

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 573 704**

51 Int. Cl.:

**C12N 7/04** (2006.01)

**A61K 35/76** (2015.01)

**A61P 31/14** (2006.01)

**C12N 15/09** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.03.2009 E 09717492 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.05.2016 EP 2267120**

54 Título: **Virus de la variolovacuna recombinante que tiene el gen del virus de la hepatitis C**

30 Prioridad:

**07.03.2008 JP 2008057515**

**18.11.2008 JP 2008294361**

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

**09.06.2016**

73 Titular/es:

**TOKYO METROPOLITAN INSTITUTE OF  
MEDICAL SCIENCE (50.0%)**

**1-6, Kamikitazawa 2-chome Setagaya-ku  
Tokyo 156-0057, JP y**

**THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC RESEARCH  
INSTITUTE (50.0%)**

72 Inventor/es:

**KOHARA, MICHINORI y  
MURAI, FUKASHI**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 573 704 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Virus de la variolovacuna recombinante que tiene el gen del virus de la hepatitis C

**5 Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un agente profiláctico y un agente terapéutico para la hepatitis C. Más específicamente, la presente invención se refiere a un virus de la variolovacuna recombinante que puede expresar un gen del virus de la hepatitis C como se define en la reivindicación 1, y a un agente profiláctico y un agente terapéutico para la hepatitis C que comprende el virus de la variolovacuna recombinante.

**Antecedentes de la invención**

En Japón, hay más de dos millones de personas infectadas con el virus de la hepatitis C (VHC), entre las cuales aproximadamente 36.000 personas desarrollan hepatocarcinoma todos los años donde en la mayoría de los pacientes con cáncer produce la muerte. Actualmente, el interferón (IFN) se utiliza como el único fármaco anti-VHC eficaz, que tiene un efecto limitado y efectos secundarios graves. Por lo tanto, existe una demanda del desarrollo de un fármaco más seguro y más eficaz. Además, dado que el envejecimiento de las personas infectadas aumenta el riesgo de desarrollar cáncer, hay una necesidad de un remedio urgente.

En el momento actual, se han desarrollado fármacos, tales como análogos de ácidos nucleicos, inhibidores de la proteasa y similares, que suprimen la replicación viral del VHC y utilizado para tratamiento. En el tratamiento con estos fármacos, sin embargo, es probable que aparezca un virus resistente a fármacos y la eliminación completa del virus es difícil en vista de los mecanismos de esta acción del virus, por lo tanto es necesaria una medicación de por vida. En tales circunstancias, ha habido un fuerte deseo de establecer un tratamiento curativo que permite la retirada y el alivio de la medicación de por vida.

Los presentes inventores han establecido diversos sistemas de modelos experimentales, a saber, fuentes de investigación en asociación con los estudios del VHC mediante la preparación de un clon de ADNc infeccioso del VHC y el establecimiento de animales infectados, tales como ratones transgénicos infecciosos con VHC y ratones quiméricos de hígado humano y similares (por ejemplo, véase el Documento 1 no de patente). Las principales características de la infección por el VHC incluyen el establecimiento de la infección persistente a una velocidad alta y la progresión a la hepatitis crónica. Los presentes inventores han sido sometidos a exhaustivos análisis y exploraciones a lo largo de los años usando los sistemas de modelos experimentales mencionados anteriormente y similares de evaluación de este mecanismo de acción en términos de adquisición de tolerancia inmunológica y descomposición de los mismos (por ejemplo, véase el documento no de patente 2).

Hasta ahora se han realizado numerosos intentos de desarrollar una vacuna para prevenir la infección por el VHC, pero hasta el momento ninguno de ellos ha proporcionado una prevención completa de la infección (por ejemplo, véanse los documentos no de patente 3, 4, 5 y 6).

Documento de patente US2006/0134065

Documento de patente WO2006/013815

Documento no de patente 1: Wakita T., et al., J. Biol. Chem., 1998, vol.273, p9001-9006

Documento no de patente 2: Inoue K., et al., Hepatology, 2007, vol.45, p921-928

Documento no de patente 3: Choo QL., et al., Pros. Natl. Acad. Sci. 1994, vol.91, 1294-1298

Documento no de patente 4: Puig M., et al., Vaccine 2004, vol.22, 991-1000

Documento no de patente 5: Abraham JD., Vaccine 2004, vol.22, 3917-3928

Documento no de patente 6: Elmowalid GA., et al., Pros. Natl. Acad. Sci. 2007, vol.104, 8427-8432

Documento no de patente 7: El-Gogo, S. et al., The J. of Gene Med., 2008, 10: 177-186

**Divulgación de la invención**

El objetivo resuelto por la presente invención es proporcionar un agente terapéutico o un agente profiláctico que comprenda un virus de la variolovacuna recombinante eficaz en la prevención del inicio de la infección de la hepatitis C.

Los presentes inventores han ido más lejos a través de una investigación importante basada en los resultados de los análisis y exámenes mencionados anteriormente sobre la infección por VHC y concibieron una idea de que una fuerte activación inmune provocada por una vacuna de la variolovacuna recombinante puede dar lugar a un potente método de prevención de la infección por hepatitis C. Por otra parte, los presentes inventores también consideraron que la fuerte activación del sistema de eliminación inmunológica provocada por una vacuna de variolovacuna recombinante o similar podría proporcionar una potente terapia curativa de la hepatitis C, y, por tanto, el objetivo del control completo de las afecciones patológicas de una enfermedad viral de mala curación parecía ser posible. Los

presentes inventores también se han dedicado a estudios con el fin de resolver el problema anterior basándose en sus resultados de muchos años de investigación sobre infecciones virales. Como resultado, tuvieron éxito en la preparación de un virus de la variolovacuna recombinante que es eficaz en la prevención del inicio de la infección de la hepatitis C, logrando así la presente invención.

5 Por tanto, la presente invención es del siguiente modo.

(1) Un virus de la variolovacuna recombinante que comprende un promotor de la expresión y un ADNc de genoma del virus de la hepatitis C.

10 Un ejemplo de un virus de la variolovacuna incluye la cepa LC16m8. El ADNc del genoma del virus de la hepatitis C es aquel que codifica una proteína no estructural del virus de la hepatitis C, en concreto:

15 (a) ADN representado por la SEQ ID NO: 2;  
 (b) ADN que se hibrida con ADN que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 2 en condiciones rigurosas que tiene 95 % o más de homología con la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 2 y que codifica la proteína no estructural del virus de la hepatitis C.

20 Por otra parte, un ejemplo del promotor de la expresión contenido en el virus de la variolovacuna recombinante de la presente invención incluye un promotor híbrido. Específicamente, los ADN de (a) y (b) siguientes se ejemplifican como una secuencia de nucleótidos del promotor híbrido:

25 (a) ADN que tiene la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 4; y  
 (b) ADN que hibrida con ADN que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 4 en condiciones rigurosas y que tiene una actividad promotora.

(2) Una composición farmacéutica que comprende el virus de la variolovacuna recombinante de acuerdo con (1) anterior.

30 La composición farmacéutica puede usarse como un agente profiláctico o un agente terapéutico para la hepatitis C.

**Breve descripción de las figuras**

35 La figura 1 muestra una estructura génica de un plásmido usado para preparar un virus de la variolovacuna recombinante del VHC.  
 La figura 2 muestra las posiciones y los nombres de los cebadores usados para confirmar la transferencia de genes del VHC mediante PCR.  
 La figura 3 muestra imágenes de electroforesis en gel de agarosa que muestran los resultados obtenidos mediante la confirmación de la transferencia de genes del VHC mediante PCR.  
 40 La figura 4 muestra imágenes de las membranas de PVDF que muestran los resultados obtenidos mediante la confirmación de la expresión de proteínas del VHC mediante el método de transferencia de tipo Western.  
 La figura 5 muestra un método para confirmar la capacidad del VHC-VVR para inducir inmunidad humoral/celular.  
 45 La figura 6 muestra los resultados obtenidos midiendo el efecto del VHC-VVR como una vacuna mediante el método de ELISA con respecto a su capacidad para inducir la inmunidad humoral.  
 La figura 7 muestra los resultados obtenidos midiendo el efecto del VHC-VVR como una vacuna mediante un ensayo ELISPOT con respecto a su capacidad para inducir la inmunidad celular.  
 La figura 8 muestra la expresión del gen interruptor Cre/loxP en un ratón transgénico que expresa hepatitis genes del virus de la hepatitis C.  
 50 La figura 9 muestra los cambios diarios en la cantidad de la proteína del núcleo del VHC en el hígado del ratón transgénico después de la expresión génica del VHC (panel A) y la alteración del tejido en el hígado del ratón transgénico debido al inicio de la hepatitis (panel B).  
 La figura 10 muestra el esquema de administración del virus de la variolovacuna recombinante del VHC a los ratones transgénicos del VHC.  
 55 La figura 11 muestra el efecto terapéutico tras la administración del virus de la variolovacuna recombinante del VHC a los ratones transgénicos del VHC.

**Mejores modos para realizar la invención**

60 En lo sucesivo en el presente documento, un virus de la variolovacuna recombinante de acuerdo con la presente invención y una aplicación del mismo se describirá con más detalle aunque el alcance de la presente invención no debe limitarse a estas descripciones, y se pueden realizar modificaciones apropiadas aparte de los siguientes ejemplos sin apartarse del alcance de la invención.

65 El alcance de la presente invención viene definida por las reivindicaciones y cualquier información que no entre dentro de las reivindicaciones se proporciona únicamente a efectos informativos.

1. Sumario

Entre las diversas vacunas, las vacunas vivas son algunas de las vacunas particularmente eficaces, pero generalmente se sabe que el desarrollo de una vacuna atenuada para un nuevo virus requiere un período muy largo de tiempo, lo que es probable que sea el caso para el VHC también.

Una técnica de ingeniería genética para la preparación de un virus de la variolovacuna recombinante (RW) como una vacuna viva es una de las técnicas conocidas empleadas en tal caso. Por ejemplo, se ha demostrado que los virus de la variolovacuna recombinantes para el virus de la rabia o de la peste bovina desarrollados por los presentes inventores ejercen efectos superiores en la prevención del inicio de la infección en las pruebas de campo y similares (por ejemplo, véase, Tsukiyama K., et al., Arch. Virol., 1989, vol.107, p.225-235).

Por otra parte, los presentes inventores han tenido éxito en la preparación de un virus de la variolovacuna recombinante que tiene ADNc de SDRA-CoV, un patógeno conocido de neumonía atípica SDRA (documento WO2006/038742) y se confirmó que se trataba de una formulación que tiene un efecto profiláctico superior, que puede usarse para la administración repetida (por ejemplo, véase, Kitabatake M., et al., Vaccine, 2007, vol.25, p.630-637).

Un virus de la variolovacuna usado como un padre recombinante para la preparación de RW tiene que ser una cepa de vacuna que tiene una seguridad establecida. La cepa LC16m8 del virus de la variolovacuna (por ejemplo, véase, Clinical Virology vol.3, No.3, 269, 1975) se conoce como dicha cepa de vacuna. La cepa LC16m8 deriva de la cepa Lister y actualmente la única cepa de la vacuna que en realidad ha sido administrada como una vacuna profiláctica cuya seguridad y eficacia se han confirmado.

Los presentes inventores también encontraron, en el curso del desarrollo y el estudio de los virus de la variolovacuna recombinantes contra la peste bovina, el VIH, el SDRA-CoV y similares, que el uso de un promotor de la expresión de genes que puede potenciar considerablemente la capacidad productora de anticuerpos y la capacidad para inducir inmunidad celular es eficaz para el virus de la variolovacuna de la presente invención. En concreto, los presentes inventores encontraron que pSFJ1-10 o pSFJ2-16 se pueden utilizar como un vector plasmídico preferible (por ejemplo, véase Jin N-Y, et al., Arch. Virol. 1994, vol.138, p.315-330, Elmowalid GA., et al., Pros. Natl. Acad. Sci. 2007, vol.104, 8427-8432; Arch. Virol. 138, 315-330, 1994; solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 6-237773, etc.).

Se divulga que, como resultado, los presentes inventores tuvieron éxito en la preparación de un virus de la variolovacuna recombinante del VHC mediante la integración de un gen que codifica una proteína no estructural del VHC y/o un gen que codifica una proteína estructural del VHC junto con un promotor en un virus de la variolovacuna.

Un virus parental de un virus de la variolovacuna recombinante de la presente invención es un virus de la variolovacuna como se ha descrito anteriormente. Un virus de la variolovacuna recombinante de la presente divulgación tiene un ADNc del VHC integrado en el genoma del virus de la variolovacuna. También se divulga que una unidad de expresión obtenida mediante la clonación de las regiones génicas enteras que codifican la proteína del VHC, la región de la proteína de la cápside externa o el gen de la región de proteína no estructural asociada con la replicación se transfieren a un vector de virus de la variolovacuna. Esta unidad de expresión se introduce en la región de codificación de HA del virus de la variolovacuna. Puesto que la transferencia del gen extraño a la región de codificación de la HA no tiene influencia alguna en la actividad de proliferación del virus de la variolovacuna, como ya se sabe, se puede usar como virus parental una cepa de vacuna segura que tiene capacidad de proliferación débil (Vaccine 12, 675-681, 1994).

Las vacunas de variolovacuna recombinantes vivas contra el virus de la rabia, el virus de la peste bovina y similares se han probado en el campo, donde se han demostrado sus excelentes efectos profilácticos contra el inicio de las infecciones respectivas.

También se divulga que los presentes inventores prepararon un virus de la variolovacuna recombinante (RW) mediante la inserción de un gen entero que codifica la proteína del virus de la hepatitis C (VHC), un gen que codifica la región de la proteína de la cápside externa o un gen que codifica una región de proteína no estructural asociada con la replicación aguas abajo de un promotor híbrido, y la integración de estos genes en la región del gen de la hemaglutinina (HA) de una cepa de virus de la variolovacuna atenuado.

El promotor híbrido incluye un promotor de inclusión de tipo A (ITA) de poxvirus y un promotor de la expresión temprana de la proteína de 7,5 kDa del virus de la variolovacuna (p7,5) con múltiples repeticiones (véase Jin N-Y, et al., Arch. Virol. 1994, vol.138, p.315-330). Este promotor fue desarrollado y está disponible del Dr. Hisatoshi Shida en la Hokkaido University.

El VVR preparado se utilizó para infectar una célula animal, por la cual se confirmaron la expresión abundante de la proteína del VHC, así como la producción temprana de un anticuerpo de títulos altos contra el VHC mediante la vacunación de un individuo animal. Además, se confirmó también que la inmunidad celular se activaba tras la

vacunación a un individuo animal mediante ensayo ELISPOT, logrando así la presente invención.

## 2. Preparación del virus de la variolovacuna recombinante del VHC

5 Todo el gen que codifica la proteína del virus de la hepatitis C (VHC), un gen que codifica la región de la proteína de la cápside externa y un gen que codifica una región de proteína no estructural asociada con la replicación ya se han clonado e insertado en un plásmido. Por lo tanto, un gen contenido en el virus recombinante de la presente invención se puede obtener según una técnica habitual de ingeniería genética. Por ejemplo, como tal técnica de ingeniería genética se puede usar un método de síntesis de ácido nucleico que usa un sintetizador de ADN utilizado generalmente. Por otra parte, después de aislar o sintetizar una secuencia génica como molde, se puede emplear un método de PCR donde los cebadores específicos para cada gen están diseñados para amplificar las secuencias de genes con un dispositivo de PCR o un método de amplificación génica usando un vector de clonación. Los expertos en la técnica pueden llevar a cabo fácilmente métodos mencionados anteriormente de acuerdo con Molecular cloning 2ª Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) o similar. El producto de la PCR obtenido se puede purificar de acuerdo con un método conocido.

En una realización preferida de la presente invención, el gen del VHC insertado en el plásmido descrito anteriormente (Genotipo 1b; Número de nucleótido: 1-9611; DDBJ/EMBL/número de acceso en GenBank: AY045702) se puede usar como molde. Por lo tanto, el ADNc del gen del VHC se utiliza como molde con cebadores específicos del gen del VHC para realizar la PCR, preparando de este modo cada región del gen del VHC. De acuerdo con la presente descripción, la totalidad de las regiones génicas del VHC, un gen que codifica la región de la proteína estructural de la proteína de la cápside externa y un gen que codifica la región de la proteína no estructural asociada con la replicación se denominan "CN5", "CN2" y "N25", respectivamente.

25 Las secuencias de nucleótidos de CN2, N25 y CN5 están representadas por las SEQ ID NOS: 1, 2 y 3 respectivamente. Aparte del ADN de la secuencia representada por la SEQ ID NO: 2, se puede usar el ADN que hibrida con el ADN que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 2 en condiciones rigurosas que tiene un 95 % o más de homología con la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 2, y que codifica una proteína no estructural del virus de la hepatitis C (ADN mutante de N25).

En el presente documento, la frase "que codifica una proteína estructural del virus de la hepatitis C" significa que el gen codifica una proteína que constituye la cápside externa del virus, específicamente, el gen codifica al menos la región de núcleo, la región E1 y la región E2 (Figura 1A). Adicionalmente, la frase "que codifica una proteína no estructural del virus de la hepatitis C" significa que el gen codifica una proteína producida en la célula tras la propagación del virus, específicamente, el gen codifica al menos la región NS2, la región NS3, la región NS4a, la región NS4b, la región NS5a y la región NS5b (Figura 1B).

Además se divulga que los genes descritos anteriormente que codifican la proteína estructural y la proteína no estructural comprenden la secuencia de longitud completa, así como una secuencia parcial de la misma. En el caso de CN2, puede no ser necesariamente una secuencia de longitud completa y puede ser una parte de la misma siempre que contenga todas o parte de la región del núcleo, la región E1 y la región E2. Por ejemplo, la región E1 (589-1164) y la región E2 (1165-2253) de la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 1 se divulgan en el presente documento. En el caso de N25, puede no ser necesariamente una secuencia de longitud completa y puede ser una parte de la misma siempre que contenga todas o parte de la región NS2, la región NS3, la región NS4a, la región NS4b, la región NS5a y la región NS5b. En el caso de CN5, puede no ser necesariamente una secuencia de longitud completa y puede ser una parte de la misma siempre que contenga todas o parte de la región del núcleo, la región E1, la región E2, la región NS2 la región NS3, la región NS4a, la región NS4b, la región NS5a y la región NS5b. Por ejemplo, la región E1 (589 - 1164), la región E2 (1165 - 2253), la región NS2 (2443 -3093) y la región NS3 (3094 - 4986) de la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 3 se divulgan en el presente documento.

El ADN mutante descrito anteriormente se puede obtener mediante síntesis química o, como alternativa, se puede obtener de una biblioteca de ADNc o una biblioteca genómica por un método de hibridación conocido, tal como hibridación de colonias, hibridación de placas, transferencia de tipo Southern o similares, usando ADN que tiene la secuencia de nucleótidos representada por cualquiera de las SEC ID NOS: 1-3 o un fragmento de la misma como sonda. Los ejemplos de condiciones rigurosas para la hibridación mencionada anteriormente incluyen 0,1 x SSC a 10xSSC, de 0,1 % a 1,0 % de SDS y de 20 °C a 80 °C. Más específicamente, después de realizar la prehibridación a 37 °C a 56 °C durante 30 minutos o más, el lavado se lleva a cabo durante 1 a 3 veces en 0,1 x SSC, 0,1 % de SDS a temperatura ambiente durante de 10 a 20 minutos. Para el procedimiento específico del método de hibridación, se puede hacer referencia a "Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2ª ed." (Cold Spring Harbor Press (1989)) o similares.

Por otra parte, se puede usar el ADN que tiene 95 % o más, 98 % o más o 99 % o más de homología con la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 2 y que codifica la proteína no estructural del virus de la hepatitis C.

Un promotor contenido en el virus de la variolovacuna recombinante de la presente invención es un promotor híbrido que consiste en una inclusión de tipo A (ITA) de poxvirus y un promotor temprano de la expresión de la proteína de 7,5 kDa del virus de la variolovacuna (p7,5) con múltiples repeticiones incluidas en la región del gen de la hemaglutinina (HA) del virus de la variolovacuna. Este promotor puede estar ligado a un plásmido apropiado, por ejemplo, pBMSF7C (Arco. Virol. 138,315-330, 1994; solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 6-237773).

Una secuencia de nucleótidos de un promotor híbrido que puede usarse para la presente invención está representada por la SEQ ID NO: 4. Además del ADN que tiene la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 4, el ADN que hibrida con el ADN que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 4 en condiciones estrictas y que tiene una actividad promotora también puede usarse para la presente invención. Las "condiciones estrictas" son las mismas que se han descrito anteriormente. La frase "que tiene una actividad promotora" significa que tiene una actividad para transcribir un gen que codifica una proteína no estructural.

Una proteína se puede expresar en masa mediante este promotor híbrido en una forma completamente modificada con azúcar desde la infección temprana a la infección tardía por el virus de la variolovacuna. De acuerdo con la presente divulgación, un vector plasmídico que tiene el gen del VHC (CN5) insertado aguas abajo de un promotor pBMSF7C se denomina pBMSF7C-CN5. Adicionalmente, de acuerdo con la presente divulgación, un vector plasmídico que tiene un gen de la región de la proteína de la cápside externa (CN2) insertado aguas abajo de un promotor pBMSF7C se denomina pBMSF7C-CN2. Además, un vector plasmídico que tiene un gen de proteína no estructural (N25) insertado aguas abajo del promotor pBMSF7C se conoce como pBMSF7C-N25.

Estos vectores plasmídicos se transfieren a un virus de la variolovacuna como huésped para preparar un virus de la variolovacuna recombinante. Para la transferencia al vector plasmídico del huésped, se puede usar cualquier técnica conocida. Se divulga que, por ejemplo, uno cualquiera de los vectores plasmídicos pBMSF7C-CN5, pBMSF7C-CN2 y pBMSF7C-N25 se puede introducir en una célula animal infectada con una cepa del virus de la variolovacuna atenuado LC16m8 para inducir la recombinación homóloga en la región del gen de la hemaglutinina (HA) del virus de la variolovacuna para preparar virus de la variolovacuna recombinantes VVR-CN5, CCR-CN2 y CCR-N25 que expresan las respectivas proteínas del VHC.

La cepa LC16m8 del virus de la variolovacuna se utiliza para la preparación de RW es una cepa atenuada que puede proliferar en un individuo animal, pero tiene la propiedad de proliferación extremadamente baja en las células nerviosas. Esta cepa se ha aprobado como una vacuna contra la viruela en Japón y no se han producido efectos secundarios graves por la vacunación de aproximadamente 50.000 niños (informe de investigación por el grupo de investigación de la vacunación de la viruela en el Ministry of Health and Welfare, Clinical Virology vol.3, No.3,269, 1975). Por otra parte, se informa que su capacidad de inducción de inmunidad es equivalente a la de la cepa Lister, es decir, la cepa parental, y, por lo tanto, la cepa LC16m8 es una vacuna segura y eficaz.

Dado que los VVR-CN5, VVR-CN2 y VVR-N25 preparados tienen el gen de la proteína del VHC insertado en la región del gen de la HA del virus de la vacuna, la expresión de la proteína HA es defectuosa y, por lo tanto, no se produce ninguna hemaglutinación. De acuerdo con la divulgación, se usan VVR-CN5, VVR-CN2 y VVR-N25 para infectar las células animales, y se realiza la detección selectiva de VVR usando la reacción de aglutinación de eritrocitos de pollo con la placa resultante como indicador. El VVR de interés puede obtenerse seleccionando las placas blancas en las que no se observa ninguna hemaglutinación.

La transferencia de genes del VHC en el virus obtenido de las placas blancas se puede confirmar mediante la realización de PCR utilizando el genoma del virus como molde y cebadores específicos de genes del VHC.

La expresión de la proteína del VHC puede confirmarse mediante transferencia de tipo Western utilizando células animales infectadas con VVR-CN5, VVR-CN2 y VVR-N25 como muestras. En el presente documento, el anticuerpo utilizado se puede obtener mediante la purificación de IgG con la proteína G de un antisuero obtenido mediante inmunización con un polipéptido del VHC (J. Biol.Chem. 279:14531-14541, 2004).

Aparte de la región del gen de la HA, normalmente se usa la región del gen de la timidina quinasa (TK) como el sitio de inserción para el gen de interés tras la preparación de RW pero se sabe que la inserción del gen de interés en la región del gen de la TK reduce la proliferación del VVR debido al defecto en la expresión de la TK. Por otra parte, se informa de que el defecto en la expresión de la proteína HA tiene poco efecto sobre la proliferación del VVR (Vaccine 12, 675-681, 1994). Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención, el sitio de inserción del gen de interés es, preferentemente, la región del gen de la HA.

### 3. Composición farmacéutica para la prevención o el tratamiento de la hepatitis C

La presente invención proporciona un agente profiláctico y terapéutico (una composición farmacéutica) para la hepatitis C que comprende el virus de la variolovacuna recombinante descrito anteriormente.

Una composición farmacéutica de la presente invención puede introducirse en un organismo mediante cualquier método conocido tal como inyección intramuscular, intraperitoneal, intradérmica o subcutánea; inhalación nasal, bucal o pulmonar; o administración oral. Además, un virus recombinante contenido en una composición farmacéutica de la presente invención se puede usar en combinación con un medicamento antiviral existente (por ejemplo, interferón). Una realización de uso combinado no está particularmente limitada y el virus recombinante de la presente invención y el fármaco antiviral existente puede introducirse en un organismo mediante un método donde ambos se administran simultáneamente o mediante método donde uno se administra después del otro a un cierto intervalo.

Además, la composición farmacéutica de la presente invención se puede mezclar con un vehículo conocido farmacéuticamente aceptable tal como un excipiente, un agente de carga, un aglutinante y un lubricante, un tampón, un agente de tonicidad, un agente quelante, un colorante, un conservante, una fragancia, un agente aromatizante, un agente edulcorante o similares.

La composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse por vía oral o parenteral de acuerdo con su forma, por ejemplo, como un agente administrado por vía oral tal como un comprimido, una cápsula, un agente en polvo, un agente granular, una píldora, una solución, jarabe o similares, o un agente administrado por vía parenteral, como una inyección, un agente tópico, un supositorio, una gota ocular o similares. Preferentemente, es, por ejemplo, una inyección local tal como una inyección intradérmica, intramuscular o intraperitoneal.

Aunque la dosis se selecciona apropiadamente de acuerdo con el tipo del elemento activo, la vía de administración, el objetivo de la administración, la edad, el peso, el sexo y los síntomas del paciente y otras condiciones, la dosis diaria del virus es de aproximadamente 1,000-1.000.000.000 UFP (unidades formadoras de placas) y, preferentemente, de aproximadamente 100.000-100.000.000 UFP en el caso de la administración oral, mientras que es de aproximadamente 100-1.000.000.000 UFP y, preferentemente, de aproximadamente 1.000-100.000.000 UFP en el caso de administración parenteral. El virus puede administrarse una vez o varias veces al día.

El virus recombinante de la presente invención se puede usar como una vacuna para prevenir o tratar la hepatitis C. Además, el desarrollo de una vacuna contra el VHC hasta la fecha se basa en la investigación que se centra en los anticuerpos contra el VCH y las células T citotóxicas (CTL). Por lo tanto, el título de anticuerpos o la actividad de la inmunidad celular como vacuna se miden, preferentemente, de antemano.

Se divulga que, por ejemplo, los títulos de anticuerpos contra los VVR-CN5, VVR-CN2, VVR-N25 preparados o la cepa LC16m8, es decir, la cepa parental, se pueden obtener mediante la vacunación de un conejo con la cepa de virus, la recogida de los sueros con el tiempo y la medición del valor ELISA contra el VHC en el suero. En los sueros de conejos vacunados con VVR-CN5- o VVR-CN2, los títulos de anticuerpos contra el VHC aumentaron tras cuatro semanas desde la vacunación.

También se divulga que la actividad de la inmunidad celular se puede medir mediante la vacunación de un ratón con VVR-CN5, VVR-CN2, VVR-N25 o la cepa LC16m8, es decir, la cepa parental, aislando las células de bazo del ratón inmunizado, y determinando si o no los CTL específicos del VHC son inducidos por el ensayo ELISPOT. De acuerdo con la presente divulgación, cuando las células del bazo derivadas de ratones BALB/c vacunados con VVR-CN5 se estimularon con un péptido sintético de una secuencia del epítipo del CRL específico de E1 restringido a H H-2<sup>d</sup>, se detectaron células productoras de INF- $\gamma$  casi diez veces las de control. De acuerdo con lo anterior se encontró que la vacunación con VVR-CN5 inducía CTL específicos de E1 en ratones BALB/c.

Por lo tanto, los VVR-VHC preparados por los presentes inventores han confirmado que inducen inmunidad humoral y celular contra el VHC.

La presente invención se describirá más específicamente mediante los ejemplos siguientes. Estos ejemplos son solo ilustrativos y no deben limitar el alcance de la presente invención.

### Ejemplo 1

Preparación del virus de la variolovacuna recombinante

Las regiones génicas completas (CN5), la región de la proteína de la cápside externa (CN2) y la región génica de la región de la proteína no estructural asociada a la replicación (N25) del virus de la hepatitis C (DDBJ/EMBL/ número de acceso en GenBank; AY045702) se integraron en los sitios SbfI y SgfI del plásmido pBMSF7C (solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 6-237773) para preparar los vectores plasmídicos pBMSF7C-CN5, pBMSF7C-CN2 y pBMSF7C-N25 que tienen los genes del VHC insertados aguas abajo del promotor híbrido AT1-p7.5 en la región génica de la hemaglutinina (HA) (Figura 1).

Se sembraron células de riñón de cultivo primario en un matraz T175. Una vez que las células alcanzaron la confluencia, se usó la cepa del virus de la variolovacuna atenuado LC16m8 para la infección a un moi = 10 y a 30 °C durante 2 horas. En el presente documento, moi (multiplicidad de infección) hace referencia a las UFP por célula.

Después de la infección, la solución de virus se eliminó mediante aspiración y las células se lavaron con PBS (-). A continuación, después del tratamiento con 0,05 % de tripsina/EDTA 0,5 mM/PBS (-) y lavado con 10 % de FCS/medio MEM, PBS (-) y tampón de HeBS, las células se suspendieron en 600 µl de tampón de HeBS. 40 µg de cada uno de los vectores plasmídicos pBMSF7C-CN5, pBMSF7C-CN2 y pBMSF7C-N25 se diluyeron usando un tampón HeBS para obtener una cantidad total de 200 µl, que se añadió y se mezcló con la suspensión celular y se dejó reposar en hielo durante 10 minutos. La suspensión celular añadida con el vector plasmídico se transfirió a una cubeta de 0,4 cm para realizar la electroporación (0,2 kV, 960 µF) usando un electroporador (Bio-Rad). Después de la electroporación, se añadió inmediatamente 1 ml de 10 % de FCS/medio MEM a la suspensión celular para la dilución. Esta suspensión celular se añadió a las células RK13 o células de riñón de cultivo primario que se habían sembrado en un matraz T175 y se cultivaron a 30 °C durante 24 horas.

Después de 24 horas de cultivo, se retiró el sobrenadante del cultivo mediante aspiración y las células se lavaron con PBS (-). A continuación, se realizó el tratamiento con 0,05 % de tripsina/EDTA 0,5 mM/PBS (-) y las células se suspendieron en un 10% de FCS/medio MEM. Se recogió la suspensión de células, se sometió a ultrasonidos (30 s x 4 veces) en agua fría y después se centrifugó (2000 rpm, 10 min). El sobrenadante resultante se utilizó como una solución de virus. La solución de virus se diluyó en 10 % de FCS/medio MEM y se usó para infectar la célula de riñón de cultivo primario que se habían sembrado en una placa de 100 mm a 30 °C durante una hora. La solución de virus se eliminó mediante aspiración y, a continuación, las células se lavaron con PBS (-). Se añadió 10 % de FCS/0,5% de metilcelulosa/medio MEM para el cultivo a 30 °C durante 72 horas. Después de 72 horas de cultivo, se retiró el sobrenadante mediante aspiración y se lavó con PBS (-). Una solución de eritrocitos de pollo diluida en PBS (+) se añadió a la placa de 100 mm para el cultivo a 37 °C durante 30 minutos. La solución de eritrocitos se eliminó mediante aspiración y, a continuación, las células se lavaron dos veces con PBS (-). Las placas sobre las que no se adsorbieron los eritrocitos de pollo se recogieron usando un Pipetman. La transferencia de genes del VHC en las placas recogidas se confirmó mediante PCR y secuenciación génica. Las placas confirmadas de la transferencia génica se sometieron a purificación en placa tres veces.

Los virus sometidos a tres veces purificación en placa se sometieron a cultivo a pequeña escala. La colonia obtenida después de la tercera purificación se suspendió en 700 µl 10 % de FCS/medio MEM y se sometió a ultrasonidos en agua fría. Después de la centrifugación (2.000 rpm, 10 min), se añadieron 500 µl de sobrenadante a las células de riñón de cultivo primario sembradas en T25 para la infección a 30 °C durante 2 horas. Después de la infección, la solución de virus se retiró mediante aspiración y las células se lavaron con 2,5 ml de 10 % de FCS/medio MEM. El medio se retiró mediante aspiración y se añadieron 2,5 ml de 10 % de FCS/medio MEM reciente para el cultivo a 30 °C durante 72 horas. Después de 72 horas, las células se rasparon del matraz con un raspador para recoger la suspensión de células. La suspensión celular recogida se sometió a ultrasonidos (30 s, 4 veces) en agua fría, seguido de centrifugación, y el sobrenadante se recogió como la solución de virus. La solución de virus recogido se diluyó en serie y después se añadió a las células RK13 o a las células de riñón de cultivos primarios que se habían sembrado en placas de 6 pocillos para la infección a 30 °C durante una hora. La solución de virus se eliminó mediante aspiración y las células se lavaron dos veces con PBS (-) y se añadió 10 % de FCS/ 0,5 % de metilcelulosa/medio MEM para el cultivo a 30 °C durante 72 horas. Después de 72 horas, se contó el número de placas formadas en el pocillo para calcular el título.

Sobre la base de este título calculado, se realizó el cultivo a escala masiva. Las células RK13 o las células de riñón de cultivos primarios se sembraron en diez matraces T175. Una vez que las células alcanzaron la confluencia, se usó la solución de virus de la variolovacuna recombinante para la infección a un  $\text{moi} = 10$  y a 30 °C durante 2 horas. Después de la infección, la solución de virus se retiró mediante aspiración y las células se lavaron con 20 ml de 10 % de FCS/medio MEM. El medio se retiró mediante aspiración y se añadieron 20 ml de 10% de FCS/medio MEM reciente para el cultivo a 30 °C durante 72 horas. Después de 72 horas, las células se rasparon de los matraces usando un raspador y las suspensiones celulares se recogieron y se congelaron a -8 0 °C para su conservación. Esta suspensión de células se sometió a tres rondas de congelación y descongelación, seguido de tratamiento con ultrasonidos (30 segundos, 4 veces) en agua fría y centrifugación para recoger el sobrenadante como una solución de virus. La solución de virus recogida se transfirió a un tubo de centrifugación de alta velocidad y se sometió a centrifugación a 18.000 rpm durante 45 minutos para permitir la precipitación del virus. El sobrenadante se retiró mediante aspiración y, a continuación, los sedimentos se resuspendieron en una pequeña cantidad de 10 % de FCS/medio MEM. Mediante este procedimiento se preparó una solución de virus que se concentró diez veces más fuerte que una con el cultivo en matriz T175. Esta solución de virus concentrado se diluyó en serie y se utilizó para infectar las células RK13 o las células de riñón de cultivos primarios que se habían sembrado en una placa de 6 pocillos y los títulos de virus de las soluciones se calcularon de la misma manera que en el método descrito anteriormente. Las soluciones concentradas de virus con títulos calculados se utilizaron en varios experimentos descritos en los siguientes ejemplos.

## Ejemplo 2

Confirmación de la transferencia de genes del VHC mediante PCR

La PCR se realizó usando los siguientes cebadores específicos de genes del VHC y el genoma del virus de la variolovacuna recombinante obtenido como molde para confirmar si el gen del VHC se había introducido o no en el

genoma del virus (Figuras 2 y 3).

(1) Secuencias de nucleótidos de los cebadores para clonación

5 Dr: HCV-CL-FL (SEQ ID NO: 5)

**5-GGGCGGCCCTGCAGGTAATACGACTCACTATAGGGCGTAGACCGT  
GCATCATGAGCACAAATCCTAAACCCCAAAGAAAAACCAAACG-3**

10 Iv: HCV-CL-MRv (SEQ ID NO: 6)

**5-GGGCGGCGCGATCGCCTATCATTAAAGGAGCCGCCACCCCTGCCCT  
TCAAGACTATC-3**

Dr: HCV-CL-MFw (SEQ ID NO: 7)

15 **5-GGGCGGCCCTGCAGGTAATACGACTCACTATAGGGCGTAGACCGT  
GCATCATGACGCGGCCGCGCAAGGCAACTGGTTCGGC-3**

Iv: HCV-CL-Rv (SEQ ID NO: 8)

20 **5-GGGCGGCGCGATCGCCTATCATTATCGGTTGGGGAGCAGGTAGAT  
GCCTAC-3**

(2) Secuencias de nucleótidos de cebadores para PCR para confirmar el inserto

25 <HA>

Dr: HA-1-S (SEQ ID NO: 9)  
5-GGTCTTATATACACCGAGTAAGG-3

30 Iv: PBSF-110-350-R20 (SEQ ID NO: 10)  
5-TCAGGAAAGACAGCCATAGC-3

<Región de la primera mitad >

35 Dr: PBSF-110-1204-S22 (SEQ ID NO: 11)  
5-CATCACATTGAAACATTGGGAC-3

40 IV: 6-354-R20 (SEQ ID NO: 12)  
5-GATTTGTGCTCATGATGCAC-3

Iv: 6-2139-R23 (SEQ ID NO: 13)  
5-CCGAACCACATTTTGTGTAAGTG-3

<Región de la última mitad >

45 Dr: 6-3251-18S (SEQ ID NO: 14)  
5-AGTAGAGCCCGTTGTCTT-3

50 Dr: 6-9168-S20 (SEQ ID NO: 15)  
5-TACCTCTTCAACTGGGCAGT-3

Iv: HA-6-R (SEQ ID NO: 16)  
5-CTAGTTCTGAGAAACCAGAGG-3

55 Específicamente, la composición de la solución de reacción era de 1U de ADN polimerasa, dNTP 0,3 mM, cebador F 1  $\mu$ M y cebador R 1  $\mu$ M en 50  $\mu$ l de tampón que viene con una polimerasa disponible en el mercado. Las condiciones del ciclo fueron 25 ciclos de: desnaturalización a 95 °C durante 0,5 minutos; hibridación a 58 °C durante 0,5 minutos; y elongación a 72 °C durante 2 minutos. El producto de PCR resultante se sometió a electroforesis utilizando un gel de agarosa para confirmar la banda. Como resultado, si se observaba una banda única que tiene la longitud esperada basada en el diseño del cebador, se consideraba que el gen del VHC se había transferido al

60

genoma del virus recombinante mientras que el gen del VHC no se había transferido si no se observaba dicha banda.

5 Como se muestra en la Figura 3, como resultado de la electroforesis en gel de agarosa al 2 % del producto de la PCR (fragmento amplificado), se encontró que el gen del VHC se había transferido al genoma del virus recombinante.

### Ejemplo 3

10 Confirmación de la expresión de proteínas del VHC mediante el método de transferencia de tipo Western

15 El virus de la variolovacuna recombinante RVV-S se utilizó para infectar células RK13 que se habían sembrado en una placa de 6 pocillos a  $moi = 30$  y a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 2 horas. Después de la infección, la solución de virus se eliminó mediante aspiración y las células se lavaron dos veces con PBS (-). A cada pocillo, se añadieron 2 ml de 10% de FCS/medio MEM para el cultivo a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas. Después de 24 horas, se retiró el medio por aspiración, y se añadieron  $100\text{ }\mu\text{l}$  de tampón de lisis (1 % de SDS, 0,5 % de NP-40, NaCl 0,15 M, Tris-HCl 10 mM (pH 7,4)) para lisar las células y la solución resultante se transfirió a un tubo Eppendorf de 1,5 ml. La solución recogida se sometió a ultrasonidos en agua fría hasta que la viscosidad llegó a ser cero. La cantidad de proteína en la solución preparada se cuantificó según el método de Lowry.

20 La electroforesis se llevó a cabo durante  $50\text{ }\mu\text{g}$  de proteína con gel de acrilamida al 10%. Al final de la electroforesis, se eliminó el gel y la proteína en el gel se transfirió a una membrana de PVDF con un papel secante semiseco pasando una corriente de  $5,5\text{ mA/cm}^2$  durante 60 minutos. Después de lavar la membrana con una solución de TBS-T, la membrana se sumergió en una solución al 5 % de leche descremada-TBS-T para el bloqueo. Después del  
25 bloqueo, la membrana se lavó tres veces con una solución de TBS-T. El anticuerpo primario fue un anticuerpo monoclonal de ratón obtenido mediante la purificación de Core-31-2, E1-384, E2-544, NS3-10-1, NS4B-52-1 y 14-5-NS5B clon IgG. La cantidad de proteína del anticuerpo purificado se cuantificó por el método de Lowry y se preparó a  $10\text{ }\mu\text{g/ml}$  para su uso. Al final de la reacción con el anticuerpo primario, la membrana se lavó tres veces con una solución de TBS-T. El anticuerpo secundario utilizado fue IgG anti-conejo unida a HRPO (de Donkey, Amersham). Al  
30 final de la reacción con el anticuerpo secundario, la membrana se lavó de nuevo tres veces con una solución de TBS-T, y se añadió una solución de ECL a la membrana para el desarrollo de la película.

35 En consecuencia, como se muestra en la Figura 4, se encontró que la proteína del VHC se expresaba en los genomas de los virus recombinantes RVV-CN2, RVV-N25 y RVV-CN5.

### Ejemplo 4

Experimentos de vacunación de conejos y ratones con virus de la variolovacuna recombinantes (Figura 5)

40 La figura 5 muestra un método para confirmar la capacidad de HCV-RVV para inducir inmunidad humoral/celular.

45 Se vacunó a conejos New Zealand hembra blancos por vía transendotelial con los virus de la variolovacuna recombinantes o la cepa parental LC16m8 obtenida en el Ejemplo 1 a  $1 \times 10^8$  ufp. Se extrajo sangre de la vena de la oreja después de 1, 2, 3, 4 y 6 semanas desde la vacunación. Además, después de seis semanas tras la vacunación viral inicial, se usó RVV-S de nuevo para la vacunación a  $1 \times 10^8$  ufp. De un modo similar, se extrajo sangre de nuevo de la vena de la oreja después de 1, 2, 3, 4 y 6 semanas desde la segunda vacunación. Toda la sangre recogida se introdujo en tubos de vacío de recogida de sangre (TERUMO, nombre comercial: Venoject II Tubos para extracción de sangre al vacío (estériles), 9 ml) y se sometió a centrifugación (3.000 rpm, 20 minutos) para separar y recoger los sueros. Los sueros se congelaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  para su conservación hasta el ensayo ELISA descrito más adelante.

### Ejemplo 5

55 Medición de los títulos de anticuerpos contra la proteína del VHC en sueros de conejos vacunados con HCV-RVV mediante el método ELISA

60 Una placa de 96 pocillos se recubrió con la proteína del núcleo y la proteína E2, al que se añadió una dilución de 100 veces de la muestra de suero congelado. Después de dejar reposar a temperatura ambiente durante una hora, la placa de 96 pocillos se lavó con una solución de TBS-T y luego se añadió anti-IgG de conejo ligado a HRPO (de Donkey, Amersham) a la placa de 96 pocillos como anticuerpo secundario. Después de la reacción con el anticuerpo secundario a temperatura ambiente durante una hora, la placa de 96 pocillos se lavó de nuevo tres veces con una solución de TBS-T, a la que se añadió una solución de desarrollo de color a  $100\text{ }\mu\text{l/pocillo}$ . Después de dejar reposar a temperatura ambiente durante 10-20 minutos, se midió la absorbancia a  $450\text{ nm}$  se con un lector de microplacas.

65 Como resultado, como se muestra en la Figura 6, los títulos de anticuerpos más altos se indujeron contra la proteína del núcleo y E2 en el suero de conejos vacunados con RW-CN2- y RVV-CN5.

**Ejemplo 6**

Confirmación de las capacidades inducción de inmunidad celular de HCV-RW como vacunas mediante ensayo ELISPOT

5 (Día 1)

10 El anticuerpo anti-ratón de IFN- $\gamma$  purificado (R4-6A2) ( $1\mu\text{g/ml}$ ) (Pharmingen) se sembró en una placa de nitrocelulosa de 96 pocillos a  $75\text{-}100\ \mu\text{l/pocillo}$ , al tiempo que se ajustó la concentración final a  $8\ \mu\text{g/ml}$  (125 veces diluido en PBS estéril) y se dejó reposar a  $4\ ^\circ\text{C}$  durante la noche.

(Día 2)

15 Se recogieron las células de bazo de ratón y se dejaron suspender en una cantidad adecuada en el lavado con RPMI. El lavado con RPMI utilizado se suplementó con FCS al 2,5%. Las células se recogieron mediante centrifugación a 1200 rpm a  $4\ ^\circ\text{C}$  durante 5 minutos. Las células se trataron con ACK, se suspendieron en RPMI de lavado en una cantidad adecuada y de nuevo se centrifugaron a 1200 rpm y a  $4\ ^\circ\text{C}$  durante 5 minutos para recoger las células. Se forzó a  $500\ \mu\text{l}$  de RPMI de lavado seguido de la suspensión celular a pasar a través de un filtro. Después del pase completo, las células se lavaron con 1,5 ml de lavado RPMI. El producto resultante se lavó una vez con medio RPMI suplementado con 10 % de FCS, se suspendieron en medio H-h y se ajustó a  $1 \times 10^7/\text{ml}$ .

20 1) Medio H-h: Una mezcla de cantidades iguales de medio RPMI suplementado con 10 % de FCS y medio de CLICK suplementado con 10 % de FCS.

25 2) RPMI suplementado con 10 % de FCS: RPMI-1640 (SIGMA R8758), FCS (final 10 %), 2-mercaptoetanol (concentración final  $5\ \mu\text{M}$ ), penicilina- estreptomina (concentración final PC: 100 u/ml, SM: 0,1 mg/ml) y 4 ml de  $\text{NaHCO}_3$  al 7,5 %.

30 3) Medio de CLICK suplementado con 10 % de FCS: Medio de CLICK (SIGMA C5572), FCS (concentración final 10 %), 2-mercaptoetanol (concentración final  $5\ \mu\text{M}$ ), penicilina- estreptomina (concentración final PC: 100 u/ml, SM: 0,1 mg/ml) y 4 ml de  $\text{NaHCO}_3$  al 7,5 %.

Inicio del cultivo

35 La placa de nitrocelulosa de 96 pocillos se lavó tres veces con PBS ( $100\ \mu\text{l/pocillo}$ ), se añadió RPMI suplementado con 10 % de FCS a  $100\ \mu\text{l/pocillo}$  y se introdujo en un incubador con  $\text{CO}_2$  a  $37\ ^\circ\text{C}$  durante una hora para el bloqueo. El medio se descartó y las células efectoras se sembraron en dilución en serie de dos veces a partir de  $1 \times 10^6/100\ \mu\text{l/pocillo}$  a  $0,125 \times 10^6/100\ \mu\text{l/pocillo}$ .

40 Una solución de péptido ( $200\ \mu\text{g/ml}$ ) se añadió a  $100\ \mu\text{l/pocillo}$  (concentración final  $100\ \mu\text{g/ml}$ ) para el cultivo en un incubador de  $\text{CO}_2$  a  $37\ ^\circ\text{C}$  durante 24 horas.

(Día 3)

45 Se descartó el medio y el resultante se lavó diez veces con PBS, 0,05 % de Tween 20 ( $200\ \mu\text{l/pocillo}$ ). El IFN- $\gamma$  biotinilado anti-ratón (XMG1.2) ( $0,5\ \text{mg/ml}$ ) (Pharmingen) se ajustó a una concentración final de  $2\ \mu\text{g/ml}$  (diluido 250 veces en PBS) y se añadió a  $100\ \mu\text{l/pocillo}$ . La mezcla se deja reposar a  $4\ ^\circ\text{C}$  durante la noche.

(Día 4)

50 La placa de nitrocelulosa de 96 pocillos se lavó diez veces con PBS, 0,05 % de Tween 20 ( $200\ \mu\text{l/pocillo}$ ). La estreptavidina-fosfatasa alcalina ( $1\ \text{mg/ml}$ ) (MABTECH AB) se ajustó a una concentración final de  $1\ \mu\text{g/ml}$  (diluido 1000 veces en PBS) y se añadió a  $100\ \mu\text{l/pocillo}$ .

55 La solución turbia resultante se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1,5 horas. Un tampón de desarrollo de color 25x AP (BIO-RAD) se diluyó 25 veces con AD y se añadieron 1/100 cantidades de los reactivos de color A y B (BIO-RAD) para preparar una mezcla de reacción. La placa de nitrocelulosa de 96 pocillos se lavó diez veces con PBS, 0,05 % de Tween 20 ( $200\ \mu\text{l/pocillo}$ ). La mezcla de reacción se añadió a  $100\ \mu\text{l/pocillo}$  y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 10-20 minutos. Una vez que se desarrolló el color y apareció un punto oscuro, la mezcla de reacción se descartó y se lavó minuciosamente en agua. Se despegó el fondo de la placa de nitrocelulosa de 96 pocillos y se secó para contar el número de puntos con el lector ELISPOT.

60 Los recuentos resultantes se muestran en la Figura 7, donde se indujo una fuerte inmunidad celular.

**Ejemplo 7**

65 Examen del efecto terapéutico de las VHC-VVR contra la hepatitis C

Un ratón transgénico (Cre/loxP/HCV-Tg) (en la Figura 8, "loxP-HCV") al que se había transferido con el gen del VHC con un sistema Cre/loxP se apareó con un ratón transgénico que expresaba Cre inducida por IFN (en la Figura 8, "MxCre") para preparar un ratón Tg (Cre/loxP/HCV-MxCre Tg) que expresa como un interruptor el gen del VHC en un momento arbitrario (Figura 8) para analizar la afección patológica de los mismos. Para el análisis de la afección patológica, se usó poli IC, es decir, un agente inductor de interferón con el fin de permitir la expresión génica de la enzima recombinante Cre con interferón.

En el presente documento, en la Figura 8, el panel A muestra la expresión del gen del VHC por el sistema de conmutación Cre/loxP mientras que el panel B muestra el apareamiento entre el ratón transgénico loxP-HCV y el ratón transgénico que expresa el gen de MxCre.

Como VHC-VVR se usaron VVR-CN2 que expresa predominantemente la proteína estructural del VHC, VVR-N25 que expresa la proteína no estructural asociada con la replicación y VVR-CN5 que expresa la proteína completa (Figura 1). Con el fin de evaluar los efectos terapéuticos de estas VHC-VVR, se vacunó a los ratones Cre/loxP/HCV-MxCre Tg que expresaban de forma persistente la proteína del VHC durante 3 meses por vía intradérmica una vez con las VHC-VVR ( $1 \times 10^7$  UFP), y se obtuvieron muestras de los hígados de los ratones después de cuatro semanas después de la vacunación (Figura 9). Posteriormente, se examinaron los niveles de expresión y la morfología de las proteínas del VHC en los hígados de los ratones.

Los resultados se muestran en la Figura 10. En la Figura 10, el panel A muestra las transiciones de la cantidad de la proteína del núcleo del VHC ("núcleo del VHC") y ALT (alanina aminotransferasa), donde la cantidad de proteína del núcleo del VHC ("núcleo del VHC") y de ALT están representados por un gráfico de barras y un gráfico de líneas, respectivamente. La ALT es un indicador del grado de daño hepático. En el Panel B, "d0", "d90", "d180" y "d480" indican alteración del tejido en el hígado antes de la expresión de genes del VHC y después de 90 días, 180 días y 480 días después de la expresión de genes del VHC, respectivamente.

La proteína del VHC en el hígado del ratón Cre/loxP/HCV-MxCre Tg (en la Figura 10, "núcleo del VHC") no se eliminó por completo y se confirmó la expresión persistente durante más de un año, lo que indica una afección patológica de hepatitis crónica, tal como inflamación o degeneración adiposa, fibrosis y similares en el hígado (Figura 10).

Adicionalmente, en los hígados de los ratones Cre/loxP/HCV-MxCre Tg después de cuatro semanas tras la vacunación con VHC-VVR, el nivel de expresión de la proteína del núcleo se redujo para el grupo de vacunación con VVR-N25 (Figura 11). Además, para el grupo de VVR-N25, la anomalía morfológica en el hígado (estructura similar a un cordón del hígado, condiciones de las células hepáticas o similares) volvió a la normalidad (Figura 11).

En la Figura 11, "m8", "CN2", "CN5" y "N25" representan la cepa LC16m8, VVR-CN2, VVR-CN5 y VVR-N25, respectivamente. El panel A muestra las cantidades de proteínas del núcleo del VHC en el hígado, mientras que el panel B muestra imágenes de los tejidos del hígado después de cuatro semanas tras la vacunación con VHC-VVR. En el Panel B, "a" muestra la imagen del tejido hepático antes de la expresión de genes del VHC, mientras que "b" muestra las imágenes de los tejidos hepáticos tras cuatro semanas después de la vacunación con VHC-VVR. Como se puede apreciar en la figura 11, el hígado del ratón al que se ha administrado VVR-N25 volvió a la normalidad. Por tanto, se ha demostrado que el virus de la variolovacuna de la presente invención tiene un efecto terapéutico sobre la hepatitis C.

#### Aplicabilidad industrial

De acuerdo con la presente invención se proporciona un nuevo virus de la variolovacuna recombinante que es eficaz y muy seguro en la prevención o tratamiento de la hepatitis C y un agente profiláctico o terapéutico para la hepatitis C (una vacuna para prevenir o tratar la hepatitis C) que comprende el nuevo virus.

[Listado de secuencias]

SEQ ID NO: 5: ADN sintético  
 SEQ ID NO: 6: ADN sintético  
 SEQ ID NO: 7: ADN sintético  
 SEQ ID NO: 8: ADN sintético  
 SEQ ID NO: 9: ADN sintético  
 SEQ ID NO: 10: ADN sintético  
 SEQ ID NO: 11: ADN sintético  
 SEQ ID NO: 12: ADN sintético  
 SEQ ID NO: 13: ADN sintético  
 SEQ ID NO: 14: ADN sintético  
 SEQ ID NO: 15: ADN sintético  
 SEQ ID NO: 16: ADN sintético  
 SEQ ID NO: 17: Péptido sintético

SEQ ID NO: 18: Péptido sintético  
 SEQ ID NO: 19: Péptido sintético  
 SEQ ID NO: 20: Péptido sintético

5 LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Tokyo Metropolitan Organization for Medical Research The Chemo- Sero- Therapeutic Research Institute
- 10 <120> Virus de la variolovacuna recombinante que tiene el gen del virus de la hepatitis C
- <130> PCT09-0013
- 15 <150> JP 2008-057515
- <151> 07-03-2008
- <150> JP 2008-294361
- <151> 18-11-2008
- 20 <160> 20
- <170> PatentIn versión 3.4
- <210> 1
- 25 <211> 3093
- <212> ADN
- <213> Virus de la hepatitis C
- <400> 1
- 30

```

cgtagaccgt gcatcatgag cacaaatcct aaaccccaaa gaaaaaccaa acgtaacacc      60
aaccgccgcc cacaggacgt caagttcccg ggtggtggtc agatcgttgg tggagtttac      120
ctgttcccgc gcaggggccc caggttgggt gtgcgcgcga ctaggaagac ttccgagcgg      180
tcacaacctc gtggaaggcg acaacctatc cccaaggctc gccagcccga gggcagggcc      240
tgggctcagc ccgggtacct ttggcccctc tatggcaacg agggcatggg gtgggcagga      300
tggctcctgt caccgcgcgg ctcccggcct agttggggcc ccacggacct ccggcgtagg      360
tcgcgtaatt tgggtaaggt catcgatacc ctcacatgcg gcttcgccga cctcatgggg      420
tacattccgc tcgtcggcgc ccccctaggg ggcgttgcca gggccctggc acatgggtgc      480
cgggttgtgg aggacggcgt gaactatgca acaggaatt tgcccgttg ctctttctct      540
atcttctctt tggctctgct gtctgttttg accatcccag cticcgccta tgaggtcgac      600
    
```

aacgtatccg ggatatacca tgtcacgaac gactgctcca actcaagtat tgtgtatgag 660  
 gcagcggaca tgatcatgca tacccccggg tccgtgccct gcgttcggga gggcaactcc 720  
 tcccgttgc tgggtggcact tactcccacg ctacgggcca ggaatgccag cgtccccact 780  
 acggcaatac gacgccatgt cgatttgctc gttggggcgg ctgctttcig ctccgctatg 840  
 tatgtgggag atctctggg atctgtttc ctgtctccc agctgttcac ctctcggccc 900  
 ccgggcatg agacaatata ggactgcaat tectcaatct atcccggcca cgtgtcaggt 960  
 caccgcatgg ctgggacat gatgatgaac tegtgccta caacggccct ggtggtgtcg 1020  
 cagttactcc ggatcccaca agctatcgtg gacatggigg cgggggctca ctgggggtgc 1080  
 ctacggggcc ttgcctacta ttccatggtg gggaaactggg ctaaggtatt gattgtgatg 1140  
 ctactttttg ccggcgtcga cggggagacc cgtgtgacag gggggcagat agccagaaat 1200  
 gcctactcgc tcacgacct cttttcatct gggtcggctc agaacatcca gctcataaac 1260  
 accaacggta gctggcacat caacaggact gccctgaact gcaatgactc cctcaacacc 1320  
 gggtttcttg ccgcgtggt ctacacgcac aagtccaacg cgtccggatg tccagagcgc 1380  
 ttggccagct gccgccccat tgacaagttc gatcaggggt ggggtcccat cacttatgct 1440  
 gagcagggcg gccaggacca gaggccttat tcttggcact acgcacctaa accatgtggt 1500  
 attgtatccg cgtcgaagg gtgtgtcca gtgtattggt tcacccaag cccagttgta 1560  
 gtggggacga ccgatcgggt cgggtgccct acgtatagct ggggggagaa tgagacagac 1620  
 gtctgtctcc ttaacaacac gcggccgccc caaggcaact ggttcggctg tacgtggatg 1680  
 aacggcacig ggttaccaa gacatgcggg gccccccgt gtaacatcgg gggggcggc 1740  
 aataacacct tgacctgcc tacggactgt ttccggaagc accccgcggc cacttacaca 1800  
 aatgtggtt cgggacctg gctgacacc aggtgcttgg tagactacc atacaggctc 1860  
 tggcactacc cctgcactgc caactttacc atcttcaagg ttaggatgta ttagggggc 1920

gtggagcaca ggctcgatgc tgcattgcaat tggacccgag gggaacgttg caacttggag 1980  
 gatagggata gatitggagct cagccccgcta ctgctgtcta caacagagtg gcagggtctg 2040  
 ccctgttctt tcaccaccct accggctctg tccactgggt taattcatct ccatcagaac 2100  
 atcgtggacg tgcaatacct gtacgggtata gggtcggcag ttgtttcctt tgcaatcaaa 2160  
 tgggactata tcgtgatact tttcctctct ctggcggagc cgcgcgtctg tgccctgttg 2220  
 tggatgatgc tgctgatagc ccaggccgag gccgccttag aaaacctggt ggtcctcaat 2280  
 gcgcgcgtccg tggccggagc gcatggcatt ctctcttcc ttgtgttctt ctgtgccgcc 2340  
 tggatcatca agggcaagct ggtccccggg gcagcatatg ctttctatgg agtatggccg 2400  
 ctgctcctgc ttctgtctggc cttaccacca cgagcttagc ctatggagcg ggagatggct 2460  
 gcatcgtgcg gaggcgcggt gtttgtaggt ctggtactct tgactttgtc accatactat 2520  
 aaagagttcc tcgccaggct catatggtgg ttgcaatatt ttatcaccag agccgaggcg 2580  
 cacctgcaag tgtggatccc ccccccaac attcgggggg gccgcgatgc catcatcctc 2640  
 ctgcgctgtg tagtccaccc agagctaatc ttigacatca ccaaactcct gctcgccata 2700  
 ctcggtccgc tcatggtgct ccaggctagc ataactcaag tgccgtactt cgtacgcgcc 2760  
 caaggctca ttcgtgcatg catgttggig cggaggtag ccgggggcca ttatgtccaa 2820  
 atggcctttg tgaagctgac cgcactgaca ggtacgtacg tttatgacca tctaactcca 2880  
 ctgcgggact gggcccacgc gggcctgcga gacctcgcgg tggcagtaga gcccgttgtc 2940  
 ttctctgaca tggagaccaa ggtcatcacc tggggggcag acaccgcagc gtgtggggac 3000  
 attatcttgg gtctacctgt ctccgcccga aggggtaggg agatacttct gggcccgccc 3060  
 gatagtcttg aagggcaggg gtggcggctc ctt 3093

<210> 2  
 <211> 7410  
 <212> ADN  
 <213> Virus de la hepatitis C

5

<400> 2

acgcgccgc cgcaaggcaa ctggttcggc tgtacgtgga tgaacggcac tgggttcacc 60  
 aagacatgcg ggggcccc gigtAACATC gggggggcg gcaataacac cttgacctgc 120  
 cctacggact gttccgga gcaccccgcc gccacttaca caaatgtgg ttcgggacct 180  
 tggctgacac ccaggtgctt ggtagactac ccatacaggc tctggcacta cccctgcact 240  
 gccaaactta ccatcttcaa ggttaggatg tatgtagggg gcgtggagca caggctcgat 300  
 gctgcatgca attggacccg aggggaacgt tgcaacttgg aggatagga tagattggag 360  
 ctacggcgc tactgtgtc tacaacagag tggcaggtgc tggcctgttc tttcaccacc 420  
 ctaccggctc tgtccactgg ttaattcat ctccatcaga acatcgtgga cgtgcaatac 480  
 ctgtacgga tagggtcggc agttgtttcc ttgcaatca aatgggacta tatcgtgata 540  
 ctttctctc tctggcga cgcgcgcgc tgtgctgct tgtggatgat gctgctgata 600  
 gccagggccg agggccctt agaaaacctg gtgtcctca atgcgcgcgc cgtggccgga 660  
 gcgcatggca ttctctcct ccttgtgttc ttctgtgcc cctgtacat caagggaag 720  
 ctggccccg gggcagcata tgcittctat ggagtatggc cgtcgtcct gcttctgctg 780  
 gccttaccac cagagctta cgctatggag cgggagatgg ctgcatcgtg cggaggcgcg 840  
 gtgtttgtag gtctgtact cttgacttgg tcaccatact ataaagagt cctgccagg 900  
 ctcatatggt ggttgaata tttatcacc agagccgagg cgcacctgca agtgtggatc 960  
 cccccctca acattcggg gggcccgat gccatcatcc tctcgcgtg ttagtccac 1020  
 ccagagctaa tcttgacat cacaaactc ctgctcgcca tactcgtcc gctcatggtg 1080  
 ctccaggcta gcataactca agtgccttac ttcgtacgc ccaagggt cattcgtgca 1140  
 tgcattgtg tgcggaagg agccggggc cattatgtcc aatggcctt tgtgaagctg 1200

accgcactga caggtacgta cgtttatgac catctaactc cactgcggga ctgggcccac 1260  
 gcgggcctgc gagacctcgc ggtggcagta gagcccgttg tcttctctga catggagacc 1320  
 aaggtcatca cctggggggc agacaccgca gcgtgtgggg acattatctt gggcttacct 1380  
 gtctccgcc gaaggggtag ggagatactt ctggggccgg ccgatagtct tgaagggcag 1440  
 gggtgccggc tcttctctcc catcacggcc tattcccaac agaccgggg cctacttgg 1500  
 tgcacatca ctagcctcac aggccgggac aaaaaccaag tcgaggggga ggttcaagt 1560  
 gtctccaccg cgacacaatc cttcctggcg acctgcgtca atggcgctg ctggactgtc 1620  
 ttccatggtg ccggctcaaa gacctagct ggcccaaaag gtccaatcac ccagatgtac 1680  
 actaatgtag acctggacct cgtcggctgg caggcgcccc ccggctcgg tctctgaca 1740  
 ccatgcacct gcggcagctc agacctctat ttggtcacga gacatgctga tgtcattccg 1800  
 gtgcgccggc ggggcgacag taggggaagc ctactctctc ccagacctgt ctctacttg 1860  
 aaaggctcct cgggtgttc gctgctctgc ccttcgaggc acgctgtgg catcttccg 1920  
 gctgctgtgt gcacccgggg ggttcgaag gcggttgatt tcatacccg tgaatcaatg 1980  
 gaaactacta tgcggtctcc ggtcttcacg gataactcat ccccccggc cgtaccgcag 2040  
 acattccaag tggcccatct acacgccct actggcagcg gcaagagcac taagggtccg 2100  
 gctgcatatg cagcccaagg gtataagggt ctcgtctga acccgtccgt tccgctacc 2160  
 ttgggttttg gggctatat gtctaaggca catggtatcg accccaacat cagaactgg 2220  
 gtaaggcca tcaccacggg cgcccctatt acatactcca cctaccgcaa gttccttgc 2280  
 gacggcggtt gttccggggc gcctatgac atcataatat gtgatgagtg ccactcaact 2340  
 gactcgacta ccactttggg cattggcaca gtcttgacc aagcggagac ggctggagcg 2400  
 cggctcgtcg tctcggccac cgctacgct ccgggatcgg tcaccgtecc acacccaat 2460  
 attgaggagg tggccctgtc caacgctga gaaatcccct tctaccgcaa agccatcccc 2520

attgaggta tcaaggggg aagacatctc attttctgcc attccaagaa gaagtatgac 2580  
 gagctcgccg caaagctatc agccctcgga cttaatgctg tagcatatta tcgggtctt 2640  
 gatgtgtccg tcataccgac caacggagac gtcgttctcg tggcaacaga cgctctaag 2700  
 acgggcttta ccggcgactt tgactcagtg atcgactgta acacatgtgt caccagaca 2760  
 gtcgatttca gcctggatcc caccitcacc atcgagacga cgaccgtgcc ccaagacgca 2820  
 gtggcggat cacagcggcg ggtaggact ggtaggggca ggagaggcat ctacaggtt 2880  
 gtgactccag gagaacggcc ctgggcatg ttcgattcct cggcctgtg tgagtctat 2940  
 gacgcggct gtgcttgta cgagctcacg cctgctgaga cctcggttag gttcgggct 3000  
 tacctgaata caccagggtt gccgctcgc caggaccatc tggagttttg ggagagcgtc 3060  
 tccacaggcc tcaccacat agatgccat tttctgtccc agactaaaca ggcaggagac 3120  
 aactcccct acctggtagc ataccaagcc acagtgtcg ccagagctca agctccacct 3180  
 ccatcatggg atcaaagtg gaagtgtc atacggctca aaccacgct gcacgggcca 3240  
 acaccctgc tgtataggct aggagccgtc caaatgaga tcaccctcac acaccctag 3300  
 accaaattca tcatggcatg catgtcggct gacctggagg tcgtcactag cacctgggtg 3360  
 ctagtagcgg gagtccttgc agctctggct gcatattgct tgacaacagg cagtgtggtc 3420  
 atttgggta ggatcatctt gtccgggagg ccggctgta tcccgcacag ggaagtctc 3480  
 taccgggagt tcgatgagat ggaagagtgc gcctcacacc tcccttacct cgaacagga 3540  
 atgcagcttg ccgagcaatt caagcagaag gcgctcggat tgctgcaaac agccaccaag 3600  
 caagcggagg ctgctgctcc cgtggtagaa tccaagtggc gagcccttga gaccttctg 3660  
 gcgaagcaca tgtggaatt catcagcggg atacagtacc tagcaggctt gtccactctg 3720  
 cctgggaacc ccgcatagc atcactgatg gcattcacag cctctatcac cagcccgctc 3780  
 tccaccaga atacctatt attaacatc tgggggggat ggttggctgc ccaactcgcc 3840

ccccccagtg ctgcttcggc tttcgtgggc gccggtatcg ccggtgcggc tgtcggcagc 3900  
ataggctttg ggaaggtgct tgtggacatc ttggcgggat atggggcagg ggtggctggc 3960  
gcgctcgtag cttttaagat catgagcggc gaggtgccct ccaccgagga cctggttaac 4020  
ttactccctg ccatccttc tcccggcgcc ctagtctgct ggtcgtgtg cgcagcaata 4080  
ctcgtcggc acgtggggcc gggagagggg gctgtacagt ggatgaaccg gctgatagcg 4140  
ttcgcctcgc gggtaacca cgtttcccc gcgcactatg tgcctgagag cgacgctcgc 4200  
gcgctgttta ctcagatcct ctccggcctt accatcactc agctgctgaa gagccttcac 4260  
cactggatca atgaggactg ctccacgcca tgctccggtt cgtggctaag ggatgtttgg 4320  
gactggatat gcacgggtgt gactgacttc aagacctggc tccagtcaa gctcctgccg 4380  
cggttaccgg ggttccttt ctctcgtgt caacgcgggt acaaggaggt ctggcggggg 4440  
gacggtatca tgcagaccac ctgcccgtgt ggagcacaga tcaccggaca tgtcaaaaac 4500  
ggttcatga ggatcgtcgg gcctaaaacc tgcagcagca cgtggcatgg aacgttcccc 4560  
atcaacgcat acaccacagg cccatgcgca cctccccgg cgccaaacta ttccaggggc 4620  
ctatggcggg tggccgctga ggagtacgtg gaggttacgc ggtggggga ttccactac 4680  
gtgacgggca tgaccactga caacgtaaag tgcccatgcc aggttccggc cctgaattc 4740  
ttactgagg tggatggagt gcggttcac aggtacgctc cggcgtgcaa acccctccta 4800  
cgggaggagg tcacattcca ggttgggctc aaccaatacc tggttgggtc acagctccca 4860  
tgcgagcccg aaccgatgt agcagtgcta acttccatgc ttaccgacce ctcccacatc 4920  
acagcagaga cggcaaagcg taggctggct agggggtctc cccctcctt ggccagttct 4980  
tcagctagcc agttatctgc gccctccttg aaggcgacat gcactacca tcatgactcc 5040  
ccggacgttg acctcatcga ggccaacctc ctgtggcggc aggagatggg cgggaacatc 5100  
acccgcgtgg agtcagagaa taaggtagta atttggact ctttcgatcc gctccgagcg 5160

gaggaggacg agagggaaacc atccgttgcg gcggagatct tgcggaaaac caagaggttc 5220  
cccccgcgga tgcccatatg ggcacgcccc gattacaacc ctccgttgct agagtcctgg 5280  
aaagaccggg actacgtccc tccggtggtg cacgggtgcc cgctaccacc taccaaagct 5340  
cctccgatac cccccccagc gagaaagagg acggtagtcc tgacagagtc cactgtgtct 5400  
tctgccttgg cggagcttgc tactaagacc tttggcagct ccgggtcgtc ggccgtcgac 5460  
agggcacggc caactgtctc tcccgaccag gcttccgacg acggcgacca aggatctgac 5520  
gttgagtctg attcctccat gccccctctt gagggagagc cgggggaccc cgatctcagc 5580  
gacgggtctt ggtctaccgt gagcgaggag gccggtgagg acgtcatctg ctgctcaatg 5640  
tctacacat ggacaggcgc ctgatcacc ccatgcgccg cggaggaaaag caagttgccc 5700  
atcaaccggt tgagcaactc ttgtttgcgt caccacaaca tggctatgac tacaacatcc 5760  
cgcagcgcag gcctacggca gaagaaggtc accttgaca gactgcaagt cctggacgac 5820  
cactaccggg acgtgctcaa ggagatgaag gcgaaggcgt ccacagttaa ggctaaactc 5880  
ctatccatag aagaagcctg taagctgacg cccccacatt cggccagatc caaatttggc 5940  
tatggggcaa aggacgtccg gaacctatcc agcaaggccg ttaaccacat ccgctccgtg 6000  
tggaaggact tgctggaaga cactgagaca ccaattgaca ccaccgtcat ggcaaaaagt 6060  
gaggtttct gcgtccaacc agagaaagga ggccgcaagc cagctcgctt tatcgtattc 6120  
ccagacttgg gggttcgtgt atgcgagaag atggcccttt atgacgttgt ctccaccctt 6180  
cctcaggccg tgatgggctc ctcatagga ttccagtact cccctggaca gcgggtcgag 6240  
ttcctgggta atgcctggaa atcaaagaaa tgcctatgg gcttttcata tgacacccgc 6300  
tgttttgact cgacagtcac tgagagtac atccgtgttg aggagtcaat ttaccaatgt 6360  
tgtgacttgg cccccgaagc cagacaggcc ataaagtcgc tcacagagcg gctttacatt 6420  
gggggtcccc tgaccaattc aaaagggcag aactgtggct atcggcggtg ccgcgcgagt 6480

ggcgtgctga cgaccagctg cggtaatacc cttacatggt acttgaaggc ctctgcagcc 6540  
 tgtcgagctg caaagctccg ggactgcacg atgctcgtga acggagacga cctcgtcgtc 6600  
 atctgtgaga gtgcgggaac ccaagaggat gaggcgaacc tacgagtcct cacggaggct 6660  
 atgactaggt attctgcccc ccccggggac ccgccccgac cagaatacga cttggagcta 6720  
 ataacatcat gttcctcaa tegtctggtc gcgcacgatg catctggcaa aagggtatac 6780  
 taccacacc gcgaccctc cccccctt gcacgggctg cgtgggagac agctagacac 6840  
 actccagtta attcctggct aggcaacatc attatgtatg cgcccacctt atgggcaagg 6900  
 atgattctga tgaccattt cttctccatc cttctagccc aggagcaact tgaaaaagcc 6960  
 ctggattgcc agatctacgg ggctgttac tccattgagc cacttgacct acctcagatc 7020  
 attgaacgac tccatggtct tagcgcattt tcactccata gttactctcc aggtgagatc 7080  
 aataggttg cttcatgcct caggaaactt ggggtaccac ctttgcgagt ctggagacat 7140  
 cgggccagaa gtgtccgcg taagctgctg tcccagggg ggagggctgc cacttgtggt 7200  
 aagtacctt tcaactgggc agtaaggacc aagctcaaac tcactccaat cccggcagcg 7260  
 tcccagttgg acttgtccag ctggttcgtg gctggttaca gcgggggaga catatatcac 7320  
 agcctgtctc gtgcccgacc ccgctggtc atgttgtgcc tactcctact ttcagtaggg 7380  
 gtaggcatct acctgctccc caaccgataa 7410

<210> 3  
 <211> 9048  
 <212> ADN  
 <213> Virus de la hepatitis C  
 <400> 3

5

cgtagaccgt gcatcatgag cacaaatcct aaaccccaaa gaaaaaccaa acgtaacacc 60  
 aaccgcccgc cacaggacgt caagttcccg ggtggtggtc agatcgttgg tggagtttac 120  
 ctggtgccgc gcaggggccc caggttgggt gtgcgcgca ctaggaagac ttccgagcgg 180

10

tcaaacctc gtggaaggcg acaacctatc cccaaggctc gccagcccga gggcagggcc 240  
 tgggctcagc ccgggtaccc ttggcccctc tatggcaacg agggcatggg gtgggcagga 300  
 tggctcctgt caccccgcgg ctcccggcct agttggggcc ccacggaccc ccggcgtagg 360  
 tccgtaatt tggtaaggt catcgatacc ctcacatgcg gcctcgccga cctcatgggg 420  
 tacattccgc tcgtcggcgc ccccctaggg ggcgttgcca gggccctggc acatgggtgc 480  
 cgggttgigg aggacggcgt gaactatgca acaggaatt tgcccggttg ctctttctct 540  
 atcttctct tggctctgct gtccgttttg accateccag cttccgctta tgagggtcgc 600  
 aacgtatccg ggatatacca tgtcacgaac gactgctcca actcaagtat tgtgtatgag 660  
 gcagcggaca tgatcatgca tcccccggg tgcgtgccct gcgttcggga gggcaactcc 720  
 tcccgttgc tgggtggcact tactcccacg ctagcggcca ggaatgccag cgtcccact 780  
 acggcaatac gacgccatgt cgatttgctc gttggggcgg ctgcctttctg ctccgctatg 840  
 tatgtgggag atctctgcgg atctgttttc ctgtctccc agctgttcac cttctcgccc 900  
 cgccggcatg agacaataca ggactgcaat tgctcaatct atcccggcca cgtgtcaggt 960  
 cacccatgg cttgggacat gatgatgaac tggtcgcta caacggccct ggtgggtgctg 1020  
 cagttactcc ggatcccaca agctatcgtg gacatgggtg cgggggctca ctgggggtgc 1080  
 ctagcgggcc ttgcctacta ttccatggtg gggaactggg ctaaggtatt gattgtgatg 1140  
 ctacttttg ccggcgtcga cggggagacc cgtgtgacag gggggcagat agccagaaat 1200  
 gcctactcgc tcacgaccct ctttcatct gggtcggctc agaacatcca gctcataaac 1260  
 accaacgta gctggcacat caacaggact gccctgaact gcaatgactc cctcaacacc 1320  
 gggtttcttg ccgcgctgtt ctacacgcac aagttcaacg cgtccggatg tccagagcgc 1380  
 ttggccagct gccgccccat tgacaagtic gatcaggggt ggggtcccat cacttatgct 1440  
 gagcagggcg gccaggacca gaggccttat tgctggcact acgcacctaa accatgtggt 1500

atgtatccg cgtcgaaggt gtgtgtcca gtgtattgtt taccccaag cccagttgta 1560  
 gtggggacga ccgatcgtt cgggtccct acgtatagct gggggagaa tgagacagac 1620  
 gtgtgtctcc ttaacaacac gcggccgccc caaggcaact ggttcggctg tacgtggatg 1680  
 aacggcactg ggttcaccaa gacatgcggg gggccccctg gtaacatcgg gggggcggc 1740  
 aataacacct tgacctgcc tacggactgt ttccggaagc accccgcggc cacttacaca 1800  
 aaatgtggtt cgggacctg gctgacacc aggtgcttgg tagactacc atacaggctc 1860  
 tggcactacc cctgcactgc caactttacc atcttcaagg ttaggatgta ttagggggc 1920  
 gtggagcaca ggctcgatec tgcattcaat tggaccgag ggaacgtt caacttggag 1980  
 gataggata gattggagct cagcccgcta ctgctgtcta caacagatg gcaggtgctg 2040  
 cctgttctt tcaccacct accggctctg tccactggt taattcatct ccatcagaac 2100  
 atcgtggacg tgcaatacct gtacgtata gggtcggcag ttgtttcct tgcaatcaa 2160  
 tggactata tctgatact tttctctc ctggcggac gcgcgctctg tgctgtctg 2220  
 tggatgatgc tgctgatagc ccaggccgag gccgccttag aaaacctggt ggtcctcaat 2280  
 gcggcctccg tggccggagc gcatggcatt ctctcttcc ttgttctt ctgtgccgc 2340  
 tggatcatca agggcaagct ggtccccggg gcagcatatg cttctatgg agtatggccg 2400  
 ctgctcctgc ttctgctggc ctaccacca cgagcttagc ctatggagcg ggagatggct 2460  
 gcatcgtgcg gaggcgggt gttttaggt ctggtactct tgactttgtc accatactat 2520  
 aaagagtcc tcgccaggct catatgggtg ttgcaatatt ttatcaccag agccgaggcg 2580  
 cacctgcaag tgtggatccc cccctcaac attcggggg gccgcgatgc catcatctc 2640  
 ctgcgctgtg tagtccacc agagctaac ttgacatca ccaaactcct gctgccata 2700  
 ctgggtccgc tcatggtgct ccaggctagc ataactcaag tgccgtactt cgtacggcc 2760  
 caaggctca ttctgcatg catgttggg cggaaggtag ccggggcca ttatgtcaa 2820

atggcctttg tgaagctgac cgcactgaca ggtacgtacg tttatgacca tctaactcca 2880  
ctgcgggact gggcccacgc gggcctgcga gacctcgcg tggcagtaga gcccgttgtc 2940  
ttctctgaca tggagaccaa ggtcatcacc tggggggcag acaccgcagc gtgtggggac 3000  
attatcttgg gtctacctgt ctccgcccga aggggtaggg agatacttct ggggccggcc 3060  
gatagtcttg aagggcaggg gtggcggctc cttgctccca tcacggccta ttcccaacag 3120  
acgcggggcc tacttggttg catcatcact agcctcacag gccgggacaa aaaccaagtc 3180  
gagggggagg ttcaagtggc ctccaccgcg acacaatcct tctggcgac ctgcgtcaat 3240  
ggcgcgtgct ggactgtctt ccatgggtcc ggctcaaaga ccttagctgg cccaaaaggt 3300  
ccaatcacc agatgtacac taatgtagac ctggacctcg tcggctggca ggcgcccccc 3360  
gggtcgcgtt ctctgacacc atgcacctgc ggcagctcag acctctattt ggtcacgaga 3420  
catgctgatg tcattccggt gcgcccgcg ggcgacagta ggggaagcct actctctccc 3480  
agacctgtct cctacttgaa aggcctctcg ggtggctccg tgctctgccc ttcgaggcac 3540  
gctgtgggca tcctccgggc tgcctgtgtc acccgggggg ttgcgaaggc ggtggatttc 3600  
ataccggtg aatcaatgga aactactatg cggctctccg tcctcacgga taactcatcc 3660  
ccccggccg taccgcagac attccaagtg gcccatctac acgcccctac tggcagcggc 3720  
aagagcacta aggtgccggc tgcatatgca gcccaagggt ataagggtct cgtcctgaac 3780  
ccgtccgttg ccgctacctt gggttttggg gcgtatatgt ctaaggcaca tggtatcgac 3840  
cccaacatca gaactggggc aagggccatc accacggggc cccctattac atactccacc 3900  
tacggcaagt tccttgccga cggcggttgt tccgggggcg cctatgacat cataatatgt 3960  
gatgagtgcc actcaactga ctgactacc atcttgggca ttggcacagt cctggaccaa 4020  
gcggagacgg ctggagcgcg gctcgtcgtc ctgccaccg ctacgcctcc gggatcggtc 4080  
accgtgccac accccaatat tgaggaggcg gccctgtcca acgctggaga aatccccttc 4140

tacggcaaag ccatcccat tgaggatc aagggggaa gacatctcat tttctgcat 4200  
 tccaagaaga agtatgacga gctcggca aagctatcag ccctcggact taatgctgta 4260  
 gcatattatc ggggtcttga tgtgtccgtc ataccgacca acggagacgt cgttgcgtg 4320  
 gcaacagacg ctctaagac gggctttacc ggcgactttg actcagtgat cgactgtaac 4380  
 acatgtgtca cccagacagt cgatttcagc ctggatcca cttcacat cgagacgacg 4440  
 accgtgcccc aagacgcagt ggcgcgatca cagcggcggg gtaggactgg tagggcagg 4500  
 agaggcatct acaggtttgt gactccagga gaacggcct cggcatgtt cgattcctcg 4560  
 gtccgtgtg agtgctatga cgcgggctgt gcttggtagc agctcacgc tctgagacc 4620  
 tcggttaggt tgcgggcta cctgaatata ccaggttgc ccgtctgcca ggaccatctg 4680  
 gagtttggg agagcgtctc cacaggcctc acccacatag atgccattt tctgtcccag 4740  
 actaacagg caggagaaa cttcccctac ctggtagcat accaagccac agtggcgcc 4800  
 agagctcaag ctccacctc atcatgggat caaatgtgga agtgtctcat acggctcaaa 4860  
 cccacgctgc acgggccaac acccctgctg tataggctag gagccgtcca aaatgagatc 4920  
 accctcacac accccatgac caaattcatc atggcatgca tctcggctga cctggaggtc 4980  
 gtcactagca cctgggtgct agtaggcgga gtccttgtag ctctggctgc atattgcttg 5040  
 acaacaggca gtgtggtcat tgtggtagg atcatcttgt ccgggaggcc ggctgttatt 5100  
 cccgacagg aagtcctcta ccgggagttc gatgagatgg aagagtgcgc ctcacacctc 5160  
 cttacatcg aacaggaat gcagcttgc gagcaattca agcagaaggc gctcggattg 5220  
 ctgcaaacag ccaccaagca agcggaggct gctgctccc tggtagaatc caagtggcga 5280  
 gcccttgaga cttctgggc gaagcacatg tgaatttca tcagcgggat acagtaccta 5340  
 gcaggcttgt ccactctgcc tgggaacccc gcgatagcat cactgatggc attcacagcc 5400  
 tctatacca gcccgctctc caccagaat accctattat ttaacatctg gggggatgg 5460

gtggctgcc aactcgccc cccagtgct gcttcggctt tcgtggcgc cggatcgcc 5520  
 ggtgcggctg tcggcagcat aggtcttggg aagggtcttg tggacatctt ggcgggatat 5580  
 ggggcagggg tggctggcgc gctcgtagct tttaaagatca tgagcggcga ggtgccctcc 5640  
 accgaggacc tggttaactt actccctgcc atccctctc cggcgccct agtcgtcggg 5700  
 gtcgtgtgc cagcaatact gcgtcggcac gtggcccgg gagagggggc tgtacagtgg 5760  
 atgaaccggc tgatagcgtt cgcctcggcg ggaaccacg tttccccgc gcactatgtg 5820  
 cctgagagcg acgctcggcg gcgtgttact cagatcctct cggccttac catcactcag 5880  
 ctgctgaaga ggcttcacca ctggatcaat gaggactgct ccacgccatg ctccggttcg 5940  
 tggctaaggg atgtttggga ctggatatgc acgggttga ctgacttcaa gacctggctc 6000  
 cagtccaagc tctgcccgc gttaccgggg gtccctttct tctcgtgtca acgcgggtac 6060  
 aaggagctt ggcgggggga cggatcatg cagaccacct gcccggtgag agcacagatc 6120  
 accggacatg tcaaaaacgg ttccatgagg atcgtcgggc ctaaaacctg cagcagcagc 6180  
 tggcatggaa cgttccccat caacgcatac accacaggcc catgcgcacc ctccccggcg 6240  
 ccaaactatt ccagggcgct atggcgggtg gccgctgagg agtacgtgga ggttacgcgg 6300  
 gtgggggati tccactacgt gacgggcatg accactgaca acgtaaagt cccatgccag 6360  
 gttccggccc ctgaattctt cactgaggtg gatggagtgc gttgcacag gtacgctccg 6420  
 gcgtgcaaac ccctcctacg ggaggaggtc acattccagg ttgggctcaa ccaatacctg 6480  
 gttgggtcac agctcccatg cgagcccga cggatgtag cagtgctaac ttccatgctt 6540  
 accgaccctt cccacatcac agcagagacg gcaaagcgtg ggctggctag ggggtctccc 6600  
 ccctccttgg ccagttcttc agctagccag ttatctgccc cttccttga ggcgacatgc 6660  
 actaccatc atgactcccc ggacgttgac ctcatcgagg ccaacctcct gtggcggcag 6720  
 gagatggcgc ggaacatcac ccgctggag tcagagaata aggtagtaat tttggactct 6780

ttcgatccgc tccgagcggg ggaggacgag | agggaacct ccttgcgccc ggagatcttg 6840  
 cggaaaacca agaggttccc cccggcgaig cccatatggg cacgcccgga ttacaaccct 6900  
 ccgttgctag agtcctggaa agaccgggac tacgtccctc cggtggatca cgggtgcccg 6960  
 ctaccaccta ccaaagctcc tccgatacca cccccacgga gaaagaggac ggtagtcttg 7020  
 acagagtcca ctgtgtcttc tgccttggcg gagcttgcta ctaagacctt tggcagctcc 7080  
 gggctgtcgg ccgtcgacag cggcacggca actgtctctc ccgaccaggc ttccgacgac 7140  
 ggcgaccaag gatctgacgt tgagtcgtat tcttccatgc cccctcttga gggagagccc 7200  
 ggggaccccg atctcagcga cgggtcttgg tctaccgtga gcgaggaggc cggtagggac 7260  
 gtcattctgt gctcaatgtc ctacacatgg acaggcgcct tgatcacgcc atgcgcccgcg 7320  
 gaggaaagca agttgcccat caaccggttg agcaactctt tgttgcgta ccacaacatg 7380  
 gtctatgcta caacatcccg cagcgcaggc ctacggcaga agaaggcac ctttgacaga 7440  
 ctgcaagtcc tggacgacca ctaccgggac gtgctcaagg agatgaaggc gaaggcgtcc 7500  
 acagttaagg ctaaactcct atccatagaa gaagcctgta agctgacgcc cccacattcg 7560  
 gccagatcca aatttggcta tggggcaaag gacgtccgga acctatccag caaggccgtt 7620  
 aaccacatcc gctccgtgtg gaaggactig ctggaagaca ctgagacacc aattgacacc 7680  
 accgtcatgg caaaaagtga ggttttctgc gtccaaccag agaaaggagg ccgcaagcca 7740  
 gctcgcctta tcgtattccc agacttgggg gticgtgtat gcgagaagat ggccctttat 7800  
 gacgttgtct ccacccttcc tcaggccgig atgggctcct catacggatt ccagtactcc 7860  
 cctggacagc ggtcagatt cctggatgaat gcctggaaat caaagaaatg ccctatgggc 7920  
 ttttcatatg acaccgctg ttttgactcg acagtcactg agagtacat ccgtgttgag 7980  
 gactcaattt accaatgttg tgaacttggcc cccgaagcca gacaggccat aaagtcgctc 8040  
 acagagcggc tttacattgg ggtccccctg accaattcaa aagggcagaa ctgtggctat 8100

**cgccggtgcc ggcgagtg cgtctgacg accagctgcg gtaatacct tacatgttac 8160**  
**ttgaaggcct ctgcagcctg tgcagctgca aagctccggg actgcacgat gctcgtgaac 8220**  
**ggagacgacc tcgtcgtcat ctgtgagagt gcgggaacct aagaggatga ggcgaacct 8280**  
**cgagicttca cggaggctat gactaggat tctgcccccc ccggggacct gccccgacca 8340**  
**gaatacgact tggagctaataacatcatgt tcttccaatg tgtcggtcgc gcacgatgca 8400**  
**tctggcaaaa gggatatacta cctcaccgac gaccctcca cccccctgc acgggctgcg 8460**  
**tgggagacag ctgacacac tccagtaata tctggctag gcaacatcat tatgtatgcg 8520**  
**cccaccttat gggcaaggat gattctgatg acccatttct tctccatcct tctagcccag 8580**  
**gagcaacttg aaaaagccct ggattgccag atctacgggg cctgttactc cattgagcca 8640**  
**cttgacctac ctgagatcat tgaacgactc catggcttta gcgcatttc actccatagt 8700**  
**tactctccag gtgagatcaa taggtggct tcatgcctca ggaacttgg ggtaccacct 8760**  
**ttggagctct ggagacatcg gcccagaagt gtccgcgcta agctgctgct ccaggggggg 8820**  
**agggctgcca ctgttggtaa gtacctcttc aactgggcag taaggaccaa gctcaaactc 8880**  
**actccaatcc cggcagcgtc ccagttggac ttgtccagct ggttcgtggc tggttacagc 8940**  
**gggggagaca tatatcacag cctgtctcgt gcccgacccc gctggttcat gttgtcccta 9000**  
**ctcctacttt cagtaggggt aggcattctac ctgctcccca accgataa 9048**

<210> 4  
 <211> 849  
 <212> ADN  
 <213> Virus de variolovacuna  
 <400 4

**gatgatgatg atgatgatga tgatgatgat gtcatagacg atgatgatta taatccaaaa 60**  
**cccactccga taccggagcc tcaccctaga ccaccgtttc ccagacatga atatcataag 120**

5

10

**aggccgaaag ttcttctgt agaagaacct gatcctgtca aaaaagacgc ggatcgtata 180**  
**agacttgata atcatatatt aaacacattg gatcataatc ttaattccat cggacactat 240**  
**tgttggata cagcagcagt tgataggta gaacatcaca ttgaaacatt gggacaatat 300**  
**gcagtaatac tagcaagaaa gataaatatg caaacattac tgttcccatg gccattacct 360**  
**actgtccatc cacatgcat agatggtagt attccgccac atgggagatc tacgatctta 420**  
**taattacacg attgtagtta agttttgaat aaaatttttt tataataaat agaggtcacg 480**  
**aacctcgact ctagaggatc ccatttgtaa aaattgaaaa actagtctaa tttattgcac 540**  
**gggtgaaaa attgaaaaac tagtctaatt tattgcacgg tgtgaaaaat tgaaaaacta 600**  
**gtctaattta ttgcacggtg tgaaaaattg aaaaactagt ctaatttatt gcacggtgtg 660**  
**aaaaattgaa aaactagtct aatttatgac acggtgtgaa aaattgaaaa actagtctaa 720**  
**tttattgcac gggtgaaaa attgaaaaac tagtctaatt tattgcacgg tgtgaaaaat 780**  
**tgaaaaacta gtctaattta ttgcacggtg tgaaaaattg aaaaactagt taatttattg 840**  
**cacggtgtg 849**

5 <210> 5  
 <211> 88  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> ADN sintético  
 <400 5

**gggcggccct gcaggtaata cgactcacta tagggcgtag accgtgcac atgagcacia 60**

**atcctaaacc ccaaagaaaa accaaacg 88**

15 <210> 6  
 <211> 57  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> ADN sintético

<400 6  
 gggcggcgcg atcgctatc attaaaggag ccgccacccc tgccttcaa gactatc 57

25 <210> 7  
 <211> 83

|    |   |           |
|----|---|-----------|
|    | <212> ADN   |           |
|    | <213> Artificial  |           |
|    | <220>   |           |
| 5  | <223> ADN sintético   |           |
|    | <400 7  |           |
|    | <b>gggcggccct gcaggaata cgactcacta tagggcgtag accgtgcatc atgacgcggc</b> | <b>60</b> |
|    | <b>cgccgcaagg caactggttc ggc</b>  | <b>83</b> |
| 10 | <210> 8   |           |
|    | <211> 51  |           |
|    | <212> ADN   |           |
|    | <213> Artificial  |           |
| 15 | <220>   |           |
|    | <223> ADN sintético   |           |
|    | <400 8  |           |
| 20 | ggcgcgcg atcgctatc attatcggtt ggggagcagg tagatgccta c 51                |           |
|    | <210> 9   |           |
|    | <211> 23  |           |
|    | <212> ADN   |           |
| 25 | <213> Artificial  |           |
|    | <220>   |           |
|    | <223> ADN sintético   |           |
| 30 | <400 9  |           |
|    | ggtcttatat acaccgagta agg 23  |           |
|    | <210> 10  |           |
|    | <211> 20  |           |
| 35 | <212> ADN   |           |
|    | <213> Artificial  |           |
|    | <220>   |           |
|    | <223> ADN sintético   |           |
| 40 | <400 10   |           |
|    | tcaggaaaga cagccatagc 20  |           |
|    | <210> 11  |           |
| 45 | <211> 22  |           |
|    | <212> ADN   |           |
|    | <213> Artificial  |           |
|    | <220>   |           |
| 50 | <223> ADN sintético   |           |
|    | <400 11   |           |
|    | catcacattg aaacattgg ac 22  |           |
| 55 | <210> 12  |           |
|    | <211> 20  |           |
|    | <212> ADN   |           |
|    | <213> Artificial  |           |
| 60 | <220>   |           |
|    | <223> ADN sintético   |           |

ES 2 573 704 T3

<400 12  
 gatttgct catgatgcac 20  
 5 <210> 13  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 10 <220>  
 <223> ADN sintético  
 <400 13  
 ccgaaccaca tttgtgtaa gtg 23  
 15 <210> 14  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 20 <220>  
 <223> ADN sintético  
 <400 14  
 agtagagccc gttgtctt 18  
 25 <210> 15  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 30 <220>  
 <223> ADN sintético  
 <400 15  
 tacctctca actgggcagt 20  
 35 <210> 16  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 40 <220>  
 <223> ADN sintético  
 45 <400 16  
 ctagtctga gaaaccagag g 21  
 50 <210> 17  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 55 <220>  
 <223> Péptido sintético  
 <400 17  
 Leu Met Gly Tyr Ile Pro Leu Val Gly Ala  
 1 5 10  
 60 <210> 18  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
<223> Péptido sintético

5  
<400 18

**Gly His Arg Met Ala Trp Asp Met**  
**1 5**

10  
<210> 19  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Artificial

15  
<220>  
<223> Péptido sintético  
<400 19

**Gly Gly Pro Pro Cys Asp Ile Gly Gly Val**  
**1 5 10**

20  
<210> 20  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Artificial

25  
<220>  
<223> Péptido sintético  
<400 20

**Gly Gly Pro Pro Cys Asn Ile Gly Gly Gly**  
**1 5 10**

30

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un virus de la variolovacuna recombinante que comprende un promotor de la expresión y un ADNc del genoma del virus de la hepatitis C, donde el ADNc es:
- 10 (a) ADN representado por la SEQ ID NO: 2; o  
(b) ADN que se hibrida con ADN que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 2 en condiciones rigurosas que tiene 95 % o más de homología con la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 2 y que codifica la proteína no estructural del virus de la hepatitis C.
- 15 2. El virus de la variolovacuna recombinante de acuerdo con la reivindicación 1, donde el virus de la variolovacuna se prepara a partir de la cepa LC16m8.
- 20 3. El virus de la variolovacuna recombinante de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde el promotor de la expresión es un promotor híbrido.
4. El virus de la variolovacuna recombinante de acuerdo con la reivindicación 3, donde la secuencia de nucleótidos del promotor híbrido es ADN de (a) o (b) siguiente:
- 25 (a) ADN que tiene la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 4; o  
(b) ADN que se hibrida con ADN que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 4 bajo condiciones rigurosas y que tiene una actividad promotora.
- 30 5. Una composición farmacéutica que comprende el virus de la variolovacuna recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
6. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5 para su uso en la prevención de la hepatitis C.
7. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5 para su uso en el tratamiento de la hepatitis C.

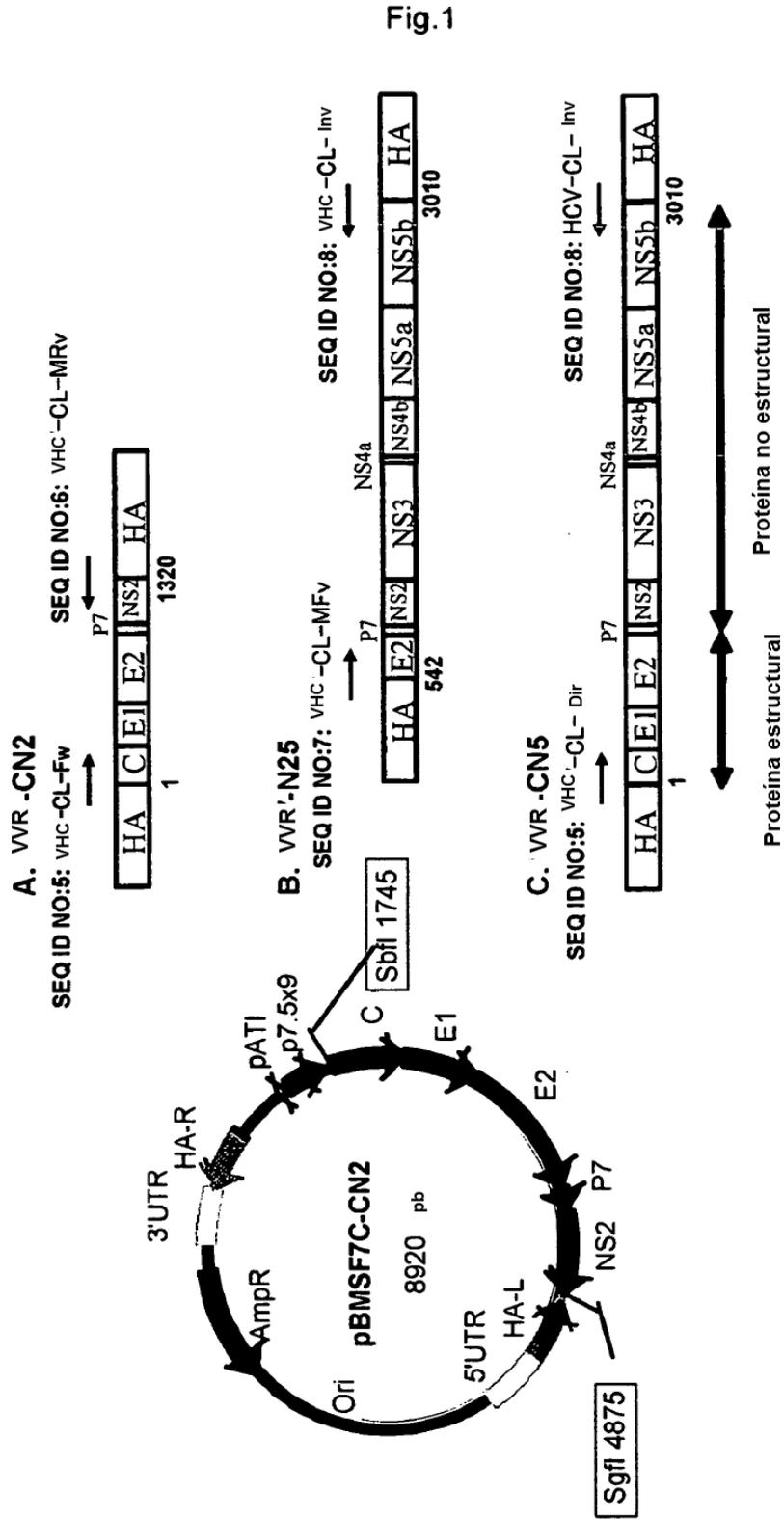
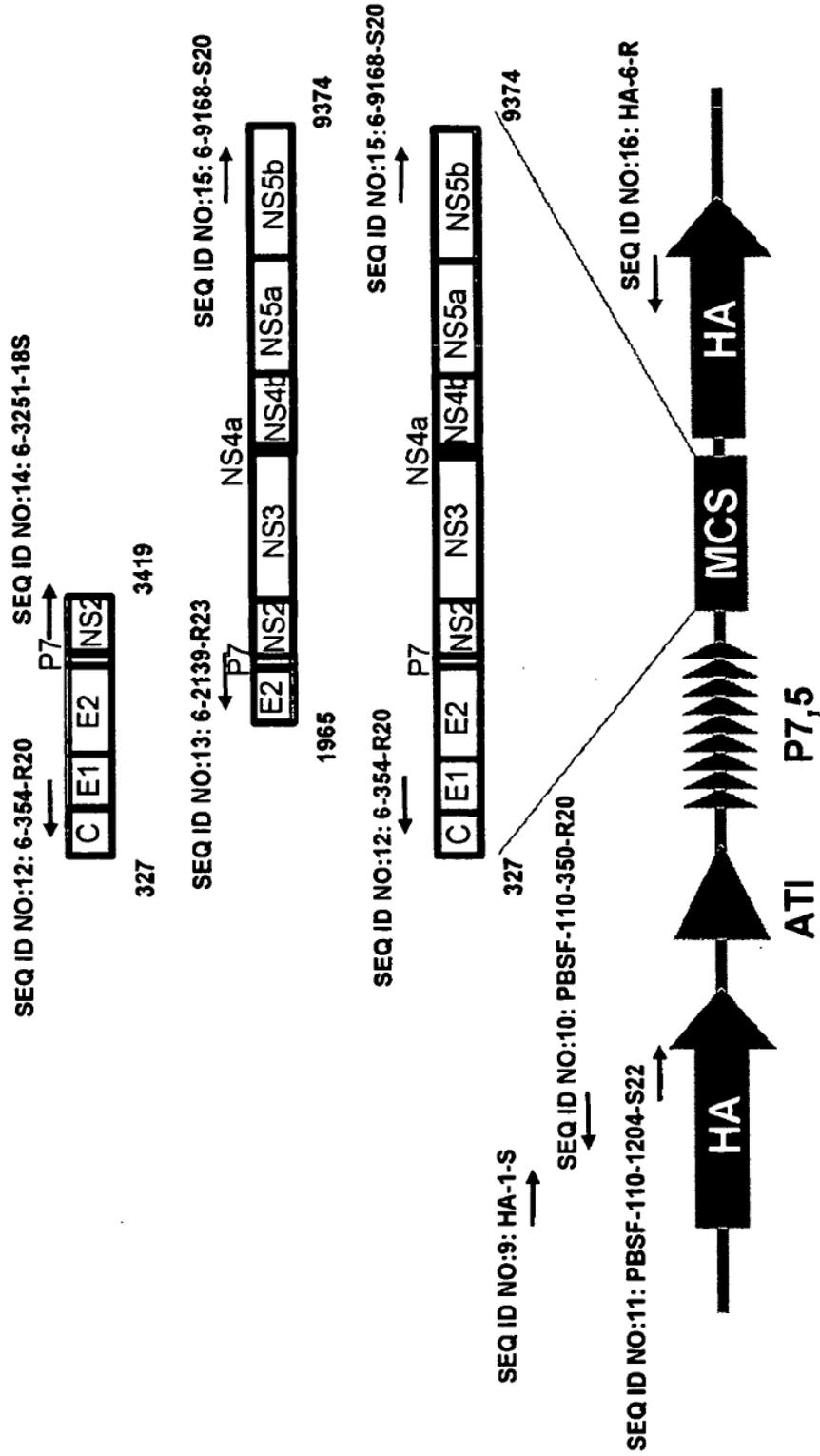
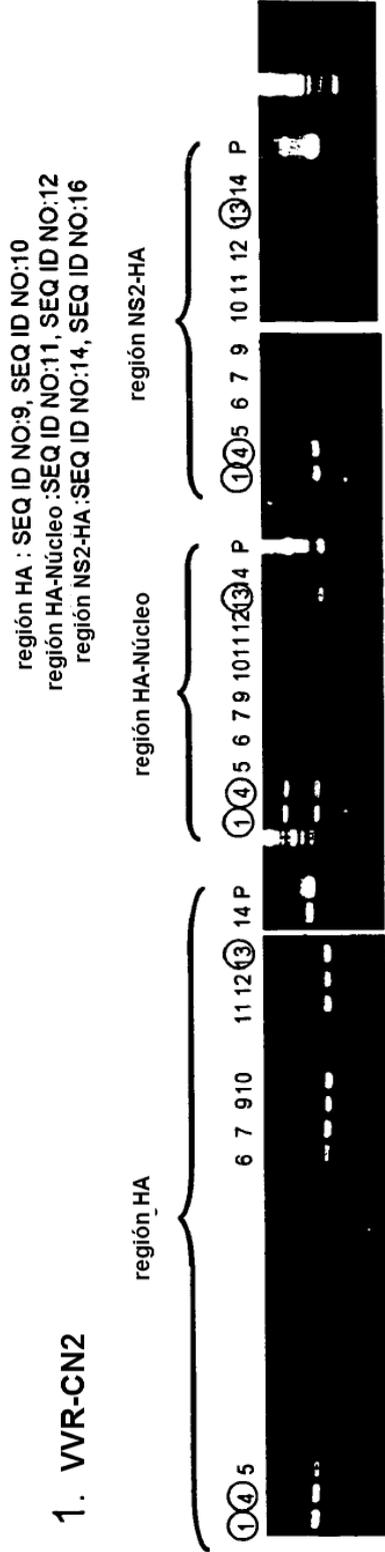


Fig. 1

Fig.2

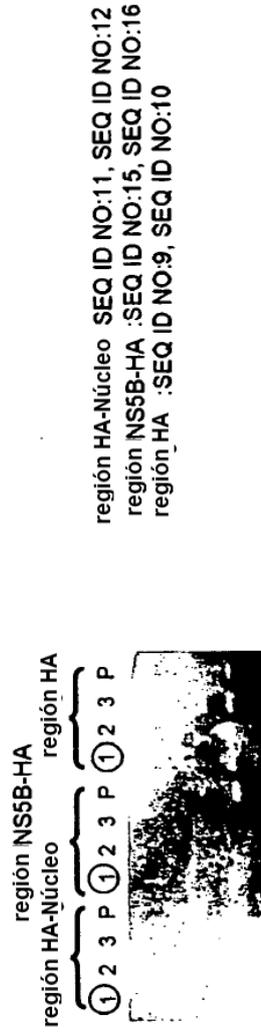


1. VVR-CN2



1, 4, 13: Clones insertados con las regiones génicas completas  
 P: Vector plasmídico de control positivo

2. VVR-CN5



1: Clones insertados con las regiones génicas completas  
 P: Vector plasmídico de control positivo

Fig.3

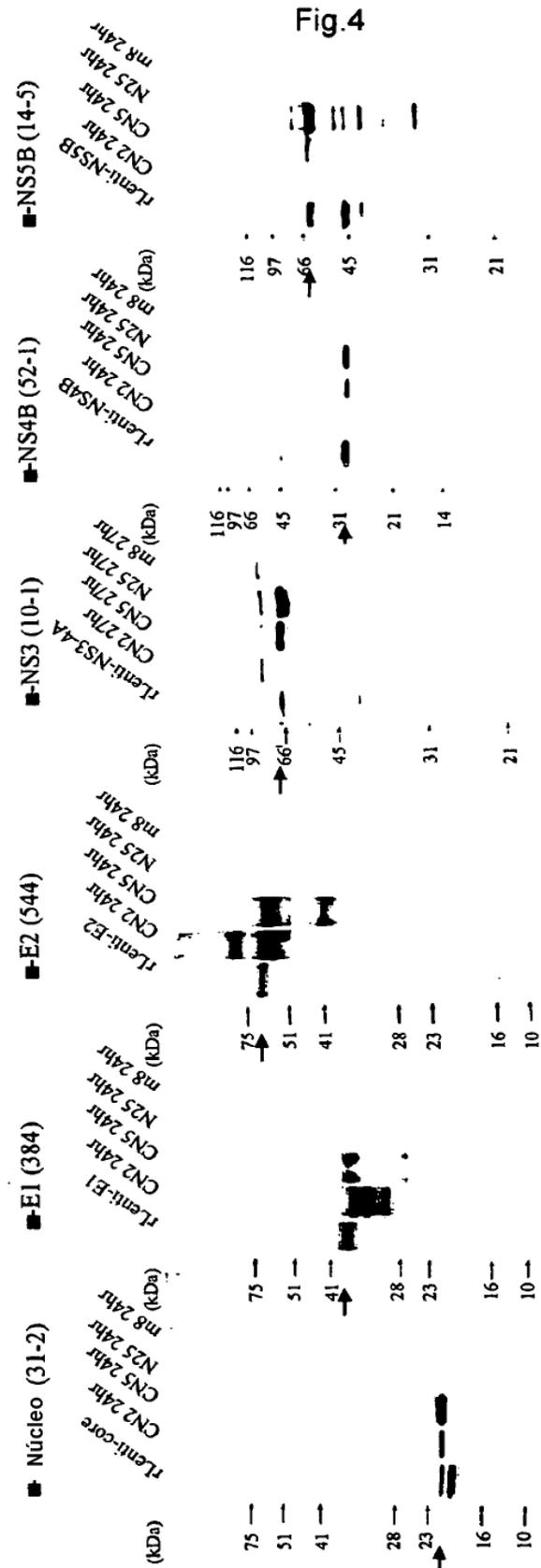
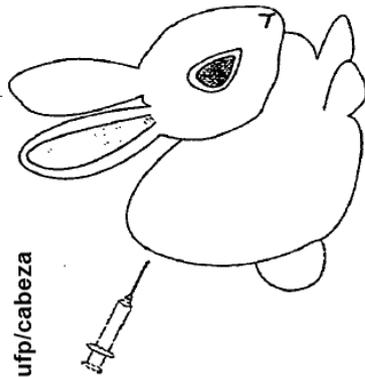


Fig.5

**1. Capacidad del VHC-VVR para inducir inmunidad humoral**

Conejo vacunado intradérmicamente

$10^8$  ufp/cabeza



Medición del título de anticuerpos contra VHC (ELISA)

**2. Capacidad del VHC-VVR para inducir inmunidad celular**

Ratón

vacunado intradérmicamente

$10^8$  ufp/cabeza

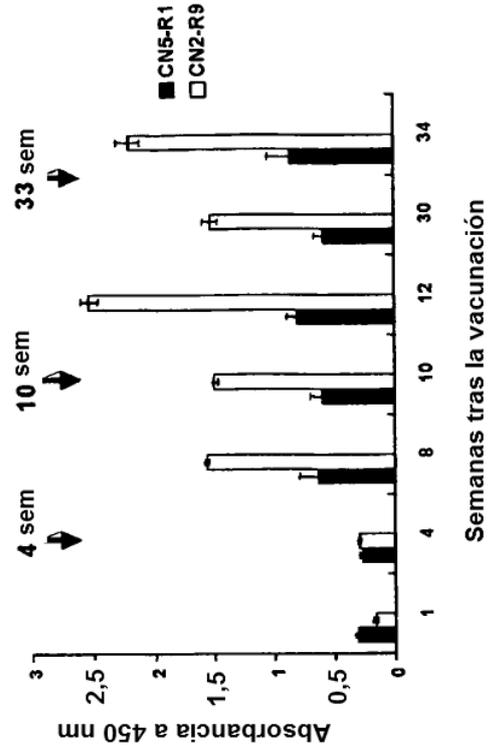
Esplenocito



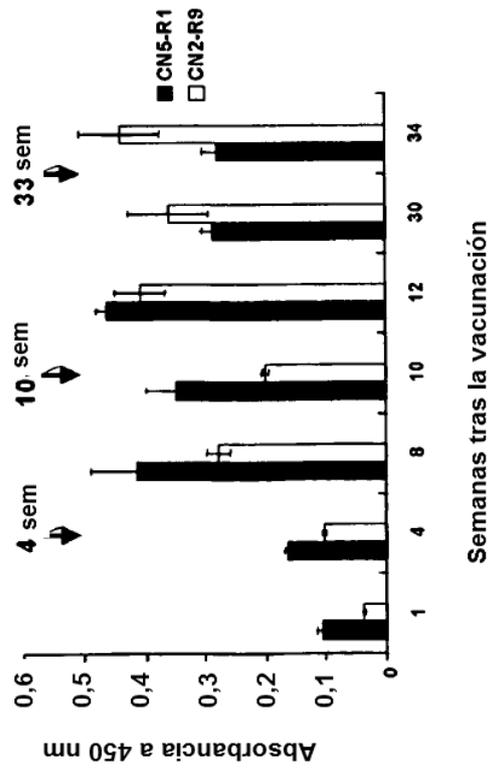
Confirmación de inducción de células T específicas del VHC (ensayo ELISPOT)

Fig.6

2. E2



1. Núcleo



1. Secuencias de aminoácidos del epítipo de CTL H-2<sup>d</sup>

| Región | Código | Nombre del epítipo | Referencias |                           | Número de aa | HCR6                      |             |
|--------|--------|--------------------|-------------|---------------------------|--------------|---------------------------|-------------|
|        |        |                    | Posición aa | Secuencia                 |              | Secuencia                 | Posición aa |
| Core   | 1      | C7-A10             | 133-142     | LMGYPLVGA (SEQ ID NO:17)  | 9            | LMGYPLVGA (SEQ ID NO:17)  | 133-142     |
| E1     | 1      | E1 3' 5'-322       | 315-322     | GHRVAWDM (SEQ ID NO:18)   | 8            | GHRVAWDM (SEQ ID NO:18)   | 315-322     |
| E2     | 1      | E2 565-574         | 565-574     | GGPCCGIGGV (SEQ ID NO:19) | 10           | GGPCCGIGGG (SEQ ID NO:20) | 565-574     |

2. Resultados del ensayo ELISPOT (BALB/c H-2<sup>d</sup>)

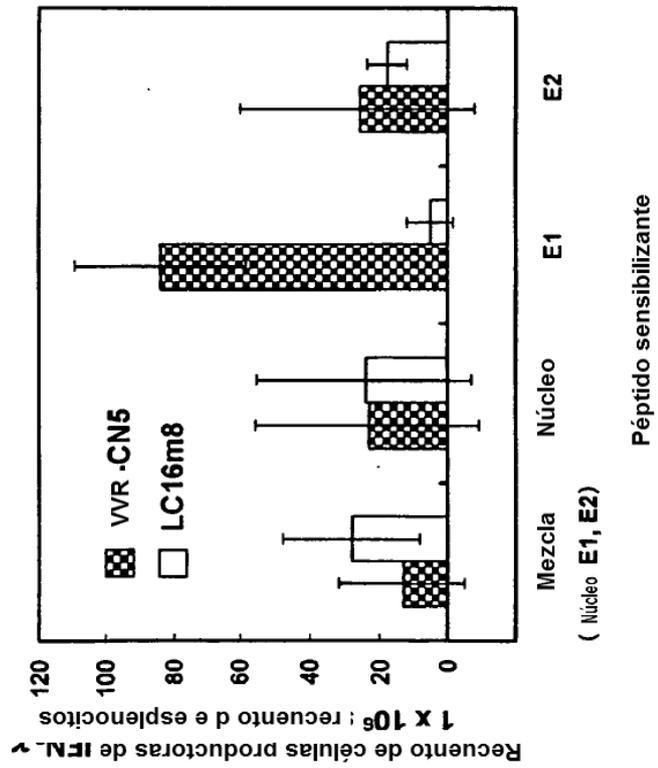


Fig.7

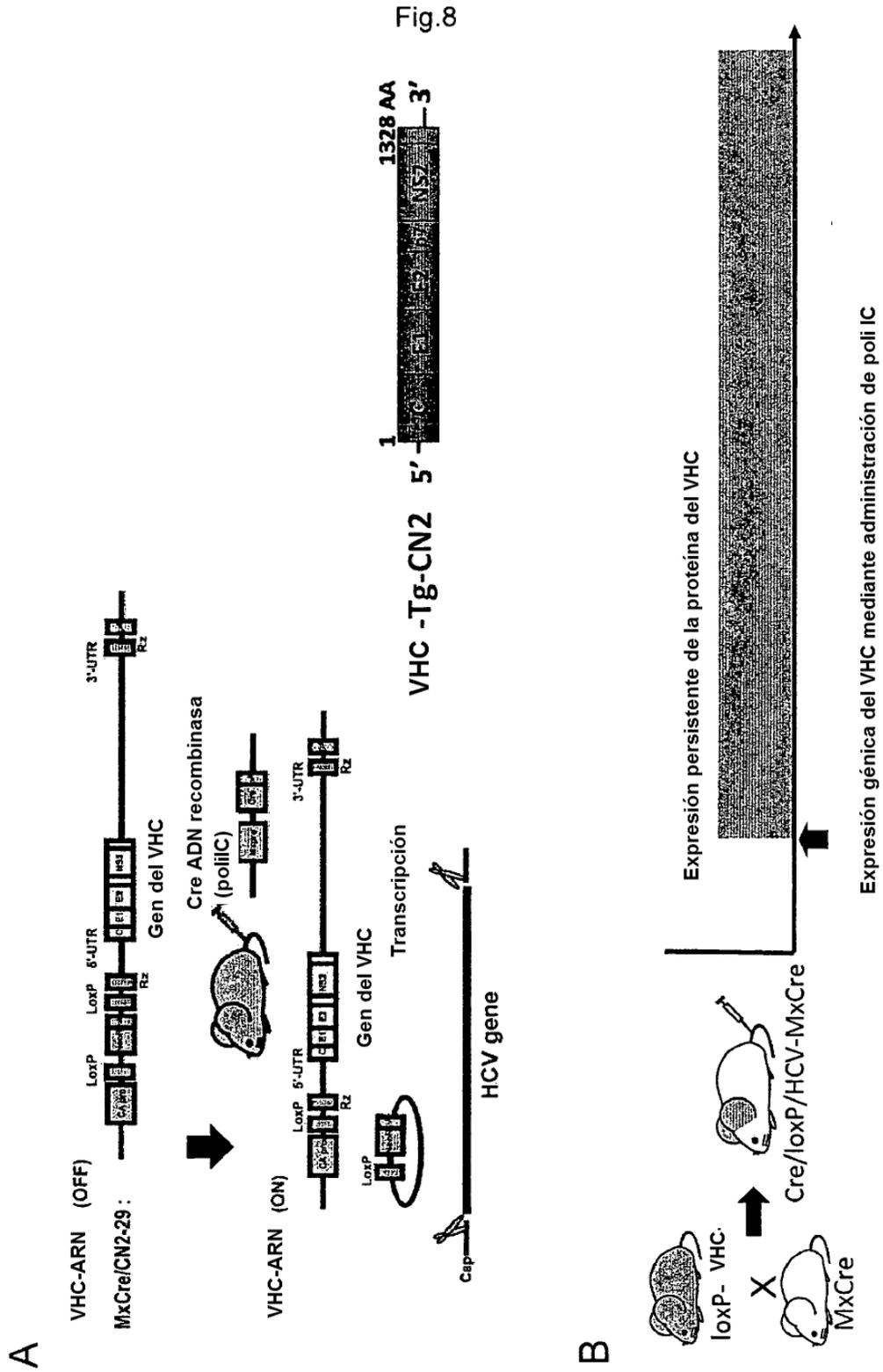


Fig.8

Fig.9

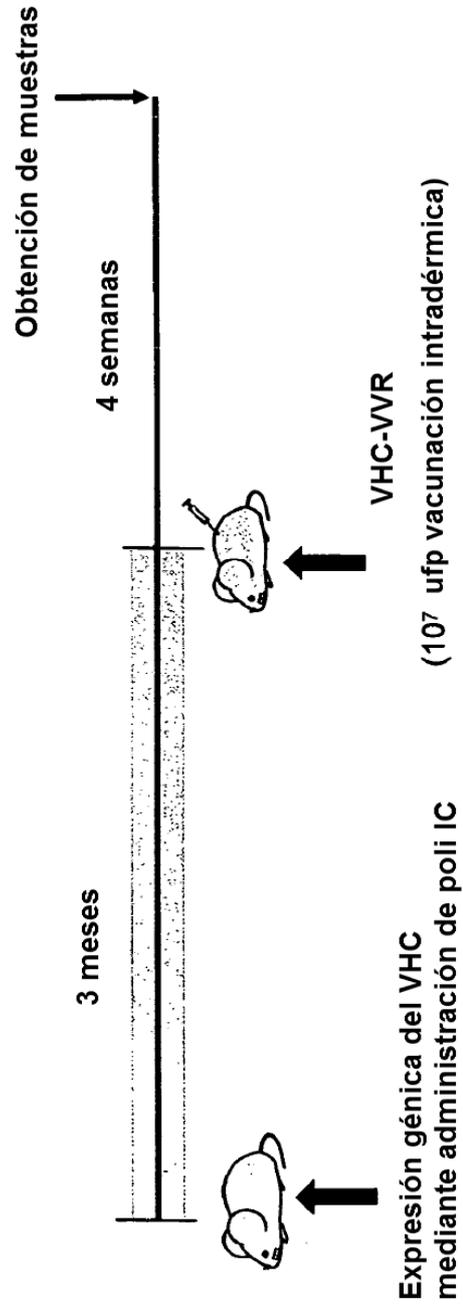


Fig.10

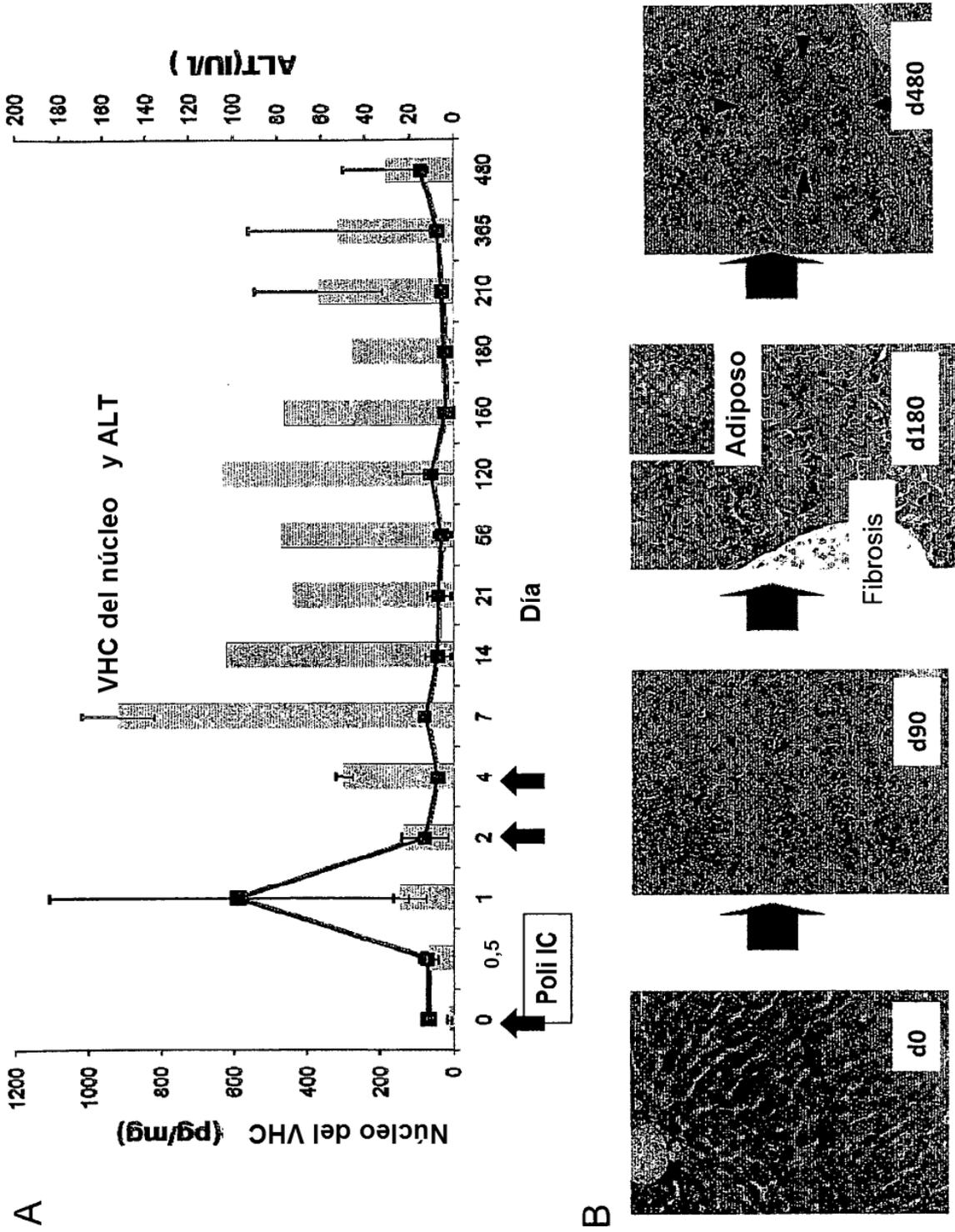


Fig.11

