly Leu
 565 570 575

ctc cta ctt ttc gta ggg gta ggc ctc ttc cta ctc ccc gct cgg 1773
 Leu Leu Leu Phe Val Gly Val Gly Leu Phe Leu Leu Pro Ala Arg
 580 585 590

<210> 3

<211> 591

5 <212> PRT

<213> Virus de la hepatitis C

<220>

<223> proteína NS5B de JFH1

<400> 3

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

1 5 10 15

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

Tyr His Asn Lys Val Tyr Cys Thr Thr Ser Lys Ser Ala Ser Gln Arg
 35 40 45

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

Asp Ser Val Leu Lys Asp Ile Lys Leu Ala Ala Ser Lys Val Ser Ala
 65 70 75 80

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

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

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

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

Phe Cys Val Asp Pro Ala Lys Gly Gly Lys Lys Pro Ala Arg Leu Ile
 145 150 155 160

Val Tyr Pro Asp Leu Gly Val Arg Val Cys Glu Lys Met Ala Leu Tyr
 165 170 175

Asp Ile Thr Gln Lys Leu Pro Gln Ala Val Met Gly Ala Ser Tyr Gly
 180 185 190

Phe Gln Tyr Ser Pro Ala Gln Arg Val Glu Tyr Leu Leu Lys Ala Trp
 195 200 205

Ala Glu Lys Lys Asp Pro Met Gly Phe Ser Tyr Asp Thr Arg Cys Phe
 210 215 220

Asp Ser Thr Val Thr Glu Arg Asp Ile Arg Thr Glu Glu Ser Ile Tyr
 225 230 235 240

Gln Ala Cys Ser Leu Pro Glu Glu Ala Arg Thr Ala Ile His Ser Leu
 245 250 255

Thr Glu Arg Leu Tyr Val Gly Gly Pro Met Phe Asn Ser Lys Gly Gln
 260 265 270

Thr Cys Gly Tyr Arg Arg Cys Arg Ala Ser Gly Val Leu Thr Thr Ser
 275 280 285

Met Gly Asn Thr Ile Thr Cys Tyr Val Lys Ala Leu Ala Ala Cys Lys
 290 295 300

Ala Ala Gly Ile Val Ala Pro Thr Met Leu Val Cys Gly Asp Asp Leu
 305 310 315 320

ES 2 360 808 T3

Val Val Ile Ser Glu Ser Gln Gly Thr Glu Glu Asp Glu Arg Asn Leu
 325 330 335

Arg Ala Phe Thr Glu Ala Met Thr Arg Tyr Ser Ala Pro Pro Gly Asp
 340 345 350

Pro Pro Arg Pro Glu Tyr Asp Leu Glu Leu Ile Thr Ser Cys Ser Ser
 355 360 365

Asn Val Ser Val Ala Leu Gly Pro Arg Gly Arg Arg Arg Tyr Tyr Leu
 370 375 380

Thr Arg Asp Pro Thr Thr Pro Leu Ala Arg Ala Ala Trp Glu Thr Val
 385 390 395 400

Arg His Ser Pro Ile Asn Ser Trp Leu Gly Asn Ile Ile Gln Tyr Ala
 405 410 415

Pro Thr Ile Trp Val Arg Met Val Leu Met Thr His Phe Phe Ser Ile
 420 425 430

Leu Met Val Gln Asp Thr Leu Asp Gln Asn Leu Asn Phe Glu Met Tyr
 435 440 445

Gly Ser Val Tyr Ser Val Asn Pro Leu Asp Leu Pro Ala Ile Ile Glu
 450 455 460

Arg Leu His Gly Leu Asp Ala Phe Ser Met His Thr Tyr Ser His His
 465 470 475 480

Glu Leu Thr Arg Val Ala Ser Ala Leu Arg Lys Leu Gly Ala Pro Pro
 485 490 495

Leu Arg Val Trp Lys Ser Arg Ala Arg Ala Val Arg Ala Ser Leu Ile
 500 505 510

Ser Arg Gly Gly Lys Ala Ala Val Cys Gly Arg Tyr Leu Phe Asn Trp
 515 520 525

Ala Val Lys Thr Lys Leu Lys Leu Thr Pro Leu Pro Glu Ala Arg Leu
 530 535 540

Leu Asp Leu Ser Ser Trp Phe Thr Val Gly Ala Gly Gly Gly Asp Ile
 545 550 555 560

Phe His Ser Val Ser Arg Ala Arg Pro Arg Ser Leu Leu Phe Gly Leu
 565 570 575

Leu Leu Leu Phe Val Gly Val Gly Leu Phe Leu Leu Pro Ala Arg
 580 585 590

<210> 4

<211> 14

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial:

Péptido sintético diseñado sobre la base del fragmento de E2 de JFH1

<400> 4

Gly Thr Thr Thr Val Gly Gly Ala Val Ala Arg Ser Thr Asn
 1 5 10

10

<210> 5

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial:

Péptido sintético diseñado en base al fragmento de E2 de JFH1

<400> 5

Cys Asp Leu Glu Asp Arg Asp Arg Ser Gln Leu Ser Pro Leu
 1 5 10

20

<210> 6

<211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador (R6-130-S17)
 <400> 6
 cgggagagcc atagtgg 17
 <210> 7
 <211> 19
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador (R6-290-R19)
 <400> 7
 15 agtaccacaa ggccttgc 19
 <210> 8
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: sonda TaqMan (R6-148-S21FT)
 <400> 8
 ctgcggaacc ggtgagtaca c 21
 <210> 9
 25 <211> 9707
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> ARN genómico del virus de la hepatitis C de longitud completa derivado de la cepa JFH1 (clon
 30 JFH-1)
 <400> 9

gaauucuaau acgacucacu auagaccugc cccuaauagg ggcgacacuc cgccaugaau 60
 cacuccccug ugaggaacua cugucuucac gcagaaagcg ccuagccaug gcguuaguau 120
 gagugucgua cagccuccag gcccccccu cccgggagag ccuaguggu cugcggaacc 180
 ggugaguaca ccggaauugc cgggaagacu ggguccuuuc uuggauaaac ccacucuaug 240
 cccggccaau ugggcgugcc cccgcaagac ugcuaagccga guagcguugg guugcgaag 300
 gccuuguggu acugccugau agggcgcuuug cgagugcccc gggaggucuc guagaccgug 360
 caccaugagc acaauuccua aaccucaaag aaaaacaaa agaaacacca accgucgcc 420
 agaagacguu aaguucccg gcggcggcca gaucguuggc ggaguauacu uguugccg 480
 caggggcccc agguugggug ugcgcacgac aaggaaaacu ucgagcggg cccagccacg 540
 ugggagacgc cagcccaucc ccaaagauc gcgcuccacu ggcaaggccu ggggaaaacc 600
 aggucgcccc uggccccuau augggauga gggacucggc ugggcaggau ggcuccuguc 660
 cccccgagc ucucgccccu ccuggggccc cacugacccc cggcauaggu cgcgcaacgu 720
 ggguaaaguc aucgacacc uaacgugug cuuugccgac cucauggggu acauccccgu 780
 cguaggcgcc ccgcuuagug gcgcccag agcugucg cagggcguga gaguccgga 840
 ggacgggguu aauuagcaa caggaaccu accgguuuc cccuuucua ucuucugcu 900
 ggcccuguug uccugcauca ccguuccggu cucugcugcc caggugaaga auaccaguag 960
 cagcuacaug gugaccaaug acugcuccaa ugacagcauc acuuggcagc ucgaggcugc 1020
 gguucuccac guccccgggu gcgucggug cgagagagug gggaaucgu cacgguguug 1080
 ggugccaguc ucgccaaca uggcugugcg gcagcccggg gccucacgc agggucugc 1140
 gacgcacauc gauaugguug ugauguccgc caccuucugc ucugcucucu acguggggga 1200
 ccucuguggc ggggugaugc ucgcggccc gguuucauc gucucgccc aguaccacug 1260
 guuugugcaa gaugcauu gcuccaaua cccuggcacc aucacuggac accgcauggc 1320
 augggacaug augaugaacu ggucgcccac ggccaccaug auccuggcgu acgugaugc 1380
 cguccccgag gucaucauag acaucguuag cggggcucac uggggcguca uguucggcuu 1440
 ggccuacuuc ucuauagcagg gagcuggggc gaaggucuu gucauccuuc ugcuggccgc 1500
 ugggguggac gcgggcacca ccaccguugg aggcgcuguu gcacguucca ccaacgugau 1560
 ugccggcgug uucagccaug gccucagca gaacauucag cucauuaca ccaacggcag 1620
 uuggcacauc aaccguacug ccuugaauug caaugacucc uugaacacc gcuuucugc 1680
 ggccuuguuc uacaccaacc gcuuaaacuc gucagggugu ccagggcgcc uguccccug 1740
 ccgcaaacuc gaggcuuucc ggauagggug gggcaccua caguacgagg auaaugucac 1800
 caauccagag gauaugaggc cguacugcug gcacuacccc ccaaagccgu guggcguagu 1860
 ccccgcgagg ucugugug gcccagugua cuguuucacc cccagcccgg uaguaguggg 1920
 cacgaccgac agacugggag ugcccaccua ccaugggga gagaugaga cagaugucuu 1980
 ccuacugaac agcaccgac cgcgcaggg cucaugguuc ggcugcacgu ggauaacuc 2040
 cacugguuuc accaagacu guggcgcgcc accuugccgc accagagcug acuuaacgc 2100
 cagcacggac uuguugucc cuacggauug uuuuaggaag cauccugaug ccacuuaau 2160
 uaaguguggu ucugggccc ggcucacacc aaagugccug guccacuacc cuuacagacu 2220
 cuggcauuac cccugcacag ucauuuuac caucucaag auaagaugu auguaggggg 2280
 gguugagcac aggcucacgg ccgcaugcaa cuucacugc ggggaucgcu gcgacuugga 2340
 ggacagggac aggagucagc ugucuccucu guugcacucu accacggaa gggcauccu 2400
 gccucgacc uacucagacu uaccgcuuu gucaacuggu cuucuccacc uucaccagaa 2460

caucguggac guacaauaca uguauggccu cucaccugcu aucacaaaau acgucguucg 2520
augggagugg gugguacucu uauuccugcu cuuagcggac gccagagucu gcgccugcuu 2580
guggaugcuc aucuuguugg gccaggccga agcagcauug gagaaguugg ucgucuugca 2640
cgcugcgagu gcggcuaacu gccauggccu ccuauuuuuu gccaucuucu ucguggcagc 2700
uuggcacauc aggggucggg uggucuccu gaccaccuau ugccucacug gccuauggcc 2760
cuucugccua cugcucaugg cacugccccg gcaggcuuau gccuauagac caccugugca 2820
cggacagaua ggcguggguu uguugauuuu gaucaccuc uucacacuca ccccggggua 2880
uaagaccuc cucggccagu gucuguggug guugugcuau cuccugacc ucgggggaaag 2940
caugauucag gaguggguac caccuagca ggucgcggc ggccgcgag gcaucgcgug 3000
ggccgucacu auauucugcc cggguguggu guuugacauu accaaauggc uuuuggcguu 3060
gcuugggccu gcuuaccucu uaagggccgc uuugacacu gugccguacu ucgucagagc 3120
ucacgcucug auaaaggguu gcgcuuuggu gaagcagcuc gcggggggua gguauguua 3180
gguggcgcua uggcccuug gcagguggac uggaccuac aucuagacc accucacacc 3240
uaugcggac uggccgcua gcggccugcg cgacuagcg gucgccgug aaccucau 3300
cuucagucc auggagaaga aggucaucgu cuggggagcg gagacggcug caugugggga 3360
cauucuacu ggacuuccg ugucccccg acucggccag gagauccuc ucggcccagc 3420
ugaugcuac accuccaagg gguggaagcu ccuugcucc aucacugcuu augcccagca 3480
aacacgaggc cuccuggcg ccuauaguggu gaguaagac gggcgugaca ggacagaaca 3540
ggccgggaa guccaaauc uguccacagu cucucagucc uuccucggaa caaccuuc 3600
ggggguuuug uggacuguuu accacggagc uggcaacaag acucuagcc gcuuacgggg 3660
uccggucac cagauguacu cgagugcuga gggggacuug guaggcuggc ccagcccc 3720
ugggaccaag ucuuuggagc cgugcaagug uggagccguc gaccuauauc uggucacgcg 3780
gaacgcugau gucauccgg cucggagac gggggacaag cggggagcau ugcucuccc 3840
gagaccuau ucgaccuuga agggguccuc gggggggccg gugcucugcc cuaggggcca 3900
cgucguuggg cucuuccgag cagcugugug cucucggggc guggccaaau ccaucgauuu 3960
caucccguu gagacacucg acguuguuac aaggucucc acuuucagug acaacagcac 4020
gccaccggcu guggcccaga ccuauaggu cggguacuug caugcuccaa cuggcagugg 4080
aaagagcacc aagguccug ucgcguuagc cgcccagggg uacaaaguac uagugcuuaa 4140
cccucggua gcugccacc ucggguuugg ggccguaccua uccaaggcac auggcauaa 4200
uccaacaau aggacuggag ucaggaccgu gaugaccggg gaggccauca cguacuccac 4260
auauggcaaa uuucucgccc augggggcug cgcuagcggc gccuauagaca ucaucauau 4320
cgaugaugc cacgcugugg augcuaccuc cauucucggc aucggaacgg uccuugauca 4380
agcagagaca gccgggguca gacuaacug gcuggcuac gccacacccc cgggucagu 4440
gacaaccccc caucccga uagaagaggu aggccucggg cgggagggug agaucuccu 4500
cuauaggagg gcgauuccc uauccugcau caagggaggg agacaccuga uuuucugcca 4560
cucaaagaaa aagugugacg agcucgcggc ggccuucgg ggcaugggcu ugaauccgu 4620
ggcauacuau agaggguugg acgucuccau aaauaccagcu cagggagau ugguggucgu 4680
cgccaccgac gcccucauga cgggguacac uggagacuuu gacuccguga ucgacugca 4740
uguagcgguc acccaagcug ucgacuucag ccuggacccc accuucacua uaaccacaca 4800
gacuguccca caagacgcug ucucacgag ucagcggcg gggcgcacag guagaggaa 4860
acagggcacu uauagguau uuuccacug ugaacgagc ucaggaaugu uugacagugu 4920
agugcuuugu gagugcuac acgcagggg ucgugguac gaucucacac cagcggagac 4980
caccgucagg cuuagagcgu auuucaacac gcccgccua cccguguguc aagaccauc 5040
ugaauuuugg gaggcaguuu ucaccggccu cacacacua gacggccacu uccucucca 5100
aacaagcaa gcgggggaga acucgcgua ccuaguagcc uaccaagcua cggugugcg 5160
cagagccaag gccccuccc cguccggga cgcauugg aaguccug cccgacuaa 5220

gccuacgcuu gcgggcccc caccucuccu guaccguuug ggcccuauua ccaaugaggu 5280
caccucaca caccugggga cgaaguacau cgccacaugc augcaagcug accuugaggu 5340
caugaccagc acgugggucc uagcuggagg aguccuggca gccgucgcc cauauugccu 5400
ggcgacugga ugcguuuca ucaucggccg cuugcacguc aaccagcgag ucgucguugc 5460
gccggauaag gagguccugu augaggcuuu ugaugagaug gaggaaugcg ccucuagggc 5520
ggcucucauc gaagaggggc agcggauagc cgagauguug aagucaaga uccaaggcuu 5580
gcugcagcag gccucuaagc aggccagga cauacaacc gccuagcagg cuucauggcc 5640
caaaguggaa cauuuuuggg ccagacacau guggaacuuc auuagcggca uccaauaccu 5700
cgcaggauug ucaacacugc cagggaacc cgcgguggcu uccaugaug cauucagugc 5760
cgccucacc aguccguugu cgaccaguac caccuuccu cuacaauca ugggaggcug 5820
guuagcucc cagaucgcac ccccgcggg gccaccggc uuugucguc guggccuggu 5880
ggggcugcc gugggcagca uaggccuggg uaaggucug guggacauc uggcaggaua 5940
uggucgggc auuucggggg ccucgucgc auucaagau augucuggcg agaagcccuc 6000
uauugaagau gucaucaauc uacugccugg gaucugucu ccgggagccc uggugguggg 6060
ggucaucugc gcggccauuc ugcgcccca cgugggaccg ggggagggcg cgguccaau 6120
gaugaacagg cuuauugccu uugcuuccag aggaaaccac gucgccccua cucacuacgu 6180
gacggagucg gaugcugcgc agcugugac ccaacuacu ggucucua cuauaaccag 6240
ccuacucaga agacuccaca auuggauaac ugaggacugc ccaucccau gcuccggauc 6300
cuggcuccgc gacguguggg acuggguuug caccuucug acagacuua aaaauggcu 6360
gaccucuaaa uuguuccca agcugcccgg ccucccuuc aucucuuguc aaaagggua 6420
caagggugug ugggccggca cuggcaucau gaccacgcg ugccuugcg gcgccaacau 6480
cucuggcaau guccgccugg gcucuaugag gaucacagg ccuaaaaccu gcaugaacac 6540
cuggcagggg accuuucua ucaauugcua cacggagggc cagucgcg cgaaccccc 6600
cacgaacuac aagaccgcca ucuggagggu gccggccucg gaguacggg aggugacgca 6660
gcaugggucg uacuccaug uaacaggacu gaccacugac aaucugaaa uccuugcca 6720
acuaccuucu ccagaguuuu ucuccugggu ggacggugug cagaucuaa gguuugcacc 6780
cacacaaag ccguuuuucc gggauagggu cucguucugc guugggcuua auuccuugc 6840
ugucggguc cagcuuccu gugaaccuga gccgacgca gacguauuga gguccaugcu 6900
aacagauccg cccacauca cggcggagac ugcggcggc cgcuuggcac ggggauracc 6960
uccaucugag gcgagcuccu cagugagcca gcuauagca ccgucguc gggccaccug 7020
caccaccac agcaaccu augacgugga cauggucgau gccaccugc ucauggaggg 7080
cgguguggcu cagacagagc cugaguccag ggugccguu cuggacuuc ucgagcaau 7140
ggccgaggaa gagagcgacc uugagcccuc aaauaccug gagugcugc ucccaggag 7200
cggguuucca cgggccuac cggcuugggc acggccugac uacaaccgc cgcucugga 7260
aucugggag aggccagau accaaccgc caccguugcu gguugucuc uccccccc 7320
caagaaggcc ccgacgccc cccaaggag acgccgaca gugggucuga gcgagagcac 7380
cauaucagaa gccuccagc aacuggccau caagaccuu gccagccc ccucgagcgg 7440
ugaugcaggc ucguccagg gggcggcgc gccgaaucc ggcgguccga gcucccug 7500
ugagccggc ccucagaga cagguuccgc cuccuauug cccccucg agggggagcc 7560
uggagauccg gaccuggagu cugaucaggu agagcuuaa ccuccccc agggggggg 7620
gguagcucc gguucgggcu cggggucuu gucuacuug uccgaggag acgauacc 7680
cgugucugc uccauguca acuccggac cggggcucua auaacuccu guagcccga 7740
agaggaaaag uugccauca acccuuugag uaacucguc uugcgauacc auacaaggu 7800
guacuguaca acaucaaga gcgccucaca gaggguuaa aagguaacuu uugacaggac 7860
gcaagugcuc gacgccau augacucagu cuuaaggac aucaagcug cggcuucca 7920
ggucagcga aggcuccu ccuuggagga ggcgugccag uugacuccac ccauucug 7980

aagauccaag uauggauucg gggccaagga gguccgcagc uuguccggga gggccguuaa 8040
ccacaucaag uccgugugga aggaccuccu ggaagaccca caaacaccaa uucccacaac 8100
caucauggcc aaaaaugagg uguucugcgu ggaccccgcc aaggggggua agaaaccagc 8160
ucgccucauc guuuaccucg accucggcgu ccgggucugc gagaaaugg cccucuaua 8220
cauuacacaa aagcuuccuc aggcgguaau gggagcuucc uauggcuucc aguacucucc 8280
ugccaacgg guggaguau ucuugaaagc augggcggaa aagaaggacc ccauggguuu 8340
uucguaugau acccgaugcu ucgacucaac cgucacugag agagacauca ggaccgagga 8400
guccauauac caggccugcu ccugcccga ggaggccgc acugccauac acucgcugac 8460
ugagagacuu uacguaggag ggcccanguu caacagcaag ggucaaaccu gcgguuacag 8520
acguugccgc gccagcgggg ucuaaccac uagcaugggu aacaccauca caugcuaua 8580
gaaagcccua gcggccugca aggcugcggg gauaguugc cccacaauugc ugguaugcgg 8640
cgaugaccua guagucaucu cagaaagcca ggggacugag gaggacgagc ggaaccugag 8700
agccuucacg gaggccauga ccagguacuc ugccccuccu ggugaucucc ccagaccgga 8760
auaugaccug gagcuauaa cauccuguuc cuaaaugug ucuguggcgu ugggcccgcg 8820
gggccgccgc agauacuacc ugaccagaga cccaaccacu ccacucgcc gggcugccug 8880
ggaaacaguu agacacucucc cuaucaauuc auggcugga aacaucucc aguauccucc 8940
aaccuauagg guucgcaugg uccuaaugac acacuucuc uccauucua ugguccaaga 9000
caccugggac cagaaccuca acuuugagau guauggauca guauacuccg ugaauccuuu 9060
ggaccuucca gccauaaug agagguuaca cgggcuugac gccuuucua ugcacacaua 9120
cucucaccac gaacugacgc ggguggcuuc agcccucaga aaacuugggg cgccaccucc 9180
cagggugugg aagagucggg cucgcgcagu cagggcgucc cucaucucc guggagggaa 9240
agcggccguu ugcggccgau aucucucaa uugggcggug aagaccaagc ucaaacucac 9300
uccauugccg gaggcgcgcc uacuggacuu auccaguugg uucaccguc gcgccggcg 9360
gggcgacauu uuucacagcg ugucgcgc ccgaccccgc ucauuacucu ucggccuacu 9420
ccuacuuuuc guagggguag gccucuuccu acucuccgc cgguagagcg gcacacacua 9480
gguacacucc auagcuacu guuccuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 9540
uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuccucuu ucuuccuuc ucaucuuau cuacuucuu 9600
ucuugguggc uccaucuuag cccuagucac ggcuagcugu gaaagguccg ugagccgcau 9660
gacugcagag agugccguaa cuggucucuc ugcagaucuu gucuaga 9707

<210> 10

<211> 3748

<212> ADN

5 <213> Virus de la hepatitis C

<220>

<223> Secuencia de ARN genómico que comprende la región de 5' UTR a NS3 de la cepa TH1

<400> 10

gccagcccc	gattgggggc	gacactccac	catagatcac	tcccctgtga	ggaactactg	60
tcttcacgca	gaaagcgtct	agccatggcg	ttagtatgag	tgtcgtgcag	cctccaggac	120
ccccctccc	gggagagcca	tagtggctcg	cggaaccggt	gagtacaccg	gaattgccag	180
gacgaccggg	tcctttcttg	gatcaacccg	ctcaatgcct	ggagatttgg	gcggtccccc	240
gcgagactgc	tagccgagta	gtgttgggtc	gcgaaaggcc	ttgtggtact	gcctgatagg	300
gtgcttgcca	gtgccccggg	aggtctcgtg	gaccgtgcac	catgagcacg	aatcctaaac	360
ctcaaagaaa	aaccaaactg	aacaccaacc	gccgccaca	ggacgtcaag	ttcccgggcg	420
gtggccagat	cgttgggtgga	gtttacctgt	tgcgcgcag	gggccccagg	ttgggtgtgc	480
gcgcgactag	gaagacttcc	gagcggctgc	aacctcgtgg	aaggcgacaa	cctatcccca	540
aggatcgccg	acccgagggc	agggcctggg	ctcagcccgg	gtacccttgg	cccctctatg	600
gcaacgaggg	catgggggtg	gcaggatggc	tcctgtcacc	ccgtggctcc	cggcctagtt	660
ggggccccaa	tgacccccgg	cgcaggtcgc	gtaatttggg	taaagtcata	gataccctta	720
catgcggtct	cgccgacctc	atggggta	ttccgctcgt	cggcgtccc	ttggggggcg	780
ctgccagggc	cttggcgcac	ggcgtccggg	ttctggagga	cggcgtgaac	tatgcaacag	840
ggaatctgcc	cgttctctct	ttctctatct	tcctcttggc	ctgctgtcc	tgtctaacca	900
tcccagcttc	cgcttatgaa	gtgcgcaacg	tgtccggggt	gtaccatgtc	acgaacgact	960
gctccaactc	gagcattgtg	tacgagacag	gggacatgat	tatgacacc	cctgggtgcg	1020
tgccctgtgt	tcgggagaac	aactcctccc	gctgctgggc	agcgtcact	cccacgctcg	1080
cggccaggaa	cgccagcgtc	cccaccacga	caatacggcg	ccacgtcgat	ttgctcgttg	1140
gggcggtgc	tttctgtccc	gctatgtacg	tgggggatct	ctgcggatct	gttttctctg	1200
tctcccagtt	gttcaccttc	tcgcctcgcc	ggcatgagac	agtgcaggac	tgcaattgtt	1260
caatctatcc	cggccacgta	tcaggtcacc	gcatggcttg	ggatatgatg	atgaactggt	1320
cacctacaac	agcctactg	gtatcgcagt	tactccggat	cccacaagcc	gtcgtggaca	1380
tgggtggcggg	ggcccactgg	ggagtccctg	cgggccttgc	ctactattcc	atggcgggga	1440
actgggctaa	ggttttgatt	gtgctgctac	tccttgcggg	cgttgatggg	gcgacctacg	1500
tgacggggggg	gtcgggaagcc	agaggggcct	ctggetttagc	aaacctcttt	tcatttgggg	1560
cgtctcagaa	gatccagctc	ataaatacca	acggcagttg	gcacatcaat	agaactgccc	1620
tgaactgcaa	tgactccctc	cacactgggt	ttcttgcgcg	gctattctac	acacacaaat	1680
tcaacgcgtc	cggatgtcca	gagcgcacag	ccagctgccc	ccccattgaa	gagttcgcctc	1740
aggggtatgg	tccatcact	tatgctgagc	cctccccctc	ggaccagagg	ccctattgct	1800
ggcactacgc	gcctcgaccg	tgtggtatca	taccgcgtc	gcagggtgtg	ggtccagtgt	1860
actgcttca	ccccagccct	gttgtgggtg	ggacgaccga	tcgctccggt	gccccacgt	1920
ataattgggg	ggcgaatgag	acggacgtgc	tgtatctcaa	caacacgcgg	ccgccgcaag	1980
gcaactggtt	cggctgcaca	tggatgaatg	gcaccgggtt	caccaagacg	tgcgggggccc	2040
ccccgtcaa	catcggggggg	ggcggcaaca	acaacacctt	gacctgccc	acggactggt	2100
tccggaaca	cccagggcc	acctacacca	aatgtggttc	gggaccttgg	ttgacacctta	2160
ggtgcatggt	cgactaccca	tacaggctct	ggcactacc	ctgaccgtt	aactttacca	2220
tcttaaggt	taggatgtac	gtgggaggtg	tggagcacag	gctcaacgcc	gcatgcaatt	2280
ggaccggagg	agagcgttgt	aacttagagg	acagggatag	atcagagctt	agcccgcgtc	2340
tgctgtcaac	aacagagtgg	caggtgctac	cttgttcctt	caccacctta	ccggctctgt	2400
ccactggttt	gatccatctc	caccagaaca	tcgtggacgt	gcaatacctg	tacggtatag	2460
ggtcggcggg	tgtctctat	gcaatcaaat	gggaatatgt	cttgttgctc	ttctctctcc	2520
tggcagacgc	gcgctctgc	gcctgcttgt	ggatgatgct	gctgatagct	caagctgagg	2580
ccgccttaga	gaacctgggtg	gtcctcaatg	cggcgtccct	ggctggagcg	catggccttc	2640
tctctttcct	tgtgttcttc	tgtgccgctt	ggtacatcaa	gggcaggttg	atccccgggg	2700

cggcgtatgc	tttttacggc	glatggccgc	tgctcctact	ccgtctggcg	ttaccaccac	2760
gagcatacgc	catggaccgg	gagatggctg	catcgtgcgg	aggcgcggtt	ttttaggtc	2820
tggcattcct	gaccttgtca	ccacactata	aggcattcct	cgccaagctc	atatgggtgt	2880
tacaatattt	tatcaccaga	gccgaggccc	atttgaagt	gtggatcccc	cccctcaacg	2940
tccggggggg	ccgcgatgcc	atcatcctcc	tcacatgcgc	gatccatcca	gaccttatct	3000
ttgacatcac	caaactcttg	ctcgccatgc	tcggtccact	catggtgctc	caggctggca	3060
taactagagt	gccgtacttc	gtgcgcgctc	aagggtcct	tcgtgcatgc	atgttgggtc	3120
ggaaagtcgc	tgggggtcat	tatgtccaaa	tggcctcat	gaagctggcc	tcgctgacag	3180
gtacgtacgt	ttacgaccat	cttactccac	tgcgggactg	ggcccacggg	ggcctacgag	3240
accttgcggt	ggcagttgag	ccgctcatct	tctctgacat	ggagaccaa	atcatcactt	3300
ggggagcaga	caccgcggcg	tgtggggaca	tcctctcggg	tctgcccgtc	tccgcccga	3360
gggggagga	gatatttctg	ggaccggccg	acaagatcag	agagcagggg	tggcgactcc	3420
ttgcccccat	cacggcctat	tcccaacaga	cgcgaggcct	actcggctgc	atcatcacta	3480
gcctcacagg	ccgggacaag	aaccaggtcg	agggggaggt	tcaagtggtc	tctaccgaa	3540
cgcaatcttt	cctggcgacc	tggtcaacg	gcgtgtgtg	gactgtctac	catggtgccg	3600
gctcgaaaac	tctagccggc	ccgaaggac	caatcaccca	aatgtacacc	aatgtagacc	3660
aggacctcgt	cggctggcag	gcgccccccg	gggcgcgctc	cttaacacca	tgcacctgcg	3720
gcagctcgga	cctttacttg	gtcacgag				3748

<210> 11

<211> 11102

5 <212> ARN

<213> Homo sapiens

<220>

<223> ARN genómico del virus de la hepatitis C quimérico derivado de la cepa JFH1 del VHC (clon JFH-1) y de la cepa TH del VHC

10 <400> 11

accugcccu	aauagggcg	acacuccgc	augaaucacu	cccugugag	gaacuacugu	60
cuucacgcag	aaagcgccua	gccauggcgu	uaguaugagu	gucguacagc	cuccaggccc	120
ccccucccg	ggagagccau	aguggucugc	ggaaccggug	aguacaccgg	aaugccggg	180
aagacugggu	ccuuucugg	auaaaccac	ucuaugcccg	gccauuuggg	cgugccccg	240
caagacugcu	agccgaguag	cguuggguug	cgaaggccu	ugugguacug	ccugauaggg	300
cgcuugcgag	ugccccggga	ggucucguag	accgugcacc	augagcaca	auccuaaacc	360
ucaaaagaaa	acaaaagaa	acaccaaccg	ucgcccuaug	auugaacaag	auggauugca	420
cgcagguucu	ccggccgcuu	ggguggagag	gcuauucggc	uagacuggg	cacaacagac	480

aaucggcugc ucugaugccg ccguguuccg gcugucagcg caggggcgcc cgguuuuuu 540
 ugucaagacc gaccuguccg gugcccugaa ugaacugcag gacgaggcag cgcggcuauc 600
 guggcuggcc acgacgggcg uuccuugcgc agcugugcuc gacguuguca cugaagcggg 660
 aagggacugg cugcuauugg gcgaagugcc ggggcaggau cuccugucau cucaccuugc 720
 uccugccgag aaaguaucca ucauggcuga ugcaauugcg cggcugcaua cgcuugauc 780
 ggcuaaccug ccauucgacc accaagcgaa acaucgcauc gagcgagcac guacucggau 840
 ggaagccggu cuugucgauc aggaugaucu ggacgaagag caucaggggc ucgcgccagc 900
 cgaacuguuc gccaggcuca aggcgcgcau gcccgcggc gaggaucucg ucgugacca 960
 uggcgaugcc ugcuugccga auaucauggu ggaaaauggc cgcuuuucg gauucaucga 1020
 cuguggccgg cugggugugg cggaccgcu ucaggacaua gcguuggcu cccgugauau 1080
 ugcugaagag cuuggcggcg aaugggcuga ccgcuuccuc gugcuuuacg guaucgccgc 1140
 ucccgaucg cagcgcaucg ccuucuaucg ccuucugac gaguucuuc gaguuuaaac 1200
 ccucuccuc cccccccu aacguuacug gccgaagccg cuuggaauaa ggccggugug 1260
 cguuugucua uauguuuuu uccaccuau ugccgucuuu uggcaaugug agggcccgga 1320
 aaccuggccc ugucuuucg acgagcauuc cuagggguc uuccccucg gccaaaggaa 1380
 ugcaaggucu guugaauguc gugaaggaag caguuccuc ggaagcuuc ugaagacaaa 1440
 caacgucugu agcgaccuu ucgaggcagc ggaaccccc accuggcgac aggugccuc 1500
 gcggccaaaa gccacgugua uaagauacac cugcaaaggc ggcacaacc cagugccacg 1560
 uugugaguug gauaguug gaaagaguca aauggcucuc cucaagcgua uucaacaagg 1620
 ggcugaagga ugcccagaag guaccccau guaugggauc ugaucugggg ccucggugca 1680
 caugcuuuac auguguuuag ucgagguuaa aaaaacguc agggcccccg aaccacgggg 1740
 acgugguuuu ccuuugaaaa acacgaugau accaugagca cgaauccuaa accucaaaaga 1800
 aaaaccaaac guaaccacaa ccgccgcca caggacguc aguucccggg cgguggccag 1860
 aucguuggug gaguuuaccu guugccgcgc aggggcccc gguugggugu gcgcgcgacu 1920
 aggaagacu ccgagcgguc gcaaccucgu ggaaggcgac aaccuauccc caaggauccg 1980
 cgaccgagg gcagggccug ggcucagccc ggguaccuu ggccccua uggcaacgag 2040
 ggcaugggggu gggcaggaug gcuccugua ccccguggcu cccggccuag uggggcccc 2100
 aaugaccccc ggcgagguc gcguaauuug gguaaaguca ucgauaccu ucaugcggc 2160
 uucgccgacc ucauggggua cauuccgcuc gucggcguc ccuugggggg cgucgccagg 2220
 gccuuggcgc auggcglucc ggucuggag gacggcguga acuaugcaac agggaauucg 2280
 cccgguuucg cuuucucua cuuccucuu gcucugcugu ccugucuaac caucccagcu 2340
 uccgcuuaug aagugcgcaa cguguccggg guguaccaug ucacgaacga cugcuccaac 2400
 ucgagcauug uguacgagac aggggacaug auuaugcaca cccugggug cgugcccu 2460
 guucgggaga acaacuccuc ccgcugcugg gcagcgcuca cucccacgcu cgcgccag 2520
 aacgccagcg uccccaccac gacaauacgg cgccagcug auuugcucgu uggggcggcu 2580
 gcuuucugcu ccgcuaugua cguggggggu cucugcggau cuguuuuccu cgucucccag 2640
 uuguucaccu ucucgccucg ccggcaugag acagugcagg acugcaauug uucaaucua 2700
 cccggccacg uaucagguca ccgcauggcu ugggauauga ugaugaacug gucaccuaca 2760
 acagccuac ugguaucgca guuacuccgg auccacaag ccgucgugga caugguggcg 2820
 ggggcccacu ggggaguccu ggcgggccc gcuacuauu ccauggcggg gaacugggcu 2880
 aagguuuuga uugugcugcu acucuuugc ggcuugaug gggcgaccua cgugacgggg 2940
 gggucggaag ccagaggggc cucuggcuua gcaaaccucu uucauuugg ggcgucucag 3000
 aagaucagc ucauaaauc caacggcagu uggcacauc auagaacug ccugaacugc 3060
 aaugacuccc uccacacugg guuucuuugc gcgcuauuc acacacacaa auucaacgcg 3120

uccggauguc cagagcgcau ggccagcugc cgccccauug aagaguucgc ucagggguau 3180
 ggucccauca cuuaugcuga gcccucccc ucggaccaga ggccuauug cuggcacuac 3240
 gcgccucgac cgugugguau cauacccgcg ucgcaggugu gugguccagu guacugcuuc 3300
 accccaagcc cuguuguggu ggggacgacc gaucgcuccg gugccccac guauaaugg 3360
 ggggcgaug agacggacgu gcuguaucuc aacaacacgc ggccgccgca aggcaacugg 3420
 uucggcugca cauggaugaa uggcaccggg uucaccaaga cgugcggggg cccccgugc 3480
 aacaucgggg ggggcggcaa caacaacacc uugaccugcc ccacggacug uuuccgaaa 3540
 caccocgagg ccaccuacac caaauuggu ucgggaccuu gguugacacc uaggugcaug 3600
 gucgacuacc cauacaggcu cuggcacuac ccucgaccg uuaacuuuac caucuuaag 3660
 guuaggauug acgugggagg ugggagcac aggcucaacg ccgcaugcaa uggaccga 3720
 ggagagcguu gaaacuuga ggacaggau agaucagagc uuagcccgcu gcugcuguca 3780
 acaacagagu ggcaggugcu accuuuuucc uucaccacc uaccggcucu guccacuggu 3840
 uugauccauc uccaccagaa caucguggac gugcaauacc uguacggauu agggucggcg 3900
 guugucuccu augcaaucaa augggaauau gucuuguugc ucuuccuccu ccuggcagac 3960
 gcgcgcgucu gcgccugcuu guggaugaug cugcugauag cucaagcuga ggccgccua 4020
 gagaaccugg ugguccuaa ugcggcgucc cuggcuggag cgcauggccu ucucucuuc 4080
 cuuguguucu ucugugccgc uugguacauc aagggcaggu ugauccccgg ggcgcgauu 4140
 gcuuuuacg gcguauggcc gcugcuccua cuccugcugg cguuaccacc acgagcauac 4200
 gccuagacg caccugugca cggacagaua ggcguggguu uguugauuu gaucaccuc 4260
 uucacacuca ccccggggua uaagaccuc cucggccagu gucuguggug guugugcuau 4320
 cuccugacc cuggggaagc caugauucag gaguggguac caccacugca ggugcgcg 4380
 ggccgcgoug gcaucgcgug ggccgucacu auuuucugcc cggguguggu guuugacau 4440
 accaaauggc uuuuggcguu gcuugggccu gcuuaccucu uaaggccgc uuugacacau 4500
 gugccguacu ucgucagagc ucacgcucug auuaggguu gcgcuuuggu gaagcagcuc 4560
 gcgggggguu gguauguua gguggcgcu uuggccuug gcagguggac uggcaccuac 4620
 aucuagacc accucacacc uaugucggac uggccgcuu gcggccugcg cgacuagcg 4680
 gucgccgugg aaccaucau cuucagucc auggagaaga aggucaucgu cuggggagcg 4740
 gagacggcug caugugggga cauucacau ggacuuccg ugucgcccg acucggccag 4800
 gagauccucc ucggcccagc ugauggcuac accuccaagg gguggaagcu ccuugcucc 4860
 aucacugcuu augcccagca aacacgaggc cuccugggcg ccuaguggu gaguaugacg 4920
 gggcgugaca ggacagaaca ggccgggaa guccaaaucc uguccacagu cucucagucc 4980
 uuccucggaa caaccaucuc ggggguuuug uggacuguu accacggagc uggcaacaag 5040
 acucuagccg gcuuacgggg uccggucacg cagauguacu cgagugcuga gggggacuug 5100
 guaggcuggc ccagcccc ucggaccuag ucuuuggagc cgugcaagug uggagccguc 5160
 gaccuauauc uggucacgcg gaacgcugau gucaucccg cucggagacg cggggacaag 5220
 cggggagcau ugcucucucc gagaccuau ucgaccuuga aggggucuc gggggggccg 5280
 gugcucugcc cuaggggcca gcugcuuggg cucuuccgag cagcugugug cucucggggc 5340
 guggccaaau ccaucgauuu caucuccguu gagacacuc acguuguuac aaggucucc 5400
 acuuucagug acaacagcac gccaccggcu gugccccaga ccuaucaggu cggguacuug 5460
 caugcuccaa cuggcagugg aaagagcacc aagguccug ucgcguaugc cgccagggg 5520
 uacaaaguac uagugcuuaa cccucggua gcugccacc ugggguuugg ggcuaccua 5580
 uccaaggcac auggcauca uccaacauu aggacuggag ucaggaccgu gaugaccggg 5640
 gagccauca cguacuccac auuaggcaaa uuucucgccc augggggcug cgcuagcggc 5700

gccaugaca ucaucauauug cgaugaaugc cacgcugugg augcuaccuc cauucucggc 5760
aucggaacgg uccuugauca agcagagaca gccgggguca gacuaacugu gcuggcuacg 5820
gccacacccc ccgggucagu gacaaccccc caucccgaua uagaagaggu aggccucggg 5880
cgggagggug agaucccuu cuaugggagg gcgauucucc uauccugcau caagggaggg 5940
agacaccuga uuuucugcca cucaaagaaa aagugugacg agcucgcggc ggcccuucgg 6000
ggcaugggcu ugaaugccgu ggcauacua agaggguugg acgucuccau aauaccagcu 6060
cagggagaug ugguggucgu cggcaccgac gcccucauga cgggguacac uggagacuuu 6120
gacuccguga ucgacugcaa uguagcgguc acccaagcug ucgacuucag ccuggacccc 6180
accuucacua uaaccacaca gacugucca caagacgcug ucucacgcag ucagcgcgc 6240
ggcgccacag guagaggaag acagggcacu uauagguaug uuuccacugg ugaacgagcc 6300
ucaggaaugu uugacagugu agugcuuugu gagugcuacg acgcaggggc ugcgugguac 6360
gaucucacac cagcgggagc caccgucagg cuuagagcgu auuucacac gcccgccua 6420
cccugugugc aagaccaucu ugaauuuugg gaggcaguuu ucaccggccu cacacacua 6480
gacgcccacu uccucucca aacaaagcaa gcgggggaga acuucgcgua ccuaguagcc 6540
uaccaagcua cggugugcgc cagagccaag gcccucucc cguccuggga cgccaugugg 6600
aagugccugg cccgacuaa gccuacgcu gcgggcccc caccucuccu guaccguuug 6660
ggccuauua ccaaugaggu caccucaca caccuggga cgaaguacau cgccacaugc 6720
augcaagcug accuugaggu caugaccagc acgugggucc uagcuggagg aguccuggca 6780
gccgucgccg cauauugccu ggcgacugga ugcguuucca ucaucggccg cuugcacguc 6840
aaccagcgag ucgucguugc gccggauaag gagguccugu augaggcuuu ugaugagaug 6900
gaggaaugcg ccucuagggc ggcucucauc gaagaggggc agcggauagc cgagauguug 6960
aaguccaaga uccaaggcuu gcugcagcag gccucuaagc aggccagga cauacaacc 7020
gcuaugcagg cuucauggcc caaaguggaa caauuuugg ccagacacau guggaacuuc 7080
auuagcggca uccaauaccu cgcaggauug ucaacacugc cagggaaacc cgcgguggcu 7140
uccaugaugg cauucagugc cgcccucacc aguccguugu cgaccaguac caccuuccu 7200
cucaacauca ugggagggcug guuagcgucc cagaucgac caccgcggg gccaccggc 7260
uuugucguca guggccuggu gggggcugcc gugggcagca uaggccuggg uaaggugcug 7320
guggacaucc uggcaggaua uggugcgggc auuucggggg ccucgucgc auucaagauc 7380
augucuggcg agaagcccuc uauugaagau gucaucauc uacugccugg gauccugucu 7440
ccgggagccc uggugguggg ggucaucugc gcggccauuc ugcgcccca cgugggaccg 7500
ggggagggcg cgguccaauug gaugaacagg cuuauugccu uugcuuccag aggaaaccac 7560
gucgccccua cucacuacgu gacggagucg gaugcugcgc agcugugac ccaacuacuu 7620
ggcucucuua cuauaaccag ccuacucaga agacuccaca auuggauaac uaggacugc 7680
cccaucccau gcuccggauc cuggcuccgc gacguguggg acuggguuug caccuuccu 7740
acagacuua aaaauggcu gaccucuaaa uuguuccca agcugcccgg ccuucccuuc 7800
aucucuuguc aaaaggggua caagggugug uggccggca cuggcaucau gaccacgcgc 7860
ugcccuugcg gcgccaacau cucuggcaau guccgcuugg gcucuauagag gaucacaggg 7920
ccuaaaaccu gcaugaacac cuggcagggg accuuccua ucaauugcua cacggagggc 7980
cagugcgcgc cgaaccccc cacgaacuac aagaccgcca ucuggagggu ggcggccucg 8040
gaguacgcgg aggugacgca gcaugggucg uacuccuau uaacaggacu gaccacugac 8100

aaucugaaaa uuccuugcca acuaccuucu ccagaguuuu ucuccugggu ggacggugug 8160
cagauccaua gguuugcacc cacaccaaag ccguuuuucc gggauagggu cucguucugc 8220
guugggcuua auuccuaugc ugucgggucc cagcuucccu gugaaccuga gcccgacgca 8280
gacguauuga gguccaugcu aacagauccg cccacauca cggcggagac ugcggcgcg 8340
cgcuuggcac ggggaucacc uccaucugag gcgaguccu cagugagcca gcuaucagca 8400
ccgucgcugc gggccaccug caccaccac agcaacaccu augacgugga cauggucgau 8460
gccaacccugc ucauggaggg cgguguggcu cagacagagc cugaguccag ggugcccguu 8520
cuggacuuc ucgagccaau ggccgaggaa gagagcgacc uugagcccuc aaauaccucg 8580
gagugcaugc uccccaggag cggguuucca cgggccuuac cggcuugggc acggccugac 8640
uacaacccgc cgcucgugga aucguggagg aggccagauu accaacccgc caccguugcu 8700
gguugugcuc ucccccccc caagaaggcc ccgacgccuc ccccaaggag acgccggaca 8760
gugggucuga gcgagagcac cauaucagaa gccuccagc aacuggccau caagaccuuu 8820
ggccagcccc ccucgagcgg ugaugcaggc ucguccacgg gggcggcgc cgccgaaucc 8880
ggcgguccga cguccccugg ugagccggcc ccucagaga cagguuccgc cuccucuaug 8940
cccccccucg agggggagcc uggagauccg gaccuggagu cugaucaggu agagcuuaa 9000
ccucccccc aggggggggg gguagucucc gguucgggcu cggggucuuug gucuacuugc 9060
uccgaggagg acgauaccac cgugugcugc uccaugucau acuccuggac cggggcucua 9120
auaacuccu guagccccga agaggaaaag uugccaauca acccuuugag uaacucgug 9180
uugcgauacc auacaaggu guacuguaca acaucaaga gcgccucaca gagggcuaaa 9240
aagguaacuu uugacaggac gcaagugcuc gacgccauu augacucagu cuuaaaggac 9300
aucaagcuag cggcuuccaa ggucagcgc aggcuccuca ccuuggagga ggcgugccag 9360
uugacuccac cccauucugc aagauccaag uauggaucg gggccaagga gguccgcagc 9420
uuguccggga gggccguuaa ccacaucaag uccgugugga aggaccuccu ggaagacca 9480
caaacacca uuccacaac caucauggcc aaaaauaggg uguucugcgu ggaccccccc 9540
aaggggggua agaaaccagc ucgccucauc guuuaccucg accucggcgu ccgggucugc 9600

gagaaaugg cccucuauga cauuacaca aagcuuccuc aggcgguaau gggagcuucc 9660
uauggcuucc aguacuccc ugcccacgg guggaguauc ucuugaaagc auaggcgga 9720
aagaaggacc ccauggguuu uucguaugau acccgauucu ucgacucaac cgucacugag 9780
agagacauca ggaccgagga guccaauac caggccugcu cccugcccga ggaggcccgc 9840
acugccauac acucgcugac ugagagacu uacguaggag ggcccaugu caacagcaag 9900
ggucaaacuu gcgguuacag acguugccgc gccagcgggg ugcuaaccac uagcaugggu 9960
aacaccauca caugcuauu gaaagccua gcggccugca aggcugcggg gauaguugc 10020
cccacaugc ugguaugcgg cgaugaccua guagucaucu cagaaagcca ggggacugag 10080
gaggacgagc ggaaccugag agccuucac gaggccauga ccagguacuc ugccccuccu 10140
ggugaucucc ccagaccgga auaugaccug gagcuauua cauccuguuc cucaaauug 10200
ucuguggcgu ugggcccgc gggccgcc agauacuacc ugaccagaga cccaaccacu 10260
ccacugccc gggcugccug ggaacaguu agacacucc cuaucaauuc auggcuggga 10320
aacaucaucc aguauucucc aaccauagg guucgcaugg uccuaaugac acacuucuu 10380
uccauucua ugguccaaga caccucggac cagaaccuca acuuugagau gnauggauca 10440

ES 2 360 808 T3

guauacuccg ugaauccuuu ggaccuucca gccauaaauug agagguuaca cgggcuugac 10500
 gccuuuucua ugcacacaua cucucaccac gaacugacgc ggguggcuuc agcccucaga 10560
 aaacuugggg cgccaccccu cagggugugg aagagucggg cucgcgcagu cagggcgucc 10620
 cucaucuccc guggagggaa agcggccguu ugcggccgau aucucuuaa ugggaggug 10680
 aagaccaagc ucaaacucac uccauugccg gaggcgcgc uacuggacuu auccaguugg 10740
 uucaccgucg gcgccggcgg gggcgacauu uuucacagcg ugucgcgcgc ccgacccgc 10800

 ucauuacucu ucggccuacu ccuacuuuc guagggguag gccucuuccu acuccccgc 10860
 cgguagagcg gcacacacua gguacacucc auagcuaacu guuccuuuuu uuuuuuuuu 10920
 uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuucu uuuuuuuuuu uuucccucu ucuucccuuc 10980
 ucaucuuaau cuacuucuu ucuugguggc uccaucuuaag ccuagucac ggcuagcugu 11040
 gaaagguccg ugagccgau gacugcagag agugccgaa cuggucucuc ugcagaucau 11100
 gu 11102

REIVINDICACIONES

1. ARN genómico del virus modificado de la hepatitis C que comprende partes del ARN genómico de dos o más cepas de virus de la hepatitis C, el cual comprende una región no traducida 5', una secuencia codificante de la proteína del núcleo, una secuencia codificante de la proteína E1, una
5 secuencia codificante de la proteína E2, una secuencia codificante de la proteína p7, una secuencia codificante de la proteína NS2, una secuencia parcial del ARN que codifica las proteínas NS3, NS4, NS5A y NS5B de una cepa JFH1 mostrada en la SEQ ID NO: 1 y una región no traducida 3', y que se puede replicar de forma autónoma, donde una de las cepas del virus de la hepatitis C es una cepa viral de genotipo 1b.
- 10 2. ARN genómico del virus modificado de la hepatitis C que comprende partes del ARN genómico de dos o más cepas de virus de la hepatitis C, el cual comprende una región no traducida 5', una secuencia codificante de la proteína del núcleo, una secuencia codificante de la proteína E1, una secuencia codificante de la proteína E2, una secuencia codificante de la proteína p7, una
15 secuencia codificante de la proteína NS2, una secuencia codificante de la proteína NS3, una secuencia codificante de la proteína NS4A, una secuencia codificante de la proteína NS4B, una secuencia codificante de la proteína NS5A, una secuencia codificante de la proteína NS5B de una cepa JFH1 mostrada en la SEQ ID NO: 2 y una región no traducida 3', y que se puede replicar de forma autónoma, donde una de las cepas del virus de la hepatitis C es una cepa viral de genotipo 1b.
- 20 3. ARN genómico del virus modificado de la hepatitis C según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque la cepa viral de genotipo 1b se selecciona de entre una cepa VHC-con1, una cepa VHC-TH, una cepa VHC-J, una cepa VHC-JT y una cepa VHC-BK.
4. ARN genómico del virus modificado de la hepatitis C según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque dichas una de las cepas del virus de la hepatitis C es una cepa VHC-con1 de genotipo
25 1b.
5. ARN genómico del virus modificado de la hepatitis C según la reivindicación 4, caracterizado porque la secuencia que codifica la proteína E1, la proteína E2, la proteína p7 y la proteína NS2 de la cepa VHC-con1 está ligada aguas abajo de la región no traducida 5' de la cepa JFH1 y, aguas abajo de la misma, la secuencia que codifica las proteínas NS3, NS4A, NS4B, NS5A y
30 NS5B de la cepa JFH1 y, aguas abajo de la misma, la región no traducida 3' de la cepa JFH1.
6. ARN genómico del virus modificado de la hepatitis C según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque dicha una de las cepas del virus de la hepatitis C es una cepa VHC-TH de genotipo 1b.
7. ARN genómico del virus modificado de la hepatitis C según la reivindicación 6, que comprende la secuencia de nucleótidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 11.
- 35 8. ARN genómico del virus modificado de la hepatitis C que comprende partes del ARN genómico de dos cepas de virus de la hepatitis C, caracterizado porque dichas cepas del virus de la hepatitis C son una cepa JPH1 y la cepa JCH1, y dicho ARN genómico del virus modificado de la hepatitis C comprende una secuencia que corresponde a 1 hasta 3866 de la secuencia del N° de Acceso del GenBank AB047640 ligada a una secuencia que corresponde a 3867 hasta 9678 de la secuencia del N° de Acceso del GenBank AB047639, y que se puede replicar de forma autónoma.
- 40 9. Vector viral dirigido a células hepáticas, que comprende el ARN genómico del virus modificado de la hepatitis C según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
10. Célula en la que se introduce el ARN genómico del virus modificado de la hepatitis C según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, y que replica el ARN genómico del virus de la hepatitis C y puede generar partículas virales.
45
11. Partículas virales de la hepatitis C, que se obtienen a partir de un cultivo obtenido mediante el cultivo de la célula según la reivindicación 10.
12. Método para purificar partículas de VHC sometiendo un líquido o un producto obtenido a partir del homogenato de células que contiene partículas del VHC según la reivindicación 11 a una cromatografía en columna y/o centrifugación en gradiente de densidad utilizadas en combinación.
50
13. Método según la reivindicación 12, caracterizado porque la cromatografía en columna es de uno o varios tipos de cromatografías seleccionados de entre cromatografía por intercambio iónico, cromatografía por filtración en gel y cromatografía de afinidad.
- 55 14. Método según la reivindicación 13, caracterizado porque la cromatografía de intercambio iónico es de uno o varios tipos de cromatografías seleccionados de entre cromatografía aniónica y

- 5 cromatografía catiónica, la cromatografía por filtración en gel es de uno o varios tipos de cromatografías utilizando una resina seleccionada de entre Sephacryl-S300(R), Sephacryl-S400(R) y Sephacryl-S500(R), y la cromatografía de afinidad es de uno o varios tipos de cromatografías utilizando una resina seleccionada de entre celulofina sulfatada, heparina y lectina.
15. Método según la reivindicación 13, caracterizado porque la cromatografía es cromatografía en celulofina sulfatada.
- 10 16. Método según la reivindicación 12, caracterizado porque la centrifugación en gradiente de densidad se lleva a cabo utilizando uno o varios solutos seleccionados de entre cloruro de cesio, sacarosa y polímeros de azúcar.
17. Método según la reivindicación 12, caracterizado porque, en el método de purificación, la cromatografía por intercambio aniónico, la cromatografía en celulofina sulfatada y la centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa se llevan a cabo, al menos una vez, respectivamente, y combinadas en cualquier orden.
- 15 18. Partículas de VHC, que se obtienen por medio de un método para purificar partículas de VHC, caracterizadas porque un líquido o una solución obtenida a partir del homogenato de células que contiene partículas de VHC según la reivindicación 11 se somete a cromatografía en columna y a centrifugación en gradiente de densidad utilizadas en combinación.
- 20 19. Partículas de VHC según la reivindicación 18, caracterizadas porque la cromatografía en columna es de uno o varios tipos de cromatografías seleccionados de entre cromatografía de intercambio iónico, cromatografía por filtración en gel y cromatografía de afinidad.
- 25 20. Partículas de VHC según la reivindicación 18, caracterizadas porque la cromatografía de intercambio iónico es de uno o varios tipos de cromatografías seleccionados de entre cromatografía aniónica y cromatografía catiónica, la cromatografía por filtración en gel es de uno o varios tipos de cromatografías utilizando una resina seleccionada de entre Sephacryl-S300(R), Sephacryl-S400(R), y Sephacryl-S500(R), y la cromatografía de afinidad es de uno o varios tipos de cromatografías utilizando una resina seleccionada de entre celulofina sulfatada, heparina, y lectina.
- 30 21. Partículas de VHC según la reivindicación 18, caracterizadas porque la cromatografía es cromatografía en celulofina sulfatada.
22. Partículas de VHC según la reivindicación 18, caracterizadas porque la centrifugación en gradiente de densidad se lleva a cabo utilizando uno o varios solutos seleccionados de entre cloruro de cesio, sacarosa y polímeros de azúcar.
- 35 23. Partículas de VHC según la reivindicación 18, que se purifican por medio del método de purificación, donde la cromatografía por intercambio aniónico, la cromatografía en celulofina sulfatada y la centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa se llevan a cabo en combinación.
- 40 24. Utilización de partículas virales de la hepatitis C según la reivindicación 11 ó 18 como antígenos para producir una vacuna contra la hepatitis C y/o un anticuerpo neutralizante.
25. Célula infectada por el virus de la hepatitis C, que está infectada por partículas virales de la hepatitis C según la reivindicación 11 ó 18.
26. Método para producir una partícula viral de la hepatitis C, caracterizado porque el método comprende el cultivo de la célula según la reivindicación 10 y la recuperación de las partículas virales del cultivo.
- 45 27. Método para producir una célula infectada por el virus de la hepatitis C, caracterizado porque el método comprende el cultivo de la célula según la reivindicación 10, la recuperación de un sobrenadante del cultivo de la célula y la aplicación del sobrenadante a otra célula para infectar dicha otra célula con partículas virales contenidas en el sobrenadante del cultivo.
- 50 28. Método para cribar una sustancia antiviral de la hepatitis C, caracterizado porque el método comprende el cultivo de la célula según la reivindicación 10 ó 25 en presencia de una sustancia de prueba y la detección del ARN del virus de la hepatitis C o partículas virales en el cultivo, evaluando así los efectos del antiviral de la hepatitis C en la sustancia de prueba.
29. Método para producir una vacuna contra la hepatitis C y/o anticuerpos neutralizantes mediante la utilización de partículas virales de la hepatitis C según la reivindicación 11 ó 18 como antígenos.

- 30.** Método para replicar y/o expresar un gen extraño en una célula, caracterizado porque el método comprende la inserción del ARN que codifica el gen extraño dentro del ARN genómico del virus modificado de la hepatitis C según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, y la introducción del ARN genómico en una célula de interés, para replicar o expresar el gen extraño en su interior.

5

Fig. 1

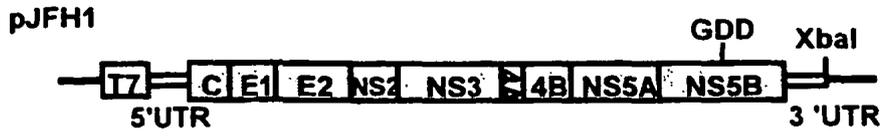


Fig. 2

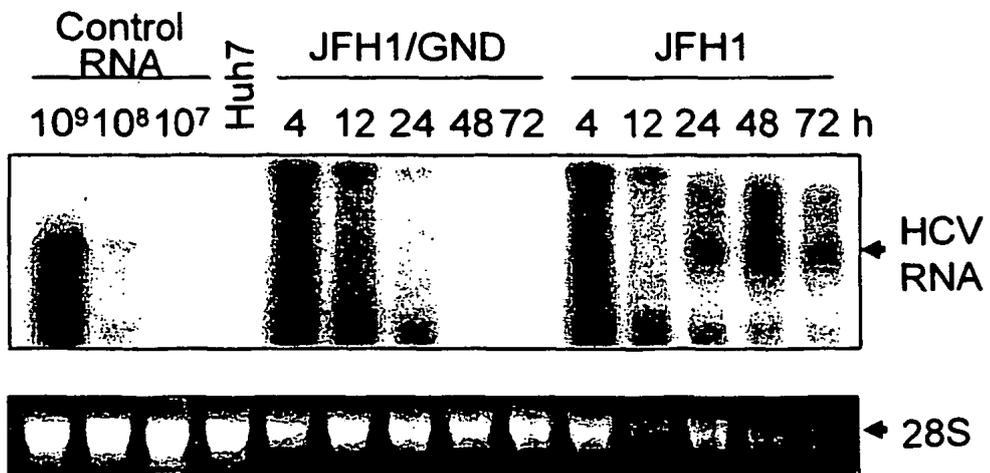


Fig. 3

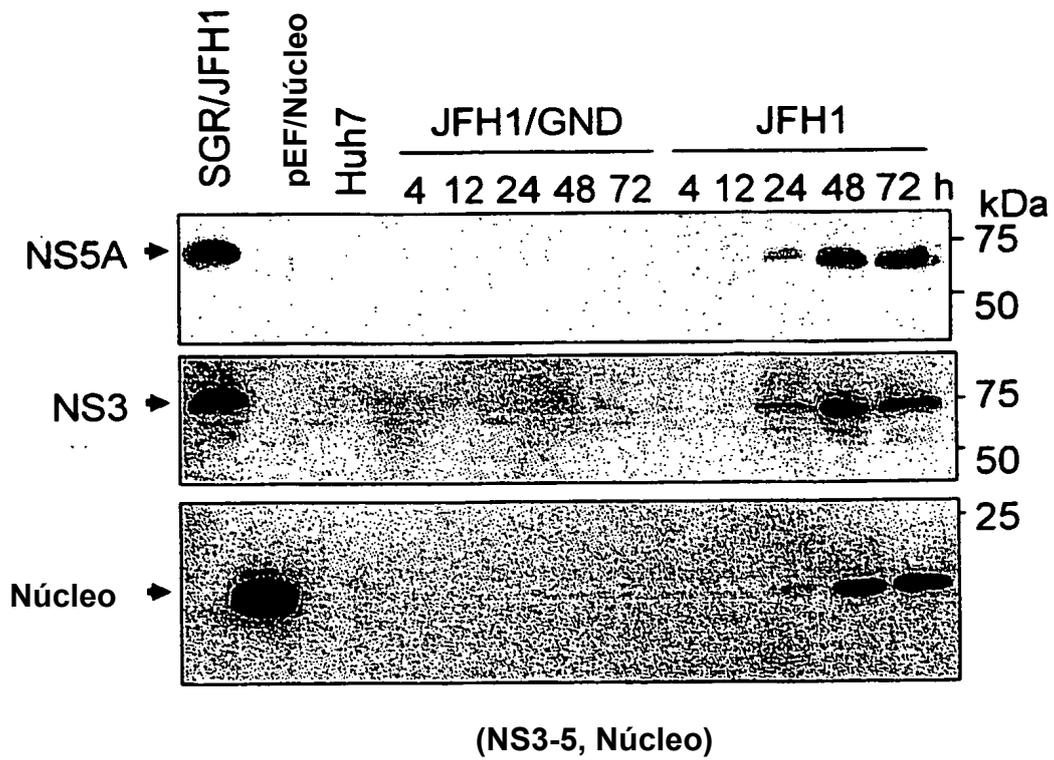
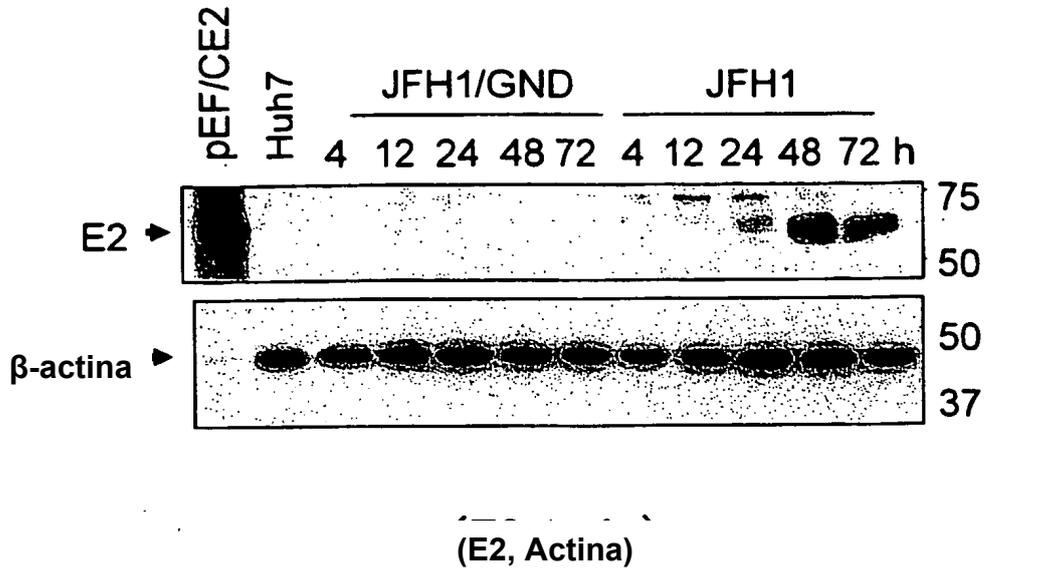


Fig. 4

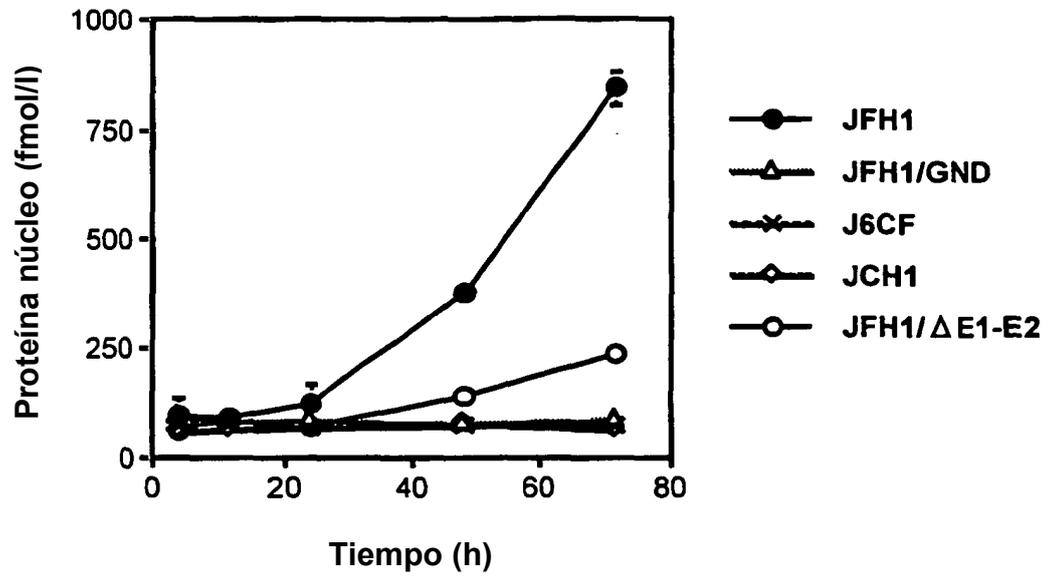


Fig. 5

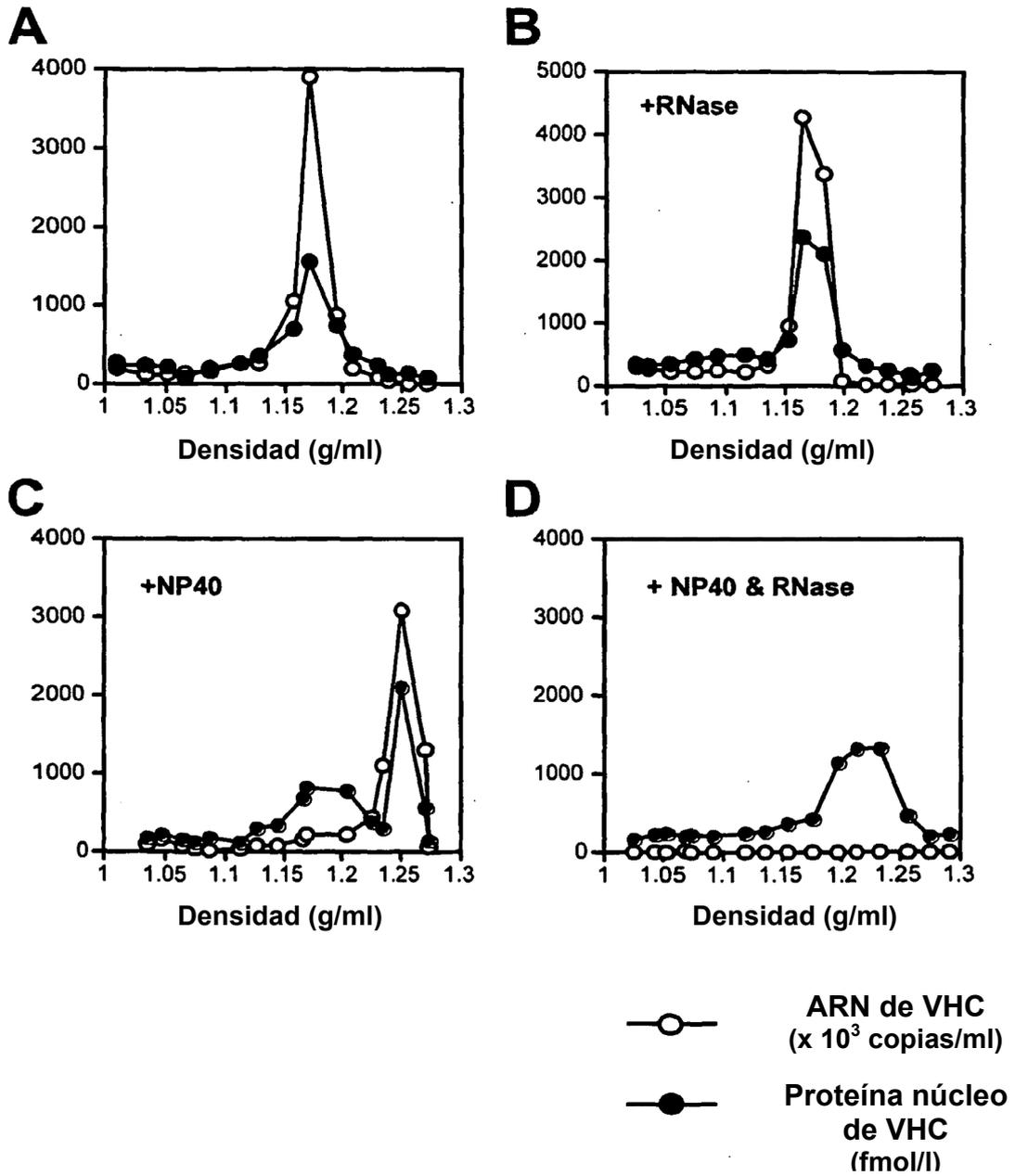


Fig. 6

A

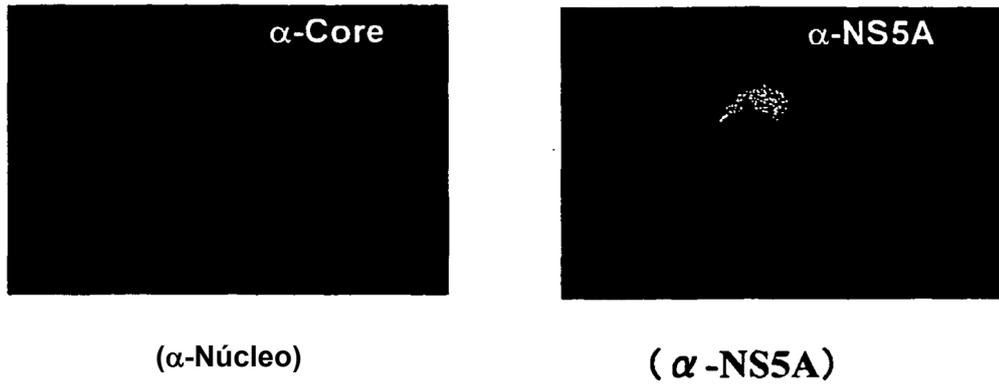


Fig. 6

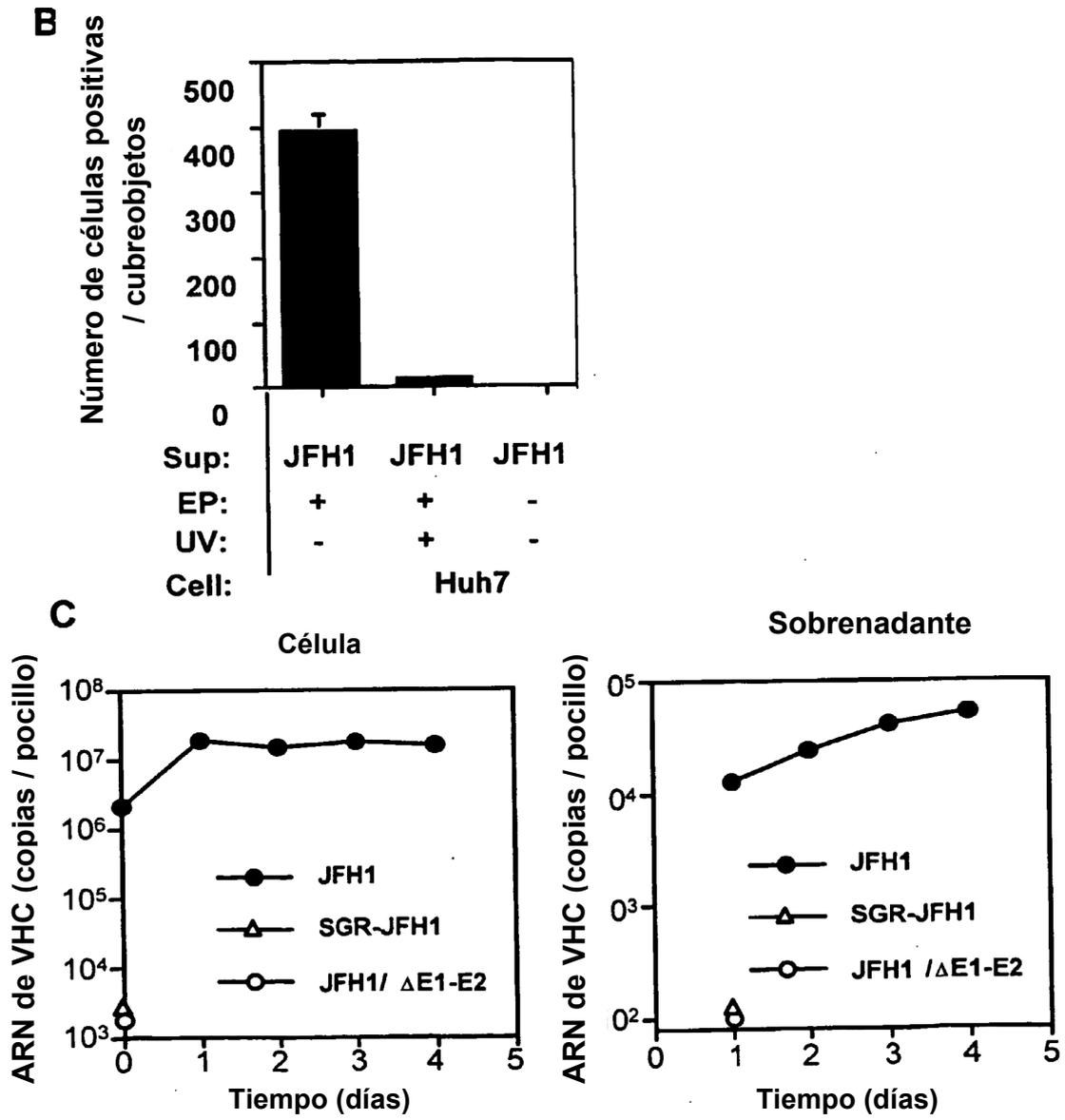
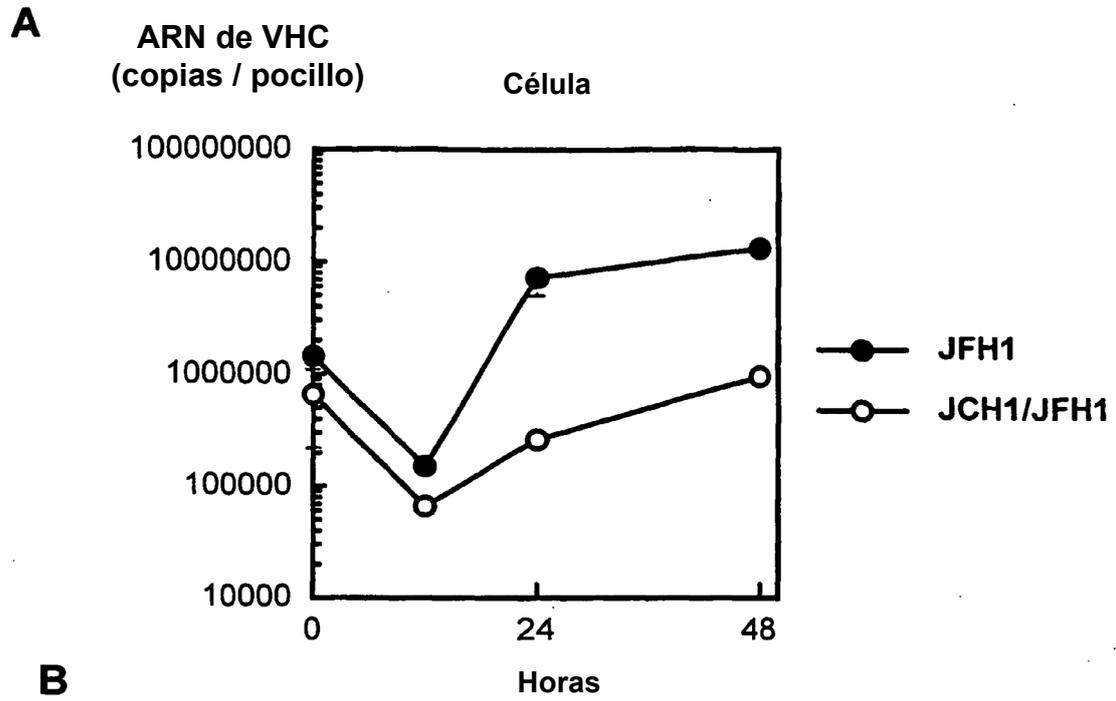


Fig. 7



B

Número de células
positivas / cubreobjetos

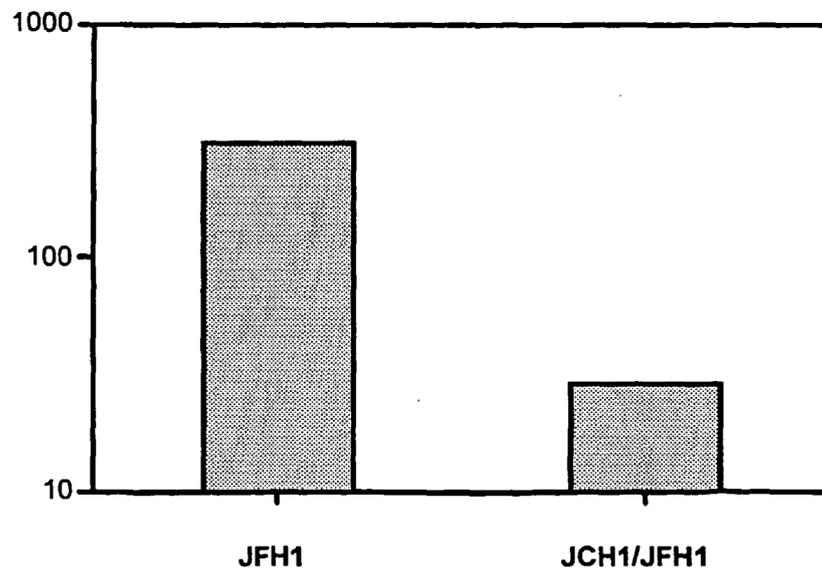


Fig. 8

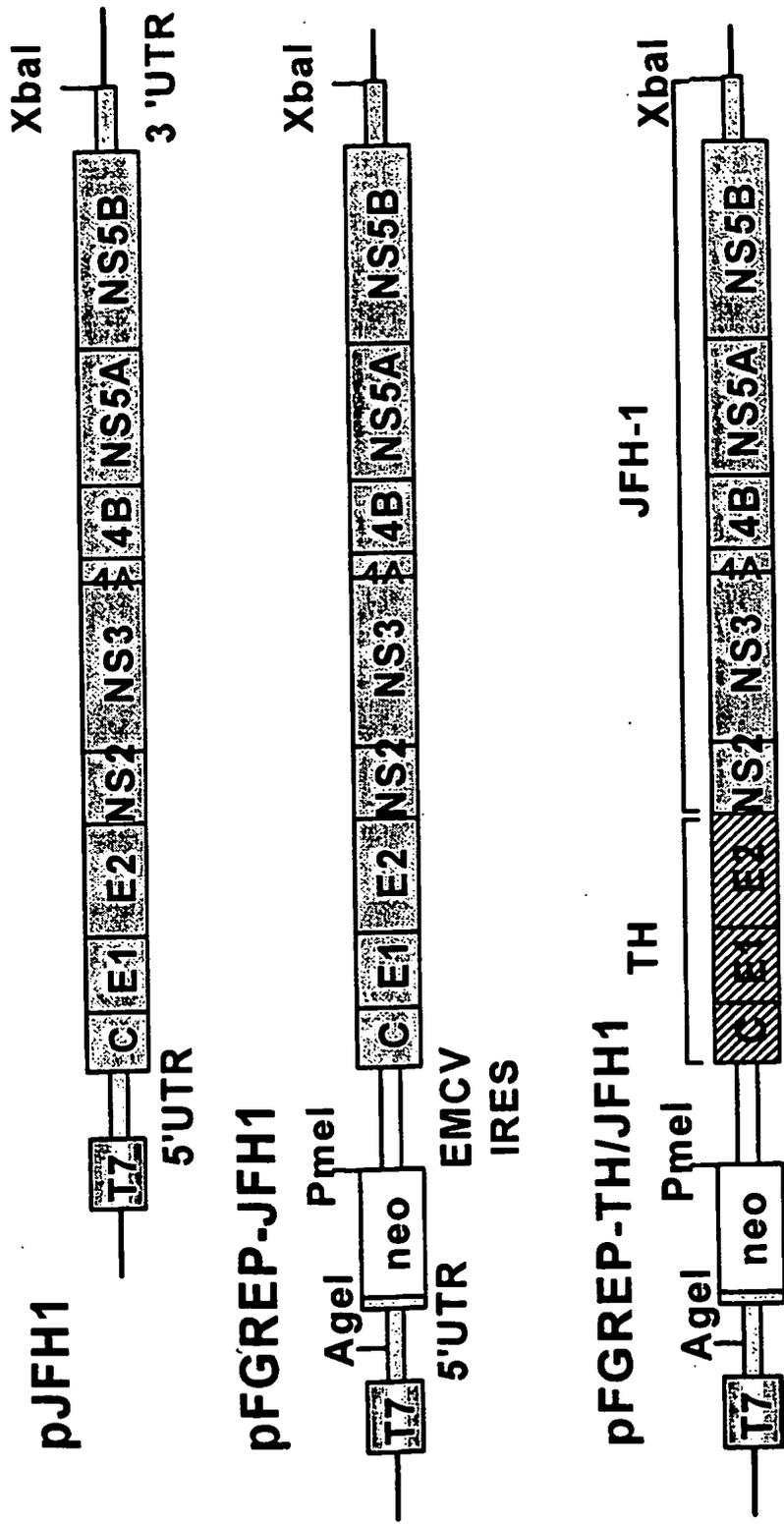
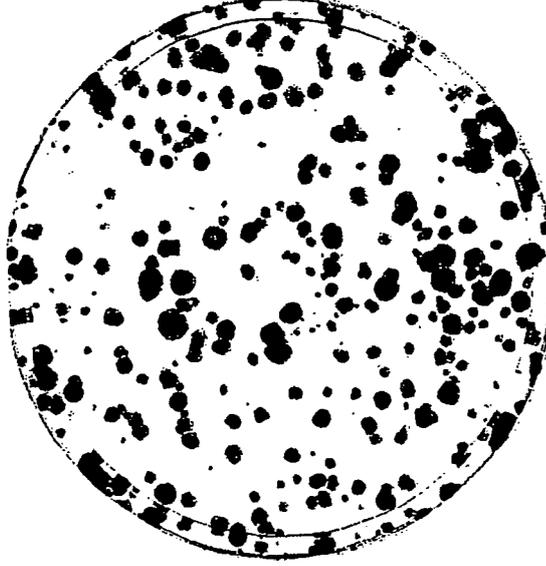
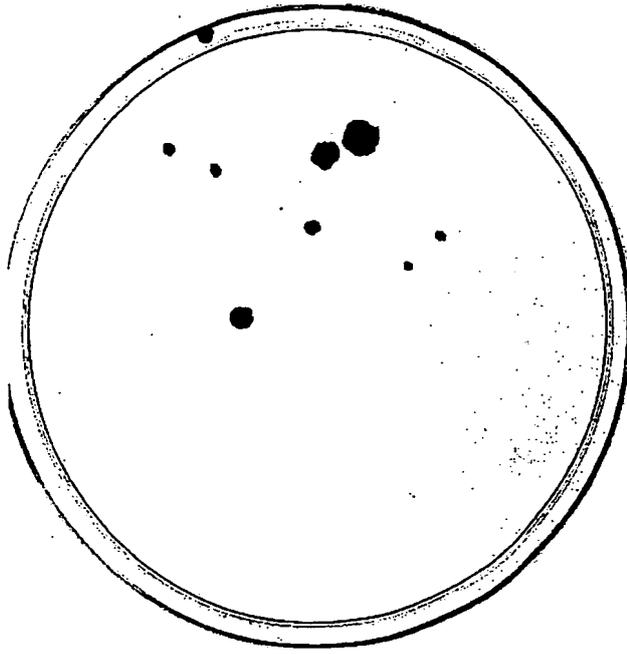


Fig. 9



Transfección ARN de 1 μ g
rFGREP-TH/JFH1

Fig. 10



rFGREP-TH/JFH1
8ml

Fig. 11

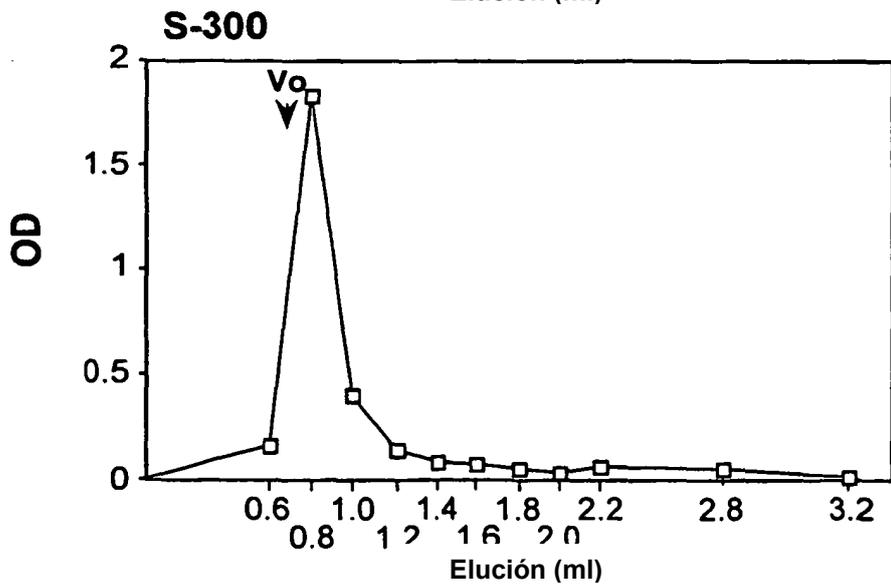
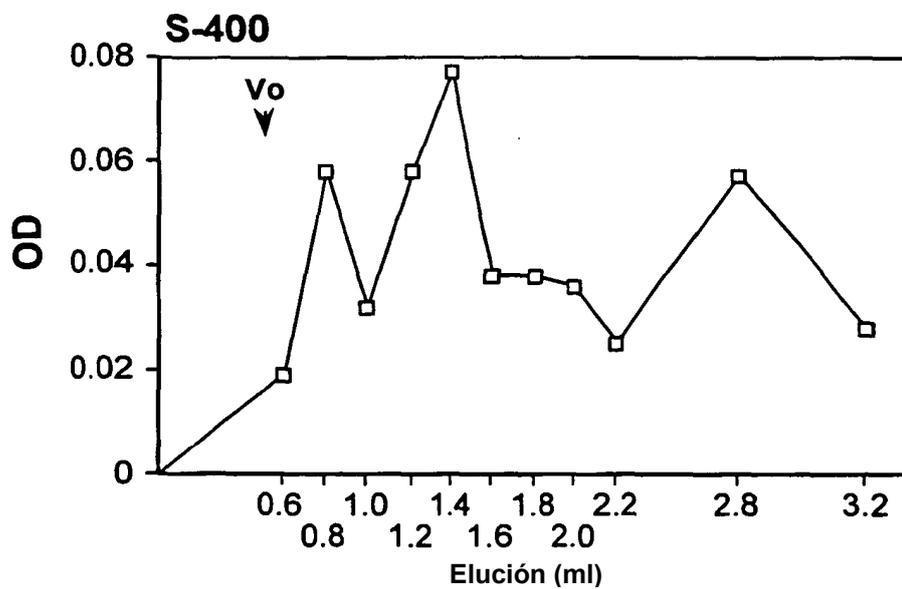
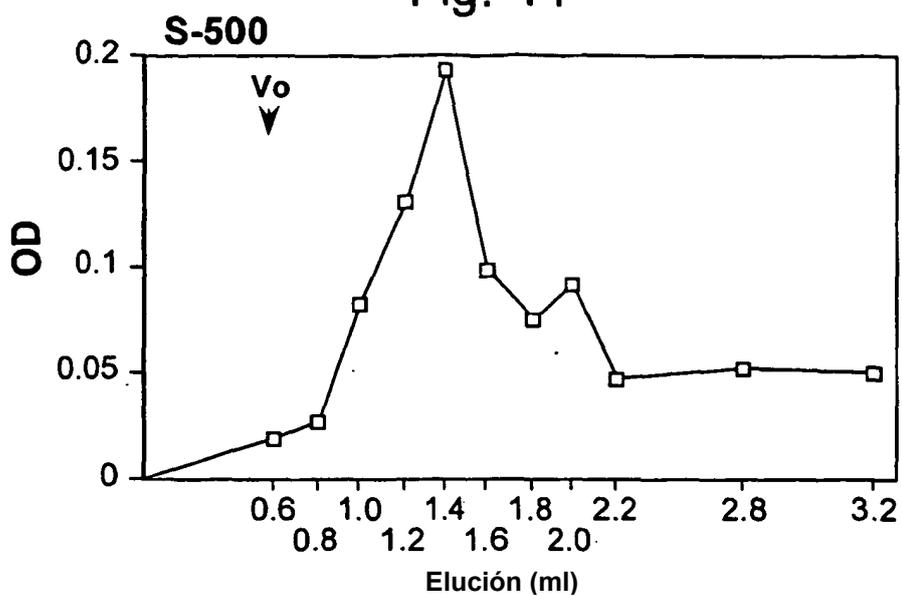


Fig. 12

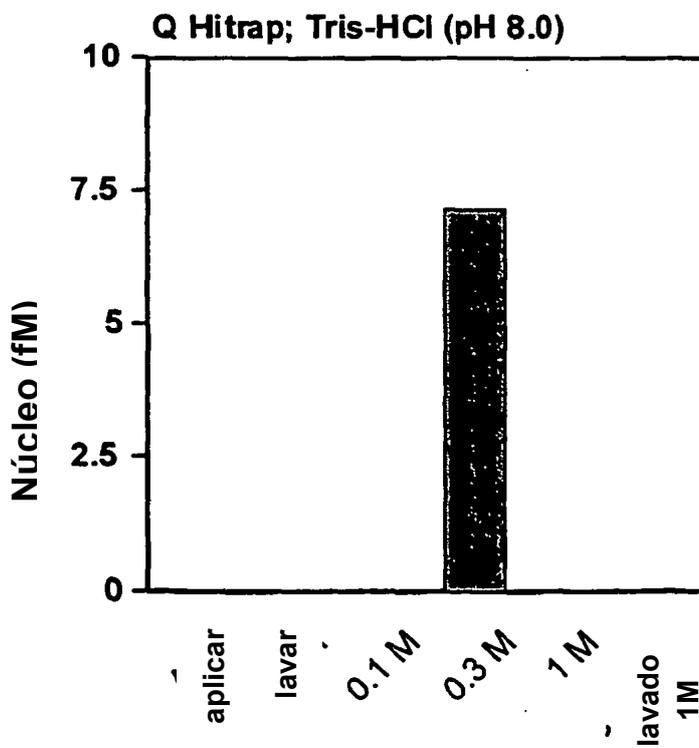
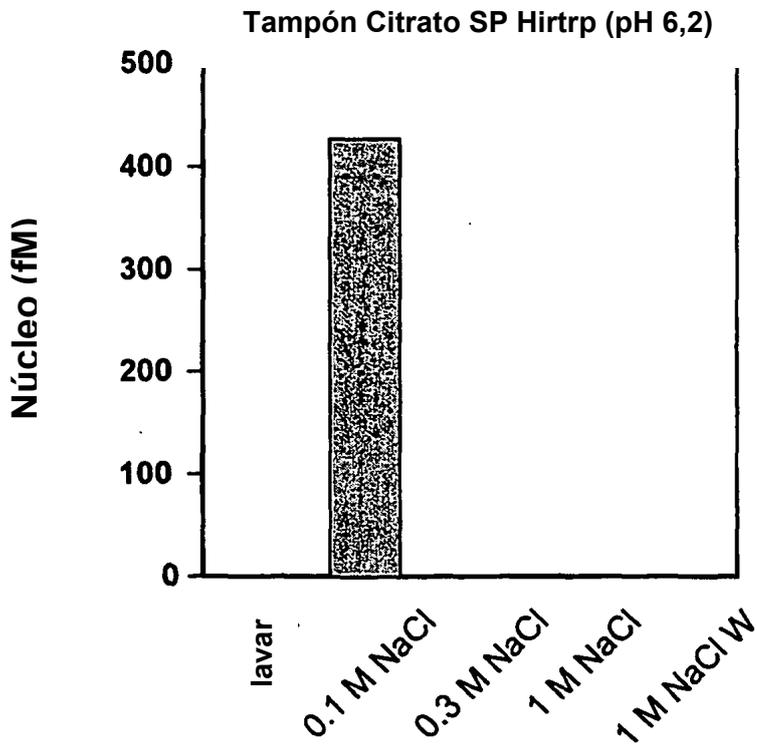


Fig. 13

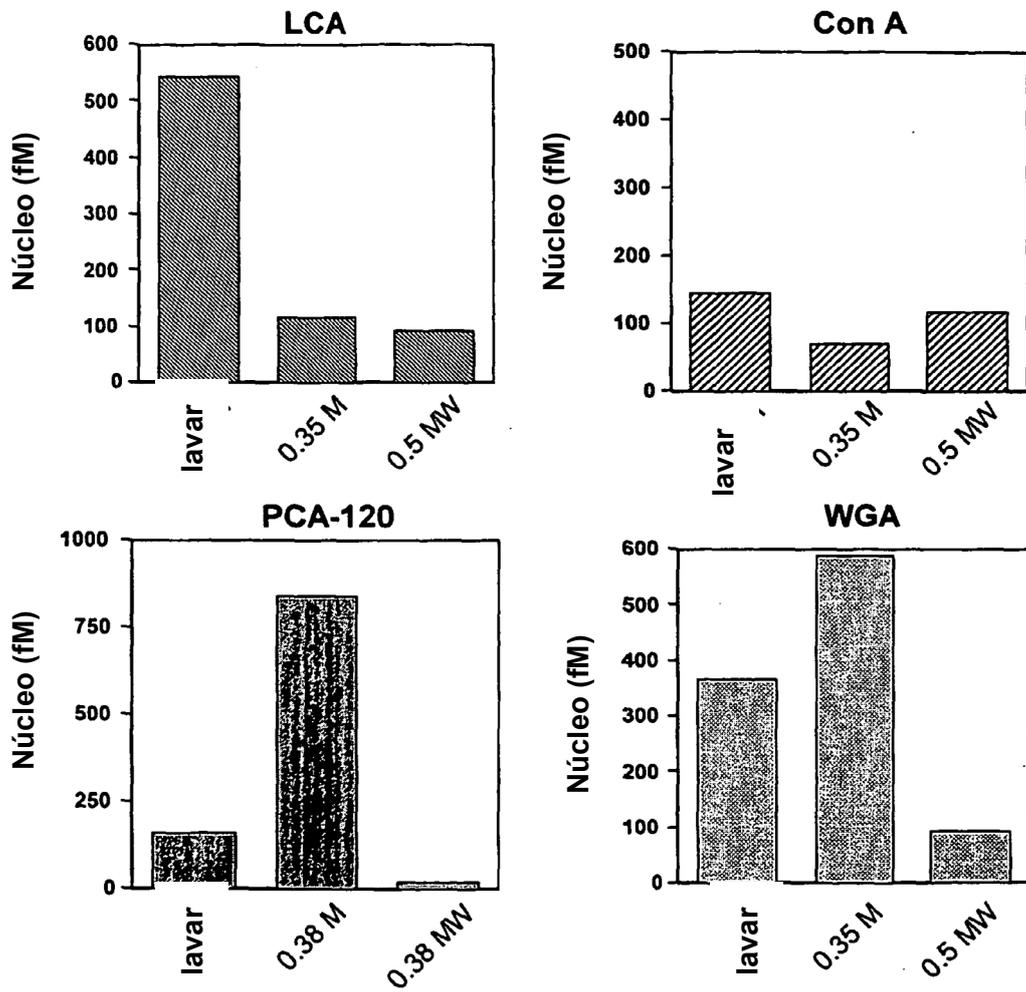


Fig. 14

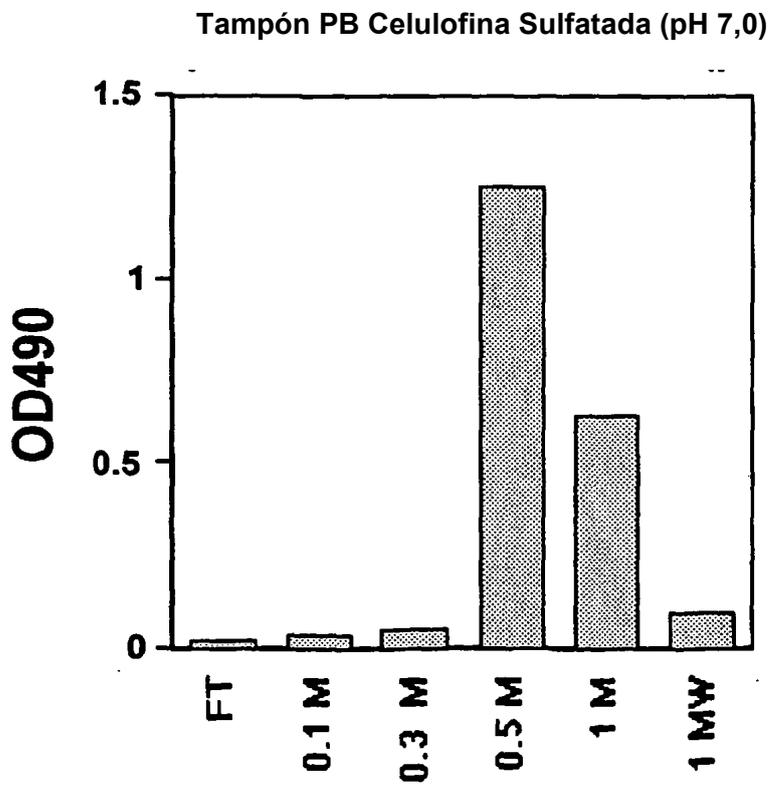
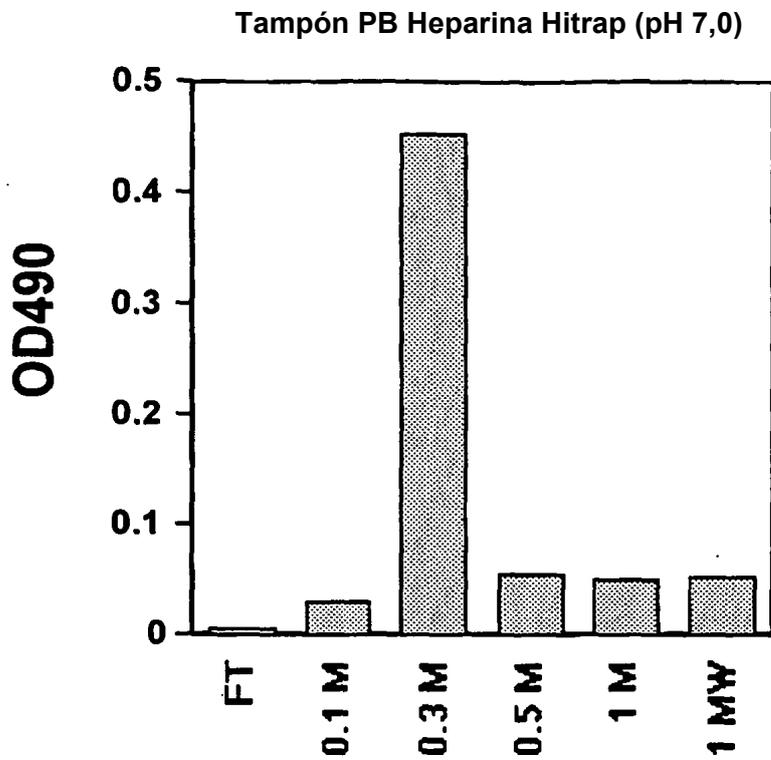


Fig. 15

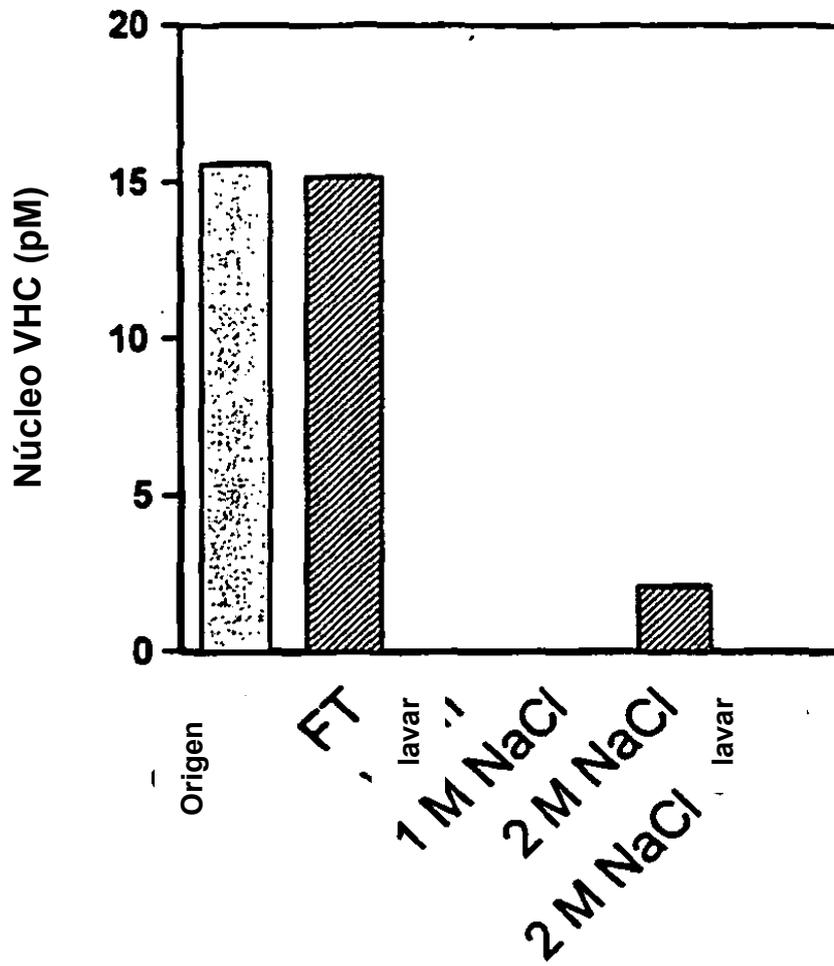
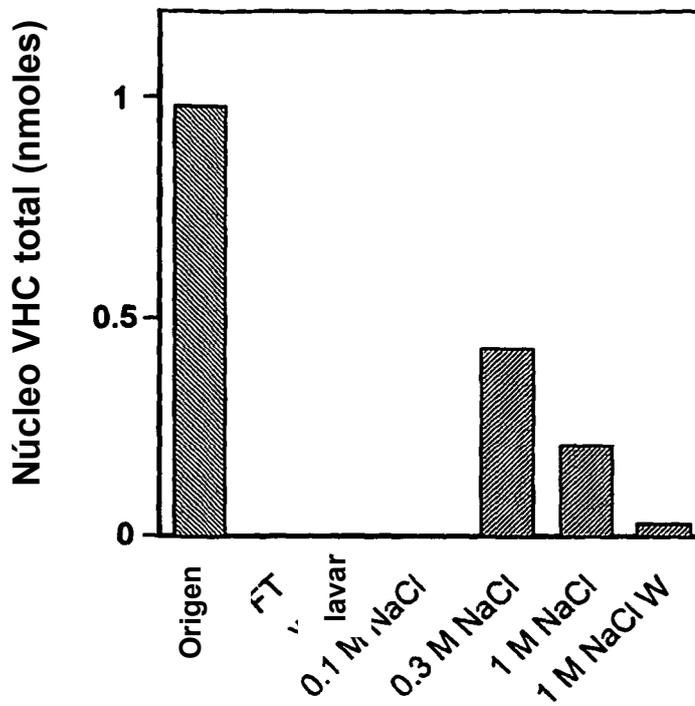


Fig. 16

A

HiTrap Q
CM 800 mL 50 mM Tris (pH 8)



B



PB Sulfato 5 ml (pH 7)

