

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 376 354**

51 Int. Cl.:

C12N 7/00 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

C12N 7/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06810937 .0**

96 Fecha de presentación: **29.09.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1930416**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.06.2008**

54 Título: **NUEVA PARTÍCULA RECOMBINANTE SIMILAR AL VIRUS DE LA HEPATITIS C HUMANO Y PROCEDIMIENTO PARA PRODUCIR LA MISMA.**

30 Prioridad:
30.09.2005 JP 2005287825

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.03.2012

73 Titular/es:
**JAPAN AS REPRESENTED BY THE DIRECTOR-
GENERAL OF NATIONAL INSTITUTE OF
INFECTIOUS DISEASES
23-1, Toyama 1-chome Shinjuku-ku
Tokyo 162-8640, JP;
Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science y
TORAY INDUSTRIES, INC.**

72 Inventor/es:
**TANABE, Jun-ichi;
SONE, Saburo;
WAKITA, Takaji;
ISHII, Koji;
SUZUKI, Ryosuke;
SUZUKI, Tetsuro y
MIYAMURA, Tatsuo**

74 Agente/Representante:
Temño Cenicerros, Ignacio

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).

ES 2 376 354 T3

DESCRIPCIÓN

Nueva partícula recombinante similar al virus de la hepatitis C humano y procedimiento para producir la misma

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a una partícula recombinante similar al virus de la hepatitis C humano y un procedimiento para producir el mismo.

10 Técnica antecedente

Los productos para introducir un gen en una célula animal se clasifican en líneas generales en procedimiento fisicoquímicos y procedimientos biológicos. Los ejemplos de procedimientos fisicoquímicos incluyen procedimientos tales como coprecipitación con fosfato cálcico, DEAE dextrano, lipofección, microinyección y electroporación. Los

15 ejemplos de procedimientos biológicos incluyen procedimientos que usan vectores virales.

Un procedimiento de vector viral es un procedimiento en el que un gen se introduce utilizando el mecanismo de invasión celular de un virus, es decir, la capacidad de infección.

20 Las proteínas estructurales derivadas de virus (nucleocápside, proteína de envoltura, etc.) existen sobre la superficie de una partícula vírica recombinante preparada usando un vector viral, que tiene un mecanismo para la introducción eficaz de un gen de forma que el virus pueda infectar una célula a través de un receptor sobre la superficie celular. Por lo tanto, una partícula recombinante viral preparada usando un vector viral de este tipo puede usarse no solo para introducir un gen en una célula animal, para generar una célula que expresa el gen de interés, sino también

25 para realizar la terapia génica, construir un animal transgénico, y así sucesivamente.

Los vectores virales se agrupan en vectores retrovíricos, vectores de virus de ADN y vectores de virus de ARN, y se caracterizan por la longitud de un gen que puede introducirse, si el gen se incorpora en el genoma cromosómico en una célula, o si el gen se introduce únicamente a una célula de división o puede también introducirse en una célula

30 no divisible, los tipos de células que pueden infectarse, la citotoxicidad, la eficacia de la introducción génica, y así sucesivamente, que dependen del tipo del virus original.

Los retrovirus tienen un ARN de hebra positiva como genoma. Este ARN tiene propiedades características a ARNm de células eucariotas, específicamente, una estructura casquete metilada en el extremo 5' y una cola de poliA de aproximadamente 200 nucleótidos en el extremo 3'. En una célula infectada, este ARN se convierte en ADN por

35 transcriptasa inversa del virus. Además, el ADN se incorpora en el ADN genómico del huésped por las acciones de las enzimas codificadas por los genes virales. El ADN incorporado se denomina provirus. Aparece una secuencia repetitiva (repetición terminal larga: LTR) en cualquier extremo de un provirus, y se sintetiza ARN viral por un promotor existente en esta secuencia. Las proteínas virales se trasladan del ARN sintetizado, y se incorpora un ARN del tamaño del genoma en la partícula vírica, que se libera fuera de la célula como una partícula hija.

La estructura de ARN requerida para la producción de una partícula vírica incluye LTR en cualquier extremo, un sitio de unión al cebador intercalado entre las mismas, una señal de encapsidación y una señal de polipurina. Estos son factores *cis* esenciales. Por otra parte, los genes que codifican las proteínas virales no son esenciales como factores

45 *cis*, y la replicación y la producción de una partícula normalmente ocurren una vez que las proteínas virales se suministran en la célula infectada.

Por lo tanto, para producir retrovirus recombinantes, se prepara un vector a partir del cual los genes codificados por el retrovirus, tales como *gag*, *pol* y *env*, se eliminan y en el que se inserta en su lugar un gen de interés que se va a expresar (denominado vector retrovílico), y este vector se introduce en una célula en la que se suministran proteínas

50 virales (denominadas normalmente como una célula empaquetadora) para preparar una partícula retrovítica incorporada con un gen extraño (Documento que no corresponde a una patente 1).

Los ejemplos de retrovirus incluyen virus de la leucemia de ratón, virus de la leucemia felina, oncovirus tipo C del babuino, virus de la inmunodeficiencia humana, virus de la leucemia de linfocitos T del adulto, y así sucesivamente. Además, los ejemplos de los indicados como vectores recombinantes retrovíricos incluyeron los basados en el virus de la leucemia de ratón (Documento que no corresponde a una patente 1), los basados en el virus de la

55 inmunodeficiencia humana (Documento que no corresponde a una patente 2), y así sucesivamente.

Un sistema para la producción de un retrovirus recombinante consiste en dos unidades de componentes, específicamente, un vector retrovítico portador de la información genética (un gen extraño de interés) que se va a introducir y todos los factores requeridos para el empaquetamiento y la incorporación del genoma viral en *cis* (ADN recombinante retrovítico) y una célula empaquetadora de retrovirus que suministra proteínas víricas codificadas por los genes *gag*, *pol* y *env*. La partícula retrovítica recombinante no puede liberarse por una célula empaquetadora en

65 solitario en la que se introduce un vector recombinante que expresa los genes *gag*, *pol* y *env*.

Para producir una partícula retrovítica recombinante, las proteínas gag, pol y env han de situarse en *trans*. Por lo tanto, introduciendo un vector retrovítico en una célula empaquetadora en la que se introduce un vector recombinante que expresa los genes *gag*, *pol* y *env*, puede producirse un retrovirus recombinante portador de la información genética mantenido en el vector que se ha mencionado anteriormente. Posteriormente, cuando una

Por lo tanto, el procedimiento del vector retrovítico es un sistema construido con el fin de incorporar de forma eficaz un ADN específico en el genoma cromosomal del huésped. Sin embargo, ya que la ubicación del gen de interés que se va a insertar puede no predecirse, no pueden descartarse las posibilidades de que el gen normal pueda dañarse por la inserción, los genes en la proximidad del sitio de inserción puedan activarse, y el gen extraño de interés pueda sobreexpresarse o bajoexpresarse. Para superar estos problemas, se promovió el desarrollo de un sistema de expresión transitorio que usaba un vector vírico de ADN que podía utilizarse como un gen extracromosómico.

Un vector del virus de ADN es un vector obtenido a partir de un virus de ADN. El virus de ADN lleva ADN en su partícula vírica como información genética. Este ADN se replica por la repetición de un procedimiento de producción de una hebra complementaria usando su propio ADN como plantilla por enzimas de replicación de ADN dependientes de ADN obtenido del huésped al menos como parte de los catalizadores. Los ejemplos de vectores del virus de ADN que pueden utilizarse como un gen extracromosómico incluyen vectores adenovirales.

Un adenovirus humano tiene ADN de doble hebra lineal con aproximadamente 36 kb como genoma, y las regiones incluidas en este genoma se dividen a grandes rasgos en los genes tempranos E1, E2, E3 y E4 y los genes tardíos L1, L2, L3, L4 y L5. Los genes tempranos están implicados principalmente en la replicación del virus, y los genes tardíos están implicados en la síntesis de proteínas estructurales víricas, tales como una cápside. Un vector adenovítico usado para la introducción de un gen se prepara reemplazando la región E1 (dividida en E1A y E1B, y todos los promotores adenovíticos se activan por E1A), un gen temprano, por un gen extraño deseado (gen de interés) y se prolifera usando 293 células, una línea celular que puede suministrar E1A en *trans* (293 células expresan E1A). Un vector de adenovirus deficiente en la región E1A no puede proliferar en una célula normal, lo que no expresa E1A. Ya que la región E3 no es esencial para la propagación del virus, a menudo se elimina para aumentar el tamaño de inserción de un gen extraño. Ya que los adenovirus pueden empaquetar un genoma hasta el 105% del tamaño del genoma de un tipo natural en su cápside, puede insertarse un gen extraño de hasta 8,1 kb mediante la delección de las regiones E1 y E3 (Documento que no corresponde a una patente 3).

Un vector adenovítico puede introducir un gen en una célula no creciente o una célula de crecimiento (Documento que no corresponde a una patente 4). Por lo tanto, este procedimiento es adecuado para los procedimientos de introducción de genes *in vivo*. Una de las desventajas de este vector es el periodo de expresión génica (en unidades de semana) generalmente corto. Esto se debe a que el genoma adenovítico existe solo dentro de una región extracromosómica (episoma) y no se replica ni amplifica. Una segunda desventaja es que el adenovirus que se usa comúnmente en el presente provoca reacciones inflamatorias no específicas e intensifica una respuesta inmune mediada por células frente al propio vector. Por lo tanto, es difícil realizar una administración continua en terapia génica (Documento que no corresponde a una patente 5).

Se están desarrollando vectores víricos basados en virus de ARN. El virus de ARN se replica repitiendo el procedimiento de generar una hebra complementaria usando su propio ARN como plantilla por sus propias enzimas de replicación de ARN dependientes del ARN como catalizadores.

Los virus de ARN se clasifican en virus de ARN de hebra negativa y virus de ARN de hebra positiva. Los ejemplos representativos de virus de ARN de hebra negativa incluyen el virus influenza. El genoma del virus influenza consiste en ocho segmentos de ARN de hebra negativa. Cuando el virus influenza infecta una célula, se inicia la transcripción génica por proteínas en la partícula influenza. En primer lugar, el ARN polimerasa vírico escinde el ARNm de la célula huésped en una docena más o menos de nucleótidos de la estructura casquete del extremo 5' y utiliza los fragmentos como cebadores para alargar la hebra de ARN (hebra positiva). Las proteínas víricas se traducen de este ARN de hebra positiva. En el procedimiento de replicación, el ARN complementario completamente al ARN vírico se sintetiza, y se amplifica el ARN del virus progenie usando esta secuencia como plantilla. Después, el ARN vírico se empaqueta junto con proteínas víricas para formar una partícula vírica.

Por lo tanto, para producir el virus influenza en un sistema de cultivo celular, las proteínas codificadas por el virus influenza se expresan por promotores de ARN polimerasa II, tales como, por ejemplo, promotores CMV y CAG, el ARN vírico se expresa por promotores de ARN polimerasa I, promotores sin una estructura casquete y poliA, tales como, por ejemplo, promotores génicos de ARNr, y el ARN vírico se empaqueta junto con proteínas víricas en la célula para formar una partícula vírica (Documento que no corresponde a una patente 6). Sin embargo, la cantidad del virus que se va a producir no se especifica, y esta técnica no se ha establecido como una técnica que pueda utilizarse en vista de la producción en una medida satisfactoria.

Los ejemplos de virus clasificados como virus de ARN de hebra positiva incluyen el virus *Sindbis* y el virus de la hepatitis C. El ARN genómico de un virus de ARN de hebra positiva también funciona como ARN mensajero (en lo

sucesivo en este documento denominado "ARNm") al mismo tiempo y puede producir proteínas requeridas para la replicación y la formación de partículas dependiendo de la función de traducción de la célula huésped. En otras palabras, el ARN genómico del propio virus de ARN de hebra positiva tiene capacidad de transmisión.

Los vectores víricos obtenidos del virus *Sindbis* tienen una estructura básica del ARN genómico a partir del cual se deletorea la región génica estructural implicada en la estructura del virus y en el que se retienen un grupo de genes para proteínas requeridas para la transcripción y la replicación del virus y ARN en el que un gen extraño deseado se liga a la dirección 3' del promotor de transcripción. Cuando dicho ARN o ADNc transcrito al este ARN se introduce en una célula, se dan la replicación autónoma del vector de ARN que incluye el gen extraño y la transcripción del gen extraño situado en la dirección 3' del promotor de transcripción, y un producto de un gen extraño de interés se expresa en la línea celular. Además, puede prepararse un complejo que tiene la capacidad de infectar pero no la capacidad de transmitir dejando que una unidad de ADNc que expresa genes estructurales (auxiliares) y una unidad de ADNc que expresa el vector de ARN que se ha mencionado anteriormente coexistan en una célula empaquetadora (Documento que no corresponde a una patente 7).

Ya que el virus *Sindbis* usa un receptor de laminina de alta afinidad de 67 kDa (LAMR) como receptor e infecta las células nerviosas con gran eficacia, el vector del virus *Sindbis* llama la atención como un sistema para introducir un gen específicamente a los nervios (Documento que no corresponde a una patente 8). Sin embargo, no se ha demostrado que la infección por el virus *Sindbis* induzca la apoptosis de la célula huésped (Documento que no corresponde a una patente 9), tiene que ver con la toxicidad.

El genoma del virus de la hepatitis C (VHC) es un ARN de hebra sencilla con hebra positiva de aproximadamente 9600 nucleótidos. Este ARN genómico comprende la región no traducida 5' (también expresada como 5'NTR o 5'UTR), la región traducida que incluye una región estructural y una región no estructural, y la región no traducida 3' (también expresada como 3'NTR o 3'UTR). Las proteínas estructurales del VHC se codifican en la región estructural, y múltiples proteínas no estructurales se codifican en la región no estructural.

Dichas proteínas estructurales (Core, E1, E2 y p7) y proteínas no estructurales (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B) del VHC se traducen como poliproteína continua de la región traducida, se someten a una digestión limitada por proteasa, se liberan y se producen. De estas proteínas estructurales y proteínas no estructurales (es decir, proteínas víricas del VHC), Core es la proteína núcleo. E1 y E2 son proteínas de envoltura. Las proteínas no estructurales son proteínas víricas implicadas en la replicación del propio virus. Se sabe que NS2 tiene una actividad de metaloproteasa, y se sabe que NS3 tiene una actividad serina proteasa (1/3 en el miembro del terminal N) y actividad helicasa (2/3 en el miembro del terminal C). Además, también se indica que NS4A es un cofactor para la actividad proteasa de NS3, y que NS5B tiene una actividad ARN polimerasa dependiente de ARN.

Se ha revelado que el VHC se clasifica en muchos tipos dependiendo del genotipo o el serotipo. De acuerdo con el procedimiento de análisis filogenético de Simmonds y col., que usa secuencias nucleotídicas de cepas del VHC, que es un procedimiento de clasificación del genotipo del VHC representativo actualmente, el VHC se clasifica en seis tipos, incluyendo los genotipos 1a, 1b, 2a, 2b, 3a y 3b, y estos se subdividen además en varios subtipos. Además, se han determinado las secuencias nucleotídicas de los genomas de longitud completa de algunos genotipos del VHC (Documentos que no corresponden a una patente de 10 a 13).

Se captura una partícula del VHC por polisacáridos sulfatados sobre la superficie celular, se une a un receptor de alta afinidad a través de proteínas de envoltura, y se recoge en el endosoma por endocitosis. Después, la membrana del virus y la membrana del endosoma se condensan, y la nucleocápside invade el citoplasma. La traducción del genoma viral no envuelto se inicia por el Sitio Interno de Entrada del Ribosoma (IRES). La traducción y la escisión de una proteína ocurren sobre la membrana del retículo endoplasmático. La proteína Core, las proteínas E1 y E2, y el ARN vírico replicado sobre el retículo endoplasmático se combinan para formar una partícula vírica. Después, la partícula brota en el lumen del retículo endoplasmático. Se cree que la partícula que ha brotado se libera fuera de la célula a través del aparato de Golgi.

Recientemente, la preparación de un replicón de ARN subgenómico del VHC como ARN obtenido del VHC que tiene la capacidad de replicarse de forma autónoma (Documentos de patente 1 y 2 y Documentos que no corresponden a una patente de 14 a 16) ha permitido el análisis del mecanismo de replicación del VHC que usan las células cultivadas. Este replicón de ARN subgenómico del VHC se obtiene reemplazando las proteínas estructurales que existen en la dirección 3' del IRES del VHC en la región no traducida 5' del ARN genómico del VHC por el gen de resistencia a neomicina y el IRES del VEMC ligado en la dirección 3' del mismo. Se ha demostrado que, cuando se introduce en una célula de cáncer de hígado humana Huh7 y se cultiva en presencia de neomicina, este replicón de ARN replica de forma autónoma en la célula Huh7. Además, se ha demostrado que algunos replicones de ARN subgenómico del VHC se replican de forma autónoma no solo en Huh7, sino también en células, tales como célula de cáncer cervical humano HeLa o célula de cáncer de hígado humano HepG2 (Documento de Patente 3). Además, el Documento de Patente 2 propone la producción de una partícula vírica del VHC que utiliza el genoma del VHC de longitud completa cuando se usa un VHC recombinante como vector para terapia génica.

[Documento de Patente 1] Solicitud de Patente Japonesa (Kokai) N° 2002-171978 A

[Documento de Patente 2] Solicitud de Patente Japonesa (Kokai) N° 2001-17187 A

[Documento de Patente 3] Solicitud de Patente Internacional WO2004/104198

[Documento que no corresponde a una patente 1] Mann, R. y col., Cell, 33 (1983) pág. 153-59

[Documento que no corresponde a una patente 2] Simada, T y col., J Clin Invest. 88 (1991) pág. 1043-47

[Documento que no corresponde a una patente 3] Betta, A y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 (1994) pág. 8802-06

[Documento que no corresponde a una patente 4] Burden, S & Yarden, Y., Neuron, 18 (1997) pág. 847-55

[Documento que no corresponde a una patente 5] Crystal, R.G Science, 270, (1995) pág. 404-10

[Documento que no corresponde a una patente 6] Neumann, G. & Kawaoka, Y., Virology 287 (2001) pág. 243-50

[Documento que no corresponde a una patente 7] Berglund, P y col., Biotechnology, 11 (1993) pág. 916-920

[Documento que no corresponde a una patente 8] Wang, K.S y col., J. Virol. 66 (1992) pág. 4992-5001

[Documento que no corresponde a una patente 9] Levine, B. y col., Nature, 361 (1993) pág. 739-42

[Documento que no corresponde a una patente 10] Simmonds, P. y col., Hepatology, 10 (1994) pág. 1321-24

[Documento que no corresponde a una patente 11] Choo, Q.L y col. Science, 244 (1989) pág. 359-362

[Documento que no corresponde a una patente 12] Okamoto, H y col., J. Gen. Virol., 73 (1992) pág. 673-79

[Documento que no corresponde a una patente 13] Mori, S. y col., Biochem. Biophys. Res. Commun. 183 (1992) pág. 334-42

[Documento que no corresponde a una patente 14] Blight y col., Science, 290 (2000) pág. 1972-74

[Documento que no corresponde a una patente 15] Friebe y col., J. Virol., 75 (2001) pág. 12047-57

[Documento que no corresponde a una patente 16] Kato, T. y col., Gastroenterology, 125 (2003) pág. 1808-17

El documento WO 2004/024904 describe procedimientos para producir partículas de pseudovíricas que contienen proteínas funcionales de, por ejemplo, el virus de la hepatitis C. El procedimiento permite la expresión de proteínas estructurales para formar partículas similares a virus. Las partículas similares a virus resultantes que son infecciosas pero incapaces de replicarse como proteínas no estructurales para controlar la replicación del virus faltan y no se expresan.

El documento WO 2005/080575 describe un procedimiento para replicar de forma eficaz una secuencia genómica del VHC de longitud completa que contiene ARN para producir partículas del virus del VHC que contienen ARN de replicón del VHC de longitud completa o ARN genómico del VHC de longitud completa usando un sistema de cultivo celular. Específicamente, un replicón de ARN que tiene capacidad de replicación autónoma y capacidad de producción de partículas víricas se construyó usando ARN genómico del VHC. La célula replicante del replicón de ARN del VHC de longitud completa puede producir partículas víricas y las partículas víricas producidas contenían el ARN replicón del VHC de longitud completa en una estructura compuesta de proteínas del virus VHC. J.R. Dubensky y col. describieron en J. Virol., Vol. 70, 1996, págs. 508-519 un sistema de vector de expresión basado en el genoma de longitud completa del virus *Sindbis* que implicaba la conversión de un replicón de ARN en un sistema de expresión basado en ADN segmentado. Los autores indican que fue posible producir partículas del virus *Sindbis* empaquetado en células co-transfectadas con el vector replicón y ADN plasmídico de DH.

T. Pietschmann y col. informan en J. Virology, Vol. 76, 2002, págs. 4008-4021 sobre la preparación de replicones subgenómicos del virus de la hepatitis C para la expresión eficaz de proteínas estructurales del VHC. El replicón de ARN se obtuvo a partir de un aislado del genotipo 1b de consenso de la cepa con1. Los autores descubrieron de D7 que a pesar de la liberación del ARN del VHC resistente a nucleasa en el sobrenadante del cultivo celular, no se encontró ninguna prueba del acoplamiento de partículas víricas.

Descripción de la invención

Actualmente, el VHC no se ha desarrollado como un vector viral como los retrovirus, adenovirus, el virus influenza y el virus *Sindbis*. Si se desarrolla un vector del VHC de este tipo, los genes pueden introducirse específicamente en células de tejidos del hígado o similares. En este caso, para garantizar la seguridad en mayor medida, es deseable que el vector del VHC infecte las células pero no tenga la propiedad de transmitir.

Un objeto de la presente invención es desarrollar una partícula recombinante similar al virus de la hepatitis C (VHC) que puede usarse como un vector de este tipo que se ha descrito anteriormente. Además, otro objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento para producir esta partícula similar al VHC de forma eficaz.

Los inventores de la presente invención intentaron permitir células cultivadas para producir una partícula recombinante similar al VHC que parece ser útil industrialmente en vista de la seguridad, comodidad y aplicabilidad. En primer lugar, el genoma del VHC se dividió en un vector que expresa las proteínas estructurales del VHC y un vector que incluye los genes implicados en la replicación. Puede incluirse un gen extraño deseado y/o IRES (Sitio Interno de Entrada del Ribosoma) en el vector posterior.

Los inventores de la presente invención construyeron un vector obtenido clonando ADN que incluía un gen extraño deseado, la secuencia de IRES, y los genes implicados en la replicación del VHC en la dirección 3' del promotor T7 y sintetizaron *in vitro* un replicón de ARN subgenómico del VHC que incluía la secuencia del gen extraño usando polimerasa T7. Este replicón de ARN se introdujo en una célula animal cultivada para obtener una cepa celular en la que se replicó el replicón de ARN subgenómico del VHC.

Posteriormente, descubrieron un sistema que puede introducir un vector que expresa altamente las proteínas estructurales del VHC en la cepa celular con una alta eficacia e introducirla en células portadoras de replicones de ARN subgenómico del VHC de diversos genotipos. Como resultado, expresando las proteínas estructurales del VHC en células, descubrieron con éxito combinaciones con las que el replicón de ARN subgenómico del VHC pueden empaquetarse en una partícula vírica.

Además, los inventores de la presente invención confirmaron que una partícula recombinante similar al VHC producida por el procedimiento de la presente invención infecta las células y que una célula infectada por el VHC recombinante no tiene la propiedad de transmisión, sin producir una partícula vírica hija. Debido a dichas características, la partícula recombinante del VHC de la presente invención puede usarse como un vector para la introducción de un gen extraño o para terapia génica.

Específicamente, la presente invención se caracteriza por las siguientes características en resumen.

De acuerdo con la presente invención se proporciona un procedimiento para producir una partícula recombinante del virus de la hepatitis C, que comprende las etapas de introducirla en:

(i) una célula portadora de un replicón de ARN subgenómico que no incluye genes que codifican las proteínas estructurales del virus de la hepatitis C y que comprende una secuencia nucleotídica que comprende la región no traducida 5', la secuencia nucleotídica codificante de las proteínas no estructurales NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B, y la región no traducida 3' de un ARN genómico obtenido a partir de una cepa del virus de la hepatitis C del genotipo 1b que es una cepa con1 o una cepa obtenida a partir del mismo,

(ii) un vector del virus vaccinia o un promotor EF-1 α portador del vector que expresa las proteínas Core, E1, E2 y p7 obtenidas a partir de una cepa del virus de la hepatitis C del genotipo 1a, 1b, 2a, 2b, 3a y 3b que es diferente de la cepa del virus de la hepatitis C de (i), cultivar la célula y recuperar la partícula recombinante del virus de la hepatitis C producida.

Como se ha especificado anteriormente, la cepa del virus de la hepatitis C del punto (i) anterior es una cepa vírica de genotipo 1b.

La cepa vírica que se ha mencionado anteriormente de genotipo 1b es la cepa con1 o una cepa de la misma.

En otra realización, la cepa del virus de la hepatitis C del punto (ii) anterior es una cepa vírica de genotipo 2a.

En una realización preferida, la cepa vírica que se ha mencionado anteriormente de genotipo 2a es la cepa JFHI o una cepa derivada de la misma.

En otra realización más, el replicón de ARN que se ha mencionado anteriormente puede incluir adicionalmente al menos una secuencia IRES.

En otra realización más, el replicón de ARN que se ha mencionado anteriormente puede incluir adicionalmente al menos un gen extraño.

En una realización preferida, el IRES que se ha mencionado anteriormente y el gen extraño que se ha mencionado anteriormente pueden situarse entre la región no traducida 5' que se ha mencionado anteriormente y la NS3 que se ha mencionado anteriormente.

En otra realización más, la célula que se ha mencionado anteriormente es una célula animal.

En una realización preferida, la célula animal que se ha mencionado anteriormente es una célula de mamífero.

Los ejemplos de la célula de mamífero anterior incluyen líneas celulares Huh7, HepG2 y establecidas obtenidas de estas células.

En otra realización más, el vector de expresión que se ha mencionado anteriormente es un vector vírico.

En una realización preferida, el vector viral que se ha mencionado anteriormente es un vector del virus vaccinia.

Las partículas virales pueden proliferarse permitiendo que la partícula recombinante del virus de la hepatitis C producida y recuperada por el procedimiento de la presente invención que se ha descrito anteriormente infecte las células susceptibles al VHC, tales como células hepáticas o linfoides. Dichos procedimientos se incluyen en el alcance de la presente invención.

De acuerdo con un segundo aspecto, la presente invención también proporciona una partícula recombinante del virus de la hepatitis C producida por el procedimiento de la presente invención que se ha descrito anteriormente y caracterizada porque tiene la capacidad de infectar pero no la capacidad de transmitir.

En una realización de la misma, se introduce un gen extraño en la partícula recombinante del virus de la hepatitis C que se ha mencionado anteriormente de una manera expresable.

5 En otra realización, la partícula recombinante del virus de la hepatitis C que se ha mencionado anteriormente es un vector.

10 En la presente invención, uno de los procedimientos preferidos para producir una partícula recombinante del virus de la hepatitis C es un procedimiento para producir una partícula recombinante del virus de la hepatitis C, en la que dicho procedimiento comprende las etapas de introducirla en (i) una célula en la que un replicón de ARN subgenómico como se define en la reivindicación 1, la región no traducida 5', la secuencia nucleotídica que codifica las proteínas NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B, y la región no traducida 3' de un ARN genómico obtenido a partir de la cepa con1 del virus de la hepatitis C, o un replicón de ARN que contiene adicionalmente al menos un gen extraño y/o al menos una secuencia de IRES, además de la secuencia nucleotídica, se replica de forma autónoma (ii) un vector del virus vaccinia que expresa las proteínas Core, E1, E2 y p7 del virus de la hepatitis C obtenidas a partir de la cepa JFH1, cultivar la célula y recuperar la partícula recombinante del virus de la hepatitis C producida.

15 Además, en la presente invención, se produce una partícula recombinante del virus de la hepatitis C preferida mediante el procedimiento preferido que se ha descrito anteriormente.

20 El procedimiento de la invención en el que la cepa del virus de la hepatitis C de genotipo 1b que se define en el punto (i) que se ha mencionado anteriormente es la cepa con1.

25 Además, también es preferible en este procedimiento que la cepa del virus de la hepatitis C de genotipo 1a que se define en el punto (ii) que se ha mencionado anteriormente sea la cepa H77c, 1, H o HC-J1.

También es preferible en este procedimiento que la cepa del virus de la hepatitis C de genotipo 1b que se define en el punto (ii) que se ha mencionado anteriormente sea la cepa J1, con1, TH, J, JT y BK.

30 También es preferible en este procedimiento que la cepa del virus de la hepatitis C de genotipo 2a que se define en el (ii) que se ha mencionado anteriormente sea la cepa JFH1, HC-J6, JCH1 o J6CF.

35 También es preferible en este procedimiento que la cepa del virus de la hepatitis C de genotipo 3a que se define en el punto (ii) que se ha mencionado anteriormente sea la cepa NZL1, K3a/650, 452 o E-b1.

También es preferible en este procedimiento que la cepa del virus de la hepatitis C de genotipo 3b que se define en el punto (ii) que se ha mencionado anteriormente sea la cepa Tr.

40 Además, en el procedimiento de la invención el vector del punto (ii) que se ha mencionado anteriormente es un vector del virus vaccinia o un vector portador del promotor EF-1 α .

45 Además, es preferible en este procedimiento que el replicón de ARN que se ha mencionado anteriormente comprenda adicionalmente al menos una secuencia del sitio de entrada interno del ribosoma (IRES) y/o al menos un gen extraño.

Es preferible que la secuencia del IRES y/o el gen extraño se sitúe entre la región no traducida 5' que se ha mencionado anteriormente y la secuencia codificante de la proteína NS3 que se ha mencionado anteriormente.

50 En este procedimiento, la célula que se ha mencionado anteriormente es preferiblemente una célula animal. Los ejemplos preferidos de células animales incluyen la célula Huh7, la célula HepG2 y líneas células establecidas obtenidas a partir de estas células.

55 Una partícula recombinante similar al virus de la hepatitis C producida por el procedimiento que se ha descrito anteriormente tiene la propiedad de infectar pero no la propiedad de transmitir.

60 Una partícula recombinante infecciosa similar al VHC en la que un ARN subgenómico del VHC que incluye un gen extraño deseado se empaqueta y que no tiene la propiedad de transmitir y un procedimiento de producción de la misma pueden proporcionarse por la presente invención. Ya que una partícula recombinante infecciosa similar al VHC de este tipo tiene la ventaja de no tener la propiedad de transmitir, puede usarse para la introducción de genes (por ejemplo, terapia génica), en particular, en células o tejidos hepáticos o linfoides o puede usarse como un vector viral para producir un animal transgénico o como una vacuna atenuada.

Breve descripción de los dibujos

65 La figura 1 es una vista esquemática de una realización de la presente invención, que muestra los procedimientos de producción de una partícula recombinante similar al VHC. a): los replicones de ARN subgenómico del VHC se

replican en la célula Huh7 en la que se introduce el replicón de ARN subgenómico del VHC. No se produce una partícula vírica. b): En la célula de a) en la que se introduce un vector que expresa la proteína estructural del VHC, se producen partículas similares a virus en las que se empaqueta el replicón de ARN subgenómico del VHC utilizando proteínas estructurales del VHC. c): En una célula infectada por la partícula similar al virus producida en b), se replican el replicón de ARN subgenómico del VHC, pero no se produce una partícula vírica hija.

La figura 2 muestra dibujos estructurales de ARN genómico del VHC y ADNc del ARN subgenómico del VHC. El diagrama superior y el diagrama del centro muestran pJFH1 y pSGR-JFH1, respectivamente, preparados a partir del VHC de genotipo 2a. El diagrama inferior muestra I389/NS3-3'/wt preparado a partir del VHC de genotipo 1b. Los símbolos de la figura representan lo que se indica a continuación: T7, promotor de ARN T7; 5'UTR, región no traducida 5'; Core, proteína Core; E1 y E2, proteínas de envoltura; p7, proteína p7; NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B, proteínas no estructurales; 3'UTR, región no traducida 3'; Agel, Pmel y XbaI, sitios de escisión de enzimas de restricción Agel, Pmel y XbaI; IRES del VEMC, sitio de entrada interno del ribosoma del virus de la encefalomiocarditis.

La figura 3 muestra mapas de vectores que expresan las proteínas estructurales del VHC de la presente invención. Específicamente, el diagrama superior muestra pGAGC-p7JFH1, un clon plasmídico preparado insertando los genes de la región estructural JFH en la dirección 3' del promotor CAG. El diagrama inferior muestra la estructura de pEF4C-p7JFH1, un clon plasmídico preparado insertando los genes de la región estructural JFH en la dirección 3' de la secuencia promotora del factor de elongación 1 α . Los símbolos de la figura representan lo que se indica a continuación: CAG, promotor CAG, pA, secuencia poliA adicional; *EcoRI*, sitio de escisión de la enzima de restricción *EcoRI*; EF-1 α , promotor del factor de elongación 1 α , BGH pA, secuencia poliA adicional del factor de crecimiento bovino.

La figura 4 muestra mapas de los genes estructurales del VHC insertados en los vectores pDisHJFHst, pDisH77st, pDisJ1st, pDisJ1 (c)/JFH(E1-p7)st y pDisJFH(c)/J1(E1-p7)st. Las diferencias en las cepas víricas a partir de las cuales se obtienen los vectores se representan por áreas sombreadas en el marco;

La figura 5 muestra gráficos que muestran la cantidad de replicón de ARN del VHC (A) y la cantidad de la proteína Core del VHC (B) en cada fracción obtenida introduciendo pEF4C-p7JFH1 en una cepa celular IH4.1 portadora de replicón y fraccionando el sobrenadante del cultivo celular (sup) por un gradiente de densidad de sacarosa. □, Experimento 1; ♦, Experimento 2.

La figura 6 muestra gráficos que muestran la cantidad de la proteína Core del VHC (eje vertical) en cada fracción (eje horizontal) obtenida permitiendo que DisJFHst, un vector del virus vaccinia, infecta una cepa celular 5-15 portadora de replicón y fraccionando el sobrenadante del cultivo celular (sup) por gradiente de densidad de sacarosa. El círculo cerrado representa la proteína Core del VHC, y el cuadrado cerrado representa los resultados usando un sobrenadante de cultivo tratado con NP40. El Experimento 1 muestra los resultados de únicamente el cultivo no tratado (figura 6 A), y el Experimento 2 muestra los resultados de los sobrenadantes de cultivo no tratados y tratados con NP40 (figura 6 B).

Mejor modo para la realización de la invención

1. Definición

Los términos usados en la presente memoria descriptiva tienen los siguientes significados.

La expresión "replicón de ARN" se refiere al ARN que se prepara modificando el genoma del virus VHC y tiene capacidad de replicación de forma autónoma.

La expresión "capacidad de replicación de forma autónoma" significa la capacidad de reproducir copias de forma autónoma de un ácido nucleico (es decir, replicación) en una célula, tal como ADN plasmídico.

La expresión "capacidad de infectar" o "propiedad de infectar" se refiere a la capacidad de introducir un ácido nucleico y similares de virus a una célula debido a la capacidad de adhesión a una célula, la fusión con una membrana celular y similares.

La expresión "virus de la hepatitis C recombinante" significa un virus obtenido cambiando las propiedades del virus VHC original cualitativamente/cuantitativamente usando técnicas de ingeniería genética. Los ejemplos del mismo incluyen un virus capaz de expresar un gen extraño, además de genes expresados por el virus original, un virus con deficiencias en la propiedad de transmisión o la capacidad de replicar un genoma vírico del virus original, y así sucesivamente. En el sentido amplio, se incluyen los virus obtenidos por recombinación de genes entre diferentes tipos o subtipos del mismo virus.

La expresión "propiedad de transmisión" o "capacidad de transmitir" significa una capacidad de formar una partícula infecciosa o un complejo similar a la misma y transmitirla a otra célula después de la introducción de un ácido

nucleico a una célula por infección o una técnica artificial y replicación del ácido nucleico existente en la célula.

"Core" es una proteína estructura núcleo del VHC.

5 "E1" y "E2" son ambas proteínas estructurales de envoltura.

"NS" se refiere a una proteína no estructural del VHC, que está implicada en la replicación del propio virus. "NS2" tiene una actividad de metaloproteasa. "NS3" tiene una actividad de serina proteasa (1/3 en el miembro terminal N) y una actividad de helicasa (2/3 en el miembro terminal C). "NS4A" es un cofactor para la actividad de proteasa de NS3. La función de "NS4B" no está clara. Se cree que "NS5A" tiene actividad para regular la transferencia de información de la célula huésped. **NS5B" tiene actividad de ARN polimerasa dependiente de ARN.

La expresión "secuencia del IRES" significa un sitio de entrada interno del ribosoma, que puede unirse con el ribosoma en el ARN para iniciar la traducción.

La expresión "de una manera expresable" significa un estado en el que un gen de interés puede transcribirse y traducirse mediante secuencias reguladoras, tales como un promotor y un potenciador.

20 2. Célula portadora del replicón de ARN subgenómico del VHC

El genoma del VHC de tipo natural consiste en un ARN de hebra sencilla de aproximadamente 9,6 kb que codifica una proteína precursora de aproximadamente 3000 aminoácidos. El genoma del VHC se constituye por la región no traducida 5' (5'UTR), Core, E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B y la región no traducida 3' (3'UTR) en este orden. El replicón de ARN subgenómico del VHC usado en el procedimiento de la presente invención incluye ARN modificado constituido por la región no traducida 5', NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B y la región no traducida 3' en este orden. Este replicón de ARN se introduce en una célula específica de una manera expresable de forma que pueda replicarse con acciones de factores reguladores, tales como un promotor.

El replicón de ARN puede comprender adicionalmente un gen extraño y/o una secuencia del IRES. El gen extraño y la secuencia del IRES pueden situarse preferiblemente entre la región no traducida 5' ya la secuencia que codifica NS3 en el orden del gen extraño y la secuencia del IRES.

Los ejemplos preferidos de la secuencia del IRES incluyen, pero sin limitación, IRES del VEMC (sitio de entrada interno del ribosoma del virus de la encefalomiocarditis), IRES del VFMD, IRES del VHC, y así sucesivamente. Se prefieren IRES del VEMC e IRES del VHC, y es más preferido IRES del VEMC.

Los ejemplos del gen extraño usados incluyen genes que muestran resistencia a fármacos (es decir, estos genes permiten la selección celular; las células que tienen este gen tendrán resistencia al fármaco) tales como, por ejemplo, un gen que codifica neomicina, higromicina, puromicina, zeocina, blasticidina, timidina cinasa, kanamicina, o similares; genes informadores (es decir, estos genes son genes marcadores que codifican un producto génico usado como un indicador de la expresión génica) tales como, por ejemplo, genes que codifican una enzima que cataliza una reacción luminiscente o una reacción de color de un gen informador, tales como, por ejemplo, luciferasa, proteína verde fluorescente (GFP), β -galactosidasa, y similares; además, genes diana de terapia génica y ácidos nucleicos terapéuticos, tales como, por ejemplo, genes que codifican diversas proteínas útiles para el tratamiento de enfermedades que requieren tratamiento en mamíferos, incluyendo seres humanos, tales como, por ejemplo, enzimas, citocinas, quimioterápicos, hormonas, anticuerpos, moléculas inmunorreguladoras, proteínas supresoras de tumor, factores de crecimiento, proteínas de membranas y proteínas vasoactivas, ácidos nucleicos terapéuticos, tales como ARN antisentido y ARNs, y así sucesivamente.

Los ejemplos específicos del replicón de ARN subgenómico del VHC incluyen pSGR-JFH1 (diagrama del centro de la figura 2), I₃₈₉/NS3-3'/wt (diagrama inferior de la figura 2), y así sucesivamente. Dichos replicones de ARN subgenómicos del VHC pueden prepararse mediante procedimientos descritos en, por ejemplo, Kato, T. y col. Gastroenterology, 125 (2003) pág. 1808-1817, una publicación de los inventores de la presente invención, la Solicitud de Patente Internacional WO2004/104198 (Documento de Patente 3), y así sucesivamente.

En el procedimiento de análisis filogenético que usa secuencias nucleotídicas de una cepa del VHC, el VHC se clasifica en seis tipos: genotipos 1a, 1b, 2a, 2b, 3a y 3b. Cada uno de estos tipos se clasifica adicionalmente en varios subtipos. Se han determinado las secuencias nucleotídicas de longitud completa de los genomas del VHC de algunos genotipos (Simmonds, P. y col., Hepatology, 10 (1994) pág. 1321-1324; Choo, Q.L y col., Science, 244 (1989) pág. 359-362; Okamoto, H. y col., J. Gen. Virol., 73 (1992) pág. 673-679; Mori, S. y col., Biochem. Biophys. Res. Commun. 183 (1992) pág. 334-342; y la Solicitud de Patente Internacional WO2004/104198).

Los ejemplos específicos de las cepas del VHC de genotipo 1a incluyen la cepa H77c (secuencia consenso de la cepa H77: número de acceso del GenBank AF011751), la cepa 1 (número de acceso del GenBank M62321), la cepa H (número de acceso del GenBank M67463), la cepa HC-J1 (número de acceso del GenBank D10749), y así sucesivamente. Los ejemplos específicos de las cepas del VHC de genotipo 1b incluyen la cepa J1 (número de

acceso del GenBank D89815), la cepa con1 (número de acceso del GenBank AJ238799, puede denominarse como la cepa Con-1), la cepa TH (Wakita, T. y col., J. Biol. Chem., 269 (1994) pág. 14205-14210), la cepa J (número de acceso del GenBank D90208), la cepa JT (número de acceso del GenBank D01171), la cepa BK (número de acceso del GenBank M58335), y así sucesivamente. Los ejemplos específicos de las cepas del VHC de genotipo 2a incluyen la cepa JFH1 (número de acceso del GenBank AB047639, puede denominarse como la cepa JFH-1), la cepa HC-J6 (número de acceso del GenBank D00944), la cepa JCH1 (número de acceso del GenBank AB047640), la cepa J6CF (número de acceso del GenBank AF177036), y así sucesivamente. Los ejemplos específicos de las cepas del VHC de genotipo 2b incluyen la cepa HC-J8 (número de acceso del GenBank D01221) y así sucesivamente. Los ejemplos específicos de las cepas del VHC de genotipo 3a incluyen la cepa NZL1 (número de acceso del GenBank D17763), la cepa K3a/650 (número de acceso del GenBank D28917), la cepa 452 (número de acceso del GenBank DQ437509), la cepa E-b1 (Chan, S. y col., J. Gen. Virol., 73 (1992) pág. 1131-1141), y así sucesivamente. Los ejemplos específicos de las cepas del VHC de genotipo 3b incluyen la cepa Tr (Chayama, K. y col., J. Gen. Virol., 75 (1994) pág. 3623-3629) y así sucesivamente. Además, también se ha indicado ya una lista de números de acceso del GenBank para otras cepas (Tokita, T. y col., J. Gen. Virol. 79 (1998) pág. 1847-1857; Cristina J. & Colina R. Virology Journal, 3 (2006) pág. 1-8).

Los elementos que constituyen el replicón de ARN subgenómico del VHC usado en la presente invención (específicamente, la región no traducida 5', NS3, NS4A, NS4B, NSSA, NS5B y la región no traducida 3') se obtienen a partir de una cepa con1 de genotipo 1b o subtipos de la misma, de manera que el replicón de ARN subgenómico del VHC pueda construirse de forma que pueda replicarse en una célula. Se aprecia que la presente invención es un procedimiento para producir una partícula recombinante similar al virus de la hepatitis C que tiene la propiedad de infectar pero la propiedad de transmitir, y el replicón de ARN de la presente invención no incluye genes que codifiquen las proteínas estructurales del VHC (Core, E1, E2 y p7) para eliminar la propiedad de transmisión de la partícula similar al virus producida.

Los elementos que se han mencionado anteriormente pueden obtenerse a partir de la misma cepa del VHC o pueden estar en forma combinada, es decir, una quimera obtenida a partir de dos o más cepas del VHC diferentes. Las cepas del VHC preferidas para el punto (ii) anterior incluyen al menos una cepa seleccionada entre el grupo que consiste en cepas del VHC de genotipos 1b y 2a, y son más preferidas la cepa con1, una cepa del VHC de genotipo 1b, y la cepa JFHI, una cepa del VHC de genotipo 2a. La cepa del VHC en la presente invención puede ser una cepa aislada resultado de la mutación natural o artificial en la cepa con1 o la cepa JFHI como una cepa parental en la que se cambia al menos el genotipo de la de la cepa parental (derivado). En este momento, el rasgo fenotípico puede ser el mismo que o diferente del rasgo de la cepa parental, pero se prefiere una cepa que tenga el mismo rasgo.

Los ejemplos del replicón de ARN subgenómico del VHC incluyen un replicón de ARN subgenómico del VHC que tiene la región no traducida 5', la secuencia que codifica las proteínas NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B, y la región no traducida 3' de la cepa con1 del VHC (genotipo 1b, número de acceso del GenBank AJ238799, Lohmann, V. y col., Science 285 (1999) pág. 110-113), Además, pueden incluirse un gen extraño deseado y una secuencia del IRES entre la región no traducida 5' y la secuencia que codifica la proteína NS3 de estos replicones de ARN subgenómicos del VHC.

La región no traducida 5', la secuencia de proteínas estructurales (Core, E1, E2 y p7), las proteínas no estructurales (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B), la región no traducida 3', y otros sitios en el ARN genómico del VHC pueden definirse usando la secuencia de ADNc genómico de longitud completa, por ejemplo, correspondiente al ARN genómico de la cepa JFH1, una cepa del VHC de genotipo 2a (Solicitud de Patente Japonesa (Kokai) N° 2002-171978 A) (número de acceso del GenBank AB047639, Kato, T. y col., Gastroenterology, 125 (2003) pág. 1808-1817, SEC ID N°: 10. La secuencia aminoacídica codificada también se muestra en la SEC ID N°: 11) como referencia.

Por ejemplo, en el ADNc genómico de longitud completa obtenido a partir de la cepa JFH1, la región no traducida 5' que puede usarse como un elemento del replicón de ARN subgenómico del VHC de la presente invención se muestra por las posiciones de los nucleótidos 1 a 340 de la secuencia nucleotídica de la SEC ID N°: 10, la región codificante de la proteína Core a la proteína p7 (Core, E1, E2 y p7) se muestra por las posiciones de los nucleótidos 341 a 2779, y la región codificante de la proteína NS3 a la región no traducida 3' (NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B y 3'UTR) se muestra por los números de nucleótidos 3431 a 9678. La región dentro del ADNc genómico obtenido a partir de otras cepas del VHC puede identificarse por comparación con las secuencias de estas regiones obtenidas a partir de la cepa JFH1.

Un replicón de ARN subgenómico del VHC puede sintetizarse con una ARN polimerasa dependiente de ADN usando un vector en el que el ADN complementario al ARN subgenómico del VHC se clona en la dirección 3' de un promotor para la transcripción de ARN de la secuencia de ADN. Los ejemplos del promotor para la transcripción de ARN de la secuencia de ADN incluyen T7, T3, SP6, y así sucesivamente, y se prefiere el promotor T7. Un ARN subgenómico del VHC puede sintetizarse por polimerasa T7. Una célula en la que un replicón de ARN subgenómico del VHC se replica de forma autónoma puede prepararse introduciendo el ARN subgenómico del VHC sintetizado de esta manera en una célula que permite la propagación del VHC.

Los ejemplos preferidos de la célula incluyen células animales, tales como, por ejemplo, células de vertebrados que incluyen células de peces, reptiles, anfibios, aves y mamíferos, y son las más preferidas las células de mamíferos. Los ejemplos adicionales de la célula incluyen células normales obtenidas del hígado, el cuello del útero y los riñones fetales, células de tumor, líneas celulares establecidas de las mismas, y así sucesivamente. Los ejemplos de las mismas incluyen células, tales como Huh7, HepG2, IMY-N9, HeLa y HEK293 (Date, T. y col., J. Biol. Chem., 279 (2004) pág. 22371-22376, Ito, T. y col., Hepatology 34 (2001) pág. 566-572), y Huh7, HepG2, y se prefieren clones obtenidos a partir de estas células.

Los ejemplos de otros procedimientos para replicar el ARN subgenómico del VHC en células cultivadas incluyen sistemas que utilizan ADNc del VHC sin usar un replicón de ARN. Cuando se expresa ADNc del VHC usando un promotor de ARN polimerasa de tipo 11, la estructura CASQUETE se añade al extremo 5' del ARN transcrito, y la cadena poliA se añade al extremo 3'. Por lo tanto, el ARN transcrito se usa como una plantilla para la síntesis de proteínas en el ribosoma, y la replicación del ARN genómico del VHC no tiene lugar. Para resolver este problema, Heller y col. prepararon un vector de ADN ligando una secuencia de ribozimas a los extremos 5' y 3' del genoma del VHC y que permitía que la ribozima escindiera el ADN transcrito por el ARN polimerasa II en una célula, de forma que el ARN del VHC al que no se añade CASQUETE o poliA pueda sintetizarse en la célula (Heller T y col. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 102 (2005) pág. 2579-2583). Una célula en la que un replicón de ARN subgenómico del VHC se replica puede obtenerse introduciendo este vector en una célula.

De acuerdo con otro procedimiento, una célula en la que se replica un replicón de ARN subgenómico del VHC puede obtenerse clonando el ADN complementario al ARN subgenómico del VHC en un vector que tenga un sistema promotor/terminador de ARN polimerasa I e introduciendo el vector en una célula que permita la propagación del VHC. Más específicamente, puede usarse pHH21 (Neumann G. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96 (1999) pág. 9345-9350). pHH21 es un vector que comprende el promotor de ARN polimerasa I humano como promotor, y el terminador de ARN polimerasa I de ratón como terminador. Cuando se añade la secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción *BsmBI* a los extremos 5' y 3' del ADNc complementario a un replicón de ARN subgenómico del VHC por PCR, el ADNc se digiere con *BsmBI*, el genoma del VHC se inserta en el sitio *BsmBI* de pHH21, y el genoma del VHC puede ligarse sin secuencias nucleotídicas adicionales entre el promotor/terminador y el genoma del VHC.

Un replicón de ARN subgenómico del VHC o un vector, tal como un vector que expresa el replicón de ARN subgenómico del VHC puede introducirse en una célula usando cualquier técnica conocida por los expertos en la técnica. Los ejemplos de dichas técnicas de introducción incluyen electroporación, pistola de partículas, lipofección, procedimiento de fosfato cálcico, microinyección, procedimiento de DEAE dextrano, y así sucesivamente.

En la presente invención, una célula en la que se replica el replicón de ARN subgenómico del VHC de la presente invención puede prepararse de acuerdo con las descripciones anteriores. Ya que un replicón de ARN de este tipo se replica de forma autónoma continuamente en la célula, una cierta cantidad del mismo se mantiene incluso en una célula sujeta a degradación de ARN. Por lo tanto, el replicón de ARN puede mantenerse en una célula en la que se introduce el replicón de ARN subgenómico del VHC de la presente invención, un vector que expresa el replicón de ARN subgenómico del VHC como se ha descrito anteriormente. En la presente invención, "célula portadora de un replicón de ARN" significa que el replicón de ARN existe en la célula de forma no transitoria pero continuamente en una cantidad significativa debido a la capacidad de replicación de manera autónoma del mismo.

De acuerdo con el procedimiento de la presente invención, puede producirse una partícula similar al virus en la que se empaqueta un replicón de ARN subgenómico del VHC, introduciendo un vector que expresa las proteínas estructurales del VHC descritas a continuación en una célula portadora del replicón de ARN subgenómico del VHC de la presente invención.

3. Construcción del vector que expresa la proteína estructural del VHC

En el procedimiento de la presente invención, es preferible expresar los genes de las proteínas estructurales del VHC en una célula portadora de un replicón de ARN subgenómico del VHC para suministrar la proteína estructural del VHC.

Las proteínas estructurales del VHC consisten en Core, E1, E2 y p7. Los genes que codifican estas proteínas para suministrar la proteína estructural del VHC no se limitan por los genotipos del VHC, y cada uno de los genes puede obtenerse a partir de la misma cepa del VHC o pueden estar en forma combinada (quimera) obtenidos a partir de dos o más cepas del VHC diferentes. Es suficiente con que los genes de las proteínas estructurales del VHC se definan de acuerdo con la reivindicación 1. Las cepas del VHC preferidas para el punto (ii) anterior son al menos una cepa vírica seleccionada entre el grupo que consiste en 1a, 2a, 3a y 3b, y las cepas más preferidas del VHC son al menos una cepa vírica seleccionada entre el grupo que consiste en cepas del VHC de genotipo 1b y 2a. Las cepas víricas más preferidas incluyen aquellas de al menos un tipo seleccionado entre el grupo que consiste en cepas de genotipo 1a, tales como H77c, 1, H y HC-J1, cepas de genotipo 1b, tales como J1, con1, TH, J, JT y BK, y cepas de genotipo 2a, tales como JFH1, HC-J6, JCH1 y J6CF. Son más preferidas la cepa H77 de genotipo 1a, la cepa J1 de

genotipo 1b y la cepa JFH1 de genotipo 2a. Es mucho más preferida la cepa JFH1 (número de acceso del GenBank AB047639, Kato, T. y col., *Gastroenterology*, 125 (2003) pág. 1808-1817).

El procedimiento para expresar estas proteínas puede ser cualquier procedimiento, siempre y cuando sea un procedimiento mediante el cual puedan expresarse en una célula, preferiblemente una célula animal, más preferiblemente una célula de mamífero. Se prefiere un procedimiento que usa un vector de expresión en el que se incorporen los genes que se han mencionado anteriormente.

En el procedimiento preferido de la presente invención, se introduce un vector que expresa las proteínas estructurales del VHC (preferiblemente, un vector de expresión que incluye los genes de las proteínas estructurales del VHC de manera expresable bajo el control de un promotor) en una célula portadora del replicón de ARN subgenómico del VHC que se ha descrito en la sección 2 anterior, y se expresa para suministrar las proteínas estructurales del VHC.

Los ejemplos del vector de expresión incluyen CDM8, pEF1/Myc-His1,2,3, pEF4/Myc-His1,2,3, pcDNA3.1, pREP4, pCEP (todos disponibles en Invitrogen Corporation), pCI-neo (Promega Corporation), y así sucesivamente. También puede usarse pcDNA5/TO (Invitrogen Corporation), que incluye un promotor cuya expresión puede regularse por tetraciclina. El promotor no se limita, siempre y cuando pueda expresar los genes en una célula animal, y los ejemplos del mismo incluyen el promotor temprano inmediato (IE) del citomegalovirus, el promotor temprano o tardío de SV40, el promotor de la metalotioneína, el promotor retroviral, el promotor de choque térmico, el promotor SRa, promotor del factor de elongación 1α , promotor de la albúmina, y así sucesivamente.

Además, los ejemplos de vectores disponibles incluyen vectores víricos. Los vectores víricos no se limitan siempre y cuando puedan infectar una célula animal y expresar un gen extraño deseado, y los ejemplos preferidos de los mismos incluyen un vector retroviral, un vector de adenovirus, un vector del virus *Sindbis*, y un vector del virus vaccinia. En particular, se prefiere el vector del virus vaccinia, ya que el vector del virus vaccinia puede expresar una gran cantidad de producto génico (Elroy-Stein, O., y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86 (1989) pág. 6126-6130).

Es preferible que el vector que expresa la proteína estructural del VHC usado en el procedimiento de la presente invención incluya el gen de la proteína Core, el gen de la proteína E1, el gen de la proteína E2 y el gen de la proteína p7 como genes de proteínas estructurales del VHC de manera que puedan expresarse en la célula huésped. Los ejemplos un vector que expresa una proteína estructural del VHC de este tipo de la presente invención incluyen vectores que incluyen el gen de la proteína Core, el gen de la proteína E1, el gen de la proteína E2 y el gen de la proteína p7 bajo el control de un promotor que puede expresar los genes insertados. En la presente invención, el vector portador de un promotor del factor de elongación 1α , en el que se insertan el gen de la proteína Core, el gen de la proteína E1, el gen de la proteína E2 y el gen de la proteína p7 bajo el control del promotor del factor de elongación 1α (EF- 1α), puede usarse como un vector que expresa una proteína estructural del VHC particularmente preferida. Aquí, la expresión "vector portador del promotor del factor de elongación 1α " significa un vector que incluye la secuencia promotora del gen del factor de elongación 1α (promotor de EF- 1α : Mizushima y col., *Nucleic Acids Res.*, 18 (1990) pág. 5322) situada de manera que los genes bajo el control del mismo pueda expresarse en la célula huésped. Los ejemplos de los mismos incluyen pEF1/Myc-His1,2,3 y pEF4/Myc-His1,2,3 (ambos disponibles en Invitrogen Corporation).

Otro ejemplo preferido del vector que expresa la proteína estructural del VHC de la presente invención es un vector del virus vaccinia que comprende el gen de la proteína Core, el gen de la proteína E1, el gen de la proteína E2 y el gen de la proteína p7 de manera expresable (vector recombinante del virus vaccinia). Preferiblemente, pueden usarse cepas del virus vaccinia, tales como, por ejemplo, las cepas DIs, WR y IBTd (Meis, RJ & Condit, RC. *Virol.* 182 (1992) pág. 442-454) para la preparación de un vector recombinante del virus vaccinia. El procedimiento para preparar un vector recombinante del virus vaccinia también se describe en detalle en los ejemplos descritos más adelante. En resumen, un vector recombinante del virus vaccinia deseado puede producirse clonando los genes de proteínas estructuras del VHC que se han mencionado anteriormente bajo el control de un promotor del virus vaccinia, tal como p.7.5 en un vector de transferencia del virus vaccinia, introduciendo adicionalmente el vector de transferencia en una célula infectada por el virus vaccinia mediante electroporación o similares, cultivando la célula para producir partículas víricas, y además seleccionando preferiblemente el virus y purificándolo. Un vector del virus vaccinia de este tipo puede prepararse en forma de una partícula recombinante similar al virus.

Ya que las proteínas estructurales del VHC (Core, E1, E2, p7) y las proteínas no estructurales (NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B) se traducen desde la región traducida como una poliproteína, se someten a una digestión limitada con proteasa, se liberan y se producen, es preferible expresar estas proteínas estructurales del VHC como una poliproteína de Core, E1, E2 y p7 en un tramo continuo, pero estas proteínas pueden expresarse por vectores de expresión separados.

Si las proteínas estructurales se expresan en una célula en la que se introducen un vector que expresa una proteína estructural pueden detectarse haciendo reaccionar una solución de cultivo celular o proteínas extraídas de las células con anticuerpos contra las proteínas estructurales (documento WO2004/104198).

Específicamente, por ejemplo, una muestra de proteínas extraída de las células se fracciona por electroforesis en gel de poliacrilamida SDS, se somete a transferencia sobre una membrana de nitrocelulosa, y se hace reaccionar con un anticuerpo de proteína anti-VHC (por ejemplo, anticuerpo o antisuero específico anti-Core recogido de un paciente con hepatitis C), y el anticuerpo puede detectarse (mediante transferencia de western).

Como alternativa, las células que expresan las proteínas del VHC se inmunotiñen usando un anticuerpo similar, y puede confirmarse la expresión y la localización intracelular de estas proteínas.

4. Empaquetamiento del replicón de ARN subgenómico del VHC en una partícula

En el procedimiento de la presente invención, una partícula similar a un virus, en la que un replicón de ARN subgenómico del VHC se empaqueta por las proteínas estructurales, se produce en una célula suministrando un vector que expresa las proteínas estructurales del VHC en una célula portadora del replicón de ARN subgenómico del VHC.

Para empaquetar en una partícula vírica un replicón de ARN subgenómico del VHC en una célula en la que el replicón de ARN subgenómico del VHC se replica, un vector que expresa las proteínas estructurales (Core, E1, E2 y p7) puede introducirse en la célula y puede expresarse. Como alternativa, el ARN subgenómico del VHC puede introducirse en una célula en la que las proteínas estructurales (Core, E1, E2 y p7) se expresan de forma estable.

Los ejemplos de un procedimiento de introducción de este tipo incluyen procedimientos conocidos, tales como electroporación, pistola de partículas, lipofección, procedimiento de fosfato cálcico, microinyección y procedimiento de DEAE dextrano.

5. Producción de la partícula recombinante similar al virus VHC

La célula portadora de un replicón de ARN subgenómico del VHC preparada como se ha descrito anteriormente en la que los genes de la proteína estructural del VHC (Core, E1, E2 y p7) se introducen y se expresan (célula productora de una partícula recombinante similar al VHC) puede producir una partícula recombinante similar al virus. La partícula recombinante similar al VHC producida tiene capacidad de infectar y capacidad de replicar el ARN subgenómico del VHC. Sin embargo, no tiene la propiedad de transmisión (capacidad de transmisión), ya que la célula infectada no puede producir una partícula vírica hija.

Por lo tanto, una partícula recombinante similar al VHC puede prepararse en un sistema de cultivo celular cultivando la célula productora de la partícula recombinante del VHC de la presente invención. La partícula similar al VHC puede obtenerse preferiblemente cultivando células productoras de la partícula recombinante similar al VHC y recuperando la partícula similar al virus producida en el cultivo (preferiblemente una solución de cultivo). Puede recuperarse una partícula similar al virus de la solución de cultivo que se ha mencionado anteriormente mediante técnicas tales como, por ejemplo, centrifugación por gradiente de densidad de sacarosa.

La capacidad de producción de la partícula vírica de la célula productora de la partícula recombinante similar al VHC de la presente invención puede confirmarse por cualquier procedimiento de detección de virus conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la capacidad de producir una partícula vírica puede determinarse fraccionando una solución de cultivo de células que aparecen para producir una partícula similar al virus por gradiente de densidad de sacarosa, y midiendo la densidad de cada fracción y la concentración de la proteína Core del VHC o el replicón de ARN del VHC en la fracción para observar si la gravedad específica coincide con la gravedad específica conocida del VHC. Además, cuando la densidad de una fracción en la que se detecta un pico de la proteína Core es inferior a la densidad de la fracción obtenida fraccionando la solución de cultivo después del tratamiento con NP40 al 0,25% (polioxietileno(9) octilfenil éter), puede determinarse que la célula tiene la capacidad de producir una partícula similar al virus.

Además, puede determinarse si una partícula similar al virus en una célula productora de la partícula recombinante similar al VHC tiene la capacidad de infectar mediante la detección del fenotipo de un gen extraño que exista en un ARN subgenómico del VHC empaquetado en la partícula vírica. Por ejemplo, puede evaluarse si el gen extraño es un gen de resistencia al fármaco inoculando la partícula vírica en una célula permisiva del VHC, cultivando normalmente durante 2 a 3 semanas en presencia de este fármaco, y contando los clones resistentes al fármaco.

Además, esto puede confirmar que una partícula similar al virus en una célula productora de la partícula recombinante similar al VHC no produce una partícula vírica hija en una célula infectada, mediante la transferencia de western que se ha descrito anteriormente o similares, si las proteínas estructurales del VHC existen en un extracto de la célula infectada, preferiblemente una muestra de sobrenadante del cultivo celular infectado.

Una partícula vírica recombinante similar al VHC producida por el procedimiento de la presente invención tiene la capacidad de infectar una célula (preferiblemente una célula permisiva del VHC). También se proporciona un procedimiento para producir una célula infectada con el virus de la hepatitis C recombinante que comprende las

etapas de cultivar una célula productora de la partícula recombinante similar al VHC y dejar que una partícula similar al virus en el cultivo obtenido (preferiblemente caldo de cultivo) infecte a otra célula (preferiblemente célula permisiva del VHC). Aquí, la célula permisiva del VHC es una célula que tiene la capacidad de replicar ARN genómico del VHC y/o de infectarse por el VHC, y no se limita a estos ejemplos. Los ejemplos específicos de células hepáticas incluyen hepatocitos primarios, célula Huh7, célula HepG2, célula IMY-N9, célula HeLa, y así sucesivamente. Los ejemplos específicos de células linfoides incluyen la célula Molt4, la célula HPB-Ma, la célula Daudi, y así sucesivamente. Sin embargo, las células hepáticas y linfoides no se limitan a estos ejemplos.

Para un entendimiento más fácil, los procedimientos de producción de la partícula recombinante similar al VHC que se han explicado en las secciones 2 a 5 anteriores se muestran esquemáticamente en la figura 1.

6. Vector para introducción génica

La partícula recombinante similar al VHC de la presente invención producida por el procedimiento de la presente invención se caracteriza porque tiene en el genoma de ARN una secuencia nucleotídica que comprende la región no traducida 5', la secuencia nucleotídica que codifica las proteínas NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B, y la región no traducida 3', obtenida a partir de las cepas del VHC que se han mencionado anteriormente (al menos una cepa vírica seleccionada entre los genotipos 1a, 1b, 2a, 2b, 3a y 3b, preferiblemente 1b y 2a, tales como, por ejemplo, la cepa con1 de genotipo 1b y la cepa JFH1 de genotipo 2a).

Además, la partícula recombinante similar al VHC de la presente invención tiene una característica de interés, que cuando se deja que la partícula similar al VHC producida en una célula productora de la partícula recombinante similar al VHC mediante el procedimiento de la presente invención infecte una célula (por ejemplo, una célula permisiva del VHC que se ha descrito anteriormente como ejemplo), el ARN subgenómico del VHC que se ha mencionado anteriormente se replica en la célula infectada, pero no se forma una partícula vírica hija.

La partícula recombinante similar al VHC de la presente invención puede usarse como un vector para la introducción/expresión génica insertando un gen extraño deseado en un replicón de ARN subgenómico del VHC empaquetado en el mismo. Dicha partícula vírica recombinante similar al VHC de la presente invención que comprende un gen extraño puede prepararse preparando un replicón de ARN subgenómico del VHC en el que el gen extraño se inserta entre la región no traducida 5' y la secuencia del IRES y se empaqueta mediante el procedimiento que se ha mencionado anteriormente de la presente invención. Ya que la partícula del VHC producida en la célula productora de la partícula recombinante del VHC no tiene capacidad de transmisión, puede usarse como un vector para la introducción génica dirigida a células o tejidos hepáticos o linfoides.

Debido a que no se incorpora un ARN subgenómico del VHC empaquetado en una partícula vírica mediante el procedimiento de producción de la partícula vírica de la presente invención en el genoma cromosómico en una célula permisiva del VHC infectada por la partícula similar al virus de la presente invención, esto tiene la ventaja de que los genes normales no se dañan o los genes en la proximidad del sitio de inserción no se activan por la inserción génica.

Debido a las características que se han mencionado anteriormente, el vector de la presente invención puede usarse, por ejemplo, para terapia génica o construcción de animales transgénicos introduciendo un gen extraño.

Los ejemplos del gen extraño (o ácido nucleico extraño) que se van a introducir en un replicón de ARN subgenómico del VHC y se van a empaquetar en una partícula vírica incluyen, pero sin limitación, genes que codifican proteínas obtenidas a partir de mamíferos, incluyendo seres humanos, por ejemplo, diversas proteínas implicadas en enfermedades, tales como proteínas, polipéptidos, o péptidos, incluyendo, por ejemplo, enzimas, citocinas, quimicinas, hormonas, anticuerpos, moléculas inmunorreguladoras, proteínas supresoras de tumor, factores de crecimiento, proteínas de membrana y proteínas vasoactivas; ácidos nucleicos terapéuticos, tales como ARN antisentido y ARNs que inhiben o suprimen la traducción de proteínas, y así sucesivamente.

Las células o tejidos susceptibles al VHC diana son células o tejidos de mamíferos, tales como, por ejemplo, células o tejidos hepáticos y linfoides humanos. El vector de la presente invención se deja actuar sobre las células o tejidos diana en condiciones *in vivo*, *in vitro* o *ex vivo*. Preferiblemente, el vector de la presente invención puede usarse para el tratamiento de seres humanos, por ejemplo, terapia génica, tratamiento de cáncer (por ejemplo, cáncer de hígado, linfoma, etc.), y similares.

El contenido de la memoria descriptiva y/o los dibujos de la Solicitud Japonesa N° 2005-287825, a la que la presente solicitud reivindica prioridad, se incluyen en la presente memoria descriptiva.

Ejemplos

La presente invención se explicará más específicamente con referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos son únicamente para ilustración, y el alcance de la presente invención no se limita a estos ejemplos.

Ejemplo 1

Preparación de la célula portadora de un replicón

5 El ADN plasmídico pSGR-JFH1 (diagrama del medio de la figura 2) se construyó reemplazando parte de las regiones estructurales y las regiones no estructurales con el gen de resistencia a neomicina (neo: también denominado como gen de neomicina fosfotransferasa) y IRES del VEMC (sitio de entrada interno del ribosoma del virus de la encefalomiocarditis) en pJFH1 que se ha preparado insertando ADN que contiene ADNc genómico de longitud completa de la cepa JFH-1 (genotipo 2a), una cepa del virus de la hepatitis C aislada de un paciente con hepatitis fulminante (clone JFH-1: número de acceso del GenBank AB047639) en el promotor en la dirección 3' del promotor T7 en el plásmido pUC19. Este procedimiento de construcción se realizó de acuerdo con un informe previo (Lohmann y col., Science, 285 (1999) pl 10-113).

15 Específicamente, el plásmido pJFH1 se digirió con enzimas de restricción *AgeI* y *Clal*, y una secuencia 5'NTR derivada de pJFH1 para la región Core y el gen de resistencia a neomicina derivado de pRSV5NEO se ligaron a los sitios de escisión mediante amplificación por PCR, un fragmento digerido con las enzimas de restricción *AgeI* y *PmeI* y una secuencia de IRES del VEMC a la región NS3 se ligaron mediante amplificación por PCR, y un fragmento digerido con las enzimas de restricción *PmeI* y *Clal* se insertó y se ligó.

20 Posteriormente, pSGR-JFH1 se digirió con la enzima de restricción *XbaI*. Después, se trataron adicionalmente de 10 a 20 µg de estos fragmentos digeridos con *XbaI* por incubación usando 20 unidades nucleasa S1 de *Aspergillus* (volumen total de la mezcla de reacción, 50 µl) a 30 °C durante 30 minutos. Nucleasa S1 de *Aspergillus* es una enzima que cataliza una reacción para degradar selectivamente una porción de hebra sencilla en un ADN de doble hebra. Normalmente, cuando se sintetiza ARN usando el fragmento digerido con *XbaI* que se ha mencionado anteriormente, ya que es como una plantilla, se sintetiza un replicón de ARN con cuatro nucleótidos extra de CTGA, que es una parte de la secuencia de reconocimiento de *XbaI*, añadidos al extremo 3'. Por consiguiente, en este ejemplo, tratando los fragmentos digeridos con *XbaI* con nucleasa S1 de *Aspergillus*, se eliminaron cuatro nucleótidos de CTGA del fragmento digerido con *XbaI*. Posteriormente, para obtener una plantilla de ADN, una solución que contenía el fragmento digerido con *XbaI* tratado con nucleasa S1 de *Aspergillus* se sometió a un tratamiento de eliminación de proteínas de acuerdo con un procedimiento convencional para purificar el fragmento digerido con *XbaI* a partir del cual se eliminaron cuatro nucleótidos de CTGA.

Posteriormente, se sintetizó ARN *in vitro* mediante T7 ARN polimerasa usando esta plantilla de ADN. Para esta síntesis de ARN, se usó el MEGAscript de Ambion. Se hicieron reaccionar 20 µl de la mezcla de reacción que contenía de 0,5 a 1,0 µg de plantilla de ADN de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Después de la finalización de la síntesis de ARN, a la solución de reacción se le añadió DNasa (2 unidades), se hizo reaccionar a 37 °C durante 15 minutos, y después la extracción de ARN se realizó adicionalmente con fenol ácido para eliminar la plantilla de ADN.

40 Se mezclaron de 0,01 ng a 10 µg de este ARN (replicón de ARN) con un ARN celular total extraído de la célula Huh7 y se ajustó de forma que la cantidad de ARN total fuera 10 µg. Después, el ARN mezclado se introduce en la célula Huh7 por electroporación. Las células Huh7 electroporadas se sembraron en una placa de cultivo y se cultivaron durante 16 a 24 horas, y después a la placa de cultivo se le añadió G418 (neomicina) a diversas concentraciones. Después, el cultivo continuó mientras se reemplazaba el medio de cultivo dos veces a la semana. Las colonias de células viables se clonaron de la placa de cultivo después de 21 días del cultivo que se ha mencionado anteriormente, y el cultivo continuó. Pueden establecerse algunas cepas de clones de células clonando dichas colonias. Una cepa celular portadora del replicón de ARN subgenómico del VHC se denominó como 1H4.1.

50 Además, también se usó para los experimentos la célula 5-15, una cepa celular portadora de un replicón de ARN subgenómico del VHC (número de acceso del GenBank, AJ242654; I₃₈₉/NS3-3'/wt en la columna inferior de la figura 2) preparada a partir del ADNc del genoma de longitud completa de la cepa Con-1 del genotipo 1b del VHC de la misma manera que se ha descrito anteriormente, que se preparó introduciendo este replicón de ARN en la cepa celular Huh7 (Lohmann y col., Science, 285 (1999) pág. 110-113).

Ejemplo 2

Preparación de un vector que expresa una proteína estructural

60 1) Vector plasmídico que expresa una proteína estructural

Una región que incluye genes de región estructural (posiciones de los nucleótidos: 249 a 2781) de la cepa JFH1 aislada de un paciente con hepatitis fulminante (número de acceso del GenBank AB047639) (Kato T. y col., J. Med. Virol. 64 (2001) pág. 334-339) se amplificó por PCR. Este fragmento de ADN se digirió con *NheI* y *EcoRI* y, por lo tanto, un fragmento obtenido que contenía los genes estructurales se purificó por electroforesis en gel de agarosa y

se cortó con los extremos romos por ADN polimerasa. Este ADNc de extremos romos se insertó en la dirección 3' de la secuencia promotora CAG (CAG) en un vector plasmídico. De forma análoga, el ADNc que se ha mencionado anteriormente que contenía los genes de región estructural obtenidos mediante la digestión con *NheI* y *EcoRI* se insertó entre los sitios de reconocimiento *SpeI* y *EcoRI* en pEF4/Myc-His (Invitrogen Corporation), un vector portador de la secuencia promotora génica del factor de elongación 1 α (promotor EF-1 α : Mizushima y col., Nucleic Acids Res., 18 (1990) pág. 5322). Los plásmidos obtenidos resultantes se denominaron como pCAGC-p7JFH1 y pEF4C-p7JFH1, respectivamente (figura 3).

2) Proteínas estructurales que expresan el vector recombinante del virus vaccinia

Para preparar un vector que contiene los genes estructurales de la cepa JFH1 y que puede expresar las proteínas codificadas mediante estos genes, en primer lugar, pEF4C-p7JFH1 mostrado en el diagrama superior de la figura 3 se digirió con enzimas de restricción *BamHI* y *EcoRI*, y la región codificante de las proteínas Core, E1 E2 y p7 se fraccionó mediante electroforesis en gel de agarosa. Posteriormente, este fragmento se ligó a un vector de transferencia del virus vaccinia pDisgptmH5 que se designa para que el gen xantina-guanina fosforribosil transferasa (XGPRT) se inserte junto con un gen extraño de interés (Ohnishi, K. y col., Jap. J. Infect. Dis. 58 (2005) pág. 88-94; Ishii, K. y col., Virology 302 (2002) pág. 433-444). Este pDisgptmH5 es un vector de transferencia en el que el gen XGPRT de *Escherichia coli* se incorpora bajo el control del promotor p7.5 del virus vaccinia insertado en un sitio de clonación del vector pUc/DIs (Ishii, K. y col., Virology 302 (2002) pág. 433-444). El vector obtenido se denominó como pDisJFHst.

Se preparó un vector que comprende los genes estructurales de la cepa H77c y que puede expresar las proteínas codificadas por estos genes mediante el siguiente procedimiento. En primer lugar, se clonó un vector en el que el ADNc genómico del VHC de la cepa H77c (número de acceso del GenBank AF011751) como plantilla, se añadieron 5 μ l de tampón 10 x acompañados por el kit LA-PCR (Takara Bio Inc.), 5 μ l de una mezcla dNTP 2,5 mM, y 1 μ l de cada uno del cebador directo H77/J1 10 μ M (AAAGATCTGCGAAAGGCCTTGTTGGTACTGC: SEC ID N°: 1) y el cebador inverso H77 (AAGAGCTCTCATAACCCGACAAGAACAACGCCGCC: SEC ID N°: 2), y finalmente se añadió agua desionizada para preparar 49 μ l de volumen total. Después, se añadió 1 μ l de Takara LA Taq (Takara Bio Inc.) y se realizó la reacción por PCR. La reacción por PCR se realizó en las siguientes condiciones: 25 ciclos de 98 °C durante 20 segundos y 68 °C durante 5 minutos (por un ciclo). Cuando una parte de los productos por PCR se sometió a electroforesis sobre un gel de agarosa, se confirmó un producto de amplificación de aproximadamente 2,5 kb.

Por consiguiente, se realizó una reacción de ligación usando 2 μ l de productos de PCR para ligar un producto de amplificación a un vector plasmídico. Se transformó *Escherichia coli* con este producto de ligación de acuerdo con un procedimiento convencional, y se preparó ADN plasmídico usando el transformante obtenido. Este ADN plasmídico se digirió con enzimas de restricción que pueden eliminar el fragmento de ADN insertado en el ADN plasmídico y se sometió a electroforesis en gel de agarosa para confirmar que se insertó un fragmento de ADN de 2,5 kb en el ADN plasmídico. La secuencia nucleotídica del fragmento de ADN insertado se determinó mediante un procedimiento convencional. Como resultado, se descubrió que la secuencia nucleotídica determinada coincidía con la secuencia de las posiciones nucleotídicas 271 a 2819 en la secuencia nucleotídica con el número de acceso del GenBank AF011751. Posteriormente, este ADN plasmídico se digirió con *BglI* y *SacI* y se sometió a electroforesis de agarosa para aislar un fragmento de ADN que contenía la región génica estructural de la cepa H77c, que se ligó al vector de transferencia del virus vaccinia pDisgptmH5 (Ohnishi, K. y col., Jap. J. Infect Dis. 58 (2005) pág. 88-94; Ishii, K. y col., Virology 302 (2002) pág. 433-444). El vector obtenido como resultado se denominó pDisH77st.

Se preparó un vector que comprende los genes estructurales de la cepa J1 y que puede expresar las proteínas codificadas por estos genes mediante el siguiente procedimiento. En primer lugar, se clonó un vector en el que el ADNc genómico del VHC de la cepa J1 (número de acceso del GenBank D89815) como plantilla, se añadieron 5 μ l de tampón 10 x acompañados por el kit LA-PCR (Takara Bio Inc.), 5 μ l de una mezcla dNTP 2,5 mM, y 1 μ l de cada uno del cebador directo H77/J1 10 μ M (AAAGATCTGCGAAAGGCCTTGTTGGTACTGC: SEC ID N°: 1) y el cebador inverso J1 (AAGAGCTCTCATAGACCTACAAAAACCCGCGCTCC: SEC ID N°: 3), y finalmente se añadió agua desionizada para preparar 49 μ l de volumen total. Después, se añadió 1 μ l de Takara LA Taq (Takara Bio Inc.) y se realizó la reacción por PCR. La reacción por PCR se realizó en las siguientes condiciones: 25 ciclos de 98 °C durante 20 segundos y 68 °C durante 5 minutos (por un ciclo). Cuando una parte de los productos de PCR se sometieron a electroforesis sobre un gel de agarosa, se confirmó un producto de amplificación de aproximadamente 2,5 kb. Por consiguiente, una reacción de ligación se realizó usando 2 μ l de los productos de PCR para ligar un producto de amplificación al vector plasmídico. Se transformó *Escherichia coli* con este producto de ligación de acuerdo con un procedimiento convencional, y se preparó ADN plasmídico usando el transformante obtenido. Este ADN plasmídico se digirió con enzimas de restricción que pueden eliminar el fragmento de ADN insertado en el ADN plasmídico y se sometió a electroforesis en gel de agarosa para confirmar que se insertó un fragmento de ADN de 2,5 kb en el ADN plasmídico. La secuencia nucleotídica del fragmento de ADN insertado se determinó mediante un procedimiento convencional. Como resultado, se descubrió que la secuencia nucleotídica determinada coincidía con la secuencia de las posiciones nucleotídicas 271 a 2819 en la secuencia nucleotídica con el número de acceso del GenBank D89815. Posteriormente, este ADN plasmídico se digirió con *BglI* y *SacI* y se sometió a electroforesis de

agarosa para aislar un fragmento de ADN que contenía la región génica estructural de la cepa J1, que se ligó al vector de transferencia del virus vaccinia pDIsGptmH5 (Ohnishi, K. y col., Jap. J. Infect. Dis. 58 (2005) pág. 88-94; Ishii, K. y col., Virology 302 (2002) pág. 433-444). El vector obtenido resultante se denominó pDIsJ1st.

- 5 Se preparó un vector que comprende una secuencia génica estructural quimérica del gen Core obtenido a partir de la cepa J1 y los genes E1, E2 y p7 obtenidos a partir de la cepa JFH1 y que puede expresar las proteínas codificadas por estos genes mediante el siguiente procedimiento. En primer lugar, para amplificar el gen Core de la cepa J1, se clonó un vector en el que el ADNc genómico del VHC de la cepa J1 I (número de acceso del GenBank D89815) como plantilla, se añadieron 5 µl de tampón 10 x acompañados por el kit LA-PCR (Takara Bio Inc.), 5 µl de una mezcla dNTP 2,5 mM, y 1 µl de cada uno del cebador directo H77/J1 10 µM (AAAGATCTGCGAAAGGCCTTGTGGTACTGC: SEC ID N°: 1) y el cebador inverso J1/JFH1 (GTAGCTGCTACTGGTATTCTTCACCTGGGCAGCGGAAGCTGGGATGGTCAAACAGGACAG: SEC ID N°: 4), y finalmente se añadió agua desionizada para preparar 49 µl de volumen total. Después, se añadió 1 µl de Takara LA Taq (Takara Bio Inc.) y se realizó la reacción por PCR. La reacción por PCR se realizó en las siguientes condiciones: 25 ciclos de 98 °C durante 20 segundos y 68 °C durante 5 minutos (por un ciclo). Para amplificar los genes E1, E2 y p7 de la JFH1, se clonó un vector en el que el ADNc genómico del VHC de la cepa JFH1 (número de acceso del GenBank AB047639) como plantilla, se añadieron 5 µl de tampón 10 x acompañados por el kit LA-PCR (Takara Bio Inc.), 5 µl de una mezcla dNTP 2,5 mM, y 1 µl de cada uno del cebador directo J1/JFH1 10 µM (CTGTCCTGTTTGACCATCCAGCTTCCGCTGCCAGGTGAAGAATACCAGTAGCA GCTAC: SEC ID N°: 5) y el cebador inverso JFH1 (AAGAGCTCTCAATCAATATCAACAAACCCACGCCT: SEC ID N°: 6), y finalmente se añadió agua desionizada para preparar 49 µl de volumen total. Después, se añadió 1 µl de Takara LA Taq (Takara Bio Inc.) y se realizó la reacción por PCR. La reacción por PCR se realizó en las siguientes condiciones: 25 ciclos de 98 °C durante 20 segundos y a 68 °C durante 5 minutos (por un ciclo). Los fragmentos amplificados obtenidos se purificaron y se disolvieron en 50 µl de H₂O. 1 µl de cada solución se diluyó 100 veces, y 1 µl de cada solución se combinó en una mezcla. Usando esta mezcla como plantilla, se realizaron 5 ciclos de LA-PCR en las condiciones que se han descrito anteriormente sin añadir cebadores. Después, se añadieron el cebador directo H77/J1 (SEC ID N°: 1) y el cebador inverso JFH1 (SEC ID N°: 6), se realizaron 10 ciclos más de LA-PCR, y el fragmento de ADN quimérico amplificado se purificó. Este fragmento se clonó en el vector plasmídico, y se determinó la secuencia nucleotídica del fragmento de ADN. Como resultado, se confirmó que el fragmento de ADN tenía una secuencia génica estructural quimérica del gen Core obtenido a partir de la cepa J1 y los genes E1, E2 y p7 obtenidos a partir de la cepa JFH1. Posteriormente, un fragmento obtenido digiriendo este plásmido con *Bg/II* y *SacI* se ligó al vector de transferencia del virus vaccinia pDIsGptmH5 (Ohnishi, K. y col., Jap. J. Infect. Dis. 58 (2005) pág. 88-94; Ishii, K. y col., Virology 302 (2002) pág. 433-444). El vector obtenido resultante se denominó pDIsJ1(c)/JFH1 (E1-p7)st.
- 35 Se preparó un vector que comprende una secuencia génica estructural quimérica del gen Core obtenido a partir de la cepa JFH1 y los genes E1, E2 y p7 obtenidos a partir de la cepa J1 y que puede expresar las proteínas codificadas por estos genes mediante el siguiente procedimiento. En primer lugar, para amplificar el gen Core de la cepa JFH1, se clonó un vector en el que el ADNc genómico del VHC de la cepa JFH1 (número de acceso del GenBank AB047639) como plantilla, se añadieron 5 µl de tampón 10 x acompañados por el kit LA-PCR (Takara Bio Inc.), 5 µl de una mezcla dNTP 2,5 mM, y 1 µl de cada uno del cebador directo JFH1 10 µM (AAAGATCTGCGAAAGGCCTTGTGGTACTGC: SEC ID N°: 7) y el cebador inverso JFH1/J1 (GGTATATCCCGACACGTTGCGCACTTCATAAGCAGAGACCGGAACGGTGATGC AGGAC: SEC ID N°: 8), y finalmente se añadió agua desionizada para preparar 49 µl de volumen total. Después, se añadió 1 µl de Takara LA Taq (Takara Bio Inc.) y se realizó la reacción por PCR. La reacción por PCR se realizó en las siguientes condiciones: 25 ciclos de 98 °C durante 20 segundos y 68 °C durante 5 minutos (por un ciclo). Para amplificar los genes E1, E2 y p7 de la cepa J1, se clonó un vector en el que el ADNc genómico del VHC de la cepa J1 (número de acceso del GenBank D89815) se clonó como plantilla, se añadieron 5 µl de tampón 10 x acompañados por el kit LA-PCR (Takara Bio Inc.), 5 µl de una mezcla dNTP 2,5 mM, y 1 µl de cada uno del cebador directo JFH1/J1 10 µM (GTCCTGCATCACCGTTCCGGTCTCTGCTTATGAAGTGCGCAACGTGTCCGGGATA TACC: SEC ID N°: 9) y el cebador inverso J1 (AAGAGCTCTCATAGACCTACAAAAACCCCGCCTCC: SEC ID N°: 3), y finalmente se añadió agua desionizada para preparar 49 µl de volumen total. Después, se añadió 1 µl de Takara LA Taq (Takara Bio Inc.) y se realizó la reacción por PCR. La reacción por PCR se realizó en las siguientes condiciones: 25 ciclos de 98 °C durante 20 segundos y 68 °C durante 5 minutos (por un ciclo). Los fragmentos amplificados obtenidos se purificaron y se disolvieron en 50 µl de H₂O. 1 µl de cada solución se diluyó 100 veces, y 1 µl de cada solución se combinó en una mezcla. Usando esta mezcla como plantilla, se realizaron 5 ciclos de LA-PCR en las condiciones que se han descrito anteriormente sin añadir cebadores. Después, se añadieron el cebador directo JFH1 (SEC ID N°: 7) y el cebador inverso J1 (SEC ID N°: 3), se realizaron 10 ciclos más de LA-PCR, y el fragmento de ADN quimérico amplificado se purificó. Este fragmento se clonó en el vector plasmídico, y se determinó la secuencia nucleotídica del fragmento de ADN. Como resultado, se confirmó que el fragmento de ADN tenía una secuencia génica estructural quimérica del gen Core obtenido a partir de la cepa JFH1 y los genes E1, E2 y p7 obtenidos a partir de la cepa J1. Posteriormente, un fragmento obtenido digiriendo este plásmido con *Bg/II* y *SacI* se ligó al vector de transferencia del virus vaccinia pDIsGptmH5 (Ohnishi, K. y col., Jap. J. Infect. Dis. 58 (2005) pág. 88-94; Ishii, K. y col., Virology 302 (2002) pág. 433-444). El vector obtenido como resultado se denominó pDIsJFH(c)/J1(E1-p7)st.
- 65 Los mapas de las secuencias génicas estructurales del VHC (secuencia génica estructural quimérica) insertados en

los vectores preparados como se ha descrito anteriormente, pDisJFHst, pDisH77st, pDisJ1st, pDisJ1(c)/JFH(E1-p7)st y pDisJFH(c)/J1(E1-p7)st, se muestran en la figura 4.

Por ejemplo, la cepa Dis recombinante del vector del virus vaccinia portadora de cada uno de los vectores que se han mencionado anteriormente se preparó y se seleccionado como se indica a continuación.

Se inocularon 500 µl de una solución de virus que contenía aproximadamente 10^6 unidades formadoras de placas (ufp) de la cepa Dis del virus vaccinia en una placa de 80 mm sobre la que se sembraron aproximadamente 10^7 células de fibroblastos de embriones de pollo (FEP), y se dejó que el virus infectara a las células mediante agitación cada 15 minutos 8 veces. Después, se añadió Medio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) con 1 ml de suero fetal bovino (FCS) al 10%, y la mezcla se cultivó a 37 °C en CO₂ al 5% durante 2 horas. El medio se eliminó, las células se lavaron con serina tamponada con fosfato (PBS) y se añadieron 0,5 ml de una solución al 0,05% de tripsina para liberar las células. Después, la suspensión celular se centrifugó a 2000 rpm durante 3 minutos para recuperar las células, y las células se suspendieron en 400 µl de PBS. Se disolvieron 10 µg del vector de transferencia que se ha mencionado anteriormente en esta suspensión celular, y la electroporación se realizó en una cubeta de 0,4 cm usando Gene Pulser II (Bio-Rad Laboratories, Inc.), con una tensión aplicada una vez a 250 v y 500 pFD. Las células se suspendieron en 2 ml de DMEM que contenía FCS al 10%, se sembraron en una placa de 35 mm y se cultivaron a 37 °C en CO₂ al 5% durante 7 días. Las células infectadas se recuperaron con el medio, se liofilizaron 3 veces, se ultrasonificaron durante 2 minutos y después se diluyeron 10, 100 ó 1000 veces con el mismo medio. Se sembraron 10^6 células sobre una placa de 35 mm seguido por la adición de 25 µg/ml de MPA, 250 µg/ml de xantina y 15 µg/ml de hipoxantina al medio (DMEM que contenía FCS al 10%) y se cultivaron durante una noche. Después, se inocularon las soluciones celulares diluidas que se han mencionado anteriormente. Se dejó que el virus infectara las células por agitación cada 15 minutos 8 veces, la solución celular diluida se eliminó, después se añadieron 2 ml de medio añadido con agar blanco al 1% (DMEM con FCS al 10%; que contenía MPA, xantina e hipoxantina), y la mezcla se solidificó y se cultivó a 37 °C en CO₂ al 5% durante 7 días. Las porciones de placas formadas se recogieron con una pipeta Pasteur, se suspendieron en 200 µl de DMEM que contenía FCS al 10%, y se ultra-sonificaron durante 2 minutos para liberar el virus del agar. Esta solución de cultivo se diluyó 10, 100 y 1000 veces con el mismo medio, el mismo procedimiento de ensayo de placas que se ha descrito anteriormente se repitió dos veces más para purificar el virus recombinante, y los procedimientos se cambiaron de escala infectando las células de FEP.

Los vectores virales (particulares recombinantes similares a virus) preparados como se ha descrito anteriormente a partir de pDisJFHst, pDisH77st, pDisJ1st, pDisJ1(c)/JFH(E1-p7)st y pDisJFH(c)/J1(E1-p7)st se denominaron DisJFHst, DisH77st, DisJ1st, DisJ1 (c)/JFH(E1-p7)st y DisJFH(c)/J1(E1-p7)st, respectivamente.

Ejemplo 3

Introducción de un vector que expresa una proteína estructural en la célula portadora de replicón y producción de la proteína estructural

Para expresar las proteínas estructurales del VHC en una célula portadora de replicón, el vector pCAGC-p7JFH1 o pEF4C-p7JFH1 que se ha preparado en el Ejemplo 2 que expresa la proteína estructural del VHC se introdujo en una célula portadora de replicón por lipofección y similares. Además, se dejó que los vectores virales que expresan las proteínas estructurales del VHC que se han preparado en el Ejemplo 2, DisJFHst, DisH77st, DisJ1st, DisJ1(c)/JFH(E1-p7)st y DisJFH(c)/J1(E1-p7)st, infectaran a las células portadoras de replicón.

1) Introducción de un vector plasmídico que expresa una proteína estructural

Se introdujo pCAGC-p7JFH1 en la célula 5-15 portadora de replicón por lipofección, después las células se cultivaron continuamente en una solución de cultivo de 8 ml y el sobrenadante de cultivo se recuperó a los 4 días para cuantificar la proteína Core del VHC. Sin embargo, la cantidad estaba por debajo del límite de detección.

Mientras tanto, se introdujo pEF4C-p7JFH1 en la célula IH4.1 portadora de replicón por lipofección. Como resultado, la proteína Core del VHC puede detectarse en el sobrenadante de cultivo por transferencia de Western. Por consiguiente, las células IH4.1 portadoras de replicón en las que se introdujo pEF4C-p7JFH1 se cultivaron durante 4 días, después se recogió un medio de cultivo (8 ml) y se centrifugó a 8.000 g y a 4 °C durante 60 minutos para recoger el sobrenadante de cultivo. Posteriormente, este sobrenadante se centrifugó usando un rotor SW20 (Beckman) a 25.000 rpm y a 4 °C durante 4 horas, y los gránulos se suspendieron en 1 ml de tampón. La muestra se cubrió sobre gradientes de densidad de sacarosa del 10 al 60% preparados en un tubo para el rotor SW41 E (Beckman) y se centrifugaron a 35.000 rpm y a 4 °C durante 16 horas. Los gradientes de densidad de sacarosa del 10 al 60% se prepararon por deposición de 2 ml de una solución al 60% (peso/peso) de sacarosa (disuelta en Tris 50 mM, pH 7,5/NaCl 0,1 M/EDTA 1 mM), 1 ml de una solución al 50% de sacarosa, 1 ml de una solución al 40% de sacarosa, 1 ml de una solución al 30% de sacarosa, 1 ml de una solución al 20% de sacarosa, y 1 ml de una solución al 10% de sacarosa en un tubo centrífuga.

Después de la finalización de la centrifugación, se recogieron 0,5 ml de cada una de las fracciones del fondo del tubo. Se determinaron la densidad, la concentración de la proteína Core del VHC y la concentración de ARN para cada fracción. La proteína Core del VHC se cuantificó por el ensayo IRMA del antígeno del orto-VHC (Aoyagi y col., J. Clin. Microbiol., 37 (1999) pág. 1802-1808). El ARN del replicón del VHC se cuantificó de acuerdo con el procedimiento de (Takeuchi y col., Gastroenterology, 116 (1999) pág. 636-642). Como se muestra en la figura 5, los picos del replicón de ARN y la proteína Core coinciden y ambos están en la fracción 8 en dos experimentos. La densidad de esta fracción coincidía con la densidad indicada de la partícula del VHCm con aproximadamente 1,17 g/ml. Esto sugirió que se produjeron las partículas virales.

2) Introducción del vector recombinante del virus vaccinia que expresa la proteína estructural del VHC

Se sembraron 2×10^6 células de la cepa celular 5-15 portadora del replicón en una placa de 10 cm, y dejó que 0,5 ufp/célula de DisJFHst infectaran la cepa celular portadora de replicón al día siguiente. El cultivo continuó en un medio de cultivo de 8 ml. Después de 4 días de cultivo, la solución de cultivo se recuperó, se centrifugó a 8.000 g y a 4 °C durante 60 minutos, y el sobrenadante de cultivo se recogió. Después, este sobrenadante se centrifugó usando el rotor SW20 (Beckman) a 25.000 rpm y a 4 °C durante 4 horas y se suspendieron gránulos equivalentes a 8 ml de la solución de cultivo celular en 1 ml de tampón con o sin NP40 al 0,2%. La muestra se incubó a 4 °C durante 20 minutos, se cubrió sobre gradientes de densidad de sacarosa del 10 al 60% en un tubo para el rotor SW41E (Beckman) y se centrifugó a 35.000 rpm y a 4 °C durante 16 horas. El gradiente de densidad de sacarosa del 10 al 60% se preparó por deposición de 2 ml de una solución al 60% (peso/peso) de sacarosa (disuelta en Tris 50 mM, pH 7,5/NaCl 0,1 M/EDTA 1 mM), 1 ml de una solución al 50% de sacarosa, 1 ml de una solución al 40% de sacarosa, 1 ml de una solución al 30% de sacarosa, 1 ml de una solución al 20% de sacarosa y 1 ml de una solución al 10% de sacarosa en un tubo centrífuga.

Después de la finalización de la centrifugación, se recuperaron 0,5 ml de cada una de las fracciones del fondo del tubo. Se determinaron la densidad y la concentración de proteína Core del VHC para cada fracción. La proteína Core del VHC se cuantificó por el ensayo IRMA del antígeno del orto-VHC (Aoyagi y col., J. Clin. Microbiol., 37 (1999) pág. 1802-1808).

Se muestran los resultados de dos experimentos independientes en la figura 6. En el grupo no tratado NP40 (tratado con PBS), la densidad de la partícula que contenía la proteína Core era 1,16 g/ml (fracción 7). En el grupo tratado NP40, la densidad de la partícula que contenía la proteína Core era 1,21 g/ml (fracción 9). Esto sugirió que una membrana superficial que tenía una alta gravedad específica debido a los lípidos que contenía se eliminó de la partícula vírica por NP40, formando una partícula núcleo que tenía el ácido nucleico y la partícula Core sola sin una estructura similar a un virus, y por lo tanto la gravedad específica aumentó. Esto sugirió que se produjo una partícula vírica completa en este sistema experimental.

De la misma manera que se ha descrito anteriormente, se dejó que los vectores virales DisJ1st, DisJ1(c)JFH(E1-p7)st y DisJFH(c)/J1(E1-p7)st infectaran la cepa celular 5-15 portadora del replicón. Se concentraron 8 ml del sobrenadante obtenido mediante el cultivo de las células durante 4 días después de la infección con una membrana de ultrafiltración y se fraccionaron por la centrifugación del gradiente de densidad de sacarosa que se ha mencionado anteriormente. Se determinaron la densidad y la concentración de la proteína Core del VHC para cada fracción. El patrón de distribución de la densidad de la proteína Core del VHC mostró que la partícula similar a un virus producida es encontrada en el sobrenadante de cultivo de las células infectadas por DisJ1st, DisJ1(c)/JFH(E1-p7)st o DisJFH(c)/J1(E1-p7)st.

Ejemplo 4

Confirmación de la capacidad de infectar de la partícula recombinante similar al VHC

Como se muestra en la figura 1, la partícula recombinante del VHC, preparada en los ejemplos que se han descrito anteriormente, tiene el gen neo como un marcador de resistencia a fármacos. Por lo tanto, para confirmar que la partícula obtenida en el Ejemplo 3 tiene la capacidad de infectar, basta con permitir a esta partícula infectar la célula Huh7 y examinar si pueden obtenerse colonias de resistencia a G418 (neomicina).

Se dejó que DisJFHst infectara la cepa celular 5-15 portadora del replicón, el sobrenadante de cultivo obtenido cultivando las células durante 4 días se concentró 30 veces por ultrafiltración de la membrana (límite, 1×10^3 Da) para infectar las células Huh7. Después de la infección, a la placa de cultivo se le añadió 1 mg/ml de G418. Después, el cultivo continuó mientras se reemplazaba el medio de cultivo dos veces a la semana. Después del cultivo durante 21 días después del sembrado, las células viables se tiñeron con violeta cristal. Como resultado, se confirmó la formación de colonias.

Si no se detectan proteínas estructurales del VHC en una célula infectada, esto significa que no se producen partículas hijas en la célula infectada. Por lo tanto, las colonias formadas en este experimento se propagaron, y se prepararon los extractos celulares de las mismas. Después, se analizaron las proteínas de estos extractos por SDS-PAGE y por transferencia de western. En los análisis, la célula Huh7 se transfectó de forma transitoria por el ADN

del plásmido de expresión, incluyendo el gen Core, y el extracto celular obtenido se usó como control positivo. Además, se usó un extracto celular obtenido de la célula Huh7 que no se transfectó como control negativo. Una muestra extraída de cada clon celular se sometió a SDS-PAGE y después se sometió a inmunotransferencia en una membrana PVDF (Immobilon-P, Millipore), y la proteína Core traducida en la célula se analizó por ECL (Amersham Pharmacia Biotech Pharmacia) usando un anticuerpo específico anti-Core (anticuerpo 2H9 del clon) y un anticuerpo secundario marcado con HRP que reconoce el anticuerpo. Como resultado, no se detectó la proteína Core en las células infectadas. Por lo tanto, se determinó que no se produjo una partícula vírica hija en las células infectadas. Esto significa que, después de que la partícula recombinante similar al VHC producida por el procedimiento de la presente invención infecte a otra célula, ésta no se reproduce más como una partícula, sino que tiene la capacidad de extender adicionalmente la infección a otras células (capacidad de transmisión).

Aplicabilidad Industrial

Una partícula recombinante similar al VHC que tiene la propiedad de infectar pero no la propiedad de transmisión, en la que un ARN subgenómico del VHC que contiene un gen extraño deseado se empaqueta, y un procedimiento para producir la misma pueden proporcionarse por la presente invención. Ya que una partícula recombinante similar al VHC de este tipo que posee la propiedad de infectar tiene la ventaja de carecer de la propiedad de transmisión, puede usarse en terapia génica a través de la introducción del gen *in vivo* o *ex vivo* a células hepáticas o linfoides o tejidos de animales, en particular, seres humanos, o pueden usarse como un vector viral para construir un animal transgénico o como una vacuna atenuada.

Listado de secuencias sin texto

Las secuencias de las SEC ID N°: 1 a 9 representan cebadores.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Director General of National Institute of Infectious Diseases Tokyo Metropolitan Organization for Medical Research Toray Industries, Inc.
 <120> Nueva partícula recombinante similar al virus de la hepatitis C humano y procedimiento para producir la misma
 5 <130> PH-2921-PCT
 <140> PCT/JP2006/319573
 <141> 2006-09-29
 <150> JP 2005-287825
 10 <151> 2005-09-30
 <160> 14
 <170> PatentIn Ver. 2.1
 <210> 1
 <211> 30
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador
 <220>
 20 <223> Inventor: Tanabe, Jun-ichi: Sone, Saburo: Wakita, Takaji Inventor: Ishii, Takashi; Suzuki, Ryosuke: Suzuki, Tetsuro Inventor: Miyamura Tatsuo
 <400> 1
 aaagatctgc gaaaggcctt gtgtactgc 30
 <210> 2
 25 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador
 30 <400> 2
 aagagctctc ataaccgac aagaacaacg ccgcc 35
 <210> 3
 <211> 35
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador
 <400> 3
 aagagctctc atagacctac aaaaaccccg cctcc 35
 40 <210> 4
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 45 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador
 <400> 4
 gtagtctgta ctgtattct tcacctgggc agcggaagct gggatggtca aacaggacag 60
 <210> 5
 <211> 60
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador
 <400> 5
 55 ctgtcctgtt tgaccatccc agctccgct gccaggtga agaataccag tagcagctac 60
 <210> 6
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador
 <400> 6
 aagagctctc aatcaatatc aaaaaccca cgcct 35
 <210> 7
 65 <211> 30

ES 2 376 354 T3

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador
 5 <400> 7
 aaagatctgc gaaaggcctt gtgtactgc 30
 <210> 8
 <211> 29
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador
 <400> 8
 ggtatatccc ggacacgttg cgcactcat aagcagagac cggaacggtg atgcaggac 29
 15 <210> 9
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador
 <400> 9
 gtcctgcatc accgttccgg tctctgcta tgaagtgcgc aacgtgtccg ggatatacc 29
 <210> 10
 <211> 9678
 25 <212> ADN
 <213> Virus de la hepatitis C
 <220>
 <221> CDS
 <222> (341).. (9442)
 30 <400> 10

acctgcccct aataggggcg acactccgcc atgaatcact cccctgtgag gaactactgt 60

cttcacgcag aaagcgccta gccatggcgt tagtatgagt gtcgtacagc ctccaggccc 120

ccccctcccg ggagagccat agtgggtctgc ggaaccggtg agtacaccgg aattgccggg 180

aagactgggt cctttcttgg ataaaccac tctatgccg gccatttggg cgtgccccg 240

caagactgct agccgagtag cgttgggttg cgaaaggcct tgttgtactg cctgataggg 300

cgcttgcgag tgccccggga ggtctcgtag accgtgcacc atg agc aca aat cct 355

Met Ser Thr Asn Pro

1 5

aaa cct caa aga aaa acc aaa aga aac acc aac cgt cgc cca gaa gac 403

Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Asn Arg Arg Pro Glu Asp

10 15 20

gtt aag ttc ccg ggc ggc ggc cag atc gtt ggc gga gta tac ttg ttg 451

Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly Gly Val Tyr Leu Leu

25 30 35

ccg cgc agg ggc ccc agg ttg ggt gtg cgc acg aca agg aaa act tcg 499

Pro Arg Arg Gly Pro Arg Leu Gly Val Arg Thr Thr Arg Lys Thr Ser

40 45 50

gag cgg tcc cag cca cgt ggg aga cgc cag ccc atc ccc aaa gat cgg 547

Glu Arg Ser Gln Pro Arg Gly Arg Arg Gln Pro Ile Pro Lys Asp Arg

55 60 65

cgc tcc act ggc aag gcc tgg gga aaa cca ggt cgc ccc tgg ccc cta 595

Arg Ser Thr Gly Lys Ala Trp Gly Lys Pro Gly Arg Pro Trp Pro Leu

70 75 80 85

tat ggg aat gag gga ctc ggc tgg gca gga tgg ctc ctg tcc ccc cga 643

Tyr Gly Asn Glu Gly Leu Gly Trp Ala Gly Trp Leu Leu Ser Pro Arg	
90 95 100	
ggc tct cgc ccc tcc tgg ggc ccc act gac ccc cgg cat agg tcg cgc	691
Gly Ser Arg Pro Ser Trp Gly Pro Thr Asp Pro Arg His Arg Ser Arg	
105 110 115	
aac gtg ggt aaa gtc atc gac acc cta acg tgt ggc ttt gcc gac ctc	739
Asn Val Gly Lys Val Ile Asp Thr Leu Thr Cys Gly Phe Ala Asp Leu	
120 125 130	
atg ggg tac atc ccc gtc gta ggc gcc ccg ctt agt ggc gcc gcc aga	787
Met Gly Tyr Ile Pro Val Val Gly Ala Pro Leu Ser Gly Ala Ala Arg	
135 140 145	
gct gtc gcg cac ggc gtg aga gtc ctg gag gac ggg gtt aat tat gca	835
Ala Val Ala His Gly Val Arg Val Leu Glu Asp Gly Val Asn Tyr Ala	
150 155 160 165	
aca ggg aac cta ccc ggt ttc ccc ttt tct atc ttc ttg ctg gcc ctg	883
Thr Gly Asn Leu Pro Gly Phe Pro Phe Ser Ile Phe Leu Leu Ala Leu	
170 175 180	
ttg tcc tgc atc acc gtt ccg gtc tct gct gcc cag gtg aag aat acc	931
Leu Ser Cys Ile Thr Val Pro Val Ser Ala Ala Gln Val Lys Asn Thr	
185 190 195	
agt agc agc tac atg gtg acc aat gac tgc tcc aat gac agc atc act	979
Ser Ser Ser Tyr Met Val Thr Asn Asp Cys Ser Asn Asp Ser Ile Thr	
200 205 210	

tgg cag ctc gag gct gcg gtt ctc cac gtc ccc ggg tgc gtc ccg tgc	1027
Trp Gln Leu Glu Ala Ala Val Leu His Val Pro Gly Cys Val Pro Cys	
215 220 225	
 gag aga gtg ggg aat acg tca cgg tgt tgg gtg cca gtc tcg cca aac	1075
Glu Arg Val Gly Asn Thr Ser Arg Cys Trp Val Pro Val Ser Pro Asn	
230 235 240 245	
 atg gct gtg cgg cag ccc ggt gcc ctc acg cag ggt ctg cgg acg cac	1123
Met Ala Val Arg Gln Pro Gly Ala Leu Thr Gln Gly Leu Arg Thr His	
250 255 260	
 atc gat atg gtt gtg atg tcc gcc acc ttc tgc tct gct ctc tac gtg	1171
Ile Asp Met Val Val Met Ser Ala Thr Phe Cys Ser Ala Leu Tyr Val	
265 270 275	
 ggg gac ctc tgt ggc ggg gtg atg ctc gcg gcc cag gtg ttc atc gtc	1219
Gly Asp Leu Cys Gly Gly Val Met Leu Ala Ala Gln Val Phe Ile Val	
280 285 290	
 tcg ccg cag tac cac tgg ttt gtg caa gaa tgc aat tgc tcc atc tac	1267
Ser Pro Gln Tyr His Trp Phe Val Gln Glu Cys Asn Cys Ser Ile Tyr	
295 300 305	
 cct ggc acc atc act gga cac cgc atg gca tgg gac atg atg atg aac	1315
Pro Gly Thr Ile Thr Gly His Arg Met Ala Trp Asp Met Met Met Asn	
310 315 320 325	
 tgg tcg ccc acg gcc acc atg atc ctg gcg tac gtg atg cgc gtc ccc	1363

Trp Ser Pro Thr Ala Thr Met Ile Leu Ala Tyr Val Met Arg Val Pro	
330 335 340	
gag gtc atc ata gac atc gtt agc ggg gct cac tgg ggc gtc atg ttc	1411
Glu Val Ile Ile Asp Ile Val Ser Gly Ala His Trp Gly Val Met Phe	
345 350 355	
ggc ttg gcc tac ttc tct atg cag gga gcg tgg gcg aag gtc att gtc	1459
Gly Leu Ala Tyr Phe Ser Met Gln Gly Ala Trp Ala Lys Val Ile Val	
360 365 370	
atc ctt ctg ctg gcc gct ggg gtg gac gcg ggc acc acc acc gtt gga	1507
Ile Leu Leu Leu Ala Ala Gly Val Asp Ala Gly Thr Thr Thr Val Gly	
375 380 385	
ggc gct gtt gca cgt tcc acc aac gtg att gcc ggc gtg ttc agc cat	1555
Gly Ala Val Ala Arg Ser Thr Asn Val Ile Ala Gly Val Phe Ser His	
390 395 400 405	
ggc cct cag cag aac att cag ctc att aac acc aac ggc agt tgg cac	1603
Gly Pro Gln Gln Asn Ile Gln Leu Ile Asn Thr Asn Gly Ser Trp His	
410 415 420	
atc aac cgt act gcc ttg aat tgc aat gac tcc ttg aac acc ggc ttt	1651
Ile Asn Arg Thr Ala Leu Asn Cys Asn Asp Ser Leu Asn Thr Gly Phe	
425 430 435	
ctc gcg gcc ttg ttc tac acc aac cgc ttt aac tcg tca ggg tgt cca	1699
Leu Ala Ala Leu Phe Tyr Thr Asn Arg Phe Asn Ser Ser Gly Cys Pro	
440 445 450	

ggg cgc ctg tcc gcc tgc cgc aac atc gag gct ttc cgg ata ggg tgg 1747
Gly Arg Leu Ser Ala Cys Arg Asn Ile Glu Ala Phe Arg Ile Gly Trp

465

ggc acc cta cag tac gag gat aat gtc acc aat cca gag gat atg agg 1795
Gly Thr Leu Gln Tyr Glu Asp Asn Val Thr Asn Pro Glu Asp Met Arg

485

ccg tac tgc tgg cac tac ccc cca aag ccg tgt ggc gta gtc ccc gcg 1843
Pro Tyr Cys Trp His Tyr Pro Pro Lys Pro Cys Gly Val Val Pro Ala

500

agg tct gtg tgt ggc cca gtg tac tgt ttc acc ccc agc ccg gta gta 1891
Arg Ser Val Cys Gly Pro Val Tyr Cys Phe Thr Pro Ser Pro Val Val

515

gtg ggc acg acc gac aga cgt gga gtg ccc acc tac aca tgg gga gag 1939
Val Gly Thr Thr Asp Arg Arg Gly Val Pro Thr Tyr Thr Trp Gly Glu

530

aat gag aca gat gtc ttc cta ctg aac agc acc cga ccg ccg cag ggc 1987
Asn Glu Thr Asp Val Phe Leu Leu Asn Ser Thr Arg Pro Pro Gln Gly

545

tca tgg ttc ggc tgc acg tgg atg aac tcc act ggt ttc acc aag act 2035
Ser Trp Phe Gly Cys Thr Trp Met Asn Ser Thr Gly Phe Thr Lys Thr

565

tgt ggc gcg cca cct tgc cgc acc aga gct gac ttc aac gcc agc acg 2083

Cys Gly Ala Pro Pro Cys Arg Thr Arg Ala Asp Phe Asn Ala Ser Thr	
570 575 580	
gac ttg ttg tgc cct acg gat tgt ttt agg aag cat cct gat gcc act	2131
Asp Leu Leu Cys Pro Thr Asp Cys Phe Arg Lys His Pro Asp Ala Thr	
585 590 595	
tat att aag tgt ggt tct ggg ccc tgg ctc aca cca aag tgc ctg gtc	2179
Tyr Ile Lys Cys Gly Ser Gly Pro Trp Leu Thr Pro Lys Cys Leu Val	
600 605 610	
cac tac cct tac aga ctc tgg cat tac ccc tgc aca gtc aat ttt acc	2227
His Tyr Pro Tyr Arg Leu Trp His Tyr Pro Cys Thr Val Asn Phe Thr	
615 620 625	
atc ttc aag ata aga atg tat gta ggg ggg gtt gag cac agg ctc acg	2275
Ile Phe Lys Ile Arg Met Tyr Val Gly Gly Val Glu His Arg Leu Thr	
630 635 640 645	
gcc gca tgc aac ttc act cgt ggg gat cgc tgc gac ttg gag gac agg	2323
Ala Ala Cys Asn Phe Thr Arg Gly Asp Arg Cys Asp Leu Glu Asp Arg	
650 655 660	
gac agg agt cag ctg tct cct ctg ttg cac tct acc acg gaa tgg gcc	2371
Asp Arg Ser Gln Leu Ser Pro Leu Leu His Ser Thr Thr Glu Trp Ala	
665 670 675	
atc ctg ccc tgc acc tac tca gac tta ccc gct ttg tca act ggt ctt	2419
Ile Leu Pro Cys Thr Tyr Ser Asp Leu Pro Ala Leu Ser Thr Gly Leu	
680 685 690	

ctc cac ctt cac cag aac atc gtg gac gta caa tac atg tat ggc ctc	2467
Leu His Leu His Gln Asn Ile Val Asp Val Gln Tyr Met Tyr Gly Leu	
695 700 705	
tca cct gct atc aca aaa tac gtc gtt cga tgg gag tgg gtg gta ctc	2515
Ser Pro Ala Ile Thr Lys Tyr Val Val Arg Trp Glu Trp Val Val Leu	
710 715 720 725	
tta ttc ctg ctc tta gcg gac gcc aga gtc tgc gcc tgc ttg tgg atg	2563
Leu Phe Leu Leu Leu Ala Asp Ala Arg Val Cys Ala Cys Leu Trp Met	
730 735 740	
ctc atc ttg ttg ggc cag gcc gaa gca gca ttg gag aag ttg gtc gtc	2611
Leu Ile Leu Leu Gly Gln Ala Glu Ala Ala Leu Glu Lys Leu Val Val	
745 750 755	
ttg cac gct gcg agt gcg gct aac tgc cat ggc ctc cta tat ttt gcc	2659
Leu His Ala Ala Ser Ala Ala Asn Cys His Gly Leu Leu Tyr Phe Ala	
760 765 770	
atc ttc ttc gtg gca gct tgg cac atc agg ggt cgg gtg gtc ccc ttg	2707
Ile Phe Phe Val Ala Ala Trp His Ile Arg Gly Arg Val Val Pro Leu	
775 780 785	
acc acc tat tgc ctc act ggc cta tgg ccc ttc tgc cta ctg ctc atg	2755
Thr Thr Tyr Cys Leu Thr Gly Leu Trp Pro Phe Cys Leu Leu Leu Met	
790 795 800 805	
gca ctg ccc cgg cag gct tat gcc tat gac gca cct gtg cac gga cag	2803

Ala Leu Pro Arg Gln Ala Tyr Ala Tyr Asp Ala Pro Val His Gly Gln

810

815

820

ata ggc gtg ggt ttg ttg ata ttg atc acc ctc ttc aca ctc acc ccg 2851

Ile Gly Val Gly Leu Leu Ile Leu Ile Thr Leu Phe Thr Leu Thr Pro

825

830

835

ggg tat aag acc ctc ctc ggc cag tgt ctg tgg tgg ttg tgc tat ctc 2899

Gly Tyr Lys Thr Leu Leu Gly Gln Cys Leu Trp Trp Leu Cys Tyr Leu

840

845

850

ctg acc ctg ggg gaa gcc atg att cag gag tgg gta cca ccc atg cag 2947

Leu Thr Leu Gly Glu Ala Met Ile Gln Glu Trp Val Pro Pro Met Gln

855

860

865

gtg cgc ggc ggc cgc gat ggc atc gcg tgg gcc gtc act ata ttc tgc 2995

Val Arg Gly Gly Arg Asp Gly Ile Ala Trp Ala Val Thr Ile Phe Cys

870

875

880

885

ccg ggt gtg gtg ttt gac att acc aaa tgg ctt ttg gcg ttg ctt ggg 3043

Pro Gly Val Val Phe Asp Ile Thr Lys Trp Leu Leu Ala Leu Leu Gly

890

895

900

cct gct tac ctc tta agg gcc gct ttg aca cat gtg ccg tac ttc gtc 3091

Pro Ala Tyr Leu Leu Arg Ala Ala Leu Thr His Val Pro Tyr Phe Val

905

910

915

aga gct cac gct ctg ata agg gta tgc gct ttg gtg aag cag ctc gcg 3139

Arg Ala His Ala Leu Ile Arg Val Cys Ala Leu Val Lys Gln Leu Ala

920

925

930

ggg ggt agg tat gtt cag gtg gcg cta ttg gcc ctt ggc agg tgg act	3187
Gly Gly Arg Tyr Val Gln Val Ala Leu Leu Ala Leu Gly Arg Trp Thr	
935 940 945	
ggc acc tac atc tat gac cac ctc aca cct atg tcg gac tgg gcc gct	3235
Gly Thr Tyr Ile Tyr Asp His Leu Thr Pro Met Ser Asp Trp Ala Ala	
950 955 960 965	
agc ggc ctg cgc gac tta gcg gtc gcc gtg gaa ccc atc atc ttc agt	3283
Ser Gly Leu Arg Asp Leu Ala Val Ala Val Glu Pro Ile Ile Phe Ser	
970 975 980	
ccg atg gag aag aag gtc atc gtc tgg gga gcg gag acg gct gca tgt	3331
Pro Met Glu Lys Lys Val Ile Val Trp Gly Ala Glu Thr Ala Ala Cys	
985 990 995	
ggg gac att cta cat gga ctt ccc gtg tcc gcc cga ctc ggc cag gag	3379
Gly Asp Ile Leu His Gly Leu Pro Val Ser Ala Arg Leu Gly Gln Glu	
1000 1005 1010	
atc ctc ctc ggc cca gct gat ggc tac acc tcc aag ggg tgg aag ctc	3427
Ile Leu Leu Gly Pro Ala Asp Gly Tyr Thr Ser Lys Gly Trp Lys Leu	
1015 1020 1025	
ctt gct ccc atc act gct tat gcc cag caa aca cga ggc ctc ctg ggc	3475
Leu Ala Pro Ile Thr Ala Tyr Ala Gln Gln Thr Arg Gly Leu Leu Gly	
1030 1035 1040 1045	
gcc ata gtg gtg agt atg acg ggg cgt gac agg aca gaa cag gcc ggg	3523

Ala Ile Val Val Ser Met Thr Gly Arg Asp Arg Thr Glu Gln Ala Gly

1050

1055

1060

gaa gtc caa atc ctg tcc aca gtc tct cag tcc ttc ctc gga aca acc 3571

Glu Val Gln Ile Leu Ser Thr Val Ser Gln Ser Phe Leu Gly Thr Thr

1065

1070

1075

atc tcg ggg gtt ttg tgg act gtt tac cac gga gct ggc aac aag act 3619

Ile Ser Gly Val Leu Trp Thr Val Tyr His Gly Ala Gly Asn Lys Thr

1080

1085

1090

cta gcc ggc tta cgg ggt ccg gtc acg cag atg tac tcg agt gct gag 3667

Leu Ala Gly Leu Arg Gly Pro Val Thr Gln Met Tyr Ser Ser Ala Glu

1095

1100

1105

ggg gac ttg gta ggc tgg ccc agc ccc cct ggg acc aag tct ttg gag 3715

Gly Asp Leu Val Gly Trp Pro Ser Pro Pro Gly Thr Lys Ser Leu Glu

1110

1115

1120

1125

ccg tgc aag tgt gga gcc gtc gac cta tat ctg gtc acg cgg aac gct 3763

Pro Cys Lys Cys Gly Ala Val Asp Leu Tyr Leu Val Thr Arg Asn Ala

1130

1135

1140

gat gtc atc ccg gct cgg aga cgc ggg gac aag cgg gga gca ttg ctc 3811

Asp Val Ile Pro Ala Arg Arg Arg Gly Asp Lys Arg Gly Ala Leu Leu

1145

1150

1155

tcc ccg aga ccc att tcg acc ttg aag ggg tcc tcg ggg ggg ccg gtg 3859

Ser Pro Arg Pro Ile Ser Thr Leu Lys Gly Ser Ser Gly Gly Pro Val

1160

1165

1170

ctc tgc cct agg ggc cac gtc gtt ggg ctc ttc cga gca gct gtg tgc	3907
Leu Cys Pro Arg Gly His Val Val Gly Leu Phe Arg Ala Ala Val Cys	
1175 1180 1185	
tct cgg ggc gtg gcc aaa tcc atc gat ttc atc ccc gtt gag aca ctc	3955
Ser Arg Gly Val Ala Lys Ser Ile Asp Phe Ile Pro Val Glu Thr Leu	
1190 1195 1200 1205	
gac gtt gtt aca agg tct ccc act ttc agt gac aac agc acg cca ccg	4003
Asp Val Val Thr Arg Ser Pro Thr Phe Ser Asp Asn Ser Thr Pro Pro	
1210 1215 1220	
gct gtg ccc cag acc tat cag gtc ggg tac ttg cat gct cca act ggc	4051
Ala Val Pro Gln Thr Tyr Gln Val Gly Tyr Leu His Ala Pro Thr Gly	
1225 1230 1235	
agt gga aag agc acc aag gtc cct gtc gcg tat gcc gcc cag ggg tac	4099
Ser Gly Lys Ser Thr Lys Val Pro Val Ala Tyr Ala Ala Gln Gly Tyr	
1240 1245 1250	
aaa gta cta gtg ctt aac ccc tcg gta gct gcc acc ctg ggg ttt ggg	4147
Lys Val Leu Val Leu Asn Pro Ser Val Ala Ala Thr Leu Gly Phe Gly	
1255 1260 1265	
gcg tac cta tcc aag gca cat ggc atc aat ccc aac att agg act gga	4195
Ala Tyr Leu Ser Lys Ala His Gly Ile Asn Pro Asn Ile Arg Thr Gly	
1270 1275 1280 1285	
gtc agg acc gtg atg acc ggg gag gcc atc acg tac tcc aca tat ggc	4243

Val Arg Thr Val Met Thr Gly Glu Ala Ile Thr Tyr Ser Thr Tyr Gly	
1290 1295 1300	
aaa ttt ctc gcc gat ggg ggc tgc gct agc ggc gcc tat gac atc atc	4291
Lys Phe Leu Ala Asp Gly Gly Cys Ala Ser Gly Ala Tyr Asp Ile Ile	
1305 1310 1315	
ata tgc gat gaa tgc cac gct gtg gat gct acc tcc att ctc ggc atc	4339
Ile Cys Asp Glu Cys His Ala Val Asp Ala Thr Ser Ile Leu Gly Ile	
1320 1325 1330	
gga acg gtc ctt gat caa gca gag aca gcc ggg gtc aga cta act gtg	4387
Gly Thr Val Leu Asp Gln Ala Glu Thr Ala Gly Val Arg Leu Thr Val	
1335 1340 1345	
ctg gct acg gcc aca ccc ccc ggg tca gtg aca acc ccc cat ccc gat	4435
Leu Ala Thr Ala Thr Pro Pro Gly Ser Val Thr Thr Pro His Pro Asp	
1350 1355 1360 1365	
ata gaa gag gta ggc ctc ggg cgg gag ggt gag atc ccc ttc tat ggg	4483
Ile Glu Glu Val Gly Leu Gly Arg Glu Gly Glu Ile Pro Phe Tyr Gly	
1370 1375 1380	
agg gcg att ccc cta tcc tgc atc aag gga ggg aga cac ctg att ttc	4531
Arg Ala Ile Pro Leu Ser Cys Ile Lys Gly Gly Arg His Leu Ile Phe	
1385 1390 1395	
tgc cac tca aag aaa aag tgt gac gag ctc gcg gcg gcc ctt cgg ggc	4579
Cys His Ser Lys Lys Lys Cys Asp Glu Leu Ala Ala Ala Leu Arg Gly	
1400 1405 1410	

atg ggc ttg aat gcc gtg gca tac tat aga ggg ttg gac gtc tcc ata	4627
Met Gly Leu Asn Ala Val Ala Tyr Tyr Arg Gly Leu Asp Val Ser Ile	
1415 1420 1425	
ata cca gct cag gga gat gtg gtg gtc gtc gcc acc gac gcc ctc atg	4675
Ile Pro Ala Gln Gly Asp Val Val Val Val Ala Thr Asp Ala Leu Met	
1430 1435 1440 1445	
acg ggg tac act gga gac ttt gac tcc gtg atc gac tgc aat gta gcg	4723
Thr Gly Tyr Thr Gly Asp Phe Asp Ser Val Ile Asp Cys Asn Val Ala	
1450 1455 1460	
gtc acc caa gct gtc gac ttc agc ctg gac ccc acc ttc act ata acc	4771
Val Thr Gln Ala Val Asp Phe Ser Leu Asp Pro Thr Phe Thr Ile Thr	
1465 1470 1475	
aca cag act gtc cca caa gac gct gtc tca cgc agt cag cgc cgc ggg	4819
Thr Gln Thr Val Pro Gln Asp Ala Val Ser Arg Ser Gln Arg Arg Gly	
1480 1485 1490	
cgc aca ggt aga gga aga cag ggc act tat agg tat gtt tcc act ggt	4867
Arg Thr Gly Arg Gly Arg Gln Gly Thr Tyr Arg Tyr Val Ser Thr Gly	
1495 1500 1505	
gaa cga gcc tca gga atg ttt gac agt gta gtg ctt tgt gag tgc tac	4915
Glu Arg Ala Ser Gly Met Phe Asp Ser Val Val Leu Cys Glu Cys Tyr	
1510 1515 1520 1525	
gac gca ggg gct gcg tgg tac gat ctc aca cca gcg gag acc acc gtc	4963

Asp Ala Gly Ala Ala Trp Tyr Asp Leu Thr Pro Ala Glu Thr Thr Val

1530

1535

1540

agg ctt aga gcg tat ttc aac acg ccc ggc cta ccc gtg tgt caa gac 5011

Arg Leu Arg Ala Tyr Phe Asn Thr Pro Gly Leu Pro Val Cys Gln Asp

1545

1550

1555

cat ctt gaa ttt tgg gag gca gtt ttc acc ggc ctc aca cac ata gac 5059

His Leu Glu Phe Trp Glu Ala Val Phe Thr Gly Leu Thr His Ile Asp

1560

1565

1570

gcc cac ttc ctc tcc caa aca aag caa gcg ggg gag aac ttc gcg tac 5107

Ala His Phe Leu Ser Gln Thr Lys Gln Ala Gly Glu Asn Phe Ala Tyr

1575

1580

1585

cta gta gcc tac caa gct acg gtg tgc gcc aga gcc aag gcc cct ccc 5155

Leu Val Ala Tyr Gln Ala Thr Val Cys Ala Arg Ala Lys Ala Pro Pro

1590

1595

1600

1605

ccg tcc tgg gac gcc atg tgg aag tgc ctg gcc cga ctc aag cct acg 5203

Pro Ser Trp Asp Ala Met Trp Lys Cys Leu Ala Arg Leu Lys Pro Thr

1610

1615

1620

ctt gcg ggc ccc aca cct ctc ctg tac cgt ttg ggc cct att acc aat 5251

Leu Ala Gly Pro Thr Pro Leu Leu Tyr Arg Leu Gly Pro Ile Thr Asn

1625

1630

1635

gag gtc acc ctc aca cac cct ggg acg aag tac atc gcc aca tgc atg 5299

Glu Val Thr Leu Thr His Pro Gly Thr Lys Tyr Ile Ala Thr Cys Met

1640

1645

1650

caa gct gac ctt gag gtc atg acc agc acg tgg gtc cta gct gga gga	5347
Gln Ala Asp Leu Glu Val Met Thr Ser Thr Trp Val Leu Ala Gly Gly	
1655 1660 1665	
gtc ctg gca gcc gtc gcc gca tat tgc ctg gcg act gga tgc gtt tcc	5395
Val Leu Ala Ala Val Ala Ala Tyr Cys Leu Ala Thr Gly Cys Val Ser	
1670 1675 1680 1685	
atc atc ggc cgc ttg cac gtc aac cag cga gtc gtc gtt gcg ccg gat	5443
Ile Ile Gly Arg Leu His Val Asn Gln Arg Val Val Val Ala Pro Asp	
1690 1695 1700	
aag gag gtc ctg tat gag gct ttt gat gag atg gag gaa tgc gcc tct	5491
Lys Glu Val Leu Tyr Glu Ala Phe Asp Glu Met Glu Glu Cys Ala Ser	
1705 1710 1715	
agg gcg gct ctc atc gaa gag ggg cag cgg ata gcc gag atg ttg aag	5539
Arg Ala Ala Leu Ile Glu Glu Gly Gln Arg Ile Ala Glu Met Leu Lys	
1720 1725 1730	
tcc aag atc caa ggc ttg ctg cag cag gcc tct aag cag gcc cag gac	5587
Ser Lys Ile Gln Gly Leu Leu Gln Gln Ala Ser Lys Gln Ala Gln Asp	
1735 1740 1745	
ata caa ccc gct atg cag gct tca tgg ccc aaa gtg gaa caa ttt tgg	5635
Ile Gln Pro Ala Met Gln Ala Ser Trp Pro Lys Val Glu Gln Phe Trp	
1750 1755 1760 1765	
gcc aga cac atg tgg aac ttc att agc ggc atc caa tac ctc gca gga	5683

Ala Arg His Met Trp Asn Phe Ile Ser Gly Ile Gln Tyr Leu Ala Gly	
1770 1775 1780	
ttg tca aca ctg cca ggg aac ccc gcg gtg gct tcc atg atg gca ttc	5731
Leu Ser Thr Leu Pro Gly Asn Pro Ala Val Ala Ser Met Met Ala Phe	
1785 1790 1795	
agt gcc gcc ctc acc agt ccg ttg tcg acc agt acc acc atc ctt ctc	5779
Ser Ala Ala Leu Thr Ser Pro Leu Ser Thr Ser Thr Thr Ile Leu Leu	
1800 1805 1810	
aac atc atg gga ggc tgg tta gcg tcc cag atc gca cca ccc gcg ggg	5827
Asn Ile Met Gly Gly Trp Leu Ala Ser Gln Ile Ala Pro Pro Ala Gly	
1815 1820 1825	
gcc acc ggc ttt gtc gtc agt ggc ctg gtg ggg gct gcc gtg ggc agc	5875
Ala Thr Gly Phe Val Val Ser Gly Leu Val Gly Ala Ala Val Gly Ser	
1830 1835 1840 1845	
ata ggc ctg ggt aag gtg ctg gtg gac atc ctg gca gga tat ggt gcg	5923
Ile Gly Leu Gly Lys Val Leu Val Asp Ile Leu Ala Gly Tyr Gly Ala	
1850 1855 1860	
ggc att tcg ggg gcc ctc gtc gca ttc aag atc atg tct ggc gag aag	5971
Gly Ile Ser Gly Ala Leu Val Ala Phe Lys Ile Met Ser Gly Glu Lys	
1865 1870 1875	
ccc tct atg gaa gat gtc atc aat cta ctg cct ggg atc ctg tct ccg	6019
Pro Ser Met Glu Asp Val Ile Asn Leu Leu Pro Gly Ile Leu Ser Pro	
1880 1885 1890	

gga gcc ctg gtg gtg ggg gtc atc tgc gcg gcc att ctg cgc cgc cac 6067
 Gly Ala Leu Val Val Gly Val Ile Cys Ala Ala Ile Leu Arg Arg His
 1895 1900 1905

gtg gga ccg ggg gag ggc gcg gtc caa tgg atg aac agg ctt att gcc 6115
 Val Gly Pro Gly Glu Gly Ala Val Gln Trp Met Asn Arg Leu Ile Ala
 1910 1915 1920 1925

ttt gct tcc aga gga aac cac gtc gcc cct act cac tac gtg acg gag 6163
 Phe Ala Ser Arg Gly Asn His Val Ala Pro Thr His Tyr Val Thr Glu
 1930 1935 1940

tcg gat gcg tcg cag cgt gtg acc caa cta ctt ggc tct ctt act ata 6211
 Ser Asp Ala Ser Gln Arg Val Thr Gln Leu Leu Gly Ser Leu Thr Ile
 1945 1950 1955

acc agc cta ctc aga aga ctc cac aat tgg ata act gag gac tgc ccc 6259
 Thr Ser Leu Leu Arg Arg Leu His Asn Trp Ile Thr Glu Asp Cys Pro
 1960 1965 1970

atc cca tgc tcc gga tcc tgg ctc cgc gac gtg tgg gac tgg gtt tgc 6307
 Ile Pro Cys Ser Gly Ser Trp Leu Arg Asp Val Trp Asp Trp Val Cys
 1975 1980 1985

acc atc ttg aca gac ttc aaa aat tgg ctg acc tct aaa ttg ttc ccc 6355
 Thr Ile Leu Thr Asp Phe Lys Asn Trp Leu Thr Ser Lys Leu Phe Pro
 1990 1995 2000 2005

aag ctg ccc ggc ctc ccc ttc atc tct tgt caa aag ggg tac aag ggt 6403

Lys Leu Pro Gly Leu Pro Phe Ile Ser Cys Gln Lys Gly Tyr Lys Gly	
2010	2015
2020	
gtg tgg gcc ggc act ggc atc atg acc acg cgc tgc cct tgc ggc gcc	6451
Val Trp Ala Gly Thr Gly Ile Met Thr Thr Arg Cys Pro Cys Gly Ala	
2025	2030
2035	
aac atc tct ggc aat gtc cgc ctg ggc tct atg agg atc aca ggc cct	6499
Asn Ile Ser Gly Asn Val Arg Leu Gly Ser Met Arg Ile Thr Gly Pro	
2040	2045
2050	
aaa acc tgc atg aac acc tgg cag ggg acc ttt cct atc aat tgc tac	6547
Lys Thr Cys Met Asn Thr Trp Gln Gly Thr Phe Pro Ile Asn Cys Tyr	
2055	2060
2065	
acg gag ggc cag tgc gcg ccg aaa ccc ccc acg aac tac aag acc gcc	6595
Thr Glu Gly Gln Cys Ala Pro Lys Pro Pro Thr Asn Tyr Lys Thr Ala	
2070	2075
2080	2085
atc tgg agg gtg gcg gcc tcg gag tac gcg gag gtg acg cag cat ggc	6643
Ile Trp Arg Val Ala Ala Ser Glu Tyr Ala Glu Val Thr Gln His Gly	
2090	2095
2100	
tcg tac tcc tat gta aca gga ctg acc act gac aat ctg aaa att cct	6691
Ser Tyr Ser Tyr Val Thr Gly Leu Thr Thr Asp Asn Leu Lys Ile Pro	
2105	2110
2115	
tgc caa cta cct tct cca gag ttt ttc tcc tgg gtg gac ggt gtg cag	6739
Cys Gln Leu Pro Ser Pro Glu Phe Phe Ser Trp Val Asp Gly Val Gln	
2120	2125
2130	

atc cat agg ttt gca ccc aca cca aag ccg ttt ttc cgg gat gag gtc	6787
Ile His Arg Phe Ala Pro Thr Pro Lys Pro Phe Phe Arg Asp Glu Val	
2135	2140
2145	
tcg ttc tgc gtt ggg ctt aat tcc tat gct gtc ggg tcc cag ctt ccc	6835
Ser Phe Cys Val Gly Leu Asn Ser Tyr Ala Val Gly Ser Gln Leu Pro	
2150	2155
2160	2165
tgt gaa cct gag ccc gac gca gac gta ttg agg tcc atg cta aca gat	6883
Cys Glu Pro Glu Pro Asp Ala Asp Val Leu Arg Ser Met Leu Thr Asp	
2170	2175
2180	
ccg ccc cac atc acg gcg gag act gcg gcg cgg cgc ttg gca cgg gga	6931
Pro Pro His Ile Thr Ala Glu Thr Ala Ala Arg Arg Leu Ala Arg Gly	
2185	2190
2195	
tca cct cca tct gag gcg agc tcc tca gtg agc cag cta tca gca ccg	6979
Ser Pro Pro Ser Glu Ala Ser Ser Ser Val Ser Gln Leu Ser Ala Pro	
2200	2205
2210	
tcg ctg cgg gcc acc tgc acc acc cac agc aac acc tat gac gtg gac	7027
Ser Leu Arg Ala Thr Cys Thr Thr His Ser Asn Thr Tyr Asp Val Asp	
2215	2220
2225	
atg gtc gat gcc aac ctg ctc atg gag ggc ggt gtg gct cag aca gag	7075
Met Val Asp Ala Asn Leu Leu Met Glu Gly Gly Val Ala Gln Thr Glu	
2230	2235
2240	2245
cct gag tcc agg gtg ccc gtt ctg gac ttt ctc gag cca atg gcc gag	7123

Pro Glu Ser Arg Val Pro Val Leu Asp Phe Leu Glu Pro Met Ala Glu	
2250	2255
2260	
gaa gag agc gac ctt gag ccc tca ata cca tcg gag tgc atg ctc ccc 7171	
Glu Glu Ser Asp Leu Glu Pro Ser Ile Pro Ser Glu Cys Met Leu Pro	
2265	2270
2275	
agg agc ggg ttt cca cgg gcc tta ccg gct tgg gca cgg cct gac tac 7219	
Arg Ser Gly Phe Pro Arg Ala Leu Pro Ala Trp Ala Arg Pro Asp Tyr	
2280	2285
2290	
aac ccg ccg ctc gtg gaa tcg tgg agg agg cca gat tac caa ccg ccc 7267	
Asn Pro Pro Leu Val Glu Ser Trp Arg Arg Pro Asp Tyr Gln Pro Pro	
2295	2300
2305	
acc gtt gct ggt tgt gct ctc ccc ccc ccc aag aag gcc ccg acg cct 7315	
Thr Val Ala Gly Cys Ala Leu Pro Pro Pro Lys Lys Ala Pro Thr Pro	
2310	2315
2320	2325
ccc cca agg aga cgc cgg aca gtg ggt ctg agc gag agc acc ata tca 7363	
Pro Pro Arg Arg Arg Arg Thr Val Gly Leu Ser Glu Ser Thr Ile Ser	
2330	2335
2340	
gaa gcc ctc cag caa ctg gcc atc aag acc ttt ggc cag ccc ccc tcg 7411	
Glu Ala Leu Gln Gln Leu Ala Ile Lys Thr Phe Gly Gln Pro Pro Ser	
2345	2350
2355	
agc ggt gat gca ggc tcg tcc acg ggg gcg ggc gcc gcc gaa tcc ggc 7459	
Ser Gly Asp Ala Gly Ser Ser Thr Gly Ala Gly Ala Ala Glu Ser Gly	
2360	2365
2370	

ggt ccg acg tcc cct ggt gag ccg gcc ccc tca gag aca ggt tcc gcc	7507
Gly Pro Thr Ser Pro Gly Glu Pro Ala Pro Ser Glu Thr Gly Ser Ala	
2375 2380 2385	
tcc tct atg ccc ccc ctc gag ggg gag cct gga gat ccg gac ctg gag	7555
Ser Ser Met Pro Pro Leu Glu Gly Glu Pro Gly Asp Pro Asp Leu Glu	
2390 2395 2400 2405	
tct gat cag gta gag ctt caa cct ccc ccc cag ggg ggg ggg gta gct	7603
Ser Asp Gln Val Glu Leu Gln Pro Pro Pro Gln Gly Gly Gly Val Ala	
2410 2415 2420	
ccc ggt tcg ggc tcg ggg tct tgg tct act tgc tcc gag gag gac gat	7651
Pro Gly Ser Gly Ser Gly Ser Trp Ser Thr Cys Ser Glu Glu Asp Asp	
2425 2430 2435	
acc acc gtg tgc tgc tcc atg tca tac tcc tgg acc ggg gct cta ata	7699
Thr Thr Val Cys Cys Ser Met Ser Tyr Ser Trp Thr Gly Ala Leu Ile	
2440 2445 2450	
act ccc tgt agc ccc gaa gag gaa aag ttg cca atc aac cct ttg agt	7747
Thr Pro Cys Ser Pro Glu Glu Glu Lys Leu Pro Ile Asn Pro Leu Ser	
2455 2460 2465	
aac tcg ctg ttg cga tac cat aac aag gtg tac tgt aca aca tca aag	7795
Asn Ser Leu Leu Arg Tyr His Asn Lys Val Tyr Cys Thr Thr Ser Lys	
2470 2475 2480 2485	
agc gcc tca cag agg gct aaa aag gta act ttt gac agg acg caa gtg	7843

ES 2 376 354 T3

Ser Ala Ser Gln Arg Ala Lys Lys Val Thr Phe Asp Arg Thr Gln Val

2490

2495

2500

ctc gac gcc cat tat gac tca gtc tta aag gac atc aag cta gcg gct 7891

Leu Asp Ala His Tyr Asp Ser Val Leu Lys Asp Ile Lys Leu Ala Ala

2505

2510

2515

tcc aag gtc agc gca agg ctc ctc acc ttg gag gag gcg tgc cag ttg 7939

Ser Lys Val Ser Ala Arg Leu Leu Thr Leu Glu Glu Ala Cys Gln Leu

2520

2525

2530

act cca ccc cat tct gca aga tcc aag tat gga ttc ggg gcc aag gag 7987

Thr Pro Pro His Ser Ala Arg Ser Lys Tyr Gly Phe Gly Ala Lys Glu

2535

2540

2545

gtc cgc agc ttg tcc ggg agg gcc gtt aac cac atc aag tcc gtg tgg 8035

Val Arg Ser Leu Ser Gly Arg Ala Val Asn His Ile Lys Ser Val Trp

2550

2555

2560

2565

aag gac ctc ctg gaa gac cca caa aca cca att ccc aca acc atc atg 8083

Lys Asp Leu Leu Glu Asp Pro Gln Thr Pro Ile Pro Thr Thr Ile Met

2570

2575

2580

gcc aaa aat gag gtg ttc tgc gtg gac ccc gcc aag ggg ggt aag aaa 8131

Ala Lys Asn Glu Val Phe Cys Val Asp Pro Ala Lys Gly Gly Lys Lys

2585

2590

2595

cca gct cgc ctc atc gtt tac cct gac ctc ggc gtc cgg gtc tgc gag 8179

Pro Ala Arg Leu Ile Val Tyr Pro Asp Leu Gly Val Arg Val Cys Glu

2600

2605

2610

aaa atg gcc ctc tat gac att aca caa aag ctt cct cag gcg gta atg 8227
Lys Met Ala Leu Tyr Asp Ile Thr Gln Lys Leu Pro Gln Ala Val Met

2615 2620 2625

Gly Ala Ser Tyr Gly Phe Gln Tyr Ser Pro Ala Gln Arg Val Glu Tyr

2630 2635 2640 2645

ctc ttg aaa gca tgg gcg gaa aag aag gac ccc atg ggt ttt tcg tat 8323
Leu Leu Lys Ala Trp Ala Glu Lys Lys Asp Pro Met Gly Phe Ser Tyr

2650

gat acc cga tgc ttc gac tca acc gtc act gag aga gac atc agg acc 8371
Asp Thr Arg Cys Phe Asp Ser Thr Val Thr Glu Arg Asp Ile Arg Thr

2665

gag gag tcc ata tac cag gcc tgc tcc ctg ccc gag gag gcc cgc act 8419
Glu Glu Ser Ile Tyr Gln Ala Cys Ser Leu Pro Glu Glu Ala Arg Thr

2680

gcc ata cac tcg ctg act gag aga ctt tac gta gga ggg ccc atg ttc 8467
Ala Ile His Ser Leu Thr Glu Arg Leu Tyr Val Gly Gly Pro Met Phe

2695 2700 2705

aac agc aag ggt caa acc tgc ggt tac aga cgt tgc cgc gcc agc ggg 8515
Asn Ser Lys Gly Gln Thr Cys Gly Tyr Arg Arg Cys Arg Ala Ser Gly

2710 2715 2720 2725

gtg cta acc act agc atg ggt aac acc atc aca tgc tat gtg aaa gcc 8563

Val Leu Thr Thr Ser Met Gly Asn Thr Ile Thr Cys Tyr Val Lys Ala	
2730	2735
2740	
cta gcg gcc tgc aag gct gcg ggg ata gtt gcg ccc aca atg ctg gta	8611
Leu Ala Ala Cys Lys Ala Ala Gly Ile Val Ala Pro Thr Met Leu Val	
2745	2750
2755	
tgc ggc gat gac cta gta gtc atc tca gaa agc cag ggg act gag gag	8659
Cys Gly Asp Asp Leu Val Val Ile Ser Glu Ser Gln Gly Thr Glu Glu	
2760	2765
2770	
gac gag cgg aac ctg aga gcc ttc acg gag gcc atg acc agg tac tct	8707
Asp Glu Arg Asn Leu Arg Ala Phe Thr Glu Ala Met Thr Arg Tyr Ser	
2775	2780
2785	
gcc cct cct ggt gat ccc ccc aga ccg gaa tat gac ctg gag cta ata	8755
Ala Pro Pro Gly Asp Pro Pro Arg Pro Glu Tyr Asp Leu Glu Leu Ile	
2790	2795
2800	2805
aca tcc tgt tcc tca aat gtg tct gtg gcg ttg ggc ccg cgg ggc cgc	8803
Thr Ser Cys Ser Ser Asn Val Ser Val Ala Leu Gly Pro Arg Gly Arg	
2810	2815
2820	
cgc aga tac tac ctg acc aga gac cca acc act cca ctc gcc cgg gct	8851
Arg Arg Tyr Tyr Leu Thr Arg Asp Pro Thr Thr Pro Leu Ala Arg Ala	
2825	2830
2835	
gcc tgg gaa aca gtt aga cac tcc cct atc aat tca tgg ctg gga aac	8899
Ala Trp Glu Thr Val Arg His Ser Pro Ile Asn Ser Trp Leu Gly Asn	
2840	2845
2850	

atc atc cag tat gct cca acc ata tgg gtt cgc atg gtc cta atg aca 8947
 Ile Ile Gln Tyr Ala Pro Thr Ile Trp Val Arg Met Val Leu Met Thr
 2855 2860 2865

cac ttc ttc tcc att ctc atg gtc caa gac acc ctg gac cag aac ctc 8995
 His Phe Phe Ser Ile Leu Met Val Gln Asp Thr Leu Asp Gln Asn Leu
 2870 2875 2880 2885

aac ttt gag atg tat gga tca gta tac tcc gtg aat cct ttg gac ctt 9043
 Asn Phe Glu Met Tyr Gly Ser Val Tyr Ser Val Asn Pro Leu Asp Leu
 2890 2895 2900

cca gcc ata att gag agg tta cac ggg ctt gac gcc ttt tct atg cac 9091
 Pro Ala Ile Ile Glu Arg Leu His Gly Leu Asp Ala Phe Ser Met His
 2905 2910 2915

aca tac tct cac cac gaa ctg acg cgg gtg gct tca gcc ctc aga aaa 9139
 Thr Tyr Ser His His Glu Leu Thr Arg Val Ala Ser Ala Leu Arg Lys
 2920 2925 2930

ctt ggg gcg cca ccc ctc agg gtg tgg aag agt cgg gct cgc gca gtc 9187
 Leu Gly Ala Pro Pro Leu Arg Val Trp Lys Ser Arg Ala Arg Ala Val
 2935 2940 2945

agg gcg tcc ctc atc tcc cgt gga ggg aaa gcg gcc gtt tgc ggc cga 9235
 Arg Ala Ser Leu Ile Ser Arg Gly Gly Lys Ala Ala Val Cys Gly Arg
 2950 2955 2960 2965

tat ctc ttc aat tgg gcg gtg aag acc aag ctc aaa ctc act cca ttg 9283

Tyr Leu Phe Asn Trp Ala Val Lys Thr Lys Leu Lys Leu Thr Pro Leu
 2970 2975 2980

ccg gag gcg cgc cta ctg gac tta tcc agt tgg ttc acc gtc ggc gcc 9331
 Pro Glu Ala Arg Leu Leu Asp Leu Ser Ser Trp Phe Thr Val Gly Ala
 2985 2990 2995

ggc ggg ggc gac att ttt cac agc gtg tcg cgc gcc cga ccc cgc tca 9379
 Gly Gly Gly Asp Ile Phe His Ser Val Ser Arg Ala Arg Pro Arg Ser
 3000 3005 3010

tta ctc ttc ggc cta ctc cta ctt ttc gta ggg gta ggc ctc ttc cta 9427
 Leu Leu Phe Gly Leu Leu Leu Leu Phe Val Gly Val Gly Leu Phe Leu
 3015 3020 3025

ctc ccc gct cgg tag agcggcacac actaggtaca ctccatagct aactgttcct 9482
 Leu Pro Ala Arg
 3030

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt ttcttttttt tttttttccc 9542

tctttcttcc cttctcatct tattctactt tctttcttgg tggtccatc ttagccctag 9602

tcacggctag ctgtgaaagg tccgtgagcc gcatgactgc agagagtgcc gtaactggtc 9662

tctctgcaga tcatgt 9678

<210> 11
 <211> 3033
 <212> PRT
 <213> Virus de la hepatitis C
 <400> 11

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

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

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

Leu Ser Thr Gly Leu Leu His Leu His Gln Asn Ile Val Asp Val Gln			
690	695	700	
Tyr Met Tyr Gly Leu Ser Pro Ala Ile Thr Lys Tyr Val Val Arg Trp			
705	710	715	720
Glu Trp Val Val Leu Leu Phe Leu Leu Leu Ala Asp Ala Arg Val Cys			
725	730	735	
Ala Cys Leu Trp Met Leu Ile Leu Leu Gly Gln Ala Glu Ala Ala Leu			
740	745	750	
Glu Lys Leu Val Val Leu His Ala Ala Ser Ala Ala Asn Cys His Gly			
755	760	765	
Leu Leu Tyr Phe Ala Ile Phe Phe Val Ala Ala Trp His Ile Arg Gly			
770	775	780	
Arg Val Val Pro Leu Thr Thr Tyr Cys Leu Thr Gly Leu Trp Pro Phe			
785	790	795	800
Cys Leu Leu Leu Met Ala Leu Pro Arg Gln Ala Tyr Ala Tyr Asp Ala			
805	810	815	
Pro Val His Gly Gln Ile Gly Val Gly Leu Leu Ile Leu Ile Thr Leu			
820	825	830	
Phe Thr Leu Thr Pro Gly Tyr Lys Thr Leu Leu Gly Gln Cys Leu Trp			
835	840	845	
Trp Leu Cys Tyr Leu Leu Thr Leu Gly Glu Ala Met Ile Gln Glu Trp			
850	855	860	
Val Pro Pro Met Gln Val Arg Gly Gly Arg Asp Gly Ile Ala Trp Ala			
865	870	875	880
Val Thr Ile Phe Cys Pro Gly Val Val Phe Asp Ile Thr Lys Trp Leu			
885	890	895	
Leu Ala Leu Leu Gly Pro Ala Tyr Leu Leu Arg Ala Ala Leu Thr His			
900	905	910	
Val Pro Tyr Phe Val Arg Ala His Ala Leu Ile Arg Val Cys Ala Leu			
915	920	925	

Val Lys Gln Leu Ala Gly Gly Arg Tyr Val Gln Val Ala Leu Leu Ala			
930	935	940	
Leu Gly Arg Trp Thr Gly Thr Tyr Ile Tyr Asp His Leu Thr Pro Met			
945	950	955	960
Ser Asp Trp Ala Ala Ser Gly Leu Arg Asp Leu Ala Val Ala Val Glu			
965	970	975	
Pro Ile Ile Phe Ser Pro Met Glu Lys Lys Val Ile Val Trp Gly Ala			
980	985	990	
Glu Thr Ala Ala Cys Gly Asp Ile Leu His Gly Leu Pro Val Ser Ala			
995	1000	1005	
Arg Leu Gly Gln Glu Ile Leu Leu Gly Pro Ala Asp Gly Tyr Thr Ser			
1010	1015	1020	
Lys Gly Trp Lys Leu Leu Ala Pro Ile Thr Ala Tyr Ala Gln Gln Thr			
1025	1030	1035	1040
Arg Gly Leu Leu Gly Ala Ile Val Val Ser Met Thr Gly Arg Asp Arg			
1045	1050	1055	
Thr Glu Gln Ala Gly Glu Val Gln Ile Leu Ser Thr Val Ser Gln Ser			
1060	1065	1070	
Phe Leu Gly Thr Thr Ile Ser Gly Val Leu Trp Thr Val Tyr His Gly			
1075	1080	1085	
Ala Gly Asn Lys Thr Leu Ala Gly Leu Arg Gly Pro Val Thr Gln Met			
1090	1095	1100	
Tyr Ser Ser Ala Glu Gly Asp Leu Val Gly Trp Pro Ser Pro Pro Gly			
1105	1110	1115	1120
Thr Lys Ser Leu Glu Pro Cys Lys Cys Gly Ala Val Asp Leu Tyr Leu			
1125	1130	1135	
Val Thr Arg Asn Ala Asp Val Ile Pro Ala Arg Arg Arg Gly Asp Lys			
1140	1145	1150	
Arg Gly Ala Leu Leu Ser Pro Arg Pro Ile Ser Thr Leu Lys Gly Ser			
1155	1160	1165	

Ser Gly Gly Pro Val Leu Cys Pro Arg Gly His Val Val Gly Leu Phe			
1170	1175	1180	
Arg Ala Ala Val Cys Ser Arg Gly Val Ala Lys Ser Ile Asp Phe Ile			
1185	1190	1195	1200
Pro Val Glu Thr Leu Asp Val Val Thr Arg Ser Pro Thr Phe Ser Asp			
1205	1210	1215	
Asn Ser Thr Pro Pro Ala Val Pro Gln Thr Tyr Gln Val Gly Tyr Leu			
1220	1225	1230	
His Ala Pro Thr Gly Ser Gly Lys Ser Thr Lys Val Pro Val Ala Tyr			
1235	1240	1245	
Ala Ala Gln Gly Tyr Lys Val Leu Val Leu Asn Pro Ser Val Ala Ala			
1250	1255	1260	
Thr Leu Gly Phe Gly Ala Tyr Leu Ser Lys Ala His Gly Ile Asn Pro			
1265	1270	1275	1280
Asn Ile Arg Thr Gly Val Arg Thr Val Met Thr Gly Glu Ala Ile Thr			
1285	1290	1295	
Tyr Ser Thr Tyr Gly Lys Phe Leu Ala Asp Gly Gly Cys Ala Ser Gly			
1300	1305	1310	
Ala Tyr Asp Ile Ile Ile Cys Asp Glu Cys His Ala Val Asp Ala Thr			
1315	1320	1325	
Ser Ile Leu Gly Ile Gly Thr Val Leu Asp Gln Ala Glu Thr Ala Gly			
1330	1335	1340	
Val Arg Leu Thr Val Leu Ala Thr Ala Thr Pro Pro Gly Ser Val Thr			
1345	1350	1355	1360
Thr Pro His Pro Asp Ile Glu Glu Val Gly Leu Gly Arg Glu Gly Glu			
1365	1370	1375	
Ile Pro Phe Tyr Gly Arg Ala Ile Pro Leu Ser Cys Ile Lys Gly Gly			
1380	1385	1390	
Arg His Leu Ile Phe Cys His Ser Lys Lys Lys Cys Asp Glu Leu Ala			
1395	1400	1405	

Ala Ala Leu Arg Gly Met Gly Leu Asn Ala Val Ala Tyr Tyr Arg Gly			
1410	1415	1420	
Leu Asp Val Ser Ile Ile Pro Ala Gln Gly Asp Val Val Val Val Ala			
1425	1430	1435	1440
Thr Asp Ala Leu Met Thr Gly Tyr Thr Gly Asp Phe Asp Ser Val Ile			
1445	1450	1455	
Asp Cys Asn Val Ala Val Thr Gln Ala Val Asp Phe Ser Leu Asp Pro			
1460	1465	1470	
Thr Phe Thr Ile Thr Thr Gln Thr Val Pro Gln Asp Ala Val Ser Arg			
1475	1480	1485	
Ser Gln Arg Arg Gly Arg Thr Gly Arg Gly Arg Gln Gly Thr Tyr Arg			
1490	1495	1500	
Tyr Val Ser Thr Gly Glu Arg Ala Ser Gly Met Phe Asp Ser Val Val			
1505	1510	1515	1520
Leu Cys Glu Cys Tyr Asp Ala Gly Ala Ala Trp Tyr Asp Leu Thr Pro			
1525	1530	1535	
Ala Glu Thr Thr Val Arg Leu Arg Ala Tyr Phe Asn Thr Pro Gly Leu			
1540	1545	1550	
Pro Val Cys Gln Asp His Leu Glu Phe Trp Glu Ala Val Phe Thr Gly			
1555	1560	1565	
Leu Thr His Ile Asp Ala His Phe Leu Ser Gln Thr Lys Gln Ala Gly			
1570	1575	1580	
Glu Asn Phe Ala Tyr Leu Val Ala Tyr Gln Ala Thr Val Cys Ala Arg			
1585	1590	1595	1600
Ala Lys Ala Pro Pro Pro Ser Trp Asp Ala Met Trp Lys Cys Leu Ala			
1605	1610	1615	
Arg Leu Lys Pro Thr Leu Ala Gly Pro Thr Pro Leu Leu Tyr Arg Leu			
1620	1625	1630	
Gly Pro Ile Thr Asn Glu Val Thr Leu Thr His Pro Gly Thr Lys Tyr			
1635	1640	1645	

Ile Ala Thr Cys Met Gln Ala Asp Leu Glu Val Met Thr Ser Thr Trp			
1650	1655	1660	
Val Leu Ala Gly Gly Val Leu Ala Ala Val Ala Ala Tyr Cys Leu Ala			
1665	1670	1675	1680
Thr Gly Cys Val Ser Ile Ile Gly Arg Leu His Val Asn Gln Arg Val			
1685	1690	1695	
Val Val Ala Pro Asp Lys Glu Val Leu Tyr Glu Ala Phe Asp Glu Met			
1700	1705	1710	
Glu Glu Cys Ala Ser Arg Ala Ala Leu Ile Glu Glu Gly Gln Arg Ile			
1715	1720	1725	
Ala Glu Met Leu Lys Ser Lys Ile Gln Gly Leu Leu Gln Gln Ala Ser			
1730	1735	1740	
Lys Gln Ala Gln Asp Ile Gln Pro Ala Met Gln Ala Ser Trp Pro Lys			
1745	1750	1755	1760
Val Glu Gln Phe Trp Ala Arg His Met Trp Asn Phe Ile Ser Gly Ile			
1765	1770	1775	
Gln Tyr Leu Ala Gly Leu Ser Thr Leu Pro Gly Asn Pro Ala Val Ala			
1780	1785	1790	
Ser Met Met Ala Phe Ser Ala Ala Leu Thr Ser Pro Leu Ser Thr Ser			
1795	1800	1805	
Thr Thr Ile Leu Leu Asn Ile Met Gly Gly Trp Leu Ala Ser Gln Ile			
1810	1815	1820	
Ala Pro Pro Ala Gly Ala Thr Gly Phe Val Val Ser Gly Leu Val Gly			
1825	1830	1835	1840
Ala Ala Val Gly Ser Ile Gly Leu Gly Lys Val Leu Val Asp Ile Leu			
1845	1850	1855	
Ala Gly Tyr Gly Ala Gly Ile Ser Gly Ala Leu Val Ala Phe Lys Ile			
1860	1865	1870	
Met Ser Gly Glu Lys Pro Ser Met Glu Asp Val Ile Asn Leu Leu Pro			
1875	1880	1885	

Gly Ile Leu Ser Pro Gly Ala Leu Val Val Gly Val Ile Cys Ala Ala			
1890	1895	1900	
Ile Leu Arg Arg His Val Gly Pro Gly Glu Gly Ala Val Gln Trp Met			
1905	1910	1915	1920
Asn Arg Leu Ile Ala Phe Ala Ser Arg Gly Asn His Val Ala Pro Thr			
	1925	1930	1935
His Tyr Val Thr Glu Ser Asp Ala Ser Gln Arg Val Thr Gln Leu Leu			
	1940	1945	1950
Gly Ser Leu Thr Ile Thr Ser Leu Leu Arg Arg Leu His Asn Trp Ile			
	1955	1960	1965
Thr Glu Asp Cys Pro Ile Pro Cys Ser Gly Ser Trp Leu Arg Asp Val			
	1970	1975	1980
Trp Asp Trp Val Cys Thr Ile Leu Thr Asp Phe Lys Asn Trp Leu Thr			
1985	1990	1995	2000
Ser Lys Leu Phe Pro Lys Leu Pro Gly Leu Pro Phe Ile Ser Cys Gln			
	2005	2010	2015
Lys Gly Tyr Lys Gly Val Trp Ala Gly Thr Gly Ile Met Thr Thr Arg			
	2020	2025	2030
Cys Pro Cys Gly Ala Asn Ile Ser Gly Asn Val Arg Leu Gly Ser Met			
	2035	2040	2045
Arg Ile Thr Gly Pro Lys Thr Cys Met Asn Thr Trp Gln Gly Thr Phe			
	2050	2055	2060
Pro Ile Asn Cys Tyr Thr Glu Gly Gln Cys Ala Pro Lys Pro Pro Thr			
2065	2070	2075	2080
Asn Tyr Lys Thr Ala Ile Trp Arg Val Ala Ala Ser Glu Tyr Ala Glu			
	2085	2090	2095
Val Thr Gln His Gly Ser Tyr Ser Tyr Val Thr Gly Leu Thr Thr Asp			
	2100	2105	2110
Asn Leu Lys Ile Pro Cys Gln Leu Pro Ser Pro Glu Phe Phe Ser Trp			
	2115	2120	2125

Val Asp Gly Val Gln Ile His Arg Phe Ala Pro Thr Pro Lys Pro Phe			
2130	2135	2140	
Phe Arg Asp Glu Val Ser Phe Cys Val Gly Leu Asn Ser Tyr Ala Val			
2145	2150	2155	2160
Gly Ser Gln Leu Pro Cys Glu Pro Glu Pro Asp Ala Asp Val Leu Arg			
2165	2170	2175	
Ser Met Leu Thr Asp Pro Pro His Ile Thr Ala Glu Thr Ala Ala Arg			
2180	2185	2190	
Arg Leu Ala Arg Gly Ser Pro Pro Ser Glu Ala Ser Ser Ser Val Ser			
2195	2200	2205	
Gln Leu Ser Ala Pro Ser Leu Arg Ala Thr Cys Thr Thr His Ser Asn			
2210	2215	2220	
Thr Tyr Asp Val Asp Met Val Asp Ala Asn Leu Leu Met Glu Gly Gly			
2225	2230	2235	2240
Val Ala Gln Thr Glu Pro Glu Ser Arg Val Pro Val Leu Asp Phe Leu			
2245	2250	2255	
Glu Pro Met Ala Glu Glu Glu Ser Asp Leu Glu Pro Ser Ile Pro Ser			
2260	2265	2270	
Glu Cys Met Leu Pro Arg Ser Gly Phe Pro Arg Ala Leu Pro Ala Trp			
2275	2280	2285	
Ala Arg Pro Asp Tyr Asn Pro Pro Leu Val Glu Ser Trp Arg Arg Pro			
2290	2295	2300	
Asp Tyr Gln Pro Pro Thr Val Ala Gly Cys Ala Leu Pro Pro Pro Lys			
2305	2310	2315	2320
Lys Ala Pro Thr Pro Pro Pro Arg Arg Arg Arg Thr Val Gly Leu Ser			
2325	2330	2335	
Glu Ser Thr Ile Ser Glu Ala Leu Gln Gln Leu Ala Ile Lys Thr Phe			
2340	2345	2350	
Gly Gln Pro Pro Ser Ser Gly Asp Ala Gly Ser Ser Thr Gly Ala Gly			
2355	2360	2365	

Ala Ala Glu Ser Gly Gly Pro Thr Ser Pro Gly Glu Pro Ala Pro Ser			
2370	2375	2380	
Glu Thr Gly Ser Ala Ser Ser Met Pro Pro Leu Glu Gly Glu Pro Gly			
2385	2390	2395	2400
Asp Pro Asp Leu Glu Ser Asp Gln Val Glu Leu Gln Pro Pro Pro Gln			
2405	2410	2415	
Gly Gly Gly Val Ala Pro Gly Ser Gly Ser Gly Ser Trp Ser Thr Cys			
2420	2425	2430	
Ser Glu Glu Asp Asp Thr Thr Val Cys Cys Ser Met Ser Tyr Ser Trp			
2435	2440	2445	
Thr Gly Ala Leu Ile Thr Pro Cys Ser Pro Glu Glu Glu Lys Leu Pro			
2450	2455	2460	
Ile Asn Pro Leu Ser Asn Ser Leu Leu Arg Tyr His Asn Lys Val Tyr			
2465	2470	2475	2480
Cys Thr Thr Ser Lys Ser Ala Ser Gln Arg Ala Lys Lys Val Thr Phe			
2485	2490	2495	
Asp Arg Thr Gln Val Leu Asp Ala His Tyr Asp Ser Val Leu Lys Asp			
2500	2505	2510	
Ile Lys Leu Ala Ala Ser Lys Val Ser Ala Arg Leu Leu Thr Leu Glu			
2515	2520	2525	
Glu Ala Cys Gln Leu Thr Pro Pro His Ser Ala Arg Ser Lys Tyr Gly			
2530	2535	2540	
Phe Gly Ala Lys Glu Val Arg Ser Leu Ser Gly Arg Ala Val Asn His			
2545	2550	2555	2560
Ile Lys Ser Val Trp Lys Asp Leu Leu Glu Asp Pro Gln Thr Pro Ile			
2565	2570	2575	
Pro Thr Thr Ile Met Ala Lys Asn Glu Val Phe Cys Val Asp Pro Ala			
2580	2585	2590	
Lys Gly Gly Lys Lys Pro Ala Arg Leu Ile Val Tyr Pro Asp Leu Gly			
2595	2600	2605	

Val Arg Val Cys Glu Lys Met Ala Leu Tyr Asp Ile Thr Gln Lys Leu			
2610	2615	2620	
Pro Gln Ala Val Met Gly Ala Ser Tyr Gly Phe Gln Tyr Ser Pro Ala			
2625	2630	2635	2640
Gln Arg Val Glu Tyr Leu Leu Lys Ala Trp Ala Glu Lys Lys Asp Pro			
2645	2650	2655	
Met Gly Phe Ser Tyr Asp Thr Arg Cys Phe Asp Ser Thr Val Thr Glu			
2660	2665	2670	
Arg Asp Ile Arg Thr Glu Glu Ser Ile Tyr Gln Ala Cys Ser Leu Pro			
2675	2680	2685	
Glu Glu Ala Arg Thr Ala Ile His Ser Leu Thr Glu Arg Leu Tyr Val			
2690	2695	2700	
Gly Gly Pro Met Phe Asn Ser Lys Gly Gln Thr Cys Gly Tyr Arg Arg			
2705	2710	2715	2720
Cys Arg Ala Ser Gly Val Leu Thr Thr Ser Met Gly Asn Thr Ile Thr			
2725	2730	2735	
Cys Tyr Val Lys Ala Leu Ala Ala Cys Lys Ala Ala Gly Ile Val Ala			
2740	2745	2750	
Pro Thr Met Leu Val Cys Gly Asp Asp Leu Val Val Ile Ser Glu Ser			
2755	2760	2765	
Gln Gly Thr Glu Glu Asp Glu Arg Asn Leu Arg Ala Phe Thr Glu Ala			
2770	2775	2780	
Met Thr Arg Tyr Ser Ala Pro Pro Gly Asp Pro Pro Arg Pro Glu Tyr			
2785	2790	2795	2800
Asp Leu Glu Leu Ile Thr Ser Cys Ser Ser Asn Val Ser Val Ala Leu			
2805	2810	2815	
Gly Pro Arg Gly Arg Arg Arg Tyr Tyr Leu Thr Arg Asp Pro Thr Thr			
2820	2825	2830	
Pro Leu Ala Arg Ala Ala Trp Glu Thr Val Arg His Ser Pro Ile Asn			
2835	2840	2845	

Ser Trp Leu Gly Asn Ile Ile Gln Tyr Ala Pro Thr Ile Trp Val Arg
2850 2855 2860

Met Val Leu Met Thr His Phe Phe Ser Ile Leu Met Val Gln Asp Thr
2865 2870 2875 2880

Leu Asp Gln Asn Leu Asn Phe Glu Met Tyr Gly Ser Val Tyr Ser Val
2885 2890 2895

Asn Pro Leu Asp Leu Pro Ala Ile Ile Glu Arg Leu His Gly Leu Asp
2900 2905 2910

Ala Phe Ser Met His Thr Tyr Ser His His Glu Leu Thr Arg Val Ala
2915 2920 2925

Ser Ala Leu Arg Lys Leu Gly Ala Pro Pro Leu Arg Val Trp Lys Ser
2930 2935 2940

Arg Ala Arg Ala Val Arg Ala Ser Leu Ile Ser Arg Gly Gly Lys Ala
2945 2950 2955 2960

Ala Val Cys Gly Arg Tyr Leu Phe Asn Trp Ala Val Lys Thr Lys Leu
2965 2970 2975

Lys Leu Thr Pro Leu Pro Glu Ala Arg Leu Leu Asp Leu Ser Ser Trp
2980 2985 2990

Phe Thr Val Gly Ala Gly Gly Gly Asp Ile Phe His Ser Val Ser Arg
2995 3000 3005

Ala Arg Pro Arg Ser Leu Leu Phe Gly Leu Leu Leu Leu Phe Val Gly
3010 3015 3020

Val Gly Leu Phe Leu Leu Pro Ala Arg
3025 3030

<210> 12
<211> 13
<212> ADN
5 <213> Virus de la hepatitis C
<400> 12
ctagccgagt agc 13
<210> 13
<211> 26
10 <212> ADN
<213> Virus de la hepatitis C
<400> 13
ccccggcagg cttatgccta gaattc 26
<210> 14

<211> 6
<212> PRT
<213> Virus de la hepatitis C
<400> 14

Pro Arg Gln Ala Tyr Ala

1

5

5

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para producir una partícula recombinante similar al virus de la hepatitis C que comprende, introducirla en
5 (i) una célula portadora de un replicón de ARN subgenómico que no incluye genes que codifican las proteínas estructurales del virus de la hepatitis C y que comprende una secuencia nucleotídica que comprende la región no traducida 5', la secuencia nucleotídica codificante para la proteína no estructural,
10 y la región no traducida 3' de un ARN genómico obtenido a partir de una cepa del virus de la hepatitis C del genotipo 1b que es una cepa con1 o una cepa obtenida a partir del mismo en la que las proteínas no estructurales son las proteínas NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B
15 (ii) un vector del virus vaccinia o un promotor EF-1 α portador del vector que expresa las proteínas Core, E1, E2 y p7 obtenidas a partir de al menos una cepa de virus seleccionada entre el grupo que consiste en cepas del virus de la hepatitis C del genotipo 1a, 1b, 2a, 2b, 3a y 3b que es diferente de la cepa del virus de la hepatitis C que se ha definido en (i)
20 cultivar la célula y recuperar la partícula similar al virus producida.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la cepa del virus de la hepatitis C como se ha definido en (ii) es del genotipo 1 a y es la cepa H77c, 1, H o HC-J1.
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la cepa del virus de la hepatitis C como se ha definido en (ii) es del genotipo 1b y es la cepa J1, TH, J, JT o BK.
25 4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la cepa del virus de la hepatitis C como se ha definido en (ii) es del genotipo 2a y es la cepa JFH1, HC-J6, JCH1 o J6CF.
30 5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la cepa del virus de la hepatitis C como se ha definido en (ii) es del genotipo 3a y es la cepa NZL1, K3a/650, 452 o E-b1.
6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la cepa del virus de la hepatitis C como se ha definido en (ii) es del genotipo 3b y es la cepa Tr.
35 7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el replicón de ARN comprende adicionalmente al menos una secuencia del sitio de entrada interno del ribosoma (IRES) y/o al menos un gen extraño.
8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la secuencia IRES y/o el gen extraño se sitúan entre la región no traducida 5' y la secuencia codificante de la proteína NS3.
40 9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la célula es una célula animal.
10. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la célula animal es la célula Huh7, la célula HepG2, o una línea celular establecida obtenida a partir de estas células.
45 11. Una partícula recombinante similar al virus de la hepatitis C producida mediante el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene la propiedad de infectar pero no la capacidad de transmitir.

Fig. 1

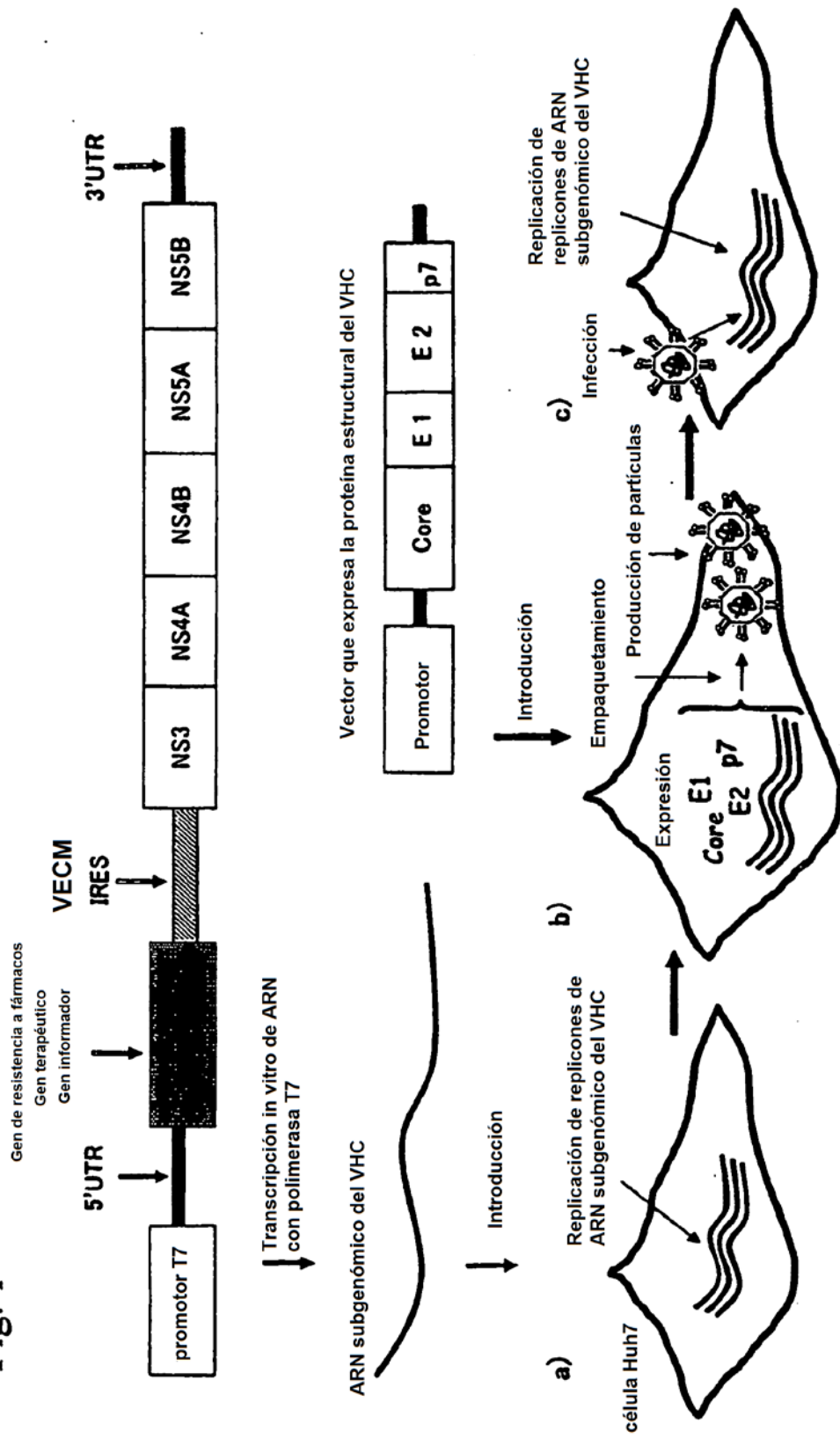
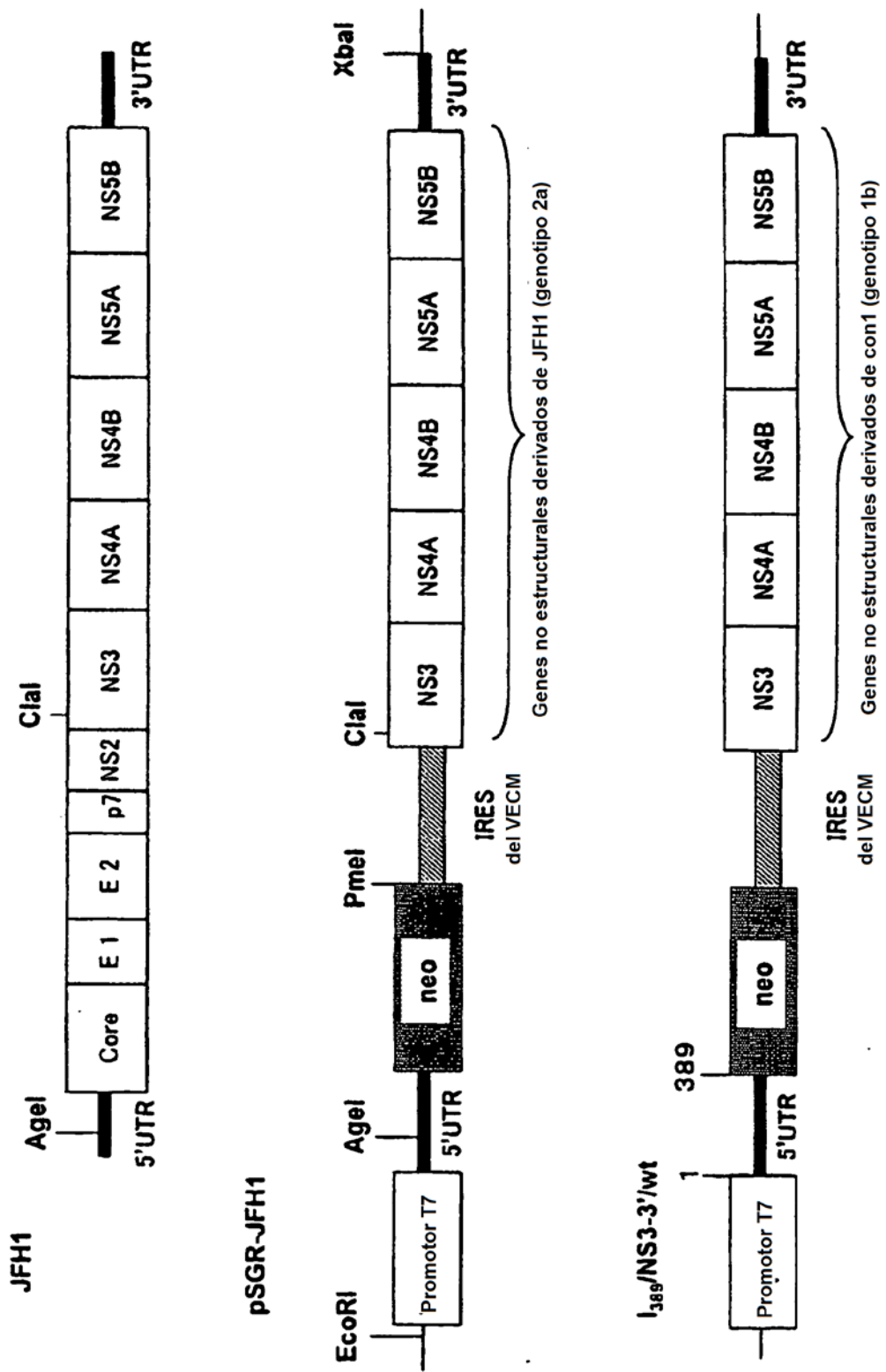


Fig. 2



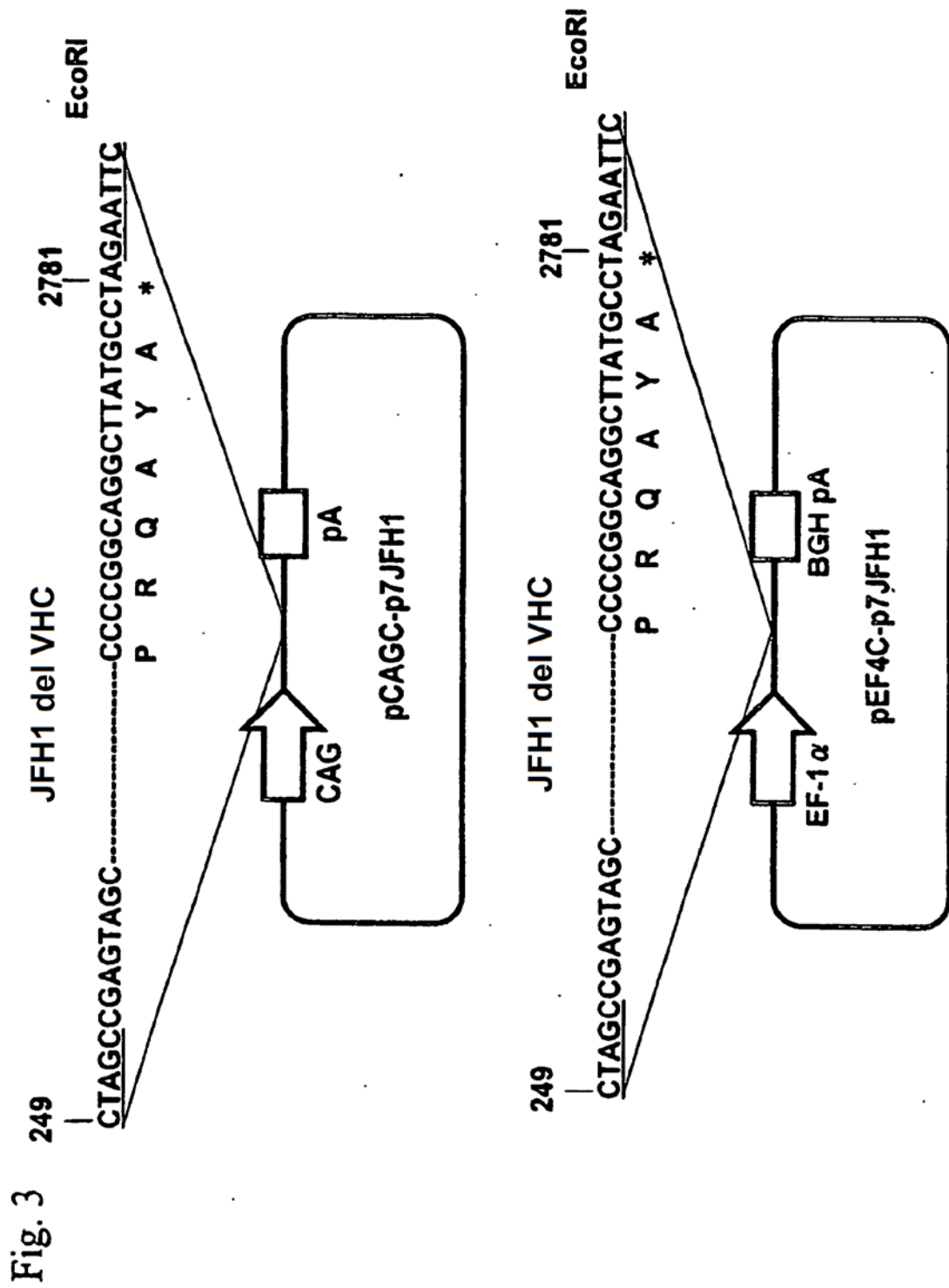


Fig. 4

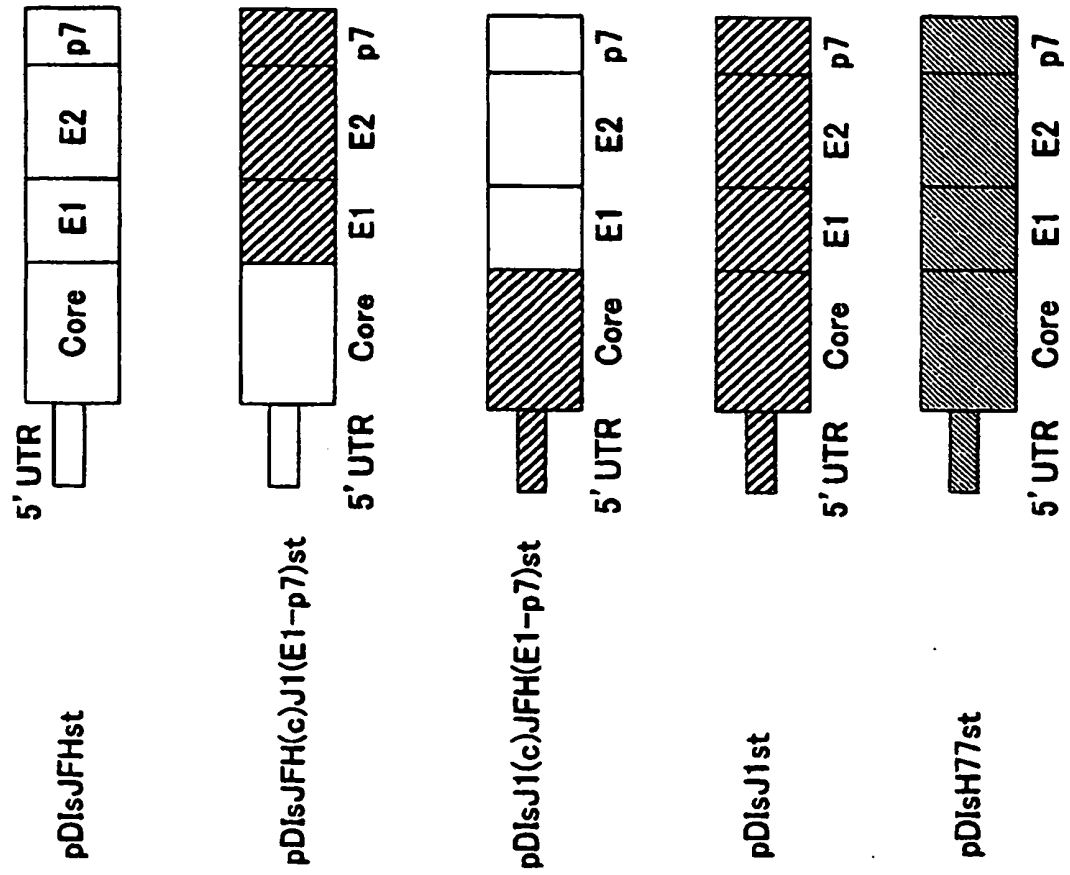


Fig. 5

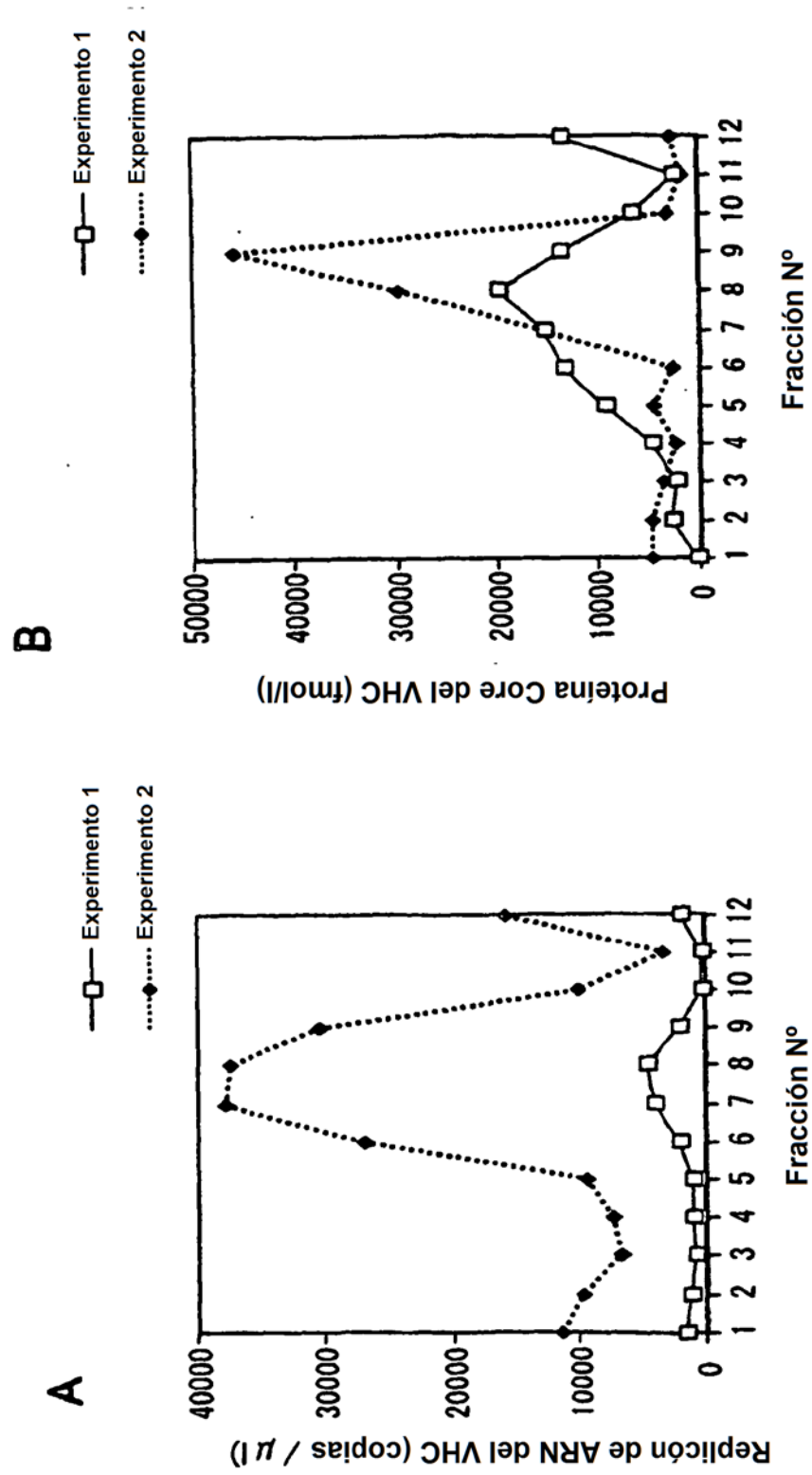


Fig. 6

