



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 346 326**

51 Int. Cl.:

C12N 15/63 (2006.01)	C12N 1/15 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)	C12N 1/21 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)	C12N 7/01 (2006.01)
C12Q 1/02 (2006.01)	C12Q 1/68 (2006.01)
G01N 33/15 (2006.01)	G01N 33/50 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)	G01N 33/567 (2006.01)
C07K 16/08 (2006.01)	A61K 35/76 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05719575 .2**

96 Fecha de presentación : **21.02.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1721985**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.11.2006**

54 Título: **Construcción de ácidos nucleicos que contiene el genoma de longitud completa del virus de la hepatitis C humana; célula replicante del genoma de longitud completa de virus recombinante que tiene la construcción de ácidos nucleicos transferida al anterior y procedimiento para construir partículas víricas de la hepatitis C.**

30 Prioridad: **20.02.2004 JP 2004-45489**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
14.10.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
14.10.2010

73 Titular/es: **Tokyo Metropolitan Organization for Medical Research
8-1, Nishishinjuku 2-chome
Shinjuku-ku, Tokyo 163-8001, JP
TORAY INDUSTRIES, Inc.**

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

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

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

Construcción de ácidos nucleicos que contiene el genoma de longitud completa del virus de la hepatitis C humana; célula replicante del genoma de longitud completa de virus recombinante que tiene la construcción de ácidos nucleicos transferida al anterior y procedimiento para construir partículas víricas de la hepatitis C.

Campo técnico

La presente invención se refiere a un replicón de ARN que comprende una secuencia de nucleótidos específica, al menos un gen marcador y/o al menos un gen indicador seleccionables, un procedimiento para producir una célula que replica un replicón de ARN y produce una partícula de virus, una célula que replica un replicón de ARN y produce una partícula de virus para cribar una sustancia contra el virus de la hepatitis C, una vacuna de la hepatitis C, un procedimiento para producir una vacuna de la hepatitis C, un procedimiento *in vitro* para producir partículas del virus de la hepatitis C y el uso de las partículas del virus de la hepatitis C producidas.

Antecedentes de la técnica

El virus de la hepatitis C (VHC) pertenece a la familia Flaviviridae y es un virus que tiene un genoma de ARN de sentido directo (+) de cadena única y es conocido por producir la hepatitis C.

El VHC produce hepatitis crónica por infección persistente. Actualmente, la principal causa de hepatitis crónica observada mundialmente es la infección persistente por VHC. En la actualidad, alrededor del 50% de individuos con infección persistente desarrolla hepatitis crónica. La hepatitis crónica en aproximadamente un 20% de estos pacientes evoluciona a cirrosis hepática en el curso de 10 a 20 años, y algunos de estos pacientes experimentan adicionalmente condiciones patológicas letales avanzadas tales como cáncer hepático.

La hepatitis C se trata actualmente principalmente mediante terapia usando interferón- α o interferón- β , o una terapia que usa una combinación de interferón- α y ribavirina, un derivado nucleósido de purina. Sin embargo incluso cuando se llevan a cabo estas terapias, se observan efectos terapéuticos en solo un 60% de los pacientes tratados. Cuando cesan las terapias después que se observan los efectos, se recrudece la enfermedad en más de la mitad de los pacientes.

Es una importante meta desarrollar agentes terapéuticos o agentes profilácticos eficaces contra la hepatitis C. La tasa de incidencia de la hepatitis C, que produce finalmente graves consecuencias, es elevada en países industriales, y no está actualmente disponible un tratamiento causal. Por tanto, se desea el desarrollo de terapias específicas de VHC y terapias de vacunas. Un objetivo para el desarrollo de un agente dirigido contra el VHC puede ser la supresión de la replicación de VHC o la supresión de la infección de las células con VHC.

Recientemente, se han preparado sistemas de replicones de ARN subgenómico de VHC, en forma de ARN replicable autónomamente derivado de VHC (véanse, los Documentos de Patente 1,2 y 3, los Documentos No de Patente 1-4). En los sistemas de replicones de ARN subgenómico de VHC, el replicón de ARN de VHC en el que se eliminan y sustituyen los genes estructurales del genoma de VHC con un gen marcador seleccionable de fármaco, se prepara e introduce en células cultivadas, y por tanto, el replicón de ARN se replica autónomamente en las células. Usando estos sistemas llega a ser posible analizar el mecanismo de replicación de VHC. Sin embargo, este es un sistema experimental en el que únicamente se evalúa la replicación del ARN vírico en el proceso de la proliferación y la replicación del virus VHC, y no se puede analizar el proceso de formación de las partículas del virus VHC en las células infectadas y la liberación extracelular de la infección en otras células.

En la actualidad, se puede evaluar únicamente el proceso de formación de partículas del virus VHC y la liberación extracelular así como la infección en otras células en los sistemas experimentales que usan animales tales como chimpancés (Documento No de Patente 5). Sin embargo, los sistemas experimentales que usan organismos vivos tales como animales son complicados y muy difíciles de analizar. Por tanto, con el fin de analizar el proceso de formación de partículas del virus VHC y la liberación extracelular, así como la infección en otras células, y para producir un agente dirigido contra VHC que tendrá el mecanismo de acción de inhibir este proceso, es necesario establecer un sistema experimental muy simplificado que reproduzca este proceso, es decir, un sistema de producción de partículas del virus VHC en sistemas experimentales de cultivo celular.

Adicionalmente, una vez que se pueden proporcionar de manera estable partículas del virus VHC usando el sistema de cultivo celular, es posible atenuar el virus o producir virus VHC no infeccioso usando técnicas de biología molecular, y se pueden usar éstas en vacunas.

Documento de Patente 1: Publicación de patente japonesa (kokai) N° 2001-17187

Documento de Patente 2: Solicitud de Patente Internacional PCT/JP03/15038

Documento de Patente 3: Solicitud de Patente japonesa N° 2003-329082

Documento No de Patente 1: **Lohmann** y col., *Science*, (1999) 285, p. 110-113

Documento No de Patente 2: **Blight** y col., *Science*, (2000) 290, p 1972-1974

Documento No de Patente 3: **Friebe** y col., *J. Virol.*, (2001) 75(24): p. 12047-12057

Documento No de Patente 4: **Ikeda** y col., *Science*, (1977) 277, p. 2997-3006

Documento No de Patente 5: **Kolykhalov** y col., *Science*, (1977) 277, p. 570-574

Documento No de Patente 6: **Kato** y col., *Gastroenterology*, (2003) 125, p. 1808-1817

Documento No de Patente 7: **Yanagi** y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, (1997) 96(16): p. 8738-8743

Documento No de Patente 8: **Okamoto** y col., *J. Gen. Virol.* (1991) 73, p. 2697-26704

Documento No de Patente 9: **Aoyagi** y col., *J. Clin. Microbiol.*, (1999) 37(6): p. 1802-1808

Divulgación de la invención

El objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento para replicar eficazmente el ARN que contiene las secuencias genómicas del VHC de longitud completa y un procedimiento para producir partículas del virus VHC que contengan el replicón de ARN del VHC de longitud completa o el ARN genómico del VHC de longitud completa en un sistema de cultivo celular. El objetivo de la presente invención no se ha conseguido nunca hasta el momento.

Como resultado de intensos estudios para conseguir el anterior objeto, los presentes inventores han desarrollado un procedimiento para producir partículas del virus VHC en un sistema de cultivo celular. Esto es, la presente invención proporciona un replicón de ARN de acuerdo con las reivindicaciones 1, 2 y 3. En las reivindicaciones 4 a 13 se definen las materias sujeto de la presente invención.

[1] Un replicón de ARN, que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende una región 5' no traducida que comprende una secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEC DE ID N°: 1, una secuencia de codificación de una proteína núcleo que comprende una secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEC DE ID N°: 2, una secuencia de codificación de la proteína E1 que comprende una secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEC DE ID N°: 3, una secuencia de codificación de la proteína E2 que comprende una secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEC DE ID N°: 4, una secuencia de codificación de la proteína NS2 que comprende una secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEC DE ID N°: 5, una secuencia de codificación de la proteína NS3 que comprende una secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEC DE ID N°: 6, una secuencia de codificación de la proteína NS4A que comprende una secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEC DE ID N°: 7, una secuencia de codificación de la proteína NS4B que comprende una secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEC DE ID N°: 8, una secuencia de codificación de la proteína NS5A que comprende una secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEC DE ID N°: 9, una secuencia de codificación de la proteína NS5B que comprende una secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEC DE ID N°: 10, una región 3' no traducida que comprende una secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEC DE ID N°: 11, al menos un gen marcador seleccionable y/o al menos un gen indicador, y al menos una secuencia IRES, en el que dicho al menos un gen marcador seleccionable y/o al menos un gen indicador, y dicha al menos una secuencia IRES se colocan entre la región 5' no traducida y la secuencia de codificación de la proteína núcleo en este orden en la dirección 5' a 3', en el que dicho replicón de ARN tiene capacidad de replicación autónoma y capacidad de producción de partículas de virus,

[2] En el replicón de ARN de acuerdo con [1], la secuencia de nucleótidos comprende la región 5' no traducida, el al menos un gen marcador seleccionable y/o el al menos un gen indicador, y la al menos una secuencia IRES, y la secuencia de codificación de la proteína núcleo, la secuencia de codificación de la proteína E1, la secuencia de codificación de la proteína E2, la secuencia de codificación de la proteína NS2, la secuencia de codificación de la proteína NS3, la secuencia de codificación de la proteína NS4A, la secuencia de codificación de la proteína NS4B, la secuencia de codificación de la proteína NS5A, la secuencia de codificación de la proteína NS5B, y la región 3' no traducida en este orden en la dirección 5' a 3'.

En un ejemplo de un replicón de ARN, el ARN genómico del virus de la hepatitis C de genotipo 2a es un ARN que comprende la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEC DE ID N°: 12.

[3] El replicón de ARN de acuerdo con [1], que comprende el ARN (a) o (b) siguiente:

(a) un ARN que comprende una secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEC DE ID N°: 13; o

(b) un ARN que comprende una secuencia de nucleótidos derivada de la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEC DE ID N°: 13 mediante delección, sustitución o adición de 1 a 100 nucleótidos, en el que dicho replicón de ARN tiene capacidad de replicación autónoma y capacidad de producción de partículas de virus.

- [4] un procedimiento para producir una célula que replica un replicón de ARN y produce una partícula de virus, que comprende introducir el replicón de ARN de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [3] en una célula.

Para este procedimiento la célula es preferiblemente una célula proliferativa. Para este procedimiento la célula es también o preferiblemente de otra manera una célula eucariota.

- [5] Una célula que replica un replicón de ARN y produce una partícula de virus, que comprende el replicón de ARN de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [3].

- [6] La célula de acuerdo con [5], en la que la célula es una célula derivada de hígado humano, una célula derivada de cuello uterino humano o una célula derivada de riñón fetal humano.

- [7] La célula de acuerdo con [5], en la que la célula es una célula Huh7, una célula hepG2, una célula IMY-N9, una célula HeLa o una célula 293.

- [8] Un procedimiento para producir una partícula del virus de la hepatitis C, que comprende cultivar la célula de acuerdo con uno cualquiera de [5] a [7] para dejar a la célula producir la partícula de virus.

- [9] Una partícula de virus de la hepatitis C que comprende el replicón de ARN de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [3].

- [10] Un procedimiento para cribar una sustancia dirigida contra el virus de la hepatitis C, que comprende cultivar, en presencia de una sustancia de ensayo, al menos una seleccionada entre el grupo constituido por (a) y (b) siguientes:

(a) la célula de acuerdo con [5] a [7], y

(b) la partícula de virus de la hepatitis C de acuerdo con [9] y la célula permisiva al virus de la hepatitis C;

y detectar el replicón de ARN o las partículas de virus en el cultivo resultante.

- [11] Una vacuna de la hepatitis C, que comprende la partícula del virus de la hepatitis C de acuerdo con [9] o una parte de la misma.

- [12] Un procedimiento para producir una vacuna de la hepatitis C de acuerdo con [9] o una parte de la misma como un antígeno.

- [13] Uso del replicón de ARN de acuerdo con uno cualquiera [1] a [3] en la producción de partículas del virus de la hepatitis C en células cultivadas.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una vista esquemática que muestra los procedimientos para construir una plantilla de ADN para preparar el replicón de ARN del VHC de longitud completa o el ARN genómico del VHC de longitud completa. La parte superior de la Figura 1 muestra la estructura de un clon del plásmido pJFH1, que se produce insertando el genoma del VHC de longitud completa en la dirección 3' del promotor T7. La parte inferior de la Figura 1 muestra la estructura del clon del plásmido pFGREP-JFH1 de acuerdo con la invención, que comprende la secuencia genómica del VHC de longitud completa, en la que se inserta un fragmento de ADN que contiene el gen de resistencia a la neomicina y el IRES de EMCV en la dirección 3' del promotor T7 de pJFH1 y en la región 5' no traducida. Los términos que se muestran en la figura son como sigue. T7: promotor T7 del ARN, 5' UTR: región 5' no traducida, C: proteína núcleo, E1, E2: proteínas de la envoltura. NS2, NS3, NS4A, NS4B, 4A, 4B: proteínas no estructurales. 3' UTR: región 3' no traducida AgeI, PmeI, XbaI: emplazamientos de restricción de los enzimas de restricción AgeI, PmeI y XbaI. GDD: El emplazamiento del motivo GDD de los aminoácidos que corresponde al centro activo de la proteína NS5B. neo: el gen resistente a la neomicina. IRES de EMCV: emplazamiento de entrada ribosómica interna del virus de la encefalomiocarditis;

La Figura 2 es una fotografía que muestra el resultado de un análisis de transferencia Northern que muestra la replicación de rJFH-1 en células Huh7 en las que se ha introducido rJFH-1, el ARN genómico del VHC de longitud completa;

La Figura 3 muestra el resultado de la cuantificación de la proteína núcleo de VHC en el medio de cultivo. El círculo abierto representa las células en las que se ha introducido rJFH1, y el círculo cerrado representa las células en las que se ha introducido rJFH1/GND;

La Figura 4 es una gráfica que muestra las cantidades de proteína núcleo de VHC y en ARN genómico de VHC de longitud completa, y los pesos específicos de cada una de las fracciones que se recogieron mediante fraccionamiento del sobrenadante del cultivo de las células Huh7 introducidas en rJFH1 mediante el gradiente de densidad de la

sacarosa. El círculo cerrado, el círculo abierto y el círculo sombreado representan la proteína del núcleo de VHC, el ARN genómico del VHC de longitud completa y el peso específico, respectivamente;

La Figura 5 es una fotografía que muestra la formación de colonias de células Huh7 en las que se transfectó rFGREP-JFH1, el replicón de ARN de VHC de longitud completa;

La Figura 6 es una fotografía que muestra la replicación del replicón de ARN del VHC de longitud completa en el clon de célula replicante del ARN del replicón de VHC de longitud completa, que se ha establecido transfectando rFGREP-JFH1 en células Huh7;

La Figura 7 es una fotografía que muestra el resultado de la amplificación de la PCR usando el ADN genómico de la células huésped como plantilla y los cebadores específicos para el gen resistente a la neomicina, para confirmar la integración del gen de resistencia a la neomicina en el ADN genómico. M: marcador de tamaño del ADN, P: control positivo, N: células Huh7;

La Figura 8 es una fotografía que muestra el resultado de un análisis de transferencia Western que demuestra la expresión de la proteína núcleo en células Huh7 en las que se ha introducido rFGREP-JFH1, el replicón de ARN del VHC de longitud completa;

La Figura 9 es una fotografía que muestra el resultado de un análisis de transferencia Western que demuestra la expresión de la proteína NS3 en células Huh7 en las que se ha introducido rFGREP-JFH1, el replicón de ARN del VHC de longitud completa;

La Figura 10 es una fotografía que muestra el resultado de un análisis de transferencia Western que demuestra la expresión de la proteína NS5A en células Huh7 en las que se ha introducido rFGREP-JFH1, el replicón de ARN del VHC de longitud completa;

La Figura 11 es una gráfica que muestra las cantidades de proteína núcleo de VHC y del replicón de ARN del VHC de longitud completa, y los pesos específicos para cada una de las fracciones que se recogieron mediante fraccionamiento del sobrenadante del cultivo de células Huh7 introducido en rFGREP-JFH1 mediante el gradiente de densidad de la sacarosa. El círculo cerrado, el círculo abierto y el círculo sombreado representan la proteína núcleo del VHC, el replicón de ARN del VHC de longitud completa y el peso específico, respectivamente; y

La Figura 12 es una fotografía que muestra la formación de colonias de células Huh7 en las que se han añadido partículas de virus en el sobrenadante del cultivo de la célula replicante del replicón de ARN del VHC de longitud completa.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se explica en detalle como sigue.

1. Replicón de ARN del VHC de longitud completa

El genoma del virus de la hepatitis C (VHC) es un ARN de sentido directo (+) de cadena única que comprende aproximadamente 9600 nucleótidos. Este ARN genómico comprende la región 5' no traducida (denotada también como 5' NTR o 5' UTR), una región traducida compuesta por una región estructural y una región no estructural, y la región 3' no traducida (denotada también como 3' NTR o 3' UTR). Las proteínas estructurales de VHC están codificadas en la región estructural y una pluralidad de proteínas no estructurales está codificadas en la región no estructural.

Dichas proteínas estructurales de VHC (núcleo, E1 y E2) y no estructurales (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B) se generan en primer lugar traduciendo la región traducida en una poliproteína continua única y a continuación, liberando ésta mediante escisión restringida de la poliproteína por las proteasas. Entre estas proteínas estructurales y proteínas no estructurales (esto es, proteínas víricas de VHC), el núcleo es una proteína núcleo, E1 y E2 son proteínas de la envoltura. Las proteínas no estructurales son proteínas implicadas en la propia replicación vírica, y se sabe que NS2 tiene actividad metaloproteasa, y se sabe que NS3 tiene actividad serina proteasa (en un tercio del N terminal lateral) y actividad helicasa (en dos tercios del C terminal lateral). Además NS4A es un cofactor para la actividad de la proteasa de NS3, y se ha informado que NS5B tiene actividad ARN polimerasa dependiente de ARN.

Los presentes inventores construyeron un replicón de ARN que tenía capacidad de replicación autónoma y capacidad de producción de partículas de virus, usando el ARN genómico.

La capacidad de replicación autónoma que tiene el ARN, que se ha producido modificando el ARN genómico de VHC se denomina "ARN del replicón" o "replicón de ARN" en el presente documento. En la presente memoria, el replicón de ARN derivado de VHC puede denominarse también replicón de ARN de VHC. El replicón de ARN de la presente invención que comprende el ARN genómico del VHC de longitud completa se denomina "replicón de ARN del VHC de longitud completa" en el presente documento. El replicón de ARN del VHC de longitud completa de la presente invención tiene capacidad de producir partículas de virus.

El replicón de ARN del VHC de longitud completa en la presente invención, el virus de la hepatitis C es un virus de la hepatitis C de genotipo 2a. En la presente invención, “el virus de la hepatitis C de genotipo 2a” o el “genotipo 2a de VJC” significa un virus de la hepatitis identificado como el genotipo 2a de acuerdo con la clasificación internacional de Simmonds y col. (véase Simmonds, P. y col, Hepatology, (1994) 10, p. 1321-1324) En la presente invención, “genotipo 2a del virus de la hepatitis C” o “genotipo 2a de VHC” incluye no solo el virus que tiene el ARN genómico del VHC que se produce naturalmente sino también el virus que tiene un ARN genómico en el que la secuencia genómica del VHC que se produce naturalmente está modificada artificialmente. Un ejemplo particular del genotipo 2a de VHC incluye la cepa JFH-1 (véase la Publicación de Patente Japonesa (kokai) N° 2002-171978).

En la presente memoria, “el ARN genómico del virus de la hepatitis C” significa el ARN que comprende la secuencia de nucleótidos de la región completa del genoma de ARN de sentido directo (+) de cadena única del virus de la hepatitis C, el ARN genómico del virus de la hepatitis C de genotipo 2a es, pero sin limitarse a, preferiblemente al ARN que comprende la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEC DE ID N°: 12.

Un ejemplo de replicón de ARN del VHC de longitud completa es un replicón de ARN que comprende la secuencia de nucleótidos que comprende una región 5' no traducida, una secuencia de codificación de la proteína núcleo, una secuencia de codificación de la proteína E1, una secuencia de codificación de la proteína E2, una secuencia de codificación de la proteína NS2, una secuencia de codificación de la proteína NS3, una secuencia de codificación de la proteína NS4A, una secuencia de codificación de la proteína NS4B, una secuencia de codificación de la proteína NS5A, una secuencia de codificación de la proteína NS5B, y una región 3' no traducida, al menos un gen marcador seleccionable o gen indicador, y al menos una secuencia IRES.

Preferiblemente, el replicón de ARN del VHC de longitud completa de acuerdo con la presente invención comprende: la región 5' no traducida, al menos un gen marcador seleccionable o gen indicador, al menos una secuencia IRES, la secuencia de codificación de la proteína núcleo, la secuencia de codificación de la proteína E1, la secuencia de codificación de la proteína E2, la secuencia de codificación de la proteína NS2, la secuencia de codificación de la proteína NS3, la secuencia de codificación de la proteína NS4A, la secuencia de codificación de la proteína NS4B, la secuencia de codificación de la proteína NS5A, la secuencia de codificación de la proteína NS5B, y la región 3' no traducida, en este orden en la dirección 5' a 3'.

En la memoria de la presente solicitud, “región 5' no traducida” (5' NTR o 5' UTR), “secuencia de codificación de la proteína núcleo” (región núcleo o región C), “secuencia de codificación de la proteína E1” (región E1), “secuencia de codificación de la proteína E2” (región E2), “secuencia de codificación de la proteína NS2” (región NS2), “secuencia de codificación de la proteína NS3” (región NS3), “secuencia de codificación de la proteína NS4A” (región NS4A), “secuencia de codificación de la proteína NS4B” (región NS4B), “secuencia de codificación de la proteína NS5A” (región NS5A), “secuencia de codificación de la proteína NS5B” (región NS5B) y “región 3' no traducida” (3' NTR o 3' UTR), y otras regiones o emplazamientos específicos tal como se definen basándose en el ARN genómico de longitud completa (SEC DE ID N°: 12) comprenden la región completa del genoma de la cepa JFH-1 (Publicación de Patente Japonesa (kokai) N° 2002-17978), que es un virus VHC de genotipo 2a.

Una región o emplazamiento parcial en el genoma del virus de la hepatitis C (VHC) de acuerdo con la presente invención, se define basándose en las secuencias que se muestran en las SEC DE ID N°s: 1-11 que son secuencias parciales de nucleótidos del ARN genómico de la cepa JFH-1 (SEC DE ID N°: 12). La “región 5' no traducida” del ARN genómico de longitud completa de la cepa JFH-1 (derivada del clon JFH-1; SEC DE ID N°: 12) comprende la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEC DE ID N°: 1. La “secuencia de codificación de la proteína núcleo” comprende la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEC DE ID N°: 2. La “secuencia de codificación de la proteína E1” comprende la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEC DE ID N°: 3. La “secuencia de codificación de la proteína E2” comprende la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEC DE ID N°: 4. La “secuencia de codificación de la proteína NS2” comprende la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEC DE ID N°: 5. La “secuencia de codificación de la proteína NS3” comprende la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEC DE ID N°: 6. La “secuencia de codificación de la proteína NS4A” comprende la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEC DE ID N°: 7. La “secuencia de codificación de la proteína NS4B” comprende la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEC DE ID N°: 8. La “secuencia de codificación de la proteína NS5A” comprende la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEC DE ID N°: 9. La “secuencia de codificación de la proteína NS5B” comprende la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEC DE ID N°: 10. La “región 3' no traducida” comprende la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEC DE ID N°: 11.

Se puede definir por ejemplo, una región o emplazamiento de la secuencia de ARN derivada de VHC mediante los números de nucleótidos en el interior de las secuencias de nucleótidos de las SEC DE ID N°s 1-12 que se determinan mediante la alineación de la secuencia de ARN y de las secuencias de nucleótidos que se muestran en las SEC DE ID N°s 1-12. En la alineación, puede estar presente un hueco, adición, delección, sustitución y similar.

De acuerdo con la presente invención, la región 5' no traducida, la secuencia de codificación de la proteína núcleo, la secuencia de codificación de la proteína E1, la secuencia de codificación de la proteína E2, la secuencia de codificación de la proteína NS2, la secuencia de codificación de la proteína NS3, la secuencia de codificación de la proteína NS4A, la secuencia de codificación de la proteína NS4B, la secuencia de codificación de la proteína NS5A, la secuencia de codificación de la proteína NS5B, y la región 3' no traducida, que están contenidas en el replicón de

ES 2 346 326 T3

ARN del VHC de longitud completa, comprende preferiblemente las secuencias de nucleótidos que se muestran en las SEC DE ID N^{os} 1-11, respectivamente.

Un ejemplo de replicón de ARN del VHC de longitud completa es un replicón de ARN que comprende las secuencias de nucleótidos que se muestran en las SEC DE ID N^{os} 1-11, al menos un gen marcador y/o gen indicador, y al menos una secuencia IRES.

“Gen marcador seleccionable” en la presente invención significa un gen que confiere capacidad de selección a una célula de tal manera que se puede seleccionar únicamente la célula que expresa el gen. Los ejemplos de gen marcador seleccionable preferidos en la presente invención incluyen un gen de resistencia a la neomicina, un gen de la timidina quinasa, un gen de resistencia a la kanamicina, un gen de resistencia a la piritiamina, un gen de la adenilil transferasa, un gen de resistencia a la Zeocina y un gen de resistencia a la puomicina. Se prefieren el gen de resistencia a la neomicina y el gen de la timidina quinasa, y se prefiere más el gen de resistencia a la neomicina. Sin embargo, el gen marcador seleccionable en la presente invención no se limita a estos genes.

Además, en la presente invención, “gen indicador” significa un gen marcador que codifica un producto génico que puede actuar como un indicador de la expresión del gen. Los ejemplos generales de gen indicador incluyen genes estructurales de enzimas que catalizan la reacción de emisión de luz o la reacción de color. Los ejemplos preferidos del gen indicador en la presente invención incluyen el gen de la cloranfenicol acetiltransferasa derivado del transposón Tn9, el gen de la β -glucuronidasa o el gen de la β -galactosidasa derivado de *Escherichia coli*, el gen de la luciferasa, un gen de la proteína fluorescente verde, el gen de la aequorina de medusa, y el gen de la fosfatasa alcalina placentar segregada (SEAP). Sin embargo, el gen indicador en la presente invención no se limita a estos genes.

Tanto uno únicamente como ambos del anterior gen seleccionable y gen indicador puede estar contenido en un replicón de ARN de longitud completa. Pueden estar presentes uno o más de los genes marcadores seleccionables o genes indicadores en un replicón de ARN del VHC de longitud completa.

En la presente invención, “secuencia IRES” significa un emplazamiento interno de entrada al ribosoma que permite que se inicie la traducción mediante la unión de los ribosomas dentro del interior del ARN. Los ejemplos preferidos de secuencia IRES en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, IRES de EMCV (el emplazamiento interno de entrada al ribosoma del virus de la encefalomiocarditis), el IRES de FMDV y el IRES DE VHC. Se prefieren más el IRES de EMCV y el IRES de VHC, y la secuencia más preferida es el IRES de EMCV.

Una forma de realización aún más preferida de un replicón de ARN del VHC de longitud completa de acuerdo con la presente invención es un ARN que comprende la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEC DE ID N^o: 13. Además, un replicón de ARN que comprende una secuencia de nucleótidos derivada de la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEC DE ID N^o: 13 mediante delección, sustitución o adición de 1-10, preferiblemente 1-30, más preferiblemente 1-10, aún más preferiblemente 1-6, y los más preferible uno a algunos (2-5) nucleótidos en la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEC DE ID N^o: 13 y que tiene capacidad de replicación autónoma y capacidad de producción de partículas de virus, es una forma de realización del replicón de ARN del VHC de longitud completa y está incluida también en el alcance de la presente invención.

El replicón de ARN del VHC de longitud completa de la presente invención puede contener también un ARN que codifica un gen extraño opcional que se va a expresar en el interior de una célula en la que se introduce el replicón de ARN de longitud completa. El ARN que codifica el gen extraño, puede estar también unido en la dirección 3' de la región 5' no traducida o unido en la dirección 5' o en la dirección 3' de un gen marcador o un gen indicador seleccionable, o unido en la dirección 5' de la región 3' no traducida. Se puede insertar el ARN que codifica el gen extraño en cualquier emplazamiento entre la secuencia de codificación de la proteína núcleo, la secuencia de codificación de la proteína E1, la secuencia de codificación de la proteína E2, la secuencia de codificación de la proteína NS2, la secuencia de codificación de la proteína NS3, la secuencia de codificación de la proteína NS4A, la secuencia de codificación de la proteína NS4B, la secuencia de codificación de la proteína NS5A y la secuencia de codificación de la proteína NS5B.

El replicón de ARN del VHC de longitud completa que contiene el ARN que codifica el gen extraño puede expresar un producto génico codificado por el gen extraño cuando se traduce en el interior de una célula en la que se introduce el ARN. De esta manera, el replicón de ARN del VHC de longitud completa que contiene el ARN que codifica el gen extraño se puede usar también apropiadamente para producir un producto génico del gen extraño en el interior de una célula.

El replicón de ARN del VHC de longitud completa de acuerdo con la presente invención puede contener adicionalmente una ribozima. Una ribozima se une en la dirección 3' de un gen marcador y/o un gen marcador seleccionables de tal manera que el gen marcador y/o el gen marcador seleccionables se pueden cortar mediante la actividad de auto-escisión de una ribozima a partir de la secuencia IRES, la secuencia de codificación de la proteína núcleo, la secuencia de codificación de la proteína E1, la secuencia de codificación de la proteína E2, la secuencia de codificación de la proteína NS2, la secuencia de codificación de la proteína NS3, la secuencia de codificación de la proteína NS4A, la secuencia de codificación de la proteína NS4B, la secuencia de codificación de la proteína NS5A y la secuencia de codificación de la proteína NS5B, y la región 3' no traducida.

En el replicón de ARN del VHC de longitud completa de acuerdo con la presente invención, el gen marcador y/o el gen indicador seleccionables anteriormente descritos, las proteínas víricas que codifican las secuencias, y el gen extraño, la ribozima o similar, se unen de tal manera que se traducen a partir del ARN del replicón de VHC de longitud completa en el marco de lectura correcto. Entre estas secuencias, las proteínas codificadas por el replicón de ARN de longitud completa se conectan preferiblemente a cada uno de los otros emplazamientos de escisión mediante la proteasa y similares, de tal manera que, las proteínas se traducen o expresan como una poliproteína, seguido por la escisión mediante la proteasa en cada proteína.

La presente invención es también útil para proporcionar un vector de ADN, preferiblemente un vector de expresión, que codifica el replicón de ARN de la presente invención.

En la presente invención “capacidad de replicación autónoma” del ARN significa que el ARN es capaz de crecer autónomamente cuando se introduce en la célula. Se puede confirmar la capacidad de replicación autónoma del ARN mediante el siguiente procedimiento aunque no está limitada. Se transfectan células Huh7 con el ARN de interés y se cultivan. Se extrae el ARN a partir de las células cultivadas resultantes y se somete a hibridación de transferencia Northern usando una sonda capaz de detectar específicamente el ARN introducido. La detección del ARN de interés confirma la replicación autónoma. Se ilustran ejemplos del procedimiento particular para confirmar la capacidad de replicación autónoma en las descripciones acerca del ensayo de capacidad de formación de colonias, confirmación de la expresión de la proteína del VHC, detección del replicón de ARN y similares en los Ejemplos de la presente memoria.

Además, en la presente invención, “capacidad de producción de partículas de virus” del ARN significa que se generan partículas de virus en una célula cuando se introduce el ARN en la célula (por ejemplo, células cultivadas tales como células Huh7). Se puede confirmar la capacidad de producción de las partículas de virus, por ejemplo, aplicando la detección mediante el procedimiento de la PCR-RT usando cebadores específicos para el ARN en el sobrenadante del cultivo de las células en las que se ha introducido el ARN. Se puede confirmar esto también sometiendo el sobrenadante del cultivo al procedimiento del gradiente de densidad de la sacarosa para separar las partículas de virus y detectar la proteína del VHC. Se ilustran ejemplos del procedimiento particular en las descripciones acerca del ensayo de la capacidad de formación de colonias, confirmación de la expresión de la proteína del VHC, detección del replicón de ARN y similares en los Ejemplos de la presente memoria.

2. Preparación del replicón de ARN del VHC de longitud completa

Las personas expertas en la técnica pueden preparar el replicón de ARN del VHC de longitud completa de acuerdo con la presente invención usando técnicas de ingeniería genética. El replicón de ARN del VHC de longitud completa se prepara usando la cepa JFH-1 como virus de la hepatitis C de genotipo 2a mediante el siguiente procedimiento.

En primer lugar, se reconstruyó de manera rutinaria el ADN que correspondía a la región completa del ARN genómico de la cepa JFH-1 (SEC DE ID N°: 12, se registró esta secuencia en un banco de datos internacional de ADN con el n° de acceso AB047639) y se insertó en la dirección 3' de un promotor de ARN con el fin de preparar un clon de ADN. Tal como se usa en el presente documento, “ADN que corresponde a ARN” significa un ADN que tiene una secuencia de nucleótidos derivada de la secuencia de nucleótidos del ARN sustituyendo U (uracilo) con T (timina). El promotor de ARN anterior está contenido preferiblemente en un clon de plásmido. Un ejemplo del promotor de ARN preferido no se limita, pero incluye el promotor de ARN T7, el promotor de ARN SP6 y el promotor de ARN SP3, y se prefiere particularmente el promotor de ARN T7.

A continuación, el gen marcador y/o el gen indicador seleccionables, y el ADN que codifica la secuencia IRES se insertan en el clon de ADN descrito anteriormente. El gen marcador y/o el gen indicador seleccionables en la dirección 3' de la región no traducida 5' y la secuencia IRES adicionalmente en la dirección 3'.

Posteriormente, usando el clon de ADN preparado tal como anteriormente como plantilla, se sintetizó el ARN usando ARN polimerasa. Se puede iniciar la síntesis del ARN mediante un procedimiento normalizado a partir de la región 5' no traducida. Cuando el clon de ADN es un clon de plásmido, se puede sintetizar el ARN usando el fragmento de ADN escindido del clon de plásmido con un enzima de restricción, tal como una plantilla. Adicionalmente, es preferible que el término 3' del ARN que se va a sintetizar tenga la misma secuencia que el término de la región 3' no traducida del ARN genómico vírico, y no se añadan o eliminen otras secuencias. El ARN sintetizado de esta manera es el replicón de ARN del VHC de longitud completa de acuerdo con la presente invención.

3. Preparación de partículas de VHC

Se puede obtener una célula recombinante que puede replicar el replicón de ARN del VHC de longitud, preferiblemente replicar continuamente (es decir, que tiene una capacidad de replicación del replicón de ARN), introduciendo el replicón de ARN del VHC de longitud completa descrito anteriormente preparado tal como se ha descrito anteriormente en una célula. En esta memoria, una célula recombinante que replica el replicón de ARN del VHC de longitud completa se denomina como “célula que replica el replicón de ARN del VHC de longitud completa”.

La célula que replica el replicón de ARN del VHC de longitud completa puede producir partículas de virus. Las partículas de virus producidas contienen el replicón de ARN del VHC de longitud completa en un armazón compuesto por las proteínas del virus VHC. De esta manera, las partículas de virus producidas por la célula que replica el replicón de ARN del VHC de longitud completa de la presente invención son partículas de VHC. Esto es, en la presente invención, se pueden preparar partículas de VHC en un sistema de cultivo celular cultivando las células que replican el replicón de ARN del VHC de longitud completa. Preferiblemente, se pueden obtener las partículas de VHC cultivando las células que replican el replicón de ARN del VHC de longitud completa y recogiendo las partículas de virus generadas en el cultivo (preferiblemente el sobrenadante del cultivo).

Como alternativa comparativa, se pueden producir partículas de VHC por una célula recombinante que se obtiene introduciendo el ARN genómico del VHC de longitud completa en una célula. El ARN genómico del VHC de longitud completa se replica con eficacia elevada en la célula, en la que se introduce el ARN genómico del VHC de longitud completa de la presente invención (el ARN genómico del VHC de longitud completa derivado del clon JFH-1). En esta memoria, una célula que replica el ARN genómico del VHC de longitud completa se denomina "célula que replica el ARN genómico del VHC de longitud completa". Las células que replican el ARN genómico del VHC de longitud completa pueden producir partículas de virus. Las partículas de virus producidas por las células que replican el ARN genómico del VHC de longitud completa contienen el ARN genómico del VHC de longitud completa en un armazón compuesto por las proteínas del virus VHC. De esta manera, las partículas de virus producidas por la célula en la que se introduce el ARN genómico del VHC de longitud completa de la presente invención son partículas de VHC. No está limitado pero se prefiere que se puedan preparar partículas de VHC en un sistema de cultivo celular cultivando la célula en la que se introduce el ARN genómico del VHC de longitud completa derivado del clon JFH-1. Por ejemplo, se pueden obtener partículas de VHC cultivando las células en las que se introduce el ARN genómico del VHC de longitud completa y recogiendo las partículas de virus generadas en el cultivo (preferiblemente el sobrenadante del cultivo).

Para una célula en la que se ha introducido el replicón de ARN del VHC de longitud completa o el ARN genómico del VHC de longitud completa, descrito anteriormente, se puede usar cualquier célula, siempre que se pueda subcultivar. Dicha célula es preferiblemente una célula eucariota, más preferiblemente una célula humana, y aún más preferiblemente una célula derivada de hígado, una célula derivada de cuello uterino humano o una célula derivada de riñón fetal humano. Se pueden usar preferiblemente células proliferativas que incluyen líneas de célula cancerosas, líneas de citoblastos y células similares, y se usan más preferiblemente células Huh7, células HepG2, células HeLa y células 293 y similares. Para estas células, se pueden usar células comercialmente disponibles, se pueden obtener estas células de depositarios de células, o se pueden usar también líneas celulares establecidas de cualquier célula (por ejemplo, células cancerosas o citoblastos).

Se puede conseguir la introducción del replicón de ARN del VHC de longitud completa o el ARN genómico de longitud completa en la células usando cualquier técnica conocida por las personas expertas en la técnica. Los ejemplos de dicho procedimiento de introducción incluyen electroporación, procedimiento del cañón de partículas, procedimiento de lipofección, procedimiento del fosfato de calcio, procedimiento de microinyección, procedimiento de DEAE Sefarosa y similares. Se prefiere particularmente el procedimiento que usa la electroporación.

Se puede introducir el replicón de ARN del VHC de longitud completa o el ARN genómico del VHC de longitud completa solo, o se puede introducir tras mezclarse con otros ácidos nucleicos. Para variar la cantidad del replicón de ARN del VHC de longitud completa o el ARN genómico del VHC de longitud completa, manteniendo a la vez la cantidad de ARN que se va a introducir, se mezcla con el ARN celular total extraído de las células, en las cuales se introduce el ARN, para llevar la cantidad total de ARN hasta un determinado nivel, y a continuación se usa la mezcla para la introducción en las células. Se puede determinar la cantidad de replicón de ARN que se va a usar para introducir en las células de acuerdo con el procedimiento de introducción empleado, y está preferiblemente entre 1 picogramo y 100 microgramos, y más preferiblemente entre 10 picogramos y 10 microgramos.

Se pueden seleccionar las células que replican el replicón de ARN del VHC de longitud completa utilizando la expresión del gen marcador o del gen indicador seleccionables en el interior del replicón de ARN del VHC de longitud completa. Específicamente, se pueden cultivar, por ejemplo, dichas células sometidas al tratamiento de introducción celular del replicón de ARN del VHC de longitud completa en un medio, en el que se pueden seleccionar las células debido a la expresión del gen marcador seleccionable. Alternativamente, tras cultivar las células sometidas al tratamiento de introducción celular del replicón de ARN del VHC de longitud completa, se puede detectar la expresión del gen indicador (por ejemplo, la proteína fluorescente).

Como ejemplo, cuando el replicón de ARN del VHC de longitud completa contiene un gen de resistencia a la neomicina como gen marcador seleccionable, las células sometidas al procedimiento de electroporación con el replicón de ARN del VHC de longitud completa, se siembran en una placa de cultivo. Tras cultivar 12 a 72 horas, preferiblemente 16 a 48 horas, se añade G418 (neomicina) a la placa de cultivo a una concentración de 0,05 miligramos/mililitro a 3,0 miligramos/mililitro. Se cultivan las células en continuo durante preferiblemente 10 días a 40 días y más preferiblemente 14 días a 28 días tras la siembra, cambiando a la vez el medio de cultivo dos veces a la semana, y se pueden seleccionar las células que están replicando el replicón de ARN del VHC de longitud completa como una colonia tiñendo las células viables con cristal violeta.

Se pueden clonar las células a partir de la colonia formada mediante un procedimiento normalizado. El clon celular obtenido de esta manera que replica el replicón de ARN del VHC de longitud completa se denomina en esta memoria como “clon celular que replica el replicón de ARN del VHC de longitud completa”. La célula que replica el replicón de ARN del VHC de longitud completa de la presente invención incluye el clon celular que replica el replicón de ARN del VHC de longitud completa.

Para la célula que replica el replicón de ARN del VHC de longitud completa, se puede confirmar la replicación real del replicón de ARN del VHC de longitud completa en la célula o el clon celular detectando el replicón de ARN del VHC de longitud completa, confirmando que el gen marcador o indicador seleccionable del replicón de ARN del VHC de longitud completa no se integra en el ADN genómico del huésped y detectando además las proteínas del VHC.

Las personas expertas en la técnica pueden detectar el replicón de ARN del VHC de longitud completa que se ha replicado de acuerdo con cualquier procedimiento conocido de detección del ARN. Por ejemplo, se puede detectar el replicón de ARN del VHC de longitud completa en el ARN total extraído de la célula mediante el procedimiento de hibridación Northern usando como sonda un fragmento de ADN específico del replicón de ARN del VHC de longitud completa.

Además, se puede confirmar la ausencia de un gen marcador o gen indicador seleccionable integrado en el replicón de ARN del VHC de longitud completa en el ADN genómico del huésped mediante, pero sin limitarse a, por ejemplo, llevando a cabo la PCR del ADN genómico extraído de la célula para amplificar al menos una parte del gen marcador o el gen indicador seleccionable, y a continuación confirmando la ausencia del producto amplificado. Debido a que se considera que en la célula, para la cual se confirma el producto amplificado, se puede haber integrado el gen marcador o el gen indicador seleccionable en el genoma del huésped, es posible que el replicón de ARN del VHC de longitud completa no se replique por sí mismo. En este caso, se puede confirmar adicionalmente la replicación del ARN del VHC de longitud completa detectando las proteínas del VHC tal como se describe a continuación.

Se puede detectar una proteína del VHC, por ejemplo, haciendo reaccionar un anticuerpo frente a la proteína del VHC que se va a expresar a partir del replicón de ARN del VHC de longitud completa con las proteínas celulares extraídas. Las personas expertas en la técnica pueden llevar a cabo este procedimiento mediante cualquier procedimiento de detección conocido. Específicamente, se puede detectar la proteína del VHC mediante, por ejemplo, transferencia de una muestra de proteína extraída de la célula sobre una membrana de nitrocelulosa, haciendo reaccionar el anticuerpo dirigido contra la proteína del VHC (por ejemplo, un anticuerpo o antisero específico contra NS3 recogido de un paciente con hepatitis C) con la membrana de nitrocelulosa y detectando el anticuerpo contra la proteína del VHC. Si se detecta la proteína del VHC entre las proteínas celulares extraídas, se puede concluir que esta célula replica el replicón de ARN del VHC de longitud completa y expresa la proteína del VHC.

Las personas expertas en la técnica pueden confirmar la capacidad de producción de partículas de virus de las células que replican el replicón de ARN del VHC de longitud completa o de las células que replican el ARN genómico del VHC de longitud completa mediante cualquier procedimiento conocido de detección. Por ejemplo, el sobrenadante del cultivo de células que se sospecha que producen las partículas de virus se fracciona mediante el gradiente de densidad de la sacarosa, y se determinan la densidad de la fracción, la concentración de la proteína núcleo del VHC, y la cantidad del replicón de ARN del VHC de longitud completa para cada fracción. Como resultado, si el pico de la proteína núcleo coincide con el del replicón de ARN del VHC de longitud completa, y la densidad de la fracción que muestra los picos detectados (por ejemplo, 1,18-1,20 mg) es más pequeña que la densidad de la fracción equivalente que la obtenida mediante el fraccionamiento del sobrenadante del cultivo tratado con NP40 al 25% (polioxietileno (9) octilfenil éter) se puede considerar que las células tienen una capacidad de producción de partículas de virus.

Se pueden detectar las partículas de virus VHC liberadas en el sobrenadante del cultivo, usando, por ejemplo, frente a la proteína núcleo, la proteína E1 o la proteína E2. También, se puede detectar la presencia de partículas de virus indirectamente, amplificando y detectando el replicón de ARN del VHC de longitud completa en el sobrenadante del cultivo mediante el procedimiento de la PCR-RT usando cebadores específicos.

4. Infección de otra célula con las partículas del VHC de la presente invención

Las partículas del virus del VHC de la presente invención tienen capacidad para infectar una célula (preferiblemente una célula permisiva a VHC). La presente invención es también útil para proporcionar un procedimiento para producir una célula infectada por el virus de la hepatitis C que comprende cultivar la célula que replica el replicón de ARN del VHC de longitud completa o la célula que replica el ARN genómico del VHC de longitud completa, e infectar otra célula (preferiblemente una célula permisiva a VHC) con partículas de virus en el cultivo obtenido de esta manera (preferiblemente, el sobrenadante del cultivo) En la presente invención, célula permisiva a VHC significa una célula que es susceptible a VHC, y es preferiblemente, pero sin limitarse a, célula hepática o una célula de linaje linfóide. En particular, la célula hepática incluye un hepatocito primario, célula Huh7, célula HepG2, célula IMY-N9, célula HeLa, célula 203 y similares. La célula de linaje linfóide incluye, pero sin limitarse a, célula Molt4, célula HPB-Ma, célula Daudi y similar.

Cuando una célula (por ejemplo, una célula permisiva a VHC) se infecta con partículas de VHC producidas por la célula que replica el replicón de ARN del VHC de longitud completa de la presente invención, el replicón de ARN del VHC de longitud completa se replica y se forman también partículas de virus en la célula infectada. Debido a que

la célula infectada con partículas de virus generadas en la célula que replica el replicón de ARN del VHC de longitud completa expresa el gen marcador y/o el gen indicador seleccionables, se puede seleccionar y/o detectarse la célula infectada utilizando la expresión. Infectando una célula con partículas de virus generadas en la célula que replica el replicón de ARN del VHC de longitud completa de la presente invención, se replica el replicón de ARN del VHC de longitud completa y además se pueden producir partículas de virus.

Más adicionalmente al infectar una célula (por ejemplo una célula permisiva a VHC9 con partículas de VHC generadas en la célula que replica el replicón de ARN del VHC de longitud completa de la presente invención, se replica el ARN genómico del VHC de longitud completa y se forman también partículas de virus en la célula infectada. Al infectar una célula con las partículas de virus generadas en la célula que replica el replicón de ARN del VHC de longitud completa de la presente invención, se replica el ARN genómico del VHC de longitud completa en la célula y además, se pueden producir partículas de virus.

Las partículas de virus VHC generadas en la célula que replica el replicón de ARN del VHC de longitud completa o en la célula que replica el ARN genómico del VHC de longitud completa pueden infectar animales permisivos a VHC y similares e inducir hepatitis producida por el VHC anterior.

5. Otras formas de realización de la presente invención

El replicón de ARN del VHC de longitud completa se replica con una eficacia elevada en la célula que replica el replicón de ARN del VHC de la presente invención. También se replica el ARN genómico del VHC de longitud completa con una eficacia elevada en la célula que replica el replicón de ARN del VHC de longitud completa de la presente invención. De esta manera, se puede producir el replicón de ARN del VHC de longitud completa o el ARN genómico del VHC de longitud completa con una eficacia elevada usando la célula que replica el replicón de ARN del VHC de longitud completa de la presente invención o la célula que replica el ARN genómico del VHC de longitud completa.

En la presente invención, se puede producir el replicón de ARN del VHC de longitud completa cultivando la célula que replica el replicón de ARN del VHC de longitud completa, extrayendo ARN del cultivo (células cultivadas y/o medio de cultivo), sometiendo al ARN al procedimiento de electroforesis, y aislando y purificando el replicón de ARN del VHC de longitud completa. Se puede producir también el ARN genómico del VHC de longitud completa usando la célula que replica el ARN genómico del VHC de longitud completa mediante procedimiento similar. El ARN producido de dicha manera comprende la secuencia genómica de longitud completa del virus de la hepatitis C. En este caso la secuencia genómica de longitud completa del virus de la hepatitis C está interrumpida por el gen marcador y/o el gen indicador seleccionables y la secuencia IRES. Mediante el procedimiento que se proporciona para producir el ARN que comprende la secuencia genómica de longitud completa del virus de la hepatitis C, se vuelve posible un análisis más detallado del genoma del virus de la hepatitis C.

Además, se puede usar adecuadamente la célula que replica el replicón de ARN del VHC de longitud completa o la célula o la célula que replica el ARN genómico e longitud completa para producir proteína de VHC. Las personas expertas en la técnica pueden producir proteína de VHC mediante cualquier procedimiento conocido. Por ejemplo, se puede producir proteína de VHC introduciendo el replicón de ARN del VHC de longitud completa o el ARN genómico del VHC de longitud completa en una célula, cultivando la célula recombinante y recogiendo las proteínas del cultivo obtenido de esta manera (células cultivadas y/o medio de cultivo) mediante procedimiento conocido.

Además, las partículas del virus VHC de la presente invención pueden poseer hepatotropismo. De esta manera, se puede producir un vector de virus hepatotrópico usando el replicón de ARN del VHC de longitud completa de la presente invención. Este vector de virus se usa adecuadamente para la terapia génica. En la presente invención, se puede introducir un gen extraño en una célula, replicarse en la célula y expresarse, integrando un ARN que codifica el gen extraño en el replicón de ARN del VHC de longitud completa o el ARN genómico del VHC de longitud completa e introduciendo el ARN integrado en la célula. Además, al preparar un ARN en el que se sustituyen la secuencia de codificación de la proteína E1 y/o la secuencia de codificación de la proteína E2 del replicón de ARN del VHC de longitud completa o el ARN genómico del VHC de longitud completa con una secuencia de codificación del armazón de la proteína externa del virus derivado de otras especies biológicas, se vuelve posible infectar el ARN de diversas especie biológicas. En este caso también, se integra un gen extraño en el replicón de ARN del VHC de longitud completa o el ARN genómico del VHC de longitud completa y se puede usar éste como un vector de virus hepatotrópico para expresar el gen extraño en hepatocitos.

La presente invención es también útil para proporcionar un procedimiento para producir un vector de virus que transporta un gen extraño, comprendiendo insertar un ARN que codifica el gen extraño en el ARN que comprende la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEC DE ID N°: 12, introduciendo éste en una célula y cultivando la célula para producir partículas de virus.

La presente invención proporciona una vacuna de la hepatitis C que comprende partículas del VHC de la presente invención o una parte de las mismas y un procedimiento para producir la vacuna de la hepatitis C que comprende partículas de VHC de la presente invención o una parte de las mismas.

En particular, se pueden usar partículas de VHC preparadas como anteriormente directamente como una vacuna o se pueden usar después de atenuar o inactivar mediante el procedimiento conocido en la técnica. Por ejemplo, se puede obtener una disolución madre de vacuna de VHC purificando las partículas de VHC usando cromatografía en columna, filtración, centrifugación y similares. Se puede preparar una vacuna de VHC viva atenuada o una vacuna de VHC inactivada a partir de esta disolución madre de vacuna de VHC. Se puede llevar a cabo la inactivación del virus haciendo reaccionar un agente de inactivación tal como formalina, β -propiolactona, glutardialdehído, y similar con el virus, añadiendo y mezclando a, por ejemplo, la suspensión de virus (Appaiahgari y col., Vaccine, (2004) 22(27-28), p. 3669-3675).

Para la producción de la vacuna de la presente invención, es posible usar el replicón de ARN del VHC en el que está atenuada o perdida la patogenicidad mediante una mutación introducida usando la técnica públicamente conocida.

Se prepara la vacuna de la presente invención para la administración como una disolución o suspensión. Es también posible que se prepare en forma de material sólido adecuado para disolver o suspender en líquido. Se puede emulsionar la preparación o encapsularla en el liposoma. El componente inmunógeno activo tal como las partículas de VHC se mezcla a menudo con un excipiente que es farmacéuticamente aceptable y apropiado para el ingrediente activo. Un excipiente adecuado incluye, por ejemplo, agua, solución salina fisiológica, dextrosa, glicerol, etanol y sus mezclas. Además, si se desea, la vacuna puede contener una pequeña cantidad de agente auxiliar (por ejemplo, humidificador o emulsificador), tampón del pH y/o adyuvante para potenciar la eficacia de la vacuna los ejemplos de adyuvantes eficaces incluyen, pero no se limitan a las siguientes sustancias: hidróxido de aluminio, N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-nor-muramil-L-alanil-D-isoglutamina (CGP11637, nor-MDP), N-acetil muramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alnina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina (CGP19835A, denominado como MTP-PE) y RIBI. RIBI contiene tres componentes extraídos de bacterias, esto es, monofosforil lípido A, dimicolato de trehalosa y esqueleto de la pared celular (HPL + TDN + CWS) en emulsión de escualeno/Tween® 80 al 2%. Se puede determinar la eficacia de un adyuvante midiendo la cantidad de anticuerpo contra las partículas d VHC inmunógenas que se producen administrando la vacuna compuesta por partículas de VHC.

La presente vacuna se administra normalmente por vía parenteral, por ejemplo, mediante inyección tal como inyección subcutánea o intramuscular. Otras formas de dosificación adecuadas para las diferentes rutas de administración incluyen supositorios y, en algún caso, la formulación oral.

Si se desea, se pueden añadir uno o más de los anteriores compuestos que tienen actividad adyuvante a la vacuna de VHC. Los adyuvantes son factores de estimulación no específicos para este sistema inmune y potencian la respuesta inmune a la vacuna de VHC en el huésped. Los ejemplos particulares de adyuvantes conocidos en esta técnica incluyen el adyuvante de Freund completo, el adyuvante de Freund incompleto, vitamina E, polímero en bloque no iónico, muramildipéptido, saponina, aceite mineral, aceite vegetal y carbopol. Los adyuvantes especialmente adecuados para la aplicación a la membrana mucosal incluyen, por ejemplo, toxina lábil al calor de *E. coli* (LT) y toxina del cólera (CT). Otros adyuvantes adecuados incluyen, por ejemplo, hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio u óxido de aluminio, emulsión de aceite (por ejemplo, Bayol (Marca Comercial Registrada) o Marcol 52 (Marca Comercial Registrada)), saponina o vitamina E solubilizada. En la forma de realización preferida, la vacuna de la presente invención contiene un adyuvante.

Con respecto a los ejemplos, para las inyecciones que se van a administrar subcutánea, intradérmica, intramuscular e intravenosamente, los ejemplos particulares de vehículos y diluyentes farmacéuticamente aceptables, que se pueden incluir en la vacuna de VHC de la presente invención incluyen estabilizantes, carbohidratos (por ejemplo, sorbitol, manitol, almidón, sacarosa, glucosa, dextrano), proteínas tales como albúmina o caseína, materiales que contienen proteínas tales como albúmina de suero bovino o leche desnatada, y tampones (por ejemplo, tampón fosfato).

Los ligantes u vehículos convencionales usados para un supositorio incluyen, por ejemplo, polialquilenglicol o triglicéridos. Se puede formular el supositorio a partir de una mezcla que contiene el ingrediente activo en el intervalo de 0,5% a 50%, preferiblemente 1% a 20%. Una formulación oral puede contener normalmente los excipientes usados. Dichos excipientes incluyen, por ejemplo, manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio y similares de calidad farmacéutica.

Se puede producir la vacuna de la presente invención en formas de dosificación de disoluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, formulaciones o polvos de liberación mantenida y que contienen el ingrediente activo (partículas de virus o un parte de las mismas) a un 10-95%, preferiblemente 25-70%.

La vacuna de la presente invención se administra mediante el procedimiento adecuado para las formas de dosificación y en la cantidad efectiva para la prevención y/o el tratamiento. La cantidad de dosificación está en el intervalo entre 0,01 μ g a 100.000 μ g y este es dependiente del paciente que se va a tratar, la capacidad de formación de anticuerpos en el sistema inmune del paciente, y el nivel deseado de protección. Es también dependiente de la ruta de administración tal como subcutánea, intradérmica, intramuscular, intravenosa y similar.

Se puede administrar esta vacuna mediante un programa de administración único o preferiblemente mediante un programa de administración complejo. En el programa de administración complejo, se llevan a cabo 1-10 administraciones individuales al comienzo de la administración, seguido por la administración a los intervalos requeridos

para mantener y/o potenciar la respuesta inmune. Por ejemplo, se puede proporcionar otro tipo de administración como segunda administración 1.4 meses más. Si es necesario, se puede continuar la administración algunos meses más. El régimen de administración se determina, al menos parcialmente, de acuerdo con las necesidades del paciente individual y es dependiente del juicio del profesional médico.

Además, se puede administrar simultáneamente la vacuna que contiene las partículas de VHC inmunógenas con otro agente del control inmune (por ejemplo, inmunoglobulina).

Se puede usar la vacuna de partículas de VHC preventivamente frente a una posible nueva infección de VHC administrándola a individuos sanos par inducir la respuesta inmune al VHC. Se puede usar también la vacuna de partículas de VHC como vacuna terapéutica para eliminar el VHC administrándola a pacientes infectados con VHC e induciendo una fuerte respuesta inmune al VHC en el cuerpo.

Se puede usar la célula que replica el replicón de ARN del VHC de longitud completa o la célula que replica el ARN genómico del VHC de longitud completa o la célula infectada con el virus de la hepatitis C, que se infecta con partículas de virus generadas en estas células, como un sistema de ensayo para cribar una sustancia (sustancia contra el virus de la hepatitis C) que promueve o inhibe, por ejemplo, la replicación del virus de la hepatitis C, la reconstrucción de las partícula del virus y la liberación de las partículas del virus. En particular, por ejemplo, se puede cribar la sustancia que promueve o inhibe el crecimiento del virus de la hepatitis C determinando si la sustancia de ensayo promueve o inhibe la replicación del replicón de ARN del VHC de longitud completa o el ARN genómico del VHC de longitud completa, o la formación o la liberación de las partículas de virus, cultivando estas células en presencia del replicón de ARN del VHC de longitud completa o el ARN genómico del VHC de longitud completa en la preparación de ARN extraído de las células descritas anteriormente. Se puede llevar a cabo la detección de las partículas de virus en el cultivo/principalmente del sobrenadante del cultivo) midiendo la cantidad, la relación o la presencia de la proteína de VHC en el sobrenadante del cultivo.

Además, se puede investigar si la inmunoglobulina purificada a partir del suero de un paciente infectado con VHC puede evitar la infección con partículas de VHC de la presente invención, detectando las partículas de virus en este cultivo. En este ensayo, se pueden usar sueros de ratones, ratas, conejos y similares, que se han inmunizado con las partículas del virus VHC de la presente invención. Se puede utilizar la inmunización por una parte de la proteína de VHC, el gen del VHC y similar. Se puede llevar a cabo este ensayo con otras sustancias preventivas de la infección de una manera similar.

Los anticuerpos que se generan contra las partículas del virus VHC de la presente invención incluyen anticuerpos policlonales y anticuerpos monoclonales. Cuando se prefiere el anticuerpo policlonal, se inmunizan mamíferos seleccionados (por ejemplo, ratón, conejo, cabra, oveja, caballo y similares) con las partículas del VHC de la presente invención como primera etapa. Se recogen los sueros de los animales inmunizados y se procesan mediante procedimiento conocido. Si los sueros que contienen los anticuerpos policlonales con los epítomos de VHC contienen anticuerpos de otros antígenos, se pueden purificar estos sueros mediante cromatografía de inmunoafinidad. Se conocen en la técnica lo procedimientos para generar antisueros policlonales y los procedimientos para el tratamiento de éstos. Se pueden aislar anticuerpos policlonales de mamíferos ya infectados con VHC.

Las personas expertas en la técnica pueden producir fácilmente anticuerpos monoclonales de epítomos de VHC. Se conoce el procedimiento común para producir el hibridoma que genera anticuerpos monoclonales. Por ejemplo, se pueden usar los procedimientos descritos en *Current Protocols in Immunology* (John Wiley & Sons, Inc.).

Se pueden producir líneas celulares que generen anticuerpos monoclonales mediante fusión celular, o mediante otro procedimiento tal como transformación directa de linfocitos B con ADN génico tumoral o transducción con el virus de Epstein-Barr. Los anticuerpos monoclonales y anticuerpos policlonales obtenidos mediante estos procedimientos son útiles para el diagnóstico, tratamiento y prevención del VHC.

Los anticuerpos producidos usando las partículas del VHC de la presente invención se administran con un solubilizante, aditivo, estabilizante, tampón y similar farmacéuticamente aceptable. Se puede escoger cualquier ruta de administración, pero se prefieren las administraciones subcutánea, intradérmica e intramuscular y se prefiere más la administración intravenosa.

Se pueden usar las partículas de VHC, generadas en la célula que replica el replicón de ARN del VHC de longitud completa de la presente invención o la célula que replica el ARN genómico del VHC de longitud completa y la célula permisiva al VHC como un sistema de ensayo para cribar una sustancia que pueda estimular o inhibir la unión del VHC a las células. En particular, se pueden cribar, por ejemplo, sustancias que pueden promover o inhibir el crecimiento del virus de la hepatitis C cultivando la partículas del VHC generadas en la células que replica el replicón de ARN del VHC de longitud completa de la presente invención junto con la célula permisiva a VHC en presencia de una sustancia de ensayo, detectando el replicón de ARN del VHC de longitud completa o las partículas del virus en el cultivo del virus y determinando si esta sustancia promueve o inhibe la replicación del replicón de ARN o la formación de las partículas de virus.

Se pueden llevar a cabo dichas detecciones del replicón de ARN del VHC de longitud completa o del ARN genómico del VHC de longitud completa o de las partículas de virus de acuerdo con la técnica descrita anteriormente.

o los siguientes Ejemplos. Se puede usar el sistema de ensayo descrito anteriormente para la producción y evaluación de los agentes preventivos, terapéuticos o diagnósticos de la infección por el virus de la hepatitis C.

En particular, los ejemplos de la utilización del sistema de ensayo de la presente invención descrito anteriormente incluyen los siguientes:

- (1) Cribar una sustancia que inhiba el crecimiento y la infección de VHC

Las sustancias que inhiben el crecimiento y la infección de VHC incluyen, por ejemplo, compuestos orgánicos que afectan el crecimiento y la infección de VHC directa o indirectamente, oligonucleótidos de sentido contrario o similares que afectan el crecimiento de VHC o la traducción de la proteína de VHC directa o indirectamente hibridándolos con la secuencia diana en el genoma de VHC o su cadena complementaria.

- (2) Evaluación de diversas sustancias que tienen actividad antivírica en el cultivo celular.

Las diversas sustancias anteriormente mencionadas incluyen sustancias obtenidas mediante diseño racional de fármacos o cribado de alto rendimiento (por ejemplo, enzima purificada y aislada).

- (3) Identificación de una nueva diana para el tratamiento de pacientes infectados con VHC

Se pueden usar, por ejemplo la célula que replica el replicón de ARN del VHC de longitud completa o las células que replican el ARN genómico del VHC de longitud completa para identificar una proteína celular del huésped que puede jugar un importante papel para el crecimiento del VHC.

- (4) Evaluación de la capacidad del VHC para adquirir resistencia a fármacos y similares, e identificación de la mutación relacionada con la resistencia.

- (5) Producción de proteína del virus como un antígeno utilizable para el desarrollo, la producción y la evaluación de agentes diagnósticos y terapéuticos para la infección del virus de la hepatitis C.

- (6) Producción de proteína del virus como un antígeno utilizable para el desarrollo, la producción y la evaluación de la vacuna para la infección del virus de la hepatitis C y producción de un VHC atenuado.

- (7) Producción de anticuerpos monoclonales o policlonales para el diagnóstico y tratamiento de la infección del virus de la hepatitis C.

La presente invención se describirá más específicamente basándose en los siguientes ejemplos y dibujos. Sin embargo, el alcance técnico de la presente invención no se limita a estos ejemplos.

Ejemplo 1

Preparación del replicón de ARN del VHC de longitud completa derivado del ARN genómico del VHC de longitud completa

(A) Construcción del vector de expresión

Se construyeron ADN plásmidos en los que los ADN (clon JFH-1) que contenían el ADNc genómico de longitud completa de la cepa JFH-1 del virus de la hepatitis C (genotipo 2a) que se había aislado de un paciente con insuficiencia hepática fulminante se insertaron en la dirección 3' de la secuencia del promotor de ARN T7 en plásmidos pUC19.

En particular, los fragmentos de la PCR-RT obtenidos amplificando el ARN vírico de la cepa JFH-1 se clonaron en vectores pGEM T EASY (Promega) para obtener los plásmidos pGEM1-258, pGEM44-486, pGEM317-849, pGEM617-1323, pGEM1141-2367, pGEM2285-3509, pGEM3471-4665, pGEM4547-5970, pGEM5883-7003, pGEM6950-8035, pGEM7984-8892, pGEM8680-9283, pGEM9231-9634 y pGEM9594-9678 (Véase documento no de patente 6). Los ADNc derivados del ARN genómico vírico contenidos en dichos plásmidos se ligaron conjuntamente usando el procedimiento de la PCR y los enzimas de restricción para clonar el ARNc genómico vírico. Se insertó la secuencia del promotor de ARN T7R en la dirección 5' del ADNc genómico vírico de longitud completa. A partir de ahora en el presente documento, el ADN plásmido construido de esta manera se denomina como pJFH1 (parte superior de la Fig. 1). Se ha descrito anteriormente la preparación del clon JFH-1 en el Documento de Patente 1 y el Documento No de Patente 3. Adicionalmente, se registró la secuencia de nucleótidos del ADNc de longitud completa del clon JFH-1 en un banco de datos internacional de ADN (DDBJ/EMBL/GenBank) con n° de Acceso AB047639.

A continuación se construyó el ADN plásmido pFGREP-JFH1 el EMCV-IRES (emplazamiento de entrada interno al ribosoma del virus de la encefalomiocarditis) y el gen resistente a la neomicina (neo; denominado también como gen de la neomicina fosfotransferasa) entre la región 5' no traducida y la región núcleo del ADN plásmido pJFH1

(parte inferior de la Figura 1). Este procedimiento de construcción estaba de acuerdo con la publicación anterior (Documento No de Patente 4). Adicionalmente, se prepararon los clones de los plásmidos mutantes pJFH1/GND y pFGREP-JFH1/GND introduciendo que cambió el motivo de aminoácidos GDD, que corresponde al centro activo de la ARN polimerasa codificado por la región NS5B en pJFH1 y pFGREP-JFH1, a GND. Debido a que la secuencia de aminoácidos del emplazamiento activo de la proteína NS5B codificada por los clones mutantes pJFH1/GND y pFGREP-JFH1/GND cambió, la proteína NS5B activa que se necesita para replicar el replicón de ARN no se puede expresar a partir de los clones mutantes.

Adicionalmente, se preparó pFGREP-JFH1/Luc como un vector de expresión introducido en un gen indicador mediante la inserción del gen de la luciferasa entre el emplazamiento MluI de 415° a 420° y el emplazamiento PmeI de 2075° a 2028° de pFGREP-JFH1 para sustituir el gen resistente a la neomicina de pFGREP-JFH1 con el gen de la luciferasa. También, un mutante pFGREP-JFH1/Luc/GND, en el que el motivo GDD del centro activo de la ARN polimerasa de NS5b se cambió a GND, se preparó mutando G a 10933° de pFGREP-JFH1/Luc a A.

Se preparó pFGREP-JFH1/EGFP, en el que el gen resistente a la neomicina de pFGREP-JFH1 se sustituyó con el gen de la proteína fluorescente verde, insertando el gen de la proteína fluorescente verde entre el emplazamiento mutante MluI de 415° a 420° y el emplazamiento PmeI de 1142° a 1149° de pFGREP-JFH1. También se preparó un mutante pFGREP-JFH1/EGFP/GND, en el que el motivo GDD del centro activo de la ARN polimerasa de NS5b se cambió a GND, mutando G a 1000° de pFGREP-JFH1/EGFP a A.

Se preparó pFGREP-JFH1/EGFP, insertando el gen de la fosfatasa alcalina placentar secretora entre el emplazamiento MluI de 415° a 420° y el emplazamiento PmeI de 1982° a 1989° de pFGREP-JFH1 para sustituir el gen resistente a la neomicina de pFGREP-JFH1 con el gen de la fosfatasa alcalina placentar secretora. También, se preparó un mutante pFGREP-JFH1/SEAP/GND, en el que el motivo GDD del centro activo de la ARN polimerasa de NS5b se cambió a GND, mutando G a 10840° de pFGREP-JFH1/SEAP a A.

(B) preparación del ARN genómico del VHC de longitud completa y del replicón de ARN del VHC de longitud completa

Se digirieron los vectores de expresión contruidos como anteriormente, pJFH1, pJFH1/GND, pGREP-JFH1 y pFGREP-JFH1/GND con el enzima de restricción XbaI para preparar las plantillas de ADN para la síntesis del ARN genómico del VHC de longitud completa y el replicón de ARN del VHC de longitud completa. Posteriormente, se trataron 10-20 µg de cada fragmento XbaI con 20 U de Nucleasa de Judía Mungo en 50 µl de disolución de reacción incubando a 30°C durante 30 min. La Nucleasa de Judía Mungo es una enzima que cataliza la reacción que implica digerir selectivamente partes de la cadena única del ADN de doble cadena. Normalmente, si se sintetiza el ARN usando los fragmentos XbaI anteriores como plantillas, se sintetizan replicones de ARN que tienen 4 bases extra de CUGA, que es una parte del emplazamiento de reconocimiento XbaI, en el término 3'. Por tanto, en este ejemplo, se eliminaron 4 bases de CUGA procedentes de los fragmentos XbaI tratando los fragmentos XbaI con Nucleasa de Judía Mungo. Posteriormente, la disolución de después del tratamiento de Nucleasa de Judía Mungo que contenía los fragmentos XbaI se sometió al tratamiento normalizado de eliminación de la proteína para obtener los fragmentos XbaI purificados sin las 4 bases, CUGA, como plantilla de ADN que se va a usar a continuación.

A continuación, se sintetizó el ARN *in vitro* a partir de esta plantilla de ADN usando ARN polimerasa T7. Se usó un MEGAscript (Ambion Co.) para la síntesis del ARN, se hicieron reaccionar 20 µl de la mezcla de reacción que contenían 0,5-1,0 microgramos de la plantilla de ADN de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Después de la síntesis del ARN, se añadió DNasa (2 U) a l mezcla de reacción y se hizo reaccionar a 37°C durante 15 minutos, y a continuación se extrajo el ARN con tratamiento de ácido-fenol para eliminar la plantilla de ADN. Se sintetizaron los ARN de esta manera a partir de las anteriores plantillas de ADN derivadas de pJFH1, pJFH1/GND, pFGREP-JFH1 y pFGREP-JFH1/GND se denominaron como rJFH1, rJFH1/GND, rFGREP-JFH1 y rFGREP-JFH1/GND, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos de estos ARN se muestran en la SEC DE ID N°: 12, 13, 14, y 15 para rJFH1, rJFH1/GND, rFGREP-JFH1 y rFGREP-JFH1/GND, respectivamente. rJFH1 es un ejemplo de los ARN genómicos del VHC de longitud completa que tienen la misma estructura de la secuencia que el genoma del VHC de longitud completa de la cepa JFH-1. rFGREP-JFH1 es un ejemplo del replicón de ARN del VHC de longitud completa de la presente invención.

Posteriormente, rFGR-JFH1/Luc (SEC DE ID N°: 21), rFGR-JFH1/Luc/GND (SEC DE ID N°: 22), rFGR-JFH1/EGFP (SEC DE ID N°: 23), rFGR-JFH1/EGFP/GND (SEC DE ID N°: 24), rFGR-JFH1/SEAP (SEC DE ID N°: 25) y rFGR-JFH1/SEAP/GND (SEC DE ID N°: 26), que fueron replicones de ARN del VHC, se produjeron usando como plantilla las vectores de expresión preparados como anteriormente, pFGREP-JFH1/Luc, pFGREP-JFH1/Luc/GND, pFGREP-JFH1/EGFP, pFGREP-JFH1/EGFP/GND, pFGR-JFH1/SEAP y pFGR-JFH1/SEAP/GND, respectivamente.

Ejemplo 2

*Replicación del ARN genómico del VHC de longitud completa en células y generación de las partículas de virus*5 (C) *Replicación del ARN genómico del VHC de longitud completa en células y generación de las partículas de virus*

Se mezclaron diversas cantidades del ARN genómico del VHC de longitud completa (rJFH1 o rFHJ1/GND) como anteriormente con el ARN total extraído de células Huh7 para llevar la cantidad de ARN hasta 10 µg. Posteriormente, el ARN mezclado se introdujo en células Huh7 mediante el procedimiento de electroporación. Se sembraron células Huh7 sometidas al tratamiento de electroporación en placas de cultivo. Tras incubar durante 12, 24, 48 y 72 horas, se recogieron las células, se extrajo el ARN y se analizó mediante el procedimiento de transferencia Northern. Se llevó a cabo el análisis de transferencia Northern de acuerdo con Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª edición, J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989). En particular, se sometió el ARN extraído de las células tras la incubación a electroforesis desnaturalizante en gel de agarosa y se transfirió el ARN a una membrana de nylon cargada positivamente después de la electroforesis. Se hibridó una sonda de ADN o ARN marcada con ³²P, preparada a partir de pJFH1 con el ARN anteriormente mencionado transferido sobre la membrana. Se lavó la membrana y se expuso a una película para detectar las bandas de ARN específicas del ARN genómico del VHC de longitud completa del clon JFH-1.

Tal como se muestra en la Figura 2, cuando se transfectó rJFH1/GND en las células, se confirmó una banda del ARN introducido como una señal débil a las 4 horas después de la transfección, pero la señal se fue debilitando con el paso del tiempo y la señal procedente de la banda fue casi indetectable a las 24 h después de la transfección. En contraste, cuando se transfectó rJFH1, la intensidad de la señal de la banda del ARN introducido se debilitó en un primer momento como fue el caso de rJFH1/GND entre las 4-12 horas después de la transfección, pero se confirmó una clara señal de la banda de ARN después de 24 horas de la transfección. La señal confirmada era específica del ARN genómico del VHC. Esto es, se consideró que algún ARN genómico del VHC de longitud completa introducido se replicó y creció. No se observó replicación de rJFH1/GND, en la que se mutó el motivo activo de NS5B, esto es, el enzima del ARN replicativo, indicando que la actividad de NS5B es importante para la replicación del ARN genómico del VHC de longitud completa. Además, se llevaron a cabo los mismos experimentos para el ARN genómico de longitud completa derivado del virus de la hepatitis C tal como la cepa H77 (Documento No de Patente 7), la cepa J6 (Documento No de Patente 8) y la cepa JCH1 que los presentes inventores aislaron de la hepatitis crónica (Documento No de Patente 6), todos los cuales se han aislado anteriormente, pero no se confirmó la replicación del ARN genómico del VHC de longitud completa de estas cepas.

35 (D) *Detección de partículas del virus VHC en el medio de cultivo del cultivo celular transfectado*

Se sembraron células Huh7 tratadas mediante electroporación tal como se ha descrito anteriormente en placas de cultivo y se cultivaron durante 12, 24, 48 y 72 horas y a continuación se evaluó la proteína núcleo del VHC en el sobrenadante del cultivo. Se llevó a cabo la evaluación de acuerdo con el ensayo IRMA del antígeno Ortho del VHC (Documento No de Patente 9). Tal como se muestra en la Figura 3, se detectó la proteína núcleo en el sobrenadante del cultivo 48 y 72 horas después de la transfección con rJFH1. Para examinar si esta proteína núcleo se segregaba como partículas de virus, se fraccionó el medio de cultivo 72 horas después de la transfección con rJFH1 mediante el gradiente de densidad de la sacarosa. En un tubo de centrifuga, se distribuyeron en capas 2 ml de disolución de sacarosa al 60% (p/p) (disuelta en Tris 50 mM pH 7,5/ NaCl 1 M/EDTA 1 mM), 1 ml de disolución de sacarosa al 50%, 1 ml de disolución de sacarosa al 40%, 1 ml de disolución al 30%, 1 ml de disolución de sacarosa al 20% y 1 ml de disolución de sacarosa al 10% y se superpusieron a la anterior 4 ml del sobrenadante del cultivo de la muestra. Se centrifugó ésta en un rotor SW41 de Beckman Ti a 400.000 RPM, a 4°C durante 16 horas. Tras la centrifugación, se recogió ésta en fracciones de 0,5 ml cada una procedentes de la parte inferior del tubo. Se determinaron la densidad, la concentración de la proteína núcleo del VHC y la cantidad del ARN genómico del VHC de longitud completa en cada fracción. Se llevó a cabo la detección del ARN genómico del VHC de longitud completa con un procedimiento de PCR-RT cuantitativo detectando el ARN de la región 5' no traducida del ARN genómico del VHC de longitud completa, de acuerdo con Takeuchi T, Katsume A, Tanaka T, Abe A, Inoue K, Tsukiyama-Kohara K, Kawaguchi R, Tanaka S, Kohara M, "Real-Time detection system for quantification of Hepatitis C virus genome", Gastroenterology 116: 636-642 (1999). En particular, se amplificó mediante la PCR el ARN genómico del VHC de longitud completa contenido en el ARN extraído de la célula, usando cebadores sintéticos, R6-130-S17: 5'-CGGGAGAGCCATAGTGG-3' (SEC DE ID N°: 16), R6-290-R19: 5'-AGTACCACAAGGCCTTTCG-3' (SEC DE ID N°: 17 y Sonda TaqMan: R6-148-S21FT, 5'-CTGCGGAACCGGTGAGTACAC-3' (SEC DE ID N°: 18) y el kit de la PCR del ARN EZ rTth, y a continuación se detectó mediante el sistema detector de secuencias ABI Prism 7700.

Tal como se muestra en la Figura 4, el pico de la proteína núcleo coincidió con el del ARN genómico del VHC de longitud completa en la fracción 11. La densidad de esta fracción fue aproximadamente de 1,18 mg/ml y esto indicó un peso específico más bajo que el del conjugado de la proteína núcleo y del ácido nucleico informado hasta el momento. Además, cuando se llevó a cabo un fraccionamiento similar después de tratar el sobrenadante del cultivo con NP40 al 0,25%, los picos de la proteína núcleo y del ARN genómico del VHC de longitud completa cambiaron a un peso específico de aproximadamente 1,28 mg/ml. Estos es, se consideró que el tratamiento con NP40 arrastró la membrana superficial, que contenía lípidos y a continuación tuvo un peso específico inferior, procedente de las partículas de núcleo que dan como resultado partículas de virus comprendidas solo por ácido nucleico y proteína núcleo, y por

tanto, aumentó el peso específico. Los anteriores resultado mostraron que el ARN genómico del VHC de longitud completa se replicó en la célula transfectando rJFH1 en células Huh7 y, como resultado, se formaron partículas de virus y se segregaron en el sobrenadante del cultivo.

Ejemplo 3

(E) Preparación de la célula que replica el replicón d ARN del VHC de longitud completa y establecimiento de los clones celulares

Se prepararon las células que replicaban de replicón de ARN del VHC de longitud completa transfectando rFGREP-JFH1 y rFGREPJFH1/GND, que se prepararon en el Ejemplo 1, en células Huh7 tal como se ha descrito en el Ejemplo 2, y a continuación se realizó un intento de establecer clones de células que replicaban el replicón de ARN del VHC de longitud completa.

En primer lugar, tras transfectar rFGREP-JFH1 y rFGREP-JFH1/GND respectivamente en células Huh7, se sembraron las células en placas de cultivo. Tras cultivar 16-24 horas, se añadió G418 a diversas concentraciones. Se continuó el cultivo aunque cambiando el medio dos veces a la semana. Tras cultivar durante 21 días, se tiñeron las células sobrevivientes con cristal violeta. Se recomptaron las colonias teñidas, y se calculó el número de colonias resultantes por peso d ARN usado para la transfección se continuó también el cultivo en alguna de las placas de cultivo para clonar colonias de las células sobrevivientes. Se extrajeron el ARN, el ADN genómico y las proteínas, respectivamente, de las células clonadas, y a continuación se investigaron la detección del replicón de ARN del VHC de longitud completa, la integración del gen resistente a la neomicina en el ADN genómico y la expresión d la proteína de VHC. Se muestran estos resultados a continuación en detalle.

(F) Capacidad de formación de colonias

Los resultados de la transfección anterior indicaron que la capacidad de formación de colonias por 1 µg de replicón de ARN usado para la transfección fue de 368 UFC (Unidad Formadora de Colonias)/µg de ARN, para las célula Huh7 transfectadas con rFGREP-JFH1, a una concentración de G418 de 1,0 mg/ml (la parte izquierda de la Figura 5). En contraste, no se observó formación de colonias para las células Huh7 transfectadas con rFGREP-JFH1/GND (la parte derecha de la Figura 5). Esto indica que la capacidad de formación de colonias de las células Huh7 transfectadas con el replicón de ARN de rFGREP-JFH1 depende de la actividad de NS5B (ARN polimerasa) que se expresa a partir de rFGREP-JFH1. Esto es, se consideró que en las células formadoras de colonias, llegó a ser posible el crecimiento de las células como resultado del mantenimiento de la resistencia a G418 debido a la expresión continua del gen resistente a la neomicina producida por la replicación autónoma del replicón de ARN de rFGREP_JFH1 por medio de la acción de NS5B expresado a partir de rFGREP-JFH1.

(G) Detección del replicón de ARN del VHC de longitud completa en clones celulares establecidos

Se extrajo el ARN total mediante el procedimiento de extracción con ácido-fenol de los clones celulares que replicaban e replicón de ARN del VHC de longitud completa, que se ha establecido transfectando rFGREP-JFH1, en célula HUH7 de acuerdo con la sección (E) anterior. Posteriormente, se evaluó este ARN total mediante el procedimiento de transferencia Northern. En el procedimiento, se usó una sonda específica de pFGREP-JFH1. Como controles, se extrajo el ARN total de las células Huh7 no transfectadas de una manera similar (en la Figura 6, se muestra como "Huh7") se usaron una muestra sintetizada *in vitro* que contenía 10⁷ copias de replicón de ARN adicionalmente al ARN extraído de las células Huh7 (en la Figura 6, se muestra como "10⁷"), y una muestra sintetizada *in vitro* que contenía 10⁸ copias del replicón de ARN adicionalmente al ARN total extraído de las células Huh7 (en la Figura 6, se muestra como "10⁸"). En la Figura 6, 1-4 indica los números de clones celulares.

Como resultado, se detectó el ARN que tenía el tamaño similar a rFGREP-JFH1 con una sonda específica de rFGREP-JFH1 (Figura 6). A partir de este resultado, se confirmó que el replicón de ARN del rFGREP-JFH1 transfectado se replicaba y crecía en el clon celular. Se demostró también que hubo diferencia en la cantidad de replicón de ARN entre los clones celulares. Tal como se muestra en la Figura 6, por ejemplo, la cantidad de replicón de ARN en el clon 2 fue inferior a la de otros clones.

(H) Confirmación de la presencia o ausencia de la integración del gen de resistencia a la neomicina en el ADN genómico

Se llevó a cabo la amplificación mediante la PCR de los clones celulares 1-8 obtenidos de acuerdo con (E) (se muestran como FG-JFH1/2-1 y FGR-JFH1/2-8 en la Figura 7), usando cebadores específicos del gen de resistencia a la neomicina (cebador de sentido directo, NEO-S3: 5'-AACAAAGATGGATTGCACGCA-3' (SEC DE ID N°: 19), cebador de sentido contrario, NEO-R: 5'-GCGTCAAGAAGGCGATAGAAG-3' (SEC DE ID N°: 20)) y el ADN genómico celular del huésped extraído de cada uno de los clones celulares como plantilla, con el fin de confirmar que la resistencia de cada uno de los clones celulares frente a G418 no era debida a la integración del gen de resistencia a la neomicina el genoma celular del huésped. Como resultado, tal como se muestra en la Figura 7, no se observó que los clones positivos mostraran la amplificación del gen de la resistencia a la neomicina.

El resultado de (H) confirmó que el replicón de ARN del VHC de longitud completa se replicaba en los clones celulares establecidos mediante transfección del replicón de ARN del VHC de longitud completa de la presente invención.

5 (I) *Detección de la proteína de VHC*

Se extrajeron las proteína mediante un procedimiento normalizado a partir de os clones celulares establecidos mediante la transfección de rFGREP-JFH1, y a continuación se analizaron mediante SDS-PAGE y el procedimiento de transferencia Western Los clones celulares examinados en este caso fueron los mismos que los usados en la sección (G) anterior. El extracto celular obtenido mediante transfección transitoria del ARN genómico del VHC de longitud completa preparado en células Huh7 se usó como control positivo (se muestra como JFH1 en las Figuras 8, 9 y 10). El extracto celular procedente del clon obtenido transfectando el replicón de ARN subgenómico del VHC (SGR_JFH1) se usó como control negativo de la proteína núcleo y como control positivo de las proteínas NS3 y NS5a (se muestra como SGR-JFH1 en las Figuras 8, 9 y 10). Se usó el extracto celular de las células Huh7 no transfectadas como control negativo de todas las proteínas (se muestra como Huh7 en las Figuras 8, 9 y 10). Se transfirieron las muestras de proteína extraídas de cada clon celular sobre membranas PVDF (Immobilon-P, Millipore), y a continuación se detectaron la proteína núcleo y la proteína NS3 codificadas por el replicón de ARN del VHC de longitud completa del anterior usando un anticuerpo específico contra el núcleo y un anticuerpo específico contra NS3 (proporcionado amablemente por el Dr. Moradpour; Wolk B, y col. J. Virology, 2000, 74: 2293-2304). Tal como se muestra en las Figuras 8 y 9, se detectaron para cada proteína los clones celulares 1-4 que se establecieron transfectando la proteína rFGREP-JFH1, del mismo tamaño que la del control positivo. Debido a que no se detectaron ni la proteína del núcleo ni la proteína NS3 para las células Huh7 no transfectadas, se confirmó en los clones celulares 1-4 que se había transfectado el replicón de ARN del VHC de longitud completa, replicado autónomamente y que se expresaban la proteína núcleo y la proteína NS3.

Adicionalmente, para cada clon celular, para el cual se ha confirmado la expresión de la proteína NS3 tal como se ha descrito anteriormente, se confirmó también la expresión de la proteína NS5A a partir del replicón de ARN del VHC de longitud completa usando como anticuerpo un suero procedente de un paciente con hepatitis C (Figura 10).

A partir de los resultados de (H) e (I) descritos anteriormente, se confirmó que en los clones celulares, que se han establecido transfectando el replicón de ARN del VHC de longitud completa, el replicón de ARN del VHC de longitud completa se replicaba y que se expresaban también las proteínas víricas.

35 (1) *Producción de partículas de virus en células que replican el replicón de ARN del VHC de longitud completa*

Se transfectó rFGREP-JFH1 en células Huh7 de acuerdo con la sección (E) anterior, se establecieron los clones celulares 2 y 3 (FGR-JFH1/2-3) que replicaban el replicón de ARN del VHC de longitud completa, y a continuación se recuperaron sus sobrenadantes de los cultivos. Se evaluaron las partículas del virus VHC en los sobrenadantes de los cultivos de acuerdo con un procedimiento similar a (D) descrito anteriormente. En la Figura 11 se muestra el resultado. En la Figura 11, un círculo sombreado representa el peso específico (g/ml) de cada fracción. Un círculo cerrado representa una cantidad de la proteína núcleo (fmol/l). Un círculo abierto representa un título del replicón de ARN del VHC de longitud completa (x 0,1 copias/ml).

Tal como se muestra en la Figura 11, el pico de la proteína núcleo coincidió con el del replicón de ARN del VHC de longitud completa en las fracciones que tenían pesos específicos de aproximadamente 1,18-1,20 mg/ml. Se encontró también un pequeño pico en la fracción más ligera. A partir de los anteriores resultados se demuestra que el replicón de ARN del VHC de longitud completa se replicó en células Huh7 transfectadas con rFGREP-JFH11, y se formaron y segregaron partículas de virus en el sobrenadante del cultivo del mismo.

50 Ejemplo 4

(K) *Experimento de infección con partículas de virus en el sobrenadante del cultivo*

Se infectaron células Huh7 con partículas de virus en el sobrenadante del cultivo añadiendo cada sobrenadante del cultivo de clones celulares 1-8 usados en (H) (es decir, FGR-JFH1/2-1, FGR-JFH1/2-2, FGR-JFH1/2-3, FGR-JFH1/2-4, FGR-JFH1/2-5, FGR-JFH1/2-6, FGR-JFH1/2-7, FGR-JFH1/2-8) a las células Huh7. Al día siguiente, se añadió G418 a 0,3 mg/ml a los medio de cultivo de las células Huh7 infectadas, y se cultivaron adicionalmente las célula Huh7 durante 21 días. Tras la finalización del cultivo, se fijaron las células y se tiñeron con cristal violeta. Se observó formación de colonias par las células infectadas con los sobrenadantes del cultivo de FGR-JFH1/2-3, FGR-JFH1/2-5 y FGR-JFH1/2-6, respectivamente. Por otra parte, no se observó formación de colonias para las células infectadas con el sobrenadante del cultivo de SGR-JFH1/4-1, usándose como control células de replicón subgenómico (descritas en el Documento No de patente 6). La Figura 12 muestra una fotografía de una placa de cultivo teñida tras cultivar durante 21 días con los 4 ml u 8 ml añadidos del sobrenadante del cultivo de FGR-JFH1/2-3 o SGR-JFH1/4-1. Se encontraron tres y nueve colonias en la placa en la que se han sembrado las células mezcladas con 4 ml y 8 ml del sobrenadante del cultivo de FGR-JFH1/2-3. Sin embargo, no se observaron colonias en la placa, en la que se han sembrado las células mezcladas con el sobrenadante del cultivo de SFR-JFH1/4-1.

Posteriormente, se clonaron las colonias formadas mediante infección con el virus de la hepatitis C usando el sobrenadante del cultivo de FGR-JFH1/2-3 y FGR-JFH1/2-5, respectivamente. Se establecieron tres clones de FGR-JFH1/C2-3-11, FGR-JFH1/C2-3-12 y FGR-JFH1/C2-3-13 a partir de la placa de cultivo infectada con el sobrenadante del cultivo de FGR-JFH1/2-3, y se establecieron 2 clones de FGR-JFH1/C2-5-11 y FGR-JFH1/C2-5-12 a partir de la

Cuando se infectaron células Huh7 con el sobrenadante del cultivo de cada clon celular de FGR-JFH1/C2-3-11, FGR-JFH1/C2-3-12, FGR-JFH1/C2-3-13, FGR-JFH1/C2-5-11 y FGR-JFH1/C2-5-12, se observó formación de colonias en las placas de cultivo infectadas con el sobrenadante del cultivo de FGR-JFH1/C2-3-12 y JFH1/C2-5-12, respectivamente. A partir de las células infectadas con el sobrenadante del cultivo de FGR-JFH1/C2-3-12, se establecieron 2 clones adicionales de FGR-JFH1/C2-3-12-1 y de FGR-JFH1/C2-3-12-2. A partir de las células infectadas con el sobrenadante del cultivo de FGR-JFH1/C2-5-12, se establecieron 2 clones adicionales de FGR-JFH1/C2-5-12-1 y FGR-JFH1/C2-5-12-2.

Se extrajeron el ARN, la proteína y el ADN genómico de estos clones celulares que se habían establecido a partir de células infectadas con el sobrenadante del cultivo de las células que replicaban el replicón de ARN del VHC de longitud completa. El examen para la integración del gen resistente a la neomicina en el ADN genómico de estos clones celulares mediante la PCR usando el ADN genómico como plantilla dio como resultado negativo en todos. Además, el replicón de ARN del VHC de longitud completa que se replicaba en las células podría detectarse mediante la PCR cuantitativa usando ARN como plantilla. Más adicionalmente, podría detectarse la proteína núcleo en el sobrenadante del cultivo. Estos resultados indican que las partículas del virus que contienen el replicón de ARN del VHC de longitud completa que se producen mediante las células que replican el replicón de ARN del VHC de longitud completa de la presente invención pueden infectar otra célula.

Aplicabilidad industrial

De acuerdo con el procedimiento de la presente invención, se pueden preparar partículas del virus VHC en un sistema de cultivo celular. Usando el replicón de ARN de la presente invención, se puede producir eficazmente el ARN que contiene el ARN genómico del VHC de longitud completa en un sistema de cultivo celular. Además, usando las células, en las que se ha introducido el replicón de ARN del VHC de longitud completa de acuerdo con la presente invención o el ARN genómico del VHC de longitud completa, se pueden replicar el replicón de ARN del VHC de longitud completa o el ARN genómico del VHC de longitud completa, y se pueden producir partículas del virus VHC de la presente invención de manera continua en el sistema de cultivo celular. Las células en las que se introduce el replicón de ARN del VHC de longitud completa o el ARN genómico del VHC de longitud completa, se pueden usar también como un sistema de ensayo para cribar diversas sustancias que influyen el proceso de replicación del VHC, la formación de partículas de virus y la liberación extracelular de partículas de virus. El replicón de ARN del VHC de longitud completa de la presente invención y el ARN genómico del VHC de longitud completa, y las partículas de virus de la presente invención son también útiles como vector vírico para un gen extraño. Se pueden incluir las partículas de virus de la presente invención, o una parte de las mismas en una vacuna como antígeno de la vacuna contra el virus de la hepatitis C. Además, el sistema, en el que las partículas de virus de la presente invención y otras células que se cultivan conjuntamente, se pueden utilizar como un sistema de ensayo para cribar diversas sustancias que tienen influencia en la infección de las células con partículas de virus. El replicón de ARN del VHC de longitud completa de la presente invención o el ARN genómico del VHC de longitud completa es útil como plantilla que permite una reproducción sencilla de la secuencia del genoma del VHC de longitud completa.

Texto libre del listado de secuencias

La SEC DE ID N°: 1 representa la secuencia de la región 5' no traducida del ARN genómico del VHC derivada del clon JFH-1.

La SEC DE ID N°: 2 representa la secuencia de codificación de la proteína núcleo del ARN genómico del VHC derivada del clon JFH-1.

La SEC DE ID N°: 3 representa la secuencia de codificación de la proteína E1 del ARN genómico del VHC derivada del clon JFH-1.

La SEC DE ID N°: 4 representa la secuencia de codificación de la proteína E2 del ARN genómico del VHC derivada del clon JFH-1.

La SEC DE ID N°: 5 representa la secuencia de codificación de la proteína NS2 del ARN genómico del VHC derivada del clon JFH-1.

La SEC DE ID N°: 6 representa la secuencia de codificación de la proteína NS3 del ARN genómico del VHC derivada del clon JFH-1.

La SEC DE ID N°: 7 representa la secuencia de codificación de la proteína NS4A del ARN genómico del VHC derivada del clon JFH-1.

ES 2 346 326 T3

La SEC DE ID N°: 8 representa la secuencia de codificación de la proteína NS4B del ARN genómico del VHC derivada del clon JFH-1.

5 La SEC DE ID N°: 9 representa la secuencia de codificación de la proteína NS5A del ARN genómico del VHC derivada del clon JFH-1.

La SEC DE ID N°: 10 representa la secuencia de codificación de la proteína NS5B del ARN genómico del VHC derivada del clon JFH-1.

10 La SEC DE ID N°: 11 representa la secuencia de la región 3' no traducida del ARN genómico del VHC derivada del clon JFH-1.

15 La SEC DE ID N°: 12 representa la secuencia del ARN genómico del VHC de longitud completa derivada del clon JFH-1.

La SEC DE ID N°: 13 representa la secuencia del replicón de ARN que comprende el ARN genómico del VHC de longitud completa derivada del clon JFH-1.

20 La SEC DE ID N°: 14 representa la secuencia del ARN genómico del VHC de longitud completa derivada del clon JFH-1 en el que el motivo de aminoácidos GDD se ha mutado en GND.

La SEC DE ID N°: 15 representa la secuencia del replicón de ARN que comprende el ARN genómico del VHC de longitud completa derivada del clon JFH-1 en el que el motivo de aminoácidos GDD se h mutado en GND.

25 LAS SEC DE ID N°s: 16-20 representan las secuencias de los cebadores.

La SEC DE ID N°: 21 representa la secuencia del replicón de ARN derivada de un vector de expresión oFGREP-JFH1/Luc.

30 La SEC DE ID N°: 22 representa la secuencia del replicón de ARN derivada de un vector de expresión pFGREP-JFH1/Luc/GND.

35 La SEC DE ID N°: 23 representa la secuencia del replicón de ARN derivada de un vector de expresión pFGREP-JFH1/EGFP.

La SEC DE ID N°: 24 representa la secuencia del replicón de ARN derivada de un vector de expresión pFGREP-JFH1/EGFP/GND.

40 La SEC DE ID N°: 25 representa la secuencia del replicón de ARN derivada de un vector de expresión pF-GREP_JFH1/SEAP.

La SEC DE ID N°: 26 representa la secuencia del replicón d ARN derivada de un vector de expresión pFGREP-JFH1/SEAP/GND.

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un replicón de ARN, que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende una región 5' no traducida que comprende una secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEC DE ID N°: 1, una secuencia de codificación de una proteína núcleo que comprende una secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEC DE ID N°: 2, una secuencia de codificación de la proteína E1 que comprende una secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEC DE ID N°: 3, una secuencia de codificación de la proteína E2 que comprende una secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEC DE ID N°: 4, una secuencia de codificación de la proteína NS2 que comprende una secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEC DE ID N°: 5, una secuencia de codificación de la proteína NS3 que comprende una secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEC DE ID N°: 6, una secuencia de codificación de la proteína NS4A que comprende una secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEC DE ID N°: 7, una secuencia de codificación de la proteína NS4B que comprende una secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEC DE ID N°: 8, una secuencia de codificación de la proteína NS5A que comprende una secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEC DE ID N°: 9, una secuencia de codificación de la proteína NS5B que comprende una secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEC DE ID N°: 10, una región 3' no traducida que comprende una secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEC DE ID N°: 11, al menos un gen marcador seleccionable y/o al menos un gen indicador, y al menos una secuencia IRES, en el que dicho al menos un gen marcador seleccionable y/o al menos un gen indicador, y dicha al menos una secuencia IRES se colocan entre la región 5' no traducida y la secuencia de codificación de la proteína núcleo en este orden en la dirección 5' a 3', en el que dicho replicón de ARN tiene capacidad de replicación autónoma y capacidad de producción de partículas de virus.

2. El replicón de ARN de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la secuencia de nucleótidos comprende la región 5' no traducida, el al menos un gen marcador seleccionable y/o el al menos un gen indicador, y la al menos una secuencia IRES, y la secuencia de codificación de la proteína núcleo, la secuencia de codificación de la proteína E1, la secuencia de codificación de la proteína E2, la secuencia de codificación de la proteína NS2, la secuencia de codificación de la proteína NS3, la secuencia de codificación de la proteína NS4A, la secuencia de codificación de la proteína NS4B, la secuencia de codificación de la proteína NS5A, la secuencia de codificación de la proteína NS5B, y la región 3' no traducida en este orden en la dirección 5' a 3'.

3. El replicón de ARN de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende el ARN (a) o (b) siguiente:

(a) un ARN que comprende una secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEC DE ID N°: 13; o

(b) un ARN que comprende una secuencia de nucleótidos derivada de la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEC DE ID N°: 13 mediante delección, sustitución o adición de 1 a 100 nucleótidos, en el que dicho replicón de ARN tiene capacidad de replicación autónoma y capacidad de producción de partículas de virus.

4. Un procedimiento para producir una célula que replica un replicón de ARN y produce una partícula de virus, que comprende introducir el replicón de ARN de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en una célula.

5. Una célula que replica un replicón de ARN y produce una partícula de virus, que comprende el replicón de ARN de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

6. La célula de acuerdo con la reivindicación 5, en la que la célula es una célula derivada de hígado humano, una célula derivada de cuello uterino humano o una célula derivada de riñón fetal humano.

7. La célula de acuerdo con la reivindicación 5, en la que la célula es una célula Huh7, una célula HepG2, una célula IMY-N9, una célula HeLa o una célula 293.

8. Un procedimiento para producir una partícula de virus de la hepatitis C, que comprende cultivar la célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7 para permitir a la célula producir la partícula de virus.

9. Una partícula de virus de la hepatitis C que comprende el replicón de ARN de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

10. Un procedimiento para cribar una sustancia contra el virus de la hepatitis C, que comprende cultivar, en presencia de una sustancia de ensayo, al menos una seleccionada entre el grupo constituido por (a), y (b) siguientes:

(a) la célula de acuerdo con la reivindicación 5 a 7, y

(b) la partícula de virus de la hepatitis C de acuerdo con la reivindicación 9 y la célula permisiva al virus de la hepatitis C;

y detectar el replicón de ARN o las partículas de virus en el cultivo resultante.

ES 2 346 326 T3

11. Una vacuna de la hepatitis C, que comprende la partícula de virus de la hepatitis C de acuerdo con la reivindicación 9 o una parte de la misma.

12. Un procedimiento para producir una vacuna de la hepatitis C usando la partícula de virus de la hepatitis C de acuerdo con la reivindicación 9 o una parte de la misma como un antígeno.

13. Uso del replicón de ARN de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en la producción de partículas de virus de la hepatitis C en células cultivadas.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Fig. 1

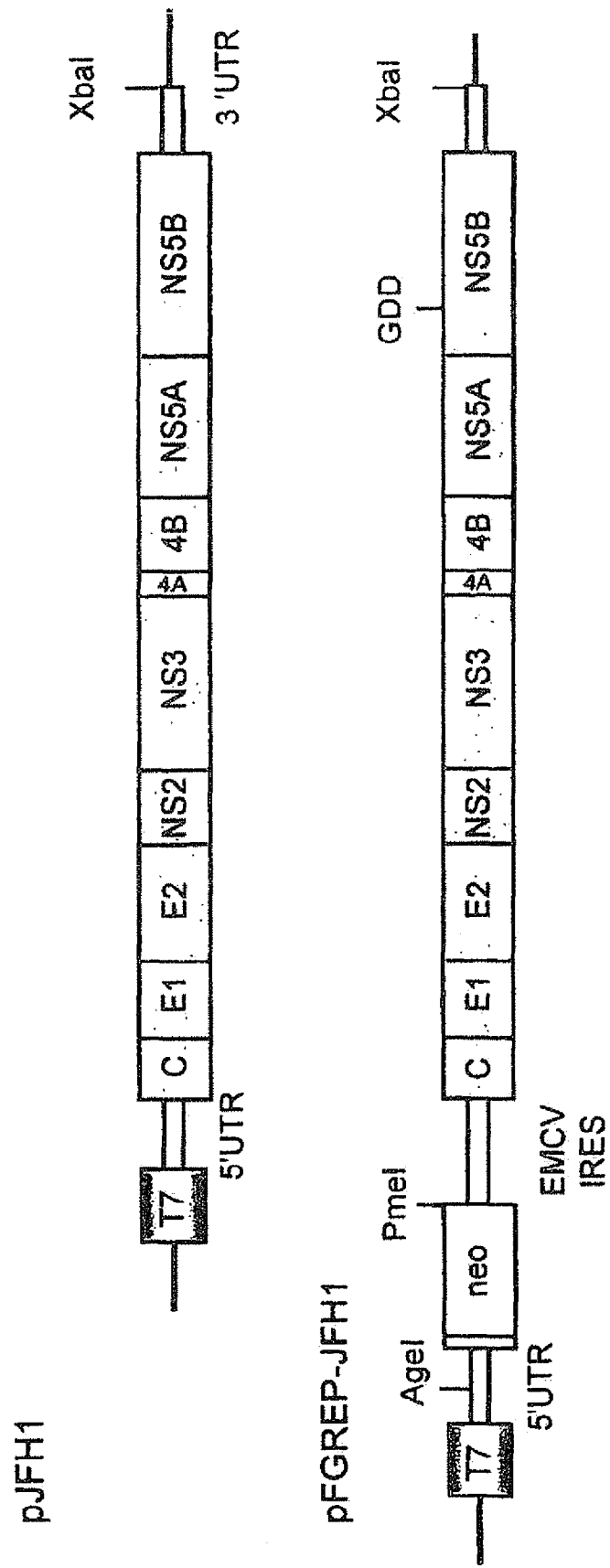


Fig. 2

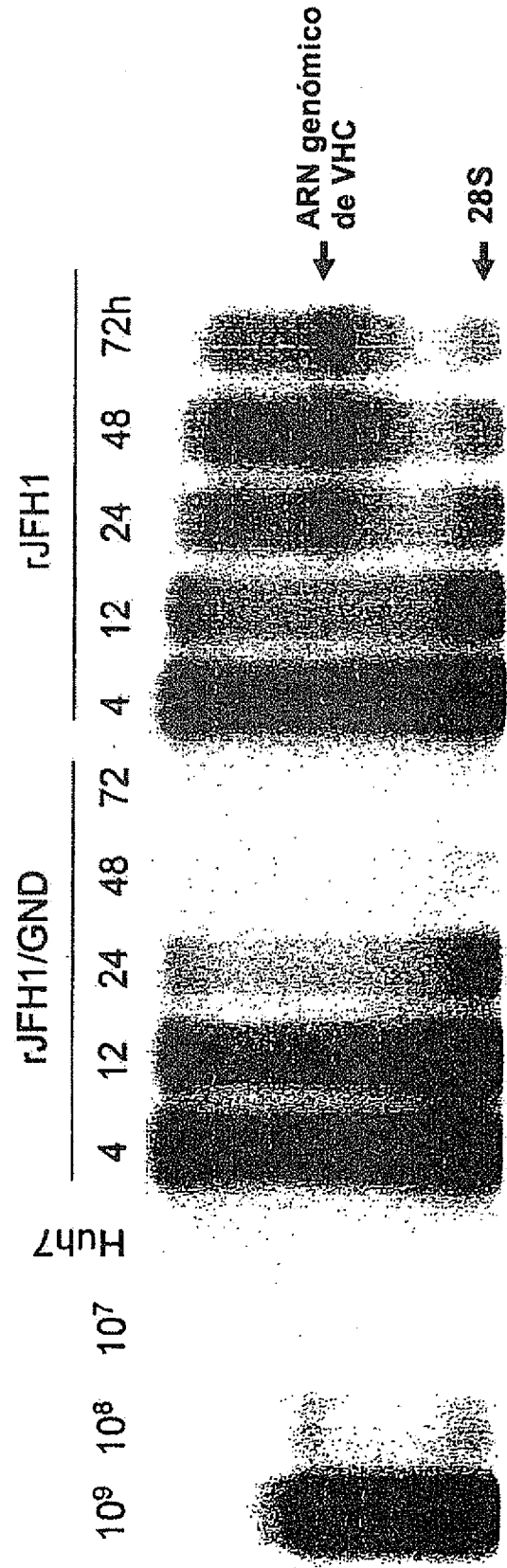


Fig. 3

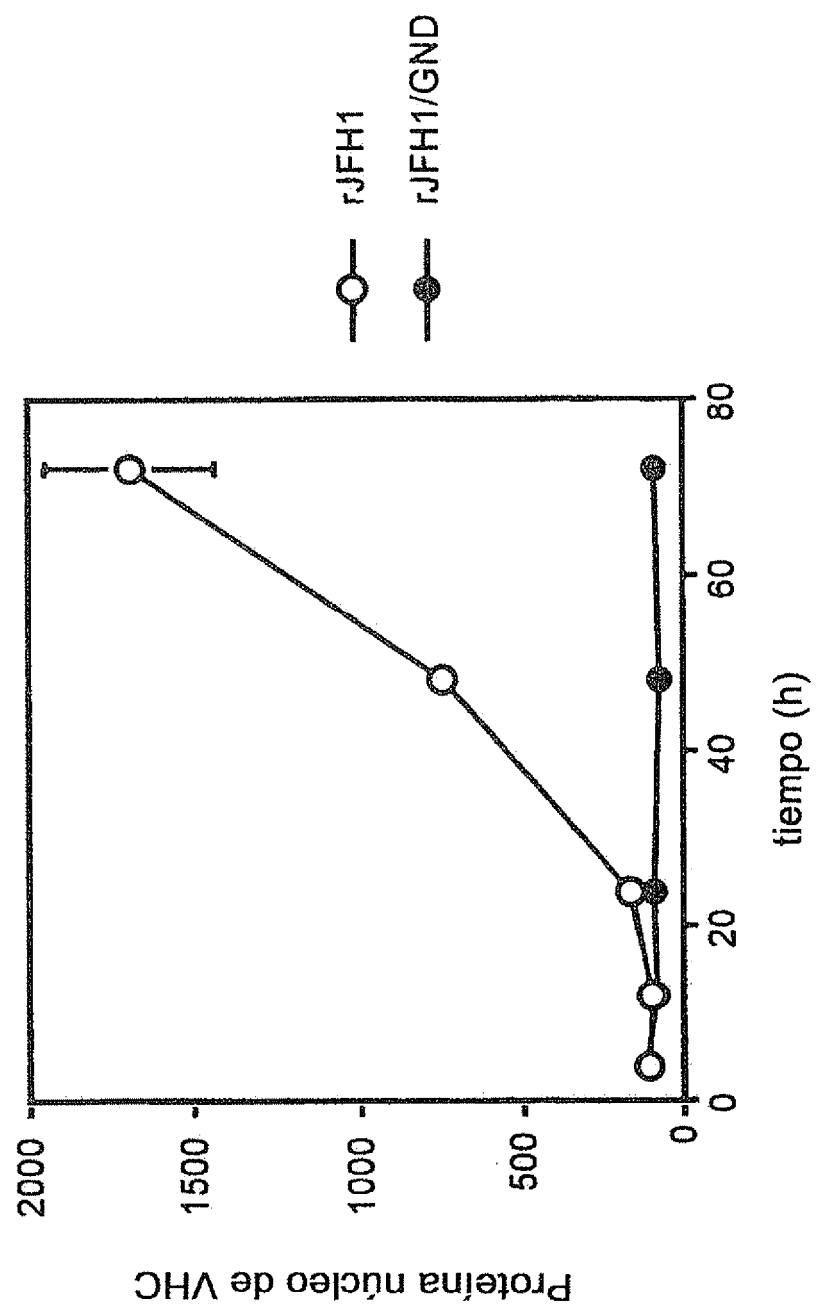


Fig. 4

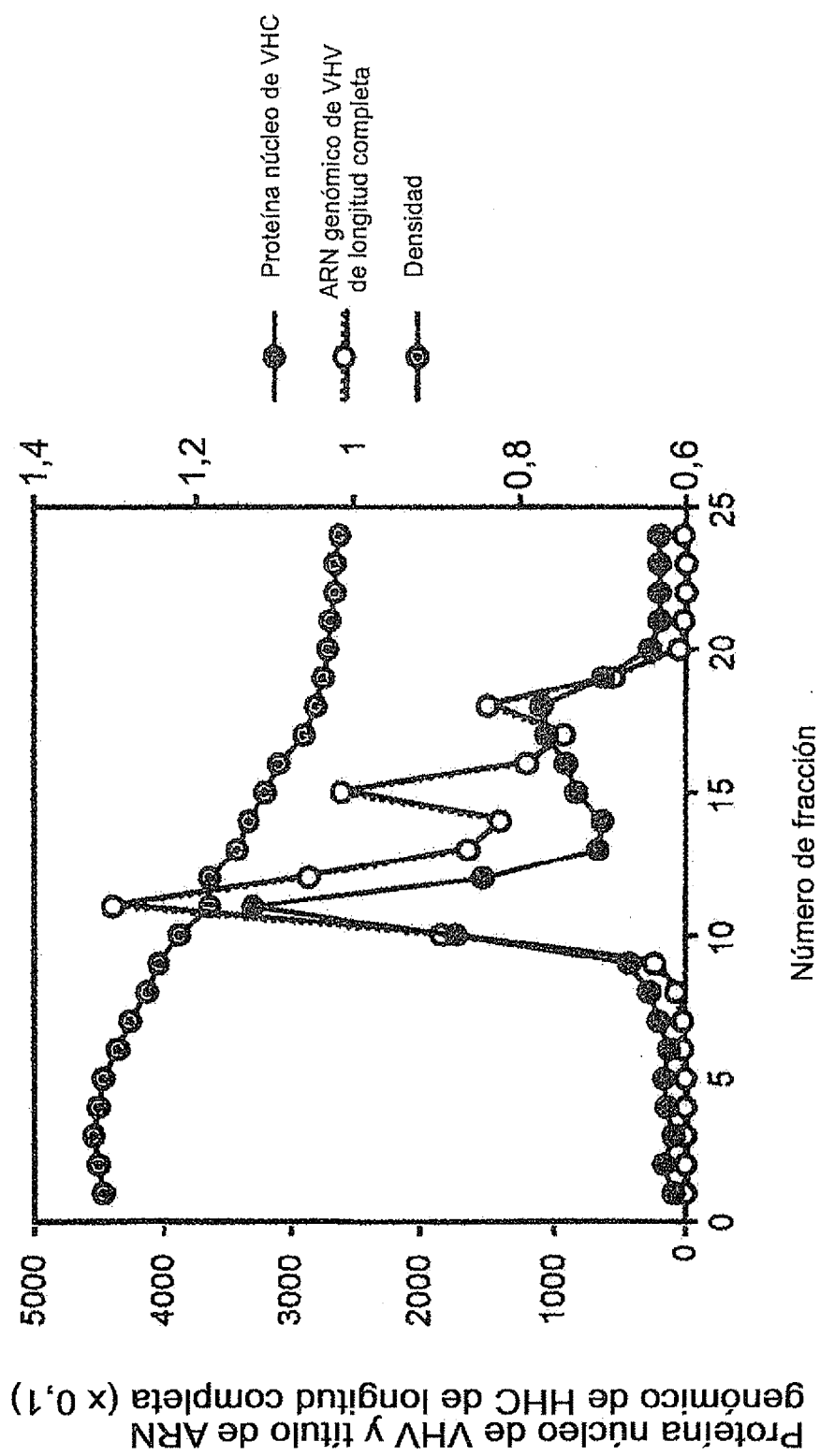
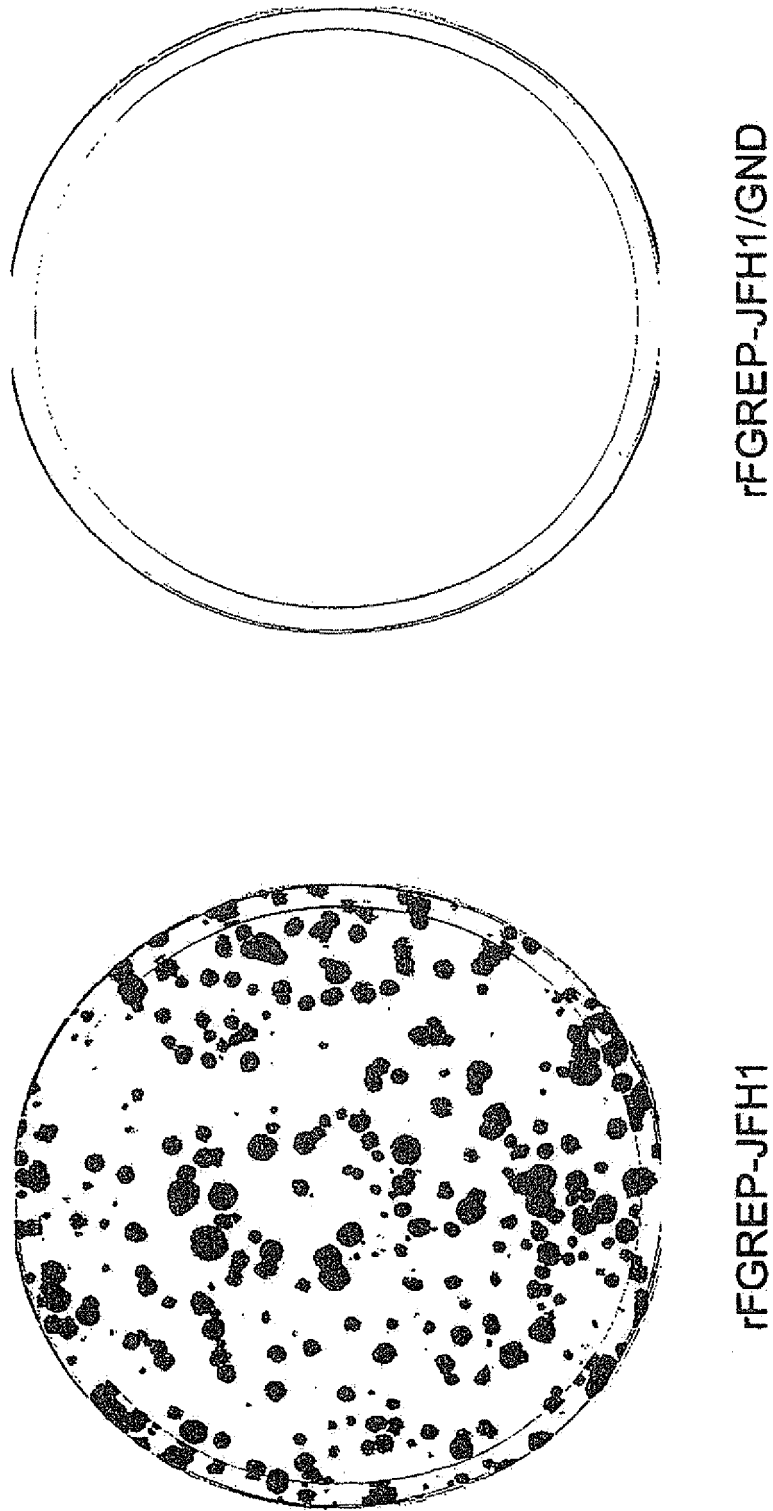


Fig. 5



1 µg de ARN transfectado

Fig. 6

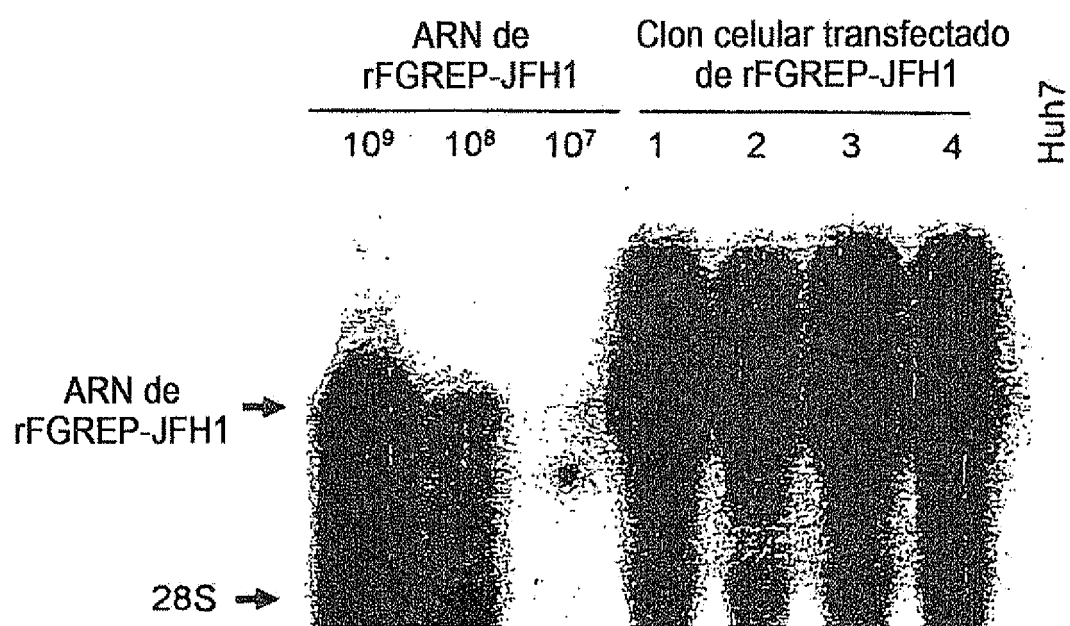


Fig. 7

Clon celular transfectado de rFGREP-JFH1

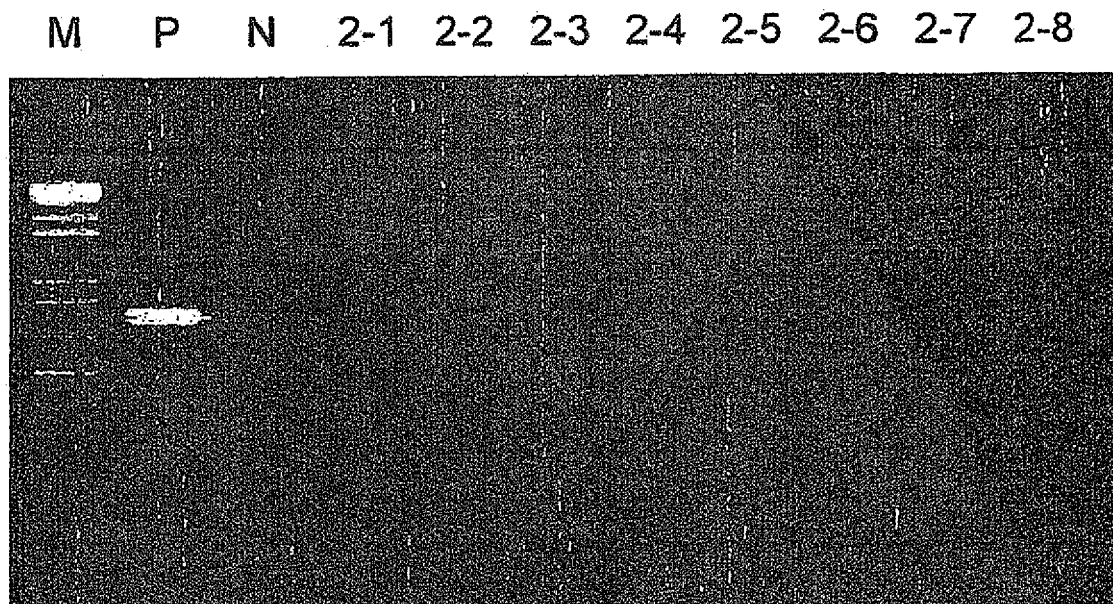


Fig. 8

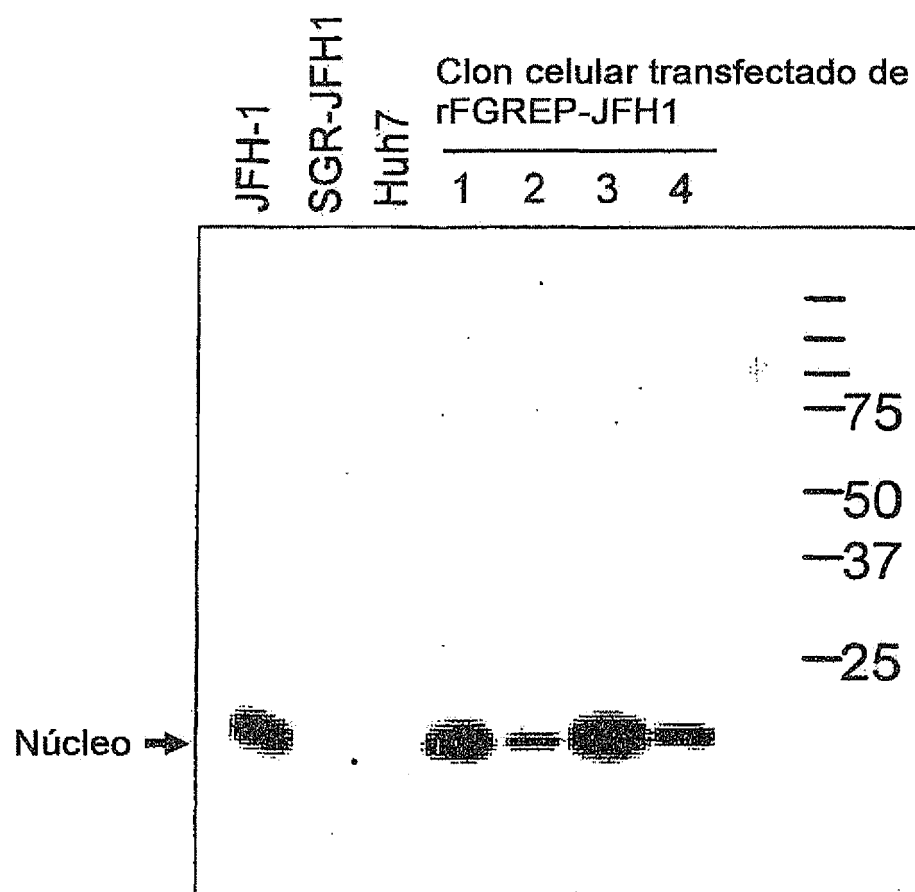


Fig. 9

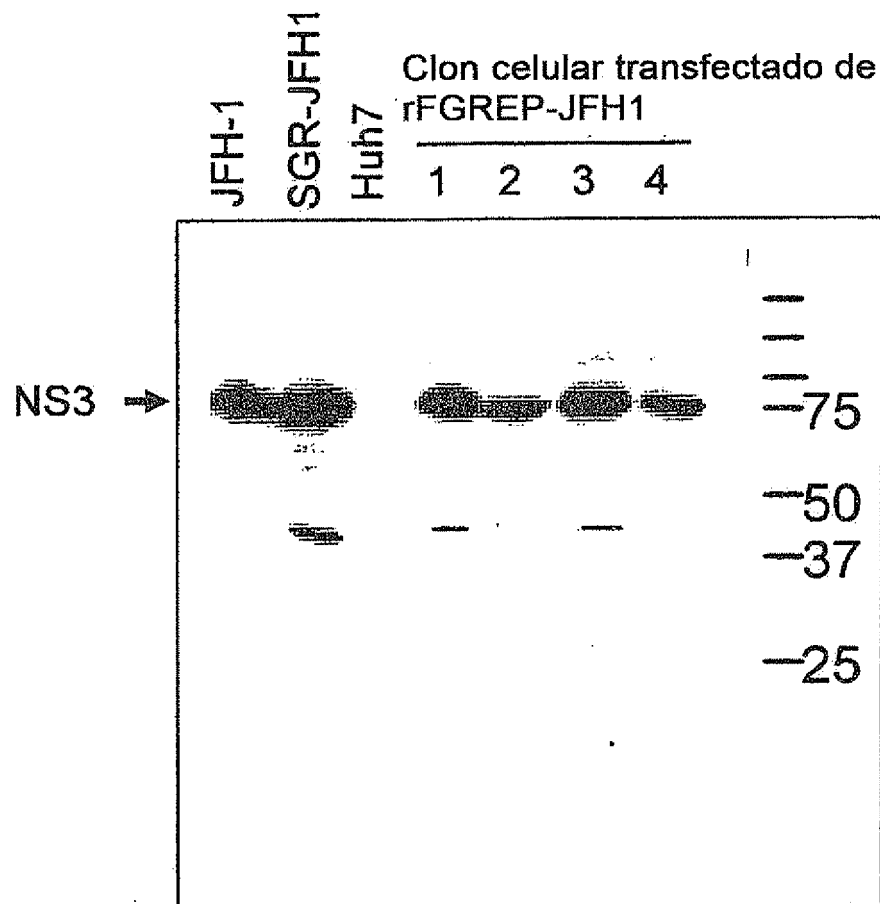
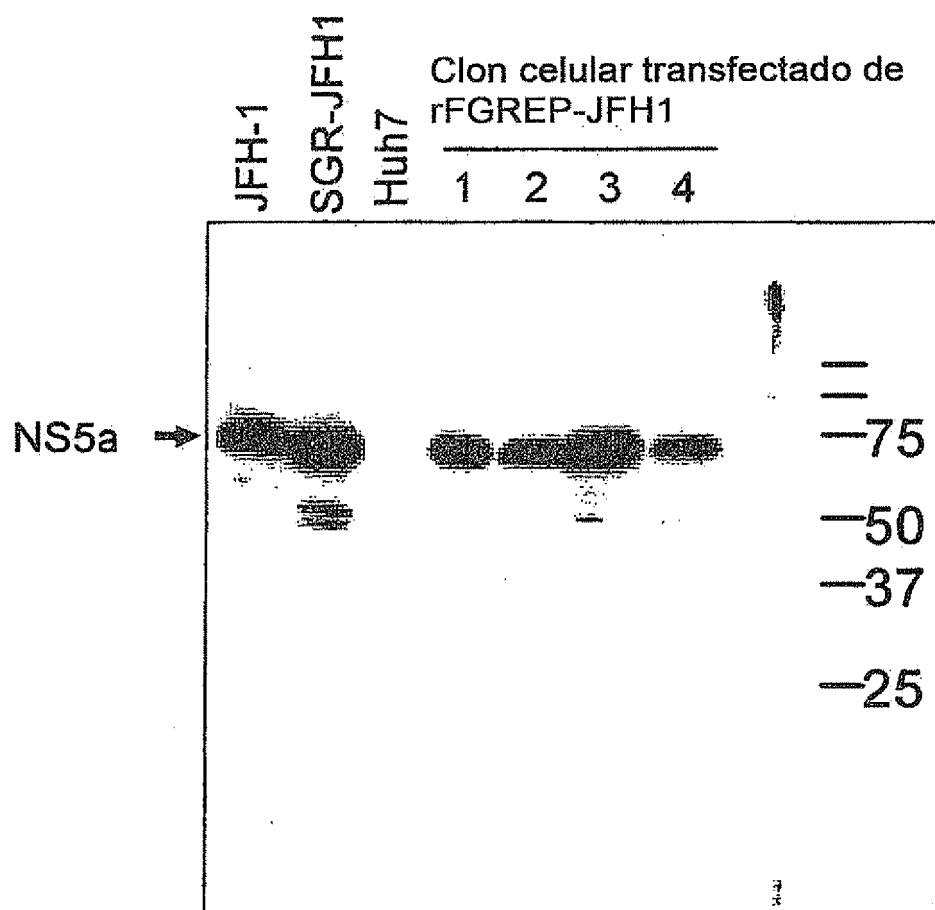


Fig. 10



Ag núcleo (fmol/l) y
título del replicón de VHC (x 0,1)

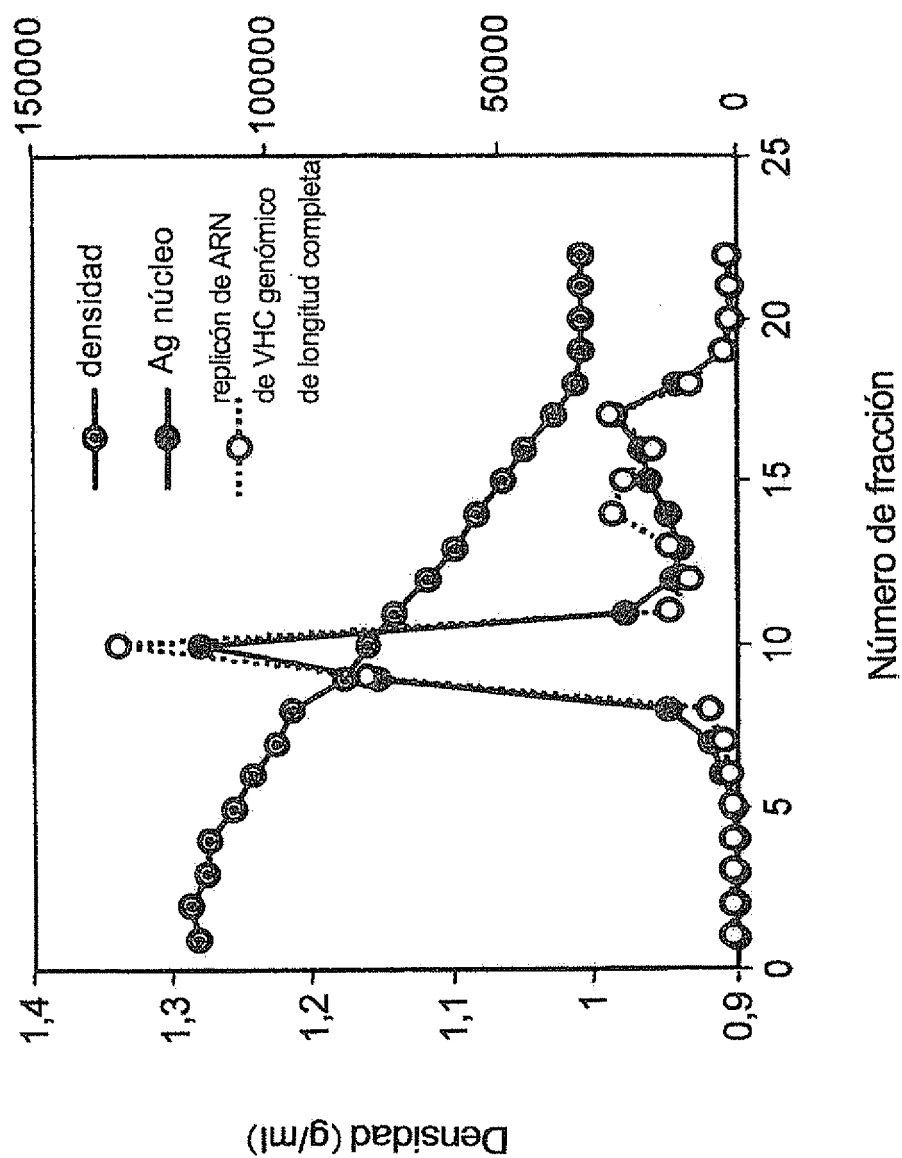
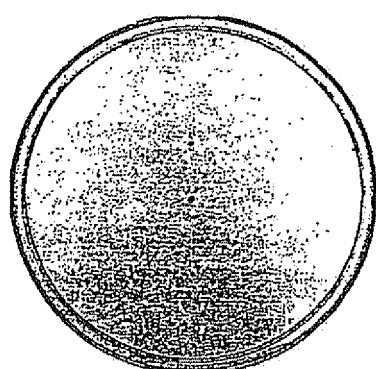
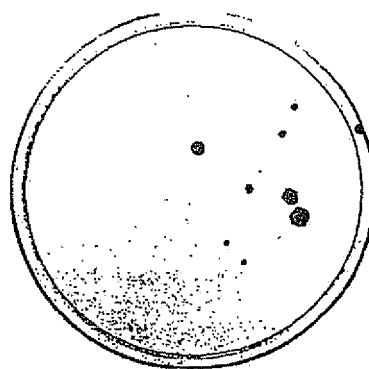


Fig.11

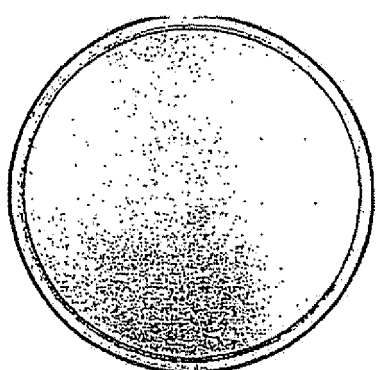
Fig. 12



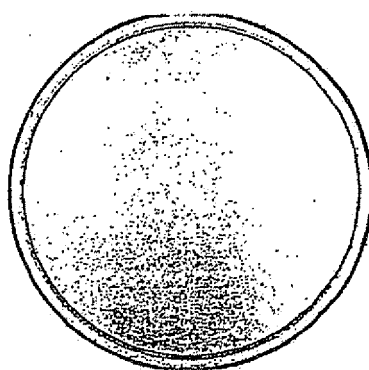
FGR-JFH1/2-3
4ml



FGR-JFH1/2-3
8ml



SGR-JFH1/4-1
4ml



SGR-JFH1/4-1
8ml

ES 2 346 326 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Tokyo Metropolitan Organization for Medical Research Toray Industries Inc.

<120> Construcción de ácido nucleico que contiene el genoma de longitud completa del virus de la hepatitis C humana, células replicantes del genoma del virus recombinante de longitud completa que tienen la construcción de ácido nucleico transferida al anterior y procedimiento para producir partículas del virus de la hepatitis C

<130> PH-2372-PCT

<140> PCT/JP2005/003232

<141> 21-02-2005

<150> JP 2004-045489

<151> 20-02-2004

<160> 26

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 340

<212> ARN

<213> Virus de la hepatitis C

<220>

<223> región 5' no traducida del ARN genómico del virus de la hepatitis C derivado del clon JFH-1

<220>

<223> Inventor: Wakita, Takaji

Inventor: Kato, Takanobu

Inventor: Date, Tomoko

Inventor: Miyamoto, Michiko

Inventor: Tanabe, Junichi

Inventor: Sone, Saburo

<400> 1

accugccccc aaaggggacg acacuccgcc augaaucacu cccugugag gaacuacugu 60

cuucacgcag aaagcgccua gccauggcgu uaguaugagu gucguacagc cuccaggccc 120

ccccucccg ggagagccau aguggucugc ggaaccggug aguacaccgg aaugccggg 180

aagacugggu ccuuucuuagg auaaaccac ucuaucccg gccauuuggg cgugcccccg 240

caagacugcu agccgaguag cguuggguug cgaaaggccu ugugguacug ccugauaggg 300

cgcugcgag ugccccggga ggucucguag accgugcacc 340

<210> 2

<211> 573

<212> ARN

<213> Virus de la hepatitis C

<220>

<223> secuencia de codificación de la proteína núcleo del ARN genómico del virus de la hepatitis C derivado del clon JFH-1

ES 2 346 326 T3

<400> 2

augagcacaa auccuaaacc ucaaagaaaa accaaaagaa acaccaaccg ucgcccagaa 60
 5 gacguuaagu ucccggggcgg cgccagauc guuggcggag uauacuuguu gccgcgcagg 120
 ggccccaggu ugguugugcg cacgacaagg aaaacuucgg agcgguccca gccacguggg 180
 10 agacgccagc ccauccccaa agaucggcgc uccacuggca aggccugggg aaaaccaggu 240
 cgccccuggc ccuauauagg gaauagggga cucggcuggg caggauggcu ccuguccccc 300
 cgaggcucuc gcccuccug gggccccacu gacccccggc auaggucgcg caacgugggu 360
 15 aaagucaucg acaccuaac guguggcuuu gccgaccuca ugguuguacu ccccgucgua 420
 ggcgccccgc uuaguggcgc cgccagagcu gucgcgcacg gcgugagagu ccuggaggac 480
 20 gggguuaauu augcaacagg gaaccuaccc gguuucccu uuucuaucu cuugcuggcc 540
 cuguuguccu gcaucaccgu uccggucucu gcu 573

25 <210> 3

<211> 576

<212> ARN

<213> Virus de la hepatitis C

30 <220>

<223> secuencia de codificación de la proteína E1 del ARN genómico del virus de la hepatitis C derivado del clon JFH-1

35 <400> 3

gcccagguga agaauaccag uagcagcuac auggugacca augacugcuc caaugacagc 60
 40 aucacuuggc agcucgaggc ugcgguucuc caguccccg ggugcguccc gugcgagaga 120
 guggggaaua cgucacggug uugggugcca gucucgcaa acauggcugu gcggcagccc 180
 ggugcccuca cgcagggucu gcggacgcac aucgauagg uuugauguc cgcaccuuc 240
 45 ugcucugcuc ucuacgugg ggaccucugu ggcgggguga ugcucgcgc ccagguguuc 300
 aucgucucgc cgcaguacca cugguuugug caagaaugca auuguccau cuaccucggc 360
 50 accaucacug gacaccgcau ggcaugggac augaugaua acuggucgcc caccgccacc 420
 augauccugg cguacgugau gcgcgucccc gaggucauca uagacaucgu uagcggggcu 480
 cacuggggcg ucauguucgg cuuggccuac uucucuauugc agggagcgug ggcgaagguc 540
 auugucaucc uucugcuggc cgcuggggug gacgcg 576

60

<210> 4

<211> 1290

<212> ARN

65

<213> Virus de la hepatitis C

<223> secuencia de codificación de la proteína E2 del ARN genómico derivado del clon JFH-1

ES 2 346 326 T3

<400> 4

ggcaccacca ccguuggagg cgcuguugca cguuccacca acgugauugc cggcguguuc 60
 5 agccauggcc cucagcagaa cauucagcuc auuaacacca acggcaguug gcacaucaac 120
 cguacugccu ugaauugcaa ugacuccuug aacaccggcu uucucgcggc cuuguucuac 180
 10 accaaccgcu uuaacucguc agggugucca gggcgccugu ccgccugccg caacaucgag 240
 gcuuuccgga uagggugggg caccuacag uacgaggaua augucaccaa uccagaggau 300
 augaggccgu acugcuggca cuacccccca aagccgugug gcguaguccc cgcgaggucu 360
 15 guguguggcc caguguacug uuucaccccc agcccggugag uagugggcac gaccgacaga 420
 cguggagugc ccaccuacac auggggagag aaugagacag augucuuccu acugaacagc 480
 20 acccgaccgc cgcagggcuc augguucggc ugcacuggga ugaacuccac ugguuucacc 540
 aagacuugug gcgcgccacc uugccgcacc agagcugacu ucaacgccag caccgacuug 600
 uuuguccua cggauguuu uaggaagcau ccugaugcca cuuauuuuaa gugugguucu 660
 25 gggcccuggc ucacacaaa gūgcugguc cacuacccuu acagacucug gcauuacccc 720
 ugcacaguca auuuuaccu cuucaagaua agaauaug uagggggggu ugagcacagg 780
 30 cucacggccg caugcaacu cacucguggg gaucgcugcg acuuggagga caggacagg 840
 agucagcugu cuccucuguu gcacucuacc acggaauggg ccauccugcc cugcaccuac 900
 35 ucagacuua cccguuguc aacuggucu cuccaccuuc accagaacau cguggacgua 960
 caauacaugu auggccucuc accugcuau acaaaauacg ucguucgaug ggagugggug 1020
 40 guacucuuau uccugcucu agcggacgcc agagucugcg ccugcuugug gaugcucauc 1080
 uuugugggcc aggccgaagc agcauuggag aaguuggucg ucuugcacgc ugcgagugcg 1140
 gcuaacugcc auggccuccu auuuuugcc aucuucucg uggcagcuug gcacaucagg 1200
 45 ggucgggugg ucccuugac caccuauugc cucacugcc uauggccuu cugccuacug 1260
 cucauggcac ugccccggca ggcuuaugcc 1290

<210> 5

<211> 651

<212> ARN

<213> Virus de la hepatitis C

<220>

<223> secuencia de codificación de la proteína NS2 del ARN genómico del virus de la hepatitis C derivado del con JFH-1

ES 2 346 326 T3

<400> 5

1 uaugacgcac cugugcacgg acagauaggg guggguuuugu ugauauugau caccucucuc 60
 5 acacucacccc cgggguaauaa gaccucuccuc ggccaguguc uguggugguu gugcuaucuc 120
 cugacccugg gggaagccau gauucaggag uggguaccac ccaugcaggu gcgcggcggc 180
 10 cgcgauggca ucgcgugggc cguacauua uucugcccgg gugugguguu ugacauuacc 240
 aaauggcuuu uggcgugcu ugggccugcu uaccucuuua gggccgcuu gacacaugug 300
 ccguacuucg ucagagcuca cgcucugua aggguaugcg cuuuggugaa gcagcucgcg 360
 15 ggggguaggu auguucaggu ggcgcuauug gcccuuggca gguggacugg caccuacuc 420
 uaugaccacc ucacaccuau gucggacugg gccguagcg gccugcgcga cuuagcgguc 480
 20 gccuggaac ccuacucuu caguccaug gagaagaagg ucaucgucug gggagcggag 540
 acggcugcau guggggacau ucuacaugga cuucccgugu ccgcccga cu gggccaggag 600
 25 auccucucg gccagcuga uggcuacacc uccaaggggu ggaagcuccu u 651

<210> 6

<211> 1893

30 <212> ARN

<213> Virus de la hepatitis C

<220>

35 <223> secuencia de codificación de la proteína NS3 del ARN genómico del virus de la hepatitis C derivado del clon JFH-1

<400> 6

40 gcucccauca cugcuuauag ccagcaaaca cgaggccucc ugggcgccau aguggugagu 60
 augacggggc gugacaggac agaacaggcc ggggaagucc aaauccuguc cacagucucu 120
 caguuccuuc ucggaacaac caucucgggg guuuugugga cuguuuacca cggagcuggc 180
 45 aacaagacuc uagccggcuu acgggguccg gucacgcaga uguacucgag ugcugagggg 240
 gacuugguag gcuggcccag ccccccuggg accaagucuu uggagccgug caagugugga 300
 gccugcgacc uauaucuggu cacgcggaac gcugauguca ucccggcucg gagacgcggg 360
 50 gacaagcggg gagcauugcu cuccccgaga cccauuucga ccuugaaggg guccucgggg 420
 gggccggugc ucugcccuag gggccacguc guugggcucu uccgagcagc ugugugcucu 480
 55 cggggcgugg ccaauuccau cgauuucav cccguugaga cacucgacgu uguuacaagg 540
 ucuccacuu ucagugacaa cagcacgcca ccggcugugc cccagaccua ucaggucggg 600
 uacuugcaug cuccaacugg caguggaaag agcaccaagg ucccugucgc guaugccgcc 660
 60 cagggguaca aaguacuagu gcuuaacccc ucgguagcug ccaccuuggg guuuggggcg 720
 uaccuaucca aggcacaugg caucaauccc acauuagga cuggagucag gaccgugaug 780
 65 accggggagg ccaucacgua cuccacauau ggcaauuuc ucgccgaugg gggcugcgcu 840
 agcggcgccu augacaucau cauugcgau gaaugccag cuguggaugc uaccuccauu 900

ES 2 346 326 T3

5 cucggcaucg gaacgguccu ugaucagca gagacagccg gggucagacu aacugugcug 960
 gcuacggcca cccccccgg gucagugaca acccccacuc ccgauauaga agagguaggc 1020
 cucgggcggg agggugagau ccccuucua uggaggggcga uuccccuacug cugcaucaag 1080
 ggaggagac accugauuuu cugccacuca aagaaaaagu gugacgagcu cgcggcgggc 1140
 10 cuucggggca ugggcuugaa ugccguggca uacuauagag gguuggacgu cuccauaaua 1200
 ccagcucagg gagauguggu ggucgucgcc accgacgcc ucaugacggg guacacugga 1260
 15 gacuuugacu ccgugaucga cugcaaugua gcggucaccc aagcugucga cuucagccug 1320
 gacccaccu ucacuauaac cacacagacu gucccacaag acgucuguc acgcagucag 1380
 cgcgcgggc gcacagguag aggaagacag ggcacuuaua gguauguuuc cacuggugaa 1440
 20 cgagccucag gaauguuuga caguguagug cuuugugagu gcuacgacgc aggggcugcg 1500
 ugguaacgauc ucacaccagc ggagaccacc gucagguua gagcguauuu caacacgccc 1560
 25 ggccuacccg ugugucaaga ccaucuugaa uuuugggagg caguuuucac cggccucaca 1620
 cacauagacg cccacuuccu cucccaaaca aagcaagcgg gggagaacuu cgcguaccua 1680
 30 guagccuacc aagcuacggu gugcgccaga gccaaagccc cucccccugc cugggacgcc 1740
 auguggaagu gccuggcccc acucaagccu acgcuugcgg gcccacacc ucuccuguac 1800
 35 cguuugggcc cuauuaccaa ugaggucacc cucacacacc cugggacgaa guacaucgcc 1860
 acaugcaugc aagcugaccu ugaggucaug acc 1893

<210> 7

40 <211> 162

<212> ARN

<213> Virus de la hepatitis C

<220>

45 <223> secuencia de codificación de la proteína NS4A del ARN genómico del virus de la hepatitis C derivado del clon JFH-1

<400> 7

50 agcacguggg uccuagcugg aggaguccug gcagccgucg ccgcauauug ccuggcgacu 60

ggaugcguuu ccaucaucgg ccgcuugcac gucaaccagc gagucgucgu ugcgccggau 120

55 aaggaggucc uguaugaggc uuuugaugag auggaggaau gc 162

<210> 8

60 <211> 783

<212> ARN

<213> Virus de la hepatitis C

<220>

65 <223> secuencia de codificación de la proteína NS4B del ARN genómico del virus de la hepatitis C derivado del clon JFH-1

ES 2 346 326 T3

<400> 8

```

      gccucuaggg cggcucucau cgaagagggg cagcggauag ccgagauguu gaaguccaag 60
5    auccaaggcu ugcugcagca ggccucuaag caggcccagg acuuacaacc cgcuaugcag 120
      gcuucauggc ccaaagugga acaauuuugg gccagacaca uguggaacuu cauugcggc 180
10   auccaauacc ugcaggauu gucaacacug ccagggaacc ccgcgguagg uuccaugaug 240
      gcauucagug ccgcccucac caguccguug ucgaccagua ccaccauccu ucucaacauc 300
      augggaggcu gguuagcguc ccagaucgca ccaccgcgg ggccaccgg cuuugucguc 360
15   aguggccugg ugggggcugc cgugggcagc auaggccugg guaaggugcu gguggacauc 420
      cuggcaggau auggugcggg cauuucgggg gccucgucg cauucaagau caugucuggc 480
20   gagaagcccu cuauggaaga ugucaucau cuacugccug ggauccuguc uccgggagcc 540
      cugguggugg gggucaucug cgcgcccauu cugcgccgcc acgugggacc gggggagggc 600
25   gcgguccaau ggaugaacag gcuuauugc uuugcuucca gaggaaacca cgucgccccu 660
      acucacuacg ugacggaguc ggaugcgucg cagcguguga cccaacuacu uggcucucuu 720
30   acuauaacca gccuacucag aagacuccac aaauuggauaa cugaggacug cccauccca 780
      ugc
                                     783

```

<210> 9

35 <211> 1398

<212> ARN

<213> Virus de la hepatitis C

40 <220>

<223> secuencia de codificación de la proteína NS5A del ARN genómico de virus de la hepatitis C derivado del clon JFH-1

45

50

55

60

65

ES 2 346 326 T3

<400> 9

```

    uccggauccu ggcuccgcga cgugugggac uggguuugca ccaucuugac agacuucaaa 60
5   aaauuggcuga ccucuaaaau guuccccaag cugcccggcc ucccuuucan cucuugucua 120
    aagggguaca agggugugug ggcgggcacu ggcaucauga ccacgcgcug cccuugcggc 180
10  gccaaacauu cuggcaaugu ccgccugggc ucuauagagga ucacaggggcc uaaaaccugc 240
    augaacaccu ggcagggggac cuuuccuaua aaauugcuaca cggaggggcca gugcgcgcgc 300
    aaacccccca cgaacuacaa gaccgccauc uggaggggugg cggccucgga guacgcggag 360
15  gugacgcagc augggugcua cuccuaugua acaggacuga ccacugacaa ucugaaaaau 420
    ccuugccaac uaccuucucc agaguuuuuc uccugggugg acggugugca gauccauagg 480
20  uuugcaccca caccaaagcc guuuuuccgg gaugaggucu cguucugcgu ugggcuuaau 540
    uccuauugcug ucggguccca gcuucccugu gaaccugagc ccgacgcaga cguauugagg 600
    uccaugcuua cagaucggcc ccacauacg gcggagacug cggcgcggcg cuuggcacgg 660
25  ggauaccuc caucugaggc gagguccua gugagccagc uaucagcacc gucgugcgg 720
    gccaccugca ccaccacag caacaccuau gacguggaca uggucgaugc caaccugcuc 780
30  auggagggcg guguggcuca gacagagccu gaguccaggg ugcccguucu ggacuuucuc 840
    gagccaaugg ccgaggaaga gacgaccuu gagcccucaa uaccaucgga gugcaugcuc 900
35  cccaggagcg gguuuccacg ggccuaccg gcuugggcac ggccugacua caaccgccc 960
    cucguggaau cguggaggag gccagauuac caaccgccc cguugcugg uugugcucuc 1020
40  ccccccccca agaaggcccc gacgccuccc ccaaggagac gccggacagu gggucugagc 1080
    gagagcacca uaucagaagc ccuccagcaa cuggccauca agaccuuugg ccagcccccc 1140
45  ucgagcggug augcaggcuc guccacgggg gcgggcgcgc ccgaauccgg cgguccgacg 1200
    ucccugggug agccggcccc cucagagaca gguuccgccu ccucuaugcc ccccucgag 1260
50  ggggagccug gagaucgga ccuggagucu gaucagguag agcuucaacc uccccccag 1320
    gggggggggg uagcucccg uucgggcucg gggucuuggu cuacuugcuc cgaggaggac 1380
    gauaccaccg ugugcugc                                     1398

```

<210> 10

<211> 1773

<212> ARN

<213> Virus de la hepatitis C

<220>

<223> secuencia de codificación del ARN genómico del virus de la hepatitis C derivado del clon JFH-1

65

ES 2 346 326 T3

<400> 10

uccaugucan acuccuggac cggggcucua auaacuccu guagccccga agaggaaaag 60
 5 uugccaauc acccuuugag uaacucgcug uugcgauacc auaacaaggu guacuguaca 120
 acaucaaaaga gcgccucaca gagggcuaaa aagguaacu uugacaggac gcaagugcuc 180
 10 gacgcccuu augacucagu cuuaaaggac aucaagcuag cggcuuccaa ggucagcgca 240
 aggcuccuca ccuuggagga ggcgugccag uugacuccac cccauucugc aagauccaag 300
 uauggauucg gggccaagga gguccgcagc uuguccggga gggccguuaa ccacaucaag 360
 15 uccgugugga aggaccuccu ggaagacca caaacaccaa uucccacaac caucauggcc 420
 aaaaugagg uguucugcg ggaccccgcc aaggggggua agaaaccagc ucgccucauc 480
 20 guuuaccug accucggcg ccgggucugc gaaaaaugg cccucuauga cauuacacaa 540
 aagcuuccuc aggcgguaau gggagcuucc uauggcucc aguaucucc ugcccaacgg 600
 25 guggaguan ucuugaaagc augggcgga aagaaggacc ccauggguuu uucguaugau 660
 acccgauuc ucgacucaac cgucacugag agagacauca ggaccgagga guccauauac 720
 caggccugcu ccugccccga ggagggcgcc acugccauac acucgcugac ugagagacuu 780
 30 uacguaggag ggcccauguu caacagcaag ggucaaaccu gcgguuacag acguugccgc 840
 gccagcgggg ugcuaaccac uagcaugggu aacaccauca caugcuangu gaaagccua 900
 35 gcggccugca aggcugcggg gauaguugc cccacaugc ugguaugcgg cgaugaccua 960
 guagucucu cagaaagcca ggggacugag gaggacgagc ggaaccugag agccuucacg 1020
 40 gaggccauga ccagguacuc ugccccuccu ggugaucucc ccagaccgga auaugaccug 1080
 gagcuauaa cauccuguuc cuaaaugug ucugugcggu ugggcccgcg gggccgccgc 1140
 45 agauacuacc ugaccagaga cccaaccacu ccacucgccc gggcugccug ggaaacagu 1200
 agacacucc cuaucaauuc auggcuggga aacaucauc aguaugcucc aaccuaugg 1260
 guucgcaugg uccuaaugac acacuucuc uccauucua ugguccaaga caccucggac 1320
 50 cagaaccuca acuuugagau gnauggauca guauacuccg ugaauccuuu ggaccuucca 1380
 gccauaaug agagguuaca cgggcuugac gccuuuucua ugcacacua cucucaccac 1440
 55 gaacugacgc ggguggcuc agccucaga aaacuugggg cgccacccu caggguugg 1500
 aagagucggg cucgcgcagu cagggcgucc cucaucucc guggaggga agcggccguu 1560
 60 ugcggccgau aucucuucua uugggcggug aagaccaagc ucaaacucac uccauugccg 1620
 gaggcgccgc uacuggacu auccaguug uucaccguc gcgccggcg gggcgacuu 1680
 uuucacagcg ugucgcgcgc ccgacccgc ucauuacuc ucggccuacu ccuacuuuc 1740
 65 guagggguag gccucuucc acucccgcu cgg 1773

ES 2 346 326 T3

<210> 11

<211> 239

<212> ARN

5 <213> Virus de la hepatitis C

<220>

<223> región 3' no traducida del ARN genómico del virus de la hepatitis C derivado del clon JFH-1

10 <400> 11

uagagcggca cacacuaggu acacuccaau gcuaacuguu cccccuuuuu uuuuuuuuuu 60

15 uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu cccucuuucu ucccuucuca 120

ucuuauucua cuuucuuucu ugguggcucc aucuuagccc uagucacggc uagcugugaa 180

agguccguga gccgcaugac ugcagagagu gccguaacug gucucucugc agaucaugu 239

20

<210> 12

<211> 9707

<212> ARN

25 <213> Virus de la hepatitis C

<220>

<223> ARN genómico del virus de la hepatitis C de longitud completa derivado del clon JFH-1

30 <400> 12

gaauucuaau acgacucacu auagaccugc cccuaauagg ggcgacacuc cgccaugaau 60

35 cacuccccug ugaggaacua cugucuucac gcagaaagcg ccuagccaug gcguuaguau 120

gagugucgua cagccuccag gcccccccu cccgggagag ccuaguggu cugcggaacc 180

ggugaguaca ccggaauugc cgggaagacu ggguccuuuc uuggauaaac ccacucuaug 240

40

ccccggccauu ugggcgugcc cccgcaagac ugcuaagccga guagcguugg guugcgaaag 300

gccuuguggu acugccugau agggcgcuug cgagugcccc gggaggucuc guagaccgug 360

45

caccaugagc acaaauccua aaccucuaag aaaaaccaaa agaaacacca accgucgccc 420

agaagacguu aaguucccg gggcgggcca gaucguuggc ggaguauacu uguugccgcg 480

50

caggggcccc agguugggug ugcgcacgac aaggaaaacu ucggagcggg cccagccacg 540

ugggagacgc cagcccaucc ccaaagaucg gcgcuccacu ggcaaggccu ggggaaaacc 600

55

aggucgcccc uggcccuau augggauga gggacucggc ugggcaggau ggcuccuguc 660

60

65

ES 2 346 326 T3

cccccgagggc ucucgccccu ccugggggccc cacugacccc cggcauaggu cgcgcaacgu 720
 ggguaaaguc aucgacaccc uaacgugugg cuuugccgac cucauggggu acauccccgu 780
 5 cguaggcgcc ccgcuuagug gcgccgccag agcugucgcg cacggcguga gaguccugga 840
 ggacggggguu aaunaugcaa caggggaaccu acccgguuuc cccuuuucua ucuucuugcu 900
 10 ggccugugug uccugcauca ccguuccggu cucugcugcc caggugaaga auaccaguag 960
 cagcuacaug gugaccaaug acugcuccaa ugacagcauc acuuggcagc ucgaggcugc 1020
 15 gguucuccac guccccgggu gcgucccgug cgagagagug gggaaucgu cacgguguug 1080
 ggugccaguc ucgccaaca uggcugugcg gcagcccggg gccucacgc agggucugcg 1140
 gacgcacauc gauaugguug ugauguccgc caccuucugc ucugcucucu acguggggga 1200
 20 ccucuguggc ggggugaugc ucgcggccca gguguuacuc gucucgcgc aguaccacug 1260
 guuugugcaa gaaugcauu gcuccaucua ccuggcacc aucacuggac accgcauggc 1320
 25 augggacaug augaugaacu ggucgccac ggcaccaug auccuggcgu acgugaugcg 1380
 cgucgccgag gucaucauag acaucguuag cggggcucac uggggcgua uguucggcuu 1440
 30 ggccuacuuc ucuaugcagg gagcgugggc gaaggucuu gucauccuuc ugcuggccgc 1500
 ugggguggac gcgggcacca ccaccguugg aggcgcuguu gcacguucca ccaacgugau 1560
 ugccggcgug uucagccaug gccucagca gaacauucag cucauuaca ccaacggcag 1620
 35 uuggcacauc aaccguacug ccuugaauug caaugacucc uugaacaccg gcuuucugc 1680
 ggccuuguuc uacaccaacc gcuuuacuc gucagggugu ccagggcgcc ugucgccug 1740
 40 ccgcaacauc gaggcuuuc ggauaggug gggcacccua caguacgagg auaaugucac 1800
 caauccagag gauaugaggc cguacugcug gcacuacccc ccaaagccgu guggcguagu 1860
 45 ccccgcgagg ucugugugug gccagugua cuguuucacc cccagcccgg uaguaguggg 1920
 cacgaccgac agacguggag ugcccaccua ccaugggga gagaugaga cagaugucu 1980
 ccuacugaac agcaccgac cggcgaggg cucaugguuc ggcugcacgu ggaugaacuc 2040
 50 cacugguuuc accaagacuu guggcgcgcc accuugccgc accagagcug acuucaacgc 2100
 cagcacggac uuguugugcc cuacggauug uuuuaggag cauccugaug ccacuuauau 2160
 55 uaaguguggu ucugggccc ugcucacacc aaagugccug guccacuacc cuuacagacu 2220
 cuggcauuac ccugcacag ucauuuuac caucucaag auagaugu auguaggggg 2280
 60 gguugagcac aggcucacgg ccgcaugcaa cuucacugc ggggaucgu gcgacuugga 2340
 ggacagggac aggagucagc ugucuccucu guugcacucu accacggaau gggccauccu 2400

65

ES 2 346 326 T3

gcccugcacc uacucagacu uacccgcuuu gucaacuggu cuucuccacc uucaccagaa 2460
 5 caucguggac guacaauaca uguauggccu cucaccugcu aucacaaaau acgucguucg 2520
 augggagugg gugguacucu uauuccugcu cuuagcggac gccagagucu gcgccugcuu 2580
 guggaugcuc aucuuguugg gccaggccga agcagcauug gagaaguugg ucgucuugca 2640
 10 cgcugcgagu ggggcuaacu gccauggccu ccuaauuuuu gccaucuucu ucguggcagc 2700
 uuggcacauc aggggucggg ugguccccuu gaccaccuau ugccucacug gccuauggcc 2760
 15 cuucugccua cugcucaugg cacugccccg gcaggcuuau gccuaugacg caccugugca 2820
 cggacagaua ggcguggguu uguugauuuu gaucaccuc uucacacuca ccccggggua 2880
 20 uaagaccuc cucggccagu gucuguggug guugugcuau cuccugaccc ugggggaagc 2940
 caugauucag gaguggguac caccacugca ggugcgcggc ggccgcgaug gcaucgcgug 3000
 ggccgucacu auauucugcc cggguguggu guuugacauu accaaauggc uuuuggcguu 3060
 25 gcuugggccu gcuuaccucu uaaggccgc uuugacacau gugccguacu ucgucagagc 3120
 ucacgcucug auaaggguau gcgcuuuggu gaagcagcuc gcggggggua gguauguua 3180
 30 gguggcgcua uuggcccuug gcagguggac uggcaccuac aucuaugacc accucacacc 3240
 uaugucggac ugggccgcua gcggccugcg cgacuuaagc gucgccgugg aaccacau 3300
 35 cuucaguccg auggagaaga aggucaucgu cuggggagcg gagacggcug caugugggga 3360
 cauucuacau ggacuucccg uguccgcccg acucggccag gagauccucc ucggcccagc 3420
 ugauggcuac accuccaagg gguggaagcu ccuugcucc aucacugcuu augcccagca 3480
 40 aacacgaggc cuccugggcg ccuauuggu gaguaugacg gggcgugaca ggacagaaca 3540
 ggccggggaa guccaaauc uguccacagu cucucagucc uuccucggaa caaccaucuc 3600
 45 ggggguuuug uggacuguuu accacggagc uggcaacaag acucuagccg gcuuacgggg 3660
 uccggucacg cagauguacu cgagugcuga gggggacuug guaggcuggc ccagcccccc 3720
 50 ugggaccaag ucuuuggagc cgugcaagug uggagccguc gaccuauauc uggucacgcg 3780
 gaacgcugau gucaucccg cucggagacg cggggacaag cggggagcau ugucucuccc 3840
 gagaccuau ucgaccuuga agggguccuc gggggggccg gugcucugcc cuaggggcca 3900
 55 cgucguuggg cucuuccgag cagcugugug cucucggggc guggccaaau ccaucgauuu 3960
 cauccccguu gagacacucg acguuguuac aaggucucc acuuucagug acaacagcac 4020
 60 gccaccggcu gugccccaga ccuaucaggu cggguacuug caugcuccaa cuggcagugg 4080
 aaagagcacc aagguccug ucgcguagc cgcccagggg uacaaaguac uagugcuuaa 4140
 65

ES 2 346 326 T3

cccucgguu gcuagccaccc ugggguuugg ggcguaccua uccaaggcac auggcaucaa 4200
 ucccaacauu aggacuggag ucaggaccgu gaugaccggg gaggccauca cguacuccac 4260
 5 auauaggcaaa uuucucgccg auggggggug cgcuagcggc gccuauagaca ucaucauauug 4320
 cgaugaaugc cacgcugugg augcuaccuc cauucucggc aucggaacgg uccuugauca 4380
 10 agcagagaca gccgggguca gacuaacugu gcuggcuacg gccacacccc ccgggucagu 4440
 gacaaccccc caucccgaua uagaagaggu aggccucggg cgggaggggug agauctccuu 4500
 15 cuauaggagg gcgauucucc uaucugcau caaggaggagg agacaccuga uuuucugcca 4560
 cucaaagaaa aagugugacg agcucgcggc ggcccuucgg ggcaugggcu ugaauagccgu 4620
 ggcauacuau agaggguugg acgucuccau aaauaccagcu caggagagau ugguggucgu 4680
 20 cgccaccgac gcccucauga cggggguacac uggagacuuu gacuccguga ucgacugcaa 4740
 uguagcgguc acccaagcug ucgacuucag ccuggacccc accuucacua uaaccacaca 4800
 25 gacuguccca caagacgcug ucucacgcag ucagcggcgc gggcgcacag guagaggaag 4860
 acagggcacu uauagguau uuuccacugg ugaacgagcc ucaggaaugu uugacagugu 4920
 30 agugcuuugu gagugcuacg acgcaggggc ugcugguuac gaucucacac cagcggagac 4980
 caccgucagg cuuagagcgu auuucaacac gcccggccua cccguguguc aagaccaucu 5040
 ugaauuuugg gaggcaguuu ucaccggccu cacacacaua gacggccacu uccucuccca 5100
 35 aacaaagcaa gcgggggaga acuucgcgua ccuaguagcc uaccaagcua cggugugcgc 5160
 cagagccaag gcccucuccc cguccuggga cgccaugugg aagugccugg cccgacucua 5220
 40 gccuacgcuu gcggggccca caccucuccu guaccguuug ggcccuauua ccauagaggu 5280
 caccucaca caccugggga cgaaguacau cgccacaugc augcaagcug accuagaggu 5340
 45 caugaccagc acgugggucc uagcuggagg aguuccggca gccgucgccg cauauugccu 5400
 ggcgacugga ugcguuucca ucaucggccg cuugcacguc aaccagcgag ucgucguugc 5460
 gccggauaag gagguccugu augaggcuuu ugaugagauug gaggaauagc ccucuagggc 5520
 50 ggcucucauc gaagaggggc agcggauagc cgagauguug aaguccaaga uccaaggcuu 5580
 gcugcagcag gccucuaagc agggccagga cauacaaccc gcuauagcag cuucauggcc 5640
 55 caaaguggaa caauuuuggg ccagacacau guggaacuuc auuagcggca uccaauaccu 5700
 cgaggaugu ucaacacugc cagggaaccc cgcgguugcu uccaugaugg cauucagugc 5760
 60 cgccucacc aguccguugu cgaccaguac caccauccuu cucaacauca ugggaggcug 5820
 guuagcgucc cagaucgcac caccgcggg ggccaccggc uuugucguca guggccuggu 5880

65

ES 2 346 326 T3

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65

gggggcugcc gugggcagca uaggccuggg uaaggugcug guggacaucc uggcaggaua 5940
 uggugcgggc auuucggggg ccucugucgc auucaagauc augucuggcg agaagcccuc 6000
 uauggaagau gucaucaauc uacugccugg gaucugucu ccgggagccc uggugguggg 6060
 ggucaucugc gcggccauuc ugcgccgcca cgugggaccg ggggagggcg cgguccaau 6120
 gaugaacagg cuuauugccu uugcuuccag aggaaaccac gucgcuccua cucacuacgu 6180
 gacggagucg gaugcgucgc agcgugugac ccaacuacuu ggcucucua cuauaaccag 6240
 ccuacucaga agacuccaca auuggauaac ugaggacugc cccauccau gcuccggauc 6300
 cuggcuccgc gacguguggg acuggguuug caccaucuu acagacuua aaaauggcu 6360
 gaccucuaaa uuguucccca agcugcccg ccucccuuc aucucuuugc aaaaggggua 6420
 caagggugug ugggccggca cuggcaucau gaccacgcgc ugcccuugc gcgccaacau 6480
 cucuggcaau guccgccugg gcucuaugag gaucacaggg ccuaaaaccu gcaugaacac 6540
 cuggcagggg accuuuccua ucaauugcua cacggagggc cagugcgcg cgaaaccccc 6600
 cacgaacuac aagaccgcca ucuggagggu ggcggccucg gaguacgcgg aggugacgca 6660
 gcaugggucg uacuccuaug uaacaggacu gaccacugac aaucugaaaa uuccuugcca 6720
 acuaccuucu ccagaguuuu ucuccugggu ggacggugug cagauccaua gguuugcacc 6780
 cacaccaaag ccguuuuucc gggaugaggu cucguucugc guugggcuaa auuccuaugc 6840
 ugucgggucc cagcuuccu gugaaccuga gcccgacgca gacguauuga gguccaugcu 6900
 aacagaucgg ccccaucau cggcggagac ugcggcgcg cgcuuggcac ggggaucacc 6960
 uccaucugag gcgagcuccu cagugagcca gcuaucagca ccgucgcugc gggccaccug 7020
 caccacccac agcaacaccu augacuguga cauggucgau gccaacccugc ucauggaggg 7080
 cgguguggcu cagacagagc cugaguccag ggugcccguu cuggacuuc ucgagccaa 7140
 ggccgaggaa gagagcgacc uugagcccuc aaauaccauc gagugcaugc ucccaggag 7200
 cggguuucca cgggccuuac cggcuugggc acggccugac uacaacccgc cgcucugga 7260
 aucguggagg aggccagauu accaaccgcc caccguugcu gguugugcuc ucccccccc 7320
 caagaaggcc ccgacgccuc ccccaaggag acgccggaca gugggucuga gcgagagcac 7380
 cauaucagaa gcccuccagc aacuggccau caagaccuuu ggccagcccc ccucgagcgg 7440
 ugaucaggc ucguccacgg gggcgggcg cgccgaaucc ggcgguccga cgucuccug 7500
 ugagccggcc ccucagaga cagguuccgc cuccuuaug cccccucg agggggagcc 7560
 uggagaucgg gaccuggagu cugaucaggu agagcuucaa ccucccccc aggggggggg 7620

ES 2 346 326 T3

5 gguagcuccc gguucgggcu cgggggucuug gucuacuugc uccgaggagg acgauaccac 7680
 cgugugcugc uccaugucau acuccuggac cgggggcucua auaacucccu guagccccga 7740
 agaggaaaag uugccaaUCA acccuuugag uaacucgcug uugcgauacc auaacaaggu 7800
 guacuguaca acaucaaaaga gcgccucaca gagggcuaaa aagguaacuu uugacaggac 7860
 10 gcaagugcuc gacgcccAUU augacucagu cuuaaaggac aucaagcuag cggcuuccaa 7920
 ggucagcgca aggcuccuca ccuuggagga ggcgugccag uugacuccac cccauucugc 7980
 15 aagauccaag uauggauucg gggccaagga gguccgcagc uuguccggga gggccguuaa 8040
 ccacaucaag uccgugugga aggaccuccu ggaagacca caaacaccaa uucccacaac 8100
 20 caucauggcc aaaaaugagg uguucugcgu ggaccccgc aaggggggua agaaaccagc 8160
 ucgccucauc guuuaccucg accucggcgu ccgggucugc gagaaaugg cccucuauga 8220
 cauucacaa aagcuuccuc aggcgguaau gggagcuucc uauggcuucc aguacucccc 8280
 25 ugcccaacgg guggaguauc ucuugaaagc augggcgga aagaaggacc ccauggguuu 8340
 uucguaugau acccgauGCU ucgacucaac cgucacugag agagacauca ggaccgagga 8400
 30 guccauauac caggccugcu ccugcccga ggaggccgc acugccauac acucgcugac 8460
 ugagagacuu uacguaggag ggcccAuguu caacagcaag ggucAAaccu gcgguuacag 8520
 35 acguugccgc gccagcgggg ugcuaaccac uagcaugggu aacaccauca caugcuangu 8580
 gaaagcccua gcggccugca aggcugcggg gauaguugc cccacaAugc ugguaugcgg 8640
 cgaugaccua guagucaucu cagaaagcca ggggacugag gaggacgagc ggaaccugag 8700
 40 agccuucacg gaggccauga ccagguacuc ugccccuccu ggugaucucc ccagaccgga 8760
 auaugaccug gagcuauaa cauccuguuc cucaaAugu ucuguggcgu uggggccgcg 8820
 45 gggccgccgc agauacuacc ugaccagaga cccaaccacu ccacucgcc gggcugccug 8880
 ggaaacaguu agacacuccc cuaucaauuc auggcuggga aacaucaucc aguauGCUCC 8940
 50 aaccauaugg guucgcaugg uccuaAugac acacuucuu uccauucua ugguccaaga 9000
 caccucggac cagaaccuca acuuugagau guauggauca guauacuccg ugaauccuuu 9060
 ggaccuucca gccauaaUUG agagguuaca cgggcuugac gccuuuuua ugcacacaua 9120
 55 cucucaccac gaacugacgc ggguggcuuc agcccucaga aaacuugggg gccaccccu 9180
 caggguugg aagagucggg cucgcgcagu cagggcgucc cucaucuccc guggagggaa 9240
 60 agcggccguu ugcggccgau aucucucaa uugggcggug aagaccaagc ucaaacucac 9300
 uccauugccg gaggcgcgcc uacuggacuu auccaguugg uucaccguc gcgccggcgg 9360
 65

ES 2 346 326 T3

gggcgacauu uuucacagcg ugucgcgcgc ccgaccccg ccauuacucu ucggccuacu 9420
 ccuacuuuuc guagggguag gccucuuccu acuccccgcu cgguagagcg gcacacacua 9480
 5 gguacacucc auagcuaacu guuccuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 9540
 uuuuuuuucu uuuuuuuuuu uuucccucu ucuucccuuc ucaucuuauu cuacuuucu 9600
 10 ucuugguggc uccaucuuag ccuagucac ggcuagcugu gaaagguccg ugagccgcgu 9660
 gacugcagag agugccguaa cuggucucuc ugcaucau gucuaga 9707
 15 <210> 13
 <211> 11111
 <212> ARN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: replicón de ARN que comprende el ARN genómico del virus de la
 hepatitis C de longitud completa derivado del clon JFH-1
 25 <400> 13
 accugccccc aauaggggag acacuccgcc augaauacuu cccugugag gaacuacugu 60
 30 cuucacgcag aaagcgccua gccauggcgu uaguaugagu gucguacagc cuccaggccc 120
 ccccuucccg ggagagccau aguggucugc ggaaccggug aguacaccgg aaugccggg 180
 35 aagacugggu ccuuucuuug auaaaaccac ucuaugcccg gccauuuggg cgugcccccg 240
 caagacugcu agccgaguag cguuggguug cgaaaggccu ugugguacug ccugauaggg 300
 cgcugcgag ugccccggga ggucucguag accgugcacc augagcaca auccuaaacc 360
 40 ucaaagaaaa accaaaagaa acaccaaccg ucgcccuaug auugaacaag auggauugca 420
 cgcagguucu ccggccgcuu ggguggagag gcuauucggc uaugacuggg cacaacagac 480
 45 aaucggcugc ucugaugccg ccguguuccg gcugucagcg caggggcgcc cgguuuuuu 540
 ugucaagacc gaccuguccg gugcccugaa ugaacugcag gacgaggcag cgcggcuau 600
 50 guggcuggcc acgacgggag uuuccuugcg agcugugcuc gacguuguca cugaagcggg 660
 55
 60
 65

ES 2 346 326 T3

aagggacugg cugcuauugg gegaagugcc ggggcaggau cuccugucan cucaccuugc 720
 uccugcccgag aaaguaacca ucauggcuga ugcaaugcgg cggcugcaua cgcuugaucc 780
 5 ggcuaaccugc ccuucgacc accaagcgaa acaucgcauc gagcgagcac guacucggau 840
 ggaagccggg cuugucgauc aggaugaucu ggacgaagag caucaggggc ucgcgccagc 900
 10 cgaacugunc gccaggcua aggcgcgcac gcccgcggc gaggauucg ucgugacca 960
 uggcgaugcc ugcugccga auaucauggu ggaaaauggc cgcuuuucug gauucaucga 1020
 15 cuguggccgg cugggugugg cggaccgca ucaggacaua gcguuggcua cccugauau 1080
 ugcugaagag cuuggcggcg aaugggcuga ccgcuccuc gugcuuucg guaucgccgc 1140
 20 ucccgauucg cagcgcaucg ccuucuaucg ccuucucgac gaguucucu gaguuuaac 1200
 ccucuccuc cccccccu aacguuacug gccgaagccg cuuggaauaa ggccggugug 1260
 cguuugucua uauguuuuu uccaccuau ugccgucuuu uggcaaugug agggcccga 1320
 25 aaccuggccc ugucucucg acgagcauc cuagggguc uuccccucg gccaaaggaa 1380
 ugcaagguc guugaauguc gugaaggag caguuccuc ggaagcuuc ugaagacaaa 1440
 30 caacgucug agcgaccuu ugcaggcagc ggaaccccc accuggcgac agguccuc 1500
 gcggccaaa gccacguga uaagauacac cugcaaaggc ggcacaacc cagugccacg 1560
 35 uugugagug gauaguug gaaagaguc aauggcuc cucaagcga uucaacaagg 1620
 ggcugaagga ugcccagaag guaccccau guaugggauc ugaucugggg ccucggugca 1680
 caugcuuac auguguuuag ucgagguua aaaaacguc agggccccc aaccacgggg 1740
 40 acgugguuu ccuugaaaa acacgaugau accaugagca caauccuaa accucaaaga 1800
 aaaacaaaa gaaacaccaa ccgucgcca gaagacguu aguucccggg cggcgccag 1860
 45 aucguuggcg gaguauacu guugccgcgc aggggcccc gguugggugu gcgcacgaca 1920
 aggaaaacuu cggagcgguc ccagccacgu gggagacgcc agcccaucc caaagaucgg 1980
 50 cgcuccacug gcaaggccug gggaaaacca ggucgcccc ggccccuaa ugggaaugag 2040
 ggacucggcu gggcaggau gcuccuguc ccccgaggcu ucgccccuc cuggggcccc 2100
 acugacccc ggcauagguc gcgcaacgug gguaaaguc ucgacaccu aacguguggc 2160
 55 uuugccgac ucauggggua caucccguc guaggcgccc cgcuuagugg cgcgccaga 2220
 gcugucgcgc acggcgugag aguccggag gacgggguu auuaugcaac aggggaaccua 2280
 60 cccgguuuc ccuuuucua cuucucguc gccugugug ccugcaucac cguuccgguc 2340
 ucugucgcc aggugaagaa uaccaguag agcuacaugg ugaccauga cugcucaau 2400
 65

ES 2 346 326 T3

5 gagagagugg ggaauacguc acgguguugg gugccagucu cgccaaacau ggcugugcgg 2520
 cagcccggug ccucacgca gggucugcgg acgcacaucg auaugguugu gauguccgcc 2580
 10 accuucugcu cugcucucua cgugggggac cucugugcgg gggugaugcu cgcggcccag 2640
 guguucaucg ucucgccgca guaccacugg uuugugcaag aaugcaauug cuccaucuaac 2700
 ccuggcacca ucacuggaca ccgcauggca ugggacauga ugaugaacug gucgcccacg 2760
 15 gccaccauga uccuggegua cgugaugcgc guccccgagg ucaucauaga caucguuagc 2820
 ggggcucacu ggggcgucan guucggcuug gccuacuucu cuaugcaggg agcgugggcg 2880
 20 aaggucuuug ucauccuucu gcuggccgcu gggguggacg cgggcaccac caccguugga 2940
 ggcgcuguug cacguuccac caacgugauu gccggcgugu ucagccaugg ccucagcag 3000
 aacauucagc ucauaaacac caacggcagu uggcacaucac accguacugc cuugaauugc 3060
 25 aaugacuccu ugaacaccgg cuuucucgcg gccuuguucu acaccaaccg cuuuaacucg 3120
 ucaggguugc cagggcgccu guccgccugc cgcaacaucg aggcuuuccg gauaggguug 3180
 30 ggcacccuac aguacgagga uaaugucacc aaucagagg auaugaggcc guacugcugg 3240
 cacuaccccc caaagccgug uggcgugagc cccgcgaggu cugugugugg ccaguguaac 3300
 35 uguuucaccc ccagcccggg aguagugggc acgaccgaca gacguggagu gcccaccuac 3360
 acauggggag agaaugagac agaugucuuu cuacugaaca gcacccgacc gccgcagggc 3420
 ucaugguucg gcugcacgug gaugaacucc acugguuua ccaagacuug uggcgcgcca 3480
 40 ccuugccgca ccagagcuga cuucaacgcc agcacggacu uguugugccc uacggauugu 3540
 uuuaaggaagc auccugaugc cacuuauuu aagugugguu cuggggccug gcucacacca 3600
 45 aagugccugg uccacuaccc uuacagacuc uggcauuacc ccugcacagu cauuuuuacc 3660
 aucuucaaga uaagaugua uguagggggg guugagcaca ggcucacggc cgcaugcaac 3720
 50 uuacucugug gggaucgug cgacuuggag gacagggaca ggagucagcu gucuccucug 3780
 uugcacucua ccacggaaug ggccauccug ccugcaccu acucagacuu acccgcuuug 3840
 ucaacugguc uuuccaccu ucaccagaac aucguggacg uacaauacau guauggccuc 3900
 55 ucaccugcua ucacaaaaua cgucguucga ugggaguggg ugguacucuu auuccugcuc 3960
 uuagcggacg ccagagucug cgccugcuug uggaugcua ucuuguuggg ccaggccgaa 4020
 60 gcagcauugg agaaguuggu cgucuuacg gcugcgagug cggcuacug ccauggccuc 4080
 cuauuuuuug ccaucuuuuu cguggcagcu uggcacaucac ggggucgggu ggucuccuug 4140

65

ES 2 346 326 T3

accaccuauu gccucacugg ccuauaggccc uucugccuac ugcucauggc acugccccgg 4200
 caggcuuauug ccuauagacgc accugugcac ggacagauag gcguggguuu guugauauug 4260
 5 aucaccucuc ucacacucac cccggggguau aagaccucc ucggccagug ucuguggugg 4320
 uuugucuauc uccugacccu gggggaagcc augauucagg aguggguacc acccaugcag 4380
 10 gugcgcgcg gccgcgaugg caucgcgugg gccgucacua uauucugccc ggguguggug 4440
 uuugacauua ccaaauaggcu uuuggcgung cuugggcug cuuaccucuu aagggccgcu 4500
 15 uuagacacau ugccguacuu cgucagagcu cagcucuga uaaggguaug cgcuuuggug 4560
 aagcagcucg cggggggguag guauguucag guggcgcuau uggcccuugg cagguggacu 4620
 ggcaccuaca ucuauagacca ccucacaccu augucggacu gggccgcuag cggccugcgc 4680
 20 gacuuagcgg ucgccgugga acccaucauc uucaguccga uggagaagaa ggucaucguc 4740
 uggggagcgg agacggcugc auguggggac auucuaacug gacuucccgu guccgccga 4800
 25 cucggccagg agauccuccu cggcccagcu gauggcuaca ccuccaaggg guggaagcuc 4860
 cuugcuccca ucacugcuua ugcccagcaa acacgaggcc uccugggcgc cauaguggug 4920
 30 aguaugacgg ggcgugacag gacagaacag gccggggaag uccaaauccu guccacaguc 4980
 ucucaguccu uccucggaac aaccaucucg gggguuuugu ggacuguuua ccacggagcu 5040
 ggcaacaaga cucuagccgg cuuacggggu ccggucacgc agauguacuc gagugcugag 5100
 35 ggggacuugg uaggcuggcc cagcccccuc gggaccaagu cuuuggagcc gugcaagugu 5160
 ggagccgucg accuauaucu ggucacgcgg aacgcugaug ucaucccgcc ucggagacgc 5220
 40 ggggacaagc ggggagcauu gcucucuccg agaccuauu cgaccuugaa gggguccucg 5280
 ggggggccgg ugcucugccc uaggggccac gucguugggc ucuuccgagc agcuguguc 5340
 45 ucucggggcg uggccaaau ccaugauuuc auccccguug agacacucga cguuguuaca 5400
 agguucucca cuuucaguga caacagcacg ccaccggcug ugcccagac cuaucagguc 5460
 50 ggguaucugc auguccaac uggcagugga aagagcacca agguccugc cgcgauagcc 5520
 gccaggggu acaaaguacu agugcuuaac ccucgguag cugccaccu gggguuugg 5580
 gcguaccuau ccaaggcaca uggaucuuu ccaacauua ggacuggagu caggaccgug 5640
 55 augacgggg aggccauac guacuccaca uauggcaau uucucgccga ugggggcugc 5700
 gcuagcggcg ccuauagacu caucuaugc gaugaaugcc acgcugugga ugcuaucucc 5760
 60 auucucggca ucggaacggc ccuugaucaa gcagagacag ccggggucag acuaacugug 5820
 cuggcuacgg ccacaccccc cgggucagug acaaccccc aucccgauau agaagaggua 5880

65

ES 2 346 326 T3

gggcucgggc gggaggguga gaucccccuc uauaggaggagg cgauuccccu auccugcauc 5940
 aaggaggaggga gacaccugau uuucugccac ucaaagaaaa agugugacga gcucgcggcg 6000
 5 gcccucgggc gcaugggcuu gaaugccgug gcauacuaua gagggguugga cgucuccaua 6060
 auaccagcuc agggagaugu gguggucguc gccaccgacg ccuucaugac gggguacacu 6120
 10 ggagacuug acuccugau cgacugcau guagcgguca cccaagcugu cgacuucage 6180
 cuggacccca ccuucacuau aaccacacag acugucccac aagacgcugu cucacgcagu 6240
 15 cagcgccgc ggcgcacagg uagaggaaga cagggcacuu auagguangu uuccacuggu 6300
 gaacgagccu caggaauguu ugacagugua gugcuuugug agugcuacga cgcaggggcu 6360
 gcgugguacg aucucacacc agcggagacc accgucaggc uuagagcgua uucaaacacg 6420
 20 cccggccuac ccgugugua agaccaucuu gaauuuuggg aggcaguuu caccggccuc 6480
 acacacauag acgcccacuu ccucuccaa acaaagcaag cgggggagaa cuucgcguac 6540
 25 cuaguagccu accaagcuac ggugugcgcc agagccaagg cccuuccccc guccugggac 6600
 gccaugugga agugccuggc ccgacucaag ccuacguug cgggccccac accucuccug 6660
 30 uaceguuugg gccuauuac caaugagguc accucacac acccugggac gaaguacauc 6720
 gccacaugca ugcaagcuga ccuugagguc augaccagca cguggguccu agcuggagga 6780
 guccuggcag ccgucgcgc auauugccug gcgacuggau gcguuuccau caucggccgc 6840
 35 uugcacguca accagcgagu cgucguugc ccggauaagg agguccugua ugaggcuuuu 6900
 gaugagaugg aggaaugcgc cucuagggcg gcucucaucg aagaggggca gcggauagcc 6960
 40 gagauguuga aguccaagau ccaaggcuug cugcagcagg ccucuaagca ggcccaggac 7020
 auacaacccg cuaugcaggc uucauggccc aaaguggaac aauuuugggc cagacacaug 7080
 45 uggaacuua uuagcggcau ccaauaccuc gcaggauugu caacacugcc aggaacccc 7140
 gcgguggcuu ccaugauggc auucagugcc gccucacca guccguugc gaccaguacc 7200
 accauccuuc ucaacaucau gggaggcugg uuagcguccc agaucgcacc acccgcgggg 7260
 50 gccaccggcu uugucguacg ugccugug gggcgugccg uggcagcau aggcuggggu 7320
 aaggugcugg uggacaucuu ggcaggauau ggugcgggca uuucgggggc ccucgucga 7380
 55 uucaagauca ugucuggcga gaagcccucu auggaagaug ucaucaucu acugccuggg 7440
 auccugucuc cgggagcccu gguggugggg gucaucugcg cggccauucu gcgcgccac 7500
 60 gugggaccgg gggagggcgc gguccaugg augaacaggc uuauugccu ugcuccaga 7560
 ggaaaccacg ucgcccucac ucacuacug acggagucgg augcgucga gcgugugacc 7620

65

ES 2 346 326 T3

caacuacuug gcucucuuac uauaaccagc cuacucagaa gacuccacaa uuggauaacu 7680
 gaggacugcc ccaucccaug cuccggaucc uggcuccgcg acguguggga cuggguuugc 7740
 5 accaucuuga cagacuucac aaauuggcug accucuaaa uguuccccaa gcugcccggc 7800
 cuccccuucac ucucuuugca aaagggguac aagggugugu gggccggcac uggcaucaug 7860
 10 accacgcgcg gcccuugcgg cgccaacauc ucuggcaaug uccgccuggg cucuaugagg 7920
 aucacagggc cuaaaaccug caugaacacc uggcagggga ccuuuccuau caauugcuac 7980
 15 acggaggggc agugcgcgcc gaaaccccc acgaacuaca agaccgccau cuggagggug 8040
 gcggccucgg aguacgcgga ggugacgcg cauggguugu acuccuangu aacaggacug 8100
 accacugaca aucugaaaau uccuugccaa cuaccuucuc cagaguuuuu cuccugggug 8160
 20 gacggugugc agauccauag guuugcacc acaccaagc cguuuuuccg ggauaggugc 8220
 ucguucugcg uugggcuuaa uuccuangu gucggguccc agcuucccug ugaaccugag 8280
 25 cccgacgcag acguauugag guccaugcua acagauccgc ccacaucac ggcgagacu 8340
 gcggcgcgcc gcuuugcacg gggaucaccu ccaucugagg cgagcuccuc agugagccag 8400
 cuaucagcac cgucgcugcg ggccaccugc accaccaca gcaacaccua ugacguggac 8460
 30 auggucgaug ccaaccugcu cauggagggc gguguggcuc agacagagcc ugaguccagg 8520
 gugcccguc uggacuucuu cgagccaaug gccgaggaag agagcgaccu ugagccuua 8580
 35 auaccaucgg agugcaugcu cccagggagc ggguuuccac gggccuacc ggcuugggca 8640
 cggccugacu acaaccgcc gcucugggaa ucguggagga ggccagauua ccaaccgcc 8700
 40 accguugcug guugugcucu ccccccccc aagaaggccc cgacgccucc ccaaggaga 8760
 cgccggacag ugggucugag cgagagcacc auaucagaag ccuccagca acuggccauc 8820
 45 aagaccuuug gccagcccc cucgagcggu gaugcaggcu cguccacggg ggcgggcgcc 8880
 gccgaauccg gcgguccgac guccccuggu gaggcgccc ccucagagac agguuccgcc 8940
 50 uccucuaugc cccccucga gggggagccu ggagauccgg accuggaguc ugaucaggua 9000
 gagcuuaac cccccccca gggggggggg guagucuccg guucgggcuc ggggucuuug 9060
 ucuacuugcu ccgaggagga cgauaccacc gugugcugcu ccaugucua cuccuggacc 9120
 55 ggggcucuaa uaacucccug uagccccga gaggaaaagu ugccaaucac ccuuugagu 9180
 aacucgcugu ugcgauacca uaacaaggug uacuguacaa caucaagag cgccucacag 9240
 60 agggcuaaaa agguaacuuu ugacaggacg caagugcugc agcccuaa ugacucaguc 9300
 uuaaaggaca ucaagcuagc ggcuuccaag gucagcgca ggcuccucac cuuggaggag 9360

65

ES 2 346 326 T3

gcgugccagu ugacuccacc ccuucugca agauccaagu auggauucgg ggccaaggag 9420
 guccgcagcu uguccgggag ggccguuaac cacaucaagu ccguguggaa ggaccuccug 9480
 5 gaagacccac aaacaccaau ucccacaacc aucauggcca aaaaugaggu guucugcgug 9540
 gaccccgcca agggggguaa gaaaccagcu cgcucaucg uuuaccuga ccucggcguc 9600
 10 cgggucugcg agaaauggc ccucuaugac auuacacaaa agcuuccuca ggcgguuaug 9660
 ggagcuuccu auggcuucca guacucccu gcccaacggg uggaguaucu cuugaaagca 9720
 15 Ugggcggaaa agaaggacc ccuugguuuu ucguaugaua ccggaugcuu cgacucaacc 9780
 gucacugaga gagacaucag gaccgaggag uccauauacc aggcugcuc ccugcccgag 9840
 20 gagcccgca cugccauaca cugcugacu gagagacuuu acguaggagg gcccauguuc 9900
 aacagcaagg gucaaaccug cgguuacaga cguugcccg ccagcggggg gcuaaccacu 9960
 agcaugggua acaccaucac augcuauug aaagcccuag cggccugcaa ggcugcgggg 10020
 25 auaguugcg ccacaugcu gguaugcggc gaugaccuag uagucaucuc agaaagccag 10080
 gggacugagg aggacgagc gaaccugaga gccuucacgg aggcgaugac cagguacucu 10140
 30 gcccuccug gugaucuccc cagaccggaa uaugaccugg agcuauaac auccuguucc 10200
 ucaaauugu cuguggcguu gggcccgcg ggccgcgca gauacuaccu gaccagagac 10260
 35 ccaaccacuc cacucgccg ggcugccugg gaaacaguua gacacuccc uaucaauuca 10320
 uggcugggaa acaucaucca guaugcuca accauauggg uucgcauggu ccuaaugaca 10380
 cacuucucu ccuucucuu gguccaagac acccuggacc agaaccuca cuuugagaug 10440
 40 uauuggaucag uauacuccg gaauccuuug gaccuuccag ccuaauuga gagguuacac 10500
 gggcuugacg ccuuuucuu gcacacauac ucucaccacg aacugacgg gguggcuuca 10560
 45 gccucagaa aacuuggggc gccacccuc agggugugga agagucggg ucgcgcaguc 10620
 agggcguccc ucaucuccg uggagggaaa gcggccguuu gggccgaa ucucuucuu 10680
 50 ugggcgguga agaccaagcu caaacucacu ccuugccgg aggcgcgcu acuggacuua 10740
 uccaguuggu ucaccgucgg cgcggcggg ggcgacuuu uucacagcgu gucgcgcgc 10800
 55 cgaccccgcu cauucucuu cgccuacuc cuacuuuucg uaggguagg ccucuccua 10860
 cucccguc gguagagcg cacacacuag guacacucca uagcuaacug uuccuuuuu 10920
 uuuuuuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuuu uuccucuuu 10980
 60 cuuccuucu caucuauuc uacuucuuu cuuggugcu ccuucuuagc ccuagucag 11040
 gcuagcugug aaaggucgu gagccgaug acugcagaga gugccguaac uggucucucu 11100
 65 gcagauaug u 11111

ES 2 346 326 T3

<210> 14

<211> 11111

<212> ARN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: ARN genómico del virus de la hepatitis C de longitud completa derivado del clon JFH-1, en el que el motivo GDD de aminoácidos se ha mutado en GND

10

<400> 14

accugccccc aauaggggcg acacuccgcc augaaucacu cccugugag gaacuacugu 60
 15 cuucacgcag aaagcgccua gccauggcgu uaguaugagu gucguacagc cuccaggccc 120
 ccccccuccg ggagagccau aguggucugc ggaaccggug aguacaccgg aaugccggg 180
 20 aagacugggu cccuucugg auaaaccac ucuaugccg gccauuuggg cgugcccccg 240
 caagacugcu agccgaguag cguuggguug cgaaaggccu ugugguacug ccugauaggg 300
 cgcuugcgag ugccccggga ggucucguag accgugcacc augagcaca auccuaaacc 360
 25 ucaaagaaaa accaaaagaa acaccaaccg ucgcccraag auugaacaag auggauugca 420
 cgcagguucu ccggccgcuu ggguggagag gcuaauccgc uaugacuggg cacaacagac 480
 30 aaucggcugc ucugaugccg ccguguuccg gcugucagcg cagggggcgc cgguucuuuu 540
 ugucaagacc gaccuguccg gugcccugaa ugaacugcag gacgaggcag cgcggcuau 600
 35 guggcuggcc acgacgggcg uuccuugcgc agcugugcuc gacguuguca cugaagcggg 660
 aagggacugg cugcuauugg gcgaagugcc ggggcaggau cuccugucau cucaccuugc 720
 40 uccugccgag aaaguaucca ucauggcuga ugcaaugcgg cggcugcaua cgcuuugauc 780
 ggcuaccugc ccauucgacc accaagcgaa acaucgauc gagcgagcac guacucggau 840
 45 ggaagccggu cuugucgauc aggaugaucu ggacgaagag caucaggggc ucgcgccagc 900

50

55

60

65

ES 2 346 326 T3

cgaacuguuc gccaggcuca aggcgcgcgau gcccgcgcgc gaggaucucg ucgugaccca 960
 5 uggcgaugcc ugcuugccga auaucauggu ggaaaauggc cgcuuuucug gauucaucga 1020
 cuguggccgg cugggugugg cggaccgcua ucaggacaua gcguuggcua cccgugauau 1080
 ugcugaagag cuuggcggcg aaugggcuga ccgcuccuc guguuuacg guaucgccgc 1140
 10 ucccgaucg cagcgcaucg ccuucuaucg ccuucugac gaguucucu gaguuuaaac 1200
 ccucuccuc ccccccccu aacguuacug gccgaagccg cuuggaauaa ggccggugug 1260
 15 cguuugucua uauguuuuu uccaccauau ugccgucuuu uggcaaugug agggcccgga 1320
 aaccuggccc ugucucucug acgagcauuc cuaggggucu uuccccucuc gccaaaggaa 1380
 20 ugcaaggucu guugaauguc gugaagggaag caguuccuc ggaagcuuc ugaagacaaa 1440
 caacgucugu agcgaccuu ugccaggcgc ggaaccccc accuggcgac aggugccucu 1500
 gcggccaaaa gccacgugua uaagauacac cugcaaaggc ggcacaacc cagugccacg 1560
 25 uugugaguug gauaguugug gaaagaguc aauggcuc cucaagcua uucaacaagg 1620
 ggcugaagga ugcccagaag guaccccau guaugggauc ugaucugggg ccucggugca 1680
 30 caugcuuac auguguuag ucgagguuua aaaaacguc agggccccc aaccacgggg 1740
 acgugguuu ccuuugaaaa acacgaugau accaugagca caaauccua accucaaaaga 1800
 35 aaaacaaaa gaaacaccaa ccgucgcca gaagacgua aguuccggg cggcgccag 1860
 aucguugcg gaguauacu guugccgcgc aggggcccc gguugggugu gcgcacgaca 1920
 aggaaaacu cggagcgguc ccagccacgu gggagacgc agcccaucc caaagaucgg 1980
 40 cgcuccacug gcaaggccug gggaaaacca ggucgcccc ggccccuaua ugggaauag 2040
 ggacucggcu gggcaggaug gcuccugucc ccccgaggcu cugccccuc cuggggcccc 2100
 45 acugacccc ggcauagguc gcgcaacgug gguaaaguc ucgacaccu aacguguggc 2160
 uuugccgacc ucauggggua cauccccguc guaggcgccc cgcuuagug cgcgccaga 2220
 50 gcugucgcgc acggcgugag aguuccggag gacggggua auuaucaac agggaaccua 2280
 cccgguuuc ccuuuucua cuucucugc gcccuugu ccugcaucac cguuccgguc 2340
 ucugucgcc aggugaagaa uaccaguag agcuacaug ugaccauga cuguccaaau 2400
 55 gacagcauca cuuggcagcu cgaggcugcg guucuccac ucccgggug cgucccguc 2460
 gagagagugg ggaauacguc acgguguugg gugccaguc cgccaaacau ggcugugcg 2520
 60 cagcccgug ccucacgca gggucugcg acgcacauc auauuguugu gauguccgc 2580
 accuucugcu cugcucucua cgugggggac cucugggcg gggugaugcu cgcggcccag 2640

65

ES 2 346 326 T3

5 guguucaucg ucucgccgca guaccacugg uuugugcaag aaugcaauug cuccaucuaac 2700
 ccuggcacca ucacuggaca ccgcauggca ugggacauga ugaugaacug gucgcccacg 2760
 gccaccauga uccuggcgua cgugaugcgc gucccccagg ucaucauaga caucguuagc 2820
 10 ggggcucacu ggggcgucan guucggcuug gccuacuucu cnaugcaggg agcgugggcg 2880
 aaggucuuug ucauccuucu gcuggccgcu gggguggacg cgggcaccac caccguugga 2940
 ggcgcuguug cacguuccac caacgugauu gccggcgugu ucagccaugg ccucacagcag 3000
 15 aacauucagc ucauuuacac caacggcagu uggcacauca accguacugc cuugaauugc 3060
 aaugacuccu ugaacaccgg cuuucucgcg gccuuguucu acaccaaccg cuuuacucg 3120
 ucaggguguc cagggcgccu guccgccugc cgcaacaucg aggcuuuccg gauagggugg 3180
 20 ggcacccuac aguacgagga uaaugucacc aauccagagg auaugaggcc guacugcugg 3240
 cacuaccccc caaagccgug uggcguaguc cccgcgaggu cugugugugg ccaguguaac 3300
 25 uguuucaccc ccagcccggg aguagugggc acgaccgaca gacguggagu gcccaccuac 3360
 acauggggag agaauagagc agaugucuc cuacugaaca gcacccgacc gccgcagggc 3420
 30 ucaugguucg gcugcacgug gaugaacucc acugguuua ccaagacuug uggcgcgcca 3480
 ccuugccgca ccagagcuga cuucaacgcc agcacggacu uguugugccc uacggauugu 3540
 35 uuaggaagc auccugaugc cacuuauuu aagugugguu cugggcccug gcucacacca 3600
 aagugccugg uccacuacc uuacagacuc uggcauuacc ccugcacagu caauuuuacc 3660
 40 aucuuaaga uaagaugua uguagggggg guugagcaca ggcucacggc cgcaugcaac 3720
 uuacucugug gggauccgug cgacuuggag gacagggaca ggagucagcu gucuccucug 3780
 uugcacucua ccacggaaug ggccauccug ccugcaccu acucagacuu acccgcuug 3840
 45 ucaacugguc uucuccaccu ucaccagaac aucguggacg uacaauacau guauggccuc 3900
 ucaccugcua ucacaaaaua cgucguucga ugggaguggg ugguacucuu auuccugcuc 3960
 50 uuagcggacg ccagagucug cgccugcuug uggauucua ucuuguuggg ccaggccgaa 4020
 gcagcauugg agaaguuggu cgucuugcac gcugcgagug cggcuaacug ccauggccuc 4080
 55 cuauuuuug ccaucuuuu cguggcagcu uggcacauca ggggucgggu ggucuccuug 4140
 accaccuauu gccucacugg ccuauggccc uucugccuac ugcucauggc acugccccgg 4200
 caggcuuug ccuaugacgc accugucac ggacagauag gcguggguuu guugauuug 4260
 60 aucacccucu ucacacucac cccggggauu aagaccucc ucggccagug ucuguggugg 4320
 uugugcuauc uccugacccu gggggaagcc augauucagg aguggguacc acccaugcag 4380
 65

ES 2 346 326 T3

5 gugcgcgcg gccgcgaugg caucgcgugg gccgucacua uauucugccc ggguguggug 4440
 uuugacauua ccaaauggcu uuuggcguug cuugggccug cuuaccucu aagggccgcu 4500
 10 uugacacaug ugccguacuu cgucagagcu cacgcucuga uaaggguaug cgcuuuggug 4560
 aagcagcucg cggggggguag guauguucag guggcgcuau uggcccuugg cagguggacu 4620
 15 ggcaccuaca ucuaugacca ccucacaccu augucggacu gggccgcuag cggccugcgc 4680
 gacuuaagcgg ucgccgugga acccaucauc uucaguccga uggagaagaa ggucaucguc 4740
 20 uggggagcgg agacggcugc auguggggac auucuacaug gacuucccg guccgcccga 4800
 cucggccagg agauccuccu cggcccagcu gauggcuaca ccuccaaggg guggaagcuc 4860
 cuugcuccca ucacugcuua ugcccagcaa acacgaggcc uccuggggcg cauaguggug 4920
 25 aguaugacgg ggcgugacag gacagaacag gccggggaag uccaaauccu guccacaguc 4980
 ucucaguccu uccucggaac aaccaucucg gggguuuugu ggacuguua ccacggagcu 5040
 30 ggcaacaaga cucuagccgg cuuacggggu ccggucacgc agauguacuc gagucgugag 5100
 ggggacuugg uaggcuggcc cagccccccu gggaccaagu cuuuggagcc gugcaagugu 5160
 35 ggagccgucg accuauaucu ggucacgcgg aacgcugaug ucaucccgcc ucggagacgc 5220
 ggggacaagc ggggagcauu gcucuccccg agaccuauu cgaccuugaa gggguccucg 5280
 40 gggggccgg ugcucugccc uaggggccac gucguugggc ucuuccgagc agcugugugc 5340
 ucucggggcg ugcccaauuc caucgaauuc auccccguug agacacucga cguuguuaca 5400
 45 aggucuccca cuuucaguga caacagcacg ccaccggcug ugccccagac cuaucagguc 5460
 50 ggguaucuug augcucaac uggcagugga aagagcacca agguccug cgcguaugcc 5520
 gccccagggu acaaaguacu agugcuuaac cccucgguag cugccaccu gggguuuggg 5580
 55 gcguaccuau ccaaggcaca uggcaucaau cccaacauua ggacuggagu caggaccgug 5640
 augaccgggg aggccaucac guacuccaca uauggcaau uucucgccga ugggggcugc 5700
 60 gcuagcggcg ccuaugacau caucauugc gaugaaugcc acgcugugga ugcuaaccuc 5760
 auucucggca ucggaacggu ccuugaucaa gcagagacag ccggggucag acuaacugug 5820
 65 cuggcuacgg ccacaccccc cgggucagug acaaccccc aucccgauau agaagaggua 5880
 ggccucgggc gggagggu gaucccuuc uaugggaggg cgauucccu auccugcauc 5940
 aagggaggga gacaccugau uuucugccac ucaaagaaaa agugugacga gcucgcggcg 6000
 70 gcccuucggg gcaugggcuu gaaugccgug gcauacuaua gagggguugga cgucuccaua 6060
 auaccagcuc agggagau gguggucguc gccaccgacg ccuacugac gggguacacu 6120

ES 2 346 326 T3

ggagacuuug acuccgugau cgacugcaau guagcgguca cccaagcugu cgacuucagc 6180
 cuggaccccca ccuucacuaa aaccacacag acugucccac aagacgcugu cucacgcagu 6240
 5 cagcgccgcg ggcgcacagg uagaggaaga cagggcacuu auagguaugu uuccacuggu 6300
 gaacgagccu caggaauguu ugacagugua gugcuuugug agugcuacga cgcaggggcu 6360
 10 gcgugguacg aucucacacc agcggagacc accgucaggc uuagagcgua uuucaacacg 6420
 cccggccuac ccgugugua agaccaucuu gaauuuuggg aggcaguuuu caccggccuc 6480
 15 acacacauag acgcccacuu ccucucccaa acaaagcaag cgggggagaa cuucgcguac 6540
 cuaguagccu accaagcuac ggugugcgcc agagccaagg cccuccccc guccugggac 6600
 gccaugugga agugccuggc ccgacucaag ccuacgcuug cgggccccac accucuccug 6660
 20 uaccguuugg gcccuauuac caaugagguc acccucacac acccugggac gaaguacauc 6720
 gccacaugca ugcaagcuga ccuugagguc augaccagca cguggguccu agcuggagga 6780
 25 guccuggcag ccgucgccgc auauugccug gcgacuggau gcguuuccau caucggccgc 6840
 uugcacguca accagcgagu cgucguugcg ccggauaagg agguccugua ugaggcuuuu 6900
 30 gaugagaugg aggaauagcg cucuagggcg gcucucaucg aagaggggca gcggauagcc 6960
 gagauguuga aguccaagau ccaaggcuug cugcagcagg ccucuaagca ggcccaggac 7020
 35 auacaacccg cuaugcaggc uucauggccc aaaguggaac aaauuugggc cagacacaug 7080
 uggaacuuca uuagcggcau ccaauaccuc gcaggauugu caacacugcc agggaaacccc 7140
 gcgguggcuu ccaugauggc auucagugcc gccuccacca guccguuguc gaccaguacc 7200
 40 accauccuuc ucaacaucau gggaggcugg uuagcguccc agaucgcacc acccgccggg 7260
 gccaccggcu ugucgucag uggccuggug ggggcugccg ugggcagcau aggcucuggu 7320
 45 aaggugcugg uggacauccu ggcaggauau ggugcgggca uuucgggggc ccucgucgca 7380
 uucaagauca ugucuggcga gaagcccucu auggaagau ucuaaauu acugccuggg 7440
 50 auccugucuc cgggagcccu gguggugggg gucaucugcg cggccauucu gcgccgccac 7500
 gugggaccgg gggaggcgcc gguccaauug augaacaggc uuauugccuu ugcuccaga 7560
 ggaaaccacg ugcgccuac ucacuacgug acggagucgg augcgucgca gcgugugacc 7620
 55 caacuacuug gcucucuac uauaaccagc cuacucagaa gacuccaaa uggauaacu 7680
 gaggacugcc ccauccaug cuccggauc ugguccgcg acguguggga cuggguuugc 7740
 60 accaucuuga cagacucaa aaauuggcug accucuaauu uguucccaa gcugcccgcc 7800
 cuccccuua ucucuugua aaagggguac aagggugugu gggccggcac uggaucaug 7860

65

ES 2 346 326 T3

accacgcgcg gcccuugcgg cgccaacauc ucuggcaaug uccgccuggg cucuaugagg 7920
 aucacagggc cuaaaaccug caugaacacc uggcagggga ccuuuccuau caauugcuac 7980
 5 acggagggcc agugcgcgcc gaaaccccc acgaacuaca agaccgccau cuggagggug 8040
 gcggccucgg aguacgcgga ggugacgcag caugggucgu acuccuaugu aacaggacug 8100
 10 accacugaca aucugaaaau uccuugccaa cuaccuucuc cagaguuuuu cuccugggug 8160
 gacggugugc agauccauag guuugcacc acaccaagc cguuuuuccg ggaugagguc 8220
 15 ucguucugcg uugggcuuua uuuccuaugc gucggguccc agcuuccug ugaaccugag 8280
 cccgacgcag acguauugag guccaugcua acagauccgc cccacauac ggcggagacu 8340
 gcggcgcggc gcuuggcacg gggauccacu ccaucugagg cgagcuccuc agugagccag 8400
 20 cuaucagcac cgucgcugcg ggccaccugc accaccaca gcaacaccua ugacuggagc 8460
 auggucgaug ccaaccugcu cauggagggc gguguggcuc agacagagcc ugaguccagg 8520
 25 gugcccguuc uggacuucu cgagccaug gccgaggaag agagcgaccu ugagccuca 8580
 auaccaucgg agugcaugcu ccccaggagc ggguuuccac gggccuucc ggcuuaggca 8640
 30 cggccugacu acaaccgcc gcucguggaa ucguggagga ggcagauua ccaaccgcc 8700
 accguugcug guugugcucu ccccccccc aagaaggccc cgacgccucc cccaaggaga 8760
 35 cgccggacag ugggucugag cgagagcacc auaucagaag ccuuccagca acuggccauc 8820
 aagaccuuug gccagcccc cucgagcggg gaugcaggcu cguccacggg ggcggcgcc 8880
 gccgaauccg gcgguccgac gucccuggu gagccggccc ccucagagac agguuccgcc 8940
 40 uccucuaugc cccccucga gggggagccu ggagauccgg accuggaguc ugaucaggua 9000
 gagcuucaac cucccccca gggggggggg guagcucccg guucgggcuc ggggucuuug 9060
 45 ucuacuugcu ccgaggagga cgauaccacc gugugcugcu ccaugucuaa cuccuggacc 9120
 ggggcucuaa uaacuccug uagccccga gaggaagaug ugccaauca cccuuugagu 9180
 50 aacucgcugu ugcgauacca uaacaaggug uacuguacaa caucaagag cgccucacag 9240
 agggcuaaaa agguaacuuu ugacaggagc caagugcucg acgcccuaa ugacucaguc 9300
 55 uuaaaggaca ucaagcuagc ggcuuccaag gucagcgaa ggcuccucac cuuggaggag 9360
 gcgugccagu ugacuccacc ccauucugca agauccaagu auggauucgg ggccaaggag 9420
 guccgcagcu uguccggag ggccguuac cacaucagu ccguguggaa ggaccuccug 9480
 60 gaagaccac aaacaccau ucccacaacc aucauggcca aaaauagggu guucugcgug 9540
 gacccgccca agggggguua gaaaccagcu cgccucaucg uuuaaccuga ccucggcguc 9600
 65

ES 2 346 326 T3

cgggucugcg agaaaauggc ccucuaugac auuacacaaa agcuuccuca ggcgguaaug 9660
 ggagcuuccu auggcuucca guacucuccu gcccacggg uggaguaucu cuugaaagca 9720
 5 ugggcggaag agaaggaccc cauggguuuu ucguaugaua cccgaugcuu cgacucaacc 9780
 gucacugaga gagacaucau gaccgaggag uccauauacc aggccugcuc ccugcccag 9840
 10 gagggccgca cugccauaca cucgcugacu gagagacuuu acguaggagg gcccanguuc 9900
 aacagcaagg gucaaaccug cgguuacaga cguugccgcg ccagcggggu gcuaaccacu 9960
 15 agcaugggua acaccaucac augcuauug aaagcccuag cggccugcaa ggcugcgggg 10020
 auaguugcgc ccacaauucu gguaugcggc aaugaccuag uagucaucuc agaaagccag 10080
 20 gggacugagg aggacgagcg gaaccugaga gccuucacgg aggccaugac cagguacucu 10140
 gcccucuccug gugauccccc cagaccggaa uaugaccugg agcuauaac auccuguucc 10200
 ucaaaugugu cuguggcguu gggcccgccg ggcgcgcga gauacuaccu gaccagagac 10260
 25 ccaaccacuc cacucgcccg ggcugccugg gaaacaguua gacacucucc uaucaauuca 10320
 uggcugggaa acaucaucca guaugcucca accauauggg uucgcauggu ccuaaugaca 10380
 30 cacuucuuu ccauucucuu gguccaagac acccuggacc agaaccucaa cuuugagaug 10440
 uauggaucag uauacuccgu gaauccuuug gaccuuccag ccuaauuga gagguuacac 10500
 35 gggcuugacg ccuuuuuuu gacacauac ucucaccacg aacugacgcg gguggcuuca 10560
 gcccucagaa aacuuggggc gccaccccuc agggugugga agagucgggc ucgcgcaguc 10620
 40 agggcgucucc ucaucucccg uggagggaaa gcggccguuu gcggccgaau ucucuucuuu 10680
 ugggcgguu gaaccaagcu caaacucacu ccuugccgg aggcgcgccu acuggacuua 10740
 uccaguuggu ucaccgucgg cgcggcgggg ggcgacuuu uucacagcgu gucgcgcgcc 10800
 45 cgaccccgcu cauuacucuu cggccuacuc cuacuuuucg uagggguaagg ccucuuuccu 10860
 cucccccgcuc gguagagcgg cacacacuag guacacucca uagcuuacug uuccuuuuuu 10920
 50 uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuccucuuu 10980
 cuucccuucu caucuuauuc uacuuuuuu cuuggugcu ccaucuuagc ccuagucacg 11040
 55 gcuagcugug aaaggucgu gagccgaug acugcagaga gugccguaac uggucucucu 11100
 gcagaucug u 11111

60 <210> 15
 <211> 9707
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>

ES 2 346 326 T3

<223> Descripción de la Secuencia Artificial; replicón de ARN que comprende el ARN genómico del virus de la hepatitis C de longitud completa derivado del clon JFH-1, en el que un motivo GDD de aminoácidos se ha mutado en GND

5 <400> 15

```

gaauucuaau acgacucacu auagaccugc ccuaauagg ggcgacacuc cgccaugaau 60
cacucccug ugaggaacua cugucuucac gcagaaagcg ccuagccaug gcguuaguau 120
gagugucgua cageccuccag gccccccccc cccgggagag ccuaguggu cugcggaacc 180
ggugaguaca ccggaauugc cggaagacu ggguccuuc uuggauaaac ccacucuaug 240
ccccggccauu ugggcgugcc cccgcaagac ugcuagccga guagcguugg guugcgaaag 300
gccuuguggu acugccugau agggcgcuug cgagugcccc gggaggucuc guagaccgug 360
caccaugagc acaaauccua aaccucaaag aaaaaccaa agaaacacca accgucgccc 420
agaagacguu aaguucccgg gcggcggcca gaucguuggc ggaguauacu uguugccgcg 480
caggggcccc agguugggug ugcgcacgac aaggaaaacu ucggagcggg cccagccacg 540
ugggagacgc cagcccaucc ccaaagaucg gcgcuccacu ggcaaggccu ggggaaaacc 600
aggucgcccc uggccccuau augggauga gggacucggc ugggcaggau ggcuccuguc 660
cccccgaggc ucucgccccu ccuggggccc cacugacccc cggcauaggu cgcgcaacgu 720
ggguaaaguc aucgacaacc uaacgugugg cuuugccgac cucauggggg acauccccgu 780
cguaggcgcc ccgcuuagug gcgccgccag agcugucgcg cacggcguga gaguccugga 840
ggacgggggu aaauaugcaa cagggaaccu acccgguuuc cccuuuucua ucuucugcu 900
ggcccuguuu uccugcauca ccguuccggu cucugcugcc caggugaaga auaccaguag 960
cagcuacaug gugaccaaug acugcuccaa ugacagcauc acuuggcagc ucgaggcugc 1020
gguucuccac guccccgggu gcgucccgug cgagagagug gggaauacgu cacgguguug 1080
ggugccaguc ucgccaacaa uggcugugcg gcagcccggg gccucacgc agggucugcg 1140

```

50

55

60

65

ES 2 346 326 T3

5 gacgcacauc gauaugguug ugauguccgc caccuucugc ucugcucucu acguggggga 1200
 ccucuguggc ggggugaugc ucgcggccca gguguucauc gucucgccgc aguaccacug 1260
 guuugugcaa gaaugcaauu gucccaucua ccucggcacc aucacuggac accgcauggc 1320
 augggacaug augaugaacu ggucgcccac ggccaccaug auccuggcgu acgugaugcg 1380
 10 cguccccag gucaucauag acaucguuag cggggcucac uggggcguca uguucggcuu 1440
 ggccuacuuc ucuauagcagg gagcgugggc gaaggucuu gucauccuuc ugcuggccgc 1500
 15 ugggguggac gcgggcacca ccaccguugg aggcgcuguu gcacguucca ccaacgugau 1560
 ugccggcgug uucagccaug gccucagca gaacauucag cucauuaaca ccaacggcag 1620
 20 uuggcacauc aaccguacug ccuugaauug caaugacucc uugaacaccg gcuuucugc 1680
 ggccuuguuc uacaccaacc gcuuaaacuc gucagggugu ccaggcgcc uguccgccug 1740
 ccgcaacauc gaggcuuucc ggauaggug gggcacccua caguacgagg auaugucac 1800
 25 caauccagag gauaugaggc cguacugcug gcacuacccc ccaaagccgu guggcguagu 1860
 ccccgcgagg ucugugugug gccagugua cuguuucacc cccagcccg uaguaguggg 1920
 30 cacgaccgac agacguggag ugcccaccua ccaugggga gagaugaga cagaugucu 1980
 ccuacugaac agcaccgac cgccgcagg cucaugguuc ggucgcacgu ggaugaacuc 2040
 35 cacugguuuc accaagacu uggcgcgcc accuugccgc accagagcug acuucaacgc 2100
 cagcacggac uuguugugcc cuacggauug uuuuaggaag cauccugaug ccacuuauu 2160
 uaaguguggu ucugggcccu ggucacacac aaagugccug guccacuacc cuuacagacu 2220
 40 cuggcauuac ccucgcacag ucauuuuuac caucuuaag auaagaugu auguaggggg 2280
 gguugagcac aggcucacgg ccgcaugcaa cuucacucgu ggggaucgu ggcacuugga 2340
 45 ggacagggac aggagucagc ugucuccucu guugcacucu accacggaau gggccauccu 2400
 gccucgacc uacucagacu uaccgcuuu gucaacuggu cuuccacc uucaccagaa 2460
 50 caucguggac guacaauaca uguauggccu cucaccugcu aucacaaaau acgucguucg 2520
 augggagugg gugguacucu uauuccugcu cuuagcggac gccagagucu gcgccugcu 2580
 guggaugcuc aucuuguugg gccaggccga agcagcauug gagaaguugg ucgucugca 2640
 55 cgcugcgagu gcggcuacu gccauggccu ccuauuuuu gccaucuuc ucguggcagc 2700
 uuggcacauc aggggucggg uggucccuu gaccaccuau ugccucacug gccuaggcc 2760
 60 cuucugccua cugcucaugg cacugccccg gcaggcuuau gccuagacg caccugugca 2820
 cggacagaua ggcguggguu uguugauuu gaucaccuc uucacacua ccccgggua 2880

65

ES 2 346 326 T3

uaagaccuc cucggccagu gucuguggug guugugcuau cuccugaccc ugggggaagc 2940
 caugauucag gaguggguac cacccaugca ggugcgcggc ggccgcgaug gcaucgcgug 3000
 5 ggccgucacu auauucugcc cggguguggu guuugacauu accaaauggc uuuuggcguu 3060
 gcuuggggccu gcuuaccucu uaagggccgc uuugacacau gugccguacu ucgucagagc 3120
 10 ucacgcucug auaaggguau gcgcuuuggu gaagcagcuc gcggggggua gguauguua 3180
 gguggcgcua uuggcccuug gcagguggac uggcaccuac aucuaugacc accucacacc 3240
 15 uaugucggac uggggccgua gcggccugcg cgacuuaagcg gucgccgugg aaccacaucau 3300
 cuucaguccg auggagaaga aggucaucgu cuggggagcg gagacggcug caugugggga 3360
 cauucuacau ggacuucccg uguccgcccg acucggccag gagauccucc ucggcccagc 3420
 20 ugauggcuac accuccaagg gguggaagcu ccuugcuccc aucacugcuu augcccagca 3480
 aacacgaggc cuccugggcg ccuaguggu gaguaugacg gggcgugaca ggacagaaca 3540
 25 ggccggggaa guccaaaucc uguccacagu cucucagucc uuccucggaa caaccaucuc 3600
 ggggguuuug uggacuguuu accacggagc uggcaacaag acucuagccg gcuuacgggg 3660
 30 uccggucacg cagauguacu cgagugcuga gggggacuug guaggcuggc ccagcccccc 3720
 ugggaccaag ucuuuggagc cgugcaagug uggagccguc gaccuauauc uggucacgcg 3780
 gaacgcugau gucaucccg cucggagacg cggggacaag cggggagcau ugcucucccc 3840
 35 gagaccuau ucgaccuuga agggguccuc gggggggccc gugcucugcc cuaggggcca 3900
 cgucguuggg cucuuccgag cagcugugug cucucggggc guggccaaau ccaucgauuu 3960
 40 cauccccguu gagacacucg acguuguuac aaggucuccc acuuucagug acaacagcac 4020
 gccaccggcu gugccccaga ccuaucaggu cggguacuug caugcuccaa cuggcagugg 4080
 45 aaagagcacc aagguccug ucgcguaugc cgcccagggg uacaaaguac uagugcuuaa 4140
 cccucggua gcugccacc ugggguuug ggcguaccua uccaaggcac auggcauca 4200
 ucccacauu aggacuggag ucaggaccgu gaugaccggg gaggccauca cguacuccac 4260
 50 auauggcaa uuucucgcc augggggcug cgcuagcggc gccuagaca ucaucauau 4320
 cgaugaaugc cacgcugugg augcuaccuc cauucucggc aucggaacgg uccuugauca 4380
 55 agcagagaca gccggguca gacuaacugu gcuggcuacg gccacacccc ccgggucagu 4440
 gacaaccccc cauccgaa uagaagaggu aggcucggg cgggaggug agaucccuu 4500
 60 cuauugggagg gcgauuccc uauccugcau caaggagggg agacaccuga uuucugcca 4560
 cucaaagaaa aagugugacg agcucgcggc ggcccuucgg ggcaugggcu ugaugccgu 4620

65

ES 2 346 326 T3

ggcauacuau agagggguugg acgucuccau aaauaccagcu cagggagaug ugguggucgu 4680
 cgccaccgac gcccucauga cggggguacac uggagacuuu gacuccguga ucgacugcaa 4740
 5 uguagcgguc acccaagcug ucgacuucag ccuggacccc accuucacua uaaccacaca 4800
 gacuguccca caagacgcug ucucacgcag ucagcgccgc gggcgcacag guagaggaag 4860
 10 acagggcacu uauagguaug uuuccacugg ugaacgagcc ucaggaaugu uugacagugu 4920
 agugcuuugu gagugcuacg acgcaggggc ugcgugguac gaucucacac cagcggagac 4980
 15 caccgucagg cuuagagcgu auuucacac gcccgccua cccguguguc aagaccaucu 5040
 ugaauuuugg gaggcaguuu ucaccggccu cacacacaua gacgccacu uccucucca 5100
 aacaaagcaa gcgggggaga acuucgcua ccuaguagcc uaccaagcua cggugugcg 5160
 20 cagagccaag gcccucuccc cguccuggga cgccaugugg aagugccugg cccgacucua 5220
 gccuacguu gcggggccca caccucuccu guaccguuug ggcccuauua ccaugaggu 5280
 25 caccucaca caccuggga cgaaguacau cgccacaugc augcaagcug accuugaggu 5340
 caugaccagc acgugggucc uagcuggagg aguccuggca gccgucgcc cauauugccu 5400
 30 ggcgacugga ugcguuucca ucaucggccg cuugcacguc aaccagcgag ucgucguugc 5460
 gccggauaag gagguccugu augaggcuu ugaugagaug gaggaaugcg ccucuagggc 5520
 ggcucucauc gaagaggggc agcggauagc cgagauguug aaguccaaga uccaaggcuu 5580
 35 gcugcagcag gccucuaagc aggccagga cauacaacc gcuaugcagg cuucauggcc 5640
 caaaguggaa caauuuuggg ccagacacau guggaacuuc auuagcggca uccaauaccu 5700
 40 cgcaggauug ucaacacugc cagggaaacc cgcgguggcu uccaugaug cauucagugc 5760
 cgccucacc aguccguugu cgaccaguac caccuuccu cucaacauca ugggaggcug 5820
 45 guuagcgucc cagaucgcac caccgcggg gccaccggc uuuglcguca guggccuggu 5880
 gggggcugcc gugggcagca uaggccuggg uaaggugcug guggacaucc uggcaggaua 5940
 uggugcgggc auuucggggg ccucgucgc auucaagauc augucggcg agaagccuc 6000
 50 uauggaagau gucaucaauc uacugccugg gaucugucu ccgggagccc ugguguggg 6060
 ggucaucugc gcggccauuc ugcgcccca cgugggaccg ggggagggcg cgguccaug 6120
 55 gaugaacagg cuuauugccu uugcuuccag aggaaaccac gucgcccuca cucacuacgu 6180
 gacggagucg gaugcgucgc agcgugugac ccaacuacu ggcucucuua cuauaaccag 6240
 60 ccuacucaga agacuccaca auuggauaac ugaggacugc cccauccau gcuccggauc 6300
 cuggcuccgc gacguguggg acuggguuug caccuucug acagacuua aaaauuggcu 6360

65

ES 2 346 326 T3

gaccucuaaa uuguucccca agcugcccg ccuccccuuc aucucuuguc aaaaggggua 6420
 caagggugug ugggcccggca cuggcaucau gaccacgcgc ugcccuugcg gcgccaacau 6480
 5 cucuggcaau guccgccugg gcucuaugag gaucacaggg ccuaaaaccu gcaugaacac 6540
 cuggcagggg accuuuccua ucaauugcua cacggagggc cagugcgcgc cgaaaccccc 6600
 10 cacgaacuac aagaccgcca ucuggagggg ggcggccucg gaguacgcgc aggugacgca 6660
 gcaugggucg uacuccuau uaacaggacu gaccacugac aaucugaaaa uuccuugcca 6720
 15 acuaccuucu ccagaguuuu ucuccugggu ggacggugug cagauccaua gguuugcacc 6780
 cacaccaaag ccguuuuucc gggaugaggu cucguucugc guugggcuua auuccuaugc 6840
 ugucgggucc cagcuucccu gugaaccuga gcccgcgcga gacguauuga gguccaugcu 6900
 20 aacagaucgg ccccacauca cggcggagac ugccggcgcg cgcuuggcac ggggaucacc 6960
 uccaucugag gcgagcuccu cagugagcca gcuaucagca ccgucgcugc gggccaccug 7020
 25 caccaccac agcaacaccu augacgugga cauggucgau gccaacucg ucauggaggg 7080
 cgguguggcu cagacagagc cugaguccag ggugcccguu cuggacuuuc ucgagccaau 7140
 30 ggccgaggaa gagagcgacc uugagcccuc aaauaccauc gagugcaugc uccccaggag 7200
 cggguuucca cgggccuuac cggcuugggc acggccugac uacaaccgc cgucugugga 7260
 aucguggagg aggccagauu accaaccgc caccguugcu gguugugcuc ucccccccc 7320
 35 caagaaggcc ccgacgccuc cccaaggag acgccggaca gugggucuga gcgagagcac 7380
 cauaucaaa gccuccagc aacuggccau caagaccuuu ggccagcccc ccucgagcgg 7440
 40 ugaugcaggc ucguccacgg gggcgggcgc cgccgaaucc ggccgguccga cgucccugc 7500
 ugagccggcc ccucagaga cagguuccgc cuccucuau cccccccuc agggggagcc 7560
 45 uggagaucgg gaccuggagu cugaucaggu agagcuuaa ccucccccc aggggggggg 7620
 gguagucucc gguucgggcu cggggucug gucuacuugc uccgaggagg acgauaccac 7680
 cgugugcugc uccaugucau acuccuggac cggggcucua auaacuccu guagccccga 7740
 50 agaggaaaag uugccaauc acccuugag uaacucgcug uugcgauacc auaacaaggu 7800
 guacuguaca acaucaaaaga gcgccucaca gagggcuuaa aagguaacuu uugacaggac 7860
 55 gcaagugcuc gacgcccauu augacucagu cuuaaaggac aucaagcuag cggcuuccaa 7920
 ggucagcgca aggcuccuca ccuuggagga ggcgugccag uugacuccac cccauucugc 7980
 60 aagauccaag uauggauucg gggccaagga gguccgcagc uuguccggga gggccguuaa 8040
 ccacaucaag uccgugugga aggaccuccu ggaagacca caaacaccaa uucccacaac 8100

65

ES 2 346 326 T3

caucauggcc aaaaaugagg uguucugcgu ggaccccgcc aaggggggua agaaaccagc 8160
 5 ucgccucauc guuuaccug accucggcgu ccgggucugc gagaaaugg ccucuauga 8220
 cauuacaaa aagcuuccuc aggcgguaau gggagcuucc uauggcuucc aguacucucc 8280
 ugcccaacgg guggaguauc ucuugaaagc augggcgga aagaaggacc ccauggguuu 8340
 10 uucguaugau acccgauucu ucgacucaac cgucacugag agagacauca ggaccgagga 8400
 guccauauac caggccugcu ccugcccgga ggaggccgc acugccauac acucgcugac 8460
 15 ugagagacuu uacguaggag ggcccauguu caacagcaag ggucaaaccu gcgguuacag 8520
 acguugccgc gccagcgggg ucuaaccac uagcaugggu aacaccauca caugcuangu 8580
 gaaagccua gcggccugca aggcugcggg gauaguugcg cccacaugc ugguaugcgg 8640
 20 caugaccua guagucucu cagaaagcca ggggacugag gaggacgagc ggaaccugag 8700
 agccuucacg gaggccauga ccagguacuc ugccccuccu ggugaucucc ccagaccgga 8760
 25 auaugaccug gagcuauaa cauccuguuc cucaaauug ucuguggcgu ugggcccgcg 8820
 gggcccgccgc agauacuacc ugaccagaga cccaaccacu ccacucgccc gggcugccug 8880
 30 ggaaacagu agacacucc cuaucaauuc auggcuggga aacaucaucc aguaugcucc 8940
 aaccauaugg guucgcaugg uccuaaugac acacuucuc uccauucua ugguccaaga 9000
 35 caccuggac cagaaccuca acuuugagau guauggauc guauacuccg ugaauccuuu 9060
 ggaccuucca gccauauug agagguuaca cgggcucgac gccuuuucua ugcacacua 9120
 cucucaccac gaacugacgc ggguggcuuc agcccucaga aaacuugggg cgccaccccu 9180
 40 caggguugg aagagucggg cucgcgcagu caggcgucc cucaucucc guggaggga 9240
 agcgccguu ugcggccgau aucucucaa ugggcggug aagaccaagc ucaaacucac 9300
 45 uccauugccg gaggcgccc uacuggacu auccaguugg uucaccguc gcgccggcg 9360
 gggcgacau uuucacagcg ugucgcgcgc ccgacccgc ucauuacucu ucggccuacu 9420
 50 ccuacuuuc guagggguag gccucuuucc acucccgcu cgguagagcg gcacacacua 9480
 gguacacucc auagcuacu guuccuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuuu 9540
 55 uuuuuuuuu uuuuuuuuu uuuccucuu ucuuccuuc ucaucuuuu cuacuucuu 9600
 ucuuggugge uccauuuag ccuagucac gguagcugu gaaaggucg ugagccgcau 9660
 gacugcagag agugccguaa cuggucucuc ugcagaucau gucuaga 9707

60 <210> 16
 <211> 17
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial
 <220>

ES 2 346 326 T3

<223> descripción de la Secuencia Artificial: cebador

<400> 16

5 cgggagagcc atagtgg 17

<210> 17

<211> 19

10 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador

<400> 17

20 agtaccacaa ggccttgc 19

<210> 18

<211> 21

<212> ADN

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador

30 <400> 18

ctgcggaacc ggtgagtaca c 21

<210> 19

35 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

40 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador

<400> 19

45 aacaagatgg attgcacgca 20

<210> 20

<211> 20

50 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

55 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador

<400> 20

60 cgtcaagaag gcgatagaag 20

<210> 21

<211> 11969

<212> ARN

65 <213> Secuencia Artificial

<220>

ES 2 346 326 T3

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: replicón de ARN derivado del vector de expresión rFGR-JFH1/Luc

<400> 21

```

5      accugccccc aaauagggcg acacuccgcc augaauacac cccugugag gaacuacugu 60
      cuucacgcag aaagcgccua gccauggcgu uaguaugagu gucguacagc cuccaggccc 120
10     ccccccuccg ggagagccau aguggucugc ggaaccggug aguacaccgg aaugccggg 180
      aagacugggu ccuuucuuug auaaaccac ucuangccc gccauuugg cgugcccccg 240
15     caagacugcu agccgaguag cguuggguug cgaaaggccu ugugguacug ccugauagg 300
      cgcuugcgag ugccccggga ggucucguag accgugcacc augagcaca auccuaaacc 360
      ucaaagaaaa accaaaagaa acaccaacc agcguaaug gaagacgcca aaaacauaaa 420
20     gaaaggcccg gcgccauucu auccucugga ggauggaacc gcuggagagc aacugcauaa 480
      ggcuaugaag agauacgccc ugguuccugg aacaauugcu uuacagaug cacauaucga 540
25     ggugaacauc acguacgcg aaualuuga aauguccguu cgguuggcag aagcuangaa 600
      acgauauggg cugaauacaa aucacagaau cguuguugc agugaaaacu cucuucuuuu 660
30     cuuuangccg guguuaggcg cguuuuuuu cgagauugca guugcgccc cgaacgacau 720
      uuauaaugaa cgugaauugc ucaacaguau gaacauuugc cagccuaccg uaguguuugu 780
      uuccaaaaag gguugcaaa aaauuuugaa cgugcaaaaa aaauuaccaa uauuccagaa 840
35     aaauuuuauc auggaauua aaacggauua ccagggaauu cagucgaugu acacguucgu 900
      cacaucucau cuaccuccg guuuuauga auacgauuuu guaccagagu ccuuugaucg 960
40     ugacaaaaca auugcacuga uauugaacuc cucuggaucu acuggguuac cuaaggguu 1020

```

45

50

55

60

65

ES 2 346 326 T3

ggcccuuccg cauagaacug ccugcgucag auucucgcau gccagagauc cuuuuuuugg 1080
 caaucaaauc auuccggaua cugcgauuuu aaguguuguu ccuuuccauc acgguuuugg 1140
 5 aauguuuacu acacucggau auuugauaug uggauuuuga gucgucuuua uguauagauu 1200
 ugaagaagag cuguuuuuac gaucccuuca ggauuacaaa auucaaagug cguugcuagu 1260
 10 accaaccuaa uuuucauuu ucgccaaaag cacucugauu gacaaauacg auuuaucaaa 1320
 uuucacagaa auugcuucug ggggcgcacc ucuuucgaaa gaagucgggg aagcggguugc 1380
 15 aaaacgcuuu caucuuccag ggauacgaca aggauauggg cucacugaga cuacaucagc 1440
 uauucugauu acacccgagg gggaugauaa accgggcgcg gucgguaaaag uuguuccauu 1500
 20 uuugaagcg aagguugugg aucuggauac cgggaaaacg cugggcguua aucagagagg 1560
 cgaauuaugu gucagaggac cuaugauuuu guccgguuau guaaacaauc cggaagcgac 1620
 caacgccuug auugacaagg auggauggcu acauucugga gacauagcuu acugggacga 1680
 25 agacgaacac uucuucauag uugaccgcuu gaagucuuua auuaaaauaca aaggauauca 1740
 gguggccccc gcugaauugg aaucgauuuu guuacaacac cccaacauu ucgacgcggg 1800
 30 cguggcaggu cuucccgacg augacgccgg ugaacuuccc gccgccguug uuguuuugga 1860
 gcacggaaaag acgaugacgg aaaaagagau cguggauuac gucgccaguc aaguaacaac 1920
 35 cgcgaaaaag uugcgcgagg gaguuguguu uguggacgaa guaccgaaag gucuuaccgg 1980
 aaaacucgac gcaagaaaaa ucagagagau ccucauaaag gccaaagaagg gcggaaaguc 2040
 caaaauguaa guuuuaaccc ucuccuucc ccccccuua cguuacuggc cgaagccgcu 2100
 40 uggaauaagg ccggugugcg uuugucuuaa uguuuuuuuc caccuuuug ccgucuuuug 2160
 gcaaugugag ggcccggaaa ccuggcccug ucuuucugac gagcauuucc aggggucuuu 2220
 45 cccucucgc caaaggaaug caaggucugu ugaauugcu gaaggaaagca guuccucugg 2280
 aagcuucuuu aagacaaaca acgucuguag cgacccuuug caggcagcgg aacccccac 2340
 50 cuggcgacag gugccucugc ggccaaaagc cacguguuaa agauacaccu gcaaaggcgg 2400
 cacaaccca gugccacguu gugaguugga uaguugugga aagagucaaa uggcucuccu 2460
 caagcguuuu caacaagggg cugaaggauu cccagaaggu accccauugu augggauug 2520
 55 aucuggggcc ucggugcaca ugcuuuacau guguuuaguc gagguuuuuu aaacgucua 2580
 gcccccgaa ccacggggac gugguuuucc uuugaaaaac acgaugauac caugagcaca 2640
 60 aaucuaaaac cucaaagaaa aaccaaaga aacaccaacc gucgccaga agacguuaag 2700
 uuuccgggcg gcggccagau cguuggcgga guauacuugu ugccgcgcag gggccccagg 2760
 65

ES 2 346 326 T3

uugggugugc gcacgacaag gaaaacuucg gagcgguccc agccacgugg gagacgccag 2820
 cccaucacca aagaucggcg cuccacuggc aaggccuggg gaaaaccagg ucgccccugg 2880
 5 ccccuauaug ggaaugaggg acucggcugg gcaggauagg uccugucucc ccgaggcucu 2940
 cgccccuccu ggggccccac ugacccccgg cauaggucgc gcaacguggg uaaagucauc 3000
 10 gacaccucaa cguguggcuu ugccgaccuc augggguaca uccccgucgu aggcgccccg 3060
 cuuaguggcg ccgccagagc ugucgcgcac ggcgugagag uccuggagga cgggguuuuu 3120
 15 uaugcaacag ggaaccuacc cgguuuuccc uuuucuauc ucuugcuggc ccuguugucc 3180
 ugcaucaccg uuccggucuc ugcugcccag gugaagaaua ccaguagcag cuacauggug 3240
 accaauagcu gcuccaauga cagcaucacu uggcagcucg aggcugcggu ucuccacguc 3300
 20 cccgggugcg ucccgugcga gagagugggg aaucagucac gguguugggu gccagucucg 3360
 ccaaacaugg cugugcgga gcccggugcc cucacgcagg gucugcgga gcaucaugau 3420
 25 augguuguga ugucggccac cuucugcuc gcucucuaug ugggggaccu cuguggcggg 3480
 gugaugcucg cggcccaggu guucaucguc ucgccgcagu accacugguu ugugcaagaa 3540
 30 ugcaauugcu ccaucuaacc uggcaccauc acuggacacc gcauggcaug ggacaugaug 3600
 augaacuggu cgcaccggc caccaugauc cuggcguaug ugaugcgcu ccccgagguc 3660
 aucauagaca ucguuagcgg ggcucacugg ggcgucaugu ucggcuuggc cuacuucucu 3720
 35 augcagggag cgugggga ggucauugc auccuucugc ugcccgucg gguggacgcg 3780
 ggcaccacca ccguuggagg cgcuguugca cguuccacca acgugauugc cggcguguuc 3840
 40 agccauggcc cucagcagaa caucagcuc auuaacacca acggcaguug gcaucaaac 3900
 cguacugccu ugaauugcaa ugacuccuug aacaccggcu uucucgcggc cuuguucuauc 3960
 45 accaaccgcu uuaacucguc agggugucca gggcgccugu ccgccugccg caacaucgag 4020
 gcuuuccgga uagggugggg caccuacag uacgaggaua augucacaa uccagaggau 4080
 50 augaggccgu acugcuggca cuacccccca aagccgugug gcguaguccc cgcgaggucu 4140
 guguguggcc caguguacug uuucaccccc agcccguag uagugggcac gaccgacaga 4200
 cguggagugc ccaccuacac auggggagag aaugagacag augucuuccu acugaacagc 4260
 55 acccgaccgc cgcagggcuc augguucggc ugcacgugga ugaacuccac ugguuucacc 4320
 aagacuugug gcgcgccacc uugccgcacc agagcugacu ucaacgccag cacggacuug 4380
 60 uugugccua cggaauuuu uaggaagcau ccugaugcca cuuauuuuaa gugugguucu 4440
 gggcccuggc ucacacaaa gugccugguc cacuacccu acagacucug gcauuacccc 4500

65

ES 2 346 326 T3

ugcacaguca auuuuaccan cuucaagaua agaauguaug uagggggggu ugagcacagg 4560
 cucacggccg caugcaacuu cacucguggg gaucgcugcg acuuggagga caggacagg 4620
 5 agucagcugu cuccucuguu gcacucuacc acggaauggg ccauccugcc cugcaccuac 4680
 ucagacuuac ccgcuuuguc aacuggucuu cuccaccuuc accagaacau cguggacgua 4740
 10 caauacaugu augggccucuc accugcuauc acaaaauacg ucguucgaug ggagugggug 4800
 guacucuuau uccugcucuu agcggacgcc agagucugcg ccugcuugug gaugcucauc 4860
 15 uuguugggcc agggcgaagc agcauuggag aaguuggucg ucuugcacgc ugcgagugcg 4920
 gcuaacugcc augggcuccu auauuuugcc aucuucucg uggcagcuug gcacaucagg 4980
 ggucgggugg ucccuugac caccuauugc cucacuggcc uauggccuu cugccuacug 5040
 20 cucauggcac ugccccggca ggcuuaugcc uaugacgcac cugugcacgg acagauaggc 5100
 guggguuugu ugauauugau caccucucuc acacucaccc cgggguauaa gaccuccuc 5160
 25 ggccaguguc uguggguguu gugcuaucuc cugaccugcg gggaagccau gauucaggag 5220
 uggguaccac ccaugcaggu gcgcggcgcc cgcgauggca ucgcgugggc cgucacuaua 5280
 30 uucugcccgg gugugguguu ugacauuacc aaauggcuuu uggcguugcu ugggccugcu 5340
 uaccucuuua gggccgcuuu gacacaugug ccguacuucg ucagagcuca cgcucugaua 5400
 aggguaugcg cuuuggugaa gcagcucgcg ggggguaggu auguucaggu ggcgcuauug 5460
 35 gccuuggca gguggacugc caccuacauc uaugaccacc ucacaccuau gucggacugc 5520
 gccgcuagcg gccugcgca cuuagcgguc gccguggaac ccaucaucuu caguccgaug 5580
 40 gagaagaagg ucaucgucug gggagcggag acggcugcau guggggacau ucuacaugga 5640
 cuucccgugu ccgcccgauc cggccaggag auccuccucg gccagcuga uggcuacacc 5700
 45 uccaaggggu ggaagcuccu ugcuccauc acugcuuug cccagcaaac acgaggccuc 5760
 cugggcgcca uaguggugag uaugacggg cgugacagga cagaacaggc cggggaaguc 5820
 caaaucugu ccacagucuc ucaguccuuc cucggaacaa ccaucucggg gguuuugug 5880
 50 acuguuuacc acggagcugc caacaagacu cuagccggcu uacggggucc ggucacgcag 5940
 auguacucga gugcugaggg ggacuuggua ggcuggccca cccccugc gaccaagucu 6000
 55 uuggagccgu gcaagugug agccgucgac cuauaucugg ucacgcggaa cgcugauguc 6060
 aucccgccuc ggagacgcgg ggacaagcgg ggagcauugc ucucccgag acccauuucg 6120
 60 accuugaagg gguccucggg ggggccggug cucugccua ggggccacgu cguugggcuc 6180
 uuccgagcag cugugucuc ucggggcgug gccaaaucca ucgaauuau ccccgugag 6240

65

ES 2 346 326 T3

acacucgacg uuguuacaag gucucccacu uucagugaca acagcacgcc accggcugug 6300
 cccagagaccu aucaggucgg guacuugcau gcuccaacug gcaguggaaa gagcaccaag 6360
 5 guccucugucg cguaugccgc ccagggguac aaaguacuag ugcuaaacc cucgguagcu 6420
 gccacccugg gguuuggggc guaccuaucc aaggcacaug gcaucaaucc caacauuagg 6480
 10 acuggaguca ggaccgugau gaccggggag gccaucacgu acuccacaua uggcaauuu 6540
 cucgccgaug ggggcugcgc uagcggcgcc uaugacauca ucauugcga ugaugccac 6600
 15 gcuguggaug cuaccuccau ucucggcauc ggaacggucc uugaucaagc agagacagcc 6660
 ggggucagac uaacugugcu ggcuacggcc acaccccccg ggucagugac aaccccccau 6720
 cccgauauag aagagguagg ccucggggcg gagggugaga ucccuucua ugggagggcg 6780
 20 auucccuau ccugcauca gggagggaga caccugauuu ucugccacuc aaagaaaag 6840
 ugugacgagc ucgcggcgcc ccuucggggc augggcuuga augccguggc auacuauaga 6900
 25 gggguaggac ucuccauau accagcucag ggagaugugg uggucgucgc caccgacgcc 6960
 cucaugacgg gguacacugg agacuuugac uccgugaucg acugcaugu agcggucacc 7020
 30 caagcugucg acuucagccu ggacccacc uucacuauaa ccacacagac uguccacaa 7080
 gacgcugucu cagcaguca gcgcgcggg cgcacaggua gaggaagaca gggcacuuau 7140
 agguauguuu ccacugguga acgagccuca ggauguuug acaguguagu gcuuugugag 7200
 35 ugcuaagcag caggggcugc gugguacgau cucacaccag cggagaccac cgucaggcuu 7260
 agagcguaau ucaacacgcc cgccuaccc gugugucaag accaucuuga auuuugggag 7320
 40 gcaguuuua ccggccucac acacauagac gccacuucc ucuccaaac aaagcaagcg 7380
 ggggagaacu ucgeguaccu aguagccuac caagcuacgg ugugcgccag agccaaggcc 7440
 45 ccucccccgu ccugggacgc cauguggaag ugccuggccc gacucaagcc uacgcuugcg 7500
 ggccccacac cucuccugua ccguuugggc ccuauuacca augaggucac ccucacacac 7560
 50 ccugggacga aguacaucgc cacaugcaug caagcugacc uugaggucac gaccagcacg 7620
 uggguccuag cuggaggagu ccuggcagcc gucgcgcgau auugccuggc gacuggaugc 7680
 guuuccauca ucggccgcuu gcacgucaac cagcgagucg ucguugcgcc ggauaaggag 7740
 55 guccuguaug aggcuuuuga ugagauggag gaugcgccu cuaggcggc ucucaucgaa 7800
 gaggggcagc ggauagccga gauguugaag uccaagauc aaggcuugcu gcagcaggcc 7860
 60 ucuaagcagg ccagagacau acaaccgcu augcaggcuu cauggccaa aguggaaca 7920
 uuugggcca gacacaugug gaacucauu agcggcaucc aaaccucgc aggauugua 7980

65

ES 2 346 326 T3

acacugccag ggaacccccgc gguggcucc augauggcag ucagugccgc ccucaccagu 8040
 ccguugucga ccaghuaccac cauccuucuc aacaucaugg gaggcugguu agcgucccag 8100
 5 aucgcaccac ccgcgggggc caccggcucc gucgucagug gccugguggg ggcugccgug 8160
 ggcagcauag gccuggguuaa ggugcuggug gacauccugg caggauaugg ugcgggcauu 8220
 10 ucggggggccc ucgucgcauu caagaucag ucuggcgaga agcccucua u ggaagauguc 8280
 aucaaucuac ugccugggau ccugucuccg ggagcccugg uggugggggu caucugcgcg 8340
 15 gccauucugc gccgccacgu gggaccgggg gagggcgcgg uccauggau gaacaggcuu 8400
 auugccuuug cuuccagagg aaaccacguc gcccuauc acuacgugac ggagucggau 8460
 gcgucgcagc gūgugacca acuacuuggc ucucuuaa uaaccagccu acucagaaga 8520
 20 cuccacaauu ggauaacuga ggacugcccc aucccaugcu ccggauccug gcuccgcgac 8580
 gugugggacu ggguuugcac caucuugaca gacuuaaaa auuggcugac cucuaauug 8640
 25 uuccccaagc ugcccggccu ccccuucauc ucuuguaaa agggguacaa gggugugugg 8700
 gccggcacug gcaucaugac cacgcgcugc ccuugcgcg ccaacaucuc uggcaauguc 8760
 30 cgccugggcu cuaugaggau cacagggccu aaaaccugca ugaacaccug gcaggggacc 8820
 uuuccuauca auugcuacac ggagggccag ugcgcgccga aacccccac gaacuacaag 8880
 accgccaucu ggaggguggc ggccucggag uacgcggagg ugacgcagca ugggucguac 8940
 35 uccuauguaa caggacugac cacugacaau cugaaaauuc cuugccaacu accuuccuca 9000
 gaguuuuucu ccugggugga cggugugcag auccauaggu uugcaccac accaaagccg 9060
 40 uuuuuccggg augaggucuc guucugcguu gggcuuaau ccuaugcugu cgggucccag 9120
 cuucccugug aaccugagcc cgacgcagac guauugaggu ccaugcuaac agauccgcc 9180
 45 cacaucacgg cggagacugc ggcgcgcgcg uuggcacggg gaucaccucc aucugaggcg 9240
 agcuccucag ugagccagcu aucagcacg ucgcugcggg ccaccugcac caccacagc 9300
 aacaccuau aguggacau ggucgaugcc aaccugcuca uggagggcgg uguggcucag 9360
 50 acagagccug aguccagggu gcccguucug gacuucucg agccaauggc cgagggaagag 9420
 agcgaccuug agcccucau accaucggag ugcaugcucc ccaggagcgg guuuccacgg 9480
 55 gccuaccgg cuugggcacg gccugacuac aaccgcggc ucguggaau guggaggagg 9540
 ccagauuacc aaccggccac cguugcūgu ugugcucucc cccccccaa gaaggccccg 9600
 60 acgccucccc caaggagacg ccggacagug ggucugagcg agagcaccu aucagaagcc 9660
 cuccagcaac uggccauca gaccuuuggc cagccccccu cgagcgguu ugcaggcucg 9720

65

ES 2 346 326 T3

uccacggggg cgggcgccgc cgaauccggc gguccgacgu cccuggguga gccggccccc 9780
ucagagacag guuccgccuc cucuaugccc cccucgagg gggagccugg agauccggac 9840
5 cuggagucug aucagguaga gcuucaaccu cccccccagg gggggggggu agcucccggu 9900
ucgggcucgg ggucugguc uacuugcucc gaggaggacg auaccaccgu gugcugcucc 9960
10 augucauacu ccuggaccgg ggcucuaaua acucccugua gcccgaaga ggaaaaguug 10020
ccaaucaacc cuuugaguaa cucgcuguug cgauaccuaa acaaggugua cuguacaaca 10080
15 ucaaagagcg ccucacagag ggcuaaaaag guaacuuiuug acaggacgca agugcucgac 10140
gcccavuuug acucagucuu aaaggacauc aagcuagcgg cuuccaaggu cagcgcaagg 10200
cuccucaccu uggaggaggc gugccaguug acuccacccc auucugcaag auccaaguau 10260
20 ggauucgggg ccaaggaggu ccgcagcuug uccgggaggg ccguuaacca caucaaguuc 10320
guguggaagg accuccugga agaccacaaa acaccaauuc ccacaaccuau cauggccaaa 10380
25 aaugaggugu ucugcgugga ccccgccaag ggggguaaga aaccagcucg ccucaucguu 10440
uaccucgacc ucggcguccg ggucugcgag aaaauggccc ucuaugacau uacacaaaag 10500
30 cuuccucagg cgguaauggg agcuuccuau ggcuuccagu acuccccugc ccaacgggug 10560
gaguaucucu ugaaagcaug ggcggaaaag aaggacccca uggguuuuuc guaugauacc 10620
cgaugcuucg acucaaccgu cacugagaga gacaucagga ccgaggaguc cauauaccag 10680
35 gccugcuccc ugcccagga ggcccgcacu gccauacacu cgcugacuga gagacuuuac 10740
guaggagggc ccauguucaa cagcaagggu caaaccugcg guuacagacg uugccgcgcc 10800
40 agcggggugc uaaccacuag cauggguaac accaucacau gcuauugaa agcccuagcg 10860
gccugcaagg cugcggggau aguugcgccc acaaugcugg uaugcgcgga ugaccuagua 10920
45 gucaucucag aaagccaggg gacugaggag gacgagcgga accugagagc cuucacggag 10980
gccaugacca gguacucugc ccucuccuggu gaucacccca gaccggaaua ugaccuggag 11040
50 cuaauaaca cuuguuccuc aaaugugucu guggcguugg gcccgcgggg ccgccgcaga 11100
uacuaccuga ccagagacc aaccacucca cugcccgggg cugccuggga aacaguuga 11160
cacuccccua ucaauucaug gcugggaaac aucauccagu augcuccaac cauauggguu 11220
55 cgcauggucc uaauagacaca cuucucucc auucucaugg uccaagacac ccuggaccag 11280
aaccucaacu uugagaugua uggaucagua uacuccguga auccuuugga ccuuccagcc 11340
60 auaauugaga gguuacacgg gcuugacgcc uuuucuaugc acacauacuc ucaccacgaa 11400
cugacgcggg ugguucagc ccucagaaaa cuuggggcgc caccuccag gguguggaag 11460

65

ES 2 346 326 T3

agucgggcuc gcgcagucag ggcguccuc aucucccgug gagggaaagc ggccguuugc 11520
 ggccgauauc ucuucaauug ggcggugaag accaagcuca aacucacucc auugccggag 11580
 5 gcgcgccuac uggacuuauc caguugguuc accgucggcg ccggcggggg cgacauuuuu 11640
 cacagcgugu cgcgcgcccg acccgcuca uuacucucg gccuacuccu acuuuucgua 11700
 10 gggguaggcc ucuuccuacu ccccgucgg uagagcggca cacacuaggu acacuccaua 11760
 gcuaacuguu cccccuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuucuuuu 11820
 15 uuuuuuuuuu cccucuuucu ucccuucuca ucuuauucua cuuucuuucu ugguggcucc 11880
 aucuuagccc uagucacggc uagcugugaa agguccguga gccgcaugac ugcagagagu 11940
 gccguaacug gucucucugc agaucaugu 11969
 20
 <210> 22
 <211> 11969
 <212> ARN
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: replicón de ARN derivado del vector de expresión rFGR-JFH1/Luc/GND
 30 <400> 22
 accugccccc aauagggcg acacucgcc augaaucau cccugugag gaacuacugu 60
 cuucacgcag aaagcgccua gccauggcgu uaguaugagu gucguacagc cuccaggccc 120
 35 ccccccuccg ggagagccau aguggucugc ggaaccggug aguacaccgg aaugccggg 180
 aagacugggg ccuuucuuug auaaaccac ucuaugccg gccauuuggg cgugcccccg 240
 40 caagacugcu agccgaguag cguuggguug cgaaaggccu ugugguacug ccugauaggg 300
 cgcuugcgag ugccccggga ggucucguag accgugcacc augagcaca auccuaaacc 360
 45 ucaaagaaaa accaaaagaa acaccaaccg acgcguaaug gaagacgcca aaaacauaaa 420
 gaaaggcccg gcgccauucu auccucugga ggauggaacc gcuggagagc aacugcauaa 480
 50
 55
 60
 65

ES 2 346 326 T3

ggcuauagaag agauacgccc ugguuccugg aacaauugcu uuuacagaug cacauaucga 540
 ggugaacauc acguacgcgg aaauacuucga aauguccguu cgguuggcag aagcuangaa 600
 5 acgauauggg cugaauacaa aucacagaau cgucguaugc agugaaaacu cucuucaauu 660
 cuuuaugccg gugugggcg cguuauuuau cggaguugca guugcgcccg cgaacgacau 720
 10 uuauaaugaa cgugaauugc ucaacaguau gaacauuucg cagccuaccg uaguguuugu 780
 uucaaaaag ggguugcaaa aaauuuugaa cgugcaaaaa aaauuaccaa uaauccagaa 840
 15 aaauauuauc auggauucua aaacggauua ccagggaauu cagucgaugu acacguucgu 900
 cacauucacu cuaccucccg guuuuaauga auacgauuuu guaccagagu ccuuugaucg 960
 ugacaaaaca auugcacuga uaaugaacuc cucuggaucu acuggguuac cuaagggugu 1020
 20 ggcccuuccg cauagaacug ccugcgucag auucucgcau gccagagauc cuauuuuugg 1080
 caaucaaauc auuccggaua cugcgauuuu aaguguuguu ccuuuccauc acgguuuugg 1140
 25 aauguuuacu acacucggau auuugauaug uggauuucga gucgucuuaa uguauagauu 1200
 ugaagaagag cuguuuuuac gaucccuuca ggauuacaaa auucaaaugug cguugcuagu 1260
 30 accaaccua uuuucauucu ucgccaaaag cacucugauu gacaaauacg auuuaucaaa 1320
 uuuacacgaa auugcuucug ggggcgcacc ucuuucgaaa gaagucgggg aagcgguugc 1380
 aaaacgcuuc caucuuccag ggauacgaca aggauuuggg cucacugaga cuacaucagc 1440
 35 uauucugauu acaccgagg gggaugauaa accgggcgcg gucgguaaag uguuccauu 1500
 uuuugaagcg aagguugugg aucuggauac cgggaaaacg cugggcguua aucagagagg 1560
 40 cgauuuuugu gucagaggac cuaugauuau guccgguuau guaaacaauc cggaagcgac 1620
 caacgccuug auugacaagg auggauggcu acauucugga gacauagcuu acugggacga 1680
 45 agacgaacac uucuucanag uugaccgcuu gaagucuuua auuaauaca aaggauauca 1740
 gguggccccc gcugaauugg aaucgauauu guuacaacac cccaacauu ucgacgcggg 1800
 50 cguggcaggu cuucccgacg augacgccgg ugaacuuccc gccgccguug uuguuuugga 1860
 gcacggaaag acgaugacgg aaaaagagau cguggauuac gucgccaguc aaguaacaac 1920
 cgcgaaaaag uugcgcggag gaguuguguu uguggacgaa guaccgaaag gucuuaccgg 1980
 55 aaaacucgac gcaagaaaaa ucagagagau ccucauaaag gccagaagg gcggaaaguc 2040
 caauuuguaa guuuuaaccc ucuccuucc ccccccuua cguuacuggc cgaagccgu 2100
 60 uggaauaagg ccggugugcg uuugucuua uguuauuuu caccuauug ccgucuuug 2160
 gcaaugugag ggcccggaaa ccuggcccug ucuucugac gagcauuccu aggggucuuu 2220

65

ES 2 346 326 T3

cccucucgc caaaggaug caaggucugu ugaaugucgu gaaggaagca guuccucugg 2280
 aagcuucuu aagacaaaca acgucuguag cgaccuuug caggcagcgg aacccccac 2340
 5 cuggcgacag gugccucugc ggccaaaagc cacguguaua agauacaccu gcaaaggcgg 2400
 cacaacccca gugccacguu gugaguugga uaguugugga aagagucaaa uggcucuccu 2460
 10 caagcguauu caacaagggg cugaaggaug ccagaaggu accccauugu augggaucug 2520
 aucugggggc ucggugcaca ugcuuuacau guguuuaguc gagguuaaaa aaacgucuag 2580
 15 gccccccgaa ccacggggac gugguuuucc uuugaaaaac acgaugauac caugagcaca 2640
 aauccuaaac cucaaagaaa aaccaaaga aacaccaacc gucgcccaga agacguuaag 2700
 uucccgggcg gcggccagau cguuggcggg guauacuugu ugccgcgcag gggccccagg 2760
 20 uugggugugc gcacgacaag gaaaacuucg gagcgguccc agccacgugg gagacgccag 2820
 cccaucccca aagaucggcg cuccacuggc aaggccuggg gaaaaccagg ucgccccugg 2880
 25 ccccuauaug ggaaugaggg acucggcugg gcaggauagg uccugucucc ccgaggcucu 2940
 cgccccuccu ggggccccac ugacccccgg cauaggucgc gcaacguggg uaaagucauc 3000
 30 gacaccuaa cguguggcuu ugccgaccuc augggguaca ucccgcucgu aggcgccccg 3060
 cuuaguggcg ccgccagagc ugucgcgcac ggcgugagag uccuggagga cgggguaau 3120
 uaugcaacag ggaaccuacc cgguuuuccc uuuuucauc ucuugcuggc ccuguugucc 3180
 35 ugcaucaccg uuccggucuc ucgugcccag gugaagaaua ccaguagcag cuacauggug 3240
 accaauagcu gcuccaaua cagcaucacu uggcagcucg aggcugcggg ucuccacguc 3300
 40 cccgggugcg ucccgugcga gagagugggg aaucgucac gguguugggu gccagucucg 3360
 ccaaacaugg cugugcggca gcccgugcc cucacgcagg gucugcggac gcacaucgau 3420
 45 augguuguga ugucggccac cuucugcucu gcucucuacg ugggggaccu cuguggcggg 3480
 gugaucucg cggcccaggu guucaucguc ucgcgcagc accacugguu ugugcaagaa 3540
 ugcaauugcu ccaucuaacc uggcaccauc acuggacacc gcauggcaug ggacaugaug 3600
 50 augaacuggu cggccacggc caccaugauc cuggcguacg ugaugcgcgu ccccgagguc 3660
 aucauagaca ucguuagcgg ggcucacugg ggcgucaugu ucggcuuggc cuacuucucu 3720
 55 augcagggag cgugggcgaa ggucuuugc auccuucugc uggccgcugg gguggacgcg 3780
 ggcaccacca ccguuggagg cgcuguugca cguuccacca acgugaugc cggcguguuc 3840
 60 agccauggcc cucagcagaa cauucagcuc auuaacacca acggcaguug gcacaucaac 3900
 cguacugccu ugaauugcaa ugacuccuug aacaccggcu uucucgcggc cuuguucuac 3960

65

ES 2 346 326 T3

accaaccgcu uuaacucguc agggugucca gggcgccugu ccgccugccg caacaucgag 4020
 gcuuuccgga uagggugggg caccuacag uacgaggaua augucaccaa uccagaggau 4080
 5 augaggccgu acugcuggca cuacccccca aagccgugug gcguaguccc cgcgaggucu 4140
 guguguggcc caguguacug uuucaccccc agcccggguag uagugggcac gaccgacaga 4200
 10 cguggagugc ccaccuacac auggggagag aaugagacag augucuuccu acugaacagc 4260
 acccgaccgc cgcagggcuc augguucggc ugcacgugga ugaacuccac ugguuucacc 4320
 15 aagacuugug gcgcgccacc uugccgcacc agagcugacu ucaacgccag cacggacuug 4380
 uuugucccua cggauuuuuu uaggaagcau ccugaugcca cuuauuuuaa gugugguucu 4440
 gggcccuggc ucacacaaaa gugccugguc cacuacccuu acagacucug gcauuacccc 4500
 20 ugcacaguca auuuuaccu cuucaagaua agaauguauug uagggggggg uagcacagg 4560
 cucacggccg caugcaacuu cacucguggg gaucgcugcg acuuggagga cagggacagg 4620
 25 agucagcugu cuccucuguu gcacucuacc acggaauagg ccauccugcc cugcaccuac 4680
 ucagacuuac ccgcuuuguc aacuggucuu cuccaccuuc accagaacau cguggacgua 4740
 30 cauacaugu auggccucuc accugcuau acaaaauacg ucuucgaug ggagugggug 4800
 guacucuuau uccugcucuu agcggacgcc agagucugcg ccugcuugug gaugcucauc 4860
 uuugugggcc aggccgaagc agcauuggag aaguuggucg ucuugcacgc ugcgagugcg 4920
 35 gcuaacugcc auggccuccu auuuuuugcc aucuuucucg uggcagcuug gcacaucagg 4980
 ggucgggugg ucccuugac caccuauugc cucacuggcc uauggccuu cugccuacug 5040
 40 cucauggcac ugccccggca ggcuuaugcc uauagcgcac cugugcacgg acagauaggc 5100
 guggguuuu ugaauuugau caccucucuc acacucaccc cgggguauaa gaccuccuc 5160
 45 ggccaguguc uguggugguu gugcuauuc cugaccucgg gggaagccau gauucaggag 5220
 uggguaccac ccaugcaggu gcgcggcggc cgcgauggca ucgcgugggc cgucacuaua 5280
 uucugcccgg gugugguguu ugacauuacc aaauggcuuu uggcguugcu ugggccugcu 5340
 50 uaccucuuuaa gggccgcuuu gacacaugug ccguacuucg ucagagcuca cgcucugaua 5400
 aggguaugcg cuuuggugaa gcagcucgcg ggggguaggu auguucaggu ggcgcuauug 5460
 55 gccuuggca gguggacugg caccuacauc uauaccacc ucacaccuau gucggacugg 5520
 gccgcuagcg gccugcgca cuuagcgguc gccguggaac ccaucaucu caguccgaug 5580
 60 gagaagaagg ucaucgucug gggagcggag acggcugcau guggggacau ucuacaugga 5640
 cuucccgugu ccgccgacu cggccaggag auccuccucg gccagcuga ugguacacc 5700

65

ES 2 346 326 T3

uccaaggggu ggaagcuccu ugcucccauc acugcuuauug cccagcaaac acgaggccuc 5760
 cuggggcgcca uaguggugag uaugacgggg cgugacagga cagaacaggc cggggaaguc 5820
 5 caaauccugu ccacagucuc ucaguccuuc cucggaacaa ccaucucggg gguuuugugg 5880
 acuguuuacc acggagcugg caacaagacu cuagccggcu uacggggucc ggucacgcag 5940
 10 auguacucga gugcugaggg ggacuuggua ggcugggcca gccccccugg gaccaagucu 6000
 uuggagccgu gcaagugugg agccgucgac cuauaucugg ucacgcggaa cgcugauguc 6060
 15 aucccggcuc ggagacgcgg ggacaagcgg ggagcauugc ucuccccgag acccauuucg 6120
 accuugaagg gguccucggg gggggcggug cucugccua ggggccacgu cguugggcuc 6180
 uuccgagcag cugugucuc ucggggcgug gccaaaucca ucgauuucau ccccgugag 6240
 20 acacucgacg uuguuacaag gucucccacu uucagugaca acagcacgcc accggcugug 6300
 cccagaccu aucaggucgg guacuugcau gcuccaacug gcaguggaaa gaggaccaag 6360
 25 gucccugucg cguaugccgc ccaggggguc aaaguacuag ugcuaaacc cucgguagcu 6420
 gccaccucgg gguuuggggc guaccuaucc aaggcacaug gcaucauucc caacauuagg 6480
 30 acuggaguca ggaccgugau gaccggggag gccaucaugu acuccacaua uggcaauuu 6540
 cucgccgaug ggggcugcgc uagcggcgcc uaugacauca ucauugcga ugaauccac 6600
 gcuguggaug cuaccuccau ucucggcauc ggaacgguc uugaucaagc agagacagcc 6660
 35 ggggucagac uaacugugcu ggcuacggcc acaccccccg ggucagugac aaccccccau 6720
 cccgauauag aagagguaag ccucgggcgg gaggguagaga ucccuucua ugggagggcg 6780
 40 auucccuau ccugcaucaa gggagggaga caccugauuu ucugccacuc aaagaaaaag 6840
 ugugacgagc ucgcggcggc ccuucggggc augggcuuga augccguggc auacuauaga 6900
 45 gggguuggacg ucuccauau accagcucag ggagaugugg uggucgucgc caccgacgcc 6960
 cucaugacgg gguacacugg agacuuugac uccgugaucg acugcaugu agcggucacc 7020
 caagcugucg acuucagccu ggacccccacc uucacuaaua ccacacagac ugucccaca 7080
 50 gacgcugucu cagcaguca gcgcccggg cgcacaggua gaggaagaca gggcacuuau 7140
 agguanguuu ccacugguga acgagccuca ggaauuuug acaguguagu gcuuugugag 7200
 55 ugcuaagcag caggggcugc gugguacgau cucacaccag cggagaccac cgucaggcuu 7260
 agagcguaau ucaacacgcc cggccuacc gugugucaag accaucuuga auuuugggag 7320
 60 gcaguuuua cgggcucac acacauagac gccacuucc ucuccaaac aaagcaagcg 7380
 ggggagaacu ucgcguaccu aguagccuac caagcuacgg ugugcgccag agccaaggcc 7440

65

ES 2 346 326 T3

ccucccccgu ccuggggacgc cauguggaag ugccuggccc gacucaagcc uacgcuugcg 7500
 ggccccacac cucuccugua ccguuugggc ccuauuacca augaggucac ccucacacac 7560
 5 ccuggggacga aguacaucgc cacaugcaug caagcugacc uugaggucan gaccagcacg 7620
 uggguccuag cuggaggagu ccuggcagcc gucgccgcau auugccuggc gacuggaugc 7680
 10 guuuuccauca ucggccgcuu gcacgucaac cagcgagucg ucguugcgcc ggauaaggag 7740
 guccuguaug aggcuuuuga ugagauggag gaauugcccu cuagggcggc ucucaucgaa 7800
 gaggggcagc ggauagccga gauguugaag uccaagauc aaggcuugcu gcagcaggcc 7860
 15 ucuagcagg cccaggacau acaacccgc auagcaggcu cauggcccaa aguggaaca 7920
 uuuggggcca gacacaugug gaacuucuu agcggcaucc aaauaccucg aggauugua 7980
 20 acacugccag ggaacccgc gguggcuucc augauggcau ucagugccgc ccuaccagu 8040
 ccguugucga ccaguaccac cauccuucuc aacaucagg gaggcugguu agcguccag 8100
 25 aucgcaccac ccgcgggggc caccggcuuu gucgucagug gccugguggg ggucgccgug 8160
 ggcagcauag gccuggguua ggugcuggug gacaucugg caggauaugg ugcgggcau 8220
 ucggggggccc ucgucgcau caagaucag ucuggcgaga agcccucua ggagauguc 8280
 30 aucaaucuac ugccugggau ccugucuccg ggagccugg ugguuggggg caucugcgcg 8340
 gccauucugc gccgccacgu gggaccgggg gagggcgcgg uccauggau gaacaggcu 8400
 35 auugccuug cuuccagagg aaaccacguc gcccuauc acuacgugac ggagucggau 8460
 gcgucgcagc gugugacca acuacuugc ucucuuaa uaaccagccu acucagaaga 8520
 40 cuccacaau ggauaacuga ggacugccc auccaugcu ccggaucug gcuccgcgac 8580
 gugugggacu ggguuugc acucugaca gacuucaaaa auuggcugac cucuaauug 8640
 uucccacaagc ugcccggccu ccccuucac ucuuugcaaa agggguacaa gggugugug 8700
 45 gccggcacug gcaucagac cagcgcguc ccuugcgcg ccaacauc ucgcauguc 8760
 cgccugggcu cuagaggau cacaggccu aaaaccugca ugaacaccug gcaggggacc 8820
 50 uuuccuauca auugcuacac ggagggccag ugcgcgccga aacccccac gaacuacaag 8880
 accgccaucu ggaggguugc ggccucggag uacgcggagg ugacgcagca uggguuguac 8940
 55 uccuanguaa caggacugac cacugaca auugcauuu cuugccaacu accuucucca 9000
 gaguuuuucu ccugggugga cggugugcag auccauaggu uugcaccac accaaagccg 9060
 60 uuuuuccggg augaggucuc guucugcguu gggcuuaau ccuagcugu cggguccag 9120
 cuuccugug aaccugagcc cgacgcagac guauugaggu ccaugcuac agauccgcc 9180

65

ES 2 346 326 T3

cacaucacgg cggagacugc ggcgcggcgc uuggcacggg gaucaccucc aucugaggcg 9240
 5 agcuccucag ugagccagcu aucagcaccg ucgcugcggg ccaccugcac caccacacgc 9300
 aacaccuaug acguggacau ggucgaugcc aaccugcuca uggaggggcg uguggcucag 9360
 acagagccug aguuccagggu gcccguucug gacuuucug agccaauggc cgaggaagag 9420
 10 agcgaccuug agcccucaau accaucggag ugcaugcucc ccaggagcgg guuuccacgg 9480
 gccuuaccgg cuugggcacg gccugacuac aacccgccgc ucguggaauc guggaggagg 9540
 15 ccagauuacc aaccgcccac cguugcuggu ugugcucucc cccccccaa gaaggccccg 9600
 acgccucccc caaggagacg ccggacagug ggucugagcg agagcaccu aucagaagcc 9660
 20 cuccagcaac uggccauca gaccuuuggc cagccccccu cgagcgguga ugcaggcucg 9720
 uccacggggg cgggcgccgc cgaauccggc gguccgacgu cccugguga gccggcccc 9780
 ucagagacag guuccgccuc cucuaugccc cccucgagg gggagccugg agauccggac 9840
 25 cuggagucug aucagguaga gcuucaaccu cccccccagg gggggggggu agcucccggu 9900
 ucgggcucgg ggucuuuguc uacuugcucc gaggaggacg auaccaccgu gugcugcucc 9960
 30 augucauacu ccuggaccgg ggcucuaaua acucccugua gcccgaaga ggaaaaguug 10020
 ccaaucaacc cuuugaguaa cucgcuguug cgauaccuaa acaaggugua cuguacaaca 10080
 35 ucaaagagcg ccucacagag ggcuaaaaag guaacuuiug acaggacgca agugcucgac 10140
 gcccauuug acucagucuu aaaggacauc aagcuagcgg cuuccaaggu cagcgcaagg 10200
 cuccucaccu uggaggaggc gugccaguug acuccacccc auucugcaag auccaaguau 10260
 40 ggauucgggg ccaaggagggu ccgcagcuug uccgggaggg ccguuaacca caucaaguuc 10320
 guguggaagg accuccugga agaccacaa acaccaauuc ccacaaccu cauggccaaa 10380
 45 aaugaggugu ucugcgugga ccccgccaag ggggguaaga aaccagcucg ccucaucguu 10440
 uaccugacc ucggcguccg ggucugcgag aaaauggccc ucuugacau uacacaaaag 10500
 50 cuuccucagg cgguaauggg agcuuccuau ggcuuccagu acuccccugc ccaacgggug 10560
 gaguauucu ugaaagcaug ggcggaaaag aaggacccca uggguuuuuc guaugauacc 10620
 cgaugcuucg acucaaccgu cacugagaga gacaucagga ccgaggaguc cauauaccag 10680
 55 gccugcuccc ugcccaggga gggccgcacu gccauacacu cgcugacuga gagacuuuac 10740
 guaggagggc ccauguucaa cagcaagggu caaaccugcg guuacagacg uugccgcgcc 10800
 60 agcggggugc uaaccacuag cauggguaac accaucacau gcuaugugaa agcccuagcg 10860
 gccugcaagg cugcggggau aguugcgcgc acaugcugg uaugcggcaa ugaccuagua 10920

65

ES 2 346 326 T3

gucaucucag aaagccaggg gacugaggag gacgagcgga accugagagc cuucacggag 10980
 gccaugacca gguacucugc cccuccuggu gaucceccca gaccggaaua ugaccuggag 11040
 5 cuaauaacau ccuguuccuc aaaugugucu guggcguugg gcccgcgggg ccgcccaga 11100
 uacuaccuga ccagagaccc aaccacucca cucgcccggg cugccuggga aacaguuaga 11160
 10 cacuccccua ucaauucaug gcugggaaac aucauccagu augcuccaac cauauggguu 11220
 cgcauggucc uaaugacaca cuucucucc auucucaugg uccaagacac ccuggaccag 11280
 15 aaccucaacu uugagaugua uggaucagua uacuccguga auccuuugga ccuuccagcc 11340
 auaauugaga gguuacacgg gcuugacgcc uuuucuauag acacauacuc ucaccacgaa 11400
 cugacgcggg ugguucacgc ccucagaaaa cuuggggcgc caccuccag gguguggaag 11460
 20 agucgggcuc gcgcagucag ggcguccuc aucucccgug gagggaaagc ggccguuugc 11520
 ggccgauauc ucuucaauug ggcggugaag accaagcuca aacucacucc auugccggag 11580
 25 gcgcgccuac uggacuuauc caguugguuc accgucggcg ccggcggggg cgacauuuuu 11640
 cacagcgugu cgcgcgcccg acccgcuca uuacucucug gccuacuccu acuuuucgua 11700
 30 gggguaggcc ucuuccuacu ccccgucgg uagagcggca cacacuaggu acacuccaua 11760
 gcuaacuguu cccccuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 11820
 uuuuuuuuuu cccucuuucu ucccuucua ucuuauucua cuuucuuucu ugguggcucc 11880
 35 aucuuagccc uagucacggc uagcugugaa agguccguga gccgaugac ugcagagagu 11940
 gccguaacug gucucucugc agaucaugu 11969
 40 <210> 23
 <211> 11036
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: replicón de ARN derivado del vector de expresión rFGR-JFH1/EGP
 50
 55
 60
 65

ES 2 346 326 T3

<400> 23

accugccccc aaauaggggcg acacuccgcc augaaucacu cccugugag gaacuacugu 60
5 cuucacgcag aaagcgccua gccaugggcg uaguaugagu gucguacagc cuccaggccc 120
ccccucccg ggagagccau aguggucugc ggaaccggug aguacaccgg aaaugccggg 180
10 aagacugggu ccuuucuuug auaaaccac ucuaugcccg gccauuuggg cgugcccccg 240
caagacugcu agccgaguag cguuggguug cgaaaggccu ugugguacug ccugauaggg 300
15 cgcuugcgag ugccccggga ggucucguag accgugcacc augagcaca auccuaaacc 360
ucaaagaaaa accaaaagaa acaccaaccg acgcguaaug gugagcaagg gcgaggagcu 420
guucaccggg guggugccca uccuggucga gcuggacggc gacguaaacg gccacaaguu 480
20 cagegugucc ggcgaggggcg agggcgaucc caccuacggc aagcugaccc ugaaguucan 540
cugcaccacc ggcaagcugc ccgugcccug gccaccuc gugaccacc ugaaccuacgg 600
25 cgugcagugc uucagccgc accccgacca caugaagcag cagcacuuc ucaaguccgc 660
caugcccgaa ggcuacgucc aggagcgac caucuucuc aaggacgac gcaacuacaa 720
30 gaccgcgcc gaggugaagu ucgaggggcg caccugggg aaccgcauc agcugaaggg 780
caucgacuuc aaggaggacg gcaacaucuu ggggcacaag cuggaguaca acuacaacag 840
ccacaacguc uauaucaugg ccgacaagca gaagaacggc aucaagguga acuucaagau 900
35 ccgccacaac aucgaggacg gcagcgugca gcucgccgac cacuaccagc agaacacccc 960
caucggcgac ggccccgugc ugcugcccga caaccacuac cugagcacc aguccgccc 1020
40 gagcaaagac cccaacgaga agcgcgauca caugguccug cuggaguucg ugaccgccgc 1080
cgggaucau cucggcaugg acgagcugua caaguaaguu uaaaccucuc cccucccccc 1140
45 cccuaacgu uacuggccga agccgcuuug aaauagggcg gugugcguuu gucuauaugu 1200
uauuuuccac cauauugccg ucuuuuggca augugagggc ccggaaaccu ggcccugucu 1260
50 ucuugacgag cauuccuagg ggucuuucc cucucgcaa aggaugcaa ggucuguuga 1320
augucgugaa ggaagcaguu ccucuggaag cuucuuaga acaacaacg ucuguagcga 1380
cccuuugcag gcagcggaac ccccaccug gcgacaggug ccucugcgge caaaagccac 1440
55 guguaaaga uacaccugca aaggcgccac aaccacagug ccacguugug aguuggauag 1500
uuguggaaag agucaaaugg cucuccucaa gcguauuca caaggggcug aaggauccc 1560
60 agaagguacc ccuuguaug ggaucugauc uggggccucg gugcacaugc uuuaucugug 1620
uuuagucgag guaaaaaaa cgucuaggcc ccccgacca cggggacgug guuuuccuuu 1680

65

ES 2 346 326 T3

gaaaaaacacg augauaccan gagcacaan auuaaacuc aaagaaaaac caaaagaaac 1740
 accaaccguc gccagagaag cguuaaguuc ccgggcggcg gccagaucgu uggcggagua 1800
 5 uacuuguugc cgcgcagggg cccagguug ggugugcgca cgacaaggaa aacuucggag 1860
 cggucccagc cacuggggag acgccagccc aucccaaaag aucggcguc cacuggcaag 1920
 10 gccuggggaa aaccaggucg cccugggccc cuauauggga augagggacu cggcugggca 1980
 ggauggcucc ugucggggc aggcucucgc ccucucggg gcccacuga ccccgccau 2040
 15 aggucgcgca acugggguua agucaucgac accuaacgu guggcuuugc cgaccucaug 2100
 ggguaacucc ccgucguagg cggcccgcuu aguggcgccg ccagagcugu cgcgcacggc 2160
 gugagagucc ugaggagcgg gguuaauuau gcaacaggga accuaccgg uuuccccuuu 2220
 20 ucuauuuu ugcugggccu guuguccugc aucaccguuc cggucucugc ugcccaggug 2280
 aagaauacca guagcagcua cauggugacc aaugacugcu ccaaugacag caucacuugg 2340
 25 cagcucgagg cugcgguucu ccacgucggc gggugcgucc cgugcgagag aguggggaau 2400
 acgucacggg guugggugcc agucucgcca aacauggcug ugcggcagcc cggugccuc 2460
 30 acgcaggguc ugcggacgca caucgauaug guugugaugu ccgccaccuu cugcucugcu 2520
 cucuacgugg gggaccucug uggcggggug augcucggc cccagguguu caucgucugc 2580
 ccgcaguacc acugguuugu gcaagaaucc aaugcucca ucuaccugg caccuacau 2640
 35 ggacaccgca uggaugggga caugaugaug aacuggcgc ccacggccac caugaucug 2700
 gcguacguga ugcgcgucgg cgaggucac auagacauc uuagcggggc ucacuggggc 2760
 40 gucauguucg guuuggccua cuucucuaug caggggagcu gggcgaagggu cauugcauc 2820
 cuucugcugg ccgucggggu ggacgcgggc accaccaccg uuggaggcgc uguugcacgu 2880
 45 uccaccaacg ugaugccgg cguguucagc cauggccuc agcagaacau ucagcucau 2940
 aacaccaacg gcaguuggca caucaaccgu acugccuuga auugcauga cuccuugaac 3000
 50 accggcuuc ugcggccuu guucacacc aaccgcuua acucgucagg guguccaggg 3060
 cgcuguccg ccugccgaa caucgaggu uuccggauag gguggggcac cuacaguac 3120
 gaggauaau ucaccauuc agaggauaug agccguacu gcuggcacua ccccccagg 3180
 55 ccgugggcg uagucggcg gaggucugug ugugggccag uguacuguu cccccagc 3240
 ccgguaguag ugggcacgac cgacagacgu ggagugocca cuacacaug gggagagaau 3300
 60 gagacagaug ucuuccuacu gaacagcacc cgaccggcg agggcucaug guucggcugc 3360
 acuggauga acuccacug uuucaccaag auugugggc cgccaccuug ccgcaccaga 3420

65

ES 2 346 326 T3

gcugācuuca acgccagcac ggacuuguug ugcccuacgg auuguuuuag gaagcauccu 3480
gaugccacuu auauuaagug ugguucuggg cccuggcuca caccaaagug ccugguccac 3540
5 uaccuuaca gacucuggca uuacccugc acagucauu uuaccaucu caagauaaga 3600
auguauguag gggggguuga gcacaggcuc acggccgcau gcaacuucac ucguggggau 3660
10 cgcugcgacu uggaggacag ggacaggagu cagcugucuc cucuguugca cucuaccacg 3720
gaaugggcca uccugcccug caccuacuca gacuuacccg cuuugucaac uggucuuuc 3780
15 caccuucacc agaacaucgu ggacguacaa uacauguau gccucucacc ugcuaucaca 3840
aaauacgucg uucgauggga guggguggua cucuuauuc ugcucuuagc ggacgccaga 3900
gucugcgccu gcuuguggau gcucaucuuug uugggcccagg ccgaagcagc auuggagaag 3960
20 uuggucgucu ugcacgcugc gagugcggu aacugccaug gccuccuaua uuuugccauc 4020
uucuuugugg cagcuuggca caucaggggu cggguggucc ccuugaccac cuauugccuc 4080
25 acuggccuau ggcccuucug ccuacugcuc auggcacugc cccggcaggc uuaugccuau 4140
gacgcaccug ugcacggaca gauaggcgug gguuuguuga uauugaucac ccucuuacaca 4200
30 cucaccccgg gguauaagac ccuccucggc cagugucugu ggugguugug cuaucuccug 4260
accucggggg aagccaugau ucaggagugg guaccaccāa ugcaggugcg cggcgggccgc 4320
gauggcaucg cgugggccgu cacuauauuc ugcccgggug ugguguuuga cauuaacaaa 4380
35 uggcuuuugg cguugcuugg gccugcuuac cucuuaggg ccgcuuugac acaugugccg 4440
uacuucguca gagcucacgc ucugauaagg gnaugcgcuu uggugaagca gcucgcgggg 4500
40 gguagguaug uucagguggc gcuaauuggcc cuuggcaggu ggacuggcac cuacaucuau 4560
gaccaccuca caccuauugc ggacugggcc gcuaagggcc ugcgcgacuu agcggugccc 4620
45 guggaacca ucaucuucag uccgauggag aagaaggua ucgucugggg agcggagacg 4680
gcugcaugug gggacauucu acauggacuu cccguguccg cccgacucgg ccaggagauc 4740
50 cuccucggcc cagcugaugg cuacaccucc aaggggugga agcuccuugc ucccaucacu 4800
gcuaugccc agcaaacacg aggcuccug ggcgccauag uggugaguau gacggggcgu 4860
gacaggacag aacaggccgg ggaaguccaa auccugucca cagucucuca guccuuccuc 4920
55 ggaacaacca ucucgggggu uuuguggacu guuuaccacg gagcuggcaa caagacucua 4980
gccggcuuac gggguccggg cagcagauu uacucgagug cugaggggga cuugguaggc 5040
60 uggcccagcc cccuugggac caagucuuug gagccgugca aguguggagc cgucgaccua 5100
uauugguca cgcggaacgc ugaugucauc ccggcucgga gacgcgggga caagcgggga 5160

65

ES 2 346 326 T3

gcauugcucu ccccgagacc cauuucgacc uugaaggggu ccucgggggg gccggugcuc 5220
 ugcccuaggg gccacgucgu ugggcucuuu cgagcagcug ugugcucucg gggcguggcc 5280
 5 aaauccaucg auuucauccc cguugagaca cucgacguug uuacaagguc ucccacuuuc 5340
 agugacaaca gcacgccacc ggcuuguccc cagaccuauc aggucgggua cuugcaugcu 5400
 10 ccaacuggca guggaaagag caccaagguc ccugucgcu augccgccc gggguacaaa 5460
 guacuagugc uuaaccccuc gguagcugcc acccuggggg uuggggcgua ccuauccaag 5520
 15 gcacauugca ucaaucccaa cauuaggacu ggagucagga ccgugaugac cggggaggcc 5580
 aucacguacu ccacauaug caaaauucuc gccgaugggg gcugcgcuaug cggcgccuau 5640
 gacaucauca uaugcgauga augccacgcu guggaugcua ccuccauuc cggcaucgga 5700
 20 acgguccuug aucaagcaga gacagccggg gucagacuaa cugugcuggc uacggccaca 5760
 cccccgggu cagugacaac ccccacucc gauauagaag agguaggccu cggcggggag 5820
 25 ggugagauc ccuucuaugg gagggcgauu ccccuauccu gcaucaaggg agggagacac 5880
 cugauuuucu gccacucaa gaaaaagugu gacgagcucg cggcgggccu ucggggcaug 5940
 30 ggcuugaug ccguggcaua cuauagaggg uuggacgucu ccuaauacc agcucaggga 6000
 gauguggugg ucgucgccac cgacgccuc augacggggg acacuggaga cuuugacucc 6060
 35 gugaucgacu gcaauguagc ggucacccaa gcugucgacu ucagccugga cccacccuuc 6120
 acuauaacca cacagacugu cccacaagac gcugucucac gcagucagcg ccgcggggcg 6180
 acagguagag gaagacaggg cacuuauagg uauguuucca cuggugaacg agccucagga 6240
 40 auguuugaca guguagugcu uugugagugc uacgacgcag gggcugcgug guacgaucuc 6300
 acaccagcgg agaccaccgu caggcuuaga gcuauuuca acacgcccg ccuaccgug 6360
 45 ugucaagacc aucuugaauu uggggaggca guuuucacc gccucacaca cauagacgcc 6420
 cacuuccucu cccaaacaaa gcaagcgggg gagaacuucg cguaccuagu agccuaccaa 6480
 50 gcuaaggugu gcgccagagc caaggccccc ccccguccu gggacgccau guggaagugc 6540
 cuggcccgac ucaagccuac gcuugcgggc cccacaccuc uccuguaccg uuugggccc 6600
 55 auuaccaaug agguacccu cacacaccu gggacgaagu acaucgccac augcaugcaa 6660
 gcugaccuug aggucaugac cagcacgugg guccuagcug gaggaguccu ggcagccguc 6720
 gccgcuaau gccuggcgac uggaucggu uccaucacg gccgcugca cgucaaccag 6780
 60 cgagucgucg uugcgccgga uaaggagguc cuguauagg cuuuugauga gauggaggaa 6840
 ugcgccucua gggcggcucu caucgaagag gggcagcgga uagccgagau guugaagucc 6900

65

ES 2 346 326 T3

aagauccaag gcuugcugca gcaggccucu aagcaggccc aggacauaca acccgcuang 6960
 caggcuucau ggcccaaagu ggaacaauuu ugggccagac acauguggaa cuucauuagc 7020
 5 ggcauccaau accucgcagg auugucaaca cugccaggga accccgcggu ggcuuccaug 7080
 auggcauuca gugccgccc caccaguccg uugucgacca guaccaccau ccuucuaac 7140
 10 aucaugggag gcugguuagc gucccagauc gcaccacccg cggggggccac cggcuuuguc 7200
 gucaguggcc uggugggggc ugccgugggc agcauaggcc uggguaaggu gcugguggac 7260
 15 auccuggcag gauauggugc gggcauuucg gggggcccucg ucgcauucaa gaucaugucu 7320
 ggcgagaagc ccucuaugga agaugucauc aaucucugc cugggauccu gucuccggga 7380
 20 gccugggugg ugggggucuu cugcgcggcc auucugcgc gccacguggg accggggggag 7440
 ggcgcggucc aauggaugaa caggcuuuu gccuuugcuu ccagaggaaa ccacgucgcc 7500
 ccuacucacu acgugacgga gucggauccg ucgcagcgug ugacccaacu acuuggcucu 7560
 25 cuuacuauaa ccagccuacu cagaagacuc cacaauugga uaacugagga cugccccauc 7620
 ccaugcuccg gauccuggcu ccgcgacgug ugggacuggg uuugcaccu cuugacagac 7680
 30 uucaaaaaau ggugaccuc uaaaauuguu cccaagcugc ccggccuccc cuucaucucu 7740
 ugucaaaagg gguacaaggg ugugugggcc ggcacuggca ucaugaccac gcgcugcccu 7800
 35 ugcggcgcca acaucucugg caauguccgc cugggcucua ugaggauac agggccuaaa 7860
 accugcauga acaccuggca ggggaccuuu ccuaucauu gcuacacgga gggccagugc 7920
 gcgccgaaac ccccccacga cuacaagacc gccaucugga ggguggcggc cucggaguac 7980
 40 gcggagguga cgcagcaugg gucguacucc uauguacacg gacugaccac ugacaauug 8040
 aaaauuccuu gccacuacc uucuccagag uuuuucuccu ggguggacgg ugugcagauc 8100
 45 cauagguuug caccacacac aaagcogu uuccgggaug agguucuguu cugcguuggg 8160
 cuuaauuccu augcugucgg gucccagcuu ccugugaac cugagcccga cgcagacgua 8220
 50 uugaggucca ugcuaacaga uccgccccac aucacggcgg agacugcggc gcggcgcuug 8280
 gcacggggau caccuccauc ugaggcgagc uccucaguga gccagcuau agcaccgucg 8340
 55 cugcggggca ccugcaccac ccacagcaac accuauagc uggacauggu cgaugccaac 8400
 cugcucaugg agggcggugu ggcucagaca gagccugagu ccagggu gccuucuggac 8460
 uuucucgagc caauggccga ggaagagagc gaccuugagc ccucaaauacc aucggagugc 8520
 60 augcucccca ggagcggguu uccacgggcc uuaccggcuu gggcacggcc ugacuacaac 8580
 ccgccgcucg uggaauugc gaggaggcca gauuaccaac cggccaccgu ugcugguugu 8640
 65

ES 2 346 326 T3

gcucucuccccc cccccaagaa ggccccgacg ccucuccccaa ggagacgccg gacagugggu 8700
 5 cugagcgaga gcaccauauc agaagcccuc cagcaacugg ccaucaagac cuuuggccag 8760
 ccccccucga gcggugaugc aggcucgucc acggggggcg gcgccgccga auccggcggu 8820
 ccgacguccc cuggugagcc ggcccccuca gagacagguu ccgccuccuc uaugcccccc 8880
 10 cucgaggggg agccuggaga uccggaccug gagucugauc agguagagcu ucaaccuccc 8940
 ccccaggggg gggggguagc ucccgggucc ggucgggggu cuuggucuac uugcuccgag 9000
 15 gaggacgaa ccaccgugug cugcuccaug ucauacuccu ggaccggggc ucuaauaacu 9060
 ccugugagcc ccgaagagga aaaguugcca aucaaccuccu ugaguaacuc gcuguugcga 9120
 20 uaccauaaca agguguacug uacaacauca aagagcgccu cacagagggc uaaaaaggua 9180
 acuuuugaca ggacgcaagu gcucgacgcc cauuaugacu cagucuuaaa ggacaaucaag 9240
 cuagcggcuu ccaaggucag cgcaaggcuc cucaccuugg aggaggcgug ccaguugacu 9300
 25 ccaccccauu cugcaagauc caaguaugga uucggggcca aggagguccg cagcuugucc 9360
 gggaggggcg uuaaccacau caaguccgug uggaaggacc uccuggaaga cccacaaaca 9420
 30 ccaauuccca caaccauau ggccaaaaau gagguguucu gcguggaccg cgccaagggg 9480
 gguaagaaac cagcucgccu caucguuuac ccugaccucg gcguccgggu cugcgagaaa 9540
 35 augggccucu augacauuac aaaaaagcuu ccucaggcgg uaaugggagc uuccuauggc 9600
 uuccaguacu cccugccca acggguggag uaucucuuga aagcaugggc ggaaaagaag 9660
 gaccccaugg guuuuucgua ugauaccga ugcuuugacu caaccgucac ugagagagac 9720
 40 aucaggaccg aggaguccau auaccaggcc ugcucccugc ccgaggaggc ccgcacugcc 9780
 auacacucgc ugacugagag acuuuacgua ggaggggcca uguucaacag caagggucaa 9840
 45 accugcgguu acagacguug ccgcgccagc ggggugcuua ccacuagcau ggguaacacc 9900
 aucacaugcu augugaaagc ccuagcggcc ugcaaggcug cggggauagu ugcgcccaca 9960
 50 augcugguau gcggcgaua ccuaguaguc aucucagaaa gccaggggac ugaggaggac 10020
 gagcggaaac ugagagccuu cacggaggcc augaccaggu acucugcccc uccuggugau 10080
 55 ccccccagac cggaauauga ccuggagcuu auaacaucuu guuccucaa ugugucugug 10140
 gcguugggcc cgcgggggcg ccgcagauac uaccugacca gagaccaac cacuccacuc 10200
 gcccgggcug ccugggaaac aguuagacac ucccuaucuu auucauggcu gggaaacau 10260
 60 auccaguaug cuccaaccuu augguuugc augguccuaa ugacacacuu cuucuccauu 10320
 cucauggucc aagacacccu gacacagaac cucaacuug agauguagg aucaguauac 10380

65

ES 2 346 326 T3

uccgugaau c uuuggaccu uccagccaua auugagaggu uacacgggcu ugacgccuuu 10440
 ucuaugcaca cauacucuca ccacgaacug acgcgggugg cuucagcccu cagaaaacuu 10500
 5 gggggcgccac ccucaggggu guggaagagu cgggcucgcg cagucagggc gucccucauc 10560
 ucccugggag ggaaagcggc cguuugcggc cgauaucucu ucaauugggc ggugaagacc 10620
 10 aagcucaaac ucacuccauu gccggaggcg cgccuacugg acuuauccag uugguucacc 10680
 gucggcgccg gcggggggcga cauuuuucac agcgugucgc gcgcccgacc ccgcucauuu 10740
 15 cucuucggcc uacuccuacu uuucguaggg guaggccucu uccuacucce cgcucgguag 10800
 agcggcacac acuagguaca cuccauagcu aacuguuccu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 10860
 uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uucuuuuuuu uuuuuuuucc uuuuuuuucc cuucucaucu 10920
 20 uauucuacuu ucuuuucugg uggcucauc uuagcccuag ucacggcuag cugugaaagg 10980
 uccgugagcc gcaugacugc agagagugcc guaacugguc ucucugcaga ucaugu 11036

<210> 24

<211> 11036

<212> ARN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: replicón de ARN derivado del vector de expresión fFGR-JFH1/EGFP/GND

<400> 24

accugcccu aauagggcg acacuccgc augaaucacu cccugugag gaacuacugu 60
 cuucacgcag aaagcgccua gccauggcgu uaguaugagu gucguacagc cuccaggccc 120
 40 ccccuucccg ggagagccau aguggucugc ggaaccggug aguacaccgg aaugccggg 180
 aagacugggu ccuuucugg auaaaccac ucaugcccg gccauuggg cgugccccg 240
 45 caagacugcu agccgaguag cguuggguug cgaaaggccu ugugguacug ccugauaggg 300
 cgcuugcgag ugccccggga ggucucguag accgugcacc augagcaca auccuaaacc 360

ES 2 346 326 T3

ucaaagaaaa accaaaagaa acaccaaccg acgcguaaug gugagcaagg gcgaggagcu 420
 guucaccggg guggugccca uccuggucca gcuggacggc gacguaaacg gccacaaguu 480
 5 cagcgugucc ggcgagggcg agggcgaucc caccuacggc aagcugaccc ugaaguucan 540
 cugcaccacc ggcaagcugc ccgugcccug gcccaccuc gugaccaccc ugaccuacgg 600
 10 cgugcagugc uucagccgcu accccgacca caugaagcag cagcacuuc ucaaguccgc 660
 caugcccgaa ggcuacgucc aggagcgac caucuucuc aaggacgac gcaacuacaa 720
 15 gacccgcgcc gaggugaagu ucgagggcga ccccuggug aaccgcaucg agcugaaggg 780
 caucgacuuc aaggaggacg gcaacaucuu ggggcacaag cuggaguaca acuacaacag 840
 ccacaacguc uauaucaugg ccgacaagca gaagaacggc aucaagguga acuucaagau 900
 20 ccgccacaac aucgaggacg gcagcgugca gcucgccgac cacuaccagc agaacacccc 960
 caucggcgac ggccccgugc ugcugcccga caaccacuac cugagcacc aguccgccc 1020
 25 gagcaaagac cccaacgaga agcgcgauca caugguccug cuggaguucg ugaccgccc 1080
 cgggaucacu cucggcaugg acgagcugua caaguaaguu uaaaccucuc cccucucccc 1140
 30 ccccuaacgu uacuggccga agccgcuugg aauaaggccg gugugcguuu gucuauaugu 1200
 uauuuuccac cauauugccg ucuuuuggca augugagggc ccggaaaccu ggcccugucu 1260
 ucuugacgag cauuccuagg ggucuuuccc cucucgcaa aggaaugcaa ggucuguuga 1320
 35 augucgugaa ggaagcaguu ccucuggaag cuucuugaag acaacaacg ucuguagcga 1380
 cccuuugcag gcagcggaac cccccaccug gcgacaggug ccucugcggc caaaagccac 1440
 40 guguaauaga uacaccugca aaggcggcac aacccagug ccacguugug aguuggauag 1500
 uuugggaaag agucaaaugg cucuccucaa gcguauuca caaggggcug aaggauccc 1560
 45 agaagguacc ccuuguaug ggauugauc uggggccucg ggcacaugc uuuaucug 1620
 uuugucgag guaaaaaaa cgucuaggcc ccccgacca cggggacgug guuuuccuuu 1680
 50 gaaaaacacg augauaccu gagcacaaau ccuaaccuc aaagaaaaac caaaagaaac 1740
 accaaccguc gcccagaaga cguuaaguuc ccggcgcg gcagaucgu uggcggagua 1800
 uacuuguugc cgcgcagggg cccagguug ggugugcga cgacaaggaa aacuucggag 1860
 55 cggucccagc cagugggag acgccagccc aucccaaaag aucggcguc cacuggcaag 1920
 gccuggggaa aaccagguc cccugggc cuauauggga augaggga cu cggcugggca 1980
 60 ggauggcucc ugucuccccg aggcucucgc cccuccuggg gcccacuga ccccggauc 2040
 agguccgcga acguggguua agucaucgac acccuacgu guggcuuugc cgaccucaug 2100

65

ES 2 346 326 T3

5 ggguaacaucc ccgucguagg cgccccgcuu aguggcgccg ccagagcugu cgcgcacggc 2160
 gugagagucc uggaggagcgg gguuaauuau gcaacaggga accuaccgg uuuccccuuu 2220
 ucuauucu ugcuggcccu guuguccugc aucaccguuc cggucucugc ugcccaggug 2280
 aagaauacca guagcagcua cauggugacc aaugacugcu ccaaugacag caucacuugg 2340
 10 cagcucgagg cugcgguucu ccacgucucc gggugcgucc cgugcgagag aguggggaau 2400
 acgucacggg guugggugcc agucucgcca aacauggcug ugcggcagcc cggugccuc 2460
 15 acgcaggguc ugcggacgca caucgauaug guugugaugu ccgccaccuu cugcucugcu 2520
 cucuacgugg gggaccucug uggcggggug augcucgagg cccagguguu caucgucugc 2580
 ccgcaguacc acugguuugu gcaagaauugc aaugcucca ucuaccugg caccuacac 2640
 20 ggacaccgca uggcauggga caugaugaug aacuggucgc ccacggccac caugaucug 2700
 gcuacguga ugcgcgucc cgaggucac auagacauc uuagcggggc ucacuggggc 2760
 25 gucauguugc guuggccua cuucucuaug caggagcgu gggcgaaggu cauugucac 2820
 cuucugcugg ccgcuggggg ggacgcgggc accaccaccg uuggaggcgc uguugcacgu 2880
 30 uccaccaacg ugaugccgg cguguucagc caugggccuc agcagaacau ucagcucuu 2940
 aacaccaacg gcaguuggca caucaaccgu acugccuuga auugcauga cuccuugaac 3000
 35 accggcuuc ugcggccuu guucacacc aaccgcuua acucgucagg guguccagg 3060
 cgccuguccg ccugccgcaa caucgaggcu uuccggauag gguggggcac ccuacaguac 3120
 gaggaauaug uaccaaacc agaggauaug aggcgguacu gcuggcacua cccccaaag 3180
 40 ccgugggcg uaguccccgc gaggucugug uguggcccag uguacuguu cccccagc 3240
 ccgguaguag ugggcacgac cgacagacgu ggagugccca ccuacacaug gggagagaau 3300
 45 gagacagau ucuuccuacu gaacagcacc cgaccgccgc agggcucaug guucggcugc 3360
 acguggauga acuccacugg uuucaccaag acuguggcg cgccaccuug ccgcaccaga 3420
 50 gcugacuua acgccagcac ggacuuguug ugccuacgg auuguuuuag gaagcauccu 3480
 gaugccacu auauuaagug ugguucuggg ccuggcuca caccaaagug ccugguccac 3540
 55 uaccuuaca gacucuggca uuaccucgc acagucuuu uuaccuacu caagauaaga 3600
 auguauuag gggggguuga gcacaggcuc acggccgcau gcaacuucac ucguggggau 3660
 cgucgcgacu uggaggacag ggacaggagu cagcugucuc cucuguugca cucuaccag 3720
 60 gaugggcca uccugcccug caccuacua gacuuaccg cuuugucaac uggucucuc 3780
 caccuucacc agaacaucgu ggacguacaa uacauguaug gccucucacc ugcuaucaca 3840
 65

ES 2 346 326 T3

aaauacgucg uucgauggga gügggüggua cucuuauucc ugcucuuagc ggacgccaga 3900
 gucugcgccu gcuuguggau gcucaucuug uugggccagg ccgaagcagc auuggagaag 3960
 5 uuggucgucu ugcacgcugc gagugcggcu aacugccaug gccuccuaua uuuugccauc 4020
 uucuuugugg cagcuuggca caucaggggu cgggüggucc ccuugaccac cuauugccuc 4080
 10 acuggccuau ggcccuucug ccuacugcuc auggcacugc cccggcaggc uuaugccuau 4140
 gacgcaccug ugcacggaca gauaggcgug gguuuuguuga uauugaucac ccucuucaca 4200
 15 cucaccccgg gguauaagac ccuccucggc cagugucugu ggüggüugug cuaucuccug 4260
 acccuggggg aagccaugau ucaggagugg guaccacca ugcaggugcg cggcgccgc 4320
 gauggcaucg cgügggccgu cacuauauuc ugcccgggug üggüguuga cauuaccaa 4380
 20 üggcuuuugg cguugcuugg gccugcuuac cucuuaggg ccgcuuugac acaugugccg 4440
 uacuucguc gagcucacgc ucugauaagg güaugcgcu üggügaagca gcucgcgggg 4500
 25 gguagguaug uucagguggc gcuaüggcc cuüggcaggu ggacuggcac cuacaucua 4560
 gaccaccuca caccuauguc ggacugggcc gcuagcggcc ügcgcgacu agcggucgc 4620
 30 güggaacca ucaucuucag uccgauggag aagaagguca ucgucugggg agcggagacg 4680
 gcugcaugug gggacauueu acauggacuu cccguguccg cccgacucgg ccaggagau 4740
 cuccucggcc cagcugaugg cuacaccucc aaggggügg a gcuccuugc ucccacacu 4800
 35 gcuuüggccc agcaaacacg äggccuccug ggcgccauag üggüguau gacggggcg 4860
 gacaggacag aacaggccgg ggaaguccaa auccugucca cagucucua guccuuccuc 4920
 40 ggaacaacca ucucgggggu uuügggacu guuuaccacg gagcuggcaa caagacucua 4980
 gccggcuuac ggggucgggu cacgcagaug uacucgagug cugaggggga cuügguaggc 5040
 45 üggcccagcc cccuggggac caagucuuug gagccgugca agugüggagc cguogaccua 5100
 uaucüggua cgcggaacgc ugaugcauc ccggcucgga gacgcgggga caagcgggga 5160
 50 gcauugcucu ccccgagacc cauuüggacc uugaägggü ccucgggggg gccggugcuc 5220
 ugcccuaggg gccacgucgu ügggcucuu cagcagcug ugugcucuc gggcgüggcc 5280
 aaauccaucg auuucacucc cguugagaca cucgacguug uuacaagguc ucccacuuuc 5340
 55 agugacaaca gcacgccacc ggcuugucc cagaccuauc äggucgggü cuugcaugcu 5400
 ccaacuggca güggaaagag caccaagguc ccugucgcgu augccgcca gggguacaaa 5460
 60 guacuagugc uuaaccccuc gguagcucc acccügggü uüggggcgua ccuauccaag 5520
 gcacauggca ucaaucccaa cauüggacu ggagucagga ccgugaugac cggggaggcc 5580

65

ES 2 346 326 T3

aucacguacu ccacauaugg caaauuucuc gccgaugggg gcugcgcuag cggcgccuau 5640
 gacaucauca uaugcgauga augccacgcu guggaugcua ccuccauucu cggcaucgga 5700
 5 acgguccuug aucaagcaga gacagccggg gucagacuaa cugugcuggc uacggccaca 5760
 ccccccgggu cagugacaac cccccaucac gauauagaag agguaggccu cgggcgggag 5820
 10 ggugagaucc ccuucuaugg gagggcgauu ccccuauccu gcaucaaggg agggagacac 5880
 cugauuuucu gccacucaaa gaaaaagugu gacgagcucg cggcgggccu ucggggcaug 5940
 15 ggcuugaauug ccguggcaua cuauagaggg uuggacgucu ccuaauuacc agcucaggga 6000
 gauguggugg ucgucgccac cgacgccuc augacggggu acacuggaga cuuugacucc 6060
 20 gugaucgacu gcaauguagc ggucacccaa gcugucgacu ucagccugga ccccauccu 6120
 acuauaacca cacagacugu cccacaagac gcugucucac gcagucagcg ccgcgggcgc 6180
 acagguagag gaagacaggg cacuuauagg uauguuucca cuggugaacg agccucagga 6240
 25 auguuugaca gugugugcu uuugagugc uacgacgcag gggcugcgug guacgaucuc 6300
 acaccagcgg agaccaccgu caggcuuaga gcguauuua acacgcccg ccuaccgug 6360
 30 ugucaagacc aucuugaauu uugggaggca guuuucaccg gccucacaca cauagacgcc 6420
 cacuuccucu cccaaacaaa gcaagcgggg gagaacuucg cguaccuagu agccuaccaa 6480
 35 gcuaaggugu gcgccagagc caaggccccc ccccguccu gggacgccau guggaagugc 6540
 cuggcccgac ucaagccuac gcuugcgggc cccacaccuc uccuguaccg uuugggccc 6600
 auuaccaaug agguacccu cacacaccu gggacgaagu acaucgccac augcaugcaa 6660
 40 gcugaccuug aggucaugac cagcacgugg guccuagcug gaggaguccu ggcagccguc 6720
 gccgcauuu gccuggcgac uggauvcguu uccaucaucg gccgcuugca cgucaaccag 6780
 45 cgagucgucg uugcgccgga uaaggagguc cuguauagg cuuuugauga gauggaggaa 6840
 ugcgccucua gggcgccucu caucgaagag gggcagcgga uagccgagau guugaagucc 6900
 50 aagauccaag gcuugcugca gcaggccucu aagcaggccc aggacauaca acccgcuau 6960
 caggcuucau ggcccaaagu ggaacaauu ugggccagac acauguggaa cuucauuagc 7020
 ggcauccaau accucgcagg auugucaaca cugccaggga acccgcggu ggcuucca 7080
 55 auggcauua gugccgccu caccaguccg uugucgacca guaccaccau ccuucuaac 7140
 aucaugggag gcugguuagc gucccagauc gcaccacccg cgggggccac cggcuuuguc 7200
 60 gucaguggcc uggugggggc ugccgugggc agcauaggcc uggguaaggu gcugguggac 7260
 auccuggcag gauauggugc gggcauuucg ggggcccucg ucgcauucaa gaucaugucu 7320

65

ES 2 346 326 T3

ggcgagaagc ccucuaugga agaugucauc aaucuaucugc cuggggauccu gucuccggga 7380
 gccucggugg uggggggucau cugcgcgggc auucugcgcc gccacguggg accgggggag 7440
 5 ggcgcggucc aauggaugaa caggcuuauu gccuuugcuu ccagaggaaa ccacgucgcc 7500
 ccuacucacu acgugacgga gucggaugcg ucgcagcgug ugacccaacu acuuggcucu 7560
 10 cuuacuaaua ccagccuacu cagaagacuc cacaauugga uaacugagga cugccccauc 7620
 ccaugcuccg gaucucggcu cgcgcagcug ugggacuggg uuugcaccu cuugacagac 7680
 15 uucaaaaauu ggcugaccuc uaaaauuguuc cccaagcugc ccggccuccc cuucaucucu 7740
 ugucaaaagg gguacaaggg ugugugggccc ggcacuggca ucaugaccac gcgcugcccu 7800
 ugcggcgcca acaucucugg caaugucgcg cugggcucua ugaggaucaac agggccuaaa 7860
 20 accugcauga acaccuggca ggggaccuuu ccuaucuuu gcuacacgga gggccagugc 7920
 gcgccgaaac cccccacgaa cuacaagacc gccaucugga ggguggcggc cucggaguac 7980
 25 gcggagguga cgcagcaugg gucguacucc uauguaacag gacugaccac ugacaauucg 8040
 aaaaauccuu gccaaucacc uucuccagag uuuuuuccu ggguggacgg ugugcagauc 8100
 30 cauagguuug caccacacac aaagccguuu uuccgggaug agguucuguu cugcguggg 8160
 cuuaauuccu augcugucgg guccagcuu ccugugaac cugagccga cgcagacgua 8220
 35 uugaggucca ugcuaacaga uccgcccac aucacggcgg agacugcggc gcggcgcuug 8280
 gcacggggau caccuccauc ugaggcgagc uccucaguga gccagcuauc agcaccgucg 8340
 cugcgggcca ccugcaccac ccacagcaac accuaugacg uggacauggu cgaugccaac 8400
 40 cugcucaugg agggcgguu ggcucagaca gagccugagu ccaggguccc cguucggac 8460
 uuucucgagc caauggccga ggaagagagc gaccuugagc ccucaauacc aucggagugc 8520
 45 augcucccca ggagcgguu uccacgggccc uuaccggcuu gggcacggcc ugacuacaac 8580
 ccgcgcucg uggaaucgug gaggaggcca gauuaccaac cgeccaccgu ugcugguugu 8640
 50 gcucuccccc cccccaagaa ggccccgacg ccuccccaa ggagacgccc gacagugggu 8700
 cugagcgaga gcaccuauuc agaagcccuc cagcaacugg ccaucaagac cuuuggccag 8760
 cccccucga gcggugaugc aggcucgucc acggggcgcg gcgcccgga auccggcggu 8820
 55 ccgacguccc cuggugagcc ggccccuca gagacagguu ccgccuccuc uaugccccc 8880
 cucgaggggg agccuggaga uccggaccug gagucgauc agguagagcu ucaaccucc 8940
 60 ccccaggggg gggggguagc ucccgguucg ggcucggggu cuuggucua uugcuccgag 9000
 gaggacgaa ccaccgugug cugcucaug ucauacuccu ggaccggggc ucuaauaacu 9060

65

ES 2 346 326 T3

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65

cccuguagcc ccgaagagga aaaguugcca aucaacccuu ugaguaacuc gcuguugcga 9120
 uaccauaaca agguguacug uacaacauca aagagcgccu cacagagggc uaaaaaggua 9180
 acuuuugaca ggacgcaagu gcucgacgcc cauuaugacu cagucuuaaa ggacaucaag 9240
 cuagcggcuu ccaaggucag cgcaaggcuc cucaccuugg aggaggcgug ccaguugacu 9300
 ccacccccauu cugcaagauc caaguaugga uucggggcca aggagguccg cagcuugucc 9360
 gggagggccg uuaaccacau caaguccgug uggaaggacc uccuggaaga cccacaaaca 9420
 ccaauuccca caaccaucau ggccaaaaau gagguguucu gcguggaccc cgccaagggg 9480
 gguaagaaac cagcucgccu caucguuuac ccugaccucg gcguccgggu cugcgagaaa 9540
 auggcccucu augacauuac acaaaagcuu ccucaggcgg uaaugggagc uuccuauggc 9600
 uuccaguacu cccugccca acggguggag uaucucuuga aagcaugggc ggaaaagaag 9660
 gacccaugg guuuuucgua ugauaccga ugcucgacu caaccgucac ugagagagac 9720
 aucaggaccg aggaguccau auaccaggcc ugcucccugc ccgaggaggc ccgcacugcc 9780
 auacacucgc ugacugagag acuuuacgua ggagggccca uguucaacag caagggucaa 9840
 accugcgguu acagacguug ccgcgccagc ggggugcuua ccacuagcau ggguaacacc 9900
 aucacaugcu augugaaagc ccuagcggcc ugcaaggcug cggggauagu ugcgcccaca 9960
 augcugguau gcggaauga ccuaguaguc aucucagaaa gccaggggac ugaggaggac 10020
 gagcggaacc ugagagccuu cacggaggcc augaccaggu acucugcccc uccuggugau 10080
 ccccccagac cggaauauga ccuggagcua auaacauccu guuccucaa ugugucugug 10140
 gcguugggcc cgcggggccg ccgcagauac uaccugacca gagacccaac cacuccacuc 10200
 gcccgggcug ccugggaaac aguagacac uccccauca auucauggcu gggaaacauc 10260
 auccaguaug cuccaaccu auggguucgc augguccuaa ugacacacuu cuuccauu 10320
 cucauggucc aagacacccu ggaccagaac cucaacuug agauguagg aucaguauac 10380
 uccgugauc cuuuggaccu uccagccaua auugagaggu uacacgggcu ugacgccuuu 10440
 ucuaugcaca cauacucua ccacgaacug acgcgggugg cuucagcccu cagaaaacuu 10500
 ggggcgccac cccucagggu guggaagagu cgggcucgcg cagucagggc guccucauc 10560
 ucccguggag ggaaagcggc cguuugcggc cgauaucucu ucaaugggc ggugaagacc 10620
 aagcucaaac ucacuccauu gccggaggcg cgccuacugg acuuauccag uugguucacc 10680
 gucggcgccg gcgggggcga cauuuuucac agcgugucgc gcgcccgacc ccgcucaua 10740
 cucuucggcc uacuccuacu uuucguagg guaggccucu uccuacuccc cgcucggua 10800

ES 2 346 326 T3

agcggcacac acuagguaca cuccauagcu aacuguuccu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 10860
 uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuucc uuuuuuuucc cuucucaucu 10920
 5 uauucuacuu uuuuuuuugg uggcuccauc uuagcccuag ucacggcuag cugugaaagg 10980
 uccgugagcc gcaugacugc agagagugcc gaaacugguc ucucugcaga ucaugu 11036
 10 <210> 25
 <211> 11876
 <212> ARN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: replicón de ARN derivado del vector de expresión rFGR-JFH1/SEAP
 20 <400> 25
 accugccccc aauagggggc acacuccgcc augaaucacu cccugugag gaacuacugu 60
 cuucacgcag aaagcgccua gccauggcgu uaguaugagu gucguacagc cuccaggccc 120
 25 ccccccuccg ggagagccau aguggucugc ggaaccggug aguacaccgg aaugccggg 180
 aagacugggu ccuuucugg auaaaccac uuaugccc gccauuugg cgugccccg 240
 30 caagacugcu agccgaguag cguuggguug cgaaaggccu ugugguacug ccugauagg 300
 cguugcgag ugccccggga ggucucguag accugcacc augagcaca auccuaaacc 360
 35 ucaaagaaaa accaaaagaa acaccaaccg acgcguuaug cugcugcugc ugcugcugcu 420
 gggccugagg cuacagcucu ccuggggcau caucccaguu gaggaggaga acccgacuu 480
 40 cuggaaccgc gaggcagccg agggccuggg ugccgccaag aagcugcagc cugcacagac 540
 agccgccaag aaccucauca ucuuccugg cgaugggaug ggggugucua cggugacagc 600
 45 ugccaggau cuaaaagggc agaagaagga caaacugggg ccugagauac ccugggccau 660
 ggaccgcuuc ccuaugugg cucuguccaa gacauacaau guagacaaac augugccaga 720
 caguggagcc acagccacgg ccuaccugug cggggucaag ggcaacuucc agaccuugg 780
 50
 55
 60
 65

ES 2 346 326 T3

cuugagugca gccgcccgc uuaaccagug caacacgaca cgcggcaacg aggucaucuc 840
 cgugaugaa cgggccaaaga aagcagggaa gucaguggga gugguaacca ccacacgagu 900
 5 gcagcacgcc ucgccagccg gcaccuacgc ccacacggug aaccgcaacu gguacucgga 960
 cgccgacgug ccugccucgg ccgccagga ggggugccag gacaucgcu cgcagcucau 1020
 10 cuccaacaug gacauugacg ugauccuagg uggaggccga aaguacaugu uucgcauggg 1080
 aaccccagac ccugaguacc cagaugacua cagccaaggu gggaccaggc uggacgggaa 1140
 15 gaucucggug caggaauggc uggcgaagcg ccagggucc cgguaugugu ggaaccgcac 1200
 ugagcucaug caggcuuccc uggaccgcuc ugugacccau cucauggguc uuuuugagcc 1260
 uggagacaug aaauacgaga uccaccgaga cuccacacug gacccuuccc ugauggagau 1320
 20 gacagaggcu gccucgccc ugcugagcag gaacccccgc ggcuccuucc uucucgugga 1380
 ggguggucgc aucgaccaug gucaucauga aagcagggcu uaccgggcac ugacugagac 1440
 25 gaucauguuc gacgacgcca uugagagggc gggccagcuc accagcgagg aggacacgc 1500
 gagccucguc acugccgacc acuccacgu cuucuccuuc ggaggcuacc ccugcgagg 1560
 30 gagcuccauc uucgggcugg cccucggcaa gggccgggac aggaaggccu acacgguccu 1620
 ccuauacgga aacgguccag gcuaugugcu caaggacggc gcccgccgg auguuaccga 1680
 gagcgagagc gggagcccc aguaucggca gcagucagca gugccccug acgaagagac 1740
 35 ccacgcaggc gaggacgug cgguguucgc gcgcggccc caggcgcacc ugguuacgg 1800
 cgugcaggag cagaccuua uagcgcacgu cauggccuuc gccgcugcc uggagcccu 1860
 40 caccgccugc gaccuggcgc ccccgccgg caccaccgac gccgcgcacc cggguuacuc 1920
 uagagucggg gcggccggcc gcuucgagca gacaugagu uaaaccucuc cccuuccccc 1980
 45 cccuaacgu uacugccga agccgcuugg aaauaggccg gugugcguuu gucuauaugu 2040
 uauuuuccac cauauugccg uuuuuggca augugagggc ccggaaccu ggccugucu 2100
 ucuugacgag cauuccuagg ggucuuucc cucucgcaa aggaaugcaa ggucuguuga 2160
 50 augucugaa ggaagcagu ccucuggaag cuucugaag acaacaacg ucuguagcga 2220
 cccuugcag gcagcggaa cccccaccug gcgacaggug ccucugcggc caaaagccac 2280
 55 guguaaaga uacaccugca aaggcggcac aaccccagug ccacguugug aguuggauag 2340
 uuguggaaag agucaaaugg cucuccuaa gcguauuca caagggcug aaggauccc 2400
 60 agaaggua ccuuguaug ggaucugauc uggggccucg gugcacaugc uuuaucaug 2460
 uuugagcag guuaaaaaa cgucaggcc cccgaacca cggggacgug guuuuccuuu 2520

ES 2 346 326 T3

gaaaaacacg augauaccu gagcacaau ccuaaaccuc aaagaaaaac caaaagaaac 2580
 accaaccguc gccagaaga cguuaaguuc cgggcgggcg gccagaucgu uggcgaggua 2640
 5 uacuuguugc cgcgcagggg cccagguug ggugugcgca cgacaaggaa aacuucggag 2700
 cggucccagc cacgugggag acgccagccc auccccaag aucggcguc cacuggcaag 2760
 10 gccuggggaa aaccaggucg cccuggcc cuauauggga augagggacu cggcugggca 2820
 ggauggcucc ugucggggcg aggcucugc ccucuggg gccccacuga ccccgccau 2880
 15 aggucgcgca acguggguua agucaucgac accuaacgu guggcuuugc cgaccucaug 2940
 ggguaacucc ccgucguagg cggcccgcu aguggcgccg ccagagcugu cgcgcacggc 3000
 gugagagucc uggaggacgg gguuaauuau gcaacaggga accuaccgg uuueccuuu 3060
 20 ucuauucu ugcuggcccu guuguccugc aucaccguuc cggucucugc ugcccaggug 3120
 aagaauacca guagcagcua cauggugacc aaugacugcu ccaaugacag caucacuugg 3180
 25 cagcucgagg cugcgguucu ccacgucgcc ggugcgucc cgugcgagag aguggggaau 3240
 acgucacggg guugggugcc agucucgcca aacauggcug ugcggcagcc cggugccuc 3300
 30 acgcaggguc ugcggacgca caucgauaug guugugaugu ccgccaccuu cugcucugcu 3360
 cucuacgugg gggaccucug uggcggggug augcucggc cccagguguu caucgucug 3420
 ccgcaguacc acugguuugu gcaagaugc aaugcucca ucuaccugg caccuacau 3480
 35 ggacaccgca uggcauggga caugaugaug aacuggucc ccacggccac caugaucug 3540
 gcuacguga ugcgcgucc cgaggucauc auagacauc uuagcggggc ucacuggggc 3600
 40 gucauguugc guuggccua cuucucuaug cagggagcgu gggcgaaggu cauugcauc 3660
 cuucugcugg ccgucggggu ggacgcgggc accaccaccg uggaggcgc uguugcacgu 3720
 45 uccaccaacg ugauugccgg cguguucagc caugggccuc agcagaacau ucagcucuu 3780
 aacaccaacg gcaguuggca caucaaccgu acugccuuga auugcauga cuccuugaac 3840
 accggcuuuc ucgcggccuu guucuaacac aaccgcuua acugcucagg guguccagg 3900
 50 cgcuguccg ccugccgcaa caucgaggcu uuccggauag gguggggcac ccuacaguac 3960
 gaggaauaug ucaccauucc agaggauaug aggcguacu gcuggcacua cccccaag 4020
 55 ccgugggcg uagucggcg gaggucugug uguggccag uguacuguu caccaccagc 4080
 ccgguaguag ugggcacgac cgacagacgu ggagugccca ccuacacau gggagagaau 4140
 60 gagacagau ucuuccuacu gaacagcacc cgaccggcg agggcucaug guucggcugc 4200
 acguggauga acuccacug uuucaccaag acuugggcg cggcccuug ccgcaccaga 4260

65

ES 2 346 326 T3

gcugacuuca acgccagcac ggacuuguug ugcccuacgg auuguuuuag gaagcauccu 4320
gaugccacuu auauuaagug ugguucuggg ccugggcuca caccaaagug ccugguccac 4380
5 uacccuuaca gacucuggca uuaccccugc acagucaauu uuaccaucuu caagauaaga 4440
auguauguag gggggguuga gcacaggcuc acggccgcau gcaacuucac ucguggggau 4500
10 cgcugcgacu ugaggagacag ggacaggagu cagcugucuc cucuguugca cucuaccacg 4560
gaaugggcca uccugcccug caccuacuca gacuuacccg cuuugucaac uggucuucuc 4620
15 caccuucacc agaacaucgu ggacguacaa uacauguauug gccucucacc ugcuaucaca 4680
aaauacgucg uucgauugga guggguggua cucuuauucc ugcucuuagc ggacgccaga 4740
gucugcgccu gcuuguggau gcucaucuuug uuggggcagg ccgaagcagc auuggagaag 4800
20 uuggucgucu ugcacgcugc gagugcggcu aacugccaug gccuccuaua uuugccauc 4860
uucuuugugg cagcuuggca caucaggggu cggguggucc ccuugaccac cuauugccuc 4920
25 acuggccuau ggcccuucug ccuacugcuc auggcacugc cccggcaggc uuaugccuau 4980
gacgcaccug ugcacggaca gauaggcgug gguuuguuga uauugaucac ccucuucaca 5040
30 cucaccccg gguauaagac ccuccucggc cagugucugu ggugguugug cuaucuccug 5100
accucggggg aagccaugau ucaggagugg guaccacca ugcaggugcg cggcgggcg 5160
gauggcaucg cgugggcccgu cacuaauuuc ugcccgggug ugguguuuga cauuaccaa 5220
35 uggcuuuugg cguugcuugg gccugcuuac cucuuaggg ccgcuuugac acaugugccg 5280
uacuucguca gacucacgc ucugauaagg guaugcgcuu uggugaagca gcucgcgggg 5340
40 gguagguaug uucagguggc gcuaauggcc cuuggcaggu ggacuggcac cuacaucuau 5400
gaccaccuca caccuauugc ggacugggcc gcuagcggcc ugcgcgacu agcggucgcc 5460
45 guggaacca ucaucuuag uccgauggag aagaagguca ucgucugggg agcggagacg 5520
gcugcaugug gggacaauuc acauggacu cccguguccg cccgacucgg ccaggagauc 5580
50 cuccucggcc cagcugaugg cuacaccucc aaggggugga agcuccuugc ucccaucacu 5640
gcuuauggcc agcaaacacg aggcuccug ggcgccauag uggugaguau gacggggcgu 5700
gacaggacag aacaggccgg ggaaguccaa auccugucca cagucucuca guccuuccuc 5760
55 ggaacaacca ucucgggggu uuuguggacu guuuaccacg gacugggcaa caagacucua 5820
gccggcuuac ggggucgggu cacgcagaug uacucgagug cugaggggga cuugguaggc 5880
60 uggcccagcc cccugggac caagucuuug gagccgugca aguguggagc cgucgaccua 5940
uaucugguca cgcggaacgc ugaugucauc ccggcucgga gacgcgggga caagcgggga 6000

65

ES 2 346 326 T3

gcuuugcucu ccccgagacc cauuucgacc uugaaggggu ccucgggggg gccggugcuc 6060
 ugcccuaggg gccacgucgu ugggcucuuc cgagcagcug ugugcucucg gggcguggcc 6120
 5 aaauccaucg auuucauccc cguugagaca cucgacguug uuacaagguc ucccacuuuc 6180
 agugacaaca gcacgccacc ggcugugccc cagaccuauc agguccggua cuugcaugcu 6240
 10 ccaacuggca guggaaagag caccaagguc ccugucgcu augccgcca gggguacaaa 6300
 guacuagugc uuaaccccuc gguagcugcc acccuggggg uuggggcgua ccuauccaag 6360
 15 gcacauggca ucaaucccaa cauuaggacu ggagucagga ccgugaugac cggggaggcc 6420
 aucacguacu ccacauaugg caaaauucuc gccgaugggg gcugcgcuag cggcgccuau 6480
 gacaucauca uaugcgaua augccacgcu guggaugcua ccuccauucu cggcaucgga 6540
 20 acgguccuug aucaagcaga gacagccggg gucagacuaa cugugcuggc uacggccaca 6600
 cccccgggu cagugacaac ccccauucc gauauagaag agguaggccu cgggcgggag 6660
 25 ggugagauc ccuucuaugg gagggcgauu ccccauccu gcaucaaggg agggagacac 6720
 cugauuuucu gccacucaaa gaaaaagugu gacgagcucg cggcggcccu ucggggcaug 6780
 30 ggcuugaug ccguggcaua cuauagaggg uuggacgucu ccuaauacc agcucaggga 6840
 gauguggugg ucgucgccac cgacgccuc augacggggg acacuggaga cuuugacucc 6900
 gugaucgacu gcaauguagc ggucacccaa gcugucgacu ucagccugga cccacccuuc 6960
 35 acuauaacca cacagacugu cccacaagac gcugucucac gcagucagcg ccgcgggcgc 7020
 acagguagag gaagacaggg cacuuauagg uauguuucca cuggugaacg agccucagga 7080
 40 auguuagaca gugugugcu uugugagugc uacgacgcag gggcugcgug guacgaucuc 7140
 acaccagcgg agaccaccgu caggcuuaga gcguauuua acacgcccg ccuaccgug 7200
 45 ugucaagacc aucuugaauu uugggaggca guuuucaccg gccucacaca cauagacgcc 7260
 cacuuccucu cccaaacaaa gcaagcgggg gagaacucg cguaccuagu agccuaccaa 7320
 50 gcuacggugu gcgccagagc caaggccccc ccccguccu gggacgccau guggaagugc 7380
 cuggcccgac ucaagccuac gcuuugcggg cccacaccuc uccuguaccg uuugggccc 7440
 auuaccaaug agguacccu cacacaccu gggacgaagu acaucgccac augcaugcaa 7500
 55 gcugaccuug aggucaugac cagcacgugg guccuagcug gaggaguccu ggcagccguc 7560
 gccgcauuu gccuggcgac uggauvcguu uccaucaucg gccguugca cgucaaccag 7620
 60 cgagucgucg uugcgccgga uaaggagguc cuguaugagg cuuuugauga gauggaggaa 7680
 ugcgccucua gggcggcucu caucgaagag gggcagcgga uagccgagau guugaagucc 7740

65

ES 2 346 326 T3

aagauccaag gcuugcugca gcaggccucu aagcaggccc aggacauaca acccgcuau 7800
 caggcuucau ggcccaaagu ggaacaauuu ugaggccagac acauguggaa cuucauuagc 7860
 5 ggcauccaau accucgcagg auugucaaca cugccaggga accccgcggu ggcuuccaug 7920
 auggcuuuca gugccgcccc caccaguccg uugucgacca guaccaccu ccuucuaac 7980
 10 aucaugggag gcugguuagc guccagauc gcaccacccg cgggggccac cggcuuuguc 8040
 gucaguggcc ugguuggggc ugccgugggc agcauaggcc ugguuaaggu gcugguggac 8100
 15 auccuggcag gauauggugc gggcauuucg ggggcccucg ucgcauucua gaucaugucu 8160
 ggcgagaagc ccucuaugga agaugucauc aaucuaucg cugggauccu gucuccggga 8220
 gccucggugg ugguuggucau cugcgcggcc auucugcgc gccacgugg accgggggag 8280
 20 ggcgcggucc aauggaugaa caggcuuuu gccuuugcu ccagaggaaa ccacgucgcc 8340
 ccuacucacu acgugacgga gucggauccg ucgcagcgug ugaccaacu acuuggcucu 8400
 25 cuuacuauaa ccagccuacu cagaagacuc cacaauugga uaacugagga cugcccauc 8460
 ccaugcuccg gauccuggcu ccgcgacgug ugaggacuggg uuugcaccu cuugacagac 8520
 30 uucaaaaaau ggucgaccuc uaaaauuguc cccaagcugc ccggccucc cuucaucucu 8580
 ugucaaaagg gguacaagg ugugugggc ggcacuggca ucaugaccac gcgcugccu 8640
 ugccggccca acaucucugg caauguccgc cugggcucua ugaggauca agggccuaaa 8700
 35 accugcauga acaccuggca ggggaccuuu ccuaucauu gcuacacgga gggccagugc 8760
 gcgccgaaac ccccccagaa cuacaagacc gccaucugga ggguggcggc cucggaguac 8820
 40 gcggagguga cgcagcaugg gucguacucc uauguaacag gacugaccac ugacaauug 8880
 aaaaauccuu gccaaacuacc uucuccagag uuuuucuccu ggguggacgg ugugcagauc 8940
 45 cauagguuug caccacacc aaagccguuu uuccgggag aggucucguu cugcguuggg 9000
 cuuaauuccu augcuguegg guccagcuu ccugugaac cugagcccga cgcagacgua 9060
 50 uugaggucca ugcuacaga uccgccccac aucacggcgg agacugcggc gcggcgcuug 9120
 gcacggggau caccuccauc ugaggcgagc uccucaguga gccagcuau agcaccgucg 9180
 cugcgggcca ccugcaccac ccacagcaac accuagacg uggacauggu cgaugccaac 9240
 55 cugcucaugg agggcgguu ggcucagaca gagccugagu ccaggguagg cguucuggac 9300
 uuucucgagc caauggccga ggaagagagc gaccuugagc ccucauacc aucggagugc 9360
 60 augcucccca ggagcggguu uccacgggcc uuaccggcuu gggcacggcc ugacuacaac 9420
 ccgccgcucg uggaauugug gaggaggcca gauuaccaac cggccaccgu ugcugguugu 9480

65

ES 2 346 326 T3

gcucucucccc cccccaagaa ggccccgacg ccucuccccaa ggagacgccg gacagugggu 9540
 cugagcgaga gcaccauauc agaagcccuc cagcaacugg ccaucaagac cuuuggccag 9600
 5 ccccccucga gcggugaugc aggcucgucc acggggggcgg gcgccgccga auccggcggu 9660
 ccgacguccc cuggugagcc ggcccccuca gagacagguu ccgccuccuc uaugcccccc 9720
 10 cucgagggggg agccuggaga uccggaccug gagucugauc agguagagcu ucaaccuccc 9780
 ccccagggggg gggggguagc ucccgguuucg ggucgggggu cuuggucuaac uugcuccgag 9840
 15 gaggacgaua ccaccgugug cugcucaug ucauacuccu ggaccggggc ucuaauaacu 9900
 ccuguaagcc ccgaagagga aaaguugcca aucaaccuu ugaguaacuc gcuguugcga 9960
 uaccuaaaca agguuacug uacaacauca aagagcgccu cacagagggc uaaaaaggua 10020
 20 acuuuugaca ggacgcaagu gcucgacgcc cauuuagacu cagucuuaaa ggacaucaag 10080
 cuagcggcuu ccaaggucag cgcaaggcuc cucaccuugg aggagcgug ccaguugacu 10140
 25 ccaccccauu cugcaagauc caaguaugga uuuggggcca aggagguccg cagcuugucc 10200
 gggagggccg uuaaccacau caaguccgug uggaaggacc uccuggaaga cccacaaaca 10260
 30 ccaauuccca caaccauau ggccaaaaau gagguguucu gcguggacc ccccaagggg 10320
 gguaagaaac cagcucgccu caucguuuac ccugaccucg gcguccgggu cugcgagaaa 10380
 auggccucuc augacauuac aaaaagcuu ccucaggcgg uaaugggagc uuccuauggc 10440
 35 uuccaguacu cccugccca acggguggag uaucucuuga aagcaugggc ggaaaagaag 10500
 gaccccaugg guuuuucgua ugaiaaccga ugcuuagacu caaccgucac ugagagagac 10560
 40 aucaggaccg aggagucau auaccaggcc ugcuccucge ccgaggaggc ccgcacugcc 10620
 auacacucgc ugacugagag acuuuacgua ggagggccca uguucaacag caagggucaa 10680
 45 accugcgguu acagacguug ccgcgccagc ggggugcuua ccacuagcau ggguaacacc 10740
 aucacaugcu augugaaagc ccuagcggcc ugcaaggcug cggggauagu ugcgccaca 10800
 50 augcugguau gcggcgauga ccuaguaguc aucucagaaa gccaggggac ugaggaggac 10860
 gagcggaacc ugagagccuu cacggaggcc augaccaggu acucugcccc uccuggugau 10920
 ccccccagac cggaauauga ccuggagcua auaacauccu guuccucaa ugugucugug 10980
 55 gcguugggcc cgcggggccg ccgcagauac uaccugacca gagaccacac cacuccacuc 11040
 gcccgggcug ccugggaaac aguuagacac ucccuaucua auucauggcu gggaaacauc 11100
 60 auccaguaug cuccaaccu auggguuucg augguccuaa ugacacacuu cuucuccauu 11160
 cucauggucc aagacaccu ggaccagaac cucaacuug agaugnaug aucaguauac 11220

65

ES 2 346 326 T3

uccgugaauc cuuuggaccu uccagccaua auugagaggu uacacgggcu ugacgccuuu 11280
 ucuauhcaca cauacucuca ccacgaacug acgcgggugg cuucagcccu cagaaaacuu 11340
 5 ggggcgccac ccucaggggu guggaagagu cgggcucgcg cagucagggc gucccucauc 11400
 ucccugggag ggaaagcggc cguuugcggc cgauaucucu ucaauugggc ggugaagacc 11460
 10 aagcucaaac ucacuccauu gccggaggcg cgcucacugg acuuauccag uugguucacc 11520
 gucggcgccg gcggggggcg cauuuuucac agcgugucgc gcgcccgcacc ccgcucauuu 11580
 15 cucuucggcc uacuccuacu uuucguaggg guagggcucu uccuacuccc cgcucgguag 11640
 agcggcacac acuagguaca cuccauagcu aacugnuccu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 11700
 uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uucuuuuuuu uuuuuuuucc ucuuuuuucc cuucucaucu 11760
 20 uauucuacuu ucuuuuuugg uggcuccauc uuagcccuag ucacggcuag cugugaaagg 11820
 uccgugagcc gcaugacugc agagagugcc guaacugguc ucucugcaga ucaugu 11876

<210> 26

<211> 11876

<212> ARN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: replicón d ARN derivado del vector de expresión rFGR-JFH1/SEAP/GND

<400> 26

accugccccc aauaggggcg acacuccgcc augaaucau cccugugag gaacuacugu 60
 cuucacgcag aaagcgccua gccauggcgu uaguaugagu gucguacagc cuccaggccc 120
 ccccuucccg ggagagccau aguggucugc ggaaccggug aguacaccgg aauugccggg 180
 aagacugggu ccuuucuuugg auaaaccac ucuaucccg gccauuuggg cgugcccccg 240
 45 caagacugcu agccgaguag cguuggguug cgaaaggccu ugugguacug ccugauaggg 300
 cgcuuugcgag ugccccggga ggucucguag accgugcacc augagcaca auccuaaacc 360

ES 2 346 326 T3

ucaaagaaaa accaaaagaa acaccaaccg acgcguaaug cugcugcugc ugcugcugcu 420
 gggccugagg cuacagcucu ccuggggcau caucccaguu gaggaggaga acccggacuu 480
 5 cuggaaccgc gaggcagccg aggcccgugg ugccgccaaag aagcugcagc cugcacagac 540
 agccgccaaag aaccucauca ucuuccuggg cgauggggaug ggggugucua cggugacagc 600
 10 ugccaggauu cuaaaagggc agaagaagga caaacugggg ccugagauac ccugggccau 660
 ggaccgcuuu ccuaugugg cucuguccaa gacauacaau guagacaaac augugccaga 720
 15 caguggagcc acagccacgg ccuaccugug cggggucaag ggcaacuucc agaccauugg 780
 cuugagugca gccgcccgc uuaaccagug caacacgaca cgcggcaacg aggucaucuc 840
 cgugaugaau cgggccaaaga aagcagggaa gucaguggga gugguaacca ccacacgagu 900
 20 gcagcacgcc ucgccagccg gcaccuacgc ccacacggug aaccgcaacu gguacucgga 960
 cgcgcagcug ccugccucgg cccgccagga ggggugccag gacaucgcuu cgcagcucu 1020
 25 cuccaacaug gacauugacg ugauccuagg ugaggggccg aaguacaugu uucgcauggg 1080
 aacccagac ccugaguacc cagaugacua cagccaaggu gggaccaggc uggacgggaa 1140
 30 gaaucuggug caggaauggc uggcgaagcg ccaggguagg cgguaugugu ggaaccgcac 1200
 ugagcucaug caggcuuccc uggaccgcuc ugugacccau cucauggguc ucuuugagcc 1260
 35 uggagacaug aaauacgaga uccaccgaga cuccacacug gacccucucc ugauggagau 1320
 gacagaggcu gccucgccc ugucagcag gaacccccgc ggcuuuuu ucuucgugga 1380
 gggugugcgc aucgaccaug gucaucauga aagcagggcu uaccgggcac ugacugagac 1440
 40 gaucauguu gacgacgcca uugagagggc gggccagcuc accagcgagg aggacacgu 1500
 gagccucguc acugccgacc acuccacgu cuucuccuuc ggaggcuacc ccugcgagg 1560
 45 gagcucauc uucgggcugg cccugggcaa ggcccgggac aggaaggccu acacgguccu 1620
 ccuaucagg aacgguccag gcuauugucu caaggacggc gcccggccgg auguuaccga 1680
 50 gagcgagagc gggagcccc aguaucggca gcagucagca gugccccugg acgaagagac 1740
 ccacgcaggc gaggacgugg cgguguucgc gcgcggccc caggcgcacc ugguuacgg 1800
 cgucaggag cagaccuua uagcgacgu cauggccuuc gccgccugcc uggagccua 1860
 55 caccgccugc gaccuggcgc ccccgccgg caccaccgac gccgcgcacc cggguuacuc 1920
 uagagucggg gggccggcc gcuucgagca gacaugaguu uaaaccucuu cccucccccc 1980
 60 cccuaacgu uacuggccga agccgcuugg aaauaggccg gugugcguuu gucuauaugu 2040
 uauuuuccac cauauugccg ucuuuuggca augugagggc ccggaaaccu ggccugucu 2100

65

ES 2 346 326 T3

ucuugacgag cauuccuagg ggucuuuucc cucucgccaa aggaaugcaa ggucuguuga 2160
 augucgugaa ggaagcaguu ccucuggaag cuucuugaag acaacaacg ucuguagcga 2220
 5 cccuuugcag gcagcggaac ccccccaccug gcgacaggug ccucugcggc caaaagccac 2280
 guguaaaga uacaccugca aaggcggaac aaccccagug ccacguugug aguuggauag 2340
 10 uuguggaaag agucaaaugg cucuccucaa gcguauucaa caaggggcug aaggauccc 2400
 agaagguacc ccuuguaug ggaucugauc ugggggccucg gugcacaugc uuuaugug 2460
 15 uuugucgag guuaaaaaaa cgucuaaggc ccccgaaaca cggggacgug guuuuccuuu 2520
 gaaaaacacg augauaccuu gagcacaauu ccuaaaccuc aaagaaaaac caaaagaaac 2580
 accaaccguc gccagaaga cguaaaguuc cggggcggcg gccagaucgu uggcggagua 2640
 20 uacuuguugc cgcgcagggg ccccagguug ggugugcgca cgacaaggaa aacuucggag 2700
 cggucccagc caguggggag acgccagccc auccccaag aucggcguc cacugcgaag 2760
 25 gccuggggaa aaccaggucg cccucggccc cuauauggga augagggacu cggcugggca 2820
 ggauggcucc ugucccccg aggcucucgc ccuuccggg gcccaauga cccccggcau 2880
 30 agguccgca acguggguua agucaucgac acccuaacgu guggcuuugc cgaccucaug 2940
 gguuacaucc ccgucguagg cgcgcgcuu aguggcgccg ccagagcugu cgcgcacggc 3000
 gugagagucc ugagggacgg gguaauuuu gcaacaggga accuaccgg uuuccccuuu 3060
 35 ucuauuucu ugcugggccu guuguccugc aucaccguuc cggucucugc ugcccaggug 3120
 aagaauacca guagcagcua cauggugacc aaugacugcu ccaaugacag caucacuug 3180
 40 cagcucgagg cugcgguucu ccacguccc gggugcgucc cgugcgagag aguggggaau 3240
 acgucacggu guugggugcc agucucgcca aacauggcug ugcggcagcc cggugcccuc 3300
 45 acgcaggguc ugcggacgca caucgauaug guugugaugu ccgccaccuu cugcucugcu 3360
 cucuacgugg gggaccucug uggcggggug augcucgagg cccagguguu caucgucug 3420
 ccgcaguacc acugguuugu gcaagaugc aaugcucca ucuaccugg caccaucacu 3480
 50 ggacaccgca uggauggga caugaugaug aacuggcgc ccacggccac caugaucug 3540
 gcguacguga ugcgguccc cgaggucauc auagacauc uuagcggggc ucacuggggc 3600
 55 gucauguucg gcuuggccua cuucucuau caggagcgu gggcgaaggu cauugucauc 3660
 cuucugcugg ccgcuggggu ggacgcgggc accaccaccg uggaggcgc uguugcacgu 3720
 60 uccaccaacg ugauugccgg cguguucagc caugggccuc agcagaacau ucagcucau 3780
 aacaccaacg gcaguuggca caucaaccgu acugccuuga auugcauga cuccuugaac 3840

65

ES 2 346 326 T3

accggcuuuc ucgcggccuu guucuacacc aaccgcuuua acucgucagg guguccaggg 3900
 cgccuguccg ccugccgcaa caucgaggcu uuccggauag gguggggcac ccuacaguac 3960
 5 gaggauaaug ucaccaaucc agaggauaug aggccguacu gcuggcacua ccccccaaag 4020
 ccguguggcg uaguecccg c gaggucugug uguggcccag uguacuguuu cccccccagc 4080
 10 ccgguaguag ugggcacgac cgacagacgu ggagugccca ccuacacaug gggagagaau 4140
 gagacagaug ucuuccuacu gaacagcacc cgaccgccgc agggcucaug guucggcugc 4200
 15 acguggauga acuccacugg uuucaccaag acuuguggcg cgccaccuug ccgcaccaga 4260
 gcugacuua acgccagcac ggacuuguug ugcccuacgg auuguuuuag gaagcauccu 4320
 gaugccacuu auauuaagug ugguucuggg ccugggcuca caccaaagug ccugguccac 4380
 20 uacccuuaca gacucuggca uuaccccugc acagucaauu uuaccaucuu caagauaaga 4440
 auguauguag gggggguuga gcacaggcuc acggccgcau gcaacuucac ucugggggau 4500
 25 cgucgcgacu ugaggagacag ggacaggagu cagcugucuc cucuguugca cucuaccacg 4560
 gauggggcca uccugcccug caccuacuca gacuuacccg cuuugucaac uggucuucuc 4620
 30 caccuucacc agaacaucgu ggacguacaa uacauguauug gccucucacc ugcuaucaca 4680
 aaauacgucg uucgauggga guggguggua cucuuauucc ugcucuagc ggacgccaga 4740
 gucugcgccu gcuuuggau gcucaucuuug uugggccagg ccgaagcagc auuggagaag 4800
 35 uuggucgucu ugcacgugc gagugcggu aacugccaug gccuccuaua uuuugccauc 4860
 uucuuugugg cagcuuggca caucaggggu cggguggucc ccuugaccac cuauugccuc 4920
 40 acuggccuau ggcccuucug ccuacugcuc auggcacugc cccggcaggc uuauugccuau 4980
 gacgcaccug ugcacggaca gauaggcgug gguuuuguu uauugaucac ccucuucaca 5040
 45 cucaccccgg gguauaagac ccuccucggc cagugucugu ggugguugug cuaucuccug 5100
 acccuggggg aagccaugau ucaggagugg guaccaccca ugcaggugcg cggcggccgc 5160
 gauggcaucg cgugggccgu cacuaauuuc ugcccgggug ugguguuuga cauuaccaa 5220
 50 uggcuuuugg cguugcuugg gccugcuuac cucuuaggg ccgcuuugac acauguccg 5280
 uacuucguca gagcucacgc ucugauaagg guaugcgcuu uggugaagca gcucgcgggg 5340
 55 gguagguaug uucagguggc gcuaauuggc cuuggcaggu ggacuggcac cuacaucuau 5400
 gaccaccuca caccuuguc ggacugggcc gcuagcgcc ugcgcgacuu agcggucgcc 5460
 60 guggaacca ucaucuucag uccgauggag aagaaggua ucgucugggg agcggagacg 5520
 gcugcaugug gggacaauu acauggacu cccguguccg cccgacucgg ccaggagauc 5580

65

ES 2 346 326 T3

cuccucggcc cagcugaugg cuacaccucc aaggggugga agcuccuugc ucccacacu 5640
 gcuuauagccc agcaaacacg aggcuccug ggcgccauag uggugaguau gacggggcgu 5700
 5 gacaggacag aacaggccgg ggaaguccaa auccugucca cagucucuca guccuuccuc 5760
 ggaacaacca ucucgggggu uuuguggacu guuuaccacg gagcuggcaa caagacucua 5820
 10 gccggcuuac gggguccggu cacgcagaug uacucgagug cugaggggga cuugguaggc 5880
 uggcccagcc cccuggggac caagucuuug gagccgugca aguguggagc cgucgaccua 5940
 15 uaucugguca cgcggaacgc ugaugucauc ccggcucgga gacgcgggga caagcgggga 6000
 gcauugcucu ccccgagacc cauuucgacc uugaaggggu ccucgggggg gccggugcuc 6060
 ugcccuaggg gccacgucgu ugggcucuuu cgagcagcug ugugcucucg gggcguggcc 6120
 20 aaauccaucg auuucacucc cguugagaca cucgacguug uuacaagguc ucccacuuuc 6180
 agugacaaca gcacgccacc ggcugugccc cagaaccuuc aggucgggua cuugcaugcu 6240
 25 ccaacuggca guggaaagag caccaagguc ccugucgcu augccgcca gggguacaaa 6300
 guacuagugc uuaacccuc gguagcugcc acccuggggu uugggcgua ccuauccaag 6360
 30 gcacauggca ucaauccaa cauuaaggacu ggagucagga ccgugaugac cggggaggcc 6420
 aucacguacu ccacauaugg caaauuucg gccgaugggg gcugcgcuag cggcgccuau 6480
 gacaucauca uaugcgaua augccacgu guggaugua ccuccauuc cggcaucgga 6540
 35 acgguccuug aucaagcaga gacagccggg gucagacuaa cugugcuggc uacggccaca 6600
 ccccccgggu cagugacaac ccccauccc gauuagaag agguaggccu cggcggggag 6660
 40 ggugagauc ccuucuaugg gagggcgauu ccccauucc gcaucaaggg agggagacac 6720
 cugauuuucu gccacucaaa gaaaaagugu gacgagcucg cggcgggccu ucggggcaug 6780
 45 ggcuugaug ccguggcaua cuauagaggg uuggacgucu ccuaauacc agcucaggga 6840
 gauguggugg ucgucgccac cgacggccuc augacggggu acacuggaga cuuugacucc 6900
 gugaucgacu gcaauguagc ggucacccaa gcugucgacu ucagccugga cccaccuuc 6960
 50 acuauaacca cacagacugu cccacaagac gcugucucac gcagucagcg ccgcgggcgc 7020
 acagguagag gaagacaggg cacuuauagg uauguuucca cuggugaacg agccucagga 7080
 55 auguuugaca guguagugcu uuugagugc uacgacgcag gggcugcgug guacgaucuc 7140
 acaccagcgg agaccaccgu caggcuuaga gcuauuuca acacggccgg ccuaccgug 7200
 60 ugucaagacc aucuugaauu uugggaggca guuuucaccg gccucacaca cauagacgcc 7260
 cacuuccucu cccaaacaaa gcaagcgggg gagaacuucg cguaccuagu agccuaccaa 7320

65

ES 2 346 326 T3

gcuacggugu gcgccagagc caaggccccc ccccguccu gggacgccau guggaagugc 7380
 cuggcccgac ucaagccuac gcuugcgggc cccacaccuc uccuguaccg uuugggccc 7440
 5 auuaccaaug agguacccu cacacaccu gggacgaagu acaucgccac augcaugcaa 7500
 gcugaccuug aggucaugac cagcacgugg guccuagcug gaggaguccu ggcagccguc 7560
 10 gccgcuaauu gccuggcgac uggaugcguu uccaucaucg gccgcuugca cgucaaccag 7620
 cgagucgucg uugcgccgga uaaggagguc cuguauagagg cuuuugauga gauggaggaa 7680
 15 ugcgccucua gggcgccucuc caucgaagag gggcagcgga uagccgagau guugaagucc 7740
 aagauccaag gcuugcugca gcaggccucuc aagcaggccc aggacauaca acccgcuau 7800
 caggcuucau ggcccaaagu ggaacaauuu ugggccagac acauguggaa cuucauuagc 7860
 20 ggcauccaau accucgcagg auugucaaca cugccaggga acccgcggu ggcuuuccaug 7920
 auggcuuca gugccgccc caccaguccg uugucgacca guaccaccau ccuucuaac 7980
 25 aucaugggag gcugguuagc gucccagauc gcaccaccg cgggggccac cggcuuuguc 8040
 gucaguggcc ugguuggggc ugccgugggc agcauaggcc ugguuaaggu gcugguggac 8100
 30 auccuggcag gauauugguc gggcauuucg ggggcccucg ucgcauucaa gaucaugucu 8160
 ggcgagaagc ccucuaugga agaungauc aaucuaucg cugggauccu gucuccggga 8220
 gccuuggugg uggggguc auugcgggc auucugcgc gccacguggg accgggggag 8280
 35 ggcgcggucc aauggaugaa caggcuuauu gccuuugcuu ccagaggaaa ccacgucgc 8340
 ccuacucacu acgugacgga gucggaugcg ucgcagcgug ugaccaacu acuuaggcuc 8400
 40 cuuacuauaa ccagccuacu cagaagacuc cacaauugga uaacugagga cugccccauc 8460
 ccaugcuccg gaucuggcuc ccgcgacgug ugggacuggg uuugcaccu cuugacagac 8520
 45 uucaaaaauu ggcugaccuc uaaaauuguu cccaagcugc ccggccuccc cuucaucuc 8580
 ugucaaaagg gguacaaggg ugugugggc ggcacuggca ucaugaccac gcgcugccc 8640
 ugccggcga acaucucugg caauguccg cugggcucua ugaggauca agggccuaaa 8700
 50 accugcauga acaccuggca ggggaccuuu ccuaucauu gcuacacgga gggccaguc 8760
 gcgccgaaac ccccccagaa cuacaagacc gccaucugga ggguggcggc cucggaguac 8820
 55 gcggagguga cgcagcaugg gucguacuc uauguaacag gacugaccac ugacaauuc 8880
 aaaaauuccu gccaaucacc uuuccagag uuuuucuccu ggguggacgg ugugcagauc 8940
 60 cauagguuug caccacacc aaagccguu uuccgggaug agguucguu cugcguuggg 9000
 cuaaaauccu augcugucgg gucccagcu cccugugaac cugagccga cgcagacgua 9060

65

ES 2 346 326 T3

uuagaggucca ugcuaacaga uccgccccac aucacggcgg agacugcggc gcggcgcuug 9120
 gcacggggau caccuccauc ugaggcgagc uccucaguga gccagcuau agcaccgucg 9180
 5 cugcggggcca ccugcaccac ccacagcaac accuaugacg uggacauggu cgaugccaac 9240
 cugcucaugg agggcgguu ggcucagaca gagccugagu ccagggugcc cguucuggac 9300
 10 uuucucgagc caauggccga ggaagagagc gaccuugagc ccucaauacc aucggagugc 9360
 augcucccca ggagcggguu uccacgggcc uuaccggcuu gggcacggcc ugacuacaac 9420
 15 ccgccgcucg uggaauugug gaggaggcca gauuaccaac cggccaccgu ugcugguugu 9480
 gcucuccccc ccccaagaa ggccccgacg ccuccccaa ggagacggcg gacagugggu 9540
 cugagcgaga gcaccauauc agaagcccuc cagcaacugg ccaucaagac cuuuggccag 9600
 20 cccccucga gcggugaugc aggcucgucc acggggcgcg gcgccgccga auccggcggu 9660
 ccgacguccc cuggugagcc ggccccuca gagacagguu ccgccuccuc uaugccccc 9720
 25 cucgaggggg agccuggaga uccggaccug gagucugauc agguagagcu ucaaccuccc 9780
 ccccaggggg gggggguagc ucccggguug ggcucggggg cuuggucuac uugcuccgag 9840
 30 gaggacgaa ccaccgugug cugcucaug ucauacuccu ggaccggggc ucaauaacu 9900
 ccugugagcc ccgaagagga aaaguugcca aucaaccuu ugaguaacuc gcuguugcga 9960
 35 uaccuaaca agguguacug uacaacauca aagagcgccu cacagagggc uaaaaggua 10020
 acuuuugaca ggacgcaagu gcucgacgcc cauuugacu cagucuuaa ggacaucaag 10080
 cuagcggcuu ccaaggucag cgcaaggcuc cucaccuugg agggaggcgug ccaguugacu 10140
 40 ccaccccau cugcaagauc caaguaugga uucggggcca agggagguccg cagcuugucc 10200
 gggagggccg uuaaccacau caaguccgug uggaaggacc uccuggaaga cccacaaaca 10260
 45 ccaauuccca caaccacau ggccaaaaau gagguguucu gcguggacc cgcgaagggg 10320
 gguaagaaac cagcucgccu caucguuuac ccugaccucg gcguccgggu cugcgagaaa 10380
 50 auggccucu augacauuac aaaaagcuu ccucaggcgg uaaugggagc uuccuauaggc 10440
 uuccaguacu cccugccca acggguggag uaucucuuga aagcaugggc ggaaaagaag 10500
 gaccccaugg guuuuucgua ugauaccga ugcuuugacu caaccgucac ugagagagac 10560
 55 aucaggaccg aggaguccau auaccaggcc ugcuccucg ccgaggaggc ccgcacugcc 10620
 auacacucgc ugacugagag acuuuacgua ggaggggcca uguucaacag caagggucaa 10680
 60 accugcgguu acagacguug ccgcgccagc ggggugcuua ccacuagcau ggguaacacc 10740
 aucacaugcu augugaaagc ccuagcggcc ugcaaggcug cggggauagu ugcgccaca 10800
 65

ES 2 346 326 T3

augcugguau gcggcaauga ccuaguaguc aucucagaaa gccagggggac ugaggaggac 10860
 gagcgggaacc ugagagccuu cacggaggcc augaccaggu acucugcccc uccuggugau 10920
 5 ccccccagac cggaauauga ccuggagcua auaacauccu guuccucaa ugugucugug 10980
 gcguuggggc cgcgggggccg ccgcagauac uaccugacca gagaccaac cacuccacuc 11040
 10 gcccgggcug ccugggaaac aguuagacac ucccuauc auucauggcu gggaaacauc 11100
 auccaguaug cuccaaccau auggguuugc augguccuaa ugacacacuu cuucuccauu 11160
 15 cucaugguuc aagacacccu ggaccagaac cucaacuug agaugnaug aucaguauc 11220
 uccgugaau c uuuggaccu uccagccaua auugagaggu uacacgggcu ugacgccuuu 11280
 ucuaugcaca cauacucua ccacgaacug acgcggggug cuucagcccu cagaaaacuu 11340
 20 ggggcggccac ccucaggggu guggaagagu cgggcucgcg cagucagggc gucccucauc 11400
 ucccguggag ggaaagcggc cguuugcggc cgauaucucu ucaauugggc ggugaagacc 11460
 25 aagcucaaac ucacuccauu gccggaggcg cgccuacug acuaucacag uugguuacac 11520
 gucggcgccg gcggggggcg cauuuuucac agcgugucgc gcgcccagacc ccgcucauuu 11580
 30 cucuucggcc uacuccuacu uuucguagg guaggccucu uccuacucce cgcucggug 11640
 agcggcacac acuagguaca cuccauagcu aacuguuucc uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 11700
 35 uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuucc uuuuuuuucc cuucucaucu 11760
 uauucuaucu ucuuuucugg ugguccauuc uuagcccuag ucacggcuag cugugaaagg 11820
 40 uccgugagcc gcaugacugc agagagugcc guaacugguc ucucugcaga ucaugu 11876

45

50

55

60

65