



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 361 598**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08844624 .0**

96 Fecha de presentación : **31.10.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2215272**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.08.2010**

54

Título: **Análisis del Genoma Casi Completo de la Resistencia a Fármacos del HCV.**

30

Prioridad: **31.10.2007 PCT/IB2007/003304**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.06.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.06.2011

73

Titular/es: **DEBIOPHARM S.A.**
Forum "Aprés-Demain", Ch. Messidor 5-7
1002 Lausanne, CH
Katholieke Universiteit Leuven

72

Inventor/es: **Vuagniaux, Grégoire;**
Dumont, Jean-Maurice;
Snoeck, Joke;
Van Dooren, Sonia y
Vandamme, Anne-Mieke

74

Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 361 598 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

Análisis del Genoma Casi Completo de la Resistencia a Fármacos del HCV.

5 Antecedentes de la Invención

Campo de la Invención

10 La presente invención hace referencia a análisis que detectan y caracterizan mutaciones individuales o ligadas en un genoma de un Virus de la Hepatitis C (HCV) que están asociadas con la resistencia de un sujeto a un fármaco anti-HCV. Los análisis también se pueden utilizar para pronosticar la resistencia a un fármaco anti-HCV de un sujeto infectado con HCV antes de o al principio de la terapia antiviral o para seleccionar una terapia alternativa para un sujeto infectado por HCV que ha desarrollado resistencia a un fármaco o combinación de fármacos terapéuticos concretos. La invención también hace referencia a pares de cebadores nucleotídicos y kits para llevar a cabo estos análisis.

Descripción de la Técnica Relacionada

20 El HCV fue clonado y caracterizado hace aproximadamente 15 años por Choo y colaboradores. Choo et al. (1989) Science 244, 359-362. El HCV pertenece a la familia Flaviviridae y comprende una nucleocápside con envoltura y un genoma con ARN de hebra sencilla de polaridad positiva. (Bartenschlager et al. (2003) Antiviral Res 60, 91 - 102). El genoma del HCV consiste en regiones 5' y 3' no codificantes (UTR o NCR) que flanquean un único marco de lectura abierto (ORF) largo. Este ORF codifica tres proteínas estructurales en el extremo amino terminal y seis proteínas no estructurales (NS) en el extremo carboxi terminal. Las proteínas estructurales son la proteína núcleo de la nucleocápside (C) y las dos glicoproteínas de la envoltura 1 (E1) y la envoltura 2 (E2). Las proteínas no estructurales se denominan NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a, NS5b. La NCR 5' es la región más altamente conservada del genoma del HCV, mientras las secuencias de las dos proteínas de la envoltura (E1 y E2) son muy variables entre los diferentes productos aislados del HCV. El grado de variación más elevado se ha observado en una región dentro de E2, conocida ahora comúnmente como región hipervariable 1.

30 Desde la identificación inicial del HCV, se han identificado al menos 7 tipos virales principales diferentes y se han denominado genotipos 1 a 7. En estos genotipos existen numerosos subtipos (p. ej. HCV1a, 1b, 1c). El genotipo y el subtipo de un virus con el cual se infecta un sujeto puede afectar a la prognosis clínica así como a la sensibilidad a diferentes tratamientos con fármacos. (Simmonds et al. (1995) Hepatology 21, 570-582; Bukh et al. (1995) Semin Liver Dis 15, 41-63; Chevaliez y Pawlotsky (2007) World J Gastroenterol 13, 2461-2466).

40 La infección por HCV sigue siendo hasta la fecha un grave problema médico. En la actualidad existen aproximadamente 170 millones de personas infectadas por el HCV. El HCV es transmitido principalmente a través de la sangre y los productos sanguíneos así como por la transmisión vertical durante el embarazo. El transcurso inicial de la infección es típicamente suave. No obstante, el sistema inmunitario es a menudo incapaz de aclarar el virus, y los sujetos con una infección persistente se encuentran en un riesgo elevado de cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular. (Poynard et al. (1997) Lancet 349, 825-832).

45 El tratamiento convencional actual para la infección crónica por HCV se basa en una combinación de interferón alfa pegilado y ribavirina. Esta terapia produce una respuesta anti-viral sostenida en el 85-90% de los sujetos infectados con los genotipos 2 y 3, pero, desafortunadamente, solamente en aproximadamente el 45% de los sujetos infectados con el genotipo 1 prevalente. (Stribling et al. (2006) Gastroenterol Clin North Am vol, 463-486.) Se requieren terapias adicionales que utilicen otros fármacos y combinaciones de fármacos que estén dotadas de una actividad antiviral más elevada y de perfiles de seguridad superiores, en particular para la prevención de la recurrencia del HCV.

50 La introducción de ensayos de diagnóstico para escrutar productos sanguíneos ha reducido de manera significativa la tasa de nuevas infecciones. La disponibilidad de modelos in vitro, esto es, modelos de replicones subgenómicos de HCV y de un modelo de cultivo de células infecciosas, y las mejoras en las técnicas de investigación molecular tales como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) han facilitado el desarrollo de inhibidores potentes adicionales de la replicación del HCV que se dirigen directamente a una proteína viral o que actúan indirectamente a través de las proteínas del anfitrión implicadas en la infección viral. (Bartenschlager (2002) Nat Rev Drug Discov 1, 911- 916; Wakita et al. (2005) Nat Med 11, 791-796.) Varios de estos nuevos compuestos se han presentado a pruebas clínicas o ya están en el mercado (http://www.hcvadvocate.org/hepatitis/hepC/HCVDrugs_2007.pdf).

60 Se han desarrollado análisis que tienen como objetivo proporcionar información pronóstica sobre la posibilidad de sensibilización a una terapia anti-HCV. (Gretch et al. (1997) Hepatology 26, 43s-47s; Podzorski (2002) Arch Pathol Lab Med 126, 285-290). Estos análisis incluyen ensayos serológicos y ensayos moleculares cualitativos o cuantitativos. Los ejemplos de los análisis basados en la PCR de la carga viral de HCV son Cobas Amplicor® (Roche) y m2000 Real-Time PCR Diagnostics System® (Abott). Otros análisis basados en la PCR que incluyen, p.

ej., Versant® HCV Genotyping Assay (Bayer Diagnostics), INNO-LiPA HCV II® (Innogenetics), kit de DEIA GEN-ETI-K (Sorin, Saluggia, Italia) y kit de genotipaje TRUGENE HCV 5'NC (Visible Genetics Europe, Evry, Francia) identifican el genotipo y el subtipo del HCV. Un método adicional por medio del cual se detectan mutaciones es el de Yagi et al., Journal of Medical Virology 77, páginas 399 – 413 de 2005, que detalla los genomas de HCV tomados de biopsias de hígado, que son clonados con posterioridad mediante transcripción inversa de larga distancia RT-PCR, seguido de 3 reacciones de PCR en las cuales en una PCR de larga distancia primaria se amplifica el genoma completo, después de lo cual tiene lugar una PCR secundaria anidada, y una terciaria; se analiza la secuencia del ADNc amplificado y se determinan las mutaciones, véase la Fig. 1A. Recientemente se ha recomendado la evaluación sistemática del genotipo y el subtipo de HCV antes de la terapia debido a que el genotipo de HCV determinará la elección y el régimen de dosificación del fármaco anti-HCV más eficaz, p. ej. ribavirina o interferón, así como la duración del tratamiento. La identificación actual del genotipo depende principalmente de la secuenciación de una pequeña subregión de un genoma del HCV, p. ej., la UTR 5', pero no del genoma completo o casi completo del HCV.

15 **Compendio de la Invención**

En su realización más general, la presente invención hace referencia a un análisis para identificar una mutación en el genoma del HCV presente en una muestra. El análisis comprende las siguientes etapas que se llevan a cabo de manera sucesiva:

- 20 a) extracción del ARN viral de la muestra que contiene el HCV;
- b) determinación del genotipo y subtipo del HCV;
- 25 c) síntesis de los ADNc parciales del genoma del HCV en tres reacciones de transcripción inversa separadas, la primera reacción de transcripción inversa se inicia a partir de un primer cebador antisentido externo seleccionado para que hibride específicamente con una secuencia en la UTR 3' de un genoma de HCV prototipo del mismo genotipo y subtipo, la segunda reacción de transcripción inversa se inicia a partir de un segundo cebador antisentido externo seleccionado para que hibride específicamente con una secuencia de la región NS4B-NS5A del genoma del HCV prototipo y la tercera reacción de transcripción inversa se inicia a partir de un tercer cebador antisentido externo seleccionado para que hibride específicamente con una secuencia de la región NS2 del genoma del HCV prototipo;
- 30 d) síntesis de la segunda hebra y amplificación de los ADNc parciales de la etapa c) en tres reacciones de PCR separadas, comprendiendo la primera reacción de PCR una alícuota de la primera reacción de transcripción inversa, el primer cebador antisentido externo y un primer cebador efector externo seleccionado para que hibride específicamente con una secuencia complementaria de la región NS4B-NS5A del genoma del HCV prototipo, comprendiendo la segunda reacción de PCR una alícuota de la segunda reacción de transcripción inversa, el segundo cebador antisentido externo y un segundo cebador efector externo seleccionado para que hibride específicamente con una secuencia complementaria de la región NS2 del genoma del HCV prototipo, y comprendiendo la tercera reacción de PCR una alícuota de la tercera reacción de transcripción inversa, el tercer cebador antisentido externo y un tercer cebador efector externo seleccionado para que hibride específicamente con una secuencia complementaria de la región UTR 5' del genoma del HCV prototipo, donde el segundo cebador antisentido externo hibrida con una secuencia de la región NS4B-NS5A del genoma del HCV prototipo que está localizada 3' con respecto a la región que es complementaria al primer cebador efector externo y donde el tercer cebador antisentido externo hibrida con una secuencia de la región NS2 del genoma del HCV prototipo que está localizada 3' con respecto a la región que es complementaria al segundo cebador efector externo;
- 35 e) amplificación adicional de los ADNc parciales de la etapa d) en tres reacciones de PCR anidadas separadas, comprendiendo la primera reacción de PCR anidada una alícuota de la primera reacción de PCR y los primeros cebadores antisentido y efector internos, comprendiendo la segunda reacción de PCR anidada una alícuota de la segunda reacción de PCR y los segundos cebadores antisentido y efector internos, y comprendiendo la tercera reacción de PCR anidada una alícuota de la tercera reacción de PCR y los terceros cebadores antisentido y efector internos, donde los cebadores internos no se solapan con los cebadores externos, el segundo cebador antisentido interno hibrida con una secuencia de la región NS4B-NS5A del genoma del HCV prototipo que está localizada 3' con respecto a la región que es complementaria al primer cebador efector interno y el tercer cebador antisentido interno hibrida con una secuencia de la región NS2 del genoma del HCV prototipo que está localizada 3' con respecto a la región que es complementaria al segundo cebador efector interno;
- 40 f) análisis de la secuencia de los ADNc amplificados adicionalmente de la etapa e); y
- 45 g) comparación de las secuencias obtenidas a partir de la etapa f) con la del HCV prototipo.
- 50
- 55
- 60

En otra realización, se utiliza un análisis de la invención para identificar y caracterizar mutaciones individuales y ligasas asociadas con la resistencia de un sujeto infectado por HCV a fármacos o combinaciones de fármacos anti-

HCV concretos y para generar o ampliar un banco de datos de mutaciones de HCV asociadas con la resistencia a fármacos anti-HCV. El análisis conlleva las siguientes etapas que se llevan a cabo de manera sucesiva:

- 5 a) extracción de ARN viral procedente de una muestra tomada de un sujeto que porta HCV que es resistente a un fármaco o combinación de fármacos anti-HCV con los cuales ha sido tratado el sujeto como indica el fracaso del tratamiento;
- b) determinación del genotipo y subtipo del HCV;
- 10 c) síntesis de los ADNc parciales del genoma del HCV en tres reacciones de transcripción inversa separadas, la primera reacción de transcripción inversa se inicia a partir de un primer cebador antisentido externo seleccionado para que hibride específicamente con una secuencia en la UTR 3' de un genoma de HCV prototipo del mismo genotipo y subtipo, la segunda reacción de transcripción inversa se inicia a partir de un segundo cebador antisentido externo seleccionado para que hibride específicamente con una secuencia de la región NS4B-NS5A del genoma del HCV prototipo y la tercera reacción de transcripción inversa se inicia a partir de un tercer cebador antisentido externo seleccionado para que hibride específicamente con una secuencia de la región NS2 del genoma del HCV prototipo;
- 15
- d) síntesis de la segunda hebra y amplificación de los ADNc parciales de la etapa c) en tres reacciones de PCR separadas, comprendiendo la primera reacción de PCR una alícuota de la primera reacción de transcripción inversa, el primer cebador antisentido externo y un primer cebador efector externo seleccionado para que hibride específicamente con una secuencia complementaria de la región NS4B-NS5A del genoma del HCV prototipo, comprendiendo la segunda reacción de PCR una alícuota de la segunda reacción de transcripción inversa, el segundo cebador antisentido externo y un segundo cebador efector externo seleccionado para que hibride específicamente con una secuencia complementaria de la región NS2 del genoma del HCV prototipo, y
- 20
- 25 comprendiendo la tercera reacción de PCR una alícuota de la tercera reacción de transcripción inversa, el tercer cebador antisentido externo y un tercer cebador efector externo seleccionado para que hibride específicamente con una secuencia complementaria de la región UTR 5' del genoma del HCV prototipo, donde el segundo cebador antisentido externo hibrida con una secuencia de la región NS4B-NS5A del genoma del HCV prototipo que está localizada 3' con respecto a la región que es complementaria al primer cebador efector externo y donde el tercer cebador antisentido externo hibrida con una secuencia de la región NS2 del genoma del HCV prototipo que está localizada 3' con respecto a la región que es complementaria al segundo cebador efector externo;
- 30
- e) amplificación adicional de los ADNc parciales de la etapa d) en tres reacciones de PCR anidadas separadas, comprendiendo la primera reacción de PCR anidada una alícuota de la primera reacción de PCR y los primeros cebadores antisentido y efector internos, comprendiendo la segunda reacción de PCR anidada una alícuota de la segunda reacción de PCR y los segundos cebadores antisentido y efector internos, y comprendiendo la tercera reacción de PCR anidada una alícuota de la tercera reacción de PCR y los terceros cebadores antisentido y efector internos, donde los cebadores internos no se solapan con los cebadores externos, el segundo cebador antisentido interno hibrida con una secuencia de la región NS4B-NS5A del genoma del HCV prototipo que está localizada 3' con respecto a la región que es complementaria al primer cebador efector interno y el tercer cebador antisentido interno hibrida con una secuencia de la región NS2 del genoma del HCV prototipo que está localizada 3' con respecto a la región que es complementaria al segundo cebador efector interno;
- 35
- 40
- f) análisis de la secuencia de los ADNc amplificados adicionalmente de la etapa e);
- 45
- g) comparación de las secuencias obtenidas a partir de la etapa f) con la del HCV prototipo e identificación de las mutaciones; y
- 50 h) introducción de las mutaciones identificadas en un banco de datos de mutaciones de HCV asociadas con la resistencia a fármacos anti-HCV.

55 En una realización relacionada, se emplea un análisis de la invención para identificar y caracterizar mutaciones individuales y ligadas asociadas con la resistencia de un sujeto infectado por HCV al tratamiento administrado y, haciendo uso de un banco de datos de mutaciones de HCV asociadas con la resistencia a fármacos anti-HCV, para seleccionar un fármaco o combinación de fármacos anti-HCV alternativos a los cuales no se espera que la variante de virus del sujeto sea resistente para una terapia adicional del sujeto. El análisis comprende las mismas etapas que la realización anterior, excepto que la etapa h) es remplazada por una etapa que conlleva una búsqueda en un banco de datos de mutaciones de HCV asociadas con la resistencia a fármacos anti-HCV para las mutaciones identificadas y selección para el tratamiento subsiguiente del sujeto, de un fármaco o combinación de fármacos anti-HCV a los cuales no se espera que el HCV sea resistente.

60

En otra realización, se emplea el análisis de la realización precedente para analizar una muestra tomadas de un sujeto infectado con HCV antes del comienzo de cualquier terapia farmacológica del sujeto. La información obtenida a partir de este análisis permitirá al médico a cargo seleccionar un fármaco o combinación de fármacos anti-HCV

para el tratamiento del sujeto, a cuyo fármaco o a cuya combinación de fármacos anti-HCV no se espera que sean resistentes la variante o variantes de HCV presentes en el sujeto.

5 Una realización más específica de la invención hace referencia a un análisis para identificar una mutación en el genoma de un HCV 1b presente en una muestra. El análisis comprende las siguientes etapas que se llevan a cabo de manera sucesiva:

a) extracción del ARN viral procedente de la muestra que contiene el HCV;

10 b) determinación del genotipo y subtipo del HCV;

c) siempre que la etapa b) indique que el HCV es de tipo 1b, síntesis de los ADNc parciales del genoma del HCV en tres reacciones separadas de transcripción inversa, la primera reacción de transcripción inversa se inicia a partir del cebador poli-A, la segunda reacción de transcripción inversa se inicia a partir del cebador HCV1bOR6312 y la
15 tercera reacción de transcripción inversa se inicia a partir del cebador HCV1bOR3306;

d) síntesis de la segunda hebra y amplificación de los ADNc parciales de la etapa c) en tres reacciones de PCR separadas, comprendiendo la primera reacción de PCR una alícuota de la primera reacción de transcripción inversa y el par de cebadores poli A/HCV1bOF6074, comprendiendo la segunda reacción de PCR una alícuota de la
20 segunda reacción de transcripción inversa y el par de cebadores HCV1bOR6312/HCV1bOF1977 y comprendiendo la tercera reacción de PCR una alícuota de la tercera reacción de transcripción inversa y el par de cebadores HCV1bOR3306/HCV1bOF129;

e) amplificación adicional de los ADNc parciales de la etapa d) en tres reacciones de PCR anidadas separadas, comprendiendo la primera reacción de PCR anidada una alícuota de la primera reacción de PCR y el par de
25 cebadores HCV1bIR9339/HCV1bIF6126, comprendiendo la segunda reacción de PCR anidada una alícuota de la segunda reacción de PCR y el par de cebadores HCV1bIR6282/HCV1bIF2523, y comprendiendo la tercera reacción de PCR anidada una alícuota de la tercera reacción de PCR y el par de cebadores HCV1bIR2770/HCV1bIF278;

30 f) análisis de la secuencia de los ADNc amplificados adicionalmente de la etapa e); y

g) comparación de las secuencias obtenidas a partir de la etapa f) con la de un HCV1b prototipo.

35 En otra realización, se utiliza un análisis de la invención para identificar y caracterizar mutaciones individuales y ligadas asociadas con la resistencia de un sujeto infectado con un HCV1b a un fármaco o combinación de fármacos anti-HCV concretos y para generar o ampliar un banco de datos de mutaciones de HCV asociadas con la resistencia a fármacos anti-HCV. El análisis conlleva las siguientes etapas que se llevan a cabo de manera sucesiva:

40 a) extracción de ARN viral procedente de una muestra tomada de un sujeto que alberga un HCV que es resistente a un fármaco o combinación de fármacos anti-HCV con los cuales ha sido tratado el sujeto;

b) determinación del genotipo y subtipo del HCV;

c) siempre que la etapa b) indique que el HCV es de tipo 1b, síntesis de los ADNc parciales del genoma del HCV en tres reacciones separadas de transcripción inversa, la primera reacción de transcripción inversa se inicia a partir del
45 cebador poli-A, la segunda reacción de transcripción inversa se inicia a partir del cebador HCV1bOR6312 y la tercera reacción de transcripción inversa se inicia a partir del cebador HCV1bOR3306;

d) síntesis de la segunda hebra y amplificación de los ADNc parciales de la etapa c) en tres reacciones de PCR separadas, comprendiendo la primera reacción de PCR una alícuota de la primera reacción de transcripción inversa y el par de cebadores poli-A/HCV1bOF6074, comprendiendo la segunda reacción de PCR una alícuota de la
50 segunda reacción de transcripción inversa y el par de cebadores HCV1bOR6312/HCV1bOF1977 y comprendiendo la tercera reacción de PCR una alícuota de la tercera reacción de transcripción inversa y el par de cebadores HCV1bOR3306/HCV1bOF129;

e) amplificación adicional de los ADNc parciales de la etapa d) en tres reacciones de PCR anidadas separadas, comprendiendo la primera reacción de PCR anidada una alícuota de la primera reacción de PCR y el par de
55 cebadores HCV1bIR9339/HCV1bIF6126, comprendiendo la segunda reacción de PCR anidada una alícuota de la segunda reacción de PCR y el par de cebadores HCV1bIR6282/HCV1bIF2523, y comprendiendo la tercera reacción de PCR anidada una alícuota de la tercera reacción de PCR y el par de cebadores HCV1bIR2770/HCV1bIF278;

60 f) análisis de la secuencia de los ADNc amplificados adicionalmente de la etapa e);

g) comparación de las secuencias obtenidas a partir de la etapa f) con la de un HCV1b prototipo e identificación de las mutaciones; y

5 h) introducción de las mutaciones identificadas en un banco de datos de mutaciones de HCV asociadas con la resistencia a fármacos anti-HCV.

10 Una vez que se ha recopilado un banco de datos útiles, se puede utilizar un análisis similar para analizar muestras procedentes de sujetos infectados con HCV1b no sometidos a tratamiento previo o procedentes de sujetos infectados con HCV1b que han sido tratados y han desarrollado resistencia al régimen de tratamiento para seleccionar un fármaco o combinación de fármacos anti-HCV apropiados para el tratamiento o el tratamiento adicional, respectivamente. En tales realizaciones, la etapa h) del análisis descrito inmediatamente antes es reemplazada por una etapa que conlleva una búsqueda en un banco de datos de mutaciones de HCV asociadas con la resistencia a fármacos anti-HCV para determinar las mutaciones identificadas y una selección del tratamiento subsiguiente del sujeto con un fármaco o combinación de fármacos anti-HCV a los cuales no se espera que sea resistente el HCV.

15 La invención también hace referencia a los pares de cebadores que consisten en poli-A y HCV1bOF6074, HCV1bOR6312 y HCV1bOF1977, HCV1bOR3306 y HCV1bOF129, HCV1bIR9339 y HCV1bIF6126, HCV1bIR6282 y HCV1bIF2523, y HCV1bIR2770 y HCV1bIF278. Los kits para la detección de mutaciones en un genoma de HCV también son un objeto de la invención. Estos kits comprenden al menos uno o todos los pares de cebadores anteriormente mencionados y pueden incluir reactivos adicionales tales como p. ej., polimerasas, tampones, y nucleósidos trifosfato.

25 **Breve descripción de los dibujos**

La FIG. 1 representa esquemáticamente la síntesis de ADNc parcial y las etapas de amplificación de los análisis de la invención en el ejemplo de un HCV de tipo 1b. La FIG. 2 compara la sensibilidad del método de amplificación de ADNc parcial de la invención con la de la amplificación de genomas virales completos.

30 Las FIGS. 3a y b comparan secuencias de aminoácidos de HCV traducidas procedentes de dos sujetos infectados obtenidos por medio de un análisis de la invención con la secuencia de un genoma de HCV prototipo.

Descripción detallada de la invención

35 Para ayudar a comprender la invención, se definen más abajo varios términos.

40 Los términos "ácido nucleico" y "oligonucleótido" hacen referencia a cebadores y fragmentos oligoméricos que van a ser amplificados o detectados, y deben ser genéricos para los polidesoxirribonucleótidos (que contienen 2-desoxi-D-ribosa), también denominados ADN, para los polirribonucleótidos (que contienen D-ribosa), también denominados ARN, y para cualquier otro tipo de polinucleótido que sea un N-glicósido de una base de purina o pirimidina, o una base de purina o pirimidina modificada. No se pretende hacer distinción de longitud entre los términos "ácido nucleico" y "oligonucleótido", y estos términos se utilizarán indistintamente. Estos términos hacen referencia solamente a la estructura primaria de la molécula. De este modo, estos términos incluyen ADN de hebra doble y sencilla, así como ARN de hebra doble y sencilla.

45 El término "ADNc" hace referencia a ADN complementario que es un ADN sintetizado a partir de un molde de ARN por medio de la acción de la ADN polimerasa dependiente de ARN o transcriptasa inversa o ADN polimerasa. Estos términos incluyen ADN complementario de hebra doble y sencilla.

50 Los oligonucleótidos se pueden preparar mediante cualquier método adecuado, incluyendo, por ejemplo, la clonación y restricción de secuencias apropiadas y la síntesis química directa mediante un método tal como el método del fosfotriéster de Narang et al. (1979) Meth Enzymol 68, 90-99; el método del fosfodiéster de Brown et al. (1979) Meth Enzymol 68, 109-151; el método de la dietilfosforamidita de Beaucage et al. (1981) Tetrahedron Lett 22, 1859-1862; y el método del soporte sólido de la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.458.066.

55 Los términos "hibridación" e "hibridan" hacen referencia a la formación de una estructura dúplex por dos ácidos nucleicos de hebra sencilla debido al emparejamiento de bases complementarias. La hibridación se puede producir entre hebras de ácido nucleico totalmente (exactamente) complementarias o entre hebras de ácido nucleico "esencialmente complementarias" que contienen regiones minoritarias de emparejamientos erróneos. Las condiciones en las cuales hibridarán solamente hebras de ácido nucleico totalmente complementarias son referidas como "condiciones de hibridación restrictivas". Se pueden obtener dúplex estables de secuencias esencialmente complementarias en condiciones de hibridación menos restrictivas. Los expertos en la técnica de la tecnología de ácidos nucleicos pueden determinar empíricamente la estabilidad del dúplex siguiendo las pautas proporcionadas por la técnica (véase, p. ej., Sambrook et al. (1985) Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor

- Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.). Generalmente, las condiciones de restricción se seleccionan para que sean aproximadamente 5°C más bajas que el punto de fusión térmico (T_m) para la secuencia específica a una fuerza iónica y un pH definidos. La T_m es la temperatura (a una fuerza iónica y un pH definidos) a la cual el 50% de los pares de bases se han disociado. La relajación de la restricción de las condiciones de hibridación permitirá que sean tolerados emparejamientos erróneos de secuencia; el grado de emparejamientos erróneos tolerados se puede controlar mediante un ajuste adecuado de las condiciones de hibridación. La hibridación de ambas hebras de ácido nucleico exactamente complementarias y esencialmente complementarias es referida en la presente memoria como "específica".
- El término "cebador" hace referencia a un oligonucleótido capaz de actuar como punto de inicio de la síntesis de ADN en condiciones en las que se induce la síntesis de un producto de extensión del cebador complementario a una hebra de ácido nucleico, esto es, en presencia de cuatro nucleósidos trifosfato diferentes y un agente para la polimerización (esto es, ADN polimerasa o transcriptasa inversa) en un tampón apropiado y a una temperatura adecuada. Un cebador es preferiblemente un oligodesoxiribonucleótido de hebra sencilla. La longitud apropiada de un cebador depende del uso pretendido del cebador pero típicamente oscila entre aproximadamente 15 y aproximadamente 35 nucleótidos. Las moléculas cebadoras cortas generalmente requieren temperaturas más frías para formar complejos híbridos suficientemente estables con el molde. Un cebador no necesita reflejar la secuencia exacta del ácido nucleico molde, sino que debe ser suficientemente complementario como para hibridar con el molde. Los cebadores pueden incorporar rasgos adicionales que permiten la detección o inmovilización del cebador pero no alteran la propiedad básica del cebador, la de actuar como punto de inicio de la síntesis de ADN. La región del cebador que es suficientemente complementaria al molde como para hibridar es referida en la presente memoria como región hibridante.
- Según se utiliza en la presente memoria, un cebador "efector" o "aguas arriba" hace referencia a un cebador cuyo producto de extensión es una subsecuencia de la hebra codificante; un cebador "antisentido" o "aguas abajo" hace referencia a un cebador cuyo producto de extensión es una subsecuencia de la hebra no codificante complementaria.
- Los términos "cebador externo" o "cebadores externos" hacen referencia al primer cebador o par de cebadores que se utilizan para la transcripción inversa o la amplificación inicial de un tramo de un ácido nucleico. Los términos "cebador interno" o "cebadores internos" hacen referencia a un cebador o a un par de cebadores que se utilizan para amplificar adicionalmente el producto de amplificación inicial. Los cebadores internos no comparten una homología de secuencia significativa con los correspondientes cebadores externos, y la amplificación por medio de cebadores internos produce típicamente un producto de amplificación secundario que es ligeramente más corto que el producto de amplificación inicial.
- Según se utiliza en la presente memoria, un cebador oligonucleotídico es "específico" para una secuencia diana si el número de emparejamientos erróneos presentes entre el oligonucleótido y la secuencia diana es menor que el número de emparejamientos erróneos presentes entre el oligonucleótido y las secuencias no diana. Se pueden seleccionar condiciones de hibridación en las cuales se forman dúplex estables solamente si el número de emparejamientos erróneos presentes no es mayor que el número de emparejamientos erróneos presentes entre el oligonucleótido y la secuencia diana. En dichas condiciones, el oligonucleótido específico de la diana puede formar un dúplex estable solamente con una secuencia diana. El uso de cebadores específicos de la diana en condiciones de amplificación adecuadamente restrictivas permite la amplificación específica de aquellas secuencias diana que contienen los sitios de unión del cebador a la diana.
- Los términos "región diana" y "ácido nucleico diana" hacen referencia a una región de un ácido nucleico que se va a amplificar o analizar de otro modo. La secuencia con la cual hibrida el cebador puede ser referida como "diana".
- Los términos "variante" o "variante de HCV" hacen referencia a un HCV que tiene un genoma que difiere del del virus prototipo correspondiente por la presencia de al menos una mutación que ocasiona al menos el cambio de un aminoácido en una proteína viral producto. Por consiguiente, el término "mutación" hace referencia a tales cambios en el genoma de una variante que da como resultado una proteína viral producto que difiere de la del virus prototipo en al menos un aminoácido.
- El término "virus prototipo" o "HCV prototipo" representa un virus HCV de referencia que proporciona un genoma de referencia con el cual se comparan las secuencias virales producidas en los análisis de la invención y que sirve como base para diseñar la síntesis de ADNc, la amplificación y los cebadores de secuenciación utilizados en los análisis. El virus prototipo puede hacer referencia a un producto aislado del virus específico. Alternativamente, puede hacer referencia a un virus HCV hipotético que contiene un genoma consenso derivado de la comparación de secuencias genómicas de múltiples productos aislados de virus. Uno de tales virus prototipo, la cepa H77 de HCV (Número de Acceso Genbank AF011751), se utilizó en el ejemplo 1 para diseñar cebadores de HCV 1b. Se utilizó HCV con1 (Número de Acceso Genbank AJ238799) como secuencia genómica de HCV 1b prototipo en los análisis del ejemplo 3. Un experto en la técnica sabrá cómo seleccionar las secuencias de HCV prototipo para otros

genotipos y subtipos. Por ejemplo, las cepas de HCV HC-J6 (Número de Acceso Genebank D00944) o JFH1 (Número de Acceso Genebank AB047639) se pueden considerar prototipo de HCV 2a.

5 El término "cuasiespecie" hace referencia a un grupo de HCV muy relacionado con HCV de idéntico genotipo y subtipo frecuentemente presentes en un sujeto infectado.

10 Los términos "fármaco o combinación de fármacos anti-HCV" hacen referencia a cualquier fármaco o combinación de fármacos, respectivamente, que sean capaces de disminuir la carga viral o el título viral de HCV en al menos un subgrupo de sujetos infectados por HCV. En particular, estos términos también hacen referencia a cualquier fármaco o combinación de fármacos, respectivamente, que sean capaces de disminuir esencialmente o significativamente la carga viral o título viral de HCV en al menos un subgrupo de sujetos infectados por HCV. Los fármacos anti-HCV incluyen, pero no están limitados a, inhibidores de la replicación de HCV tales como los inhibidores de polimerasa, los inhibidores de proteasa y los inhibidores de ciclofilina, los moduladores de la respuesta inmunitaria del anfitrión, los inhibidores de la entrada de virus y los inhibidores de factores del anfitrión.

15 El término "banco de datos de mutaciones de HCV asociadas con la resistencia a fármacos anti-HCV" hace referencia a una recopilación, en cualquier forma, de mutaciones que están asociadas con la resistencia a cualquier fármaco o combinación de fármacos anti-HCV, estando indicada la resistencia por un fracaso en el curso del tratamiento con el fármaco o combinación de fármacos anti-HCV para reducir esencialmente la carga viral (también referido como fracaso del tratamiento). Dicho banco de datos se puede reunir utilizando la información disponible en la técnica o haciéndola asequible en la técnica así como la información obtenida a partir de los análisis de las muestras procedentes de sujetos infectados, resistentes a fármacos llevados a cabo empleando los análisis de la presente invención.

20 Los análisis disponibles en la actualidad no indican si un miembro de una población de variantes de HCV presentes en un sujeto (cuasiespecie) o incluso si una variante predominante será resistente a un tratamiento con un fármaco o combinación de fármacos anti-HCV concretos. Por otra parte, estos ensayos no determinan qué mutaciones individuales, mutaciones ligadas o huellas de un genoma viral están asociadas con la resistencia viral a una terapia anti-HCV concreta. La mayoría de las terapias contra HCV son muy costosas y prolongadas. El tratamiento de un sujeto infectado con HCV sin saber si es un resistente a priori al fármaco o combinación de fármacos anti-HCV concretos utilizados puede dar como resultado efectos adversos en el sujeto debido a las consecuencias de la presencia continuada de virus a elevados niveles así como a efectos secundarios (toxicidad) del tratamiento anti-HCV.

25 Un análisis diagnóstico para caracterizar mutaciones en un genoma de HCV completo o casi completo de un genotipo y/o subtipo concreto que están asociadas con una resistencia a un fármaco o combinación de fármacos anti-HCV concretos es una necesidad percibida hace mucho tiempo por los expertos en la técnica, es decir, un médico, un médico clínico o una enfermera en un hospital o en instalaciones para el cuidado médico. La presente invención proporciona éste análisis. El análisis se basa en la amplificación por medio de una transcripción inversa – reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) de un genoma de HCV en forma de tres fragmentos de ADN solapantes de longitudes similares. Los autores de la invención encontraron que la amplificación del genoma en forma de tres fragmentos representa el mejor compromiso entre la necesidad de sensibilidad para el análisis y la evitación de la selección de secuencias variantes virales. Dentro de unos límites, la sensibilidad del análisis aumentaría con el número de fragmentos discretos amplificados, mientras la minimización de la selección requeriría una disminución del número de fragmentos discretos amplificados. Los análisis de la invención son muy sensibles y, en contraste con los análisis basados en la transcripción inversa y la amplificación de genomas virales completos, permiten la detección y el análisis de los genomas de HCV procedentes de muestras tomadas de sujetos con cargas virales muy bajas.

30 Los análisis de la invención permitirán la reunión sistemática de un banco de datos de mutaciones que están asociadas con la resistencia a fármacos anti-HCV concretos y, una vez que se han reunido los datos útiles, se pueden emplear como análisis pronósticos para determinar la presencia en un sujeto infectado de una variante de HCV que es resistente al tratamiento con uno o varios fármacos anti-HCV concretos. Basándose en dicha información, será posible seleccionar un fármaco o combinación de fármacos anti-HCV apropiados para la terapia del sujeto infectado que no será obstaculizada por la resistencia a fármacos de una variante de HCV detectable ya presente en el sujeto antes de la terapia. Por otra parte, una vez que se ha seleccionado un régimen terapéutico concreto y se ha iniciado el tratamiento del sujeto, se podría introducir el virus aislado del sujeto en un modelo de cultivo de células infecciosas y permitir que experimentara unas pocas rondas de replicación bajo la presión selectiva del fármaco o la combinación de fármacos utilizados en el sujeto. Después se podría realizar un análisis de la invención sobre la población de virus seleccionada para determinar si se había producido la amplificación de una variante minoritaria resistente al fármaco que pudo no haber sido detectada antes de dicha amplificación. Los resultados obtenidos podrían ser utilizados para adaptar o cambiar rápidamente el régimen de fármaco administrado al sujeto.

- Además de las mediciones de la carga viral, se podría emplear un análisis de la invención para controlar el desarrollo de resistencia a fármacos en un sujeto tratado con un fármaco o una combinación de fármacos anti-HCV. El virus se aislaría al final del transcurso de la terapia o en diferentes momentos durante el tratamiento y se analizaría utilizando un análisis de la invención. La detección de una variante principal que contuviera una mutación o un grupo de mutaciones ligadas de resistencia conocidas proporcionaría una indicación, que sería independiente de las determinaciones de la carga viral, de que el régimen terapéutico necesita ser adaptado o sustituido por otro régimen. El banco de datos de mutaciones mencionado antes ayudaría al médico a la elección de un régimen adaptado o alternativo.
- Los análisis de la presente invención son muy sensibles y permiten la detección, por medio de un único procedimiento, de mutaciones individuales o mutaciones ligadas que se producen esencialmente en cualquier parte del genoma de HCV que están asociadas con la resistencia a un tratamiento con cualquier combinación de uno o más fármacos anti-HCV.
- La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique de otro modo, mecanismos convencionales de la biología molecular, la microbiología, el ADN recombinante, la síntesis de polipéptidos y ácidos nucleicos, y la inmunología, que están dentro del conocimiento práctico de la técnica. Estos mecanismos se explican en detalle en las publicaciones. Véase p. ej., Sambrook et al., (1989) *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.; *DNA Cloning - a Practical Approach*, volúmenes 1 y 2 (D. M. Glover, ed., 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait, ed., 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (B. D. Hames & S.J. Higgins, eds., 1984); *Transcription y Translation* (B. D. Hames & S.J. Higgins, eds., 1984); *Animal Cell Culture - a Practical Approach* (R.I. Freshney, ed., 1986); *Immobilized Cells y Enzymes - A Practical Approach* (J. Woodward, ed., 1985); B. Perbal (1984) *A Practical Guide to Molecular Cloning*, John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y.; la serie *Methods in Enzymology*, Academic Press, Inc., incluyendo el volumen 154 (R. Wu & L. Grossman, eds., 1987) y el volumen 155 (R. Wu, ed., 1987); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J. H. Miller & M. P. Calos, eds., 1987); *Immunochemical Methods in Cell y Molecular Biology* (R.J. Mayer & J. H. Walker, eds., 1987), *Protein Purification - Principles y Practice* (R.K. Scopes, 1987); y *Handbook of Experimental immunology*, volúmenes 1-4 (D. M. Weir & C.C. Blackwell, eds., 1986).
- En la realización más general, la presente invención se refiere a un análisis que es capaz de identificar y caracterizar mutaciones individuales y ligadas en un genoma de una variante de HCV presente en una muestra, comprendiendo el análisis las siguientes etapas que se llevan a cabo de manera sucesiva:
- Etapas:
- Etapa 1: extracción del ARN viral procedente de una muestra que contiene un HCV;
- Etapa 2: determinación del genotipo y subtipo del HCV;
- Etapa 3: síntesis de los ADNc parciales del genoma del HCV en tres reacciones separadas de transcripción inversa, la primera reacción de transcripción inversa se inicia a partir de un primer cebador antisentido externo seleccionado para que hibride específicamente con una secuencia de la UTR 3' de un HCV prototipo del mismo genotipo y subtipo, la segunda reacción de transcripción inversa se inicia a partir de un segundo cebador antisentido externo seleccionado para que hibride específicamente con una secuencia de la región NS4B-NS5A del genoma del HCV prototipo y la tercera reacción de transcripción inversa se inicia a partir de un tercer cebador antisentido externo seleccionado para que hibride específicamente con una secuencia de la región NS2 del genoma del HCV prototipo;
- Etapa 4: síntesis de la segunda hebra y amplificación de los ADNc parciales del genoma del HCV en tres reacciones de PCR separadas, comprendiendo la primera reacción de PCR una alícuota de la primera reacción de transcripción inversa, el primer cebador antisentido externo y un primer cebador efector externo seleccionado para que hibride específicamente con un complemento de una secuencia de la región NS4B-NS5A del genoma del HCV prototipo, comprendiendo la segunda reacción de PCR una alícuota de la segunda reacción de transcripción inversa, el segundo cebador antisentido externo y un segundo cebador efector externo seleccionado para que hibride específicamente con un complemento de una secuencia de la región NS2 del genoma del HCV prototipo, y comprendiendo la tercera reacción de PCR una alícuota de la tercera reacción de transcripción inversa, el tercer cebador antisentido externo y un tercer cebador efector externo seleccionado para que hibride específicamente con un complemento de una secuencia de la región UTR 5' del genoma del HCV prototipo, donde el segundo cebador antisentido externo hibrida con una secuencia de la región NS4B-NS5A del genoma del HCV prototipo que está localizada 3' con respecto a la región que es complementaria al primer cebador efector externo y donde el tercer cebador antisentido externo hibrida con una secuencia de la región NS2 del genoma del HCV prototipo que está localizada 3' con respecto a la región que es complementaria al segundo cebador efector externo;
- Etapa 5: amplificación parcial de los ADNc parciales de la etapa 4 en tres reacciones de PCR anidadas separadas, comprendiendo la primera reacción de PCR anidada una alícuota de la primera reacción de PCR y los primeros cebadores antisentido y efector internos, comprendiendo la segunda reacción de PCR anidada una alícuota de la segunda reacción de PCR y los segundos cebadores antisentido y efector internos, y comprendiendo la tercera

- reacción de PCR anidada una alícuota de la tercera reacción de PCR y los terceros cebadores antisentido y efector internos, donde los cebadores internos no se solapan con los cebadores externos, el segundo cebador antisentido interno hibrida con una secuencia de la región NS4B-NS5A del genoma del HCV prototipo que está localizada 3' con respecto a la región que es complementaria al primer cebador efector interno y el tercer cebador antisentido interno hibrida con una secuencia de la región NS2 del genoma del HCV prototipo que está localizada 3' con respecto a la región que es complementaria al segundo cebador efector interno;
- 5
- Etapa 6: análisis de la secuencia de los ADNc amplificados adicionalmente de la etapa 5; y
- 10
- Etapa 7: comparación de las secuencias obtenidas con la del HCV prototipo.
- En una realización más específica, la presente invención hace referencia a un análisis que es capaz de identificar y caracterizar mutaciones individuales y ligadas en un genoma de una variante de HCV resistente a un fármaco o combinación de fármacos anti-HCV en una muestra tomada de un sujeto que ha experimentado tratamiento con el fármaco o combinación de fármacos anti-HCV. El análisis comprende las siguientes etapas que se llevan a cabo de manera sucesiva:
- 15
- Etapa 1: extracción de ARN viral de una muestra tomada de un sujeto que alberga un HCV que es resistente a un fármaco o combinación de fármacos anti-HCV con los cuales se ha tratado el sujeto;
- 20
- Etapas 2 - 6 como en el análisis descrito más arriba;
- Etapa 7: comparación de las secuencias obtenidas en la etapa 6 con la del genoma del HCV prototipo e identificación de mutaciones; y
- 25
- Etapa 8: introducción de las mutaciones identificadas en un banco de datos de mutaciones asociadas con la resistencia a fármacos anti-HCV.
- Una vez que se ha establecido un banco de datos útil de mutaciones asociadas con la resistencia a fármacos, la presente invención también hará referencia a un análisis que es idéntico al análisis descrito inmediatamente antes, excepto que la etapa 8 consistirá en la búsqueda del banco de datos para la mutaciones identificadas y la selección de un fármaco o combinación de fármacos anti-HCV alternativos a los cuales no se espera que el HCV sea resistente para un tratamiento posterior del sujeto.
- 30
- El último análisis de la invención también se puede llevar a cabo en una muestra tomada de un sujeto infectado con HCV antes del comienzo de cualquier terapia farmacológica del sujeto. Los resultados procedentes del análisis permitirán al médico seleccionar un fármaco o combinación de fármacos anti-HCV a los cuales el HCV con el que está infectado el sujeto no es resistente. Se ha comprendido que un sujeto frecuentemente está infectado con una cuasiespecie de HCV que comprende una variante dominante y múltiples variantes menores. El análisis descubrirá principalmente las mutaciones presentes en la variante dominante. Que las mutaciones presentes en las variantes menores también se puedan descubrir dependerá de muchos factores, en particular de la abundancia relativa de las variantes menores y de la tecnología de secuenciación empleada. Las mutaciones de una variante menor deben ser identificables mediante secuenciación capilar rutinaria, esto es, secuenciación automatizada convencional, si la abundancia relativa de la variante menor es de al menos aproximadamente 20%. Si la representación de una variante es inferior, se necesitará utilizar una metodología de secuenciación avanzada tal como la tecnología de secuenciación por síntesis de alto rendimiento para obtener información mutacional. Dichas tecnologías de secuenciación fueron desarrolladas, p. ej., por Illumina Inc., San Diego, CA, 454 Life Sciences, Branford, CT, y Applied Biosciences, Foster City, CA. Los equipos y servicios de secuenciación se encuentran disponibles en el mercado.
- 35
- 40
- 45
- 50
- Las realizaciones específicas de los análisis que se utilizan con las muestras que contienen una variante de HCV 1b se presentan más abajo y se ilustran adicionalmente en la sección de Ejemplos. Uno de dichos análisis comprende las siguientes etapas que se llevan a cabo de manera sucesiva:
- 55
- Etapa 1: extracción del ARN viral procedente de una muestra que contiene un HCV;
- Etapa 2: determinación del genotipo y subtipo del HCV;
- 60
- Etapa 3: siempre que la etapa 2 indique que el HCV es del tipo 1b, síntesis de los ADNc parciales del genoma del HCV en tres reacciones separadas de transcripción inversa, la primera reacción de transcripción inversa se inicia a partir del cebador poli-A, la segunda reacción de transcripción inversa se inicia a partir del cebador HCV1bOR6312 y la tercera reacción de transcripción inversa se inicia a partir del cebador HCV1bOR3306;

- 5 Etapa 4: síntesis de la segunda hebra y amplificación de los ADNc parciales del genoma del HCV en tres reacciones de PCR separadas, comprendiendo la primera reacción de PCR una alícuota de la primera reacción de transcripción inversa y el par de cebadores poli-A/HCV1bOF6074, comprendiendo la segunda reacción de PCR una alícuota de la segunda reacción de transcripción inversa y el par de cebadores HCV1bOR6312/HCV1bOF1977 y comprendiendo la tercera reacción de PCR una alícuota de la tercera reacción de transcripción inversa y el par de cebadores HCV1bOR3306/HCVOF129;
- 10 Etapa 5: amplificación adicional de los ADNc parciales de la etapa 4 en tres reacciones de PCR anidadas separadas, comprendiendo la primera reacción de PCR anidada una alícuota de la primera reacción de PCR y el par de cebadores HCV1bIR9339/HCV1bIF6126, comprendiendo la segunda reacción de PCR anidada una alícuota de la segunda reacción de PCR y el par de cebadores HCV1bIR6282/HCV1bIF2523, y comprendiendo la tercera reacción de PCR anidada una alícuota de la tercera reacción de PCR y el par de cebadores HCV1bIR2770/HCVIF278;
- 15 Etapa 6: análisis de la secuencia de los ADNc amplificados adicionalmente de la etapa 5; y
- Etapa 7: comparación de las secuencias obtenidas con la del HCV1b prototipo.
- 20 Otro de estos análisis que se utilizan con muestras obtenidas de un sujeto que alberga un HCV 1b que es resistente a la terapia que el sujeto ha recibido comprende las siguientes etapas que se llevan a cabo de manera sucesiva:
- Etapa 1: extracción del ARN viral procedente de una muestra tomada de un sujeto infectado con un HCV que es resistente a un fármaco o combinación de fármacos anti-HCV con los cuales se ha tratado el sujeto;
- 25 Etapas 2 - 6 como en el análisis anterior;
- Etapa 7: comparación de las secuencias obtenidas en la etapa 6 con la del genoma del HCV prototipo e identificación de las mutaciones; y
- 30 Etapa 8: introducción de las mutaciones identificadas en un banco de datos de mutaciones asociadas con la resistencia a fármacos anti-HCV.
- Un análisis similar que se puede llevar a cabo una vez que se ha generado un banco de datos útil de las mutaciones de HCV1b asociadas con las resistencia a fármacos es idéntico al análisis descrito inmediatamente antes, excepto que la etapa 8 consistirá en una búsqueda en el último banco de datos de las mutaciones identificadas y una selección de un fármaco o combinación de fármacos anti-HCV alternativos a los cuales no se espera que el HCV sea resistente para el posterior tratamiento del sujeto.
- 35 El análisis anterior también se puede llevar a cabo sobre una muestra tomada de un sujeto infectado con HCV antes del comienzo de cualquier terapia farmacológica del sujeto. Siempre que el HCV del sujeto sea del tipo 1b, los resultados del análisis permitirán al médico seleccionar un fármaco o combinación de fármacos anti-HCV a los cuales el HCV con el que el sujeto está infectado no es resistente.
- 40 Los aspectos clave de los análisis específicos de HCV 1b anteriores también se ilustran en la Fig.1 y en la sección de Ejemplos. Las secuencias de nucleótidos de la síntesis del ADNc y los cebadores de amplificación así como el grupo de cebadores de secuenciación propuestos se proporcionan en la Tabla 1.
- 45

Tabla 1: Cebadores de HCV 1b

Nombre del cebador	Propósito	Dirección	Secuencia del cebador	Localización en el genoma (H77 como referencia)	SEQ ID NO:
HCV1bOR3306	ADNc/PCR externa región UTR 5'-NS2	antisentido	GATGATGTCCCCAC ACGCCGCGGTGTC	3332-3306	3
HCVOF129	PCR externa región UTR 5'-NS2	efector	CCGGGAGAGCCAT AGTGGTCTGCGGA ACC	129-157	6
HCVIF278	PCR interna región UTR 5'-NS2	efector	GCCTTGTGGTACTG CCTGATAGGGTGCT TG	278-307	12
HCV1bIR2770	PCR interna región 5' UTR-	antisentido		2798-2770	9

Nombre del cebador	Propósito	Dirección	Secuencia del cebador	Localización en el genoma (H77 como referencia)	SEQ ID NO:
	NS2		TCCGCACGATGCA GCCATCTCCCGGTC CA		
HCV1bOR6312	ADNc/PCR externa región NS2-NS5A	antisentido	GGCAGGAGCTTGG ACTGGAGCCAGGT CTTGAA	6343-6312	2
HCV1bOF1977	PCR externa región NS2- NS5A	efector	CAAGGCAACTGGTT CGGCTGTACATGGA TGAA	1977-2008	5
HCV1bIF2523	PCR interna región NS2- NS5A	efector	GACGCGCGGTCT GYGCTGCTTGTGG AT	2523-551	11
HCV1bIR6282	PCR interna región NS2- NS5A	antisentido	TCAGTCAACACCGT GCATATCCAGTCCC A	6310-6282	8
poli-A	ADNc/PCR externa región NS4B-UTR 5'	antisentido	de 30 unidades	9447-9418	1
HCVOF6074	PCR externa región NS4B- UTR 3'	efector	GGCTGTGCAGTGG ATGAACCGGCTGAT AGC	6074-6103	4
HCV1bIF6126	PCR interna región NS4B- UTR 3'	efector	GTCTCCCCACGCA CTATGTGCCTGA	6126-6151	10
HCV1bIR9339	PCR interna región NS4B- UTR 3'	antisentido	GGGAGCAGGTAGA TGCCTACCCCTAC	9367-9342	7
HCV1bSF310	secuenciación región UTR 5'- NS2	efector	GAGTGCCCCGGGA GGTCTTCGTAGA	309-332	13
HCV1bSF807	secuenciación región UTR 5'- NS2	efector	CCGGGTTCTGGAG GACGGCGTGAA	806-829	14
HCV1bSR850	secuenciación región UTR 5'- NS2	antisentido	AGGAAGATAGAGAA AGAGCAACCGGG	874-849	15
HCV1bSF1202	secuenciación región UTR 5'- NS2	efector	TCTCCCAGCTGTTC ACCTTCTC	1201-1222	16
HCV1bSR302	secuenciación región UTR 5'- NS2	antisentido	GACCAGTTCATCAT CATATCC	1321-1301	17
HCV1bSF1597	secuenciación región UTR 5'- NS2	efector	GGCAGCTGGCACA TCAACAGGAC	1593-1615	18
HCV1bSR1653	secuenciación región UTR 5'- NS2	antisentido	GTAGAACAGCGCG GCAAGGAAC	1674-1653	19
HCV1bSF1854	secuenciación región UTR 5'-	efector		1850-1872	20

Nombre del cebador	Propósito	Dirección	Secuencia del cebador	Localización en el genoma (H77 como referencia)	SEQ ID NO:
	NS2		TGGTCCAGTGTATT GYTTCACCC		
HCV1bSR1990	secuenciación región UTR 5'- NS2	antisentido	TTCATCCATGTACA GCCGAACCA	2008-1896	21
HCV1bSF2242	secuenciación región UTR 5'- NS2	efector	GTGGGGGGCGTGG AGCACAGGC	2238-2259	22
HCV1bSR2433	secuenciación región UTR 5'- NS2	antisentido	CGTACAGGTATTGC ACGTCCACG	2451-2429	23
HCV1bSF2640	secuenciación región NS2- NS5A	efector	TCTCTCCTTCCTTG TGTCTTCT	2636-2658	24
HCV1bSF2860	secuenciación región NS2- NS5A	antisentido	AACCACCATATGAG CCTGGCGAG	2882-2860	25
HCV1bSF3085	secuenciación región NS2- NS5A	efector	CGCGCTCAAGGGC TCATYCGTG	3081-3102	26
HCV1bSR3280	secuenciación región NS2- NS5A	antisentido	CAGGTGATGATCTT GGTCTCCAT	3298-3276	27
HCV1bSF3541	secuenciación región NS2- NS5A	efector	ACRCAATCTTTCCT GGCGACCTG	3537-3559	28
HCV1bSR3643	secuenciación región NS2- NS5A	antisentido	GTCCTGGTCTACAT TGGTGTACAT	3662-3639	29
HCV1bSF4004	secuenciación región NS2- NS5A	efector	CGCAGACATTCCAA GTGGCCCA	4000-4021	30
HCV1bSR4237	secuenciación región NS2- NS5A	antisentido	CAACCACCGTCGG CAAGGAAGTT	4255-4233	31
HCV1bSF4516	secuenciación región NS2- NS5A	efector	CTCATTTTCTGCCA TTCCAAGAA	4512-4534	32
HCV1bSR4666	secuenciación región NS2- NS5A	antisentido	TCAAAGTCGCCGGT AWAGCCCGTCAT	4687-4682	33
HCV1bSF5048	secuenciación región NS2- NS5A	efector	TAGATGCCCACTTC TTGTCCC	5044-5064	34
HCV1bSR5164	secuenciación región NS2- NS5A	antisentido	AGCCGTATGAGACA CTTCCACAT	5182-5160	35
HCV1bSF5524	secuenciación región NS2- NS5A	efector	CAATTCAAGCAGAA GGCGCTCGG	5520-5542	36
HCV1bSR5639	secuenciación región NS2-	antisentido		5659-5635	37

Nombre del cebador	Propósito	Dirección	Secuencia del cebador	Localización en el genoma (H77 como referencia)	SEQ ID NO:
	NS5A		TGTATCCCGCTGAT GAARTTCCACA		
HCV1bSF5986	secuenciación región NS2- NS5A	efector	ACACGCTGTGATAA ATGTCTCCCCCGC	5986-6008	38
HCV1bSR6092	secuenciación región NS2- NS5A	antisentido	GAAGCGAACGCTAT CAGCCGGTTCA	6112-6088	39
HCV1bSF6186	secuenciación región NS2- NS5A	efector	CCTCTCCAGCCTTA CCATCACTCA	6182-6205	40
HCV1bSR6256	secuenciación región NS2- NS5A	antisentido	TCCCTIAGCCACGA GCCGGAGCATGG	6281-6256	41
HCV1bSF6416	secuenciación región NS4B- región UTR 3'	efector	TCATGCAIACCACCT GCCCATG	6416-6437	42
HCV1bSR6616	secuenciación región NS4B- región UTR 3'	antisentido	TCCCCACCCGCG TGACCTCCAC	6639-6616	43
HCV1bSF6853	secuenciación región NS4B- región UTR 3'	efector	GTGCTCACTTCCAT GCTCACCGA	6849-6871	44
HCV1bSR6964	secuenciación región NS4B- región UTR 3'	antisentido	TCAAGGAAGGCGC AGACA ACTG	6975-6954	45
HCV1bSF7066	secuenciación región NS4B- región UTR 3'	efector	GGGAACATCACCC GCGTGGAGTC	7056-7078	46
HCV1bSR7273	secuenciación región NS4B- región UTR 3'	antisentido	GGCACCCGTGTA CCACCGGAGG	7285-7263	47
HCV1bSF7504	secuenciación región NS4B- región UTR 3'	efector	TACTCCTCCATGCC CCCCCTTGA	7494-7516	48
HCV1bSR7558	secuenciación región NS4B- región UTR 3'	antisentido	CTCGCTCACRGTAG ACCAAGACCC	7570-7548	49
HCV1bSF7968	secuenciación región NS4B- región UTR 3'	efector	CTCGCTCACRGTAG ACCAAGACCC	7961-7984	50
HCV1bSR8077	secuenciación región NS4B- región UTR 3'	antisentido	TCTGGGAATACGAT AAGGCGAGC	8092-8070	51
HCV1bSF8528	secuenciación región NS4B- región UTR 3'	efector	AGCTCCAGGACTG CACGATGCT	8521-8542	52
HCV1bSR8622	secuenciación región NS4B- región UTR 3'	antisentido	TACCTAGTCATAGC CTCCGTGAAG	8638-8615	53

Nombre del cebador	Propósito	Dirección	Secuencia del cebador	Localización en el genoma (H77 como referencia)	SEQ ID NO:
HCV1bSF9010	secuenciación región NS4B- región UTR 3'	efector	ACACGCTGTGATAA ATGTCTCCCCCGC	9010-9031	54
HCV1bSR9094	secuenciación región NS4B- región UTR 3'	antisentido	GATGTCTCCAGACT CGCAAGGG	9108-9087	55

5 Otras realizaciones específicas de la invención hacen referencia a análisis análogos para su uso con muestras obtenidas de sujetos infectados con HCV de otros genotipos y subtipos, en particular HCV 1a, HCV 2 y HCV 3. Un experto en la técnica sabrá cómo diseñar una síntesis de ADNc y unos cebadores de amplificación apropiados de acuerdo con el método de la invención así como cebadores de secuenciación mediante la referencia a secuencias de genomas virales prototipo.

10 Las muestras pueden consistir en, pero no están limitadas a, muestras de sangre de sujetos infectados por HCV o infectados simultáneamente por HIV y HCV, cuyas muestras pueden ser tomadas de los sujetos antes, durante o después del transcurso del tratamiento con un fármaco o combinación de fármacos anti-HCV. Los análisis de la invención se pueden utilizar para otras aplicaciones. Por ejemplo, las variantes de HCV presentes en una muestra procedente de un sujeto pueden ser clonadas en un vector de HCV infeccioso y transducidas a células de mamífero. (Kato et al. (2007) J Virol 81, 4405-4411). El virus infeccioso que contiene las secuencias variantes de HCV se pueden utilizar después de eso para infectar cultivos de mamífero, y las muestras obtenidas después de uno o 15 varios ciclos de infección en presencia o ausencia de un fármaco o combinación de fármacos anti-HCV se pueden analizar por medio de los análisis de la invención.

20 La extracción de ARN de HCV procedente de las muestras se puede realizar mediante diferentes métodos incluyendo el uso de kits asequibles comercialmente, p. ej., el kit QIAamp® Viral RNA mini, el kit QIAamp® Utralsens® Virus, reactivos de Trizol (Invitrogen) o productos concentrados Vivaspin.

25 Las reacciones de transcripción inversa y de PCR que forman parte de los análisis se llevan a cabo utilizando mezclas de reacción convencionales y condiciones tales como las descritas en los ejemplos y las referencias citadas en ellos. Típicamente, los ácidos nucleicos extraídos de las muestras se someten a 20-40 ciclos de amplificación en las reacciones de PCR de la etapa 4 y 2-10 ciclos en la reacción de PCR anidada de la etapa 5.

30 La invención se elabora adicionalmente por medio de los siguientes ejemplos. Los ejemplos se proporcionan con el fin de ilustrar a un experto en la técnica, y no se pretende que sean limitantes del alcance de la invención que se describe en las reivindicaciones. De este modo, la invención no se debe considerar limitada a los ejemplos proporcionados, pero se debe considerar que incluye todas y cada una de las variaciones que resultan evidentes como resultado de las enseñanzas ilustradas en la presente memoria.

EJEMPLOS

35 **Ejemplo 1: Métodos detallados utilizados en los análisis de la invención**

40 Muestras: Se obtuvieron muestras de plasma procedentes de pacientes no sometidos a terapia previa de dos hospitales diferentes. Se determinó la carga viral utilizando el sistema HCV Viral Load COBAS AMPLICOR de Roche Molecular Diagnostics (Basilea, Suiza).

45 Las muestras se seleccionaron basándose en la presencia del HCV de tipo 1b determinada mediante el ensayo InnoLipa (Innogenetics, Zwijnaarde, Bélgica). Para confirmar el genotipo, después de la síntesis de ADNc y la amplificación de PCR con un grupo de pares de cebadores externos, se llevó a cabo la secuenciación con uno de los últimos cebadores. La secuencia resultante se sometió a genotipaje y subtipaje utilizando la herramienta de Subtipaje de HCV Automatizada Oxford. (De Oliveira et al. (2005) Bioinformatics 21, 3797-3800).

50 Selección y síntesis de cebadores: Los cebadores para la transcripción inversa, la amplificación por PCR y la secuenciación se desarrollaron utilizando el programa OLIGO (Medprobe, Oslo, Noruega). Se descargaron las secuencias del genoma casi completo alineado de la base de datos de HCV de Los Álamos (<http://hcv.lanl.gov/content/sequence/HCV/ToolsOutline.html>). Las secuencias de los cebadores para HCV 1b se dan en la Tabla 1. Los cebadores se sintetizaron mediante Applera Europe (Lennik, Bélgica).

Extracción de ARN: La extracción de ARN se realizó utilizando el kit QIAamp Viral RNA mini de Qiagen (Westburg, Leusden, Países Bajos) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

5 Síntesis de ADNc y amplificación por PCR: Se sometió a transcripción inversa el ARN en tres reacciones separadas (cebadas con los tres cebadores antisentido externos) con Transcriptor RT de Roche (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). En primer lugar, se desnaturalizaron el cebador antisentido externo 2,5 μM y 10 μl de ARN en un microtubo durante 5 minutos a 65°C y se enfriaron bruscamente. A continuación, se reunió una mezcla de transcripción inversa en un volumen final de 20 μl , incluyendo la mezcla los siguientes componentes adicionales: 1 X Tampón para RT Transcriptor, dNTP 1mM, 20 U de Inhibidor de ARNasa Protector, 10 U de Transcriptasa Inversa
10 Transcriptor y agua MilliQ. La síntesis de ADNc se realizó a 50°C durante 90 minutos, y después se enfriaron las reacciones a 4°C. La amplificación por PCR se realizó en dos etapas utilizando el Sistema de PCR con Moldes Largos de Gran Expansión de Roche (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Se realizó un primer grupo de PCR en las siguientes condiciones: 1x Tampón para Moldes Largos de Gran Expansión 1, dNTP 0,350 mM, cebador efector externo 0,3 μM , cebador antisentido externo 0,3 μM , 3,75 U de ADN Polimerasa de Moldes Largos de Gran Expansión, 5 μl de ADNc molde y agua MilliQ en un volumen final de 50 μl . Después de una etapa de desnaturalización a 94°C durante 2 min., se realizaron 10 ciclos de 10 seg. a 94°C, 30 seg. a 57°C, y 4 min. a 68°C. Esta amplificación estuvo seguida de 25 ciclos de 15 seg. a 94°C, 30 seg. a 57°C, y 4 min. a 68°C, con un incremento de tiempo de 20 seg/ciclo y una etapa de elongación final de 7 min. a 68°C. Las reacciones se enfriaron después a 4°C. Se realizó una segunda etapa de PCR en las siguientes condiciones: 1x Tampón para Moldes Largos de Gran Expansión 1, dNTP 0,350 mM, cebador efector interno 0,3 μM , cebador antisentido interno 0,3 μM , 3,75 U de ADN Polimerasa para Moldes Largos de Gran Expansión, 2 μl de producto de amplificación del primer grupo de PCR y agua MilliQ en un volumen final de 50 μl . Las condiciones del ciclo fueron idénticas al primer grupo de PCR excepto que solamente se realizaron tres ciclos.

25 Electroforesis en gel: se analizaron los productos de la PCR por medio de electroforesis en gel de agarosa. Se cargaron 7,5 μl de producto de PCR sobre un gel de agarosa al 1,5%, y se realizó la electroforesis a 100 V. Los geles se tiñeron durante 10 minutos con bromuro de etidio para visualizar los fragmentos de ADN.

30 Purificación de los productos de la PCR: los productos de la PCR se purificaron utilizando el kit de purificación de PCR Qiaquick de Qiagen (Westburg, Leiden, Países Bajos) de acuerdo con el protocolo del fabricante. La concentración de los productos de PCR purificados se determinó espectrofotométricamente. Las reacciones de secuenciación requirieron aproximadamente 2 ng/100 pb de ADN.

35 Secuenciación de nucleótidos: Las reacciones de secuenciación se realizaron en Fastens SA (Ginebra, Suiza) utilizando el Kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems Inc., Foster City, USA). Se ensamblaron los cóntigos y se analizaron los datos en Seqscape (Applied Biosystems Inc., Foster City, USA).

40 **Ejemplo 2: Validación de los análisis de la invención: tasa de éxito de la PCR, y reproducibilidad y sensibilidad de un análisis de la invención**

45 Se determinó la tasa de éxitos al obtener cantidades visualizables y secuenciables de tres productos de PCR solapantes que representan casi el genoma viral completo de muestras que contienen HCV 1b utilizando 60 muestras procedentes de sujetos infectados que fueron originalmente genotipificados como HCV1b por Inno-LiPA HCV I. Se volvieron a analizar los genotipos/subtipos por medio de secuenciación y análisis filogenético para las muestras con resultados equívocos.

50 Se evaluó la reproducibilidad del análisis para PCR del genoma parcial sometiendo a ensayo por triplicado las muestras de genotipo 1b confirmado. Al menos 2 de los 3 ensayos repetidos se realizaron a partir de una muestra de plasma. Excepcionalmente, el ensayo de la tercera repetición se inició a partir del ARN extraído de muestras con volúmenes de plasma insuficientes.

La sensibilidad del análisis se validó sobre 10 muestras.

55 La especificidad del análisis se estimó mediante secuenciación parcial de los productos de la PCR producidos a partir de un subgrupo de 8 muestras. Todas las secuencias fueron HCV1b o 1a. Los resultados de estos análisis se resumen en la siguiente Tabla 2. Los resultados del Ejemplo de las determinaciones de la sensibilidad se presentan en la Fig. 2.

60 Los datos presentados en la Tabla 2 demuestran que la tasa de éxito de la PCR se aproximaba al 100% después de la corrección del subtipo. El análisis fue específico para el genotipo 1 de HCV. Se observó una buena reproducibilidad. La sensibilidad fue excelente para las regiones UTR 5'-NS2 y NS2-NS5A, y aceptable para la región NS4B-NS5B.

Tabla 2: Tasa de éxitos de la PCR, y reproducibilidad y sensibilidad de un análisis de la invención

Pares de cebadores	Región del genoma de HCV	Tasa de éxitos de la PCR tipificado con InnoLipa como HCV1b	Tasa de éxitos de la PCR de secuencias tipificadas como HVC1b	Reproducibilidad	Sensibilidad (copias/reacción)
HCV1bOR3306/ HCVOF129	UTR 5'-NS2	46/60 (82%)	45/47 (96%)	27/45 (3 de 3 ensayos) 16/45 (2 de 3 ensayos) 2/45 (1 de 3 ensayos)	1-10
HCV1bOR312/ HCV1bOF1977	NS2-NS5A	55/60 (92%)	44/47 (94%)	17/44 (3 de 3 ensayos) 22/44 (2 de 3 ensayos) 5/44 (1 de 3 ensayos)	10-100
poli-A/ HCV1bOF6074	NS4B-NS5B	54/60 (90%)	(45/47) (96%)	19/45 (3 de 3 ensayos) 18/45 (2 de 3 ensayos) 8/45 (1 de 3 ensayos)	100-1000

5 **Ejemplo 3: Análisis de muestras procedentes de sujetos infectados con HCV, no sometidos a tratamiento previo por medio de un análisis de la invención**

10 Se analizaron alícuotas de muestras de plasma de sujetos infectados con HCV no sometidos a tratamiento previo por medio de un análisis de la invención (análisis de la reivindicación 5). Las secuencias de ácido nucleico obtenidas después de la secuenciación se tradujeron automáticamente a aminoácidos y se compararon/alinearon con el programa clustalw2.0 (en EBSite) con una secuencia consenso de HCV 1b, HCV con1 (Número de Acceso Genbank AF011751). Las secuencias 5306 y 5415 son procedentes de dos sujetos infectados no sometidos a terapia previa. Las secuencias de aminoácidos traducidas derivadas del HCV presente en los dos sujetos se comparan con la secuencia con1 de las Figs. 3a y 3b. La identidad de secuencia con la secuencia consenso se indica por medio de un guión en las secuencias procedentes de los sujetos infectados. Se indica el comienzo de la secuencia codificante para cada proteína viral (NÚCLEO, E1, E2, P7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B).

20 Las secuencias de aminoácidos derivadas de HCV presentes en los sujetos infectados, no sometidos a tratamiento previo revelan la presencia de mutaciones L91 M en la proteína núcleo asociada con la resistencia a la terapia con IFN/Ribavirina y V499A en NS5B asociada con la resistencia a inhibidores no nucleosídicos o compuestos de benzimidazol. Véase la Tabla 3 para una información publicada relevante.

Tabla 3: Compendio de algunas mutaciones de aminoácidos encontradas en el genoma de HCV1b de sujetos o replicones de HCV que están asociados con la resistencia a fármacos

Región de la proteína de HCV	Mutaciones	Resistencia a Fármacos	Referencia de publicación
Núcleo	L91M	Terapia con IFN/Ribavirina	Akuta et al., Virology, 2005
NS5B	V499A	Inhibidor no nucleosídico, compuestos de benzimidazol	Kukolj et al., JBC, 2005; Hwu et al., Antivir. Res., 2008
NS5A	T245A	Terapia con IFN/Ribavirina en sujetos infectados con HCV 1a	Nousbaum et al., J. Virology, 2000
NS3	C16S/C	ACH806	Yang et al., Antimicrob. Agent Chem., 2008

25

LISTA DE SECUENCIAS

<110>Debiopharma SA
Katholieke universiteit Leuven, KU Leuven Research & Development

5	<120>Análisis del genoma casi completo de la resistencia a fármacos para HCV <130>DPH077	
10	<150>PCT/182007/03304 <151>2007-10-31 <160>58 <170>PatentIn versión 3.5	
15	<210>1 <211>30 <212>ADN <213>Secuencia Artificial	
20	<220> <223>Cebador HCVRpoliA	
25	<400>1 aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	30
30	<210>2 <211>32 <212>ADN <213>Secuencia Artificial <220>	
35	<223>Cebador HCV1bOR6312 <400>2 ggcaggagct tggactggag ccaggctcttg aa	32
40	<210>3 <211>27 <212>ADN <213>Secuencia Artificial	
45	<220> <223>Cebador HCV1bOR3306	
50	<400>3 gatgatgtcc ccacacgccg cggtgtc	27
55	<210>4 <211>30 <212>ADN <213>Secuencia Artificial <220>	
60	<223>Cebador HCV1bOF6974 <400>4 ggctgtgcag tggatgaacc ggctgatagc	30

5	<210>5 <211>32 <212>ADN <213>Secuencia Artificial <220> <223>Cebador HCV1bOF1977	
10	<400>5 caaggcaact ggttcggctg tacatggatg aa	32
15	<210>6 <211>29 <212>ADN <213>Secuencia Artificial <220> <223>Cebador HCV1bOF129	
20	<400>6 ccgggagagc catagtggtc tgcggaacc	29
25	<210>7 <211>26 <212>ADN <213>Secuencia Artificial <220> <223>Cebador HCV1bIR9339	
30	<400>7 gggagcaggt agatgcctac ccctac	26
35	<210>8 <211>29 <212>ADN <213>Secuencia Artificial <220> <223>Cebador HCV1bIR6282	
40	<400>8 tcagtcaaca ccgtgcatat ccagtccca	29
45	<210>9 <211>29 <212>ADN <213>Secuencia Artificial <220> <223>Cebador HCV1bIR2770	
50	<400>9 tccgcacgat gcagccatct cccggtcca	29
55	<210>10 <211>26 <212>ADN <213>Secuencia Artificial	
60		

	<220>	
5	<223>Cebador HCV1bIF6126	
	<400>10	
	gtctcccca cgcactatgt gcctga	26
10	<210>11	
	<211>29	
	<212>ADN	
	<213>Secuencia Artificial	
15	<220>	
	<223>Cebador HCV1bIF2523	
	<400>11	
20	gacgcgcgcg tctgygcctg ctttggat	29
	<210>12	
	<211>30	
	<212>ADN	
	<213>Secuencia Artificial	
25	<220>	
	<223>Cebador HCVIF278	
30	<400>12	
	gccttgtggt actgcctgat agggtgcttg	30
	<210>13	
	<211>25	
35	<212>ADN	
	<213>Secuencia Artificial	
	<220>	
40	<223>Cebador 1bSF310	
	<400>13	
	gagtgccccg ggaggtcttc gtaga	25
45	<210>14	
	<211>24	
	<212>ADN	
	<213>Secuencia Artificial	
50	<220>	
	<223>Cebador HCV1bSF807	
	<400>14	
55	ccgggttctg gaggacggcg tga	24
	<210>15	
	<211>26	
	<212>ADN	
60	<213>Secuencia Artificial	
	<220>	

	<223>Cebador HCV1bSR850	
5	<400>15 aggaagatag agaaagagca accggg	26
	<210>16 <211>22 <212>ADN <213>Secuencia Artificial	
10	<220>	
	<223>Cebador HCV1bSF1202	
15	<400>16 tctccagct gttcaccttc tc	22
	<210>17 <211>21 <212>ADN <213>Secuencia Artificial	
20	<220>	
	<223>Cebador HCV1bSR1302	
25	<400>17 gaccagttca tcatcatatc c	21
	<210>18 <211>23 <212>ADN <213>Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223>Cebador HCV1bSF1597	
35	<400>18 ggcagctggc acatcaacag gac	23
	<210>19 <211>22 <212>ADN <213>Secuencia Artificial	
40	<220>	
	<223>Cebador HCV1bSR1653	
45	<400>19 gtagaacagc gcggcaagga ac	22
	<210>20 <211>23 <212>ADN <213>Secuencia Artificial	
50	<220>	
	<223>Cebador HV1bSF1854	
55	<400>20	
60		

	tgggccagtg tattgyttca ccc	23
5	<210>21 <211>23 <212>ADN <213>Secuencia Artificial <220>	
10	<223>Cebador HCV1bSR1990 <400>21 ttcatccatg tacagccgaa cca	23
15	<210>22 <211>22 <212>ADN <213>Secuencia Artificial	
20	<220> <223>Cebador HCV1bSF2242	
25	<400>22 gtggggggcg tggagcacag gc	22
30	<210>23 <211>23 <212>ADN <213>Secuencia Artificial <220>	
35	<223>Cebador HCV1bSR2433 <400>23 cgtacaggta ttgcacgtcc acg	23
40	<210>24 <211>23 <212>ADN <213>Secuencia Artificial	
45	<220> <223>Cebador HCV1bSF2640	
50	<400>24 tctctccttc cttgtgttct tct	23
55	<210>25 <211>23 <212>ADN <213>Secuencia Artificial <220>	
60	<223>Cebador HCV1bSF2860 <400>25 aaccaccata tgagcctggc gag	23
	<210>26	

	<211>22 <212>ADN <213>Secuencia Artificial	
5	<220> <223>Cebador HCV1bSF3085	
	<400>26 cgcgctcaag ggctcatycg tg	22
10	<210>27 <211>23 <212>ADN <213>Secuencia Artificial	
15	<220> <223>Cebador HCV1bSR3280	
20	<400>27 caggtgatga tcttggcttc cat	23
25	<210>28 <211>23 <212>ADN <213>Secuencia Artificial	
	<220> <223>Cebador HCV1bSF3541	
30	<400>28 acrcaatctt tcctggcgac ctg	23
35	<210>29 <211>24 <212>ADN <213>Secuencia Artificial	
40	<220> <223>Cebador HCV1bSR3643	
45	<400>29 gtcctggctt acattgggtg acat	24
50	<210>30 <211>22 <212>ADN <213>Secuencia Artificial	
	<220> <223>Cebador HCV1bSF4004	
55	<400>30 cgcagacatt ccaagtgcc ca	22
60	<210>31 <211>23 <212>ADN <213>Secuencia Artificial	

<220>
 <223>Cebador HCV1bSR4237

5 <400>31
caaccaccgt cggcaaggaa ctt 23
 <210>32
 <211>23
 <212>ADN
 10 <213>Secuencia Artificial
 <220>

<223>Cebador HCV1bSF4516

15 <400>32
ctcattttct gccattccaa gaa 23
 <210>33
 <211>26
 <212>ADN
 20 <213>Secuencia Artificial
 <220>

25 <223>Cebador HCV1bSR4666

<400>33
tcaaagtcgc cggtagagcc cgtcat 26
 30 <210>34
 <211>21
 <212>ADN
 <213>Secuencia Artificial
 35 <220>

<223>Cebador HCV1bSF5048

40 <400>34
tagatgccca cttcttgtcc c 21
 <210>35
 <211>23
 45 <212>ADN
 <213>Secuencia Artificial
 <220>

50 <223>Cebador HCV1bSR5164

<400>35
agccgatga gacacttcca cat 23
 55 <210>36
 <211>23
 <212>ADN
 <213>Secuencia Artificial
 60 <220>

<223>Cebador HCV1bSF5524

	<400>36 caattcaagc agaagggcgt cgg	23
5	<210>37 <211>25 <212>ADN <213>Secuencia Artificial	
10	<220> <223>Cebador HCV1bSR5639	
15	<400>37 tgtatcccgc tgatgaartt ccaca	25
20	<210>38 <211>27 <212>ADN <213>Secuencia Artificial	
25	<220> <223>Cebador HCV1bSF5986	
30	<400>38 acacgctgtg ataaatgtct cccccgc	27
35	<210>39 <211>25 <212>ADN <213>Secuencia Artificial	
40	<220> <223>Cebador HCV1bSR6092	
45	<400>39 gaagcgaacg ctatcagccg gttca	25
50	<210>40 <211>24 <212>ADN <213>Secuencia Artificial	
55	<220> <223>Cebador HCV1bSF6186	
60	<400>40 cctctccagc cttaccatca ctca	24
65	<210>41 <211>26 <212>ADN <213>Secuencia Artificial	
70	<220> <223>Cebador HCV1bSR6256	
75	<220> <221>base_modificada <222>(6)..(6)	

	<223>desoxiinosina	
	<220>	
5	<221>rasgos_misc <222>(6)..(6) <223>n es desoxiinosina	
	<400>41	
10	tccctnagcc acgagccgga gcatgg	26
	<210>42 <211>22 <212>ADN <213>Secuencia Artificial	
15	<220>	
	<223>Cebador HCV1bSF6416	
20	<220> <221>base_modificada <222>(8)..(8) <223>desoxiinosina	
25	<220> <221>rasgos_misc <222>(8)..(8) <223>n es desoxiinosina	
30	<400>42 tcatgcanac cacctgccca tg	22
	<210>43 <211>23 <212>ADN <213>Secuencia Artificial	
35	<220>	
40	<223>Cebador HCV1bSR6616	
	<400>43 tccccacccc gcgtgacctc cac	23
45	<210>44 <211>23 <212>ADN <213>Secuencia Artificial	
50	<220>	
	<223>Cebador HCV1bSF6853	
	<400>44 gtgctcactt ccatgctcac cga	23
55	<210>45 <211>22 <212>ADN <213>Secuencia Artificial	
60	<220>	

	<223>Cebador HCV1bSR6964	
	<400>45	
5	tcaaggaagg cgcagacaac tg	22
	<210>46	
	<211>23	
	<212>ADN	
10	<213>Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223>Cebador HCV1bSF7066	
15	<400>46	
	gggaacatca cccgcgtgga gtc	23
	<210>47	
	<211>23	
20	<212>ADN	
	<213>Secuencia Artificial	
	<220>	
25	<223>Cebador HCV1bSR7273	
	<400>47	
	gggcacccgt gtaccaccgg agg	23
30	<210>48	
	<211>23	
	<212>ADN	
	<213>Secuencia Artificial	
35	<220>	
	<223>Cebador HCV1bSF7504	
	<400>48	
40	tactcctcca tgccccccct tga	23
	<210>49	
	<211>24	
	<212>ADN	
45	<213>Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223>Cebador HCV1bSR7558	
50	<400>49	
	ctcgctcacr gtagaccaag accc	24
	<210>50	
55	<211>24	
	<212>ADN	
	<213>Secuencia Artificial	
	<220>	
60	<223>Cebador HCV1bSF7968	
	<400>50	

	ctccgtgtgg aaggacttgc tgga	24
	<210>51 <211>23 <212>ADN <213>Secuencia Artificial	
5	<220>	
10	<223>Cebador HCV1bSR8077	
	<400>51 tctgggaata cgataaggcg agc	23
15	<210>52 <211>22 <212>ADN <213>Secuencia Artificial	
20	<220>	
	<223>Cebador HCV1bSF8528	
25	<400>52 agctccagga ctgcacgatg ct	22
30	<210>53 <211>24 <212>ADN <213>Secuencia Artificial	
	<220>	
35	<223>Cebador HCV1bSR8622	
	<400>53 tacctagtca tagcctccgt gaag	24
40	<210>54 <211>27 <212>ADN <213>Secuencia Artificial	
45	<220>	
	<223>Cebador HCV1bSF9010	
50	<400>54 acacgctgtg ataaatgtct cccccgc	27
55	<210>55 <211>22 <212>ADN <213>Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223>Cebador HCV1bSR9094	
60	<400>55 gatgtctcca gactcgcaag gg	22
	<210>56	

<211>3010
 <212>PRT
 <213>Virus hepatitis C con1

5 <400>56

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

Phe Leu Leu Ala Leu Leu Ser Cys Leu Thr Ile Pro Ala Ser Ala Tyr
 180 185 190
 Glu Val Arg Asn Val Ser Gly Val Tyr His Val Thr Asn Asp Cys Ser
 195 200 205
 Asn Ala Ser Ile Val Tyr Glu Ala Ala Asp Met Ile Met His Thr Pro
 210 215 220
 Gly Cys Val Pro Cys Val Arg Glu Asn Asn Ser Ser Arg Cys Trp Val
 225 230 235 240
 Ala Leu Thr Pro Thr Leu Ala Ala Arg Asn Ala Ser Val Pro Thr Thr
 245 250 255
 Thr Ile Arg Arg His Val Asp Leu Leu Val Gly Ala Ala Ala Leu Cys
 260 265 270
 Ser Ala Met Tyr Val Gly Asp Leu Cys Gly Ser Val Phe Leu Val Ala
 275 280 285
 Gln Leu Phe Thr Phe Ser Pro Arg Arg His Glu Thr Val Gln Asp Cys
 290 295 300
 Asn Cys Ser Ile Tyr Pro Gly His Val Thr Gly His Arg Met Ala Trp
 305 310 315 320
 Asp Met Met Met Asn Trp Ser Pro Thr Ala Ala Leu Val Val Ser Gln
 325 330 335
 Leu Leu Arg Ile Pro Gln Ala Val Val Asp Met Val Ala Gly Ala His
 340 345 350
 Trp Gly Val Leu Ala Gly Leu Ala Tyr Tyr Ser Met Val Gly Asn Trp
 355 360 365
 Ala Lys Val Leu Ile Val Met Leu Leu Phe Ala Gly Val Asp Gly Gly
 370 375 380
 Thr Tyr Val Thr Gly Gly Thr Met Ala Lys Asn Thr Leu Gly Ile Thr
 385 390 395 400
 Ser Leu Phe Ser Pro Gly Ser Ser Gln Lys Ile Gln Leu Val Asn Thr
 405 410 415
 Asn Gly Ser Trp His Ile Asn Arg Thr Ala Leu Asn Cys Asn Asp Ser
 420 425 430
 Leu Asn Thr Gly Phe Leu Ala Ala Leu Phe Tyr Val His Lys Phe Asn
 435 440 445

Ser Ser Gly Cys Pro Glu Arg Met Ala Ser Cys Ser Pro Ile Asp Ala
 450 455 460

Phe Ala Gln Gly Trp Gly Pro Ile Thr Tyr Asn Glu Ser His Ser Ser
 465 470 475 480

Asp Gln Arg Pro Tyr Cys Trp His Tyr Ala Pro Arg Pro Cys Gly Ile
 485 490 495

Val Pro Ala Ala Gln Val Cys Gly Pro Val Tyr Cys Phe Thr Pro Ser
 500 505 510

Pro Val Val Val Gly Thr Thr Asp Arg Phe Gly Val Pro Thr Tyr Ser
 515 520 525

Trp Gly Glu Asn Glu Thr Asp Val Leu Leu Leu Asn Asn Thr Arg Pro
 530 535 540

Pro Gln Gly Asn Trp Phe Gly Cys Thr Trp Met Asn Ser Thr Gly Phe
 545 550 555 560

Thr Lys Thr Cys Gly Gly Pro Pro Cys Asn Ile Gly Gly Ile Gly Asn
 565 570 575

Lys Thr Leu Thr Cys Pro Thr Asp Cys Phe Arg Lys His Pro Glu Ala
 580 585 590

Thr Tyr Thr Lys Cys Gly Ser Gly Pro Trp Leu Thr Pro Arg Cys Leu
 595 600 605

Val His Tyr Pro Tyr Arg Leu Trp His Tyr Pro Cys Thr Val Asn Phe
 610 615 620

Thr Ile Phe Lys Val Arg Met Tyr Val Gly Gly Val Glu His Arg Leu
 625 630 635 640

Glu Ala Ala Cys Asn Trp Thr Arg Gly Glu Arg Cys Asn Leu Glu Asp
 645 650 655

Arg Asp Arg Ser Glu Leu Ser Pro Leu Leu Leu Ser Thr Thr Glu Trp
 660 665 670

Gln Val Leu Pro Cys Ser Phe Thr Thr Leu Pro Ala Leu Ser Thr Gly
 675 680 685

Leu Ile His Leu His Gln Asn Val Val Asp Val Gln Tyr Leu Tyr Gly
 690 695 700

Ile Gly Ser Ala Val Val Ser Phe Ala Ile Lys Trp Glu Tyr Val Leu
 705 710 715 720

Leu Leu Phe Leu Leu Leu Ala Asp Ala Arg Val Cys Ala Cys Leu Trp
 725 730 735
 Met Met Leu Leu Ile Ala Gln Ala Glu Ala Ala Leu Glu Asn Leu Val
 740 745 750
 Val Leu Asn Ala Ala Ser Val Ala Gly Ala His Gly Ile Leu Ser Phe
 755 760
 Leu Val Phe Phe Cys Ala Ala Trp Tyr Ile Lys Gly Arg Leu Val Pro
 770 775 780
 Gly Ala Ala Tyr Ala Leu Tyr Gly Val Trp Pro Leu Leu Leu Leu Leu
 785 790 795 800
 Leu Ala Leu Pro Pro Arg Ala Tyr Ala Met Asp Arg Glu Met Ala Ala
 805 810 815
 Ser Cys Gly Gly Ala Val Phe Val Gly Leu Ile Leu Leu Thr Leu Ser
 820 825 830
 Pro His Tyr Lys Leu Phe Leu Ala Arg Leu Ile Trp Trp Leu Gln Tyr
 835 840 845
 Phe Ile Thr Arg Ala Glu Ala His Leu Gln Val Trp Ile Pro Pro Leu
 850 855 860
 Asn Val Arg Gly Gly Arg Asp Ala Val Ile Leu Leu Thr Cys Ala Ile
 865 870 875 880
 His Pro Glu Leu Ile Phe Thr Ile Thr Lys Ile Leu Leu Ala Ile Leu
 885 890 895
 Gly Pro Leu Met Val Leu Gln Ala Gly Ile Thr Lys Val Pro Tyr Phe
 900 905 910
 Val Arg Ala His Gly Leu Ile Arg Ala Cys Met Leu Val Arg Lys Val
 915 920 925
 Ala Gly Gly His Tyr Val Gln Met Ala Leu Met Lys Leu Ala Ala Leu
 930 935 940
 Thr Gly Thr Tyr Val Tyr Asp His Leu Thr Pro Leu Arg Asp Trp Ala
 945 950 955 960
 His Ala Gly Leu Arg Asp Leu Ala Val Ala Val Glu Pro Val Val Phe
 965 970 975
 Ser Asp Met Glu Thr Lys Val Ile Thr Trp Gly Ala Asp Thr Ala Ala
 980 985 990

Cys Gly Asp Ile Ile Leu Gly Leu Pro Val Ser Ala Arg Arg Gly Arg
 995 1000 1005

Glu Ile His Leu Gly Pro Ala Asp Ser Leu Glu Gly Gln Gly Trp
 1010 1015 1020

Arg Leu Leu Ala Pro Ile Thr Ala Tyr Ser Gln Gln Thr Arg Gly
 1025 1030 1035

Leu Leu Gly Cys Ile Ile Thr Ser Leu Thr Gly Arg Asp Arg Asn
 1040 1045 1050

Gln Val Glu Gly Glu Val Gln Val Val Ser Thr Ala Thr Gln Ser
 1055 1060 1065

Phe Leu Ala Thr Cys Val Asn Gly Val Cys Trp Thr Val Tyr His
 1070 1075 1080

Gly Ala Gly Ser Lys Thr Leu Ala Gly Pro Lys Gly Pro Ile Thr
 1085 1090 1095

Gln Met Tyr Thr Asn Val Asp Gln Asp Leu Val Gly Trp Gln Ala
 1100 1105 1110

Pro Pro Gly Ala Arg Ser Leu Thr Pro Cys Thr Cys Gly Ser Ser
 1115 1120 1125

Asp Leu Tyr Leu Val Thr Arg His Ala Asp Val Ile Pro Val Arg
 1130 1135 1140

Arg Arg Gly Asp Ser Arg Gly Ser Leu Leu Ser Pro Arg Pro Val
 1145 1150 1155

Ser Tyr Leu Lys Gly Ser Ser Gly Gly Pro Leu Leu Cys Pro Ser
 1160 1165 1170

Gly His Ala Val Gly Ile Phe Arg Ala Ala Val Cys Thr Arg Gly
 1175 1180 1185

Val Ala Lys Ala Val Asp Phe Val Pro Val Glu Ser Met Glu Thr
 1190 1195 1200

Thr Met Arg Ser Pro Val Phe Thr Asp Asn Ser Ser Pro Pro Ala
 1205 1210 1215

Val Pro Gln Thr Phe Gln Val Ala His Leu His Ala Pro Thr Gly
 1220 1225 1230

Ser Gly Lys Ser Thr Lys Val Pro Ala Ala Tyr Ala Ala Gln Gly
 1235 1240 1245

Tyr Lys Val Leu Val Leu Asn Pro Ser Val Ala Ala Thr Leu Gly
 1250 1255 1260

Phe Gly Ala Tyr Met Ser Lys Ala His Gly Ile Asp Pro Asn Ile
 1265 1270 1275

Arg Thr Gly Val Arg Thr Ile Thr Thr Gly Ala Pro Ile Thr Tyr
 1280 1285 1290

Ser Thr Tyr Gly Lys Phe Leu Ala Asp Gly Gly Cys Ser Gly Gly
 1295 1300 1305

Ala Tyr Asp Ile Ile Ile Cys Asp Glu Cys His Ser Thr Asp Ser
 1310 1315 1320

Thr Thr Ile Leu Gly Ile Gly Thr Val Leu Asp Gln Ala Glu Thr
 1325 1330 1335

Ala Gly Ala Arg Leu Val Val Leu Ala Thr Ala Thr Pro Pro Gly
 1340 1345 1350

Ser Val Thr Val Pro His Pro Asn Ile Glu Glu Val Ala Leu Ser
 1355 1360 1365

Ser Thr Gly Glu Ile Pro Phe Tyr Gly Lys Ala Ile Pro Ile Glu
 1370 1375 1380

Thr Ile Lys Gly Gly Arg His Leu Ile Phe Cys His Ser Lys Lys
 1385 1390 1395

Lys Cys Asp Glu Leu Ala Ala Lys Leu Ser Gly Leu Gly Leu Asn
 1400 1405 1410

Ala Val Ala Tyr Tyr Arg Gly Leu Asp Val Ser Val Ile Pro Thr
 1415 1420 1425

Ser Gly Asp Val Ile Val Val Ala Thr Asp Ala Leu Met Thr Gly
 1430 1435 1440

Phe Thr Gly Asp Phe Asp Ser Val Ile Asp Cys Asn Thr Cys Val
 1445 1450 1455

Thr Gln Thr Val Asp Phe Ser Leu Asp Pro Thr Phe Thr Ile Glu
 1460 1465 1470

Thr Thr Thr Val Pro Gln Asp Ala Val Ser Arg Ser Gln Arg Arg
 1475 1480 1485

Gly Arg Thr Gly Arg Gly Arg Met Gly Ile Tyr Arg Phe Val Thr
 1490 1495 1500

Pro Gly Glu Arg Pro Ser Gly Met Phe Asp Ser Ser Val Leu Cys
 1505 1510 1515
 Glu Cys Tyr Asp Ala Gly Cys Ala Trp Tyr Glu Leu Thr Pro Ala
 1520 1525 1530
 Glu Thr Ser Val Arg Leu Arg Ala Tyr Leu Asn Thr Pro Gly Leu
 1535 1540 1545
 Pro Val Cys Gln Asp His Leu Glu Phe Trp Glu Ser Val Phe Thr
 1550 1555 1560
 Gly Leu Thr His Ile Asp Ala His Phe Leu Ser Gln Thr Lys Gln
 1565 1570 1575
 Ala Gly Asp Asn Phe Pro Tyr Leu Val Ala Tyr Gln Ala Thr Val
 1580 1585 1590
 Cys Ala Arg Ala Gln Ala Pro Pro Pro Ser Trp Asp Gln Met Trp
 1595 1600 1605
 Lys Cys Leu Ile Arg Leu Lys Pro Thr Leu His Gly Pro Thr Pro
 1610 1615 1620
 Leu Leu Tyr Arg Leu Gly Ala Val Gln Asn Glu Val Thr Thr Thr
 1625 1630 1635
 His Pro Ile Thr Lys Tyr Ile Met Ala Cys Met Ser Ala Asp Leu
 1640 1645 1650
 Glu Val Val Thr Ser Thr Trp Val Leu Val Gly Gly Val Leu Ala
 1655 1660 1665
 Ala Leu Ala Ala Tyr Cys Leu Thr Thr Gly Ser Val Val Ile Val
 1670 1675 1680
 Gly Arg Ile Ile Leu Ser Gly Lys Pro Ala Ile Ile Pro Asp Arg
 1685 1690 1695
 Glu Val Leu Tyr Arg Glu Phe Asp Glu Met Glu Glu Cys Ala Ser
 1700 1705 1710
 His Leu Pro Tyr Ile Glu Gln Gly Met Gln Leu Ala Glu Gln Phe
 1715 1720 1725
 Lys Gln Lys Ala Ile Gly Leu Leu Gln Thr Ala Thr Lys Gln Ala
 1730 1735 1740
 Glu Ala Ala Ala Pro Val Val Glu Ser Lys Trp Arg Thr Leu Glu
 1745 1750 1755

Ala Phe Trp Ala Lys His Met Trp Asn Phe Ile Ser Gly Ile Gln
 1760 1765 1770

Tyr Leu Ala Gly Leu Ser Thr Leu Pro Gly Asn Pro Ala Ile Ala
 1775 1780 1785

Ser Leu Met Ala Phe Thr Ala Ser Ile Thr Ser Pro Leu Thr Thr
 1790 1795 1800

Gln His Thr Leu Leu Phe Asn Ile Leu Gly Gly Trp Val Ala Ala
 1805 1810 1815

Gln Leu Ala Pro Pro Ser Ala Ala Ser Ala Phe Val Gly Ala Gly
 1820 1825 1830

Ile Ala Gly Ala Ala Val Gly Ser Ile Gly Leu Gly Lys Val Leu
 1835 1840 1845

Val Asp Ile Leu Ala Gly Tyr Gly Ala Gly Val Ala Gly Ala Leu
 1850 1855 1860

Val Ala Phe Lys Val Met Ser Gly Glu Met Pro Ser Thr Glu Asp
 1865 1870 1875

Leu Val Asn Leu Leu Pro Ala Ile Leu Ser Pro Gly Ala Leu Val
 1880 1885 1890

Val Gly Val Val Cys Ala Ala Ile Leu Arg Arg His Val Gly Pro
 1895 1900 1905

Gly Glu Gly Ala Val Gln Trp Met Asn Arg Leu Ile Ala Phe Ala
 1910 1915 1920

Ser Arg Gly Asn His Val Ser Pro Thr His Tyr Val Pro Glu Ser
 1925 1930 1935

Asp Ala Ala Ala Arg Val Thr Gln Ile Leu Ser Ser Leu Thr Ile
 1940 1945 1950

Thr Gln Leu Leu Lys Arg Leu His Gln Trp Ile Asn Glu Asp Cys
 1955 1960 1965

Ser Thr Pro Cys Ser Gly Ser Trp Leu Arg Asp Val Trp Asp Trp
 1970 1975 1980

Ile Cys Thr Val Leu Thr Asp Phe Lys Thr Trp Leu Gln Ser Lys
 1985 1990 1995

Leu Leu Pro Arg Leu Pro Gly Val Pro Phe Phe Ser Cys Gln Arg
 2000 2005 2010

Gly Tyr Lys Gly Val Trp Arg Gly Asp Gly Ile Met Gln Thr Thr
 2015 2020 2025

Cys Pro Cys Gly Ala Gln Ile Thr Gly His Val Lys Asn Gly Ser
 2030 2035 2040

Met Arg Ile Val Gly Pro Arg Thr Cys Ser Asn Thr Trp His Gly
 2045 2050 2055

Thr Phe Pro Ile Asn Ala Tyr Thr Thr Gly Pro Cys Thr Pro Ser
 2060 2065 2070

Pro Ala Pro Asn Tyr Ser Arg Ala Leu Trp Arg Val Ala Ala Glu
 2075 2080 2085

Glu Tyr Val Glu Val Thr Arg Val Gly Asp Phe His Tyr Val Thr
 2090 2095 2100

Gly Met Thr Thr Asp Asn Val Lys Cys Pro Cys Gln Val Pro Ala
 2105 2110 2115

Pro Glu Phe Phe Thr Glu Val Asp Gly Val Arg Leu His Arg Tyr
 2120 2125 2130

Ala Pro Ala Cys Lys Pro Leu Leu Arg Glu Glu Val Thr Phe Leu
 2135 2140 2145

Val Gly Leu Asn Gln Tyr Leu Val Gly Ser Gln Leu Pro Cys Glu
 2150 2155 2160

Pro Glu Pro Asp Val Ala Val Leu Thr Ser Met Leu Thr Asp Pro
 2165 2170 2175

Ser His Ile Thr Ala Glu Thr Ala Lys Arg Arg Leu Ala Arg Gly
 2180 2185 2190

Ser Pro Pro Ser Leu Ala Ser Ser Ser Ala Ser Gln Leu Ser Ala
 2195 2200 2205

Pro Ser Leu Lys Ala Thr Cys Thr Thr Arg His Asp Ser Pro Asp
 2210 2215 2220

Ala Asp Leu Ile Glu Ala Asn Leu Leu Trp Arg Gln Glu Met Gly
 2225 2230 2235

Gly Asn Ile Thr Arg Val Glu Ser Glu Asn Lys Val Val Ile Leu
 2240 2245 2250

Asp Ser Phe Glu Pro Leu Gln Ala Glu Glu Asp Glu Arg Glu Val
 2255 2260 2265

Ser Val Pro Ala Glu Ile Leu Arg Arg Ser Arg Lys Phe Pro Arg
 2270 2275 2280
 Ala Met Pro Ile Trp Ala Arg Pro Asp Tyr Asn Pro Pro Leu Leu
 2285 2290 2295
 Glu Ser Trp Lys Asp Pro Asp Tyr Val Pro Pro Val Val His Gly
 2300 2305 2310
 Cys Pro Leu Pro Pro Ala Lys Ala Pro Pro Ile Pro Pro Pro Arg
 2315 2320 2325
 Arg Lys Arg Thr Val Val Leu Ser Glu Ser Thr Val Ser Ser Ala
 2330 2335 2340
 Leu Ala Glu Leu Ala Thr Lys Thr Phe Gly Ser Ser Glu Ser Ser
 2345 2350 2355
 Ala Val Asp Ser Gly Thr Ala Thr Ala Ser Pro Asp Gln Pro Ser
 2360 2365 2370
 Asp Asp Gly Asp Ala Gly Ser Asp Val Glu Ser Tyr Ser Ser Met
 2375 2380 2385
 Pro Pro Leu Glu Gly Glu Pro Gly Asp Pro Asp Leu Ser Asp Gly
 2390 2395 2400
 Ser Trp Ser Thr Val Ser Glu Glu Ala Ser Glu Asp Val Val Cys
 2405 2410 2415
 Cys Ser Met Ser Tyr Thr Trp Thr Gly Ala Leu Ile Thr Pro Cys
 2420 2425 2430
 Ala Ala Glu Glu Thr Lys Leu Pro Ile Asn Ala Leu Ser Asn Ser
 2435 2440 2445
 Leu Leu Arg His His Asn Leu Val Tyr Ala Thr Thr Ser Arg Ser
 2450 2455 2460
 Ala Ser Leu Arg Gln Lys Lys Val Thr Phe Asp Arg Leu Gln Val
 2465 2470 2475
 Leu Asp Asp His Tyr Arg Asp Val Leu Lys Glu Met Lys Ala Lys
 2480 2485 2490
 Ala Ser Thr Val Lys Ala Lys Leu Leu Ser Val Glu Glu Ala Cys
 2495 2500 2505
 Lys Leu Thr Pro Pro His Ser Ala Arg Ser Lys Phe Gly Tyr Gly
 2510 2515 2520

Ala Lys Asp Val Arg Asn Leu Ser Ser Lys Ala Val Asn His Ile
 2525 2530 2535

Arg Ser Val Trp Lys Asp Leu Leu Glu Asp Thr Glu Thr Pro Ile
 2540 2545 2550

Asp Thr Thr Ile Met Ala Lys Asn Glu Val Phe Cys Val Gln Pro
 2555 2560 2565

Glu Lys Gly Gly Arg Lys Pro Ala Arg Leu Ile Val Phe Pro Asp
 2570 2575 2580

Leu Gly Val Arg Val Cys Glu Lys Met Ala Leu Tyr Asp Val Val
 2585 2590 2595

Ser Thr Leu Pro Gln Ala Val Met Gly Ser Ser Tyr Gly Phe Gln
 2600 2605 2610

Tyr Ser Pro Gly Gln Arg Val Glu Phe Leu Val Asn Ala Trp Lys
 2615 2620 2625

Ala Lys Lys Cys Pro Met Gly Phe Ala Tyr Asp Thr Arg Cys Phe
 2630 2635 2640

Asp Ser Thr Val Thr Glu Asn Asp Ile Arg Val Glu Glu Ser Ile
 2645 2650 2655

Tyr Gln Cys Cys Asp Leu Ala Pro Glu Ala Arg Gln Ala Ile Arg
 2660 2665 2670

Ser Leu Thr Glu Arg Leu Tyr Ile Gly Gly Pro Leu Thr Asn Ser
 2675 2680 2685

Lys Gly Gln Asn Cys Gly Tyr Arg Arg Cys Arg Ala ser Gly Val
 2690 2695 2700

Leu Thr Thr Ser Cys Gly Asn Thr Leu Thr Cys Tyr Leu Lys Ala
 2705 2710 2715

Ala Ala Ala Cys Arg Ala Ala Lys Leu Gln Asp Cys Thr Met Leu
 2720 2725 2730

Val Cys Gly Asp Asp Leu Val Val Ile Cys Glu ser Ala Gly Thr
 2735 2740 2745

Gln Glu Asp Glu Ala Ser Leu Arg Ala Phe Thr Glu Ala Met Thr
 2750 2755 2760

Arg Tyr Ser Ala Pro Pro Gly Asp Pro Pro Lys Pro Glu Tyr Asp
 2765 2770 2775

Leu Glu 2780 Leu Ile Thr Ser Cys 2785 Ser Ser Asn Val Ser 2790 Val Ala His
 Asp Ala 2795 Ser Gly Lys Arg Val 2800 Tyr Tyr Leu Thr Arg 2805 Asp Pro Thr
 Thr Pro 2810 Leu Ala Arg Ala Ala 2815 Trp Glu Thr Ala Arg 2820 His Thr Pro
 Val Asn 2825 Ser Trp Leu Gly Asn 2830 Ile Ile Met Tyr Ala 2835 Pro Thr Leu
 Trp Ala 2840 Arg Met Ile Leu Met 2845 Thr His Phe Phe Ser 2850 Ile Leu Leu
 Ala Gln 2855 Glu Gln Leu Glu Lys 2860 Ala Leu Asp Cys Gln 2865 Ile Tyr Gly
 Ala Cys 2870 Tyr Ser Ile Glu Pro 2875 Leu Asp Leu Pro Gln 2880 Ile Ile Gln
 Arg Leu 2885 His Gly Leu Ser Ala 2890 Phe Ser Leu His Ser 2895 Tyr Ser Pro
 Gly Glu 2900 Ile Asn Arg Val Ala 2905 Ser Cys Leu Arg Lys 2910 Leu Gly Val
 Pro Pro 2915 Leu Arg Val Trp Arg 2920 His Arg Ala Arg Ser 2925 Val Arg Ala
 Arg Leu 2930 Leu Ser Gln Gly Gly 2935 Arg Ala Ala Thr Cys 2940 Gly Lys Tyr
 Leu Phe 2945 Asn Trp Ala Val Arg 2950 Thr Lys Leu Lys Leu 2955 Thr Pro Ile
 Pro Ala 2960 Ala Ser Gln Leu Asp 2965 Leu Ser Ser Trp Phe 2970 Val Ala Gly
 Tyr Ser 2975 Gly Gly Asp Ile Tyr 2980 His Ser Leu Ser Arg 2985 Ala Arg Pro
 Arg Trp 2990 Phe Met Trp Cys Leu 2995 Leu Leu Leu Ser Val 3000 Gly Val Gly
 Ile Tyr 3005 Leu Leu Pro Asn Arg 3010

<210>57
 <211>3003

<212>PRT
<213>Virus hepatitis C

<400>57

Met Ser Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Asn
 1 5 10 15
 Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly
 20 25 30
 Gly Val Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Leu Gly Val Arg Ala
 35 40 45
 Thr Arg Lys Thr Ser Glu Arg Ser Gln Pro Arg Gly Arg Arg Gln Pro
 50 55 60
 Ile Pro Lys Ala Arg Arg Pro Glu Gly Arg Thr Trp Ala Gln Pro Gly
 65 70 75 80
 Tyr Pro Trp Pro Leu Tyr Gly Asn Glu Gly Met Gly Trp Ala Gly Trp
 85 90 95
 Leu Leu Ser Pro Arg Gly Ser Arg Pro Ser Trp Gly Pro Thr Asp Pro
 100 105 110
 Arg Arg Arg Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Ile Asp Thr Leu Thr Cys
 115 120 125
 Gly Phe Ala Asp Leu Met Gly Tyr Ile Pro Leu Val Gly Ala Pro Leu
 130 135 140
 Gly Gly Ala Ala Arg Ala Leu Ala His Gly Val Arg Val Leu Glu Asp
 145 150 155 160
 Gly Val Asn Tyr Ala Thr Gly Asn Leu Pro Gly Cys Ser Phe Ser Ile
 165 170 175
 Phe Leu Leu Ala Leu Leu Ser Cys Leu Thr Ile Pro Ala Ser Ala Tyr
 180 185 190
 Glu Val Arg Asn Val Ser Gly Val Tyr His Val Thr Asn Asp Cys Ser
 195 200 205
 Asn Thr Ser Ile Val Tyr Glu Thr Ala Asp Met Ile Met His Thr Pro
 210 215 220
 Gly Cys Val Pro Cys Val Arg Glu Ala Asn Ser Ser Arg Cys Trp Ala
 225 230 235 240
 Ala Leu Thr Pro Thr Leu Ala Ala Arg Asn Thr Ser Ile Pro Thr Thr
 245 250 255

Thr Ile Arg Arg His Val Asp Leu Leu Val Gly Ala Ala Ala Leu Cys
 260 265 270
 Ser Ala Met Tyr Val Gly Asp Leu Cys Gly Ser Val Phe Leu Val Ser
 275 280 285
 Gln Leu Phe Thr Phe Ser Pro Arg Arg His Glu Thr Val Gln Asp Cys
 290 295 300
 Asn Cys Ser Leu Tyr Pro Gly His Val Ser Gly His Arg Met Ala Trp
 305 310 315 320
 Asp Met Met Met Asn Trp Ser Pro Thr Ala Ala Leu Val Ala Ser Gln
 325 330 335
 Leu Leu Arg Ile Pro Gln Ala Val Val Asp Met Val Ala Gly Ala His
 340 345 350
 Trp Gly Val Leu Ala Gly Leu Ala Tyr Tyr Ser Met Val Gly Asn Trp
 355 360 365
 Ala Lys Val Leu Ile Val Met Leu Leu Phe Ala Gly Val Asp Gly Ala
 370 375 380
 Pro Asn Ala Ile Ala Ser Ser Pro Ala Arg Gly Ala Arg Gly Ile Thr
 385 390 395 400
 Ser Leu Phe Thr Pro Gly Ala Ser Gln Asn Val Gln Leu Ile Asn Thr
 405 410 415
 Asn Gly Ser Trp His Ile Asn Arg Thr Ala Leu Asn Cys Asn Asp Ser
 420 425 430
 Leu His Thr Gly Phe Leu Ala Ala Leu Phe Tyr Val Asn Lys Phe Asn
 435 440 445
 Ser Ser Gly Cys Pro Glu Arg Met Ala Ser Cys Arg Pro Ile Asp Gln
 450 455 460
 Phe Ala Gln Gly Trp Gly Pro Ile Thr His Val Val Pro Lys Asp Leu
 465 470 475 480
 Asp Gln Arg Pro Tyr Cys Trp His Tyr Ala Pro Arg Pro Cys Gly Ile
 485 490 495
 Val Arg Ala Ser Glu Val Cys Gly Pro Val Tyr Cys Phe Thr Pro Ser
 500 505 510
 Pro Val Val Val Gly Thr Thr Asp Arg Ser Gly Ala Pro Thr Tyr Asn
 515 520 525

ES 2 361 598 T3

Trp Gly Glu Asn Glu Thr Asp Val Leu Leu Leu Asn Asn Thr Arg Pro
 530 535 540

Pro Gln Gly Asn Trp Phe Gly Cys Thr Trp Met Asn Ser Thr Gly Phe
 545 550 555

Thr Lys Thr Cys Gly Gly Pro Pro Cys Asn Ile Gly Gly Leu Gly Asn
 565 570 575

Asn Thr Leu Thr Cys Pro Thr Asp Cys Phe Arg Lys His Pro Glu Ala
 580 585 590

Thr Tyr Ile Lys Cys Gly Ser Gly Pro Trp Leu Thr Pro Arg Cys Leu
 595 600 605

Val Asn Tyr Pro Tyr Arg Leu Trp His Tyr Pro Cys Thr Val Asn Phe
 610 615 620

Thr Ile Thr Gln Val Arg Met Tyr Val Gly Gly Val Glu His Arg Leu
 625 630 635 640

Glu Ala Ala Cys Asn Trp Thr Arg Gly Glu Arg Cys Asn Leu Glu Asp
 645 650 655

Arg Asp Arg Ala Glu Leu Ser Pro Leu Leu Leu Ser Thr Thr Glu Trp
 660 665 670

Gln Val Leu Pro Cys Ser Phe Thr Thr Leu Pro Ala Leu Ser Thr Gly
 675 680 685

Leu Ile His Leu His Gln Asn Ile Val Asp Val Gln Tyr Leu Tyr Gly
 690 695 700

Ile Gly Ser Ala Val Val Ser Tyr Val Ile Lys Trp Glu Tyr Val Leu
 705 710 715 720

Leu Leu Phe Leu Leu Leu Ala Asp Ala Arg Val Cys Ala Cys Leu Trp
 725 730 735

Met Met Leu Leu Ile Ala Gln Ala Glu Ala Ala Leu Glu Asn Leu Val
 740 745 750

Val Leu Asn Ala Ala Ser Val Ala Gly Thr His Gly Ile Leu Ser Phe
 755 760 765

Leu Val Phe Phe Cys Ala Ala Trp Tyr Ile Lys Gly Arg Leu Val Pro
 770 775 780

Gly Ala Ala Tyr Ala Phe Tyr Gly Val Trp Pro Leu Leu Leu Leu Leu
 785 790 795 800

Leu Ala Leu Pro Pro Arg Ala Tyr Ala Met Asp Arg Glu Met Ala Ala
 805 810 815
 Ser Cys Gly Gly Ala Val Phe Val Gly Leu Val Leu Leu Thr Leu Ser
 820 825 830
 Pro His Tyr Lys Pro Leu Leu Ala Lys Leu Ile Trp Trp Leu Gln Tyr
 835 840 845
 Leu Ile Thr Arg Ala Glu Ala His Leu Gln Val Trp Val Pro Pro Leu
 850 855 860
 Asn Val Arg Gly Gly Arg Asp Ala Ile Ile Leu Leu Thr Cys Ala Leu
 865 870 875 880
 His Pro Glu Leu Thr Phe Asp Ile Thr Lys His Leu Leu Ala Ile Leu
 885 890 895
 Gly Pro Leu Met Val Leu Gln Ala Gly Ile Thr Lys Val Pro Tyr Phe
 900 905 910
 Val Arg Ala Gln Gly Leu Ile Arg Val Cys Met Leu Val Arg Lys Val
 915 920 925
 Ala Gly Gly His Tyr Val Gln Met Ala Leu Met Lys Leu Ala Ala Leu
 930 935 940
 Thr Gly Thr Tyr Val Tyr Asp His Leu Thr Pro Leu Arg Asp Trp Ala
 945 950 955 960
 His Gln Gly Leu Arg Asp Leu Ala Val Ala Val Glu Pro Val Val Phe
 965 970 975
 Ser Asp Met Glu Thr Lys Val Ile Thr Trp Gly Ala Asp Thr Ala Ala
 980 985 990
 Cys Gly Asp Ile Ile Leu Gly Leu Pro Val Ser Ala Arg Arg Gly Arg
 995 1000 1005
 Glu Ile Leu Leu Gly Pro Ala Asp Ser Leu Glu Gly Gln Gly Trp
 1010 1015 1020
 Arg Leu Leu Ala Pro Ile Thr Ala Tyr Ala Gln Gln Thr Arg Gly
 1025 1030 1035
 Leu Leu Gly Cys Ile Ile Thr Ser Leu Thr Gly Arg Asp Lys Asn
 1040 1045 1050
 Gln Val Glu Gly Glu Val Gln Val Val Ser Thr Ala Thr Gln Ser
 1055 1060 1065

Phe Leu Ala Thr Cys Val Asn Gly Val Cys Trp Thr Val Phe His
 1070 1075 1080
 Gly Ala Gly Ser Lys Thr Leu Ala Gly Pro Lys Gly Pro Ile Thr
 1085 1090 1095
 Gln Met Tyr Thr Asn Val Asp Gln Asp Leu Val Gly Trp Gln Ala
 1100 1105 1110
 Pro Ser Gly Ala Arg Ser Leu Thr Pro Cys Thr Cys Gly Ser Ser
 1115 1120 1125
 Asp Leu Tyr Leu Val Thr Arg His Ala Asp Val Ile Pro Val Arg
 1130 1135 1140
 Arg Arg Gly Asp Ser Arg Gly Ser Leu Leu Ser Pro Arg Pro Val
 1145 1150 1155
 Ser Tyr Leu Lys Gly Ser Ser Gly Gly Pro Leu Leu Cys Pro Leu
 1160 1165 1170
 Gly His Ala Val Gly Ile Phe Arg Ala Ala Val Cys Thr Arg Gly
 1175 1180 1185
 Val Ala Lys Ala Val Asp Phe Val Pro Val Glu Ser Met Glu Thr
 1190 1195 1200
 Thr Met Arg Ser Pro Val Phe Thr Asp Asn Ser Ser Pro Pro Ala
 1205 1210 1215
 Val Pro Gln Thr Phe Gln Val Ala His Leu His Ala Pro Thr Gly
 1220 1225 1230
 Ser Gly Lys Ser Thr Arg Val Pro Ala Ala Tyr Ala Ala Gln Gly
 1235 1240 1245
 Tyr Lys Val Leu Val Leu Asn Pro Ser Val Ala Ala Thr Leu Gly
 1250 1255 1260
 Phe Gly Ala Tyr Met Ser Lys Ala His Gly Ile Asp Pro Asn Ile
 1265 1270 1275
 Arg Thr Gly Val Arg Thr Ile Thr Thr Gly Ala Pro Val Thr Tyr
 1280 1285 1290
 Ser Thr Tyr Gly Lys Phe Leu Ala Asp Gly Gly Cys Ser Gly Gly
 1295 1300 1305
 Ala Tyr Asp Ile Ile Ile Cys Asp Glu Cys His Ser Thr Asp Ser
 1310 1315 1320

Thr Ser Ile Leu Gly Ile Gly Thr Val Leu Asp Gln Ala Glu Thr
 1325 1330 1335
 Ala Gly Ala Arg Leu Val Val Leu Ala Thr Ala Thr Pro Pro Gly
 1340 1345 1350
 Ser Val Thr Val Pro His Pro Asn Ile Glu Glu Val Ala Leu Ser
 1355 1360 1365
 Asn Thr Gly Glu Ile Pro Phe Tyr Gly Lys Ala Ile Pro Leu Glu
 1370 1375 1380
 Thr Ile Lys Gly Gly Arg His Leu Ile Phe Cys His Ser Lys Lys
 1385 1390 1395
 Lys Cys Asp Glu Leu Ala Ala Lys Leu Ser Gly Leu Gly Leu Asn
 1400 1405 1410
 Ala Val Ala Tyr Tyr Arg Gly Leu Asp Val Ser Val Ile Pro Thr
 1415 1420 1425
 Ser Gly Asn Val Val Val Val Ala Thr Asp Ala Leu Met Thr Gly
 1430 1435 1440
 Tyr Thr Gly Asp Phe Asp Ser Val Ile Asp Cys Asn Thr Cys Val
 1445 1450 1455
 Thr Gln Thr Val Asp Phe Ser Leu Asp Pro Thr Phe Thr Ile Glu
 1460 1465 1470
 Thr Thr Thr Val Pro Gln Asp Ala Val Ser Arg Ser Gln Arg Arg
 1475 1480 1485
 Gly Arg Thr Gly Arg Gly Arg Arg Gly Ile Tyr Arg Phe Val Thr
 1490 1495 1500
 Pro Gly Glu Arg Pro Ser Gly Met Phe Asp Ser Ser Val Leu Cys
 1505 1510 1515
 Glu Cys Tyr Asp Ala Gly Cys Ala Trp Tyr Glu Leu Thr Pro Ala
 1520 1525 1530
 Glu Thr Ser Val Arg Leu Arg Ala Tyr Leu Asn Thr Pro Gly Leu
 1535 1540 1545
 Pro Val Cys Gln Asp His Leu Glu Phe Trp Glu Ser Val Phe Thr
 1550 1555 1560
 Gly Leu Thr His Ile Asp Ala His Phe Leu Ser Gln Thr Lys Gln
 1565 1570 1575

Ala Gly Asp Asn Phe Pro Tyr Leu Val Ala Tyr Gln Ala Thr Val
 1580 1585 1590

Cys Ala Arg Ala Gln Ala Pro Pro Pro Ser Trp Asp Gln Met Trp
 1595 1600 1605

Lys Cys Leu Ile Arg Leu Lys Pro Thr Leu His Gly Pro Thr Pro
 1610 1615 1620

Leu Leu Tyr Arg Leu Gly Ala Val Gln Asn Glu Val Val Leu Thr
 1625 1630 1635

His Pro Val Thr Lys Tyr Ile Met Ala Cys Met Ser Ala Asp Leu
 1640 1645 1650

Glu Ile Val Thr Ser Thr Trp Val Leu Val Gly Gly Val Leu Ala
 1655 1660 1665

Ala Leu Ala Ala Tyr Cys Leu Thr Ala Gly Ser Val Val Ile Val
 1670 1675 1680

Gly Arg Ile Ile Leu Ser Gly Lys Pro Ala Val Ile Pro Asp Arg
 1685 1690 1695

Glu Val Leu Tyr Gln Glu Phe Asp Glu Met Glu Glu Cys Ala Ser
 1700 1705 1710

His Leu Pro Tyr Ile Glu Gln Gly Met Gln Leu Ala Glu Gln Phe
 1715 1720 1725

Lys Gln Lys Ala Leu Gly Leu Leu Gln Thr Ala Thr Lys Gln Ala
 1730 1735 1740

Glu Ala Val Ala Pro Val Val Glu Ser Lys Trp Gln Ala Leu Glu
 1745 1750 1755

Thr Phe Trp Ala Lys His Met Trp Asn Phe Ile Ser Gly Ile Gln
 1760 1765 1770

Tyr Leu Ala Gly Leu Ser Thr Leu Pro Gly Asn Pro Ala Ile Ala
 1775 1780 1785

Ser Leu Met Ala Phe Thr Ala Ser Ile Thr Ser Pro Leu Thr Thr
 1790 1795 1800

Gln His Thr Leu Leu Phe Asn Ile Leu Gly Gly Trp Val Ala Ala
 1805 1810 1815

Gln Leu Ala Pro Pro Ser Ala Ala Ser Ala Phe Val Gly Ala Gly
 1820 1825 1830

Ile Ala Gly Ala Ala Val Gly Ser Ile Gly Leu Gly Lys Val Leu
 1835 1840 1845

Val Asp Ile Leu Ala Gly Tyr Gly Ala Gly Val Ala Gly Ala Leu
 1850 1855 1860

Val Ala Phe Lys Ile Met Ser Gly Glu Met Pro Ser Thr Glu Asp
 1865 1870 1875

Leu Val Asn Leu Leu Pro Ala Ile Leu Ser Pro Gly Ala Leu Val
 1880 1885 1890

Val Gly Val Val Cys Ala Ala Ile Leu Arg Arg His Val Gly Pro
 1895 1900 1905

Gly Glu Gly Ala Val Gln Trp Met Asn Arg Leu Ile Ala Phe Ala
 1910 1915 1920

Ser Arg Gly Asn His Val Ser Pro Thr His Tyr Val Pro Glu Ser
 1925 1930 1935

Asp Ala Ala Ala Arg Val Thr Gln Ile Leu Ser Ser Leu Thr Ile
 1940 1945 1950

Thr Gln Leu Leu Lys Arg Leu His Gln Trp Ile Asn Glu Asp Cys
 1955 1960 1965

Ser Thr Pro Cys Ser Gly Ser Trp Leu Arg Asp Val Trp Asp Trp
 1970 1975 1980

Ile Cys Thr Val Leu Ala Asp Phe Lys Thr Trp Leu Gln Ser Lys
 1985 1990 1995

Leu Leu Pro Arg Leu Pro Gly Val Pro Phe Leu Ser Cys Gln Arg
 2000 2005 2010

Gly Tyr Lys Gly Val Trp Arg Gly Asp Gly Ile Met His Thr Thr
 2015 2020 2025

Cys Pro Cys Gly Ala Gln Ile Thr Gly His Val Lys Asn Gly Ser
 2030 2035 2040

Met Arg Ile Val Gly Pro Lys Thr Cys Ser Asn Thr Trp His Gly
 2045 2050 2055

Thr Phe Pro Ile Asn Ala Tyr Thr Thr Gly Pro Cys Thr Pro Ser
 2060 2065 2070

Pro Ala Pro Asn Tyr Ser Arg Ala Leu Trp Arg Val Ala Ala Glu
 2075 2080 2085

Glu Tyr Val Glu Val Thr Arg Val Gly Asp Phe His Tyr Val Thr
 2090 2095 2100

Gly Ile Thr Thr Asp Asn Val Lys Cys Pro Cys Gln Val Pro Ala
 2105 2110 2115

Pro Glu Phe Phe Thr Glu Val Asp Gly Val Arg Leu His Arg Tyr
 2120 2125 2130

Ala Pro Ala Cys Lys Pro Leu Leu Arg Glu Glu Val Thr Phe Leu
 2135 2140 2145

Val Gly Leu Asn Gln Tyr Leu Val Gly Ser Gln Leu Pro Cys Glu
 2150 2155 2160

Pro Glu Pro Asp Val Thr Val Leu Thr Ser Met Leu Thr Asp Pro
 2165 2170 2175

Ser His Ile Thr Ala Glu Ala Ala Lys Arg Arg Leu Ala Arg Gly
 2180 2185 2190

Ser Pro Pro Ser Leu Ala Ser Ser Ser Ala Ser Gln Leu Ser Ala
 2195 2200 2205

Pro Ser Leu Lys Ala Thr Cys Thr Ala Cys His Asp Ser Pro Asp
 2210 2215 2220

Ala Asp Leu Ile Glu Ala Asn Leu Leu Trp Arg Gln Glu Met Gly
 2225 2230 2235

Gly Asn Ile Thr Arg Val Glu Ser Glu Asn Lys Val Val Ile Leu
 2240 2245 2250

Asp Ser Phe Asp Pro Leu His Ala Glu Glu Asp Glu Gly Glu Val
 2255 2260 2265

Ser Ile Pro Ala Glu Ile Leu Arg Lys Thr Arg Lys Phe Pro Arg
 2270 2275 2280

Ala Leu Pro Val Trp Ala Arg Pro Asp Tyr Asn Pro Pro Leu Leu
 2285 2290 2295

Glu Ser Trp Lys Asp Pro Asp Tyr Val Pro Pro Val Val His Gly
 2300 2305 2310

Cys Pro Leu Pro Pro Thr Lys Ala Pro Pro Ile Pro Pro Pro Arg
 2315 2320 2325

Arg Lys Arg Thr Val Val Leu Thr Asp Ser Thr Val Ser Ser Ala
 2330 2335 2340

Leu Ala Glu Leu Ala Thr Lys Thr Phe Gly Ser Ser Glu Ser Ser
 2345 2350 2355
 Ala Val Asp Ser Gly Thr Ala Thr Ala Pro Pro Asp Gln Pro Leu
 2360 2365 2370
 Asp Asp Gly Asn Thr Gly Ser Asp Ala Glu Ser Tyr Ser Ser Met
 2375 2380 2385
 Pro Pro Leu Glu Gly Glu Pro Gly Asp Pro Asp Leu Ser Asp Gly
 2390 2395 2400
 Ser Trp Ser Thr Val Ser Glu Glu Ala Ser Glu Asp Val Val Cys
 2405 2410 2415
 Cys Ser Met Ser Tyr Thr Trp Thr Gly Ala Leu Ile Thr Pro Cys
 2420 2425 2430
 Ala Ala Glu Glu Ser Lys Leu Pro Ile Asn Ala Leu Ser Asn Ser
 2435 2440 2445
 Leu Leu Arg His His Asn Met Val Tyr Ala Thr Thr Ser Arg Ser
 2450 2455 2460
 Ala Ser Gln Arg Gln Lys Lys Val Thr Phe Asp Arg Leu Gln Val
 2465 2470 2475
 Leu Asp Asp His Tyr Arg Asp Val Leu Lys Glu Met Lys Ala Lys
 2480 2485 2490
 Ala Ser Thr Val Lys Ala Lys Leu Leu Ser Ile Glu Glu Ala Cys
 2495 2500 2505
 Lys Leu Thr Pro Pro His Ser Ala Lys Ser Lys Phe Gly Tyr Gly
 2510 2515 2520
 Ala Lys Asp Val Arg Asn Leu Ser Ser Lys Ala Val Asn His Ile
 2525 2530 2535
 Arg Ser Val Trp Gln Asp Leu Leu Glu Asp Ser Glu Thr Pro Ile
 2540 2545 2550
 Asp Thr Thr Ile Met Ala Lys Asn Glu Val Phe Cys Val Gln Pro
 2555 2560 2565
 Glu Lys Gly Gly Arg Lys Pro Ala Arg Leu Ile Val Phe Pro Asp
 2570 2575 2580
 Leu Gly Val Arg Val Cys Glu Lys Met Ala Leu Tyr Asp Val Val
 2585 2590 2595

Ser Thr Leu Pro Gln Ala Val Met Gly Ser Ser Tyr Gly Phe Gln
 2600 2605 2610

Tyr Ser Pro Gly Gln Arg Val Glu Phe Leu Val Asn Ala Trp Lys
 2615 2620 2625

Ser Lys Lys Asn Pro Met Gly Phe Ser Tyr Asp Thr Arg Cys Phe
 2630 2635 2640

Asp Ser Thr Val Thr Glu Ser Asp Ile Arg Val Glu Glu Ser Ile
 2645 2650 2655

Tyr Gln Cys Cys Asp Leu Ala Pro Glu Ala Arg Gln Ala Ile Arg
 2660 2665 2670

Ser Leu Thr Glu Arg Leu Tyr Val Gly Gly Pro Leu Thr Asn Ser
 2675 2680 2685

Lys Gly Gln Asn Cys Gly Tyr Arg Arg Cys Arg Ala Ser Gly Val
 2690 2695 2700

Leu Thr Thr Ser Cys Gly Asn Thr Leu Thr Cys Tyr Leu Lys Ala
 2705 2710 2715

Ser Ala Ala Cys Arg Ala Ala Lys Leu Gln Asp Cys Thr Met Leu
 2720 2725 2730

Val Cys Gly Asp Asp Leu Val Val Ile Cys Glu Ser Ala Gly Thr
 2735 2740 2745

Gln Glu Asp Ala Ala Ser Leu Arg Val Phe Thr Glu Ala Met Thr
 2750 2755 2760

Arg Tyr Ser Ala Pro Pro Gly Asp Pro Pro Gln Pro Glu Tyr Asp
 2765 2770 2775

Leu Glu Leu Ile Thr Ser Cys Ser Ser Asn Val Ser Val Ala His
 2780 2785 2790

Asp Ala Ser Gly Lys Arg Val Tyr Tyr Leu Thr Arg Asp Pro Thr
 2795 2800 2805

Thr Pro Leu Ala Arg Ala Ala Trp Glu Thr Ala Arg His Thr Pro
 2810 2815 2820

Val Asn Ser Trp Leu Gly Asn Ile Ile Met Phe Ala Pro Thr Leu
 2825 2830 2835

Trp Ala Arg Met Ile Leu Met Thr His Phe Phe Ser Ile Leu Leu
 2840 2845 2850

Ala Gln Glu Gln Leu Glu Lys Ala Leu Asp Cys Gln Ile Tyr Gly
 2855 2860 2865

Ala Cys Tyr Ser Ile Glu Pro Leu Asp Leu Pro Gln Ile Ile Gln
 2870 2875 2880

Arg Leu His Gly Leu Ser Ala Phe Ser Leu His Ser Tyr Ser Pro
 2885 2890 2895

Gly Glu Ile Asn Arg Val Ala Ser Cys Leu Arg Lys Leu Gly Val
 2900 2905 2910

Pro Pro Leu Arg Ala Trp Arg His Arg Ala Arg Ser Val Arg Ala
 2915 2920 2925

Lys Leu Leu Ser Leu Gly Gly Arg Ala Ala Thr Cys Gly Arg Tyr
 2930 2935 2940

Leu Phe Asn Trp Ala Val Arg Thr Lys Leu Lys Leu Thr Pro Ile
 2945 2950 2955

Pro Ala Ala Ser Gln Leu Asp Leu Ser Gly Trp Phe Val Ala Gly
 2960 2965 2970

Tyr Ser Gly Gly Asp Ile Tyr His Ser Leu Ser Arg Ala Arg Pro
 2975 2980 2985

Arg Trp Phe Met Trp Cys Leu Leu Leu Ser Val Gly Val Gly
 2990 2995 3000

<210>58
 <211>3005
 <212>PRT
 <213>Virus hepatitis C

5

<400>58

Met Ser Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Asn
 1 5 10 15

Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly
 20 25 30

Gly Val Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Leu Gly Val Arg Ala
 35 40 45

Thr Arg Lys Thr Ser Glu Arg Ser Gln Pro Arg Gly Arg Arg Gln Pro
 50 55 60

Ile Pro Lys Ala Arg Arg Pro Glu Gly Arg Thr Trp Ala Gln Pro Gly
 65 70 75 80

10

Tyr Pro Trp Pro Leu Tyr Gly Asn Glu Gly Met Gly Trp Ala Gly Trp
 85 90 95
 Leu Leu Ser Pro Arg Gly Ser Arg Pro Ser Trp Gly Pro Thr Asp Pro
 100 105 110
 Arg Arg Arg Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Ile Asp Thr Leu Thr Cys
 115 120 125
 Gly Phe Ala Asp Leu Met Gly Tyr Ile Pro Leu Val Gly Ala Pro Leu
 130 135 140
 Gly Gly Ala Ala Arg Ala Leu Ala His Gly Val Arg Val Leu Glu Asp
 145 150 155 160
 Gly Val Asn Tyr Ala Thr Gly Asn Leu Pro Gly Cys Ser Phe Ser Ile
 165 170 175
 Phe Leu Leu Ala Leu Leu Ser Cys Leu Thr Ile Pro Ala Ser Ala Tyr
 180 185 190
 Glu Val Arg Asn Val Ser Gly Ala Tyr His Val Thr Asn Asp Cys Ser
 195 200 205
 Asn Ser Ser Ile Val Tyr Glu Ala Ala Asp Val Ile Met His Thr Pro
 210 215 220
 Gly Cys Val Pro Cys Val Arg Glu Asp Asn Thr Ser Arg Cys Trp Val
 225 230 235 240
 Ala Leu Thr Pro Thr Leu Ala Ala Arg Asn Ala Ser Val Pro Thr Met
 245 250 255
 Thr Ile Arg Arg His Val Asp Leu Leu Val Gly Thr Ala Ala Phe Cys
 260 265 270
 Ser Ala Met Tyr Val Gly Asp Leu Cys Gly Ser Val Phe Leu Val Ser
 275 280 285
 Gln Leu Phe Thr Phe Ser Pro Arg Arg His Glu Thr Val Gln Asp Cys
 290 295 300
 Asn Cys Ser Ile Tyr Pro Gly His Ile Thr Gly His Arg Met Ala Trp
 305 310 315 320
 Asp Met Met Met Asn Trp Ser Pro Thr Thr Ala Leu Val Val Ser Gln
 325 330 335
 Leu Leu Arg Ile Pro Gln Val Val Met Asp Ile Val Thr Gly Ala His
 340 345 350

ES 2 361 598 T3

Trp Gly Val Leu Ala Gly Leu Ala Tyr Tyr Ser Met Ala Gly Asn Trp
 355 360 365
 Ala Lys Val Leu Ile Val Leu Leu Leu Phe Ala Gly Val Asp Gly Arg
 370 375 380
 Thr Glu Thr Thr Gly Gly Val Ala Ala Arg Thr Thr His Gly Phe Thr
 385 390 395 400
 Ser Leu Phe Ser Val Gly Ser Lys Gln Thr Ile Gln Leu Ile Asn Thr
 405 410 415
 Asn Gly Ser Trp His Ile Asn Arg Thr Ala Leu Asn Cys Asn Asp Ser
 420 425 430
 Leu Gln Thr Gly Phe Leu Ala Ala Leu Phe Tyr Val Asn Lys Phe Asn
 435 440 445
 Ser Ser Gly Cys Pro Glu Arg Met Ala Ser Cys Arg Pro Ile Asp Lys
 450 455 460
 Phe Ala Gln Gly Trp Gly Pro Ile Ser Tyr Ala Lys Ala Ser Ser Ser
 465 470 475 480
 Asp Gln Arg Pro Tyr Cys Trp His Tyr Ala Pro Arg Pro Cys Gly Ile
 485 490 495
 Val Pro Ala Ser Gln Val Cys Gly Pro Val Tyr Cys Phe Thr Pro Ser
 500 505 510
 Pro Val Val Val Gly Thr Thr Asp Arg Ser Gly Val Pro Thr Tyr Asn
 515 520 525
 Trp Gly Glu Asn Glu Thr Asp Val Leu Ile Leu Asn Asn Thr Arg Pro
 530 535 540
 Pro Gln Gly Asn Trp Phe Gly Cys Thr Trp Met Asn Ser Thr Gly Tyr
 545 550 555 560
 Thr Lys Thr Cys Gly Gly Pro Pro Cys Asp Ile Gly Gly Val Gly Asn
 565 570 575
 Asp Ser Asn Arg Leu Thr Cys Pro Thr Asp Cys Phe Arg Lys His Pro
 580 585 590
 Glu Ala Thr Tyr Thr Lys Cys Gly Ser Gly Pro Trp Leu Thr Pro Arg
 595 600 605
 Cys Met Val Asp Tyr Pro Tyr Arg Leu Trp His Tyr Pro Cys Thr Val
 610 615 620

Asn Phe Thr Ile Phe Lys Val Arg Met Tyr Val Gly Gly Val Glu His
 625 630 635 640
 Arg Leu Asn Ala Ala Cys Asn Trp Thr Arg Gly Glu Arg Cys Asn Leu
 645 650 655
 Glu Asp Arg Asp Arg Ser Glu Leu Ser Pro Leu Leu Leu Ser Thr Thr
 660 665 670
 Glu Trp Gln Ile Leu Pro Cys Ser Phe Thr Thr Leu Pro Ala Leu Ser
 675 680 685
 Thr Gly Leu Ile His Leu His Gln Asn Ile Val Asp Val Gln Tyr Leu
 690 695 700
 Tyr Gly Val Gly Ser Ala Val Val Ser Leu Ala Ile Lys Trp Glu Tyr
 705 710 715 720
 Val Leu Leu Leu Phe Leu Phe Leu Ala Asp Ala Arg Val Cys Ala Cys
 725 730 735
 Val Trp Met Met Met Leu Ile Val Gln Ala Glu Ala Ala Leu Glu Asn
 740 745 750
 Leu Val Val Leu Asn Ala Ala Ser Val Ala Gly Glu His Gly Ile Leu
 755 760 765
 Ser Phe Leu Val Phe Phe Cys Ala Ala Trp Tyr Ile Lys Gly Arg Leu
 770 775 780
 Val Pro Gly Ala Thr Tyr Ala Phe Tyr Ser Val Trp Pro Leu Leu Leu
 785 790 795 800
 Leu Leu Leu Ala Leu Pro Pro Arg Ala Tyr Ala Met Asp Arg Glu Thr
 805 810 815
 Ala Ala Ser Cys Gly Gly Ala Val Phe Val Gly Leu Ala Leu Leu Thr
 820 825 830
 Leu Ser Pro His Tyr Lys Glu Leu Leu Ala Lys Leu Ile Trp Trp Leu
 835 840 845
 Gln Tyr Leu Ile Thr Arg Ala Glu Ala Gln Leu Gln Val Trp Val Pro
 850 855 860
 Pro Leu Asn Val Arg Gly Gly Arg Asp Ala Ile Ile Leu Leu Thr Cys
 865 870 875 880
 Met Val His Pro Glu Leu Ile Phe Asp Ile Thr Lys Ile Leu Leu Ala
 885 890 895

Ile Leu Gly Pro Leu Met Val Leu Gln Ala Ser Ile Thr Lys Met Pro
 900 905 910

Tyr Phe Val Arg Ala Gln Gly Leu Ile Arg Ala Cys Ala Leu Val Arg
 915 920 925

Lys Ala Ala Gly Gly His Tyr Val Gln Met Ala Leu Met Lys Leu Ala
 930 935 940

Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Tyr Asp His Leu Thr Pro Leu Arg Asp
 945 950 955 960

Trp Ala His Ser Gly Leu Arg Asp Leu Ala Val Ala Val Glu Pro Val
 965 970 975

Val Phe Ser Asp Met Glu Thr Lys Ile Ile Thr Trp Gly Ala Asp Thr
 980 985 990

Ala Ala Cys Gly Asp Ile Ile Ser Gly Leu Pro Val Ser Ala Arg Arg
 995 1000 1005

Gly Arg Glu Ile Leu Leu Gly Pro Ala Asp Ser Phe Glu Gly Gln
 1010 1015 1020

Gly Trp Arg Leu Leu Ala Pro Ile Thr Ala Tyr Ala Gln Gln Thr
 1025 1030 1035

Arg Gly Leu Leu Gly Cys Ile Ile Thr Ser Leu Thr Gly Arg Asp
 1040 1045 1050

Lys Asn Gln Val Glu Gly Glu Val Gln Val Val Ser Thr Ala Thr
 1055 1060 1065

Gln Ser Phe Leu Ala Thr Cys Val Asn Gly Val Cys Trp Thr Val
 1070 1075 1080

Phe His Gly Ala Gly Ser Lys Thr Leu Ala Gly Pro Lys Gly Pro
 1085 1090 1095

Val Thr Gln Met Tyr Thr Asn Val Asp Gln Asp Leu Val Gly Trp
 1100 1105 1110

Gln Ala Pro Pro Gly Ala Arg Ser Leu Thr Pro Cys Thr Cys Gly
 1115 1120 1125

Ser Ser Asp Leu Tyr Leu Val Thr Arg His Ala Asp Val Ile Pro
 1130 1135 1140

Val Arg Arg Arg Gly Asp Ser Arg Gly Ser Leu Leu Ser Pro Arg
 1145 1150 1155

Pro Val Ser Tyr Leu Lys Gly Ser Ser Gly Gly Pro Leu Leu Cys
 1160 1165 1170

Ser Ser Gly His Ala Val Gly Ile Phe Arg Ala Ala Val Cys Thr
 1175 1180 1185

Arg Gly Val Ala Lys Ala Val Asp Phe Val Pro Val Glu Ser Met
 1190 1195 1200

Glu Thr Thr Met Arg Ser Pro Val Phe Thr Asp Asn Ser Ser Pro
 1205 1210 1215

Pro Ala Val Pro Gln Thr Phe Gln Val Ala His Leu His Ala Pro
 1220 1225 1230

Thr Gly Ser Gly Lys Ser Thr Lys Val Pro Ala Ala Tyr Ala Ala
 1235 1240 1245

Gln Gly Tyr Lys Val Leu Val Leu Asn Pro Ser Val Ala Ala Thr
 1250 1255 1260

Leu Ser Phe Gly Ala Tyr Met Ser Lys Ala His Gly Val Asp Pro
 1265 1270 1275

Asn Ile Arg Thr Gly Val Arg Thr Ile Thr Thr Gly Ala Pro Ile
 1280 1285 1290

Thr Tyr Ser Thr Tyr Gly Lys Phe Leu Ala Asp Gly Gly Cys Ser
 1295 1300 1305

Gly Gly Ala Tyr Asp Ile Ile Ile Cys Asp Glu Cys His Ser Ile
 1310 1315 1320

Asp Ser Thr Ser Ile Leu Gly Ile Gly Thr Val Leu Asp Gln Ala
 1325 1330 1335

Glu Thr Ala Gly Ala Arg Leu Val Val Leu Ala Thr Ala Thr Pro
 1340 1345 1350

Pro Gly Ser Val Thr Val Pro His Pro Asn Ile Glu Glu Val Ala
 1355 1360 1365

Leu Ser Asn Thr Gly Glu Ile Pro Phe Tyr Gly Lys Ala Ile Pro
 1370 1375 1380

Ile Glu Thr Ile Lys Gly Gly Arg His Leu Ile Phe Cys His Ser
 1385 1390 1395

Lys Lys Lys Cys Asp Glu Ile Ala Ala Lys Leu Ser Ser Leu Gly
 1400 1405 1410

Leu Asn Ala Val Ala Tyr Tyr Arg Gly Leu Asp Val Ser Val Ile
 1415 1420 1425
 Pro Thr Ser Gly Asn Val Val Val Ala Thr Asp Ala Leu Met
 1430 1435 1440
 Thr Gly Phe Thr Gly Asp Phe Asp Ser Val Ile Asp Cys Asn Thr
 1445 1450 1455
 Cys Val Thr Gln Thr Val Asp Phe Ser Leu Asp Pro Thr Phe Thr
 1460 1465 1470
 Ile Glu Thr Thr Thr Val Pro Gln Asp Ala Val Ser Arg Ser Gln
 1475 1480 1485
 Arg Arg Gly Arg Thr Gly Arg Gly Arg Arg Gly Ile Tyr Arg Phe
 1490 1495 1500
 Val Thr Pro Gly Glu Arg Pro Ser Gly Met Phe Asp Ser Ser Val
 1505 1510 1515
 Leu Cys Glu Cys Tyr Asp Ala Gly Cys Ala Trp Tyr Glu Leu Thr
 1520 1525 1530
 Pro Ala Glu Thr Ser Val Arg Leu Arg Ala Tyr Leu Asn Thr Pro
 1535 1540 1545
 Gly Leu Pro Val Cys Gln Asp His Leu Glu Phe Trp Glu Ser Val
 1550 1555 1560
 Phe Thr Gly Leu Thr His Ile Asp Ala His Phe Leu Ser Gln Thr
 1565 1570 1575
 Lys Gln Ala Gly Asp Asn Phe Pro Tyr Leu Val Ala Tyr Gln Ala
 1580 1585 1590
 Thr Val Cys Ala Arg Ala Gln Ala Pro Pro Pro Ser Trp Asp Gln
 1595 1600 1605
 Met Trp Lys Cys Leu Ile Arg Leu Lys Pro Thr Leu His Gly Pro
 1610 1615 1620
 Thr Pro Leu Leu Tyr Arg Leu Gly Ala Val Gln Asn Glu Val Ile
 1625 1630 1635
 Leu Thr His Pro Ile Thr Lys Tyr Ile Met Ala Cys Met Ala Ala
 1640 1645 1650
 Asp Leu Glu Val Val Thr Ser Thr Trp Val Leu Val Gly Gly Val
 1655 1660 1665

Leu Ala Ala Leu Ala Ala Tyr Cys Leu Thr Thr Gly Ser Val Val
 1670 1675 1680
 Ile Val Gly Arg Ile Ile Leu Ser Gly Lys Pro Ala Val Ile Pro
 1685 1690 1695
 Asp Arg Glu Val Leu Tyr Arg Glu Phe Asp Glu Met Glu Glu Cys
 1700 1705 1710
 Ala Ser His Leu Pro Tyr Ile Glu Gln Gly Met Gln Leu Ala Glu
 1715 1720 1725
 Gln Phe Lys Gln Lys Ala Leu Gly Leu Leu Gln Thr Ala Thr Lys
 1730 1735 1740
 Gln Ala Glu Ala Ala Ala Pro Val Val Glu Ser Lys Trp Arg Ala
 1745 1750 1755
 Leu Glu Thr Phe Trp Ala Lys His Met Trp Asn Phe Ile Ser Gly
 1760 1765 1770
 Ile Gln Tyr Leu Ala Gly Leu Ser Thr Leu Pro Gly Asn Pro Ala
 1775 1780 1785
 Ile Ala Ser Leu Met Ala Phe Thr Ala Ser Ile Thr Ser Pro Leu
 1790 1795 1800
 Thr Thr Gln His Thr Leu Leu Phe Asn Ile Leu Gly Gly Trp Val
 1805 1810 1815
 Ala Ala Gln Leu Ala Pro Pro Ser Ala Ala Ser Ala Phe Val Gly
 1820 1825 1830
 Ala Gly Ile Ala Gly Ala Ala Val Gly Ser Ile Gly Leu Gly Lys
 1835 1840 1845
 Val Leu Val Asp Ile Leu Ala Gly Tyr Gly Ala Gly Val Ala Gly
 1850 1855 1860
 Ala Leu Val Ala Phe Lys Val Met Ser Gly Glu Met Pro Ser Thr
 1865 1870 1875
 Glu Asp Leu Val Asn Leu Leu Pro Ala Ile Leu Ser Pro Gly Ala
 1880 1885 1890
 Leu Val Val Gly Val Val Cys Ala Ala Ile Leu Arg Arg His Val
 1895 1900 1905
 Gly Pro Gly Glu Gly Ala Val Gln Trp Met Asn Arg Leu Ile Ala
 1910 1915 1920

Phe Ala Ser Arg Gly Asn His Val Ser Pro Thr His Tyr Val Pro
 1925 1930 1935

Glu Ser Asp Ala Ala Ala Arg Val Thr Gln Ile Leu Ser Ser Leu
 1940 1945 1950

Thr Ile Thr Gln Leu Leu Lys Arg Leu His Gln Trp Ile Asn Glu
 1955 1960 1965

Asp Cys Ser Thr Pro Cys Ser Gly Ser Trp Leu Arg Asp Val Trp
 1970 1975 1980

Asp Trp Ile Cys Thr Val Leu Thr Asp Phe Lys Thr Trp Leu Gln
 1985 1990 1995

Ser Lys Leu Leu Pro Arg Leu Pro Gly Val Pro Phe Phe Ser Cys
 2000 2005 2010

Gln Arg Gly Tyr Lys Gly Val Trp Arg Gly Asp Gly Ile Met Gln
 2015 2020 2025

Thr Thr Cys Pro Cys Gly Ala Gln Ile Thr Gly His Val Lys Asn
 2030 2035 2040

Gly Ser Met Arg Ile Ile Gly Pro Lys Thr Cys Ser Asn Thr Trp
 2045 2050 2055

His Gly Thr Phe Pro Ile Asn Ala Tyr Thr Thr Gly Pro Cys Thr
 2060 2065 2070

Pro Ser Pro Ala Pro Asn Tyr Ser Arg Ala Leu Trp Arg Val Ala
 2075 2080 2085

Ala Glu Glu Tyr Val Glu Val Thr Arg Val Gly Asp Phe His Tyr
 2090 2095 2100

Val Thr Gly Met Thr Thr Asp Asn Leu Lys Cys Pro Cys Gln Val
 2105 2110 2115

Pro Ala Pro Glu Phe Tyr Thr Glu Val Asp Gly Val Arg Leu His
 2120 2125 2130

Arg Tyr Ala Pro Ala Cys Lys Pro Leu Leu Arg Glu Glu Val Thr
 2135 2140 2145

Phe Leu Val Gly Leu Asn Glu Tyr Pro Val Gly Ser Gln Leu Pro
 2150 2155 2160

Cys Glu Pro Glu Pro Asp Val Thr Val Leu Ala Ser Met Leu Thr
 2165 2170 2175

Asp Pro Ser His Ile Thr Ala Glu Thr Ala Lys Arg Arg Leu Ala
 2180 2185 2190
 Arg Gly Ser Pro Pro Ser Leu Ala Ser Ser Ser Ala Ser Gln Leu
 2195 2200 2205
 Ser Ala Pro Ser Leu Lys Ala Thr Cys Thr Thr Asn His Asp Ser
 2210 2215 2220
 Pro Asp Ala Asp Leu Ile Glu Ala Asn Leu Leu Trp Arg Gln Glu
 2225 2230 2235
 Met Gly Gly Asn Ile Thr Arg Val Glu Ser Glu Asn Lys Val Val
 2240 2245 2250
 Ile Leu Asp Ser Phe Asp Pro Leu Arg Ala Glu Glu Asp Glu Arg
 2255 2260 2265
 Glu Val Ser Ile Pro Ala Glu Ile Leu Arg Lys Ser Lys Lys Phe
 2270 2275 2280
 Pro Ser Ala Met Pro Val Trp Ala Arg Pro Asp Tyr Asn Pro Pro
 2285 2290 2295
 Leu Leu Glu Ser Trp Lys Ser Pro Asp Tyr Val Pro Pro Val Val
 2300 2305 2310
 His Gly Cys Pro Leu Pro Pro Ala Lys Ala Pro Pro Val Pro Pro
 2315 2320 2325
 Pro Arg Arg Lys Arg Thr Val Val Leu Thr Glu Ser Thr Val Ser
 2330 2335 2340
 Ser Ala Leu Ala Glu Leu Ala Thr Lys Thr Phe Ser Ser Ser Glu
 2345 2350 2355
 Ser Ser Ala Val Asp Ser Gly Thr Ala Thr Ala Pro Pro Asp Gln
 2360 2365 2370
 Pro Leu Asp Asp Gly Asp Ala Gly Ser Asp Ala Gly Ser Tyr Ser
 2375 2380 2385
 Ser Met Pro Pro Leu Glu Gly Glu Pro Gly Asp Pro Asp Leu Ser
 2390 2395 2400
 Asp Gly Ser Trp Ser Thr Val Ser Glu Glu Ala Ser Glu Asp Val
 2405 2410 2415
 Val Cys Cys Ser Met Ser Tyr Thr Trp Thr Gly Ala Leu Ile Thr
 2420 2425 2430

Pro Cys Ala Ala Glu Glu Ser Lys Leu Pro Ile Asn Ala Leu Ser
 2435 2440 2445
 Asn Ser Leu Leu Arg His His Asn Met Val Tyr Ala Thr Thr Ser
 2450 2455 2460
 Arg Ser Ala Ser Gln Arg Gln Lys Lys Val Thr Phe Asp Arg Leu
 2465 2470 2475
 Gln Val Leu Asp Asp His Tyr Arg Asp Val Leu Lys Glu Met Lys
 2480 2485 2490
 Ala Lys Ala Ser Thr Val Lys Ala Lys Leu Leu Ser Val Glu Glu
 2495 2500 2505
 Ala Cys Lys Leu Thr Pro Pro His Ser Ala Arg Ser Lys Phe Gly
 2510 2515 2520
 Tyr Gly Ala Lys Asp Val Arg Asn Leu Ser Ser Lys Ala Val Asn
 2525 2530 2535
 His Ile His Ser Val Trp Lys Asp Leu Leu Glu Asp Ser Glu Thr
 2540 2545 2550
 Pro Ile Asp Thr Thr Ile Met Ala Lys Asn Glu Val Phe Cys Val
 2555 2560 2565
 Gln Pro Glu Lys Gly Gly Arg Lys Pro Ala Arg Leu Ile Val Tyr
 2570 2575 2580
 Pro Asp Leu Gly Val Arg Val Cys Glu Lys Met Ala Leu Tyr Asp
 2585 2590 2595
 Val Val Ser Thr Leu Pro Gln Ala Val Met Gly Ser Ser Tyr Gly
 2600 2605 2610
 Phe Gln Tyr Ser Pro Gly Gln Arg Val Glu Phe Leu Val Asn Ala
 2615 2620 2625
 Trp Lys Ser Lys Lys Cys Pro Met Gly Phe Ala Tyr Asp Thr Arg
 2630 2635 2640
 Cys Phe Asp Ser Thr Val Thr Glu Ser Asp Ile Arg Val Glu Glu
 2645 2650 2655
 Ser Ile Tyr Gln Cys Cys Asp Leu Ala Pro Glu Ala Arg Gln Ala
 2660 2665 2670
 Ile Arg Ser Leu Thr Glu Arg Leu Tyr Val Gly Gly Pro Leu Thr
 2675 2680 2685

Asn Ser Lys Gly Gln Asn Cys Gly Tyr Arg Arg Cys Arg Ala Ser
 2690 2695 2700

Gly Val Leu Thr Thr Ser Cys Gly Asn Thr Leu Thr Cys Tyr Leu
 2705 2710 2715

Lys Ala Ser Ala Ala Cys Arg Ala Ala Lys Leu Gln Asp Cys Thr
 2720 2725 2730

Met Leu Val Cys Gly Asp Asp Leu Val Val Ile Cys Glu Ser Ala
 2735 2740 2745

Gly Thr Gln Glu Asp Ala Ala Ser Leu Arg Val Phe Thr Glu Ala
 2750 2755 2760

Met Thr Arg Tyr Ser Ala Pro Pro Gly Asp Pro Pro Gln Pro Glu
 2765 2770 2775

Tyr Asp Leu Glu Leu Ile Thr Ser Cys Ser Ser Asn Val Ser Val
 2780 2785 2790

Ala His Asp Ala Ser Gly Lys Arg Val Tyr Tyr Leu Thr Arg Asp
 2795 2800 2805

Pro Thr Thr Pro Leu Ala Arg Ala Ala Trp Glu Thr Ala Lys His
 2810 2815 2820

Thr Pro Val Asn Ser Trp Leu Gly Asn Ile Ile Met Tyr Ala Pro
 2825 2830 2835

Thr Leu Trp Ala Arg Met Ile Leu Met Thr His Phe Phe Ser Ile
 2840 2845 2850

Leu Leu Ala Gln Glu Gln Leu Glu Lys Ala Leu Asp Cys Gln Ile
 2855 2860 2865

Tyr Gly Ala Cys Tyr Ser Ile Glu Pro Leu Asp Leu Pro Gln Ile
 2870 2875 2880

Ile Gln Arg Leu His Gly Leu Ser Ala Phe Ser Leu His Ser Tyr
 2885 2890 2895

Ser Pro Gly Glu Ile Asn Arg Val Ala Ser Cys Leu Arg Lys Leu
 2900 2905 2910

Gly Val Pro Pro Leu Arg Thr Trp Arg His Arg Ala Arg Ser Val
 2915 2920 2925

Arg Ala Lys Leu Leu Ser Gln Gly Gly Arg Ala Ala Ile Cys Gly
 2930 2935 2940

Lys Tyr Leu Phe Asn Trp Ala Val Arg Thr Lys Leu Lys Leu Thr
 2945 2950 2955

Pro Ile Pro Ala Ala Ser Arg Leu Asp Leu Ser Gly Trp Phe Val
 2960 2965 2970

Ala Gly Tyr Gly Gly Gly Asp Ile Tyr His Ser Val Ser Arg Ala
 2975 2980 2985

Arg Pro Arg Trp Phe Met Trp Cys Leu Leu Leu Leu Ser Val Gly
 2990 2995 3000

Val Gly
 3005

REIVINDICACIONES

1. Un análisis para identificar una mutación en el genoma de un HCV presente en una muestra, comprendiendo el análisis las etapas sucesivas de:

- 5 a) extracción del ARN viral procedente de la muestra que contiene el HCV;
- b) determinación del genotipo y el subtipo del HCV;
- 10 c) síntesis de los ADNc parciales del genoma del HCV en tres reacciones de transcripción inversa separadas, la primera reacción de transcripción inversa se inicia a partir de un primer cebador antisentido externo seleccionado para hibridar específicamente con una secuencia de la UTR 3' de un genoma de HCV prototipo del mismo genotipo y subtipo, la segunda reacción de transcripción inversa se inicia a partir de un segundo cebador antisentido externo seleccionado para que hibride específicamente con una secuencia de la región NS4B-NS5A del genoma del HCV prototipo y la tercera reacción de transcripción inversa se inicia a partir de un tercer cebador antisentido externo seleccionado para que hibride específicamente con una secuencia de la región NS2 del genoma del HCV prototipo;
- 15 d) síntesis de la segunda hebra y amplificación de los ADNc parciales de la etapa c) en tres reacciones de PCR separadas, comprendiendo la primera reacción de PCR una alícuota de la primera reacción de transcripción inversa, el primer cebador antisentido externo y un primer cebador efector externo seleccionado para que hibride específicamente con una secuencia complementaria de la región NS4B-NS5A del genoma del HCV prototipo, comprendiendo la segunda reacción de PCR una alícuota de la segunda reacción de transcripción inversa, el segundo cebador antisentido externo y un segundo cebador efector externo seleccionado para que hibride específicamente con una secuencia complementaria de la región NS2 del genoma del HCV prototipo, y comprendiendo la tercera reacción de PCR una alícuota de la tercera reacción de transcripción inversa, el tercer cebador antisentido externo y un tercer cebador efector externo seleccionado para que hibride específicamente con una secuencia complementaria de la región UTR 5' del genoma del HCV prototipo, donde el segundo cebador antisentido externo hibrida con una secuencia de la región NS4B-NS5A del genoma del HCV prototipo que está localizada 3' con respecto a la región que es complementaria al primer cebador efector externo y donde el tercer cebador antisentido externo hibrida con una secuencia de la región NS2 del genoma del HCV prototipo que está localizada 3' con respecto a la región que es complementaria al segundo cebador efector externo;
- 20 e) amplificación adicional de los ADNc parciales de la etapa d) en tres reacciones de PCR anidadas separadas, comprendiendo la primera reacción de PCR anidada una alícuota de la primera reacción de PCR y los primeros cebadores antisentido y efector internos, comprendiendo la segunda reacción de PCR anidada una alícuota de la segunda reacción de PCR y los segundos cebadores antisentido y efector internos, y comprendiendo la tercera reacción de PCR anidada una alícuota de la tercera reacción de PCR y los terceros cebadores antisentido y efector internos, donde los cebadores internos no se solapan con los cebadores externos, el segundo cebador antisentido interno hibrida con una secuencia de la región NS4B-NS5A del genoma del HCV prototipo que está localizada 3' con respecto a la región que es complementaria al primer cebador efector interno y el tercer cebador antisentido interno hibrida con una secuencia de la región NS2 del genoma del HCV prototipo que está localizada 3' con respecto a la región que es complementaria al segundo cebador efector interno;
- 25 f) análisis de la secuencia de los ADNc adicionalmente amplificados de la etapa e); y g) comparación de las secuencias obtenidas a partir de la etapa f) con la del HCV prototipo.
- 30
- 35
- 40
- 45

2. Un análisis capaz de identificar y caracterizar mutaciones individuales y ligadas en un genoma de una variante de HCV resistente a un fármaco anti-HCV, comprendiendo el análisis las etapas sucesivas de:

- 50 a) extracción del ARN viral a partir de una muestra tomada de un sujeto que porta un HCV que es resistente a un fármaco o un fármaco o combinación de fármacos anti-HCV con los cuales se ha tratado el sujeto como indica el fracaso del tratamiento;
- b) determinación del genotipo y el subtipo del HCV;
- 55 c) síntesis de los ADNc parciales del genoma del HCV en tres reacciones de transcripción inversa separadas, la primera reacción de transcripción inversa se inicia a partir un primer cebador antisentido externo seleccionado para que hibride específicamente con una secuencia de la UTR 3' de un genoma de HCV prototipo del mismo genotipo y subtipo, la segunda reacción de transcripción inversa se inicia a partir de un segundo cebador antisentido externo seleccionado para que hibride específicamente con una secuencia de la región NS4B-NS5A del genoma del HCV prototipo y la tercera reacción de transcripción inversa se inicia a partir de un tercer cebador antisentido externo seleccionado para que hibride específicamente con una secuencia de la región NS2 del genoma de HCV prototipo;
- 60 d) síntesis de la segunda hebra y amplificación de los ADNc parciales de la etapa c) en tres reacciones de PCR separadas, comprendiendo la primera reacción de PCR una alícuota de la primera reacción de transcripción inversa,

- el primer cebador antisentido externo y un primer cebador efector externo seleccionado para que hibride específicamente con una secuencia complementaria de la región NS4B-NS5A del genoma del HCV prototipo, comprendiendo la segunda reacción de PCR una alícuota de la segunda reacción de transcripción inversa, el segundo cebador antisentido externo y un segundo cebador efector externo seleccionado para que hibride específicamente con una secuencia complementaria en la región NS2 del genoma del HCV prototipo, y comprendiendo la tercera reacción de PCR una alícuota de la tercera reacción de transcripción inversa, el tercer cebador antisentido externo y un tercer cebador efector externo seleccionado para que hibride específicamente con una secuencia complementaria de la región UTR 5' del genoma del HCV prototipo, donde el segundo cebador antisentido externo hibrida con una secuencia de la región NS4B-NS5A del genoma del HCV prototipo que está localizada 3' con respecto a la región que es complementaria al primer cebador efector externo y donde el tercer cebador antisentido externo hibrida con una secuencia de la región NS2 del genoma del HCV prototipo que está localizada 3' con respecto a la región que es complementaria al segundo cebador efector externo;
- e) amplificación adicional de los ADNc parciales de la etapa d) en tres reacciones de PCR anidadas separadas, comprendiendo la primera reacción de PCR anidada una alícuota de la primera reacción de PCR y los primeros cebadores antisentido y efector internos, comprendiendo la segunda reacción de PCR anidada una alícuota de la segunda reacción de PCR y los segundos cebadores antisentido y efector internos, y comprendiendo la tercera reacción de PCR anidada una alícuota de la tercera reacción de PCR y los terceros cebadores antisentido y efector internos, donde los cebadores internos no se solapan con los cebadores externos, el segundo cebador antisentido interno hibrida con una secuencia de la región NS4B-NS5A del genoma del HCV prototipo que está localizada 3' con respecto a la región que es complementaria al primer cebador efector interno y el tercer cebador antisentido interno hibrida con una secuencia de la región NS2 del genoma del HCV prototipo que está localizada 3' con respecto a la región que es complementaria al segundo cebador efector interno;
- f) análisis de la secuencia de los ADNc adicionalmente amplificados de la etapa e);
- g) comparación de las secuencias obtenidas a partir de la etapa f) con la del HCV prototipo e identificación de mutaciones; y
- h) introducción de las mutaciones identificadas en un banco de datos de mutaciones de HCV asociadas con la resistencia a fármacos anti-HCV.
3. El análisis de la reivindicación 2, donde la etapa h) consiste en una búsqueda en el banco de datos de las mutaciones de HCV asociadas con la resistencia a fármacos anti-HCV de las mutaciones identificadas y una selección del tratamiento subsiguiente del sujeto con un fármaco o combinación de fármacos anti-HCV a los cuales no se espera que sea resistente el HCV.
4. El análisis de la reivindicación 3, donde la muestra se toma de un sujeto infectado con HCV antes del comienzo de cualquier terapia farmacológica del sujeto.
5. El análisis de la reivindicación 5, que comprende las etapas sucesivas de:
- a) extracción del ARN viral a partir de la muestra que contiene el HCV;
- b) determinación del genotipo y el subtipo del HCV;
- c) siempre que la etapa b) indique que el HCV es de tipo 1b, síntesis de los ADNc parciales del genoma del HCV en tres reacciones de transcripción inversa separadas, la primera reacción de transcripción inversa se inicia a partir de un cebador poli-A, la segunda reacción de transcripción inversa se inicia a partir de un cebador HCV1bOR6312 (SEQ ID: 2) y la tercera reacción de transcripción inversa se inicia a partir del cebador HCV1bOR3306 (SEQ ID: 3);
- d) síntesis de la segunda hebra y amplificación de los ADNc parciales de la etapa c) en tres reacciones de PCR separadas, comprendiendo la primera reacción de PCR una alícuota de la primera reacción de transcripción inversa y el par de cebadores poli-A/HCV1bOF6074 (SEQ IDs: 1 y 4), comprendiendo la segunda reacción de PCR una alícuota de la segunda reacción de transcripción inversa y el par de cebadores HCV1bOR6312 (SEQ ID: 2)/HCV1bOF1977 (SEQ ID: 5) y comprendiendo la tercera reacción de PCR una alícuota de la tercera reacción de transcripción inversa y el par de cebadores HCV1bOR3306/HCVOF129 (SEQ ID: 6);
- e) amplificación adicional de los ADNc parciales de la etapa d) en tres reacciones de PCR anidadas separadas, comprendiendo la primera reacción de PCR anidada una alícuota de la primera reacción de PCR y el par de cebadores HCV1bIR9339 (SEQ ID: 7)/HCV1bIF6126 (SEQ ID: 10), comprendiendo la segunda reacción de PCR anidada una alícuota de la segunda reacción de PCR y el par de cebadores HCV1bIR6282 (SEQ ID: 8)/HCV1bIF2523 (SEQ ID: 11), y comprendiendo la tercera reacción de PCR anidada una alícuota de la tercera reacción de PCR y el par de cebadores HCV1 bIR2770 (SEQ ID: 9)/HCVIF278 (SEQ ID: 12);

- f) análisis de la secuencia de los ADNc adicionalmente amplificados de la etapa e); y
- 5 g) comparación de las secuencias obtenidas a partir de la etapa f) con la de un HCV1b prototipo.
6. El análisis de la reivindicación 2, que comprende las etapas sucesivas de:
- 10 a) extracción del ARN viral procedente de una muestra tomada de un sujeto que alberga un HCV que es resistente a un fármaco o combinación de fármacos anti-HCV con el cual se ha tratado al sujeto;
- 15 b) determinación del genotipo y el subtipo del HCV;
- c) siempre que la etapa b) indique que el HCV es de tipo 1b, síntesis de los ADNc parciales del genoma del HCV en tres reacciones de transcripción inversa separadas, la primera reacción de transcripción inversa se inicia a partir de un cebador poli-A, la segunda reacción de transcripción inversa se inicia a partir del cebador HCV1bOR6312 y la tercera reacción de transcripción inversa se inicia a partir del cebador HCV1bOR3306;
- 20 d) síntesis de la segunda hebra y amplificación de los ADNc parciales de la etapa c) en tres reacciones de PCR separadas, comprendiendo la primera reacción de PCR una alícuota de la primera reacción de transcripción inversa y el par de cebadores poli-A/HCV1bOF6074, comprendiendo la segunda reacción de PCR una alícuota de la segunda reacción de transcripción inversa y el par de cebadores HCV1bOR6312/HCV1bOF1977 y comprendiendo la tercera reacción de PCR una alícuota de la tercera reacción de transcripción inversa y el par de cebadores HCV1bOR3306/HCVOF129;
- 25 e) amplificación adicional de los ADNc parciales de la etapa d) en tres reacciones de PCR anidadas separadas, comprendiendo la primera reacción de PCR anidada una alícuota de la primera reacción de PCR y el par de cebadores HCV1bIR9339/HCV1bIF6126, comprendiendo la segunda reacción de PCR anidada una alícuota de la segunda reacción de PCR y el par de cebadores HCV1bIR6282/HCV1bIF2523, y comprendiendo la tercera reacción de PCR anidada una alícuota de la tercera reacción de PCR y el par de cebadores HCV1bIR2770/HCVIF278;
- 30 f) análisis de la secuencia de los ADNc adicionalmente amplificados de la etapa e);
- g) comparación de las secuencias obtenidas a partir de la etapa f) con la del HCV 1b prototipo e identificación de las mutaciones; y
- 35 h) introducción de las mutaciones identificadas en un banco de datos de mutaciones de HCV asociadas con la resistencia a un fármaco anti-HCV.
- 40 7. El análisis de la reivindicación 6, donde la etapa h) consiste en una búsqueda en un banco de datos de mutaciones de HCV asociadas con la resistencia a un fármaco anti-HCV de las mutaciones identificadas y selección del tratamiento subsiguiente del sujeto con un fármaco o una combinación de fármacos anti-HCV a los cuales no se espera que sea resistente el HCV.
- 45 8. El análisis de la reivindicación 7, donde la muestra se toma de un sujeto infectado con HCV antes del comienzo de cualquier terapia farmacológica del sujeto.
9. Un par de cebadores que consiste en poli-A y HCV1bOF6074.
- 50 10. Un par de cebadores que consiste en HCV1bOR6312 y HCV1bOF1977.
11. Un par de cebadores que consiste en HCV1bOR3306 y HCVOF129.
12. Un par de cebadores que consiste en HCV1bIR9339 y HCV1bIF6126.
- 55 13. Un par de cebadores que consiste en HCV1bIR6282 y HCV1bIF2523.
14. Un par de cebadores que consiste en HCV1bIR2770 y HCVIF278.
- 60 15. Un kit para la detección de mutaciones en un genoma de HCV, donde dicho kit comprende un par de cebadores de cualquiera de las reivindicaciones 9-14.
16. Un kit para la detección de mutaciones en un genoma de HCV, donde dicho kit comprende los pares de cebadores de las reivindicaciones 9-14.

Fig. 1

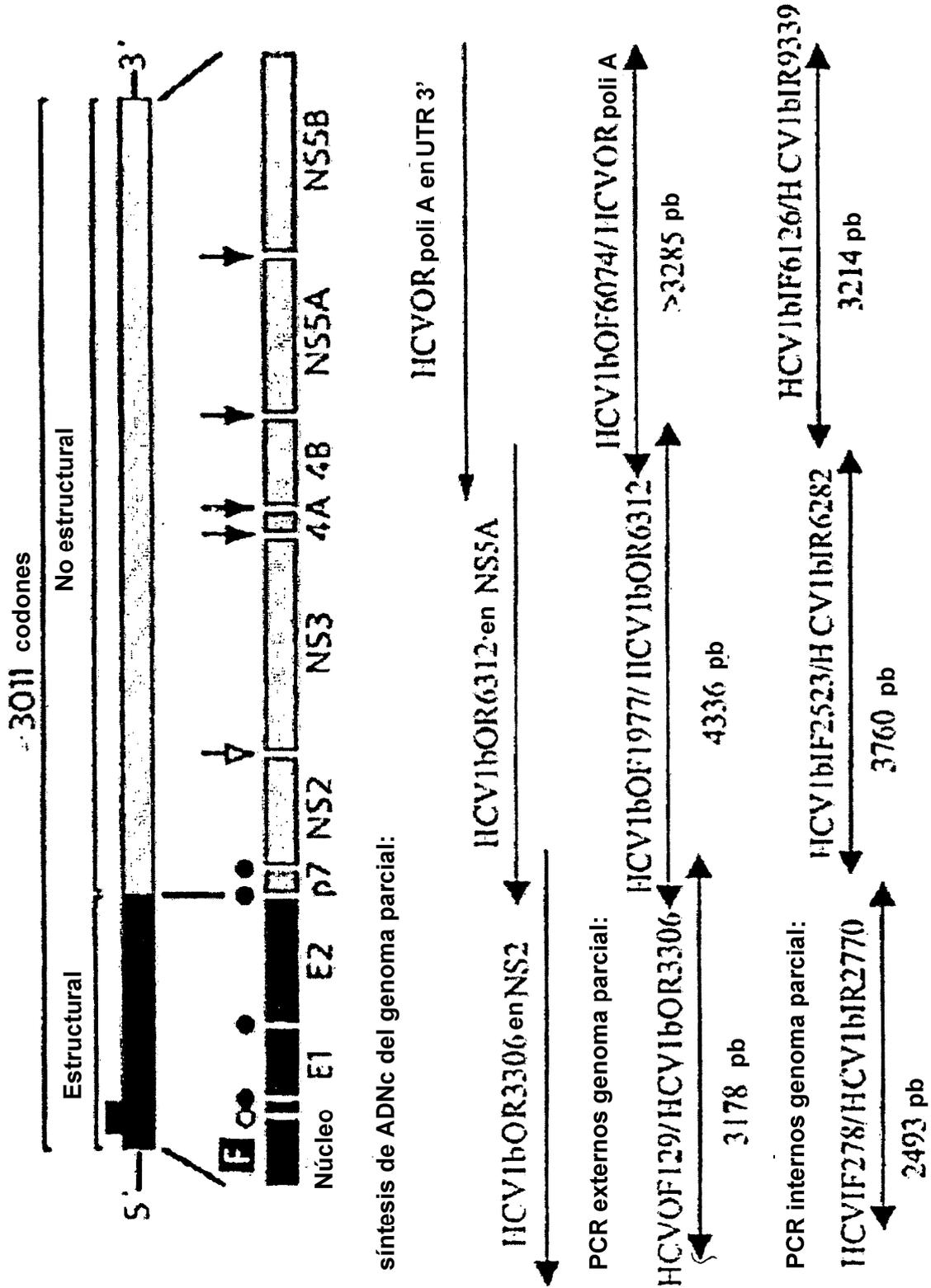


Fig. 2

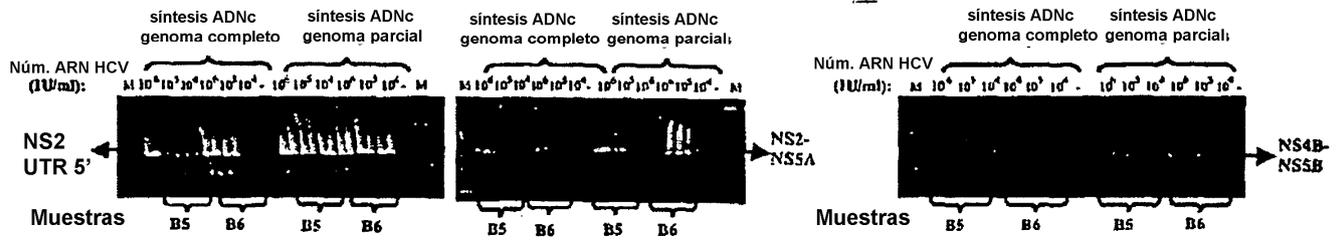


Fig. 3b

NS3
HCV1b ESVF TGLTHIDAHFLSOTKQAGDFPVLVAYQATVZCARQA PPPSHDQWKCIAI KLKPTLHGPTPLVRLVGNQNEVTTHTITKVMACHSADLEWVSTWLVGGVLAALMAYCLTGG 1678
5306 -----VI-----V-----I-----A-----A-----
5415 -----IL-----A-----
NS4B
HCV1b SWVI VGRRI LSGKPAI IPDREVLNREFDMECA SHLPY IEOEQVLAQEKOKAIGLQATKQAEAAAFVVESSKWPTELEAFMAKHWNFI SGIQYLVGLSLTGFNPALASIMAFASIT 1798
5306 -----V-----Q-----I-----V-----QA-----T-----
5415 -----V-----V-----A-----T-----
NS4A
HCV1b SPLTQHTLLEHLLGGVWAQIAPFSMASAFVCAETAGAVGSI GLGRVLDVILAGYAGVAGALVAFKVSQEMPTEDLVNLPAILSPGALVYGVVCAILRRHVGFEGAVQWNR 1918
5306 -----
5415 -----
NS5A
HCV1b LIAFASRGNHVSPTHYVESDAAARVTOILSILTITQLLKRHKWLNEDGCTPGSGSKLRDWDWI CTVAIDERTWLASKJLAPRLGPVFF SCQRGKGVWREGDIMGTCPOGAQITGH 2038
5306 -----A-----I-----H-----
5415 -----
HCV1b VNRGSHRI VGRFCSTNTHIGTFPIHAYTTGPTCPSPFNYSRALNRVMAREYVEVTRVGFIVYTGHTIDNVKPCQVPAPPEFFTEVDGVRIRHYAPACKPILARERVTFFVGLMAYQVNGS 2158
5306 -----K-----I-----I-----y-----
5415 -----I-----K-----I-----E-----P-----
NS5B
HCV1b QLECFEPDVAVLTSMITDPSHITAEITAKRRLARGSPPSLIASSASQLSAPSLKATCTTRHDSFDADLI EANLLWRQESGGHTRVESNKVVI LDFEFLQAEDEEREVSVP AEI LRRS 2278
5306 -----T-----A-----A-----AC-----H-----D-----H-----D-----R-----I-----K-----
5415 -----
HCV1b RKEPRAMP IWARDYRPLESNKDPQVPPVWVGGCLP PAKAPPI PPPRRKRWVLESYVSSALAEIATKTFCS SSVDSGTATASPDP SDDGDAGSDVESYSSMPPFLSCEPCDP 2398
5306 -----L-----V-----T-----D-----I-----P-----L-----N-----A-----
5415 -----K-----S-----V-----T-----S-----S-----L-----L-----AG-----
NS5B
HCV1b DLSDGWSVSEEA SEDVCCSSISTYTWGALITP CAABETKLPINALSHLHHNLVYATTSR SADRQKVT FDRQVLDH YRDLVKEMKAKASTVKA KLLSVEEACKLTPPHSARS 2518
5306 -----S-----N-----M-----Q-----I-----
5415 -----H-----S-----H-----Q-----
NS5B
HCV1b KEFYGAKDVRVLSKAVNHIRSVHKDLEDTETPIDTYIMARVETCVQBEKGRKPARLIVPDLGVRVCEKHALYDVVSTLQAVHSSYGFQYSPQRVDFLVNWKAKCKPHGFAY 2630
5306 -----Q-----S-----H-----Y-----P-----L-----S-----S-----B-----
5415 -----H-----S-----
NS5B
HCV1b DRCEDSVTENDI RVESYQCCLAPARQAIRSIVRRLYIGCF LTN SKGCKYRRCRAGVLITS CGNTLTCYLKAAACRRAKXLDQCTMIVCGDDLWVLCESNGTQDEASLRAF 2758
5306 -----S-----V-----V-----
5415 -----S-----V-----A-----
NS5B
HCV1b TEAMTRYSRPPGDPKPEYDLELITSCSSNVSVAMIDASGRVYVYICRDPPTPLA RAAMEZAHITPVNSWLANIHWYAFITMARNLHTIFFSTLJAQDQHEKALDCQIYGRCSYIEPIDI 2878
5306 -----Q-----
5415 -----Q-----
NS5B
HCV1b PQIQLHGLS AFSLIHSYSPGEINRVASCLRRLGVPPLRWRARARVAPRLLSQSFRATCGRYLFRWAVRTKLKPTIPANGQIDLS SHVAGYSGSDI YHLSLRARERWRNFCILSLVGVQIYLLPNR 3010
5306 -----K-----L-----K-----L-----G-----G-----
5415 -----T-----K-----I-----R-----G-----V-----
***** 3003
***** 3005