

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 869 575**

51 Int. Cl.:

A61K 35/76	(2015.01) A61K 48/00	(2006.01)
A61K 31/7088	(2006.01)	
A61K 39/29	(2006.01)	
A61P 1/16	(2006.01)	
A61P 31/14	(2006.01)	
C12N 7/01	(2006.01)	
C12N 15/09	(2006.01)	
G01N 33/576	(2006.01)	
C12N 15/863	(2006.01)	
C07H 21/00	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.11.2015 PCT/JP2015/082327**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.05.2016 WO16076441**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.11.2015 E 15859816 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.03.2021 EP 3219323**

54 Título: **Composición farmacéutica para el tratamiento y/o la prevención de la hepatitis C**

30 Prioridad:

11.11.2014 JP 2014229283

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.10.2021

73 Titular/es:

**NOBELPHARMA CO., LTD. (100.0%)
1-17-24, Shinkawa, Chuo-ku
Tokyo 104-0033, JP**

72 Inventor/es:

**KOHARA, MICHINORI;
YASUTOMI, YASUHIRO y
SHIOGAMA, YUMIKO**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 869 575 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición farmacéutica para el tratamiento y/o la prevención de la hepatitis C

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica para tratar y/o prevenir la hepatitis C.

Antecedentes de la técnica

10 Dos millones de personas padecen del virus de la hepatitis C (VHC) en Japón, entre ellos 36.000 personas desarrollan carcinoma hepatocelular cada año donde muchos de dichos pacientes con cáncer terminan muriendo. Aunque actualmente el interferón (IFN) se usa como un fármaco anti-VHC, su efecto es limitado y está asociado con serios efectos secundarios. Por lo tanto, ha habido una necesidad del desarrollo de un fármaco más seguro y más eficaz.

15 Además, es necesario una acción urgente puesto que el riesgo de desarrollar cáncer está incrementando con el envejecimiento de los pacientes infectados.

En las circunstancias actuales, se han desarrollado y usado fármacos para suprimir la replicación del virus VHC tal como análogos de ácido nucleico e inhibidores de la proteasa para el tratamiento. Cuando se usan estos fármacos para el tratamiento, sin embargo, es probable que surja un virus resistente a fármaco y el mecanismo de acción de los fármacos sugiere que la eliminación completa del virus es difícil y por tanto se requiere medicación de por vida. Recientemente, se ha desarrollado y usado un fármaco anti-VHC altamente activo pero el coste del tratamiento es muy alto como unos 800.000-1.200.000 yenes por ciclo, lo que limita el número de pacientes que pueden recibir este tratamiento. En tales circunstancias, encarecidamente se ha requerido el establecimiento de un tratamiento curativo seguro y económico que permita la retirada o la liberación de la medicación de por vida.

Los presentes inventores han establecido recursos de investigación que se relacionan con la investigación del VHC y han establecido diferentes sistemas experimentales modelos preparando clones infecciosos de ADNc del VHC y estableciendo animales infecciosos tales como ratones transgénicos y ratones quiméricos de hígado humano que pueden desarrollar la hepatitis C (por ejemplo, véase el documento no de patente 1: Wakita T., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 1998, vol.273, pp. 9.001-9.006). Las características principales de la infección por VHC incluyen una alta tasa de infección persistente y transmisión para el desarrollo de hepatitis crónica. Durante un largo periodo de tiempo, los presentes inventores se han dedicado al serio análisis e investigación de este mecanismo desde el punto de vista de la adquisición y el déficit en la tolerancia inmunitaria usando el sistema experimental modelo anteriormente descrito y demás (por ejemplo, véase en el documento no de patente 2: Inoue K., *et al.*, *Hepatology*, 2007, vol.45, pp. 921-928).

Hasta ahora se han realizado muchos intentos de desarrollar una vacuna para prevenir la infección por VHC pero no se ha conseguido prevenir por completo la infección (por ejemplo, véase el documento no de patente 3: Choo QL., *et al.*, *Pros. Natl. Acad. Sci.* 1994, vol.91, pp. 1.294-1.298, Documento no de patente 4: Puig M., *et al.*, *Vaccine* 2004, vol.22, pp. 991-1000, Documento no de patente 5: Abraham JD., *Vaccine* 2004, vol.22, pp. 3.917-3.928 y el documento no de patente 6: Elmowalid GA., *et al.*, *Pros. Natl. Acad. Sci.* 2007, vol.104, pp.8.427-8.432).

En general, se conoce un denominado método de sensibilización-refuerzo (*prime-boost*) como método para inducir fuertemente la inmunidad mediada por célula, en el que se realiza una inmunización primaria con una vacuna de ADN y, a continuación, una inmunización de refuerzo con un virus vaccinia recombinante (vacuna vaccinia) (por ejemplo, véase el documento no de patente 7: Houghton M., *Immunol. Rev.*, enero de 2011, vol.239(1), p.99-108).

Sumario de la invención

50 En estas circunstancias, se ha deseado el desarrollo de técnicas de tratamiento y prevención que puedan inducir inmunidad mediada por célula más fuerte contra la hepatitis C y que sean eficaces en la eliminación completa del VHC.

La presente invención se hizo considerando tales circunstancias y proporciona una composición farmacéutica para su uso en un método para tratar y/o prevenir la hepatitis C y demás como se describe más adelante.

(1) Una composición farmacéutica que comprende un primer virus vaccinia recombinante y

(i) un vector recombinante; o
60 (ii) un virus vaccinia recombinante adicional,

para su uso en un método para tratar y/o prevenir la hepatitis C, en donde el método comprende

(a) administrar el primer virus vaccinia recombinante para una inmunización primaria y, a continuación, el vector recombinante o el virus vaccinia recombinante adicional para una inmunización de refuerzo; o
65 (b) administrar el vector recombinante para una inmunización primaria y, a continuación, el primer virus vaccinia

recombinante para una inmunización de refuerzo;

en donde el primer virus vaccinia recombinante comprende un promotor de expresión, y todo o una parte del ADNc del genoma del virus de la hepatitis C;

en donde el vector recombinante o el virus vaccinia recombinante adicional comprende un promotor de expresión, y todo o una parte del ADNc del genoma del virus de la hepatitis C siempre que tenga una secuencia de nucleótidos que difiera de la de todo o una parte del ADNc del genoma del virus de la hepatitis C contenido en el primer virus vaccinia recombinante;

y en donde

(A) el ADNc del primer virus vaccinia recombinante comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína estructural del virus de la hepatitis C y el ADNc del vector recombinante o el ADNc del virus vaccinia recombinante adicional comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína no estructural del virus de la hepatitis C; o

(B) el ADNc del primer virus vaccinia recombinante comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína no estructural del virus de la hepatitis C y el ADNc del vector recombinante o el ADNc del virus vaccinia recombinante adicional comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína estructural del virus de la hepatitis C.

(2) Una composición farmacéutica que comprende un primer virus vaccinia recombinante para su uso en un método para tratar y/o prevenir la hepatitis C, en donde el método comprende

(a) administrar el primer virus vaccinia recombinante para una inmunización primaria y, a continuación, administrar

(i) un vector recombinante; o

(ii) un virus vaccinia recombinante adicional

para una inmunización de refuerzo; o

(b) administrar un vector recombinante para una inmunización primaria y, a continuación, administrar el primer virus vaccinia recombinante para una inmunización de refuerzo;

en donde el primer virus vaccinia recombinante comprende un promotor de expresión, y todo o una parte del ADNc del genoma del virus de la hepatitis C;

y en donde el vector recombinante o el virus vaccinia recombinante adicional comprende un promotor de expresión, y todo o una parte del ADNc del genoma del virus de la hepatitis C, siempre que tenga una secuencia de nucleótidos que difiera de la de todo o una parte del ADNc del genoma del virus de la hepatitis C contenido en el virus vaccinia recombinante,

y en donde

(A) el ADNc del primer virus vaccinia recombinante comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína estructural del virus de la hepatitis C y el ADNc del vector recombinante o el ADNc del virus vaccinia recombinante adicional comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína no estructural del virus de la hepatitis C; o

(B) el ADNc del primer virus vaccinia recombinante comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína no estructural del virus de la hepatitis C y el ADNc del vector recombinante o el ADNc del virus vaccinia recombinante adicional comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína estructural del virus de la hepatitis C.

(3) Una composición farmacéutica que comprende un vector recombinante para su uso en un método para tratar y/o prevenir la hepatitis C, en donde el método comprende

(a) administrar un virus vaccinia recombinante para una inmunización primaria y, a continuación, administrar el vector recombinante para una inmunización de refuerzo; o

(b) administrar el vector recombinante para una inmunización primaria y, a continuación, administrar un virus vaccinia recombinante para una inmunización de refuerzo;

en donde el virus vaccinia recombinante comprende un promotor de expresión, y todo o una parte del ADNc del genoma del virus de la hepatitis C;

y en donde el vector recombinante comprende un promotor de expresión, y todo o una parte del ADNc del genoma del virus de la hepatitis C, siempre que tenga una secuencia de nucleótidos que difiera de la de todo o una parte del ADNc del genoma del virus de la hepatitis C contenido en el virus vaccinia recombinante,

y en donde

(A) el ADNc del virus vaccinia recombinante comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína estructural del virus de la hepatitis C y el ADNc del vector recombinante comprende una secuencia de

nucleótidos que codifica una proteína no estructural del virus de la hepatitis C; o

(B) el ADNc del virus vaccinia recombinante comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína no estructural del virus de la hepatitis C y el ADNc del vector recombinante comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína estructural del virus de la hepatitis C.

5 (4) La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los anteriores puntos (1) a (3), en donde los ADNc del genoma del virus de la hepatitis C codifican independientemente una proteína estructural del virus de la hepatitis C, una proteína no estructural del virus de la hepatitis C, o una proteína estructural y una proteína no estructural del virus de la hepatitis C.

10 (5) La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los anteriores puntos (1) a (3), en donde los ADNc del genoma del virus de la hepatitis C son cada uno independientemente cualquier ADN de los siguientes (a)-(f):

- 15 (a) ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO:1;
- (b) ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el 90 % o más de identidad con el ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO:1 y que codifica una proteína estructural y una proteína no estructural del virus de la hepatitis C;
- (c) ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO:2;
- 20 (d) ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el 90 % o más de identidad con el ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO:2 y que codifica una proteína estructural y una proteína no estructural del virus de la hepatitis C;
- (e) ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO:3; o
- (f) ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el 90 % o más de identidad con el ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO:3 y que codifica una proteína
- 25 estructural y una proteína no estructural del virus de la hepatitis C.

(6) La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los anteriores puntos (1) a (5), en donde uno o más de los promotores de expresión es un promotor híbrido.

30 (7) La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con el anterior punto (6), en donde la secuencia de nucleótidos del promotor híbrido es ADN de los siguientes (a) o (b):

- (a) ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO:4; o
- (b) ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el 90 % o más de identidad con el ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO:4 y que tiene actividad promotora.

35 (8) La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los anteriores puntos (1) a (7), en donde el virus vaccinia recombinante, el primer virus vaccinia recombinante y/o el virus vaccinia recombinante adicional es la cepa LC16m8.

40 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un diagrama que muestra estructuras génicas de ratones modelo de la hepatitis C, una vacuna de ADN que expresa el gen del VHC y un virus vaccinia recombinante.

45 La Figura 2 es un diagrama de los resultados que muestra que una vacuna de sensibilización-refuerzo que comprende una combinación de una vacuna de ADN del VHC y rVV indujo la reacción de inmunidad mediada por célula específica al VHC en ratones Tg codificadores del VHC de longitud parcial.

La Figura 3 es un diagrama de los resultados que muestra que una vacuna de sensibilización-refuerzo que comprende una combinación de una vacuna de ADN del VHC y rVV redujo el nivel de expresión de la proteína central (*core*) en el hígado a un mayor alcance que una vacuna de ADN sola.

50 La Figura 4 es una fotografía que muestra los resultados del examen morfológico de los hígados después de una administración de vacuna de sensibilización-refuerzo en ratones Tg codificadores del VHC de longitud parcial.

La Figura 5 es un diagrama de los resultados que muestra que la activación de la inmunidad mediada por célula específica era débil incluso con una vacuna de sensibilización-refuerzo en ratones Tg codificadores del VHC de longitud completa.

55 La Figura 6 es un diagrama que muestra un proceso para desarrollar una novedosa vacunación de sensibilización-refuerzo.

La Figura 7 es un diagrama de los resultados (parte 1) que muestra que una combinación de una vacuna de ADN y un virus vaccinia recombinante (vacuna vaccinia recombinante) que tienen diferentes regiones activó la inmunidad mediada por célula específica a un mayor alcance en ratones Tg codificadores del VHC de longitud parcial.

60 La Figura 8 es un diagrama de los resultados (parte 2) que muestra que las combinaciones de una vacuna de ADN y un virus vaccinia recombinante (vacuna vaccinia recombinante) que tienen diferentes regiones activó la inmunidad mediada por célula específica a un mayor alcance en ratones Tg codificadores del VHC de longitud parcial.

65 La Figura 9 es un diagrama de los resultados que muestra que una combinación de una vacuna de ADN de N25 y CN2-rVV activó la inmunidad mediada por célula específica incluso en ratones Tg codificadores del VHC de

longitud completa fuertemente inmunodeprimidos.

La Figura 10 son fotografías que muestran los resultados del examen morfológico de los hígados de ratón después de una administración de vacuna de sensibilización-refuerzo en ratones Tg codificadores del VHC de longitud completa Rz15. En referencia a las figuras, el grupo rVV-N25 se refiere a aquellos administrados con ADN de N25 (vacuna primaria) y N25 rVV (vacuna de refuerzo), el grupo VHC-N25 se refiere a aquellos administrados con ADN de N25 (vacuna primaria) y ADN de N25 (vacuna de refuerzo), y el grupo de vacuna de sensibilización-refuerzo se refiere a aquellos administrados con ADN de N25 (vacuna primaria) y CN2-rVV (vacuna de refuerzo).

Modos para llevar a cabo la invención

A continuación en el presente documento, la presente invención se describirá en detalle. El alcance de la presente invención no debe estar limitado a estas descripciones y la presente invención puede modificarse apropiadamente y llevarse a cabo de una manera diferente de los siguientes ejemplos.

1. Sumario de la invención

Como se ha descrito anteriormente, la presente invención es una composición farmacéutica para su uso en un método para tratar y/o prevenir la hepatitis C (a continuación en el presente documento, también se refiere como una "composición farmacéutica de la presente invención") que comprende un (a) virus vaccinia recombinante de más adelante y un (b) vector recombinante, o un (c) virus vaccinia recombinante de más adelante y un (d) virus vaccinia recombinante de más adelante,

en donde uno cualquiera del (a) virus vaccinia recombinante de más adelante o el (b) vector recombinante de más adelante se administra para una inmunización primaria y, a continuación, el otro para una inmunización de refuerzo, o alternativamente uno cualquiera del (c) virus vaccinia recombinante de más adelante o el (d) virus vaccinia recombinante de más adelante se administra para una inmunización primaria y, a continuación, el otro para una inmunización de refuerzo. En este caso, los (a), (c) y (d) de más adelante generalmente se refieren a las denominadas vacunas vaccinia mientras que el (b) de más adelante generalmente se refiere a una denominada vacuna de ADN, pero ambos no se limitan particularmente a los mismos:

- (a) un virus vaccinia recombinante que comprende un promotor de expresión, y todo o una parte del ADNc del genoma del virus de la hepatitis C;
- (b) un vector recombinante que comprende un promotor de expresión, y todo o una parte del ADNc del genoma del virus de la hepatitis C (siempre que tenga una secuencia de nucleótidos que difiera de la de todo o una parte del ADNc del genoma del virus de la hepatitis C contenido en el (a) virus vaccinia recombinante);
- (c) un virus vaccinia recombinante que comprende un promotor de expresión, y todo o una parte del ADNc del genoma del virus de la hepatitis C;
- (d) un virus vaccinia recombinante que comprende un promotor de expresión, y todo o una parte del ADNc del genoma del virus de la hepatitis C (siempre que tenga una secuencia de nucleótidos que difiera de la de todo o una parte del ADNc del genoma del virus de la hepatitis C contenido en el (c) virus vaccinia recombinante).

Con el fin de inducir más fuertemente inmunidad mediada por célula, un método de sensibilización-refuerzo convencionalmente conocido generalmente emplea un método para tratar o prevenir inmunológicamente la enfermedad infecciosa o similar, en el que se conduce primero una inmunización primaria con una vacuna de ADN que es seguida por una inmunización de refuerzo con un virus vaccinia recombinante (vacuna vaccinia) (documento no de patente 7 previamente citado, etc.). De acuerdo con este método de sensibilización-refuerzo convencionalmente conocido, el uso de los ADN que tienen secuencias de nucleótidos sustancialmente idénticas (usar los ADN de la misma región del ADNc del genoma) para ADN incorporado en una vacuna de ADN usada para una inmunización primaria (ADN derivado del ADNc del genoma del virus causante o similar) así como el ADN incorporado en un virus vaccinia recombinante usado para una inmunización de refuerzo ha sido un conocimiento técnicamente común para los expertos en la materia.

Los presentes inventores, sin embargo, encontraron que se podía inducir inmunidad mediada por célula específica más significativa y más fuerte cuando se usaban ADN que tenían diferentes secuencias de nucleótidos (usando ADN de diferentes regiones del ADNc del genoma del virus causante o similar) como ADN incorporado en una vacuna para una inmunización primaria y ADN incorporado en una vacuna para una inmunización de refuerzo, que cuando se usaban los ADN de la misma región, lo cual era totalmente inesperado antes. También encontraron que este efecto era más notable en un modelo animal (ratón transgénico) que expresaba el gen del VHC de longitud completa es decir era menos susceptible de inmuoestimulación. Los presentes inventores además encontraron que este notable efecto podía conseguirse usando la vacuna de ADN y el virus vaccinia recombinante (vacuna vaccinia) para la inmunización primaria y la inmunización de refuerzo de cualquier manera, y también usando virus vaccinia recombinante (vacunas vaccinia) para tanto la inmunización primaria como la inmunización de refuerzo, lo cual ha sido totalmente inesperado en los métodos de sensibilización-refuerzo convencionales. La presente invención se logró en base a estos diferentes descubrimientos conseguidos por intensos y continuos experimentos e investigaciones realizados por los presentes inventores.

2. Vacuna vaccinia (virus vaccinia recombinante)

Los virus vaccinia recombinantes de (a), (c) y (d) mencionados en el anterior punto 1 (en concreto, los virus vaccinia recombinantes del VHC; las denominadas vacunas vaccinia) y un método para preparar los mismos se describirán más adelante.

Todos los genes que codifican la proteína del virus de la hepatitis C (VHC), los genes que codifican las regiones proteicas estructurales que construyen la cápside y los genes que codifican las regiones proteicas no estructurales implicadas en la replicación ya han sido clonadas e insertadas en plásmidos. Por lo tanto, los genes contenidos en un virus vaccinia recombinante de la presente invención pueden obtenerse por una técnica de ingeniería genética habitual. Por ejemplo, puede emplearse un método de síntesis de ácido nucleico que use un sintetizador de ADN comúnmente usado como técnica de ingeniería genética. Como alternativa, puede emplearse una técnica de PCR en la que se aísla una secuencia del gen y se sintetiza como un molde y, a continuación, se diseñan cebadores específicos para cada gen para amplificar la secuencia del gen con un equipo de PCR, o una técnica de amplificación del gen que usa un vector de clonación. Los métodos anteriormente descritos fácilmente pueden llevarse a cabo por los expertos en la materia en referencia a "Molecular cloning, A Laboratory Manual" 3ª Edición. (Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001)) o similar. El producto resultante de la PCR puede purificarse empleando un método conocido.

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, el gen del VHC anteriormente descrito insertado dentro del plásmido (genotipo 1b; ácidos nucleicos n.º 1-9.611; número de registro de DDBJ/EMBL/GenBank; AY045702) puede usarse como un molde. La PCR puede llevarse a cabo usando ADNc del gen del VHC como un molde y cebadores específicos al gen del VHC para preparar cada una de las regiones del gen del VHC. De acuerdo con la presente invención, todos las regiones del gen del VHC se denominan "CN5", los genes que codifican básicamente las regiones proteicas estructurales de una proteína estructural que construye la cápside (parcialmente incluido un gen que codifica una región proteica no estructural) se denominan "CN2", y los genes que codifican básicamente las regiones proteicas no estructurales implicadas en la replicación (parcialmente incluido un gen que codifica una región proteica estructural (específicamente, una parte de la región E2 (pero no la región E2 de longitud completa) y la región p7)) se denominan "N25".

Las secuencias de nucleótidos de CN2, N25 y CN5 están representadas por las SEQ ID NO: 1, 2 y 3, respectivamente. Además del ADN que tiene las secuencias de nucleótidos representada por las SEQ ID NO:1-3, también pueden usarse en la presente invención los siguientes ADN.

El ADN que hibrida con el ADN que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO:1 en condiciones rigurosas y que codifica una proteína estructural y una proteína no estructural del virus de la hepatitis C (variante de ADN de CN2).

El ADN que hibrida con el ADN que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO:2 en condiciones rigurosas y que codifica una proteína estructural y una proteína no estructural del virus de la hepatitis C (variante de ADN de N25).

El ADN que hibrida con el ADN que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO:3 en condiciones rigurosas y que codifica una proteína estructural y una proteína no estructural del virus de la hepatitis C (variante de ADN de CN5).

En el presente documento, la expresión "que codifica una proteína estructural del virus de la hepatitis C" significa que codifica una proteína que construye la cápside del virus, específicamente, codifica al menos la región central, la región E1 y la región E2. Adicionalmente, la expresión "que codifica una proteína no estructural del virus de la hepatitis C" significa que codifica una proteína generada en la célula tras la proliferación del virus, específicamente para codificar al menos la región NS2, la región NS3, la región NS4a, la región NS4b, la región NS5a y la región NS5b. Además, la expresión "que codifica una proteína estructural y una proteína no estructural del virus de la hepatitis C" significa que codifica una proteína que construye la cápside del virus así como una proteína generada en la célula tras la proliferación del virus, específicamente para codificar al menos la región central, la región E1, la región E2, la región NS2, la región NS3, la región NS4a, la región NS4b, la región NS5a y la región NS5b.

Además, los genes que codifican las proteínas estructurales y los genes que codifican las proteínas no estructurales anteriormente descritos comprenden secuencias de longitud completa así como secuencias parciales de las mismas.

En el caso de CN2, no tiene que ser de una longitud completa y puede ser una parte de la misma siempre que contenga todas o algunas de la región central, la región E1, la región E2, la región p7 y la región NS2 (o una parte de la misma). Por ejemplo, la región E1 (589°-1.164°) y la región E2 (1.165°-2.253°) pueden usarse entre la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO:1.

En el caso de N25, no tiene que ser de una longitud completa y puede ser una parte de la misma siempre que contenga todas o alguna de la región E2 (específicamente una parte de la misma), la región p7, la región NS2, la región NS3, la región NS4a, la región NS4b, la región NS5a y la región NS5b. Por ejemplo, la región NS2 (805°-1.455°) y la región NS3 (1.456°-3.348°) pueden usarse entre la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO:2.

En el caso de CN5, no tiene que ser de una longitud completa y puede ser una parte de la misma siempre que contenga todas o algunas de la región central, la región E1, la región E2, la región p7, la región NS2, la región NS3, la región NS4a, la región NS4b, la región NS5a y la región NS5b. Por ejemplo, la región E1 (589°-1.164°), la región E2 (1.165°-2.253°), la región NS2 (2.443°-3.093°) y la región NS3 (3.094°-4.986°) pueden usarse entre la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO:3.

Las variantes de ADN anteriormente descritas pueden obtenerse por síntesis química o de una biblioteca de ADNc o una biblioteca genómica mediante una técnica de hibridación conocida tal como la hibridación en colonia, la hibridación en placa o la transferencia tipo Southern que usa ADN que tiene la secuencia de nucleótidos representada por las SEQ ID:1-3 o un fragmento de la misma como sonda. Ejemplos de las condiciones rigurosas empleadas en la hibridación anteriormente descrita incluyen 0,1 x SSC-10 x SSC, SDS al 0,1 %-1,0 % y 20 °C-80 °C. Más específicamente, las condiciones pueden incluir hibridación previa a 37 °C-56 °C durante 30 minutos o más, seguido de 1-3 veces de lavado en 0,1 x SSC, SDS al 0,1 % a temperatura ambiente durante 10-20 minutos. Para un procedimiento más detallado de la técnica de hibridación, véase "Molecular Cloning, A Laboratory Manual" 3ª Edición (Cold Spring Harbor Press (2001)) o demás.

Como alternativa, también puede usarse el ADN que tiene 50 % o más, 60 % o más, 70 % o más, 80 % o más, 90 % o más, 95 % o más, 98 % o más o 99 % o más de homología (identidad) con la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO:1 y que codifica una proteína estructural y una proteína no estructural del virus de la hepatitis C (variante de ADN de CN2); el ADN que tiene 50 % o más, 60 % o más, 70 % o más, 80 % o más, 90 % o más, 95 % o más, 98 % o más o 99 % o más de homología (identidad) con la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO:2 y que codifica una proteína estructural y una proteína no estructural del virus de la hepatitis C (variante de ADN de N25); o el ADN que tiene 50 % o más, 60 % o más, 70 % o más, 80 % o más, 90 % o más, 95 % o más, 98 % o más o 99 % o más de homología (identidad) con la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO:3 y que codifica una proteína no estructural y una proteína estructural del virus de la hepatitis C (variante de ADN de CN5).

Un promotor contenido en el virus vaccinia recombinante de la presente invención es un promotor híbrido que comprende un cuerpo de inclusión tipo A de poxvirus (ATI) y repeticiones en tandem del promotor de expresión temprana de la proteína del virus vaccinia de 7,5 kDa (p7.5) dentro de la región del gen de la hemaglutinina (HA) del virus vaccinia. Este promotor puede estar ligado a un plásmido adecuado. Por ejemplo, se conoce pBMSF7C (*Arch. Virol.* 138, 315-330, 1994; Publicación de solicitud de patente pendiente de examen japonesa n.º Heisei 6-237773).

Una secuencia de nucleótidos de un promotor híbrido que puede usarse en la presente invención está representada por la SEQ ID NO:4. Además del ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO:4, el ADN que hibrida con el ADN que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO:4 en condiciones rigurosas y que tiene actividad promotora también puede usarse en la presente invención. Las "condiciones rigurosas" son las mismas que las anteriormente descritas. La expresión "que tiene actividad promotora" significa que tiene actividad para iniciar la transcripción de un gen que codifica una proteína estructural o una proteína no estructural. Adicionalmente, también puede usarse el ADN que tiene 50 % o más, 60 % o más, 70 % o más, 80 % o más, 90 % o más, 95 % o más, 98 % o más o 99 % o más de homología (identidad) con la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO:4 y que tiene actividad promotora.

Este promotor híbrido puede expresar una gran cantidad de proteína en una forma completamente glicosilada de infección de virus vaccinia de temprana a tardía. De acuerdo con la presente invención, un vector plasmídico que tiene el gen del VHC (CN5) insertado en dirección 3' del promotor pBMSF7C se denomina pBMSF7C-CN5. Adicionalmente, de acuerdo con la presente invención, un vector plasmídico que tiene básicamente un gen de la región proteica estructural (parcialmente incluida una región proteica no estructural) (CN2) insertado en dirección 3' del promotor pBMSF7C se denomina pBMSF7C-CN2. Además, un vector plasmídico que tiene básicamente un gen de la región proteica no estructural (parcialmente incluida una región proteica estructural) (N25) insertado en dirección 3' del promotor pBMSF7C se denomina pBMSF7C-N25.

Un virus vaccinia recombinante puede prepararse introduciendo estos vectores plasmídicos en un virus vaccinia hospedador. Puede emplearse cualquier técnica conocida para introducir el vector plasmídico en un hospedador. Por ejemplo, pueden introducirse cada uno de los vectores plasmídicos pBMSF7C-CN5, pBMSF7C-CN2 y pBMSF7C-N25 en una célula animal infectada con la cepa del virus vaccinia atenuada LC16m8 para inducir la recombinación homóloga en la región del gen de la hemaglutinina (HA) del virus vaccinia, preparando de este modo el virus vaccinia recombinante (rVV-CN5, rVV-CN2 y rVV-N25) que expresa las respectivas proteínas del VHC.

En este caso, la cepa del virus vaccinia LC16m8 que se usa para preparar el virus vaccinia recombinante puede proliferar en un animal individual, pero es una cepa atenuada cuya propiedad de proliferación es extremadamente baja en las células nerviosas. Esta cepa está aprobada como una vacuna contra la viruela en Japón, donde no ha causado serios efectos secundarios tras la vacunación de aproximadamente 50.000 niños (informe de investigación del "Smallpox Research Group, Ministry of Health and Welfare", *Clinical Virology*, Vol.3, No.3, 269, 1975). Por otra parte, se informa que su capacidad de inducir inmunidad es comparable con la de la cepa Lister madre, y así la cepa LC16m8 es una vacuna segura y eficaz.

Puesto que el gen de la proteína del VHC está insertado en la región del gen de la HA del virus vaccinia en los rVV-CN5, rVV-CN2 y rVV-N25 preparados, se suprime la expresión de la proteína HA y por tanto no se observa hemaglutinación. Por consiguiente, la hemaglutinación de eritrocitos aviares con placas formadas por la infección de células animales con rVV-CN5, rVV-CN2 y rVV-N25 se usa como un indicador para el cribado del virus vaccinia recombinante. El virus vaccinia recombinante de interés puede obtenerse seleccionando una placa blanca sin hemaglutinina.

El virus obtenido de la placa blanca puede someterse a PCR usando el genoma del virus como modelo y los cebadores específicos al gen del VHC para confirmar la transferencia del gen del VHC.

La expresión de la proteína del VHC puede confirmarse por el método de transferencia tipo Western usando células animales infectadas con rVV-CN5, rVV-CN2 y rVV-N25 como muestras. En este caso, como anticuerpo, puede usarse IgG purificada de un antisuero preparado por inmunización de polipéptido del VHC (*J. Biol. Chem.* 279:14.531-14.541, 2004) que usa la Proteína G.

Si no es la región del gen de la HA, normalmente se usa la región del gen de la timidina cinasa (TK) como el sitio de inserción para el gen de interés tras la preparación del virus vaccinia recombinante. Si se inserta el gen de interés en la región del gen de la TK, se suprime la expresión de TK por lo que se sabe que la propiedad de proliferación del virus vaccinia recombinante se reduce. Mientras tanto, se informa que la supresión de la expresión de la proteína HA tiene poco efecto sobre la propiedad de proliferación del virus vaccinia recombinante (*Vaccine* 12, 675-681, 1994). Por consiguiente, de acuerdo con la presente invención, la región del gen de la HA es preferible como sitio de inserción para el gen de interés.

3. Vacuna de ADN (vector recombinante)

A continuación en el presente documento, se describirá el (b) vector recombinante (la denominada vacuna de ADN) mencionado en el anterior punto 1 y un método para preparar el mismo y demás.

Una vacuna de ADN es un vector de transporte de gen (plásmido o virus) que incorpora un gen deseado (ADN derivado del genoma del VHC de acuerdo con la presente invención), el cual se administra a un paciente o similar de manera que la célula que incorpora esta vacuna de ADN genere una proteína o un péptido expresado de dicho gen deseado. La proteína generada o similar estimula el sistema inmunitario e induce su anticuerpo. Puesto que la vacuna de ADN permanece dentro del cuerpo durante un largo periodo de tiempo después de la administración y continua la generación gradual de la proteína o similar, puede evitarse la reacción inmunitaria excesiva y su estructura simple permite la modificación (Tang DC *et al.*, *Nature* 356: 152-154, 1992; Barry MA *et al.*, *Nature* 377: 632-635, 1995). Además, es ventajoso porque la reacción inmunitaria inducida en el hospedador es tipo Th2 (Tang DC *et al.*, *Nature* 356: 152-154, 1992; Ulmer JB *et al.*, *Science* 259: 1.745-1.749, 1993; Hoffman SL *et al.*, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 772: 88-94, 1995).

La vacuna de ADN usada en la presente invención puede ser un vector plasmídico o un vector vírico que incorpora ADNc similar al ADNc derivado del genoma del VHC o similar (incluidas las variantes de dicho ADNc) incorporado en el virus vaccinia recombinante descrito en el anterior punto 2 o un correspondiente ARN. Específicamente, ejemplos preferidos de la vacuna de ADN usada en la presente invención incluyen, pero sin limitación, los vectores plasmídicos anteriormente mencionados pBMSF7C-CN5, pBMSF7C-CN2 y pBMSF7C-N25.

4. Composición farmacéutica para tratar y/o prevenir la hepatitis C

La composición farmacéutica de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende una combinación del (a) virus vaccinia recombinante y el (b) vector recombinante descritos en el anterior punto 1, o una composición farmacéutica que comprende una combinación del (c) virus vaccinia recombinante y el (d) virus vaccinia recombinante.

Para el uso combinacional anteriormente descrito, es importante que la secuencia de nucleótidos de todo o una parte del ADNc del genoma del VHC contenido (incorporado) en el anterior (a) virus vaccinia recombinante sea diferente de la secuencia de nucleótidos de todo o una parte del ADNc del genoma del VHC contenido (incorporado) en el anterior (b) vector recombinante.

De manera similar, para el uso combinacional anteriormente descrito, es importante que la secuencia de nucleótidos de todo o una parte del ADNc o el genoma del VHC contenido (incorporado) en el anterior (c) virus vaccinia recombinante sea diferente de la secuencia de nucleótidos de todo o una parte del ADNc del genoma del VHC contenido (incorporado) en el anterior (d) virus vaccinia recombinante.

Puesto que los ADN incorporados del genoma del VHC tienen diferentes secuencias de nucleótidos entre sí como se ha descrito anteriormente, pueden ejercer un notable efecto como se ha descrito anteriormente, en concreto un efecto de inducción inmunitaria mediada por célula específica muy fuerte.

La combinación de los ADN derivados del genoma del VHC incorporados en el anterior (a) virus vaccinia recombinante y el anterior (b) vector recombinante, y la combinación de los ADN derivados del genoma del VHC incorporados en el anterior (c) virus vaccinia recombinante y el anterior (d) virus vaccinia recombinante no están particularmente limitados y pueden seleccionarse arbitrariamente entre diferentes ADN derivados del genoma del VHC descritos en el anterior punto 2 que pueden usarse en la presente invención. Ejemplos de la combinación incluyen, pero sin limitación, una combinación donde N25 está incorporado en el anterior (a) virus vaccinia recombinante mientras que CN2 está incorporado en el anterior (b) vector recombinante, o viceversa, y la combinación donde N25 está incorporado en el anterior (c) virus vaccinia recombinante mientras que CN2 está incorporado en el anterior (d) virus vaccinia recombinante, o viceversa.

Además, en una composición farmacéutica de la presente invención, cuando se emplea la combinación del anterior (a) virus vaccinia recombinante y el anterior (b) vector recombinante, es importante que uno cualquiera de ellos se administre para una inmunización primaria y, a continuación, el otro para una inmunización de refuerzo. De manera similar, cuando se emplea la combinación del anterior (c) virus vaccinia recombinante y el anterior (d) virus vaccinia recombinante, es importante que uno cualquiera de ellos se administre para una inmunización primaria y, a continuación, el otro para una inmunización de refuerzo. De acuerdo con la presente invención, la administración para la inmunización primaria puede realizarse en dosis múltiple (preferentemente dos veces) y la administración para la inmunización de refuerzo puede realizarse en dosis múltiple (preferentemente dos veces). Por ejemplo, una pauta posológica preferible puede incluir administraciones para la inmunización primaria dos veces en la semana 0 y la semana 2 seguido de una administración para la inmunización de refuerzo en la semana 4, o una administración para la inmunización primaria en la semana 0 seguido de administraciones para la inmunización de refuerzo dos veces en la semana 2 y en la semana 4. El método para inducir la inmunidad mediada por célula en la que se administran secuencialmente diferentes tipos de vacunas en dos fases, es decir, la inmunización primaria y la inmunización de refuerzo, es característico del método de sensibilización-refuerzo.

En el presente documento también se describe un método para tratar y/o prevenir la hepatitis C, que comprende: administrar uno de un (a) virus vaccinia recombinante de más adelante o un (b) vector recombinante de más adelante a un animal de prueba (paciente) para una inmunización primaria; y, a continuación, administrar el otro para una inmunización de refuerzo:

- (a) un virus vaccinia recombinante que comprende un promotor de expresión, y todo o una parte del ADNc del genoma del virus de la hepatitis C; y
- (b) un vector recombinante que comprende un promotor de expresión, y todo o una parte del ADNc del genoma del virus de la hepatitis C (siempre que tenga una secuencia de nucleótidos que difiera de la de todo o una parte del ADNc del genoma del virus de la hepatitis C contenido en el (a) virus vaccinia recombinante).

En el presente documento también se describe el uso de una composición farmacéutica de la presente invención para tratar y/o prevenir la hepatitis C, específicamente, el uso del anterior (a) virus vaccinia recombinante y el anterior (b) vector recombinante, en particular, el uso de uno del anterior (a) virus vaccinia recombinante o el anterior (b) vector recombinante para una inmunización primaria y el otro para una inmunización de refuerzo.

En el presente documento también se describe un método para tratar y/o prevenir la hepatitis C, que comprende: administrar uno de un (c) virus vaccinia recombinante de más adelante o un (d) virus vaccinia recombinante de más adelante a un animal de prueba (paciente) para una inmunización primaria; y, a continuación, administrar el otro para una inmunización de refuerzo:

- (c) un virus vaccinia recombinante que comprende un promotor de expresión, y todo o una parte del ADNc del genoma del virus de la hepatitis C; y
- (d) un virus vaccinia recombinante que comprende un promotor de expresión, y todo o una parte del ADNc del genoma del virus de la hepatitis C (siempre que tenga una secuencia de nucleótidos que difiera de la de todo o una parte del ADNc del genoma del virus de la hepatitis C contenido en el (c) virus vaccinia recombinante).

En el presente documento también se describe el uso de una composición farmacéutica de la presente invención para tratar y/o prevenir la hepatitis C, específicamente, el uso del anterior (c) virus vaccinia recombinante y el anterior (d) virus vaccinia recombinante, en particular, el uso de uno del anterior (c) virus vaccinia recombinante o el anterior (d) virus vaccinia recombinante para una inmunización primaria y el otro para una inmunización de refuerzo.

Una composición farmacéutica de la presente invención puede introducirse en un organismo mediante cualquier método conocido, por ejemplo, pero sin limitación, por inyección intramuscular, intraperitoneal, intradérmica o subcutánea; inhalación nasal, bucal o pulmonar; o administración oral. De manera adicional, el virus vaccinia recombinante contenido en la composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse en combinación con un fármaco antivírico existente (por ejemplo, interferón). Una realización de estas administraciones combinacionales no está particularmente limitada. El virus recombinante de la presente invención puede administrarse simultáneamente con el fármaco antivírico existente, o pueden introducirse en un organismo de acuerdo con un método en el que se administra uno después del otro tras un determinado periodo de tiempo.

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

Una composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse por vía oral o parenteral de acuerdo con su forma que incluye agentes orales tales como un comprimido, una cápsula, un agente en polvo, un agente granular, una píldora, una solución, un jarabe o similar, o agentes parenterales tales como una inyección, un agente tópico, un supositorio o unas gotas de ojo. Ejemplos preferibles incluyen inyecciones locales tales como inyecciones intradérmicas, intramusculares e intraperitoneales.

Aunque una dosis puede elegirse apropiadamente de acuerdo con el tipo del principio activo, la vía de administración, el sujeto de administración, la edad, el peso, el sexo y los síntomas del paciente, y otras condiciones, la dosis diaria del virus vaccinia recombinante (vacuna vaccinia) o el vector recombinante (vacuna de ADN) es de aproximadamente 1.000-1.000.000.000 UFP (unidades formadoras de placa) y preferentemente aproximadamente 100.000-100.000.000 UFP en el caso de la administración oral, mientras que es de aproximadamente 100-1.000.000.000 UFP y preferentemente de aproximadamente 1000-100.000.000 UFP en el caso de la administración parenteral. El virus vaccinia recombinante (vacuna vaccinia) o el vector recombinante (vacuna de ADN) puede administrarse una vez o varias veces al día.

Es preferible que el título del anticuerpo o la actividad de inmunidad mediada por célula como vacuna se mida de antemano para el virus vaccinia recombinante (vacuna vaccinia) o el vector recombinante (vacuna de ADN) usado en la presente invención.

Por ejemplo, el título de anticuerpo contra rVV-CN5, rVV-CN2, rVV-N25 o la cepa madre LC16m8 como el virus vaccinia recombinante (vacuna vaccinia) puede determinarse inoculando conejos con estas cepas víricas y recogiendo secuencialmente los sueros para medir los valores de ELISA contra el VHC en los sueros. El título del anticuerpo del vector recombinante (vacuna de ADN) también puede medirse de la misma manera que se ha descrito anteriormente.

Además, la actividad de inmunidad mediada por célula puede medirse inoculando ratones con rVV-CN5, rVV-CN2, rVV-N25, o la cepa madre LC16m8 y, a continuación, aislando las células del bazo de los ratones inmunizados para determinar si se induce o no LTC (linfocito T citotóxico) específico al VHC por ensayo ELISPOT. La actividad de inmunidad mediada por célula del vector recombinante (vacuna de ADN) también puede medirse de la misma manera que se ha descrito anteriormente.

A continuación en el presente documento, la presente invención se describirá más específicamente a modo de ejemplos, aunque la presente invención no debe limitarse a los mismos.

Ejemplo 1

Ratón transgénico

Se usaron ratones transgénicos (VHC-Tg) (CN2-29^(+/-)/MxCre^(+/-) (MxCre/HCR6-CN2), RzCN5-15^(+/-)/MxCre^(+/-) (MxCre/HCR6-RzB15)) en los que la expresión del gen del VHC puede inducirse en cualquier momento mediante la administración de poli(I:C) (Figura 1B), y C56BL/6.

Los ratones VHC-Tg que se administraron con poli(I:C) para permitir la expresión continua de la proteína del VHC durante 3 meses se usaron para los experimentos. Los ratones CN2-29^(+/-)/MxCre^(+/-) codificaban una parte del gen del VHC mientras que los ratones RzCN5-15^(+/-)/MxCre^(+/-) codificaban el gen del VHC de longitud completa.

Ejemplo 2

Preparación de la vacuna de la expresión del gen del VHC (vacuna de ADN)

Se usaron vacunas de ADN del VHC (VHC-CN2 (o ADN de CN2) y VHC-N25 (o ADN de N25)) preparadas a partir del vector plasmídico pBMSF7C que contenían todas las regiones del gen del VHC (Figura 1A) mediante la inserción de las regiones del gen que codifican básicamente las regiones proteicas estructurales (CN2) del VHC y las regiones del gen que codifican básicamente las regiones proteicas no estructurales (N25) del VHC en los vectores plasmídicos pCAGGS, respectivamente por el método PCR y la reacción de la enzima de restricción como una vacuna primaria (vacuna para una inmunización primaria) o una vacuna de refuerzo (vacuna para una inmunización de refuerzo) (Figura 1C). Se usó una vacuna de ADN sin las regiones del gen del VHC (vacío) como control para estas vacunas. Adicionalmente, se usaron rVV-CN2 y rVV-N25, en concreto, los virus vaccinia recombinantes (rVV) obtenidos insertando las mismas secuencias que las secuencias incorporadas en las vacunas de ADN en las cepas de virus vaccinia LC16m8, como o bien la vacuna primaria o la vacuna de refuerzo (Figura 1C).

Ejemplo 3Preparación de los virus vaccinia recombinantes (vacunas vaccinia)

- 5 Todas las regiones del gen del virus de la hepatitis C (CN5) y las regiones del gen que codifican las regiones proteicas estructurales que construyen la cápside (CN2) y las regiones del gen que codifican las regiones proteicas no estructurales implicadas en la replicación (N25) (número de registro DDBJ/EMBL/GenBank; AY045702) se insertaron cada una en sitios SbfI y SgfI del plásmido pBMSF7C (véase la publicación de la solicitud de patente pendiente de examen japonesa n.º Heisei 6-237773) para preparar los vectores plasmídicos pBMSF7C-CN5, pBMSF7C-CN2 y
- 10 pBMSF7C-N25, en los que los genes derivados del genoma del VHC se insertaron en dirección 3' del promotor híbrido AT1/p7.5 dentro de la región del gen de la hemaglutinina (HA).

- Células de cultivo primario de riñón de conejo se sembraron en un matraz T175. Una vez que las células alcanzaron confluencia, se usó la cepa del virus vaccinia atenuada LC16m8 para infección a $md_i=10$ y 30 °C durante dos horas.
- 15 El término md_i (multiplicidad de infección) se refiere a UFP por célula. Después de la infección, se retiró por aspiración la solución del virus y las células se lavaron con PBS(-). Posteriormente, las células se sometieron a un tratamiento con 0,05 % de tripsina/EDTA 0,5 mM/PBS(-), lavadas con un medio 10% de FCS/MEM, PBS(-) y un tampón HeBS y, a continuación, las células se suspendieron en 600 µl de un tampón HeBS. Se diluyeron 40 µg de cada uno de los vectores plasmídicos pBMSF7C-CN5, pBMSF7C-CN2 y pBMSF7C-N25 en un tampón HeBS a una cantidad total de
- 20 200 µl, lo cual se añadió a la suspensión celular y se mezcló y se dejó reposar sobre hielo durante 10 minutos. La suspensión celular añadida con el vector plasmídico se transfirió dentro de una cubeta de 0,4 cm y se sometió a electroporación (0,2 kV, 960 µF) usando un electroporador (Bio-Rad). Inmediatamente después de la electroporación,, se añadió 1 ml de un medio 10 % de FCS/MEM a la suspensión celular para dilución. Esta suspensión celular se añadió a células RK13 o células de cultivo primario de riñón de conejo que se habían sembrado en un matraz T175
- 25 por adelantado y se cultivó a 30 °C durante 24 horas.

- Después de 24 horas de cultivo, el sobrenadante del cultivo se retiró por aspiración y las células se lavaron con PBS(-). Posteriormente, las células se sometieron a un tratamiento con 0,05 % de tripsina /EDTA 0,5 mM/PBS(-) y, a continuación, se suspendieron en un medio 10 % de FCS/MEM. La suspensión celular se recogió, se sometió a
- 30 tratamiento ultrasónico (30 s x 4 veces) en agua fría y, a continuación, se centrifugó (2.000 rpm, 10 min). El sobrenadante resultante se usó como la solución del virus. La solución del virus se diluyó en un medio 10 % de FCS/MEM, y se usó para infectar células de cultivo primario de riñón que se habían sembrado en una placa de 100 mm a 30 °C durante una hora. Después de retirar la solución del virus por aspiración, las células se lavaron con PBS(-). Se añadió un medio 10 % de FCS/ 0,5 % de metilcelulosa/MEM al cultivo a 30 °C durante 72 horas. 72 horas después,
- 35 el sobrenadante se retiró por aspiración y el resultante se lavó con PBS(-). Se añadió una solución de eritrocitos aviares diluidos en PBS(+) a la placa de 100 mm para cultivar a 37 °C durante 30 minutos. La solución de eritrocitos se retiró por aspiración y las células se lavaron con PBS(-) dos veces. Las placas que no absorbieron los eritrocitos aviares se recogieron usando una pipeta Pipetman. Las placas recogidas se sometieron a PCR y secuenciación genética para confirmar la transferencia del gen del VHC. Las placas confirmadas con transferencia del gen se
- 40 sometieron a purificación de placa repetida durante tres veces.

- Los virus aislados después de las tres veces de purificación de placa se sometieron a cultivo a escala pequeña. La colonia obtenida después de la tercera purificación se suspendió en 700 µl de medio 10 % de FCS/MEM y se sometió a un tratamiento ultrasónico en agua fría. Después de la centrifugación (2.000 rpm, 10 min), se añadió 500 µl del
- 45 sobrenadante a células de cultivo primario de riñón que se habían sembrado en un matraz T25 para infección a 30 °C durante 2 horas. Después de la infección, se retiró por aspiración la solución del virus y las células se lavaron con 2,5 ml de medio 10 % de FCS/MEM. El medio se retiró por aspiración y se añadió de nuevo 2,5 ml del medio 10 % de FCS/MEM al cultivo a 30 °C durante 72 horas. 72 horas después, las células se rasparon del matraz usando un raspador y se recogió la suspensión celular. La suspensión celular recogida se sometió a un tratamiento ultrasónico
- 50 (30 s, 4 veces) en agua fría seguido de centrifugación. El sobrenadante resultante se recogió como una solución del virus. La solución del virus recogida se diluyó en serie y se añadió a células RK13 o células de cultivo primario de riñón de conejo que se habían sembrado en una placa de 6 pocillos para infección a 30 °C durante una hora. La solución del virus se retiró por aspiración, las células se lavaron dos veces con PBS(-) y, a continuación, se añadió un medio 10 % de FCS/0,5 % de metilcelulosa/MEM al cultivo a 30 °C durante 72 horas. 72 horas después, se contó el número
- 55 de placas formadas en el pocillo para determinar el título.

- Se condujo un cultivo a gran escala en base al título determinado. Se sembraron células RK13 o células de cultivo primario de riñón de conejo en diez matraces T175. Una vez que las células alcanzaron confluencia, se usó la solución del virus vaccinia recombinante para infección a $md_i=0,1$ y 30 °C durante dos horas. Después de la infección, se retiró
- 60 por aspiración la solución del virus y las células se lavaron con 20 ml de medio 10 % de FCS/MEM. El medio se retiró por aspiración y se añadió de nuevo 20 ml del medio 10 % de FCS/MEM al cultivo a 30 °C durante 72 horas. 72 horas después, las células se rasparon del matraz usando un raspador y la suspensión celular se recogió, congeló y almacenó a -80 °C. Después de tres ciclos de congelación-descongelación de esta suspensión celular, el resultante se sometió a tratamiento ultrasónico (30 s, 4 veces) en agua fría y se centrifugó. El sobrenadante resultante se recogió
- 65 como una solución del virus. La solución del virus recogida se transfirió dentro de un tubo de centrifuga de alta velocidad y se centrifugó a 18.000 rpm durante 45 minutos para precipitar el virus. El sobrenadante se retiró por

aspiración y después de eso los sedimentos se resuspendieron en una cantidad pequeña de medio 10 % de FCS/MEM. Mediante este procedimiento, puede prepararse una solución del virus que tenga una concentración 10 veces mayor que la obtenida tras el cultivo en el matraz T175. Esta solución del virus concentrada se diluyó en serie y se usó para infectar células RK13 o células de cultivo primario de riñón que se habían sembrado en una placa de 6 pocillos para determinar el título del virus en la solución por un método similar al método anteriormente descrito. Esta solución del virus concentrada que tenía el título determinado se usó en diferentes experimentos en los siguientes ejemplos.

Ejemplo 4

Métodos de inmunización

Se administró 100 µg de vacuna de ADN suspendida en 25 µl de PBS dos veces en un intervalo de dos semanas a los músculos de la parte posterior de las patas del ratón por electroporación (50 V, 99 ms, 8 veces). Se administró por vía intradérmica el virus vaccinia recombinante en la espalda a 1×10^8 ufp/50 µl. Dos semanas después de la última administración, se extirparon los bazo y los hígados para análisis.

Ejemplo 5

Determinación de la capacidad inductora de inmunidad mediada por célula específica por método ELISPOT

Se estimularon células del bazo (1×10^5) que se sometieron a un tratamiento de hemólisis de eritrocitos o células CD8⁺ y CD4⁺ (2×10^5) obtenidas separando las células del bazo usando perlas magnéticas (Miltenyi Biotec) con células estimuladoras que se habían tratado previamente con mitomicina (células tumorales en las que se sobreexpresó cada sitio del gen del VHC (EL-4/CN2, /C, /E2, /NS2, /N3-4A)) (1×10^4) y se cultivaron a 37 °C durante 48 horas en una incubadora de CO₂ al 5 % para determinar las células productoras de IPN-γ específico al antígeno del VHC por un método ELISPOT.

(Día 1)

Un anticuerpo anti-IFN-γ de ratón purificado (R4-6A2) (1 mg/ml) (Pharmingen) se ajustó para tener una concentración final de 8 µg/ml (diluido 1:125 en PBS estéril), se sembró a 75-100 µl/pocillo en placa de nitrocelulosa de 96 pocillos y se dejó reposar a 4 °C durante la noche.

(Día 2)

Se tomaron del ratón células del bazo y una cantidad moderada de ellas se dejaron en suspensión en RPMI de lavado. Como RPMI de lavado, se usó RPMI complementado con 2,5 % de FCS. El resultante se centrifugó a 1.200 rpm y 4 °C durante 5 minutos para recoger las células. Las células se trataron con ACK (cloruro de amonio potasio), se dejaron que se suspendieran en RPMI de lavado y se centrifugaron de nuevo a 1.200 rpm y 4 °C durante 5 minutos para recoger las células. 500 µl del RPMI de lavado y, a continuación, la célula suspendida se pasó a través de un filtro. Después de que se pasara la solución completamente por el filtro, el resultante se lavó con 1,5 ml de RPMI de lavado. Las células se lavaron una vez con RPMI complementado con 10 % de FCS y se dejaron que se resuspendieran en un medio H-h a 1×10^7 /ml.

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

2) RPMI complementado con 10 % de FCS: RPMI-1640 (SIGMA R8758), FCS (10 % final), 2-mercaptoetanol (concentración final 5 µM), penicilina-estreptomina (concentración final PC: 100 µ/ml, SM:0,1 mg/ml), 7,5 % de NaHCO₃ 4 ml

3) medio de CLICK complementado con 10 % de FCS: medio de CLICK (SIGMA C5572), FCS (concentración final 10 %), 2-mercaptoetanol (concentración final 5 µM), penicilina-estreptomina (concentración final PC: 100 µ/ml, SM:0,1 mg/ml), 7,5 % de NaHCO₃ 4 ml

Cultivo de iniciación

La placa de nitrocelulosa de 96 pocillos anteriormente descrita se lavó con PBS (100 µl/pocillo) durante tres veces, a continuación, se añadió RPMI complementado con 10 % de FCS a 100 µl/pocillo, y se sometió a bloqueo a 37 °C durante una hora en una incubadora de CO₂. El medio se descargó y las células efectoras se sembraron en diluciones en serie 1:2 de 1×10^6 /100 µl/pocillo a $0,125 \times 10^6$ /100 µl/pocillo.

Se añadió una solución de péptido (200 µg/ml) a 100 µl/pocillo (concentración final de 100 µg/ml) y se cultivó a 37 °C durante 24 horas en una incubadora de CO₂.

(Día 3)

El medio se descargó y el resultante se lavó con PBS, Tween 20 al 0,05 % (200 µl/pocillo) durante diez veces. El anti-

IFN- γ de ratón biotinilado (XMG1.2) (0,5 mg/ml) (Pharmingen) se ajustó para tener una concentración final de 2 μ g/ml (diluido 1:250 en PBS estéril) y se añadió a 100 μ l/pocillo. El resultante se dejó reposar a 4 °C durante una noche.

(Día 4)

5 La placa de nitrocelulosa de 96 pocillos anteriormente descrita se lavó con PBS, Tween 20 al 0,05 % (200 μ l/pocillo) durante diez veces. La estreptavidina-alkalina fosfatasa (1 mg/ml) (MABTECH AB) se ajustó para tener una concentración final de 1 μ g/ml (diluido 1:1.000 en PBS estéril) y se añadió a 100 μ l/pocillo.

10 La solución resultante se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1,5 horas. Un tampón de desarrollo de color 25x AP (BIO-RAD) se diluyó 1:25 en agua destilada, se añadieron 1/100 volumen de cada uno de los reactivos de color AP A y B (BIO-RAD) para preparar la mezcla de reacción. La placa de nitrocelulosa de 96 pocillos anteriormente descrita se lavó con PBS, Tween 20 al 0,05 % (200 μ l/pocillo) durante diez veces. La mezcla de reacción se añadió a 100 μ l/pocillo y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 10-20 horas. Una vez que se desarrolló el color y
15 surgió una mancha oscura, la mezcla de reacción se descargó y el resultante se lavó rigurosamente con agua. El fondo de la placa de nitrocelulosa de 96 pocillos se raspó y se secó para contar el número de manchas con el lector de ELISPOT.

20 Se extirparon los bazo de los ratones C57BL/6 que habían sido administrados con vacuna VHC-N25 y rVV-N25 para determinar la célula productora del IFN- γ específico al antígeno del VHC en las células del bazo por el método ELISPOT. Las células del bazo del grupo control no mostraron ninguna mancha específica después de la estimulación mientras que se confirmaba la producción significativa de IFN- γ en las células del bazo del grupo administrado con VHC-N25 después de la estimulación con células EL-4/E2, /NS2 e /N3-4A (Figura 2). De manera similar, se confirmó la producción de IFN- γ en el grupo de sensibilización-refuerzo contra células EL-4/E2, /NS2 y /N3-4A.

25 Se muestran los resultados contados. La Figura 2 muestra los resultados de la inoculación de vacuna de sensibilización-refuerzo con VHC-N25 y rVV-N25 en ratones Tg con VHC de longitud parcial. En comparación con la inoculación con solo VHC-N25, la reacción de inmunidad mediada por célula específica al VHC se indujo más fuertemente. La Figura 3 muestra la cantidad de proteína central del VHC en el hígado en ese momento, cuando la
30 eliminación era más fuerte con la inoculación de vacuna de sensibilización-refuerzo con VHC-N25 y rVV-N25. La Figura 4 muestra los tejidos hepáticos observados en ese momento, cuando la hepatitis mejoró más con la inoculación de vacuna de sensibilización-refuerzo con VHC-N25 y rVV-N25. Como puede apreciarse en la Figura 5, sin embargo, la inducción de la reacción de inmunidad mediada por célula específica al VHC era insuficiente con la inoculación de vacuna de sensibilización-refuerzo con VHC-N25 y rVV-N25 en ratones Tg con VHC de longitud completa. Por
35 consiguiente, las combinaciones de la inoculación de vacuna de sensibilización-refuerzo eran variadas como se muestra en la Figura 6 para investigación.

Como resultado, se encontró que las combinaciones de diferentes regiones del gen como la inoculación de vacuna de sensibilización-refuerzo con VHC-N25 y rVV-CN2 inducían fuertemente la reacción de inmunidad mediada por célula
40 específica al VHC como se muestra en la Figura 7. Los resultados de los análisis de otras combinaciones variadas se muestran en la Figura 8. Siempre que las diferentes regiones del gen se combinan tal cual, se encontró que no solamente una inoculación de vacuna de sensibilización-refuerzo con VHC-ADN y rVV sino también una inoculación de vacuna de sensibilización-refuerzo con rVV que tenían diferentes regiones del gen inducían fuertemente la reacción
45 de inmunidad mediada por célula específica al VHC. Cuando se condujo una inoculación de vacuna de sensibilización-refuerzo con VHC-N25 y rVV-CN2 como combinación de diferentes regiones del gen en ratones Tg con VHC de longitud completa, se observó inducción muy fuerte de la reacción de inmunidad mediada por célula específica al VHC como se muestra en la Figura 9.

Ejemplo 6

50 Análisis del hígado

Después de la administración de la vacuna, los hígados se recogieron para preparar extractos de tejido hepático, los cuales se sometieron a fijación con formalina. Los niveles de expresión de la proteína central del VHC en los extractos
55 del tejido hepático se cuantificaron con kit ELISA con antígeno del VHC disponible en el mercado (Ortho Clinical Diagnostics) (Figura 3). Los niveles de expresión de la proteína central del VHC en los hígados disminuyeron en todos los grupos administrados con vacuna en comparación con el grupo administrado con vacío. En particular, se confirmó que el nivel de expresión de la proteína central estaba muy reducido en el grupo inoculado con vacuna de sensibilización-refuerzo (Figura 3). Las secciones de hígado fijadas con formalina se incrustaron en parafina después
60 de preparar las secciones del tejido, las cuales se sometieron a tinción con hematoxilina/eosina (Figura 4). Como resultado del examen morfológico de los hígados, se observó un número de anomalías morfológicas tales como hinchamiento de las células hepáticas y patrón trabecular irregular en los hígados de los ratones CN2-29^(+/-)/MxCre^(+/-) a los que se les había dejado expresar continuamente la proteína del VHC durante tres meses mientras que estas anomalías se mejoraron en el grupo administrado con la vacuna. En particular, se confirmó una notable mejora en el
65 grupo inoculado con la vacuna de sensibilización-refuerzo (Figura 4).

Además, también se observó un número de anomalías morfológicas tales como hinchamiento de las células hepáticas y patrón trabecular irregular en los hígados de los ratones Rz15^(+/-)/MxCre^(+/-) a los que se les había dejado expresar continuamente la proteína del VHC durante tres meses mientras que estas anomalías se mejoraron en el grupo administrado con la vacuna. En particular, se confirmó una notable mejora en el grupo inoculado con la vacuna de sensibilización-refuerzo (Figura 10).

Aplicabilidad industrial

La presente invención puede proporcionar una composición farmacéutica para tratar y/o prevenir la hepatitis C que puede activar además la inmunidad mediada por célula específica y que es eficaz en eliminar completamente el VHC en comparación con un caso en donde se usa solo un virus vaccinia convencionalmente conocido o una vacuna de ADN.

Listado de secuencias

<110> TOKYO METROPOLITAN INSTITUTE OF MEDICAL SCIENCE NATIONAL INSTITUTES OF BIOMEDICAL INNOVATION, HEALTH AND NUTRITION THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC RESEARCH INSTITUTE

<120> Una composición farmacéutica para tratar y/o prevenir la hepatitis C

<130> G1223WO

<150> JP 2014-229283

<151> 11/11/2014

<160> 4

<170> PatentIn versión 3.4

<210> 1

<211> 3093

<212> ADN

<213> Virus de la hepatitis C

<400> 1

ES 2 869 575 T3

cgtagaccgt gcatcatgag cacaaatcct aaaccccaaa gaaaaaccaa acgtaacacc	60
aaccgccgcc cacaggacgt caagttcccg ggtggtggtc agatcgttgg tggagtttac	120
ctgttgccgc gcaggggccc caggttgggt gtgcgcgcga ctaggaagac ttccgagcgg	180
tcacaacctc gtggaaggcg acaacctatc cccaaggctc gccagcccga gggcagggcc	240
tgggctcagc ccgggtaccc ttggcccctc tatggcaacg agggcatggg gtgggcagga	300
tggctcctgt caccgccggg ctcccgccct agttggggcc ccacggaccc ccggcgtagg	360
tcgcgtaatt tgggtaaggt catcgatacc ctcacatgcg gcttcgccga cctcatgggg	420
tacattccgc tcgtcggcgc cccctagggg ggcgttgcca gggccctggc acatggtgtc	480
cggttggtgg aggcggcgt gaactatgca acagggaatt tgcccggttg ctctttctct	540
atcttctctt tggctctgct gtccctgtttg accatcccag cttccgctta tgaggtgcgc	600
aacgtatccg ggatatacca tgtcacgaac gactgctcca actcaagtat tgtgtatgag	660
gcagcggaca tgatcatgca tccccccggg tgcgtgccct gcgttcggga gggcaactcc	720
tcccgttgct ggggtggcact tactcccacg ctagcggcca ggaatgccag cgtccccact	780
acggcaatac gacgccatgt cgatttgctc gttggggcgg ctgctttctg ctccgctatg	840
tatgtgggag atctctgcgg atctgttttc cttgtctccc agctgttcac cttctcgccc	900
cgccggcatg agacaataca ggactgcaat tgctcaatct atcccggcca cgtgtcaggt	960
caccgcatgg cttgggacat gatgatgaac tggtcgccta caacggccct ggtggtgtcg	1020
cagttactcc ggatcccaca agctatcgtg gacatggtgg cgggggctca ctgggggtgc	1080
ctagcggggc ttgcctacta ttccatggtg ggggaactggg ctaagggtatt gattgtgatg	1140
ctactttttg ccggcgtcga cggggagacc cgtgtgacag gggggcagat agccagaaat	1200

ES 2 869 575 T3

gcctactcgc tcacgaccct cttttcatct gggtcggctc agaacatcca gctcataaac 1260
 accaacggta gctggcacat caacaggact gccctgaact gcaatgactc cctcaacacc 1320
 gggtttcttg ccgcgctggt ctacacgcac aagttcaacg cgtccggatg tccagagcgc 1380
 ttggccagct gccgccccat tgacaagttc gatcaggggt ggggtcccat cacttatgct 1440
 gagcagggcg gccaggacca gaggccttat tgctggcact acgcacctaa accatgtggt 1500
 attgtatccg cgtcgaaggt gtgtgggtcca gtgtattggt tcacccaag ccagttgta 1560
 gtggggacga ccgatcgggt cgggtgtccct acgtatagct ggggggagaa tgagacagac 1620
 gtgctgctcc ttaacaacac gcggccgccg caaggcaact ggttcggctg tacgtggatg 1680
 aacggcactg ggttcaccaa gacatgcggg gggccccctg gtaacatcgg ggggggcggc 1740
 aataacacct tgacctgcc tacggactgt ttccggaagc acccgcggc cacttacaca 1800
 aaatgtggtt cgggaccttg gctgacaccc aggtgcttg tagactacc atacaggctc 1860
 tggcactacc cctgcactgc caactttacc atcttcaagg ttaggatgta tgtagggggc 1920
 gtggagcaca ggctcgatgc tgcattgcaat tggacccgag gggaacgttg caacttgag 1980
 gatagggata gattggagct cagcccgtca ctgctgtcta caacagagtg gcagggtgctg 2040
 ccctgttctt tcaccacctt accggtcttg tccactggtt taattcatct ccatcagaac 2100
 atcgtggacg tgcaatacct gtacggtata gggtcggcag ttgtttcctt tgcaatcaaa 2160
 tgggactata tcgtgatact tttcctcctc ctggcggacg cgcgcgtctg tgctgcttg 2220
 tggatgatgc tgctgatagc ccaggccgag gccgccttag aaaacctggt ggtcctcaat 2280
 gcggcgtccg tggcgggagc gcatggcatt ctctccttcc ttgtgttctt ctgtgcgcgc 2340
 tggtagatca agggcaagct ggtccccggg gcagcatatg ctttctatgg agtatggccg 2400
 ctgctcctgc ttctgctggc cttaccacca cgagcttacg ctatggagcg ggagatggct 2460
 gcatcgtgcg gaggcgcggt gtttgtaggt ctggtagctt tgactttgtc accatactat 2520
 aaagagttcc tcgccaggct catatggtgg ttgcaatatt ttatcaccag agccgaggcg 2580
 cacctgcaag tgtggatccc cccctcaac attcgggggg gccgcgatgc catcatcctc 2640
 ctgcgctgtg tagtccaccc agagctaatac tttgacatca ccaaactcct gctcgccata 2700
 ctcggtccgc tcatggtgct ccaggctagc ataactcaag tgccgtactt cgtacgcgcc 2760
 caagggctca ttctgcatg catgttggtg cggaaggtag ccgggggcca ttatgtccaa 2820
 atggcctttg tgaagctgac cgcactgaca ggtacgtacg tttatgacca tctaactcca 2880
 ctgcgggact gggcccacgc gggcctgcga gacctcgcgg tggcagtaga gcccgttgtc 2940
 ttctctgaca tggagaccaa ggtcatcacc tggggggcag acaccgcagc gtgtggggac 3000
 attatcttgg gtctacctgt ctccgccga aggggtaggg agatacttct ggggccggcc 3060
 gatagtctg aagggcaggg gtggcgctc ctt 3093

ES 2 869 575 T3

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

5 <400> 2

```

acgcggccgc cgcaaggcaa ctggttcggc tgtacgtgga tgaacggcac tgggttcacc      60
aagacatgcg ggggcccccc gtgtaacatc gggggggggc gcaataaacac cttgacctgc      120
cctacggact gtttcgggaa gcaccccgcg gccacttaca caaaatgtgg ttcgggacct      180
tggctgacac ccaggtgctt ggtagactac ccatacaggc tctggcacta cccctgcact      240
gccaacttta ccatcttcaa ggtaggatg tatgtagggg gcgtggagca caggctcgat      300
gctgcatgca attggaccgc aggggaacgt tgcaacttgg aggataggga tagattggag      360
ctcagcccg c tactgctgtc tacaacagag tggcaggtgc tgccctgttc tttcaccacc      420
ctaccggctc tgtccactgg ttttaattcat ctccatcaga acatcgtgga cgtgcaatac      480
ctgtacggta tagggtcggc agttgtttcc tttgcaatca aatgggacta tatcgtgata      540
cttttccctc tcctggcgga cgcgcgcgtc tgtgcctgct tgtggatgat gctgctgata      600
gcccaggccg agggcgctt agaaaacctg gtggtcctca atgcggcgct cgtggccgga      660
gcgcatggca ttctctcctt ccttgtgttc ttctgtgccg cctggtagat caagggcaag      720
ctgggtccccg gggcagcata tgctttctat ggagtatggc cgctgctcct gcttctgctg      780
gccttaccac cacgagctta cgctatggag cgggagatgg ctgcatcgtg cggaggcgcg      840
gtgtttgtag gtctggtact cttgactttg tcaccatact ataaagagtt cctcgccagg      900
ctcatatggt ggttgcaata ttttatcacc agagccgagg cgcacctgca agtgtggatc      960
ccccccctca acattcgggg gggccgcgat gccatcatcc tcctcgctg tgtagtccac      1020
ccagagctaa tctttgacat caccaaactc ctgctcgcca tactcggtcc gctcatggtg      1080
ctccaggcta gcataactca agtgccgtac ttcgtacgcg cccaagggct cattcgtgca      1140
tgcatgttgg tgcggaaggt agccgggggc cattatgtcc aaatggcctt tgtgaagctg      1200
accgcactga caggtacgta cgtttatgac catctaactc cactgcggga ctgggcccac      1260
gcgggcctgc gagacctcgc ggtggcagta gagcccgttg tcttctctga catggagacc      1320
aaggtcatca cctggggggc agacaccgca gcgtgtgggg acattatctt ggggtctacct      1380
gtctccgccc gaaggggtag ggagatactt ctggggcccg ccgatagtct tgaagggcag      1440
gggtggcggc tccttgctcc catcacggcc tattcccaac agacgcgggg cctacttggt      1500
tgcatcatca ctagcctcac aggcggggac aaaaaccaag tcgaggggga ggttcaagtg      1560
gtctccaccg cgacacaatc cttcctggcg acctgcgtca atggcgcgctg ctggactgtc      1620

```

ES 2 869 575 T3

ttccatggtg	ccggctcaaa	gaccttagct	ggcccaaaag	gtccaatcac	ccagatgtac	1680
actaatgtag	acctggacct	cgtcggctgg	caggcgcccc	ccgggtcgcg	ttctctgaca	1740
ccatgcacct	gcggcagctc	agacctctat	ttggtcacga	gacatgctga	tgtcattccg	1800
gtgcgcgggc	ggggcgacag	taggggaagc	ctactctctc	ccagacctgt	ctcctacttg	1860
aaaggctcct	cggttggtcc	gctgctctgc	ccttcgaggc	acgctgtggg	catcttccgg	1920
gctgctgtgt	gcacccgggg	ggttgcaag	gcggtggatt	tcatacccg	tgaatcaatg	1980
gaaactacta	tgcggtctcc	ggtcttcacg	gataactcat	ccccccggc	cgtaccgcag	2040
acattccaag	tggcccatct	acacgcccct	actggcagcg	gcaagagcac	taagggtgccg	2100
gctgcatatg	cagcccaagg	gtataagggtg	ctcgctcctga	accggtccgt	tgccgctacc	2160
ttgggttttg	gggcgtatat	gtctaaggca	catgggtatcg	acccaacat	cagaactggg	2220
gtaagggcca	tcaccacggg	cgcccctatt	acatactcca	cctacggcaa	gttccttgcc	2280
gacggcggtt	gttccggggg	cgcctatgac	atcataatat	gtgatgagt	ccactcaact	2340
gactcgacta	ccatcttggg	cattggcaca	gtcctggacc	aagcggagac	ggctggagcg	2400
cggtcgtcg	tgctcgccac	cgctacgcct	ccgggatcgg	tcaccgtgcc	acaccccaat	2460
attgaggagg	tggccctgtc	caacgctgga	gaaatcccct	tctacggcaa	agccatcccc	2520
attgaggtca	tcaagggggg	aagacatctc	atcttctgcc	attccaagaa	gaagtatgac	2580
gagctcgccg	caaagctatc	agccctcgga	cttaatgctg	tagcatatta	tcggggctctt	2640
gatgtgtccg	tcataccgac	caacggagac	gtcgttgtcg	tggcaacaga	cgctctaattg	2700
acgggcttta	ccggcgactt	tgactcagt	atcgactgta	acacatgtgt	caccagaca	2760
gtcgatttca	gcctggatcc	caccttcacc	atcgagacga	cgaccgtgcc	ccaagacgca	2820
gtggcgcgat	cacagcggcg	gggtaggact	ggtaggggca	ggagaggcat	ctacaggttt	2880
gtgactccag	gagaacggcc	ctcgggcatg	ttcgattcct	cggtcctgtg	tgagtgtctat	2940
gacgcgggct	gtgcttggtg	cgagctcacg	cctgctgaga	cctcggttag	gttgcgggct	3000
tacctgaata	caccagggtt	gcccgtctgc	caggaccatc	tggagttttg	ggagagcgctc	3060
tccacaggcc	tcaccacat	agatgcccct	tttctgtccc	agactaaaca	ggcaggagac	3120
aacttcccct	acctggtagc	ataccaagcc	acagtgtgcg	ccagagctca	agctccacct	3180
ccatcatggg	atcaaagtgtg	gaagtgtctc	atacggtcca	aaccacgct	gcacggggcca	3240
acacccctgc	tgtataggct	aggagccgtc	caaaatgaga	tcaccctcac	acaccccatg	3300
accaaattca	tcattggcatg	catgtcggct	gacctggagg	tcgtcactag	cacctgggtg	3360
ctagtagggc	gagtccttgc	agctctggct	gcatattgct	tgacaacagg	cagtgtggctc	3420
attgtgggta	ggatcatctt	gtccgggagg	ccggctgtta	ttcccagacg	ggaagtcctc	3480
taccgggagt	tcgatgagat	ggaagagtgc	gcctcacacc	tccttacat	cgaacaggga	3540

ES 2 869 575 T3

atgcagcttg	ccgagcaatt	caagcagaag	gcgctcggat	tgctgcaaac	agccaccaag	3600
caagcggagg	ctgctgctcc	cgtggtagaa	tccaagtggc	gagcccttga	gaccttctgg	3660
gcgaagcaca	tgtggaattt	catcagcggg	atacagtacc	tagcaggctt	gtccactctg	3720
cctgggaacc	ccgcgatagc	atcactgatg	gcattcacag	cctctatcac	cagcccgcctc	3780
tccaccacaga	ataccctatt	atttaacatc	tgggggggat	gggtggctgc	ccaactcgcc	3840
ccccccagtg	ctgcttcggc	tttcgtgggc	gccggtatcg	ccggtgcggc	tgtcggcagc	3900
ataggtcttg	ggaaggtgct	tgtggacatc	ttggcgggat	atggggcagg	ggtggctggc	3960
gcgctcgtag	cttttaagat	catgagcggc	gaggtgccct	ccaccgagga	cctggttaac	4020
ttactccctg	ccatcctctc	tcccggcgcc	ctagtcgtcg	gggtcgtgtg	cgcagcaata	4080
ctgcgtcggc	acgtggggcc	gggagagggg	gctgtacagt	ggatgaaccg	gctgatagcg	4140
ttcgcctcgc	ggggtaacca	cgtttcccc	gcgcactatg	tgctgagag	cgacgctcgc	4200
gcgcgtgtta	ctcagatcct	ctccggcctt	accatcactc	agctgctgaa	gaggcttcac	4260
cactggatca	atgaggactg	ctccacgcca	tgctccgggt	cgtggctaag	ggatgtttgg	4320
gactggatat	gcacgggtgt	gactgacttc	aagacctggc	tccagtccaa	gctcctgccg	4380
cggttaccgg	gggtcccttt	cttctcgtgt	caacgcgggt	acaagggagt	ctggcggggg	4440
gacggtatca	tgcagaccac	ctgcccgtgt	ggagcacaga	tcaccggaca	tgtcaaaaac	4500
ggttccatga	ggatcgtcgg	gcctaaaacc	tgcagcagca	cgtggcatgg	aacgttcccc	4560
atcaacgcat	acaccacagg	cccatgcgca	ccctccccgg	cgccaaacta	ttccaggggc	4620
ctatggcggg	tggccgctga	ggagtacgtg	gaggttacgc	gggtggggga	tttccactac	4680
gtgacgggca	tgaccactga	caacgtaaag	tgcccatgcc	aggttccggc	ccctgaattc	4740
ttcactgagg	tggatggagt	gcggttgcac	aggtacgctc	cggcgtgcaa	accctccta	4800
cgggaggagg	tcacattcca	ggttgggctc	aaccaatacc	tggttgggtc	acagctccca	4860
tgcgagcccc	aaccggatgt	agcagtgtta	acttccatgc	ttaccgaccc	ctcccacatc	4920
acagcagaga	cggcaaagcg	taggctggct	agggggtctc	ccccctcctt	ggccagttct	4980
tcagctagcc	agttatctgc	gccttccttg	aaggcgacat	gcactacca	tcattgactcc	5040
ccggacgttg	acctcatcga	ggccaacctc	ctgtggcggc	aggagatggg	cgggaacatc	5100
acccgcgtgg	agtcagagaa	taaggtagta	attttggact	ctttcgatcc	gctccgagcg	5160
gaggaggacg	agagggaacc	atccgttgcg	gcggagatct	tgcggaaaac	caagaggttc	5220
ccccggcgga	tgcccatatg	ggcacgccc	gattacaacc	ctccgttgct	agagtcctgg	5280
aaagaccggg	actacgtccc	tccggtggta	cacgggtgcc	cgctaccacc	taccaaagct	5340
cctccgatac	cacccccacg	gagaaagagg	acggtagtcc	tgacagagtc	cactgtgtct	5400

ES 2 869 575 T3

tctgccttgg	cggagcttgc	tactaagacc	tttggcagct	ccgggtcgtc	ggccgtcgac	5460
agcggcacgg	caactgctcc	tcccgaccag	gcttccgacg	acggcgacca	aggatctgac	5520
gttgagtcgt	attcctccat	gccccctctt	gagggagagc	cgggggaccc	cgatctcagc	5580
gacgggtctt	ggtctaccgt	gagcgaggag	gccggtgagg	acgtcatctg	ctgctcaatg	5640
tcctacacat	ggacaggcgc	cttgatcacg	ccatgcgccg	cggaggaaag	caagttgccc	5700
atcaaccctg	tgagcaactc	tttggttgcgt	caccacaaca	tgggtctatg	tacaacatcc	5760
cgcagcgcag	gcctacggca	gaagaaggtc	acdtttgaca	gactgcaagt	cctggacgac	5820
cactaccggg	acgtgctcaa	ggagatgaag	gcgaaggcgt	ccacagttaa	ggctaaactc	5880
ctatccatag	aagaagcctg	taagctgacg	ccccacatt	cggccagatc	caaatttggc	5940
tatggggcaa	aggacgtccg	gaacctatcc	agcaaggccg	ttaaccacat	ccgctccgtg	6000
tggaaggact	tgctggaaga	cactgagaca	ccaattgaca	ccaccgtcat	ggcaaaaagt	6060
gaggttttct	gcgtccaacc	agagaaagga	ggccgcaagc	cagctcgcct	tatcgtattc	6120
ccagacttgg	gggttcgtgt	atgcgagaag	atggcccttt	atgacgtggt	ctccaccctt	6180
cctcaggccg	tgatgggctc	ctcatacgga	ttccagtact	cccctggaca	gcgggtcgag	6240
ttcctggtga	atgcctggaa	atcaaagaaa	tgccctatgg	gcttttcata	tgacaccgcg	6300
tgttttgact	cgacagtcac	tgagagtgac	atccgtgttg	aggagtcaat	ttaccaatgt	6360
tgtgacttgg	ccccgaagc	cagacaggcc	ataaagtgcg	tcacagagcg	gctttacatt	6420
gggggtcccc	tgaccaattc	aaaagggcag	aactgtggct	atcgccggtg	ccgcgcgagt	6480
ggcgtgctga	cgaccagctg	cggtaatacc	cttacatgtt	acttgaaggc	ctctgcagcc	6540
tgtcgagctg	caaagctccg	ggactgcacg	atgctcgtga	acggagacga	cctcgtcgtc	6600
atctgtgaga	gtgcgggaac	ccaagaggat	gaggcgaacc	tacgagtctt	cacggaggct	6660
atgactaggt	attctgcccc	ccccggggac	ccgccccgac	cagaatacga	cttggagcta	6720
ataacatcat	gttcctccaa	tgtgtcggtc	gcgcacgatg	catctggcaa	aagggtatac	6780
tacctcacc	gcgaccctc	cacccccctt	gcacgggctg	cgtgggagac	agctagacac	6840
actccagtta	attcctggct	aggcaacatc	attatgtatg	cgcccacctt	atgggcaagg	6900
atgattctga	tgaccattt	cttctccatc	cttctagccc	aggagcaact	tgaaaaagcc	6960
ctggattgcc	agatctacgg	ggcctgttac	tccattgagc	cacttgacct	acctcagatc	7020
attgaacgac	tccatggtct	tagcgcattt	tcactccata	gttactctcc	aggtgagatc	7080
aatagggtgg	cttcatgcct	caggaaactt	ggggtaccac	ccttgcgagt	ctggagacat	7140
cgggccagaa	gtgtccgcgc	taagctgctg	tcccaggggg	ggagggctgc	cacttgtggt	7200
aagtacctct	tcaactgggc	agtaaggacc	aagctcaaac	tcactccaat	ccgggcagcg	7260
tcccagttgg	acttgtccag	ctggttcgtg	gctggttaca	gcgggggaga	catatatcac	7320

ES 2 869 575 T3

agcctgtctc gtgcccgacc ccgctgggtc atgttgtgcc tactcctact ttcagtaggg 7380
gtaggcacatc acctgctccc caaccgataa 7410

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

<400> 3

cgtagaccgt gcatcatgag cacaaatcct aaacccccaaa gaaaaaccaa acgtaacacc 60
aaccgccgcc cacaggacgt caagttcccg ggtggtgggc agatcgttgg tggagtttac 120
ctgttgccgc gcaggggccc caggttgggt gtgcgcgcga ctaggaagac ttccgagcgg 180
tcacaacctc gtggaaggcg acaacctatc cccaaggctc gccagcccga gggcagggcc 240
tggtctcagc ccgggtaccc ttggccctc tatggcaacg agggcatggg gtgggcagga 300
tggtctcctgt caccgcggcg ctcccgccct agttggggcc ccacggaccc ccggcgtagg 360
tcgcgtaatt tgggtaaggc catcgatacc ctacatgcg gcttcgccga cctcatgggg 420
tacattccgc tcgtcggcgc cccctaggg ggcttgcca gggccctggc acatggtgtc 480
cgggttgtgg aggacggcgt gaactatgca acagggaatt tgcccgggtg ctctttctct 540
atcttctctc ttgctctgct gtcctgtttg accatcccag ctcccgctta tgaggtgcgc 600
aacgtatccg ggatatacca tgtcacgaac gactgctcca actcaagtat tgtgtatgag 660
gcagcggaca tgatcatgca tacccccggg tgctgcccct gcgttcggga gggcaactcc 720
tcccgttgct ggtggcact tactcccacg ctacggcca ggaatgccag cgtcccact 780
acggcaatac gacgccatgt cgatttgctc gttggggcgg ctgctttctg ctccgctatg 840
tatgtgggag atctctgcgg atctgttttc cttgtctccc agctgttcac ctctctgccc 900
cgccggcatg agacaatata ggactgcaat tgctcaatct atcccgcca cgtgtcaggt 960
caccgcatgg cttgggacat gatgatgaac tggctgccta caacggccct ggtggtgtcg 1020
cagttactcc ggatcccaca agctatcgtg gacatggtgg cgggggctca ctggggtgtc 1080
ctagcgggcc ttgcctacta ttccatggtg gggaactggg ctaaggtatt gattgtgatg 1140
ctactttttg ccggcgctga cggggagacc cgtgtgacag gggggcagat agccagaaat 1200
gcctactcgc tcacgacct cttttcatct gggctggctc agaacatcca gtcataaac 1260
accaacggta gctggcacat caacaggact gccctgaact gcaatgactc cctcaacacc 1320
gggtttcttg ccgcgctggt ctacacgcac aagttcaacg cgtccggatg tccagagcgc 1380
ttggccagct gccgccccat tgacaagttc gatcaggggt ggggtcccat cacttatgct 1440
gagcagggcg gccaggacca gaggccttat tgctggcact acgcacctaa accatgtggt 1500
attgtatccg cgtcgaaggc gtgtggtcca gtgtattgtt tcacccaag ccagttgta 1560

ES 2 869 575 T3

gtggggacga	ccgatcgggt	cggtgtccct	acgtatagct	ggggggagaa	tgagacagac	1620
gtgctgctcc	ttaacaacac	gcggccgccg	caaggcaact	ggttcggctg	tacgtggatg	1680
aacggcactg	ggttcaccaa	gacatgcggg	ggccccccgt	gtaacatcgg	ggggggcggc	1740
aataacacct	tgacctgccc	tacggactgt	ttccggaagc	accccgcggc	cacttacaca	1800
aaatgtggtt	cgggaccttg	gctgacaccc	aggtgcttgg	tagactaccc	atacaggctc	1860
tggcactacc	cctgcactgc	caactttacc	atcttcaagg	ttaggatgta	tgtagggggc	1920
gtggagcaca	ggctcgatgc	tgcatgcaat	tggacccgag	gggaacgttg	caacttggag	1980
gatagggata	gattggagct	cagcccgcct	ctgctgtcta	caacagagtg	gcagggtgctg	2040
ccctgttctt	tcaccaccct	accggctctg	tccactgggt	taattcatct	ccatcagaac	2100
atcgtggacg	tgcaatacct	gtacgggtata	gggtcggcag	ttgtttcctt	tgcaatcaaa	2160
tgggactata	tcgtgatact	tttccctcct	ctggcggacg	cgcgcgtctg	tgctgtcttg	2220
tggatgatgc	tgctgatagc	ccaggccgag	gccgccttag	aaaacctggg	ggctcctcaat	2280
gcggcgtccg	tggccggagc	gcattggcatt	ctctccttcc	ttgtgttctt	ctgtgccgcc	2340
tggtagatca	agggcaagct	gggtccccggg	gcagcatatg	ctttctatgg	agtatggccg	2400
ctgctcctgc	ttctgctggc	cttaccacca	cgagcttacg	ctatggagcg	ggagatggct	2460
gcacgtgctg	gagggcgcggt	gtttgttaggt	ctgggtactct	tgactttgtc	accatactat	2520
aaagagttcc	tcgccaggct	catatgggtg	ttgcaatatt	ttatcaccag	agccgaggcg	2580
cacctgcaag	tgtggatccc	ccccctcaac	attcgggggg	gccgcgatgc	catcatcctc	2640
ctcgcgtgtg	tagtccaccc	agagctaata	tttgacatca	ccaaactcct	gctcgccata	2700
ctcgggtccg	tcattggtgct	ccaggctagc	ataactcaag	tgccgtactt	cgtacgcgcc	2760
caagggctca	ttcgtgcatg	catgttggtg	cgggaaggtag	ccggggggcca	ttatgtccaa	2820
atggcctttg	tgaagctgac	cgcactgaca	ggtacgtacg	tttatgacca	tctaactcca	2880
ctgcgggact	gggcccacgc	gggcctgcga	gacctcgcgg	tggcagtaga	gcccgttgtc	2940
ttctctgaca	tggagaccaa	ggcatcacc	tggggggcag	acaccgcagc	gtgtggggac	3000
attatcttgg	gtctacctgt	ctccgcccga	aggggtaggg	agatacttct	ggggccggcc	3060
gatagtcttg	aagggcaggg	gtggcggctc	cttgctccca	tcacggccta	ttcccaacag	3120
acgcggggcc	tacttgggtg	catcatcact	agcctcacag	gccgggacaa	aaaccaagtc	3180
gagggggagg	ttcaagtggg	ctccaccgcg	acacaatcct	tcctggcgac	ctgcgtcaat	3240
ggcgcgtgct	ggactgtctt	ccatgggtgc	ggctcaaaga	ccttagctgg	cccaaaaggt	3300
ccaatcacc	agatgtacac	taatgtagac	ctggacctcg	tcgggtggca	ggcgcccccc	3360
gggtcgcgtt	ctctgacacc	atgcacctgc	ggcagctcag	acctctatct	ggtcacgaga	3420

ES 2 869 575 T3

catgctgatg	tcattccggt	gcgcggcg	ggcgacagta	ggggaagcct	actctctccc	3480
agacctgtct	cctacttgaa	aggctcctcg	ggtggtccgc	tgctctgccc	ttcgaggcac	3540
gctgtgggca	tcttcggg	tgctgtgtgc	acccggggg	ttgcgaaggc	ggtggatttc	3600
ataccggttg	aatcaatgga	aactactatg	cggtctccgg	tcttcacgga	taactcatcc	3660
ccccggccg	taccgcagac	attccaagtg	gccatctac	acgcccctac	tggcagcggc	3720
aagagcacta	agggtgccgc	tgcatatgca	gccaagggt	ataagggtgct	cgctcctgaac	3780
ccgtccgttg	ccgctacctt	gggttttggg	gcgtatatgt	ctaaggcaca	tggtatcgac	3840
cccaacatca	gaactggggt	aagggccatc	accacggg	cccctattac	atactccacc	3900
tacggcaagt	tccttgccga	cggcggttgt	tccggggg	cctatgacat	cataatatgt	3960
gatgagtgcc	actcaactga	ctcgactacc	atcttgggca	ttggcacagt	cctggaccaa	4020
gcggagacgg	ctggagcg	gctcgtcgtg	ctcgccaccg	ctacgcctcc	gggatcggtc	4080
accgtgccac	acccaatat	tgaggagggtg	gccctgtcca	acgctggaga	aatccccttc	4140
tacggcaaag	ccatccccat	tgagggtcatc	aaggggggaa	gacatctcat	tttctgccat	4200
tccaagaaga	agtatgacga	gctcgccgca	aagctatcag	ccctcggact	taatgctgta	4260
gcatattatc	ggggtcttga	tgtgtccgtc	ataccgacca	acggagacgt	cgttgtcgtg	4320
gcaacagacg	ctctaatac	gggctttacc	ggcgactttg	actcagtgat	cgactgtaac	4380
acatgtgtca	cccagacagt	cgatttcagc	ctggatccca	ccttcacccat	cgagacgacg	4440
accgtgcccc	aagacgcagt	ggcgcgatca	cagcggcg	gtaggactgg	taggggcagg	4500
agaggcatct	acaggtttgt	gactccagga	gaacggccct	cgggcatgtt	cgattcctcg	4560
gtcctgtgtg	agtgtctatga	cgcggtgtgt	gcttggtacg	agctcacgcc	tgctgagacc	4620
tcggttaggt	tgcgggctta	cctgaataca	ccagggttgc	ccgtctgcca	ggaccatctg	4680
gagttttggg	agagcgtctc	cacaggcctc	acccacatag	atgcccattt	tctgtcccag	4740
actaaacagg	caggagacaa	cttcccctac	ctggtagcat	accaagccac	agtgtgcgcc	4800
agagctcaag	ctccacctcc	atcatgggat	caaagtgtga	agtgtctcat	acggctcaaa	4860
cccacgtgc	acgggccaac	acccctgctg	tataggctag	gagccgtcca	aaatgagatc	4920
accctcacac	accccatgac	caaattcatc	atggcatgca	tgtcggctga	cctggaggtc	4980
gtcactagca	cctgggtgct	agtaggcgga	gtccttgag	ctctggctgc	atattgcttg	5040
acaacaggca	gtgtggtcat	tgtgggtagg	atcatcttgt	ccgggaggcc	ggctgttatt	5100
cccgacagg	aagtcctcta	ccgggagttc	gatgagatgg	aagagtgcgc	ctcacacctc	5160
ccttacatcg	aacagggaat	gcagcttgcc	gagcaattca	agcagaaggc	gctcggattg	5220
ctgcaaacag	ccaccaagca	agcggaggct	gctgctccc	tggtagaatc	caagtggcga	5280
gcccttgaga	ccttctgggc	gaagcacatg	tggaatttca	tcagcgggat	acagtaccta	5340

ES 2 869 575 T3

gcaggcttgt ccactctgcc tgggaacccc gcgatagcat cactgatggc attcacagcc 5400
tctatcacca gcccgctctc caccagaat accctattat ttaacatctg ggggggatgg 5460
gtggctgccc aactcgcccc cccagtgct gcttcggctt tcgtgggcgc cggtatcgcc 5520
ggtgcggctg tcggcagcat aggtcttggg aaggtgcttg tggacatctt ggcgggatat 5580
ggggcagggg tggctgggcg gctcgtagct tttaatgatca tgagcggcga ggtgccctcc 5640
accgaggacc tggttaactt actccctgcc atcctctctc ccggcgccct agtcgtcggg 5700
gtcgtgtgcg cagcaatact gcgtcggcac gtgggcccgg gagagggggc tgtacagtgg 5760
atgaaccggc tgatagcgtt cgcctcgcgg ggtaaccacg tttccccgc gcactatgtg 5820
cctgagagcg acgctgcggc gcgtgttact cagatcctct ccggccttac catcactcag 5880
ctgctgaaga ggcttcacca ctggatcaat gaggactgct ccacgccatg ctccggttcg 5940
tggctaaggg atgtttggga ctggatatgc acggtgttga ctgacttcaa gacctggctc 6000
cagtccaagc tcctgccgcg gttaccgggg gtccctttct tctcgtgtca acgcgggtac 6060
aagggagtct ggcgggggga cggtatcatg cagaccacct gcccggtgtg agcacagatc 6120
accggacatg tcaaaaacgg ttccatgagg atcgtcgggc ctaaaacctg cagcagcacg 6180
tggcatggaa cgttccccat caacgcatac accacaggcc catgcgccacc ctccccggcg 6240
ccaaactatt ccagggcgct atggcggtg gccgctgagg agtacgtgga ggttacgcgg 6300
gtgggggatt tccactacgt gacgggcatg accactgaca acgtaaagtg cccatgccag 6360
gttccggccc ctgaattctt cactgaggtg gatggagtgc ggttgcacag gtacgctccg 6420
gcgtgcaaac ccctcctacg ggaggaggtc acattccagg ttgggctcaa ccaataacctg 6480
gttgggtcac agctcccatg cgagcccgaa ccggatgtag cagtgtctaac ttccatgctt 6540
accgaccctt cccacatcac agcagagacg gcaaagcgta ggctggctag ggggtctccc 6600
ccctccttgg ccagttcttc agctagccag ttatctgcgc cttccttgaa ggcgacatgc 6660
actaccatc atgactcccc ggacgttgac ctcatcgagg ccaacctcct gtggcggcag 6720
gagatggcg ggaacatcac ccgctggag tcagagaata aggtagtaat tttggactct 6780
ttcgatccgc tccgagcgga ggaggacgag agggaaacct ccgttgcggc ggagatcttg 6840
cggaaaacca agaggttccc cccggcgatg cccatatggg cagccccga ttacaacctt 6900
ccgttgctag agtcctggaa agaccggac tacgtccctc cgggtgtaca cgggtgcccg 6960
ctaccaccta ccaaagctcc tccgatacca ccccaacgga gaaagaggac ggtagtcctg 7020
acagagtcca ctgtgtcttc tgccttggcg gagcttgcta ctaagacctt tggcagctcc 7080
gggtcgtcgg ccgtcgacag cggcacggca actgctcctc ccgaccaggc ttccgacgac 7140
ggcgaccaag gatctgacgt tgagtcgtat tcctccatgc cccctcttga gggagagccg 7200

ES 2 869 575 T3

ggggacccccg atctcagcga cgggtcttgg tctaccgtga gcgaggaggc cgggtgaggac	7260
gtcatctgct gctcaatgtc ctacacatgg acaggcgcct tgatcacgcc atgcgccgcg	7320
gaggaaagca agttgcccac caaccggtt agcaactctt tgttgcgta ccacaacatg	7380
gtctatgcta caacatcccc cagcgcaggc ctacggcaga agaagggtcac ctttgacaga	7440
ctgcaagtcc tggacgacca ctaccgggac gtgctcaagg agatgaaggc gaaggcgtcc	7500
acagttaagg ctaaaactct atccatagaa gaagcctgta agctgacgcc cccacattcg	7560
gccagatcca aatttggtta tggggcaaag gacgtccgga acctatccag caaggccgtt	7620
aaccacatcc gctccgtgtg gaaggacttg ctggaagaca ctgagacacc aattgacacc	7680
accgtcatgg caaaaagtga ggttttctgc gtccaaccag agaaaggagg ccgcaagcca	7740
gctcgcccta tcgtattccc agacttgggg gtctgtgtat gcgagaagat ggccctttat	7800
gacgtggtct ccacccttcc tcaggccgtg atgggctcct catabggatt ccagtactcc	7860
cctggacagc gggctcgagt cctgggtgaat gcctggaaat caaagaaatg ccctatgggc	7920
ttttcatatg acaccgctg ttttgactcg acagtcactg agagtgacat ccgtgttgag	7980
gagtcaattt accaatgttg tgacttggcc cccgaagcca gacaggccat aaagtcgctc	8040
acagagcggc ttacatttg gggccccctg accaattcaa aagggcagaa ctgtggctat	8100
cgccggtgcc gcgcgagtgg cgtgctgacg accagctgcg gtaataacct tacatgttac	8160
ttgaaggcct ctgcagcctg tcgagctgca aagctccggg actgcacgat gctcgtgaac	8220
ggagacgacc tcgtcgtcat ctgtgagagt gcggaaccc aagaggatga ggcgaaacct	8280
cgagtcttca cggaggctat gactaggtat tctgcccccc ccggggagccc gccccgacca	8340
gaatacgact tggagctaata aacatcatgt tcctccaatg tgtcggtcgc gcacgatgca	8400
tctggcaaaa gggatatacta cctcaccgcg gaccctcca ccccccttgc acgggctgcg	8460
tgggagacag ctagacacac tccagttaat tcctggctag gcaacatcat tatgtatgcg	8520
cccaccttat gggcaaggat gattctgatg acccatttct tctccatcct tctagcccag	8580
gagcaacttg aaaaagccct ggattgccag atctacgggg cctgttactc cattgagcca	8640
cttgacctac ctacatcat tgaacgactc catggtctta gcgcattttc actccatagt	8700
tactctccag gtgagatcaa taggggtggc tcatgcctca ggaaacttgg ggtaccaccc	8760
ttgcgagtct ggagacatcg ggccagaagt gtccgcgcta agctgctgtc ccaggggggg	8820
agggctgcc cttgtggtaa gtacctcttc aactgggcag taaggaccaa gctcaaactc	8880
actccaatcc cggcagcgtc ccagttggac ttgtccagct gggtcgtggc tggttacagc	8940
gggggagaca tatatcacag cctgtctcgt gcccgacccc gctggttcat gttgtgccta	9000
ctcctacttt cagtaggggt aggcattctac ctgctcccca accgataa	9048

ES 2 869 575 T3

<210> 4
 <211> 849
 <212> ADN
 <213> Virus vaccinia

5

<400> 4

gatgatgatg atgatgatga tgatgatgat gtcatagacg atgatgatta taatccaaaa	60
cccactccga taccggagcc tcaccctaga ccaccgtttc ccagacatga atatcataag	120
aggccgaaag ttcttcctgt agaagaacct gatcctgtca aaaaagacgc ggatcgtata	180
agacttgata atcatatatt aaacacattg gatcataatc ttaattccat cggacactat	240
tgttgtgata cagcagcagt tgataggtta gaacatcaca ttgaaacatt gggacaatat	300
gcagtaatac tagcaagaaa gataaatatg caaacattac tgttcccatg gccattacct	360
actgtccatc cacatgcgat agatggtagt attccgccac atgggagatc tacgatctta	420
taattacacg attgtagtta agttttgaat aaaatTTTTT tataataaat agaggtcacg	480
aacctcgact ctagaggatc ccattgtgaa aaattgaaaa actagtctaa tttattgcac	540
ggtgtgaaaa attgaaaaac tagtctaatt tattgcacgg tgtgaaaaat tgaaaaacta	600
gtctaattta ttgcacggtg tgaaaaattg aaaaactagt ctaatttatt gcacggtgtg	660
aaaaattgaa aaactagtct aattttattgc acggtgtgaa aaattgaaaa actagtctaa	720
tttattgcac ggtgtgaaaa attgaaaaac tagtctaatt tattgcacgg tgtgaaaaat	780
tgaaaaacta gtctaattta ttgcacggtg tgaaaaattg aaaaactagt taattttattg	840
cacggtgtg	849

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende un primer virus vaccinia recombinante y

- 5 (i) un vector recombinante; o
(ii) un virus vaccinia recombinante adicional,

para su uso en un método para tratar y/o prevenir la hepatitis C, en donde el método comprende

- 10 (a) administrar el primer virus vaccinia recombinante para una inmunización primaria y, a continuación, el vector recombinante o el virus vaccinia recombinante adicional para una inmunización de refuerzo; o
(b) administrar el vector recombinante para una inmunización primaria y, a continuación, el primer virus vaccinia recombinante para una inmunización de refuerzo;

- 15 en donde el primer virus vaccinia recombinante comprende un promotor de expresión, y todo o una parte del ADNc del genoma del virus de la hepatitis C;
en donde el vector recombinante o el virus vaccinia recombinante adicional comprende un promotor de expresión, y todo o una parte del ADNc del genoma del virus de la hepatitis C siempre que tenga una secuencia de nucleótidos que difiera de la de todo o una parte del ADNc del genoma del virus de la hepatitis C contenido en el primer virus
20 vaccinia recombinante;
y en donde

- (A) el ADNc del primer virus vaccinia recombinante comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína estructural del virus de la hepatitis C y el ADNc del vector recombinante o el ADNc del virus vaccinia
25 recombinante adicional comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína no estructural del virus de la hepatitis C; o
(B) el ADNc del primer virus vaccinia recombinante comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína no estructural del virus de la hepatitis C y el ADNc del vector recombinante o el ADNc del virus vaccinia
30 recombinante adicional comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína estructural del virus de la hepatitis C.

2. Una composición farmacéutica que comprende un primer virus vaccinia recombinante para su uso en un método para tratar y/o prevenir la hepatitis C, en donde el método comprende

- 35 (a) administrar el primer virus vaccinia recombinante para una inmunización primaria y, a continuación, administrar
(i) un vector recombinante; o
(ii) un virus vaccinia recombinante adicional

- 40 para una inmunización de refuerzo; o
(b) administrar un vector recombinante para una inmunización primaria y, a continuación, administrar el primer virus vaccinia recombinante para una inmunización de refuerzo;

- en donde el primer virus vaccinia recombinante comprende un promotor de expresión, y todo o una parte del ADNc
45 del genoma del virus de la hepatitis C;
y en donde el vector recombinante o el virus vaccinia recombinante adicional comprende un promotor de expresión, y todo o una parte del ADNc del genoma del virus de la hepatitis C, siempre que tenga una secuencia de nucleótidos que difiera de la de todo o una parte del ADNc del genoma del virus de la hepatitis C contenido en el virus vaccinia recombinante,
50 y en donde

- (A) el ADNc del primer virus vaccinia recombinante comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína estructural del virus de la hepatitis C y el ADNc del vector recombinante o el ADNc del virus vaccinia
55 recombinante adicional comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína no estructural del virus de la hepatitis C; o
(B) el ADNc del primer virus vaccinia recombinante comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína no estructural del virus de la hepatitis C y el ADNc del vector recombinante o el ADNc del virus vaccinia
60 recombinante adicional comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína estructural del virus de la hepatitis C.

3. Una composición farmacéutica que comprende un vector recombinante para su uso en un método para tratar y/o prevenir la hepatitis C, en donde el método comprende

- 65 (a) administrar un virus vaccinia recombinante para una inmunización primaria y, a continuación, administrar el vector recombinante para una inmunización de refuerzo; o
(b) administrar el vector recombinante para una inmunización primaria y, a continuación, administrar un virus

vaccinia recombinante para una inmunización de refuerzo;

en donde el virus vaccinia recombinante comprende un promotor de expresión, y todo o una parte del ADNc del genoma del virus de la hepatitis C;

5 y en donde el vector recombinante comprende un promotor de expresión, y todo o una parte del ADNc del genoma del virus de la hepatitis C, siempre que tenga una secuencia de nucleótidos que difiera de la de todo o una parte del ADNc del genoma del virus de la hepatitis C contenido en el virus vaccinia recombinante, y en donde

10 (A) el ADNc del virus vaccinia recombinante comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína estructural del virus de la hepatitis C y el ADNc del vector recombinante comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína no estructural del virus de la hepatitis C; o

15 (B) el ADNc del virus vaccinia recombinante comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína no estructural del virus de la hepatitis C y el ADNc del vector recombinante comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína estructural del virus de la hepatitis C.

4. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde los ADNc del genoma del virus de la hepatitis C codifican independientemente una proteína estructural del virus de la hepatitis C, una proteína no estructural del virus de la hepatitis C, o una proteína estructural y una proteína no estructural del virus de la hepatitis C.

5. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde los ADNc del genoma del virus de la hepatitis C son cada uno independientemente cualquier ADN de los siguientes (a)-(f):

25 (a) ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO:1;
(b) ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el 90 % o más de identidad con el ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO:1 y que codifica una proteína estructural y una proteína no estructural del virus de la hepatitis C;

30 (c) ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO:2;
(d) ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el 90 % o más de identidad con el ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO:2 y que codifica una proteína estructural y una proteína no estructural del virus de la hepatitis C;

35 (e) ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO:3; o
(f) ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el 90 % o más de identidad con el ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO:3 y que codifica una proteína estructural y una proteína no estructural del virus de la hepatitis C.

40 6. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde uno o más de los promotores de expresión es un promotor híbrido.

7. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la secuencia de nucleótidos del promotor híbrido es ADN de los siguientes (a) o (b):

45 (a) ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO:4; o
(b) ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el 90 % o más de identidad con el ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO:4 y que tiene actividad promotora.

50 8. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el virus vaccinia recombinante, el primer virus vaccinia recombinante y/o el virus vaccinia recombinante adicional es la cepa LC16m8.

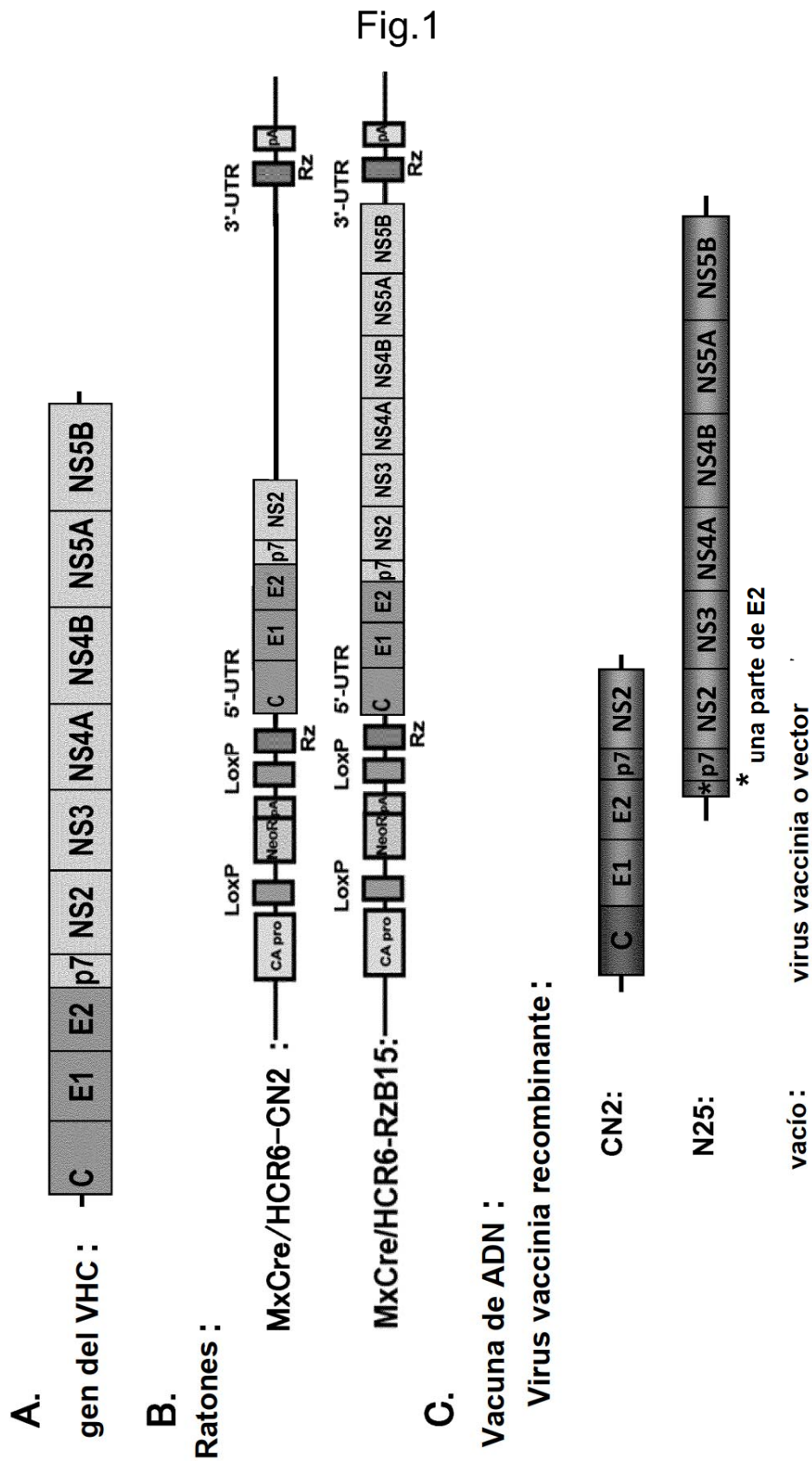


Fig.1

Fig.2

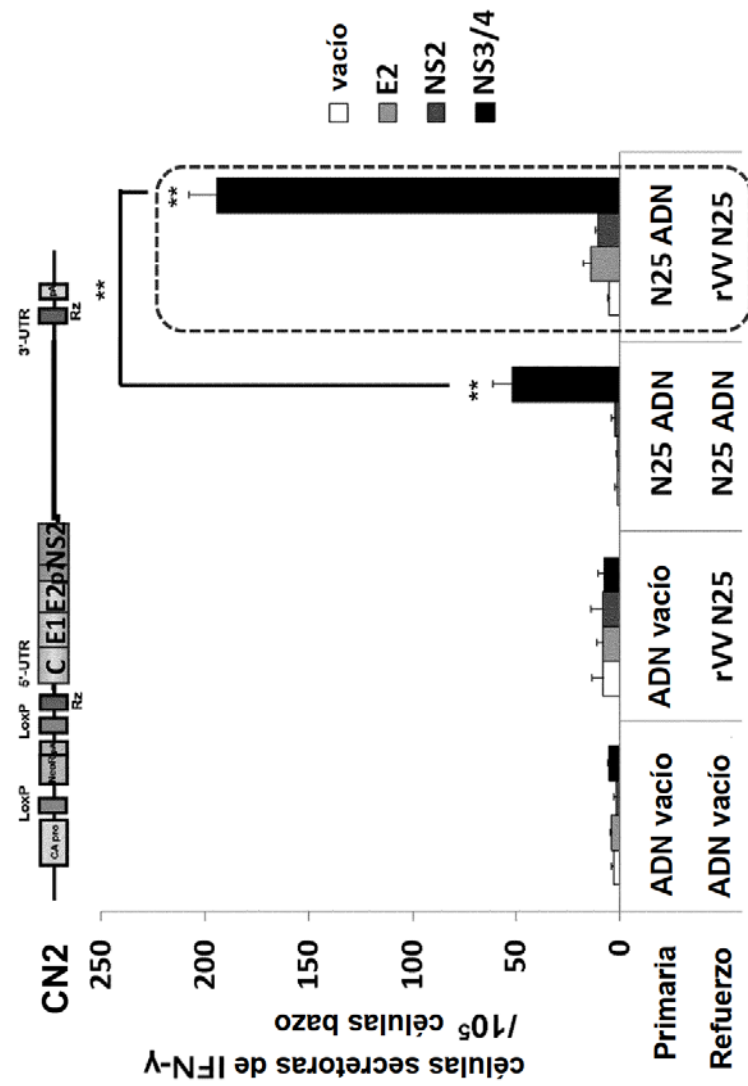


Fig.3

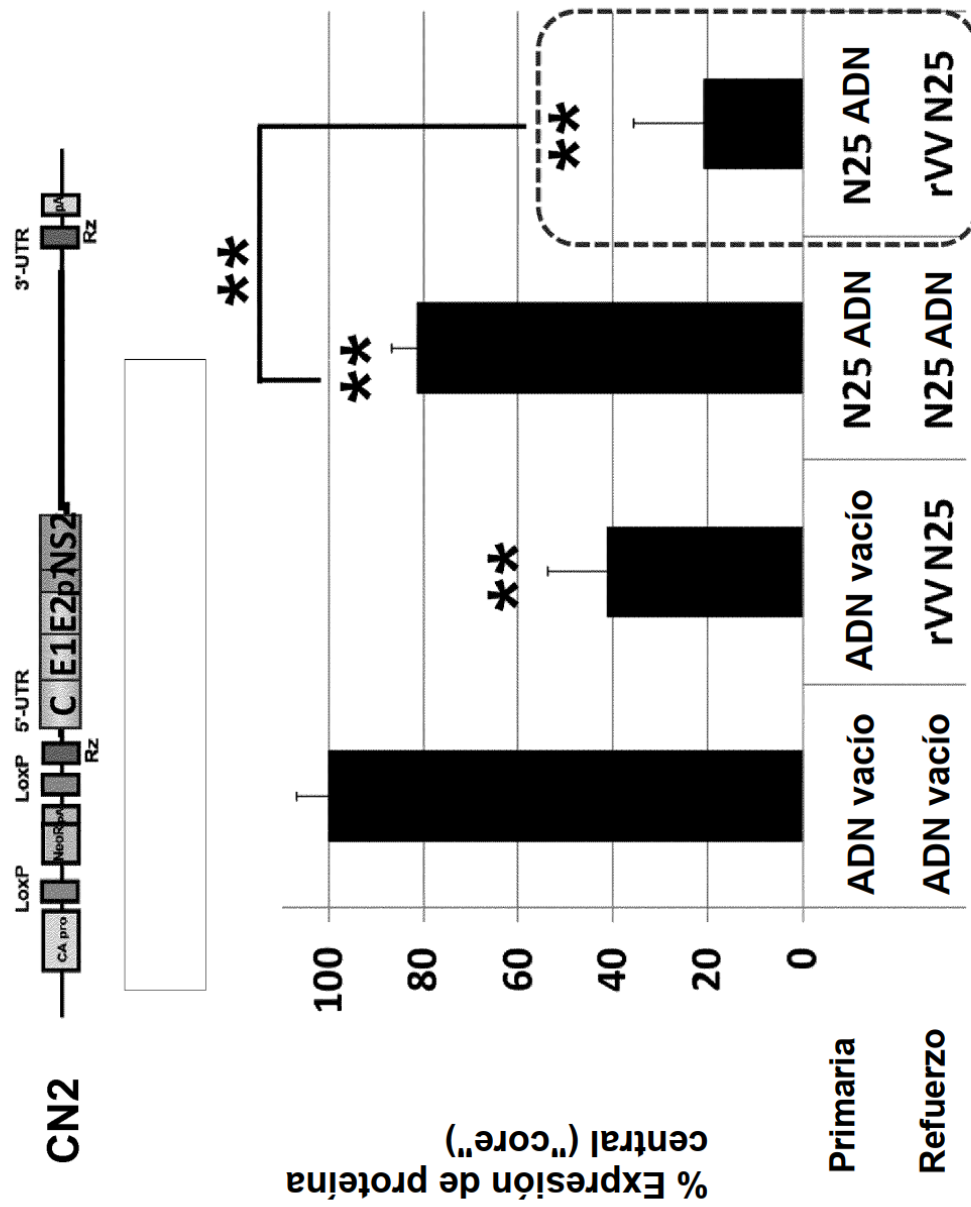


Fig.4

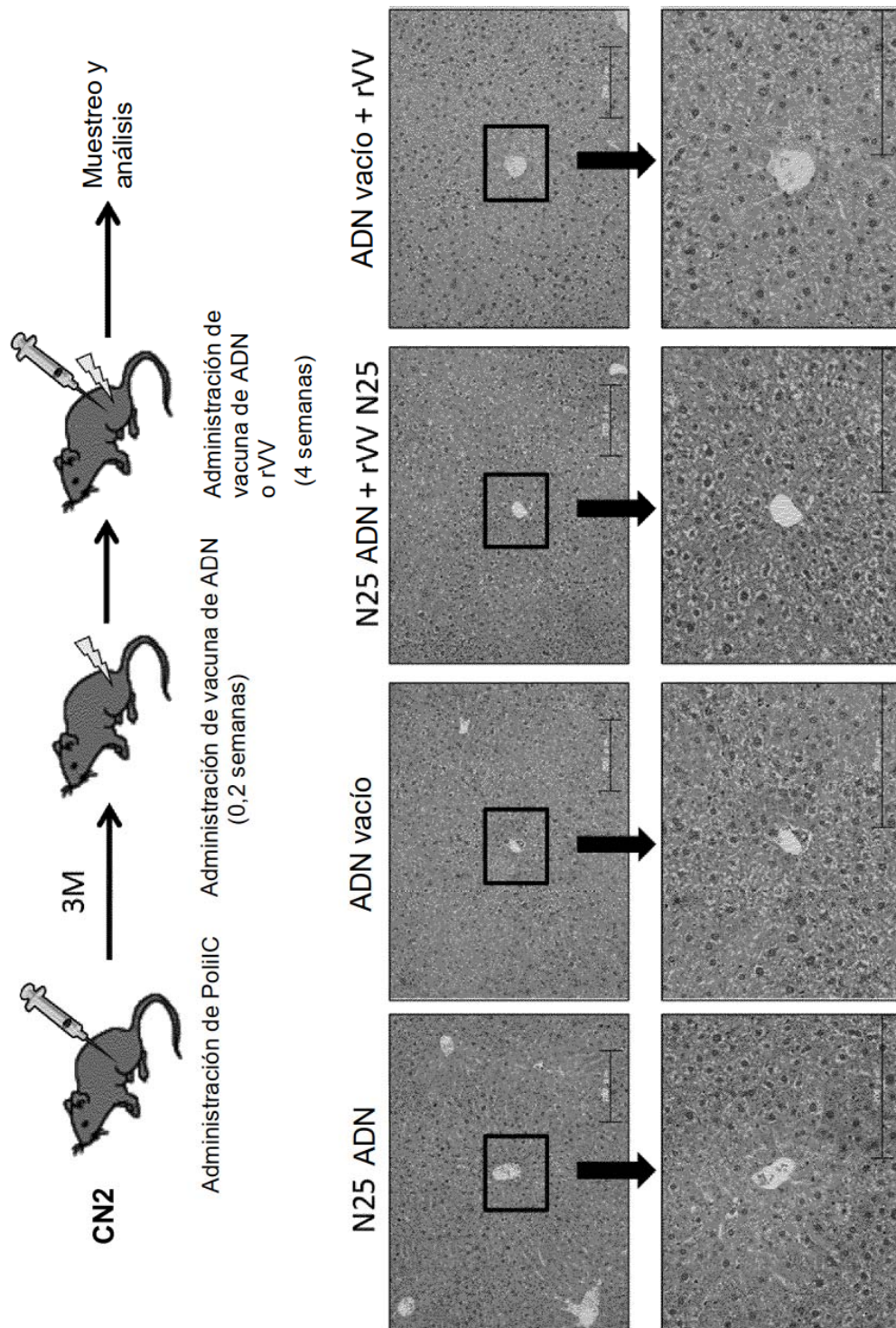


Fig.5

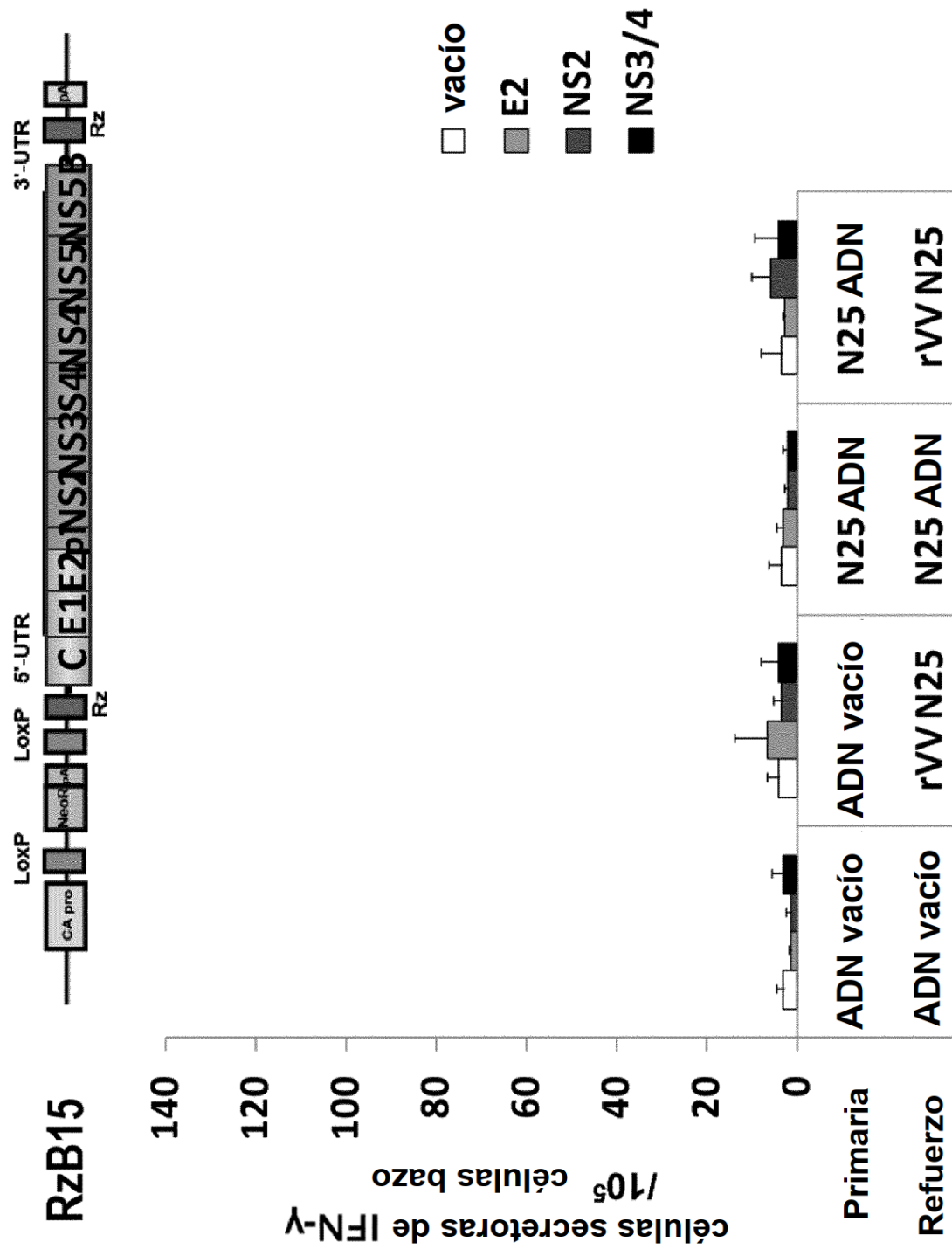


Fig.6

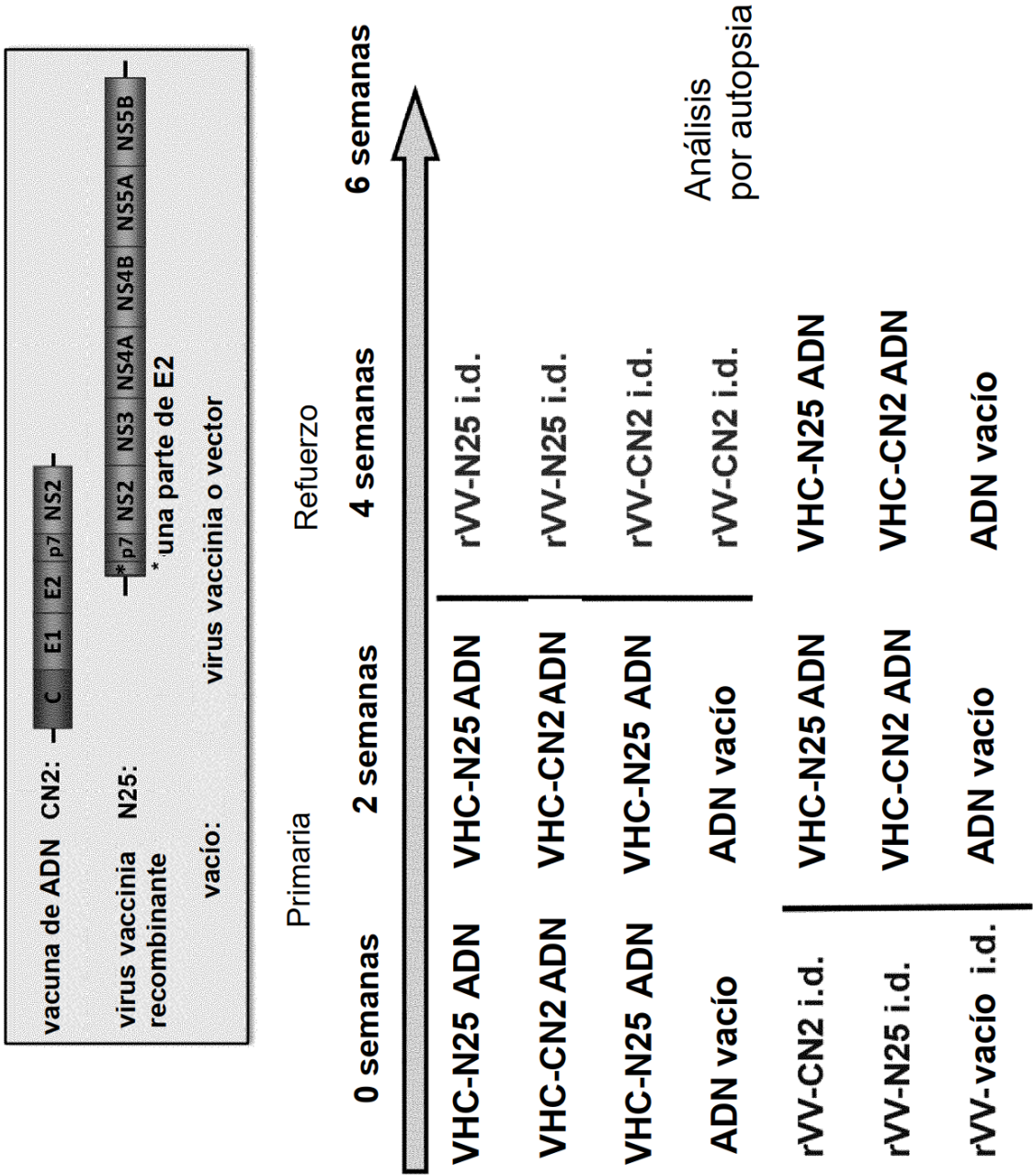


Fig.7

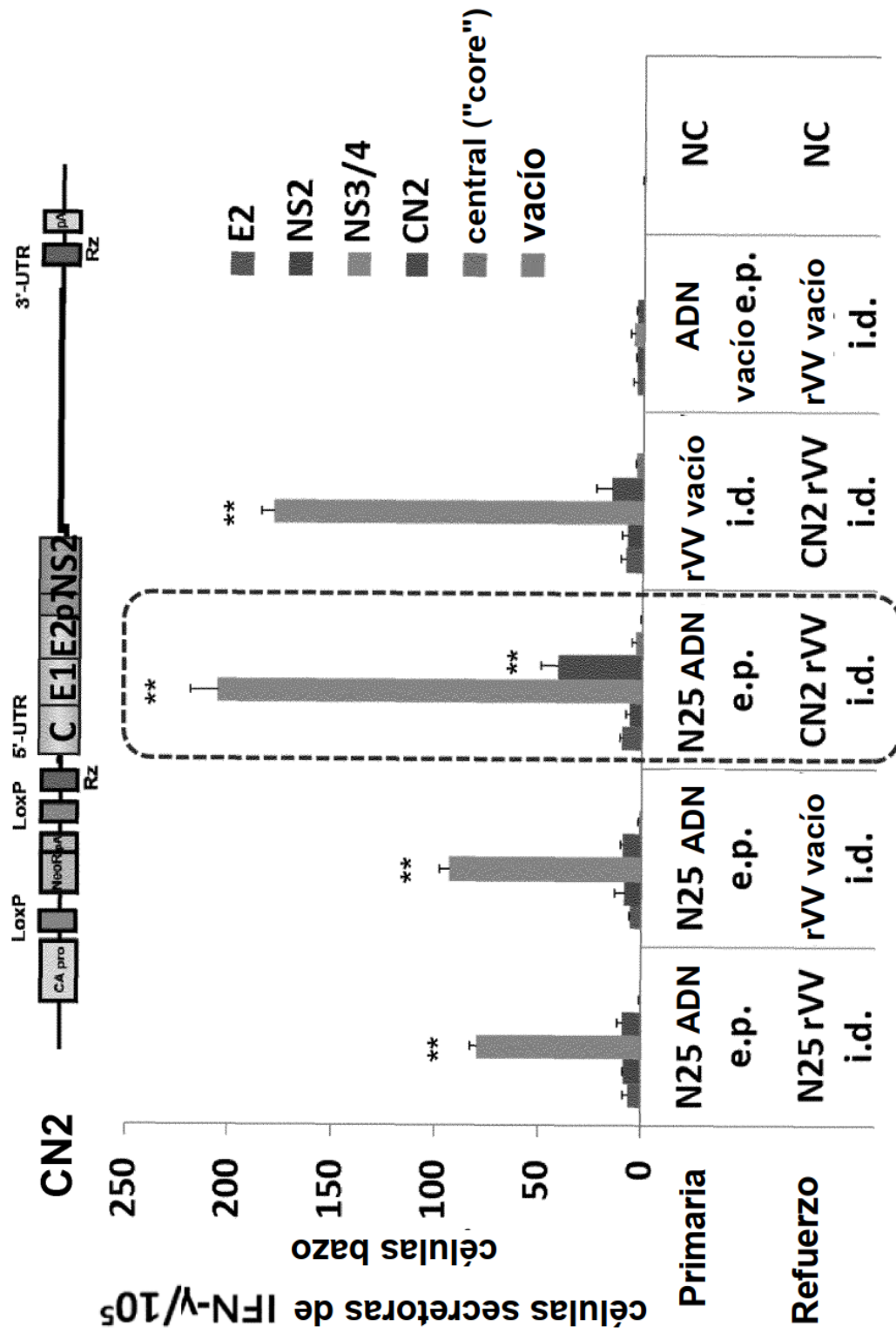


Fig.8

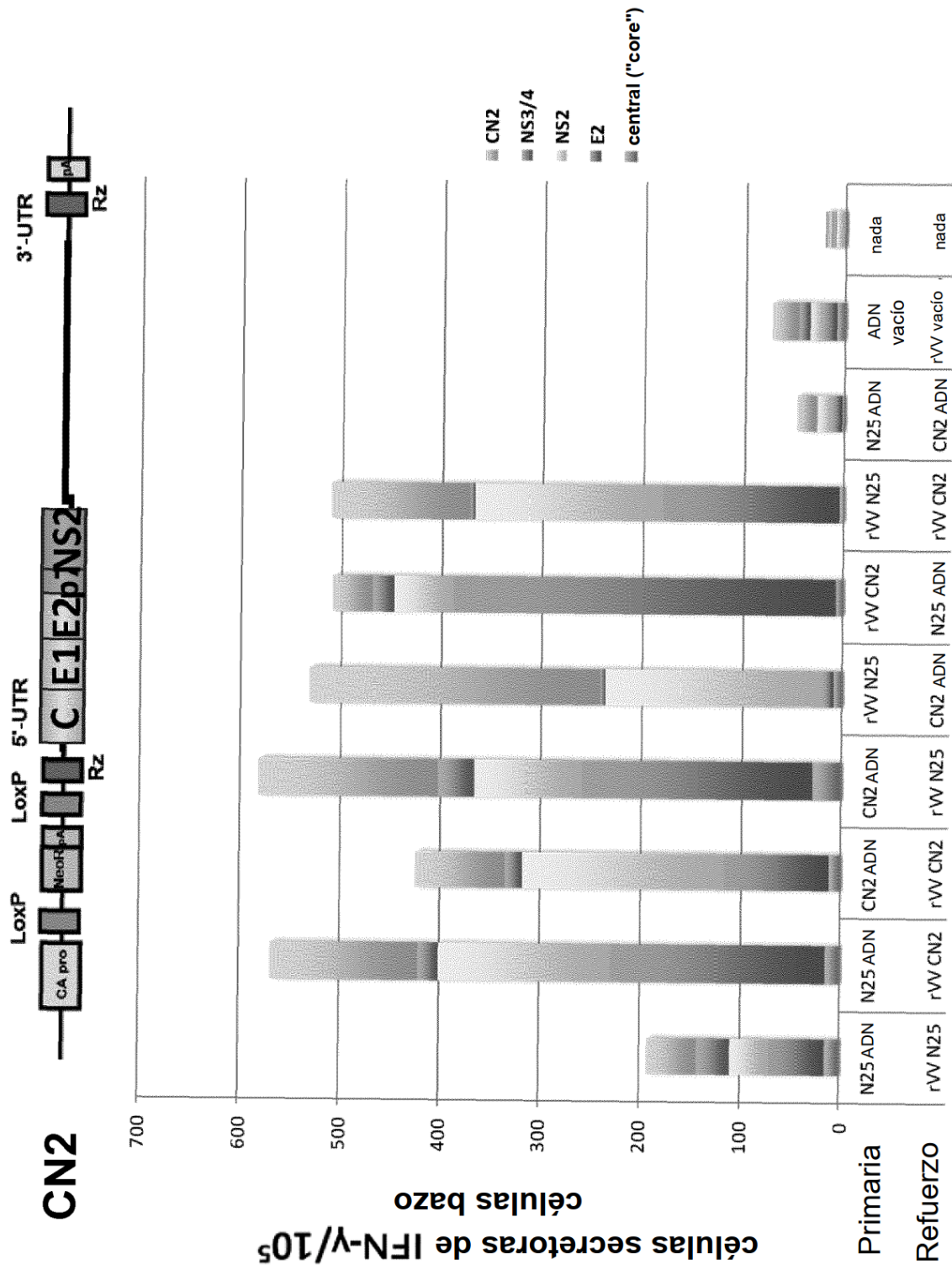


Fig.9

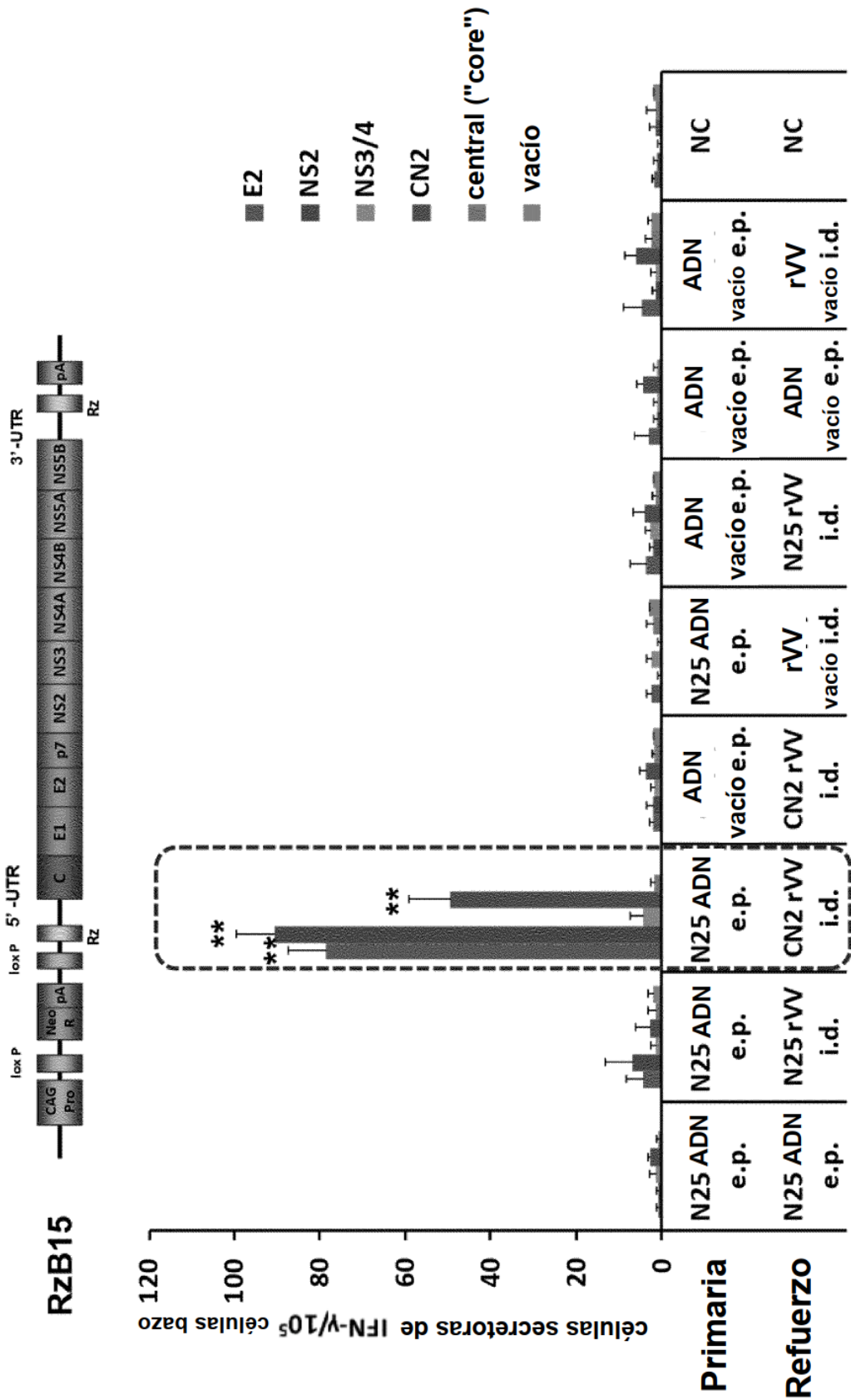


Fig.10

