

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 373 642**

51 Int. Cl.:
C07H 21/00 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01937697 .9**
96 Fecha de presentación: **23.05.2001**
97 Número de publicación de la solicitud: **1296998**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.04.2003**

54 Título: **VARIANTES DE VHC.**

30 Prioridad:
23.05.2000 US 576989

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.02.2012

73 Titular/es:
**WASHINGTON UNIVERSITY
1 BROOKINGS DRIVE
ST. LOUIS, MO 63130, US**

72 Inventor/es:
**RICE, Charles M., III y
BLIGHT, Keril, J.**

74 Agente: **Pérez Barquín, Eliana**

ES 2 373 642 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

Variantes de VHC

(1) Campo de la invención.

5

La invención se refiere a materiales y a metodologías relacionadas con la producción y el uso de variantes del virus de la hepatitis C (VHC). Más específicamente, se proporcionan variantes del VHC que son útiles para el diagnóstico, terapia, vacunas y otros usos.

10 (2) Descripción de la técnica relacionada

Breve visión general del virus de la hepatitis C

Después del desarrollo de ensayos de diagnóstico para el virus de la hepatitis A y hepatitis B, se reconoció un agente adicional, que podía ser transmitido experimentalmente a chimpancés [Alter y col., *Lancet* 1.459-463 (1978); Hollinger y col., *Intervirology* 10, 60-68 (1978); Tabor y col., *Lancet* 1,463-466 (1978)], como la causa principal de la hepatitis adquirida por transfusión. En 1989 se describieron los clones de ADNc correspondientes al agente de la hepatitis no A, no B (NANB) causante, llamado virus de la hepatitis C (VHC) [Choo y col., *Science* 244, 359-362 (1989)]. Este descubrimiento ha llevado a rápidos avances en el diagnóstico, y a la comprensión de la epidemiología, patogénesis y virología molecular del VHC (para una revisión, Véase Houghton y col., *Curr. Stud. Hematol. Blood Transfus.* 61, 1-11 (1994); Houghton (1996), pág. 1035-1058 en *FIELDS VIROLOGY*, Fields y col., Eds., Raven Press, Philadelphia; Major y col., *Hepatology* 25, 1527-1538 (1997); Reed y Rice, pág. 1-37 en *HEPATITIS C VIRUS*, Reesink, Ed., Karger, Basel; Hagedorn y Rice (1999), *THE HEPATITIS C VIRUSES*, Springer, Berlín). Se encuentran pruebas de la infección por el VHC en todo el mundo, y la prevalencia de los anticuerpos específicos para el VHC está en el intervalo desde 0,4-2% en la mayoría de los países a más de 14% en Egipto [Hibbs y col., *J. Inf. Dis.* 168,789-790 (1993)]. Además de la transmisión por la sangre o los productos sanguíneos, o las vías sexual y congénita menos frecuentes, se producen casos esporádicos no asociadas a factores de riesgo conocidos y que dan cuenta de más de 40% de los casos de infección por el VHC [Alter y col., *J. Am. Med. Assoc.* 264, 2231-2235 (1990); Mast y Alter, *Semin. Virol.* 4, 273-283 (1993)]. Las infecciones normalmente son crónicas [Alter y col., *N. Eng. J. Med.* 327, 1899-1905 (1992)] y el desenlace clínico va desde un estado de vehículo no visible hasta la hepatitis aguda, hepatitis activa crónica y cirrosis, que está muy asociada al desarrollo del carcinoma hepatocelular.

Aunque se ha mostrado que el interferón (IFN)- α es útil para el tratamiento de una minoría de pacientes con infecciones crónicas por el VHC [Davis y col., *N. Engl. J. Med.* 321,1501 -1506 (1989); DiBisceglie y col., *New Engl. J. Med.* 321,1506-1510 (1989)] y las vacunas de subunidades parecen prometedoras en el modelo de chimpancé [Choo y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 1294-1298 (1994)], son necesarios más esfuerzos para desarrollar terapias y vacunas más eficaces (véase, p. ej., Tsambiras y col., 1999, Hepatitis C: Hope on the Horizon, Hepatitis C Symposium of 37th Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of America, revisado en http://www.medscape.com/medscape/cno/1999/IDSA/Story.cfm?story_id=913). La considerable diversidad observada entre los diferentes aislados del VHC [para una revisión, Véase Bukh y col., *Sem. Liver Dis.* 15, 41-63 (1995); Fanning y col., 2000, *Medscape Gastroenterology* 2:mg16558.fann], el surgimiento de variantes genéticas en individuos con infección crónica [Enomoto y col., *J. Hepatol.* 17,415-416(1993); Hijikata y col., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 175,220-228 (1991); Katoy col., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 189,119-127(1992); Kato y col., *J. Virol.* 67, 3923-3930 (1993); Kurosaki y col., *Hepatology* 18, 1293-1299 (1993); Lesniewski y col., *J. Med. Virol.* 40, 150-156 (1993); Ogata y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 3392-3396 (1991); Weiner y col., *Virology* 180, 842-848 (1991); Weiner y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 3468-3472 (1992)], y la falta de inmunidad protectora provocada después de infección por el VHC [Farci y col., *Science* 258, 135-140 (1992); Prince y col., *J. Infect. Dis.* 165, 438-443 (1992)] son los retos principales hacia estos objetivos.

50

Biología molecular del VHC

Clasificación. Basándose en su estructura genómica y las propiedades de virión, el VHC se ha clasificado como un género separado en la familia flavivirus, que incluye otros dos géneros: los flavivirus (p. ej., virus de la fiebre amarilla (YF)) y los pestivirus animales (p. ej., el virus de la diarrea vírica bovina (BVDV) y el virus de la fiebre porcina clásica (CSFV)) [Francki y col., *Arch. Virol. Suppl.* 2, 223 (1991)]. Todos los miembros de esta familia tienen viriones con envuelta que contienen un genoma de ARN de cadena positiva que codifica todas las proteínas de virus específicas

55

conocidas por traducción de un solo marco de lectura abierto (ORF) extenso.

Estructura y propiedades físicas del virión. Los estudios sobre la estructura y las propiedades físicas del virión del VHC se han visto dificultados por la falta de un sistema de cultivo celular que pudiera soportar la replicación vírica eficiente y por los títulos normalmente bajos de virus infecciosos presentes en el suero. El tamaño del virus infeccioso, basándose en experimentos de filtración, es entre 30-80 nm [Bradley y col., *Gastroenterology* 88, 773-779 (1985); He y col., *J. Infect. Dis.* 156, 636-640 (1987); Yuasa y col., *J. Gen. Virol.* 72, 2021-2024 (1991)]. Las mediciones iniciales de densidad de flotación del material infeccioso en sacarosa dieron un intervalo de valores, con la mayoría presente en una mezcla de densidad baja < 1,1 g/ml [Bradley y col., *J. Med. Virol.* 34, 206-208 (1991)]. Estudios posteriores han usado la RT/PCR para detectar el ARN específico del VHC como una medición indirecta del virus potencialmente infeccioso presente en el suero de seres humanos con infección crónica o chimpancés infectados experimentalmente. A partir de estos estudios, ha estado cada vez más claro que existe una heterogeneidad considerable entre las diferentes muestras clínicas, y que muchos factores pueden afectar al comportamiento de las partículas que contienen ARN de VHC [Hijikata y col., *J. Virol.* 67, 1953-1958 (1993); Thomssen y col., *Med. Microbiol. Immunol.* 181,293-300 (1992)]. Dichos factores incluyen la asociación con inmunoglobulinas [Hijikata y col., (1993) Véase antes] o lipoproteínas de baja densidad [Thomssen y col., 1992, Véase antes, Thomssen y col., *Med. Microbiol. Immunol.* 182, 329-334 (1993)]. En el suero de chimpancé en fase aguda muy infecciosa, el ARN específico del VHC normalmente se detecta en fracciones de densidad flotante baja (1,03-1,1 g/ml) [Carrick y col., *J. Virol. Meth.* 39, 279-289 (1992); Hijikata y col., (1993) Véase antes]. En otras muestras, la presencia de anticuerpos contra el VHC y la formación de complejos inmunitarios se correlaciona con partículas de mayor densidad y menor infectividad [Hijikata y col., (1993) Véase antes]. El tratamiento de las partículas con cloroformo, que destruye la infectividad [Bradley y col., *J. Infect. Dis.* 148,254-265 (1983); Feinstone y col., *Infect. Immun.* 41,816-821 (1983)], o con detergentes no iónicos, produjo partículas de mayor densidad que contenían ARN (1,17-1,25 g/ml) que se creyó que representaban nucleocápsidas del VHC [Hijikata y col., (1993) Véase antes, Kanto y col., *Hepatology* 19, 296-302 (1994); Miyamoto y col., *J. Gen Virol.* 73, 715-718 (1992)].

Ha habido descripciones de ARN específicos del VHC de sentido negativo en sueros y plasmas [véase, Fong y col., *Journal of Clinical Investigation* 88:1058-60 (1991)]. Sin embargo, no parece probable que dichos ARN sean componentes esenciales de las partículas infecciosas, puesto que algunos sueros con infectividad alta pueden tener niveles bajos o indetectables de ARN de cadena negativa [Shimizu y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6037-6041 (1993)].

La composición proteínica del virión no se ha determinado rigurosamente, pero las proteínas estructurales del VHC incluyen una proteína C básica y dos glicoproteínas de membrana, E1 y E2.

Replicación del VHC. Los primeros sucesos en la replicación del VHC se entienden poco. Un receptor de hepatocito puede ser CD81, que se une a la glicoproteína de la envuelta E2 (Pelery y col., 1998, *Science* 282:938-41). La asociación de algunas partículas de VHC con beta-lipoproteínas e inmunoglobulinas aumenta la posibilidad de que estas moléculas huésped puedan modular la absorción de virus y el tropismo tisular.

Los estudios que examinan la replicación del VHC se han restringido en su mayor parte a pacientes humanos o a chimpancés inoculados experimentalmente. En el modelo de chimpancé, el ARN del VHC se detecta en el suero tan pronto como 3 días después de la inoculación y persiste a través del máximo de los niveles de alanina aminotransferasa (ALT) en el suero (un indicador del daño hepático) [Shimizu y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6441-6444 (1990)]. Al comienzo de la viremia le sigue la aparición de marcas características indirectas de la infección del hígado por el VHC. Estas incluyen la aparición de un antígeno citoplasmático [Shimizu y col., (1990) Véase antes] y cambios ultraestructurales en los hepatocitos, tales como la formación de agregados microtubulares, por los cuales el VHC se denominó previamente el "agente de formación de túbulos" o "TFA" sensible al cloroformo [revisado por Bradley, *Prog. Med. Virol.* 37: 101-135 (1990)]. Como se muestra por la aparición de antígenos víricos [Blight y col., *Amer. J. Path.* 143: 1568-1573 (1993); Hiramatsu y col., *Hepatology* 16: 306-311 (1992); Krawczynski y col., *Gastroenterology* 103: 622-629 (1992); Yamada y col., *Digest. Dis. Sci.* 38: 882-887 (1993)] y la detección de ARN de sentido positivo y negativo [Fong y col., (1991) Véase antes, Gunji y col., *Arch. Virol.* 134:293-302 (1994); Haruna y col., *J. Hepatol.* 18:96-100 (1993); Lamas y col., *J. Hepatol.* 16: 219-223 (1992); Nouri Aria y col., *J. Clin. Inves.* 91; 2226-34 (1993); Sherker y col., *J. Med. Virol.* 39: 91-96 (1993); Takehara y col., *Hepatology* 15: 387-390 (1992); Tanaka y col., *Liver* 13: 203-208 (1993)], parece que los hepatocitos son el sitio principal de la replicación del VHC, en particular durante la infección aguda [Negro y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:2247-2251 (1992)]. En fases posteriores de la infección del VHC, la aparición de anticuerpos específicos para el VHC, la persistencia o resolución de la viremia, y la gravedad de la enfermedad hepática, varían mucho tanto en el modelo de chimpancé como en pacientes humanos (Fanning y col., Véase antes). Aunque se puede producir algún daño en el hígado

como consecuencia directa de la infección por el VHC y citopatogenicidad, el consenso que surge es que las respuestas inmunitarias del huésped, en particular los linfocitos T citotóxicos específicos de virus, pueden tener una función más dominante en la mediación del daño celular.

- 5 Se ha especulado que el VHC también puede replicarse en depósito(s) extrahepático(s). En algunos casos, la RT/PCR o la hibridación in situ, han mostrado una asociación del ARN del VHC con células mononucleares de la sangre periférica incluyendo linfocitos T, linfocitos B y monocitos [revisado en Blight y Gowans, *Viral Hepatitis Rev.* 1: 143-155 (1995)]. Dicho tropismo tisular podría ser importante para el establecimiento de infecciones crónicas y también podría tener una función en la asociación entre la infección por el VHC y algunas anomalías inmunológicas
 10 tales como la crioglobulinemia mixta [revisado por Ferri y col., *Eur. J. Clin. Invest.* 23:399-405 (1993)], glomerulonefritis, y los linfomas B no Hodgkin raros [Ferri y col., (1993) Véase antes, Kagawa y col., *Lancet* 341: 316-317(1993)]. Sin embargo, la detección de ARN de cadena negativa en la circulación en el suero, la dificultad de obtener la RT/PCR verdaderamente específica de cadena [Gunji y col., (1994) Véase antes], y el bajo número de células aparentemente infectadas, han hecho difícil obtener pruebas no ambiguas de la replicación en estos tejidos
 15 in vivo.

Estructura genómica. Se han descrito las secuencias genómicas de longitud completas o casi completas de numerosos aislados de VHC [véase, p. ej., Lin y col., *J. Virol.* 68:5063-5073 (1994a); Okamoto y col., *J. Gen. Virol.* 75:629-635 (1994); Sakamoto y col., *J. Gen. Virol.* 75:1761-1768 (1994); Trowbridge y col., *Arch. Virol.* 143:501-511
 20 (1998); Chamberlain y col., *J. Gen. Virol.* 78:1341-1347 (1997); y las referencias en Davis, *Am. J. Med.* 27:21 S-26S], los ARN genómicos del VHC tienen ~9,6 kilobases (kb) de longitud (Figura 1) y consisten en una región 5' no traducida (5' NTR), una región que codifica la poliproteína que consiste en un solo marco de lectura abierto (ORF) extenso, y una 3' NTR. La 5' NTR tiene 341-344 bases de longitud y es altamente conservada. La longitud del ORF extenso varía ligeramente entre aislados, y codifican poliproteínas de aproximadamente 3010 a aproximadamente
 25 3033 aminoácidos.

La 3' NTR se puede dividir en 3 dominios. El primer dominio (principalmente 5') muestra una diversidad considerable tanto en composición como en longitud (28-42 bases). Un trabajo reciente de Yanagi y col., [*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:2291-2295(1999)] demuestra que esta región no es necesaria para la replicación vírica. El segundo dominio
 30 consiste en una región de polipirimidina de longitud variable de poli(A) (en al menos el VHC-1, tipo 1a [Han y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:1711-1715 (1991)]) o poli(U-UC) (Véase Chen y col., *Virology* 188:102-113 (1992); Okamoto y col., *J. Gen. Virol.* 72:2697-2704 (1991); Tokita y col., *J. Gen. Virol.* 66:1476-83 (1994)]. El tercer dominio, en el extremo 3' del genoma, es un elemento de ARN nuevo, altamente conservado, de aproximadamente 98 nucleótidos, que es necesario para el inicio eficaz de la replicación del ARN vírico [véase, p. ej., patente de
 35 EE.UU. nº 5.874.565 y patente de EE.UU. nº 6.127.116; Kolykhalov y col., *J. Virol.* 70: 3363-3371 (1996); Tanaka y col., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 215: 744-749 (1996); Tanaka y col., *J. Virol.* 70:3307-12 (1996); Yamada y col., *Virology* 223:255-261 (1996); Cheng y col., *J. Virol.* 73:7044-7049]. Parece que este dominio y las regiones de polipirimidina son críticas para la infectividad in vivo [Yanagi y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:2291-2295 (1999)].

40 *Traducción y procesamiento proteolítico.* La secuencia 5' NTR altamente conservada contiene múltiples ORF cortos que empiezan por AUG y muestra una homología significativa con la región 5' NTR de pestivirus [Bukh y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4942-4946 (1992); Han y col., (1991) Véase antes]. Está presente una serie de estructuras de tallo-lazo que interaccionan con factores del huésped. Estas estructuras interaccionan con factores del huésped para iniciar la síntesis de la poliproteína por un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) permitiendo el inicio eficaz
 45 de la traducción en el primer AUG del ORF extenso [Honda y col., *J. Virol* 73:4941-4951 (1999); Tang y col., *J. Virol.* 73:2359-2364(1999); Psaridi y col., *FEBS Lett.* 453:49-53 (1999)]. Algunas de las características predichas de los elementos IRES del VHC y pestivirus son similares entre sí [Brown y col., (1992) Véase antes]. La capacidad de este elemento para funcionar como un IRES sugiere que los ARN genómicos del VHC pueden carecer de una estructura de remate 5'.

50 La organización y el procesamiento de la proteína del VHC (figura 1) parece que es más similar a la del pestivirus. Se han identificado al menos 10 polipéptidos y el orden de estos productos de escisión en la poliproteína es NH2-C-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B-COOH. Como se muestra en la figura 1, el procesamiento proteolítico es mediado por la peptidasa señal del huésped y dos proteasas codificadas por el VHC, la autoproteasa NS2-3 y la serina proteasa NS3-4A [Véase Rice, en "Fields Virology" (B. N. Fields, D. M. Knipe and P. M. Howley, Eds.), Vol. pág. 931-960. Raven Press, New York (1996); Shimotohno y col., *J. Hepatol.* 22: 87-92 (1995) para una revisión], C es una proteína básica que sirve como núcleo vírico o proteína de cápside; E1 y E2 son glicoproteínas de la envuelta del virión; p7 es una proteína hidrófoba de función desconocida que es escindida de forma ineficaz de la glicoproteína E2 [Lin y col., (1994a) Véase antes; Mizushima y col., *J. Virol.* 68: 6215-6222 (1994); Selby y col.,

Virology 204:114-122 (1994)]. NS2-NS5B son proteínas no estructurales (NS) que funcionan en complejos de replicación de ARN vírico. Sus funciones se han identificado como sigue: NS2 es una metaloproteasa; NS3 es una proteasa/helicasa que contiene patrones característicos de las helicasas de ARN y que se ha mostrado que tiene una actividad de NTPasa estimulada por ARN [Suzich y col., *J. Virol.* 67, 6152-6158 (1993)]; NS4A es un cofactor para NS3; NS4B tiene función desconocida; NS5A interacciona con factores celulares para modular transcripcionalmente los genes celulares y promover el crecimiento celular [Ghosh y col., *J. Biol. Chem.* 275:7184-7188] y proporcionar resistencia al IFN α ; y NS5B es una replicasa que contiene el patrón GDD característico de las ARN polimerasas dirigidas por ARN de otros virus de ARN de cadena positiva.

10 *Ensamblaje y liberación de viriones.* Este procedimiento no se ha examinado directamente, pero la carencia de glicanos complejos, la localización en el ER de las glicoproteínas del VHC [Dubuisson y col., *J. Virol.* 68: 6147-6160 (1994); Ralston y col., *J. Virol.* 67: 6753-6761 (1993)] y la ausencia de estas proteínas en la superficie celular [Dubuisson y col., (1994) Véase antes; Spaete y col., *Virology* 188: 819-830 (1992)] sugieren que la morfogénesis inicial del virión puede producirse por el surgimiento en vesículas intracelulares. Hasta el momento, no se ha observado la formación de partículas y liberación eficaces en ensayos de expresión transitoria, lo que sugiere que están ausentes o bloqueados factores víricos o del huésped esenciales. La formación y liberación de viriones del VHC puede ser ineficaz puesto que una fracción sustancial del virus permanece asociado a células, como se encuentra en los pestivirus. Las partículas de VHC extracelulares purificadas parcialmente de plasma humano contienen glicanos N-unidos complejos, aunque no se mostró que estos restos de hidratos de carbono estuvieran específicamente asociados a E1 o E2 [Sato y col., *Virology* 196:354-357 (1993)]. Los glicanos complejos asociados a glicoproteínas en los viriones liberados sugeriría el paso por la región trans-Golgi y el movimiento de los viriones por la ruta secretora del huésped. Si esto es correcto, entonces el secuestro intracelular de las glicoproteínas del VHC y la formación de viriones pueden tener una función en el establecimiento de infecciones crónicas por minimización de la vigilancia inmunitaria y previniendo la lisis de las células infectadas por virus mediante anticuerpos y complementos.

Variabilidad genética. Como para todos los virus de ARN de cadena positiva, la ARN polimerasa dirigida por ARN del VHC (NS5B) se cree que carece de actividad de lectura de prueba de exonucleasa 3'-5' para eliminar las bases mal incorporadas. Por lo tanto, la replicación es propensa al error, conduciendo a una población de virus de "cuasiespecies" que consiste en un gran número de variantes [Martell y col., *J. Virol.* 66: 3225-3229 (1992); Martell y col., *J. Virol.* 68: 3425-3436 (1994)]. Esta variabilidad es evidente en múltiples niveles. Primero, en un individuo con infección crónica, se producen cambios en la población vírica a lo largo del tiempo [Ogata y col., (1991) Véase antes; Okamoto y col., *Virology* 190: 894-899 (1992)]; y estos cambios pueden tener consecuencias importantes para la enfermedad. Un ejemplo particularmente interesante es el segmento N-terminal de 30 restos de la glicoproteína E2, que presenta un grado de variabilidad mucho mayor que el resto de las poliproteínas [por ejemplo, Véase Higashi y col., *Virology* 197, 659-668. 1993; Hijikata y col., (1991) Véase antes; Weiner y col., (1991) Véase antes]. Hay muchas pruebas de que esta región hipervariable, llamada región hipervariable 1 (HVR1), quizás análoga al dominio V3 de gp120 del VIH-1, puede estar bajo selección inmunitaria mediante la circulación de anticuerpos específicos del VHC [Kato y col., (1993) Véase antes; Taniguchi y col., *Virology* 195:297-301 (1993); Weiner y col., (1992) Véase antes]. En este modelo, los anticuerpos dirigidos contra esta parte de E2 pueden contribuir a la neutralización de virus y así dirigen la selección de variantes con sustituciones que permiten escapar de la neutralización. Esta plasticidad sugiere que una secuencia de aminoácidos específica en la región hipervariable E2 no es esencial para otras funciones de la proteína tales como la unión, penetración o ensamblaje del virión. La evolución genérica del HVR1 en los 4 primeros meses de infección, se ha correlacionado con la capacidad de una cepa particular del virus para causar la infección crónica [Farci y col., *Science* 288:339-344 (2000)].

La variabilidad genérica también puede contribuir al espectro de las diferentes respuestas observadas después de tratamiento con IFN- α de pacientes con infección crónica. Los menores niveles de ALT en el suero y la mejor histología hepática, que normalmente se correlacionan con una disminución del nivel de ARN del VHC en la circulación, se observa en ~40% de los tratados [Greiser-Wilke y col., *J. Gen. Virol.* 72: 2015-2019 (1991)]. Después de tratamiento, recaen aproximadamente 70% de los pacientes que responden. En algunos casos, después de una pérdida transitoria de ARN vírico en la circulación, se observa una viremia renovada durante o después del curso del tratamiento. Aunque esto puede sugerir la existencia o la generación de genotipos o variantes del VHC resistentes al IFN, es necesario más trabajo para determinar las contribuciones relativas del genotipo vírico y las diferencias específicas del huésped en la respuesta inmunitaria.

Las comparaciones de secuencias de diferentes aislados del VHC en todo el mundo también han puesto de manifiesto una gran diversidad genética [revisado en Bukh y col., (1995) Véase antes]. Debido a la falta de ensayos serológicos biológicamente relevantes tales como ensayos de neutralización cruzada, los tipos de VHC (designados

- por números), los subtipos (designados por letras) y los aislados, actualmente se agrupan basándose en la similitud de la secuencia de nucleótidos o de aminoácidos. En todo el mundo, el VHC se ha clasificado en 6 genotipos principales y más de 50 subtipos [Purcell, *Hepatology* 26:11 S-14S (1997)]. Los que tienen mayor importancia en los EE.UU. son el genotipo 1, subtipos 1a y 1b (Véase a continuación y Bukh y col., (1995), Véase antes para una
5 discusión de la prevalencia y distribución de genotipos). La similitud de secuencias de aminoácidos entre los genotipos más divergentes puede ser tan pequeña como de ~50%, dependiendo de la proteína con la que se compare. Esta diversidad tiene implicaciones biológicas importantes, en particular para el diagnóstico, el diseño de vacunas y la terapia.
- 10 *Replicación del ARN del VHC.* Por analogía con otros flavivirus, se cree que la replicación del ARN del virión del VHC de sentido positivo se produce por un intermedio de cadena negativa. Esta estrategia se puede describir brevemente como sigue: (i) la eliminación del recubrimiento de la partícula de virus que llega libera la cadena positiva genómica, que es traducida para producir una sola poliproteína larga que probablemente es procesada co- y postraduccionalmente para producir proteínas individuales estructurales y no estructurales; (ii) las proteínas no
15 estructurales forman un complejo de replicación que usa el ARN del virión como molde para la síntesis de cadenas negativas; (iii) estas cadenas negativas a su vez sirven de moldes para la síntesis de cadenas positivas, que se pueden usar para la traducción adicional de proteína vírica, síntesis de cadena negativa o empaquetamiento en viriones progenie. Hay muy pocos detalles disponibles sobre el proceso de replicación del VHC, debido a la falta de un buen sistema experimental para la propagación vírica. Los análisis detallados de la replicación del VHC auténtico
20 y otras etapas del ciclo de vida vírico, se facilitarían mucho por el desarrollo de un sistema eficaz para la replicación del VHC en el cultivo celular.

Se han hecho muchos intentos de infectar células cultivadas con suero recogido de individuos infectados por el VHC y se han descrito niveles bajos de replicación en una serie de tipos de células infectadas por este procedimiento, incluyendo líneas celulares de linfocitos B [Bertolini y col., *Res. Virol.* 144: 281-285 (1993); Nakajima y col., *J. Virol.* 70: 9925-9 (1996); Valli y col., *Res. Virol.* 146: 285-288 (1995)], linfocitos T [Kato y col., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 206:863-9 (1996); Mizutani y col., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 227:822-826; Mizutani y col., *J. Virol.* 70:7219-7223 (1996); Nakajima y col., (1996) Véase antes; Shimizu y Yoshikura, *J. Virol.*, 68:8406-8408 (1994); Shimizu y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:5477-5481 (1992); Shimizu y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:
30 6037-6041 (1993)], y hepatocitos [Kato y col., *Jpn. J. Cancer Res.*, 87: 787-92 (1996); Tagawa, *J. Gastroenterol. and Hepatol.*, 10: 523-527 (1995)], así como células mononucleares de sangre periférica (CMSP) [Cribier y col., *J. Gen. Virol.*, 76: 2485-2491 (1995)], y cultivos primarios de hepatocitos fetales humanos [Carloni y col., *Arch. Virol. Suppl.* 8:31-39 (1993); Cnbier y col., (1995) Véase antes; Lacovacci y col., *Res. Virol.*, 144:275-279 (1993)] o hepatocitos de chimpancés adultos [Lanford y col., *Virology* 202: 606-14 (1994)]. La replicación del VHC también se ha
35 detectado en hepatocitos primarios derivados de un paciente humano con VHC que se infectó con el virus in vivo antes del cultivo [Ito y col., *J. Gen. Virol.* 77:1043-1054 (1996)] y en la línea celular de hepatoma humano Huh7 después de transfección con ARN transcrito in vitro de un clon de ADNc del VHC-1 [Yoo y col., *J. Virol.*, 69:32-38 (1995)]. La observación descrita de la replicación en células transfectadas con el ARN derivado del clon del VHC-1 era sorprendente puesto que este clon carece de la secuencia requerida 3' NTR terminal en la dirección 3' de la
40 región de homopolímero (Véase a continuación), y porque se describió una serie de observaciones inusuales (Véase en la sección de antecedentes la solicitud de patente de EE.UU. n° 6127116). Los sistemas de cultivo celular mejor caracterizados para la replicación del VHC usan una línea de linfocitos B (Daudi) o linfocitos T infectada constantemente con retrovirus (HPB-Ma o MT-2) [Kato y col., (1995) Véase antes; Mizutani y col., *Biochem Biophys Res. Commun.*, 227: 822-826 (1996a); Mizutani y col., (1996) Véase antes; Nakajima y col., (1996) Véase antes;
45 Shimizu y Yoshikura, (1994) Véase antes; Shimizu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6037-6041 (1993)]. HPBMa se infecta con un virus anfitriónico de leucemia murina pseudotipo del virus del sarcoma murino, mientras que MT-2 se infecta con virus linfotrópicos de linfocitos T humanos tipo 1 (HTLV-1). Se han aislado los clones (HPBMa 10-2 y MT-2C) que mantienen la replicación del VHC más eficazmente que la población no clonada, para las dos líneas de linfocitos T HPBMa y MT-2 [Mizutani y col. *J. Virol.* (1996) Véase antes; Shimizu y col., (1993) Véase antes]. Sin
50 embargo, los niveles máximos de replicación de ARN obtenidos en estas líneas o en las líneas Daudi después de degradación del ARN introducido es todavía de solo 5×10^4 moléculas de ARN por 10^6 células (Mizutani y col., (1996) Véase antes; Mizutani y col., (1996) Véase antes) o 10^4 moléculas de ARN por ml de medio de cultivo [Nakajima y col., (1996) Véase antes]. Aunque el nivel de replicación es bajo, se han documentado infecciones a largo plazo de hasta 198 días en un sistema [Mizutani y col., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 227: 822-826 (1996a)]
55 y más de un año en otro sistema [Nakajima y col., (1996) Véase antes], y se ha demostrado la producción de virus infecciosos por pase seriado sin células o mediado por células de los virus a células no tratadas.

Sin embargo, la replicación eficaz de un clon de VHC que comprendía la secuencia 3' NTR terminal conservada esencial, no se ha observado hasta el trabajo descrito en la patente de EE.UU. n° 6127116, también descrito en

Kolykhalov y col., *Science* 277:570 (1997), que describe un clon infeccioso de un aislado de la cepa H (tipo 1a). Ahora se conocen clones de VHC de otros subtipos. Véase, p. ej., Yanagi y col., *Virology* 262:250-263 (1999) y Yanagi y col., *Virology* 244:161-172 (1998). Aunque los transcritos de ARN de estos clones son capaces de infectar chimpancés, los cultivos celulares con estos clones solo mantienen poco, o nada, la replicación del virus.

5

Como se describe en la patente de EE.UU. nº 6127116 (véase, p. ej., la figura 2 en la misma) son posibles muchas variaciones de un clon funcional. Estas incluyen secuencias de longitud completa o parcial en las que se inserta un gen exógeno. El gen exógeno puede incluir, p. ej., un gen indicador tal como β -galactosidasa o luciferasa, o un gen que codifica un marcador seleccionable, tal como *neo*, *DHFR* o *tk*. En un ejemplo específico descrito en la misma, el gen *neo* está operativamente unido a un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES), con el fin de seleccionar las células infectadas por la resistencia a la neomicina o G418. De esta forma, se asegura la presencia de ARN del VHC replicativo esencialmente en todas las células supervivientes. Además, la región que codifica la poliproteína del VHC de estos clones puede ser deficiente en algunos o en todos los genes estructurales C, E1 y E2. Por lo tanto, se pueden crear replicones sin producir viriones. Combinando la construcción deficiente en genes estructurales con un marcador seleccionable tal como *neo*, se puede crear un sistema replicón de replicación de forma eficaz, que se puede usar para estudiar la replicación del VHC y para otros propósitos.

Los ejemplos de los replicones descritos en la patente de EE.UU. nº 6127116 se proporcionan en Lohmann y col., *Science* 285: 110-113 (1999). En este trabajo, se construyeron clones de ADN de replicones del VHC de genotipo 1, subtipo 1b. Las características de estos replicones que no son las características del VHC natural son: una región que codifica la poliproteína que carece de los genes que codifican las proteínas estructurales del VHC; un IRES de EMCV inmediatamente 5' a la región de la poliproteína; y un gen *neo* inmediatamente 3' a la 5'NTR (y el IRES de VHC), en la que el extremo 5' del gen de la proteína C del VHC está fusionado con el extremo 5' del gen *neo*. Cuando se transfectaron células Huh-7 con transcritos de ARN de estos clones, surgieron de 6 a >60 colonias resistentes a G418 por experimento. Aunque el número de células tratadas no se especificaba, normalmente en experimentos de este tipo se tratan aproximadamente 10^6 - 10^7 células. Por lo tanto, se cree que la eficacia de la transfección, medida por las colonias resistentes a G418/totales, era menor que 0,01% en estos estudios.

Los controles en el trabajo de Lohmann y col. incluían eliminaciones en el marco del sitio activo de la NS5B polimerasa. Aunque se tuvo cuidado de eliminar el ADN molde de los transcritos de control, surgieron varias colonias de control resistentes a G418. Además, el número de colonias de control resistentes a G418 que surgieron era mucho menor que las colonias que surgen de las células transfectadas con los replicones que contienen el NS5B natural.

Cuando las colonias resistentes a G418 se sometieron a subpases, la mayoría no pudieron mantenerse. De más de 303 colonias resistentes a G418 de los tratamientos con replicones que no son de control, 9 (<3%) se podían someter a subpase para establecer líneas celulares estables. Los replicones establecidos en las líneas celulares infectadas se secuenciaron. Aunque cada replicón tiene una serie de sustituciones de aminoácidos, las sustituciones estaban dispersas por toda la región codificante de la poliproteína. Por lo tanto no había mutaciones que fueran consistentes en una región codificante de la poliproteína, y se concluyó que el establecimiento de 9 líneas celulares no se debía a mutaciones adaptativas en estos replicones. Este argumento se ensayó experimentalmente mediante experimentos de transfección/reconstitución que no proporcionaron pruebas de cambios adaptativos.

A pesar de los avances descritos antes, se necesitan sistemas más eficaces de células infectadas por el VHC para la producción de cepas de virus concentrados, análisis estructural de componentes de viriones, evaluación de terapias antivíricas putativas incluyendo vacunas y compuestos antivíricos, y mejores análisis de los procesos víricos intracelulares, incluyendo la replicación del ARN. Por lo tanto, se necesitan varios tipos de clones del VHC que se puedan usar para cualquiera de los propósitos anteriores. También es necesario caracterizar el VHC con respecto a las regiones del genoma que podrían contribuir a una replicación y producción de viriones in vitro o in vivo más eficaces.

Resumen de la invención

Por lo tanto, un objeto principal de la presente invención ha sido proporcionar el ADN que codifica el VHC no natural que es capaz de replicación.

Un objeto relacionado de la invención es proporcionar el ARN genómico a partir del ADN anterior. Todavía otro objeto de la invención es proporcionar el ADN del VHC atenuado o el ARN genómico adecuado para el desarrollo de vacunas, que puedan invadir una célula y replicarse pero no puedan propagar virus infecciosos.

Otro objeto de la invención es proporcionar modelos in vitro e in vivo de infección por el VHC y replicación del ARN para ensayar fármacos dirigidos contra el VHC (o antivíricos), para evaluar la resistencia a fármacos y para ensayar las vacunas víricas de VHC atenuadas.

5

Un objeto adicional de la invención es proporcionar replicones del VHC replicativos. Estos replicones no codifican proteínas estructurales, pero pueden codificar una proteína exógena tal como un gen indicador o un marcador seleccionable.

10 Todavía otro objeto de la invención es proporcionar replicones adaptativos, con mayor capacidad para establecer la replicación en líneas celulares primarias o continuas.

Por lo tanto, de forma resumida, los autores de la invención han conseguido descubrir procedimientos para crear variantes del VHC replicativas, incluyendo variantes con mutaciones adaptativas en el VHC que mejoran su capacidad para establecer la replicación del ARN en cultivo para crear líneas celulares continuas. Estas variantes del VHC y las líneas celulares que las albergan, son útiles para estudiar la replicación y otras características del VHC. Las líneas celulares también son útiles para desarrollar vacunas y para ensayar propiedades antivíricas de compuestos.

15

20 Por lo tanto, la presente invención se dirige a un polinucleótido que comprende una secuencia del VHC no natural que es capaz de replicación productiva en una célula huésped, o es capaz de ser transcrita en una secuencia del VHC no natural que es capaz de replicación productiva en una célula huésped. La secuencia del VHC comprende, de 5' a 3' en el ácido nucleico en el sentido positivo, una región funcional no traducida 5' (5' NTR); una o más regiones codificantes de proteína, incluyendo al menos una región codificante de poliproteína que es capaz de replicar el ARN del VHC; y una región funcional no traducida 3' (3' NTR) del VHC, en el que la región codificante de la poliproteína comprende un gen de NS5A que comprende una mutación adaptativa (i) que codifica un cambio en la secuencia de aminoácidos seleccionado del grupo que consiste en Ser (1179) a Ile, Arg (1164) a Gly, Ala (1174) a Ser, Ser (1172) a Cys, Ser (1172) a Pro, de la SEQ ID NO: 3; o (ii) comprende una eliminación de nucleótidos que corresponde a los nucleótidos 5345 a 5485 de la SEQ ID NO: 6. En realizaciones preferidas de estos polinucleótidos, la 5' NTR es una 5' NTR del VHC, el polinucleótido comprende al menos un IRES seleccionado del grupo que consiste en un IRES vírico, un IRES celular y un IRES artificial, y la región que codifica la poliproteína es una región que codifica la poliproteína del VHC.

25

30

Los polinucleótidos anteriores comprenden una mutación adaptativa. La mutación adaptativa puede ser tal que el polinucleótido tenga una eficacia de transfección de células de mamífero mayor que 0,01%; más preferiblemente mayor que 0,1%; incluso más preferiblemente, mayor que 1%; todavía más preferiblemente mayor que 5%, puede ser aproximadamente 6%. Las mutaciones adaptativas pueden ser tales que el polinucleótido sea capaz de replicación en una célula no hepática, por ejemplo en células HeLa. Las mutaciones adaptativas también pueden hacer que el polinucleótido tenga virulencia atenuada, en donde el VHC tiene deteriorada su capacidad para producir enfermedad, establecer infecciones crónicas; producir respuestas autoinmunitarias y transformar células.

40

En los mutantes adaptativos descritos antes, la región de poliproteína comprende un gen de NSSA que no es un gen de NS5A natural y comprende una mutación. La mutación está preferiblemente en los 50 nucleótidos de una ISDR o incluye la ISDR; más preferiblemente la mutación está en los 20 nt de la ISDR o incluye la ISDR. Las mutaciones adaptativas son aquellas que codifican un cambio en la secuencia de aminoácidos seleccionado del grupo que consiste en: de Ser (1179) a Ile, de Arg (1164) a Gly, de Ala (1174) a Ser, de Ser (1172) a Cys, de Ser (1172) a Pro, de la SEQ ID NO: 3; o incluyen una eliminación de los nucleótidos 5345 a 5485 de la SEQ ID NO: 6.

45

En algunas realizaciones de los polinucleótidos de la invención, la región que codifica la poliproteína del VHC codifica todas las proteínas estructurales y no estructurales del VHC. En otras realizaciones, la región que codifica la poliproteína no es capaz de hacer partículas de VHC infecciosas, haciendo de la variante del VHC un replicón. Preferiblemente, la incapacidad de hacer partículas de VHC se debe a una eliminación en la región codificante de las proteínas estructurales. Algunas realizaciones de estos replicones comprenden además un gen exógeno operativamente unido a un primer IRES y la región codificante de la poliproteína del VHC operativamente unida a un segundo IRES. Preferiblemente, el replicón comprende una secuencia del VHC de genotipo 1, más preferiblemente subtipo 1b. Los genes exógenos preferidos en estos replicones son marcadores seleccionables o genes indicadores. En otras realizaciones preferidas de replicones, el primer IRES es un IRES del VHC, el agente exógeno es un gen neo, y el segundo IRES es un IRES del EMCV. Los ejemplos de los replicones anteriores incluyen las SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 25. Los replicones anteriores también comprenden preferiblemente

55

una mutación adaptativa, que incluye cualquiera de los fenotipos adaptativos previamente descritos, incluyendo mayor eficacia de transfección, replicación en una célula no hepática incluyendo células HeLa y virulencia atenuada, y comprende además cualquiera de las mutaciones adaptativas descritas previamente, tales como las diferentes mutaciones y eliminaciones de NS5A previamente descritas.

5

Los polinucleótidos de la presente invención pueden estar en forma de ARN o ADN. Las realizaciones preferidas de los polinucleótidos son las SEQ ID NO: 5-13 y 22-25, los complementos de las mismas y los equivalentes de ARN de las secuencias o sus complementos. En algunas realizaciones, los polinucleótidos son capaces de infección productiva en un chimpancé tras inyección intrahepática.

10

La presente invención también se dirige a la expresión de vectores que comprenden formas de ADN de cualquiera de los polinucleótidos anteriores, operativamente asociados a un promotor. Además, la invención se dirige a células que comprenden los vectores de expresión anteriores, así como a células huésped que comprenden cualquiera de los polinucleótidos descritos antes. Las células huésped son preferiblemente células de mamífero, más preferiblemente células humanas. Las células huésped son preferiblemente hepatocitos, linfocitos T, linfocitos B o fibroblastos de prepucio; más preferiblemente hepatocitos. Algunos mutantes adaptativos también pueden replicarse en células HeLa. Las células huésped pueden estar dentro de un mamífero no humano capaz de soportar la transfección y replicación del VHC y la infección cuando el ARN del VHC codifica una partícula vírica. Un mamífero no humano preferido es un chimpancé.

20

También se describen procedimientos para identificar una línea celular que es permisiva para la replicación del ARN con el VHC. El procedimiento incluye las etapas de poner en contacto una célula en cultivo tisular con una cantidad infecciosa de los polinucleótidos descritos antes, y detectar la replicación de las variantes del VHC en células de la línea celular.

25

También se describe un procedimiento para producir una línea celular que comprende el VHC replicativo. El procedimiento incluye las etapas de (a) transcribir el vector de expresión descrito antes para sintetizar el ARN del VHC; (b) transfectar una célula con el ARN del VHC; y (c) cultivar la célula.

30 Además, se describe una vacuna. La vacuna incluye cualquiera de los polinucleótidos descritos antes, en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Una descripción relacionada es un procedimiento para inducir inmunoprotección frente al VHC en un primate. El procedimiento incluye administrar la vacuna al primate.

Una descripción adicional es un procedimiento para ensayar un compuesto para inhibir la replicación del VHC. El procedimiento incluye las etapas (a) tratar las células huésped descritas antes con el compuesto; y (b) evaluar en la célula huésped tratada la replicación reducida, en donde la replicación reducida del VHC indica la capacidad del compuesto para inhibir la replicación.

Una descripción adicional es un procedimiento para ensayar un compuesto para inhibir la infección por el VHC. El procedimiento comprende tratar una célula huésped con el compuesto anterior, durante o después de infectar la célula huésped con cualquiera de los polinucleótidos de la invención.

Otra descripción más es una variante del VHC que tiene (a) una eficacia de transfección mayor que 0,01%, determinada por replicación dependiente de la resistencia a la neomicina, o (b) una mayor capacidad para que las colonias iniciales de células transfectadas con la variante sobrevivan a subpases que el genotipo 1, subtipo 1b, del VHC natural. La variante del VHC tiene también, de 5' a 3' en el ácido nucleico de sentido positivo, una región funcional 5' no traducida (5' NTR) del VHC que comprende una secuencia conservada 5' terminal en el extremo; una región codificante de la poliproteína del VHC; y una región funcional 3' no traducida (3' NTR) del VHC que comprende una región variable, una región de polipirimidina y una secuencia conservada 3' terminal en el extremo.

Preferiblemente, la eficacia de la transfección es mayor que 0,1%; en realizaciones más preferidas, mayor que 1%; y todavía más preferiblemente mayor que 5%. Lo más preferiblemente, la eficacia de la transfección es aproximadamente 6%.

Las variantes pueden tener cualquiera de las características de los polinucleótidos descritos antes y comprenden la mutación o eliminación en NS5A descrita para los polinucleótidos anteriores.

Entre las diferentes ventajas logradas por la presente invención están el proporcionar polinucleótidos que comprenden secuencias del VHC no naturales; proporcionar variantes del VHC que tienen una eficacia de transfección y capacidad para sobrevivir a los subpases mayor que las formas del VHC que tienen regiones

codificantes de poliproteínas naturales; proporcionar vectores de expresión que comprenden los polinucleótidos anteriores y variantes del VHC; proporcionar células y células huésped que comprenden los vectores de expresión anteriores; proporcionar procedimientos para identificar una línea celular que es permisiva para la replicación del ARN con el VHC; proporcionar vacunas que comprenden los polinucleótidos anteriores en un vehículo farmacéuticamente aceptable; proporcionar procedimientos para inducir inmunoprotección frente al VHC en un primate; y proporcionar procedimientos para ensayar un compuesto para la inhibición de la replicación del VHC.

Breve descripción de los dibujos

10 Figura 1. *Estructura genómica del VHC, procesamiento de la poliproteína y características de las proteínas.* En la parte superior se representa el genoma vírico con las regiones codificantes de proteínas estructurales y no estructurales, y las 5' y 3' NTR, y la estructura secundaria de 3' putativa. Las cajas debajo del genoma indican proteínas generadas por la cascada de procesamientos proteolíticos. Las proteínas estructurales putativas están indicadas mediante cajas sombreadas y las proteínas no estructurales mediante cajas blancas. Los tramos contiguos de aminoácidos no cargados se muestran mediante barras negras. Los asteriscos indican proteínas con glicanos N-unidos pero no indican necesariamente la posición o el número de sitios usados. Los sitios de escisión mostrados son para la peptidasa de señal del huésped (♦), la proteasa NS2-3 (flecha curvada) y la serina proteasa NS3-4A (↓).

Figura 2. *Estrategias para la expresión de ARN heterólogos y proteínas usando vectores de VHC.* En la parte superior hay un diagrama del ARN de polaridad positiva del virus VHC, que expresa proteínas víricas maduras por traducción de un solo ORF extenso y procesamiento proteolítico. Las regiones de la poliproteína que codifican las proteínas estructurales (ESTRUCTURAL) y las proteínas no estructurales (REPLICASA) están indicadas como cajas sombreadas en claro y en blanco, respectivamente. Debajo se muestra una serie de constructos de expresión de "replicones" competentes para la replicación propuesta. Los primeros 4 constructos (A-D) carecen de genes estructurales y por lo tanto requerirían un sistema auxiliar para permitir el empaquetamiento en viriones infecciosos. Los constructos E-G no requerirían funciones auxiliares para la replicación o empaquetamiento. Las cajas sombreadas en oscuro indican secuencias de genes heterólogos o exógenos (FG). Las señales de inicio (aug) y terminación (trm) de la traducción se indican por triángulos en blanco y rombos negros, respectivamente. Los sitios internos de entrada al ribosoma (IRES) se indican como cajas con rayas verticales. Los constructos A y H ilustran la expresión de un producto heterólogo como una fusión en el marco con la poliproteína del VHC. Dichas uniones de fusión de proteínas se pueden diseñar de modo que el procesamiento sea mediado por proteasas del huésped o víricas (indicado con una flecha).

Figura 3. *Estructura de HCVrep1bBartMan.* Se construyeron dos versiones de este replicón infeccioso como se describe en el ejemplo 1. La primera, HCVrep1bBartMan/Avall, tiene un sitio de restricción Avall en el dominio variable de la 3' NTR que no está presente en la 3' NTR del subtipo 1b del VHC natural. La segunda variante, HCVrep1bBartMan/Δ2U's, tiene 32 U, en lugar de los 34 del natural, en el tramo más largo de U contiguos en el dominio de polipirimidina de la 3' NTR. La designación "GDD→AGG" muestra la mutación inactivante en los replicones no replicativos que se usaron como controles negativos de polimerasa en el ejemplo 1.

Figura 4. *Generación de clones de células resistentes a G418.* En la parte superior hay un diagrama de los replicones HCVrep1bBartMan descritos en la figura 3. El texto en el medio resume las etapas usadas para aislar los mutantes adaptativos, que se describen después en el ejemplo 1. La parte inferior del diagrama resume varias características de algunos de los replicones aislados como se describe en el ejemplo.

Figura 5. *Síntesis del ARN específico del VHC y proteínas.* La figura 5A ilustra la replicación del ARN resistente a la actinomicina D de 4 replicones adaptativos como se describe después en el ejemplo. La figura 5B ilustra la inmunoprecipitación de proteínas específicas del VHC marcadas con ³⁵S de 3 replicones adaptativos como se describe después en el ejemplo 1.

Figura 6. *Detección de NS3 en clones de células resistentes a G418.* Se inmunotñeron monocapas de células transfectadas con diferentes replicones como se indica con un anticuerpo dirigido contra NS3. Los patrones de tinción eran similares a las células teñidas de un hígado infectado.

Figura 7. *Cambios de nucleótidos y aminoácidos en la región que codifica NS5A del VHC.* Se indican los cambios de nucleótidos y aminoácidos en una parte de la región que codifica NS5A de 7 clones adaptativos.

Figura 8. *Colonias resistentes a G418 generadas después de electroporación de ARN replicones en células Huh7.* Se compara la capacidad de un replicón adaptativo (replicón I) para establecer colonias después de transfección en

células Huh7 (medio) con el replicón original HCVrepBartMan/Avall (izquierda) y el mismo replicón adaptativo, pero con una mutación inactivante en el gen de la polimerasa (derecha).

Figura 9. *Estructuras de replicones del VHC y ARN del VHC de longitud completa.* La 5'NTR-EMCV del replicón adaptativo tiene la 5' NTR fusionada directamente al IRES del EMCV en dirección 5' de NS3. Otro replicón adaptativo, HCVrep/NS2-5B tiene la proteína no estructural, NS2, en dirección 5' de NS3. Se ensambló un clon del ADNc del VHC de longitud completa, HCV FL. También se ensambló un derivado bicistrónico, HCV FL-neo, en el que 5' NTR está fusionada al gen de la neomicina fosfotransferasa y el IRES de EMCV está en dirección 5' del marco de lectura abierto del VHC. En ambos clones de longitud completa, el marco de lectura abierto comprende las regiones estructurales y no estructurales, desde la cápsida a NS5B. Además, todos los replicones y ARN de VHC de longitud completa comprenden la mutación que codifica la sustitución de Ser por Ile en la posición 1179 de la SEQ ID NO: 3, en NS5A.

Figura 10. *Replicación del ARN de replicones y ARN de VHC de longitud completa.* Los replicones del VHC y los ARN de VHC de longitud completa mostrados en la figura 9 son competentes en la replicación.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

En el presente documento se usan diferentes expresiones, que tienen las siguientes definiciones:

Como se usan en el presente documento, "región que codifica la poliproteína del VHC" significa la parte de un virus de la hepatitis C que codifica el marco de lectura abierto (ORF) de la poliproteína. Este ORF puede codificar proteínas que son iguales o diferentes a las proteínas del VHC natural. El ORF también puede codificar sólo algunas de las proteínas funcionales codificadas por una región que codifica la poliproteína natural. Las proteínas codificadas por el mismo también pueden ser de diferentes aislados de VHC y también puede codificar proteínas que no son del VHC.

La frase "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que son fisiológicamente tolerables y normalmente no producen una reacción alérgica o adversa similar, tal como malestar gástrico, mareo y similares, cuando se administran a un ser humano. Preferiblemente, como se usa en el presente documento, la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o un gobierno estatal, o listado en la farmacopea de EE.UU. u otra farmacopea generalmente reconocida para uso en animales y más en particular en seres humanos. El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el cual se administra el compuesto. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los procedentes del petróleo, origen animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Se usan preferiblemente como vehículos agua o disoluciones salinas acuosas y disoluciones acuosas de dextrosa y glicerol, en particular para disoluciones inyectables. Los vehículos farmacéuticamente adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E.W. Martin.

La frase "cantidad terapéuticamente eficaz" se usa en el presente documento para significar una cantidad suficiente para reducir en al menos aproximadamente 15 por ciento, preferiblemente en al menos 50 por ciento, más preferiblemente en al menos 90 por ciento, y lo más preferiblemente para prevenir una deficiencia clínicamente significativa de la actividad, función y respuesta del huésped. Alternativamente, una cantidad terapéuticamente eficaz es suficiente para producir una mejora en una afección clínicamente significativa en el huésped.

El término "adyuvante" se refiere a un compuesto o mezcla que potencia la respuesta inmunitaria contra un antígeno. Un adyuvante puede servir como un depósito tisular que libera lentamente el antígeno y también como un activador del sistema linfático que potencia de forma no específica la respuesta inmunitaria (Hood y col., Immunology, 2ª Ed., 1984, Benjamin/Cummings: Menlo Park, California, pág. 384). A menudo, un primer estímulo con un antígeno sólo, en ausencia de un adyuvante no conseguirá producir una respuesta inmunitaria humoral o celular. Los adyuvantes incluyen, pero sin estar limitados a adyuvante completo de Freund, adyuvante incompleto de Freund, saponina, geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias activadoras de la superficie tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite o hidrocarburo, hemocianinas de lapa californiana, dinitrofenol y adyuvantes potencialmente útiles para seres humanos tales como BCG (*bacilo Calmette-Guerin*) y *Corynebacterium parvum*. Preferiblemente, el adyuvante es farmacéuticamente aceptable.

En una realización específica, el término “aproximadamente” significa dentro de 20%, preferiblemente dentro de 10% y más preferiblemente dentro de 5% de un valor o intervalo dado.

La expresión “infección vírica” como se usa en el presente documento, se refiere a la forma habitual en la que las partículas víricas naturales se establecen en las células huésped. Esto en general incluye la unión a la célula huésped, absorción, suministro al citosol o núcleo e inicio de la replicación.

El término “transfección” como se usa en el presente documento, se refiere a la infección de una célula con un polinucleótido. El polinucleótido puede ser ADN o ARN. Un procedimiento preferido de transfección de una célula con un polinucleótido del VHC es con ARN competente para la replicación. La administración a células permisivas se puede facilitar mediante electroporación, liposomas cargados, alta concentración salina, dextrano DE, etc. Los ARN competentes para la replicación también se pueden lanzar en las células después de transfección de ADN, tal como plásmidos o virus de ADN que se han diseñado adecuadamente para proporcionar las señales de inicio y terminación de la transcripción. Los ARN transfectados pueden representar ARN genómicos de longitud completa capaces de iniciar un ciclo de replicación completo (incluyendo la producción de virus progenie), o pueden ser defectuosos careciendo de uno o más elementos del ARN o de proteínas esenciales para la producción del virión, pero no para la replicación del ARN. Estos últimos ARN que carecen de la capacidad para producir un virión, se denominarán en general en el presente documento “ARN competentes para la replicación”, “replicones de ARN” o “replicones”.

Como se usa en el presente documento, el término “subpase” implica la transferencia de una colonia de un recipiente de medio a otro recipiente de medio. Los ejemplos de recipientes de medio incluyen placas, botellas o tubos de ensayo con medios de crecimiento sólidos o líquidos. Salvo que se indique lo contrario, “subpase” significa la transferencia de una colonia de células transfectadas con el VHC de un recipiente de medio donde se han cultivado las células recién transfectadas a un recipiente de medio en el que se aísla la colonia.

El término “auténtico” se usa en el presente documento para referirse a un polinucleótido del VHC, sea un ADN o ARN, que proporciona la replicación y producción de proteínas funcionales de VHC, o componentes de las mismas. Los polinucleótidos del VHC auténticos de la presente invención son capaces de replicación y pueden ser infecciosos, p. ej. en un modelo de chimpancé o en cultivo tisular, para formar partículas víricas (es decir, “viriones”). Un polinucleótido de VHC auténtico de la presente invención también puede ser un “replicón” de modo que es incapaz de producir el complemento completo de proteínas estructurales para hacer un virión infeccioso competente para la replicación. Sin embargo, dichos replicones son capaces de replicar el ARN. Por lo tanto, los polinucleótidos de VHC auténticos ilustrados en la presente solicitud contienen toda la información codificada por el virus, sea en elementos de ARN o proteínas codificadas, necesaria para iniciar un ciclo de replicación de ARN del VHC. Los polinucleótidos de VHC auténticos de la invención incluyen las modificaciones descritas en el presente documento, p. ej. por mutagénesis dirigida o por adaptación del cultivo, que producen un derivado defectuoso o atenuado, o una variante adaptativa. Alternativamente, las secuencias homólogas de las realizaciones específicas descritas en el presente documento se puede sustituir por secuencias de otros genotipos o aislados. Por ejemplo, un ácido nucleico de VHC auténtico de la invención puede comprender mutaciones adaptativas descritas en el presente documento, p. ej., en un plásmido receptor, diseñado en la región que codifica la poliproteína de un clon funcional de otro aislado o genotipo (una región consenso o una obtenida por clonación de alta fidelidad). Además, el polinucleótido de VHC de la presente invención puede incluir un gen exógeno, tal como un gen que codifica un marcador seleccionable o una proteína indicadora.

Descripción general

La práctica de la presente invención usará, salvo que se indique lo contrario, técnicas convencionales de cultivo celular, biología molecular, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que están dentro del alcance de la técnica. Dichas técnicas están explicadas en su totalidad en la bibliografía. Véase, p. ej., Ausubel y col. (ed.) (1993) "Current protocols in molecular biology". Green Publishing Associates, New York; Ausubel y col. (1995), "Short Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons; Joseph Sambrook y col. (1989), "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", second ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press; la serie, METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.); Animal Cell Culture [R.I. Freshney, ed. (1986)]; Lau, ed. (1999), HEPATITIS C PROTOCOLS, Humana Press, New York; y Immobilized Cells And Enzymes [IRL Press, (1986)].

La presente invención se dirige a variantes del virus de la hepatitis C (VHC) y procedimientos para producir las variantes. Como se usa en el presente documento, una variante del VHC es una secuencia del VHC no natural que es capaz de replicación productiva en una célula huésped. La secuencia genética de estas variantes puede

comprender inserciones, eliminaciones o mutaciones de bases respecto a las secuencias del VHC natural. Como se discute con más detalle a continuación, las variantes se pueden producir por ingeniería genética, por procedimientos conocidos por el experto en la materia (véase, p. ej. la patente de EE.UU. nº 6127116, Lohmann y col., *Science* 285:110-113(1999)). Alternativamente, como se discute con más detalle a continuación, las variantes también se pueden producir por procedimientos de selección en cultivos, o una combinación de selección en cultivos e ingeniería genética.

Las variantes están en forma de ADN o ARN y se pueden incorporar a cualquier forma útil de aquellos compuestos, por ejemplo en ADN extracromosómico, que se replique en un microorganismo tal como *E. coli* o levaduras. Entre estos se incluyen plásmidos, fagos, BAC, YAC etc. También se contemplan en el alcance de la invención ARN y viriones que comprenden la variante. Las variantes de la presente invención también pueden estar en forma de casetes para la inserción en un vector de clonación de ADN. Se contempla que los ARN de VHC sean complementarios a cualquier ADN de VHC descrito en el presente documento. Un ARN de VHC infeccioso es un ARN de cadena positiva creado a partir del molde de la cadena negativa del clon de ADN de VHC de la invención.

Las variantes de la presente invención no están estrechamente limitadas a ningún subtipo de virus particular. Por lo tanto, cualquier componente particular de la variante o la variante entera, pueden ser de cualquier subtipo de VHC. Los subtipos preferidos son 1a y 1b, debido a que están muy extendidos, así como por el gran conocimiento disponible para estos dos subtipos. Sin embargo, se contempla dentro del alcance de la invención el uso de cualquier otro genotipo o subtipo que se consideraría dentro del alcance de la materia. Esto subtipos incluyen, pero sin estar limitados a cualesquiera subtipos dentro de los genotipos VHC-1, VHC-2, VHC-3, VHC-4, VHC-5 y VHC-6. Además, puesto que el VHC carece de actividad de lectura de prueba, el propio virus muta fácilmente, formando "cuasiespecies" de mutantes del VHC que también están contempladas como útiles para la presente invención. Dichas mutaciones se identifican fácilmente por secuenciación de los aislados de un sujeto, como se detalla en el presente documento o en la patente de EE.UU. nº 6127116. Se espera que los procedimientos y composiciones descritos en el presente documento sean útiles para cualquier subtipo o cuasiespecie conocidos, o para cualquier subtipo o cuasiespecie no conocidos pero que se descubra en el futuro.

Las variantes del VHC de la invención incluyen una secuencia conservada 5'-NTR, que generalmente comprende la secuencia 5'-terminal GCCAGCC, y que puede tener bases adicionales en la dirección 5' de esta secuencia conservada sin afectar a la actividad funcional del ácido nucleico del VHC. En una realización preferida, la secuencia 5'-GCCAGCC incluye de 0 a aproximadamente 10 bases adicionales en la dirección 5'; más preferiblemente incluye de 0 a aproximadamente 5 bases en la dirección 5'; más preferiblemente todavía incluye, 0, 1 ó 2 bases en la dirección 5'. En realizaciones específicas, la secuencia 5'-terminal del extremo puede ser GCCAGCC; GCCAGCC; UGCCAGCC; AGCCAGCC; AAGCCAGCC; GAGCCAGCC; GUGCCAGCC; o GCGCCAGCC, en las que la secuencia GCCAGCC es el extremo 5' de la SEQ ID NO: 1. Sin embargo, el alcance de las variantes del VHC de la invención abarca cualquier 5' NTR funcional del VHC, sea conocida ahora o se descubra más adelante.

Las variantes del VHC de la invención también incluyen una 3' NTR que comprende una región de polipirimidina como la que se conoce del VHC natural. Se sabe que estas regiones de polipirimidina comprenden un ARN de VHC de cadena positiva, un tramo de poli(U)/poli(UC) o un tramo de poli(A). Sin embargo, la región de polipirimidina de la presente invención también puede incluir otros tramos de polipirimidina que ahora no se conocen pero que más adelante se encuentre que son funcionales en el VHC infeccioso. Como se sabe en la técnica, el tramo de polipirimidina puede ser de longitud variable: tanto corto (aproximadamente 75 bases) como largo (133 bases) son eficaces, aunque se comprueba que un clon de VHC que contiene un tramo de poli(U/UC) largo es muy infeccioso. Se pueden encontrar tramos más largos en aislados de VHC naturales. Por lo tanto, un ácido nucleico del VHC auténtico de la invención puede tener un tramo de polipirimidina de longitud variable.

La 3' NTR también comprende, en su extremo 3', el elemento de ARN altamente conservado de aproximadamente 98 nucleótidos, conocido en la materia, y que se describe, p. ej., en la patente de EE.UU. nº 5.874.565, patente de EE.UU. nº 6.127.116, y patente de EE.UU. nº 5.837.463. En un aspecto específico, el extremo de 3' NTR es ARN homólogo a un ADN que tiene la secuencia 5'-TGTTGGCTCCATCTTAGCCCTAGTCACGGCTAGCTGTGAAAGGTCCGTGAGCC GCATGACTGCAGAGAGT-GCTGATACTGGCCTCTGCTGATCATGT-3' (SEQ ID NO: 2). Sin embargo, se entiende que el alcance de la invención abarca las variantes del VHC con cualquier 3' NTR de VHC que permita la replicación vírica, sea conocida ahora la secuencia o se descubra más adelante. Están incluidas las 3' NTR que no comprenden una región variable.

Las variantes del VHC de la presente invención también incluyen una región que codifica una poliproteína suficiente para permitir la replicación del ARN del VHC. Por lo tanto, la región que codifica la poliproteína puede ser deficiente

en genes funcionales que codifican el complemento completo de los genes estructurales del VHC C, E1 y E2. Además, la región que codifica la poliproteína puede comprender eliminaciones, inserciones o mutaciones que no se encuentran en cepas del VHC natural. Además, la región que codifica la poliproteína puede ser quimérica, tal que algunos de los genes codificantes de la misma son de regiones análogas de otros virus, como se discute a
5 continuación.

Las variantes del VHC abarcadas por la presente invención incluyen variantes que no producen partículas víricas. Estas variantes, que se pueden denominar "replicones" carecen de la capacidad de producir un complemento totalmente funcional de las proteínas estructurales C, E1 y E2. La incapacidad para producir el componente de las
10 proteínas estructurales funcionales del virus VHC la puede conferir la eliminación de los genes que codifican 1, 2 o las 3 de estas proteínas. Alternativamente, una eliminación de una pequeña parte de la secuencia que codifica una de las proteínas estructurales, o una mutación en una región crítica de la secuencia codificante o una inserción en la secuencia codificante, podría conducir a un VHC que no puede producir viriones. En este último caso, la inserción puede ser cualquier secuencia que altere la capacidad de la proteína estructural de formar parte de un virión, y
15 puede incluir secuencias funcionales, tales como las que codifican un gen indicador (tal como β -galactosidasa) o las que confieren selectividad a la célula que alberga el replicón (tal como *neo*). Las manipulaciones anteriores están totalmente dentro del alcance de la técnica. Véase, p. ej., Lohmann y col., Véase antes y el ejemplo 1. Como se discute a continuación, dichas variantes son útiles para estudiar la replicación del virus VHC, entre otras cosas.

20 Las variantes de la presente invención también pueden comprender una alteración en la secuencia codificante de la región que codifica la poliproteína que no afecta a la producción de viriones funcionales o replicones. Estas alteraciones pueden ser tales que la secuencia de aminoácidos de la proteína madura no cambie con respecto a la secuencia natural, debido a la degeneración del código genético. Dichas alteraciones pueden ser útiles, p. ej., cuando introducen o eliminan un sitio de restricción, de modo que se altera el tamaño de los fragmentos de VHC
25 producidos por digestión con una enzima de restricción. Esto proporciona una característica que distingue a esta variante, que se puede usar, p. ej. para identificar un aislado infeccioso particular en un modelo animal de infección múltiple, o para proporcionar sitios convenientes para la posterior manipulación. Se puede usar cualquier técnica de mutagénesis conocida en la materia, incluyendo, pero sin estar limitados a la mutagénesis dirigida in vitro [Hutchinson, C., y col., 1978, *J. Biol. Chem.* 253: 6551; Zoller y Smith, 1984, *DNA* 3:479-488; Oliphant y col., 1986,
30 *Gene* 44:177; Hutchinson y col., 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83:710], uso de conectores TAB@ (Farmacia), etc. Se prefieren las técnicas de la PCR para la mutagénesis dirigida [véase, Higuchi, 1989, "Using PCR to Engineer DNA", en *PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification*, H. Erlich, ed., Stockton Press, capítulo 6, pág. 61-70].

35 Las alteraciones en la secuencia que codifica la poliproteína también pueden introducir sustituciones conservativas de aminoácidos en las proteínas codificadas por el VHC. Las sustituciones conservativas de aminoácidos se refieren a la posibilidad de intercambiar los restos que tienen cadenas laterales similares. Los aminoácidos sustituidos de manera conservativa se pueden agrupar de acuerdo con las propiedades químicas de sus cadenas laterales. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos incluye aquellos aminoácidos que tienen cadenas laterales neutras e hidrófobas
40 (A, V, L, I, P, W, F y M); otro grupo son aquellos aminoácidos que tienen cadenas laterales neutras y polares (G, S, T, Y, C, N y Q); otro grupo son aquellos aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas (K, R y H); otro grupo son aquellos aminoácidos que tienen cadenas laterales ácidas (D y E); otro grupo son aquellos aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas (G, A, V, L e I); otros grupos son aquellos aminoácidos que tienen cadenas laterales alifático-hidroxilo (S y T); otro grupo son aquellos aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen amina (N,
45 Q, K, R y H); otro grupo son aquellos aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas (F, Y y W); y otro grupo son aquellos aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre (C y M). Las sustituciones conservativas de aminoácidos preferidas son R-K; E-D, Y-F, L-M; V-I y Q-H. Las sustituciones conservativas de aminoácidos, cuando se producen en las proteínas estructurales, pueden alterar epítomos antigénicos y por lo tanto la reactividad inmunitaria del virus. Esas sustituciones podrían alterar también la función de las proteínas no
50 estructurales, de modo que el virus se reproduzca a una velocidad diferente o se altere su capacidad de replicación en un cultivo celular o en un organismo. Véase, p. ej., el ejemplo 1, en el que el replicón IV está adaptado a condiciones de cultivo celular debido a la sustitución conservativa de aminoácidos Ser→Cys en la proteína NS5A_Q.

Las alteraciones en la región que codifica la poliproteína también podrían introducir sustituciones no conservativas
55 de aminoácidos en una o más de las proteínas codificadas por la misma. Se esperaría que las sustituciones no conservativas alteraran la función de la proteína de forma más drástica que las sustituciones conservativas, y por lo tanto sería más probable, que en las sustituciones conservativas, que alteraran las características fenotípicas del virus tales como la velocidad de replicación, adaptación a cultivo celular o cultivo in vivo, y presentaran determinantes antigénicos. Son ejemplos varias mutaciones adaptativas en la región que codifica NS5A descrita más

adelante.

En algunas realizaciones de la invención, la región que codifica la poliproteína tiene una secuencia consenso derivada de más de un aislado de VHC. Por ejemplo, un ácido nucleico de VHC auténtico de la invención puede comprender una secuencia 5' y 3' de cualquiera de los subtipos de virus y una región de poliproteína de cualquier otro subtipo. Alternativamente, sólo una de las proteínas codificadas en la poliproteína puede ser de otro subtipo vírico. De esta forma, se puede estudiar el efecto de una proteína particular en las características de una cepa particular (por ejemplo, virulencia reducida, mayor velocidad de replicación etc.).

10 También se contemplan quimeras con otros virus, tales como con el virus de la diarrea vírica bovina u otro flavivirus. Véase, p. ej., el documento PCT/US99/08850. En algunas realizaciones, se pueden usar componentes de los clones funcionales para construir virus quiméricos para ensayar las funciones de los genes del VHC y sus inhibidores [Filocamo y col., *J. Virol.* 71:1417-1427 (1997); Hahm y col., *Virology* 226: 318-326 (1996); Lu y Wimmer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:1412-7 (1996)]. En dicha extensión de la invención, se usan elementos funcionales del VHC tales como IRES 5', proteasas, ARN helicasa, polimerasa o 3' NTR, para crear derivados quiméricos del BVDV cuya replicación productiva depende de uno o más de estos elementos del VHC. Dichas quimeras de BVDV/VHC se pueden usar después para seleccionar y evaluar estrategias antivíricas contra estos componentes funcionales.

20 Se espera que las quimeras en las que un gen que codifica una proteína estructural o no estructural de un virus estrechamente relacionado, tal como un virus B GB, sustituye al correspondiente gen del VHC, también se han funcionales. Véase, p. ej., Butkiewicz y col., 2000, *J. Virol.* 74,4291-4301.

Otras alteraciones en la región que codifica la poliproteína contempladas por la presente invención incluyen eliminaciones o inserciones en la secuencia. Dichas alteraciones también pueden alterar la velocidad de replicación, adaptación a diferentes condiciones de crecimiento o determinantes antigénicos. Un ejemplo preferido de una eliminación útil incluye la eliminación de 47 aminoácidos y sustitución de Ser 1182 a Asp 1229 de la SEQ ID NO: 3 por Tyr, que es una mutación adaptativa en NS5A que proporciona mayor eficacia de transfección que el VHC con NS5A natural. Véase el ejemplo 1.

30 Las inserciones en la región que codifica la poliproteína pueden ser de cualquier longitud y en cualquier zona de la región, con la condición de que el VHC modificado todavía puede replicarse. Preferiblemente, la inserción se realiza en el marco con el resto de la región que codifica la poliproteína, para permitir la traducción correcta de la región de la poliproteína en la dirección 3' desde la inserción.

35 Las inserciones en la región que codifica la poliproteína podrían introducir un gen que codifica una proteína heteróloga. La elección de la proteína heteróloga no está estrechamente limitada y puede incluir una proteína que es terapéutica para el huésped o célula infectados, o una proteína que se recoge y purifica para otro propósito. Los genes heterólogos particularmente útiles incluyen aquellos usados para la detección de la variante (es decir, genes indicadores) o para la selección de células que tienen la variante. Los ejemplos no limitantes de genes indicadores útiles en la presente invención incluyen β -galactosidasa, β -glucuronidasa, luciferasa de luciérnaga o bacteriana, proteína verde fluorescente (GFP) y derivados humanizados de los mismos, marcadores de superficie celular y marcadores secretados. Dichos productos se ensayan directamente o pueden activar la expresión o actividad de indicadores adicionales. Los ejemplos no limitantes de marcadores seleccionables para células de mamíferos incluyen, pero sin estar limitados a los genes que codifican la dihidrofolato reductasa (DHFR; resistencia a metotrexato), timidina quinasa (*tk*, resistencia a metotrexato), puomicina acetil transferasa (*pac*; resistencia a puomicina), resistencia a neomicina (*neo*, resistencia a neomicina o G418), resistencia al ácido micofenólico (*gpt*), resistencia a higromicina, resistencia a blastidina, y resistencia a zeocina. Se pueden usar otros marcadores seleccionables en diferentes huéspedes tales como levaduras (*ura3*, *his3*, *leu2*, *trp1*).

50 La presente invención también abarca variantes del VHC que tienen alteraciones en las regiones no codificantes del virus. Por ejemplo, el gen exógeno discutido antes también se puede insertar en una región no codificante del virus, con la condición de que la región con el inserto continúe siendo suficientemente funcional para permitir la replicación. Para proporcionar la traducción de un gen exógeno insertado en una región no codificante, el gen exógeno debe estar operativamente unido a señales de inicio de la traducción, preferiblemente un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) derivado de ARNm celulares o víricos [Jang y col., *Enzyme* 44: 292-309 (1991); Macejak y Sarnow, *Nature* 353: 90-94 1991); Molla y col., *Nature* 356: 255-257 (1992)]. En resumen, esta estrategia crea un segundo cistrón en la variante, separada del cistrón de la región que codifica la poliproteína. Un IRES preferido es el IRES del virus de la encefalomiocarditis (EMCV).

- El gen exógeno también se puede insertar en la 3' NTR o la 5' NTR. En la 3' NTR, el casete de gen exógeno/IRES se inserta preferiblemente en el dominio variable más en el extremo 5'. Sin embargo, también se contemplan inserciones para otras regiones de la 3' NTR, tales como la unión de la región variable y la región de polipirimidina, o dentro de la región de la polipirimidina. En la 5' NTR, el gen exógeno preferiblemente se inserta en la zona justo adyacente (3') al IRES interno del VHC. En estas variantes, el gen exógeno se diseña para estar operativamente unido al IRES del VHC. Cuando este es el caso, se prefiere que el segundo IRES (p. ej., un IRES de EMCV) se diseñe justo 5' a la región que codifica la poliproteína, para estar operativamente unido a esta región. Véase el ejemplo y Lohmann y col., Véase antes.
- 10 Algunas de las estrategias anteriores para la expresión funcional de genes heterólogos se han descrito previamente. Véase Bredenbeek y Rice, (1992) para una revisión Véase antes; Véase también la figura 2, que también es la figura 2 de la patente de EE.UU. n° 6127116.

- Además, las alteraciones de la región no codificante tales como mutaciones, eliminaciones o inserciones que no codifican una proteína exógena, están dentro del alcance de la invención. Por ejemplo, se pueden usar ventajosamente mutaciones, eliminaciones o inserciones en las regiones variable o de polipirimidina de la 3' NTR, incluyendo eliminaciones de la región variable entera, o en la región 5' NTR, que crea o destruye sitios de restricción o hace que la variante sea identificable de otra forma, para crear una variante "marcada". Véase, p. ej., el ejemplo en el que una mutación en la región variable de la 3' NTR creaba un sitio de restricción *Avall* fácilmente identificable, y en el que una eliminación en la región de polipirimidina creaba otra variante identificable.

- La secuencia que codifica la poliproteína comprende mutaciones adaptativas y puede comprender mutantes con adaptaciones funcionales deseables tales como variantes atenuadas. Estas variantes mejoradas pueden ser superiores en cualquier característica deseada. Los ejemplos no limitantes de características que se pueden mejorar mediante los presentes procedimientos incluyen la replicación más rápida y más precisa in vivo o en cultivo, eficacia de la transfección mejorada, capacidad mejorada para establecer líneas celulares sometidas a subpase, capacidad para infectar un huésped o una línea de células huésped, virulencia y atenuación de los síntomas de la enfermedad.

- Algunas variantes del VHC pueden ser adaptativas, p. ej., por selección para la propagación en animales o in vitro. Véase, p. ej., el ejemplo. Alternativamente, las variantes se pueden diseñar para que comprendan la adaptación funcional. Véase, p. ej., el ejemplo en el que se ha diseñado una eliminación que tenía una mayor eficacia de transfección y capacidad para someter a subpases para crear una línea celular estable, que soporte la replicación persistente del VHC.

- Los clones del VHC no funcionales, p. ej., que no son capaces de replicación genuina, que no pueden producir proteínas del VHC, que no producen ARN de VHC detectado por análisis Northern, o que no pueden infectar animales o líneas celulares susceptibles in vitro, se pueden corregir usando componentes de las variantes de la presente invención. Comparando una variante de una secuencia de ácido nucleico de VHC auténtica de la invención, con la secuencia del clon de VHC no funcional, se pueden identificar y corregir los defectos del clon no funcional, y la variante replicativa corregida podría tener características como la variante, tales como una mutación adaptativa, etc. Todos los procedimientos para modificar secuencias de ácidos nucleicos están disponibles para el experto en la materia para realizar las modificaciones en el genoma del VHC no funcional, incluyendo pero sin estar limitados a la mutagénesis dirigida, sustitución de la secuencia funcional de una variante del VHC auténtica para la secuencia homóloga en el clon funcional, etc.

- Adaptación del VHC para las características del cultivo celular mejoradas.* La eficacia de la replicación y transfección y la estabilidad de viriones y replicones que tienen la replicación de poliproteínas naturales en cultivo celular no es eficaz. Es decir, las células transfectadas, p. ej., con transcritos de ARN de clones de estas cepas se replican lentamente en cultivo y las células transfectadas son difíciles de mantener. Además, la eficacia de la transfección es pobre. Es decir, muy pocas células que son transfectadas con el replicón de ARN son capaces de soportar la replicación del VHC. Véase, p. ej., el ejemplo 1 y Lohmann y col., Véase antes, en los que menos de 0,01% de las células Huh-7 transfectadas con transcritos de ARN de replicones que tienen una región que codifica la poliproteína no estructural natural (genotipo 1, subtipo 1), crecieron en las colonias en la placa petri en la que se cultivaron los transfectantes. Además, un porcentaje pequeño de colonias que surgieron del cultivo original (<3%) se podía subpasar a otra placa de medio para formar una línea celular estable aislada que soportaba la replicación del VHC.

La "eficacia de la transfección" se define determinando el porcentaje de células que tienen ARN de VHC replicativo que continua traduciendo proteínas codificadas por los ácidos nucleicos transfectados. La forma más fácil de medir esto es determinando el porcentaje de células que presentan una característica conferida por el ARN de VHC.

Véase, p. ej., el ejemplo 1, en el que replicones que comprenden un gen *neo* conferían la resistencia a G418 a las células transfectadas, y en el que las células eran resistentes a G418 después de división y formación de colonias en la placa en la que se cultivaron las células transfectadas. En ese ejemplo, la resistencia a G418 podría no persistir suficientemente para que se formaran las colonias, salvo que el ARN de VHC pudiera replicarse y repartirse en las células que se dividen mientras continua replicando y traduciendo el gen *neo* para conferir resistencia a G418. Por lo tanto, la eficacia de la transfección depende de la replicación, en cuanto que el VHC transfectado debe replicar, transcribir y traducir la característica medida (aquí, la resistencia a G418). En el contexto del marcador seleccionable *neo*, este procedimiento para determinar la eficacia de la transfección se denomina “resistencia a la neomicina dependiente de la replicación”. Este es el modo preferido de medir la eficacia de la transfección, porque solo mide la transcripción del VHC que se establece él mismo suficientemente para replicarse y repartirse en las células que se dividen para formar una colonia.

Otra característica desventajosa del cultivo celular del ácido nucleico del VHC que tiene los genes de la poliproteína no estructural natural, es que solo un porcentaje bajo de colonias que se forman después de la transfección y selección pueden continuar manteniéndose después del subpase, como líneas celulares continuas que albergan ARN replicativo. Esto era <3% en Lohmann y col., como se ha discutido antes.

Las características desventajosas del VHC que tiene genes de poliproteínas no estructurales naturales, se pueden reducir usando algunas mutaciones y eliminaciones adaptativas en la región que codifica NS5A o en algún otro sitio, como se describe en el presente documento. Las mutaciones preferidas comprenden alteraciones de la secuencia de aminoácidos codificada en una región de la NS5A que está justo 5' de la región codificante de la “región determinante de la sensibilidad al interferón” (ISDR). Específicamente, diferentes mutaciones en aproximadamente 50 nucleótidos 5' de la ISDR, más preferiblemente en aproximadamente 20 nucleótidos de la ISDR, donde se altera la secuencia de aminoácidos codificada, tienen el efecto de adaptar un VHC para que tenga mayor eficacia de transfección y mayor capacidad para aguantar subpases para establecer una línea celular que alberga la replicación del VHC persistente. Las mutaciones específicas que tienen este efecto incluyen de Ser en Ile en el aminoácido 1179 de la de la SEQ ID NO: 3 (región de poliproteína no estructural de subtipo 1 b), conferida, por ejemplo, por la mutación de g en t en la posición 5336 de la SEQ ID NO: 6, realizado en la SEQ ID NO: 8 (nucleótido [nt]) y SEQ ID NO: 16 (aminoácido [aa]); de Arg en Gly en el aminoácido 1164 de la SEQ ID NO: 3, conferida, por ejemplo, por la mutación de a en g en la posición 5289 de la SEQ ID NO: 6, realizado en la SEQ ID NO: 9 (nt) y SEQ ID NO: 17 (aa); de Ala en Ser en el aminoácido 1174 de la SEQ ID NO: 3, conferida, por ejemplo, por la mutación de g en t en la posición 5320 de la SEQ ID NO: 6, realizada en la SEQ ID NO: 10 (nt) y la secuencia de aminoácidos de NS5A de la SEQ ID NO: 19; de Ser en Cys en el aminoácido 1172 de la SEQ ID NO: 3, conferida, por ejemplo, por la mutación de c en g en la posición 5315 de la SEQ ID NO: 6, realizada en el gen de NS5A de la SEQ ID NO: 11 y la secuencia de aminoácidos de NS5A de la SEQ ID NO: 20; y de Ser en Pro en el aminoácido 1172 de la SEQ ID NO: 3, conferida, por ejemplo por la mutación de t en c en la posición 5314 de la SEQ ID NO: 6, realizada en el gen de NS5A de la SEQ ID NO: 12 y la SEQ ID NO: 21 de aminoácidos de NS5A. El efecto adaptativo de estas mutaciones es sorprendente puesto que esta región del VHC normalmente es conservada entre los aislados de VHC. Además, las eliminaciones dentro de la ISDR, incluyendo las eliminaciones de la ISDR entera y varias secuencias flanqueadoras, produce este efecto de adaptación. Entre estas eliminaciones está la sustitución de la ISDR y secuencia flanqueadora que comprende los aminoácidos 1182 a 1229 de la SEQ ID NO: 3 por una tirosina, conferida, por ejemplo, por la eliminación de los nt 5345-5485 de la SEQ ID NO: 6, y realizada en la SEQ ID NO: 7 (nt) y la SEQ ID NO: 14 de aminoácidos de NS5A.

Las variantes del VHC que comprenden mutaciones de adaptación al cultivo celular también se pueden atenuar, es decir, deteriorar su capacidad para producir enfermedad, establecer infecciones crónicas, desencadenar respuestas autoinmunitarias y transformar células.

La presente invención también describe procedimientos para seleccionar variantes adaptativas del VHC. Estos procedimientos comprenden el uso de un virión de VHC o preferiblemente un replicón, que además comprende un marcador seleccionable dominante tal como un gen *neo*. Las células son transfectadas con estas variantes. Los transfectantes se cultivan en medio de selección, tal como con G418 cuando se usa el gen *neo* en la variante. Las colonias que surgen que presentan resistencia al marcador seleccionable se subpasan a medio de selección de nueva aportación. El VHC en las colonias que aguantan el subpase para establecer una línea celular que alberga la replicación del VHC, se puede aislar y usar para transfectar células adicionales. Cualquiera de estas colonias que muestran una mayor eficacia de transfección u otras características deseables, tales como la capacidad para aguantar subpases, son variantes adaptativas en las que la naturaleza adaptativa de la variante la confiere al menos una mutación o eliminación. Se secuencian zonas seleccionadas del VHC en estas variantes adaptativas. Preferiblemente, se secuencian al menos la NS5A. Más preferiblemente, se secuencian la región que codifica la

poliproteína entera. Cualquier mutación en estas variantes se puede evaluar además para determinar la naturaleza adaptativa de las mutaciones. La evaluación implica preferiblemente recrear la mutación en otra región codificante natural y determinar si el mutante del VHC recreado presenta el fenotipo adaptativo del mutante original.

5 Las mutaciones adaptativas también se podrían poner de manifiesto por, pero sin restringir: (i) alteración del tropismo de la replicación del ARN del VHC; (ii) alteración de los productos víricos responsables de los efectos perjudiciales en las células huésped; (iii) aumento o disminución de la eficacia de replicación del ARN del VHC; (iv) aumento o disminución de la eficacia de empaquetamiento del ARN del VHC y/o ensamblaje y liberación de partículas de VHC; (v) alteración del tropismo celular a nivel de unión al receptor y entrada. Por lo tanto, el marcador
 10 seleccionable dominante diseñado, cuya expresión depende de la replicación productiva del ARN de VHC, se puede usar para seleccionar mutaciones adaptativas en la maquinaria de replicación del VHC o la célula huésped transfectada, o ambos. Además, los marcadores seleccionables dominantes se pueden usar para seleccionar mutaciones en la maquinaria de replicación del VHC que permite niveles más altos de replicación del ARN o de formación de partículas. En un ejemplo, los derivados del VHC diseñados que expresan una forma mutante de la
 15 DHFR se pueden usar para conferir resistencia al metotrexato (MTX). Como marcador seleccionable dominante, la DHFR mutante no es eficaz puesto que son necesarias cantidades casi estequiométricas para la resistencia al MTX. Al aumentar sucesivamente las concentraciones de MTX en el medio, serán necesarias cantidades crecientes de DHFR para la supervivencia continuada de las células que albergan el ARN del VHC replicativo. Este esquema de selección, o similares basados en este concepto, puede dar como resultado la selección de mutaciones en la
 20 maquinaria de replicación del ARN del VHC que permiten niveles más altos de replicación del ARN del VHC y acumulación de ARN. Se pueden aplicar selecciones similares para mutaciones que permiten la producción de rendimientos mayores de partículas de VHC en cultivo celular o partículas de VHC mutante con tropismo celular alterado. Dichos esquemas de selección implican recoger partículas de VHC de líquidos sobrenadantes de cultivos o después de alteración celular y seleccionar las partículas de transducción resistentes al MTX por reinfección de
 25 células vírgenes.

Se pueden usar procedimientos similares al anterior para establecer variantes adaptativas con variaciones en las características tales como mayor o menor capacidad para producir infección, capacidad para producir infección en un huésped que la cepa natural no es capaz de infectar, o células de dicho huésped.

30 La invención también proporciona líneas de células huésped transfectadas con cualquiera de los ADN de VHC (o ARN de VHC) establecidos antes. Los ejemplos de células huésped incluyen, pero sin estar limitados a el grupo que consiste en una célula bacteriana, una célula de levadura, una célula de insecto y una célula de mamífero. Preferiblemente, la célula huésped es capaz de proporcionar la expresión de la ARN replicasa del VHC funcional,
 35 viriones o proteínas de partículas víricas.

En un aspecto relacionado, como se ha descrito resumidamente antes, la invención proporciona un vector para la terapia génica o una vacuna génica (también denominada en el presente documento una vacuna genética), en la que una proteína heteróloga se inserta en el ácido nucleico de VHC en condiciones que permiten la expresión de la
 40 proteína heteróloga. Estas vacunas pueden ser ADN o ARN. En particular, la invención proporciona una vector de ADN del virus de la hepatitis C (VHC) infeccioso que comprende de 5' a 3' en el ADN en el sentido positivo, una región 5' no traducida (NTR) del VHC que contiene la secuencia 5'-terminal en el extremo GCCAGCC; una región que codifica la poliproteína del VHC que comprende una región codificante de un gen heterólogo; y una región 3' no traducida (NTR). Preferiblemente, el promotor se selecciona del grupo que consiste en bacteriófago T3, T7 y SP6.

45 En las realizaciones de la invención en las que el ácido nucleico funcional del VHC es ADN, puede comprender además un promotor operativamente asociado a la 5' NTR. Por ejemplo, pero no como limitación, el promotor se puede seleccionar del grupo que consiste en bacteriófago T7, T3 y SP6. Sin embargo, se puede usar cualquier promotor adecuado para la transcripción del ARN genómico del VHC correspondiente al ADN del VHC, dependiendo
 50 del sistema de transcripción específico usado. Por ejemplo, para la transcripción nuclear (p. ej., en un animal transgénico para el VHC), se puede usar un promotor endógeno o vírico, tal como el CMV. Además, estos ADN dirigidos por promotor se pueden incorporar en un ADN de replicación extracromosómica, tal como un plásmido o un fago.

55 En el presente documento se contemplan diferentes usos de las variantes de la invención. Los usos relevantes para la terapia y el desarrollo de vacunas incluyen: (i) la generación de cepas definidas de virus VHC definidas para desarrollar ensayos in vitro e in vivo para la neutralización, unión, penetración y entrada del virus; (ii) estudios de estructura/función de proteínas y elementos de ARN de VHC e identificación de nuevos objetivos antivíricos; (iii) una vigilancia sistemática de los sistemas y condiciones de cultivos celulares para identificar los que soportan la

- replicación del ARN de VHC natural y variante y la liberación de partículas; (iv) producción de variantes adaptativas del VHC capaces de una replicación más eficaz en cultivo celular; (v) producción de variantes del VHC con tropismo tisular o de especie alterado; (vi) establecimiento de modelos animales alternativos para la evaluación de inhibidores, incluyendo los que soportan la replicación de variantes del VHC; (vii) desarrollo de ensayos de replicación del VHC sin células; (viii) producción de partículas de VHC inmunógenas para vacunación; (ix) diseño de derivados de VHC atenuados como posibles candidatos de vacunas; (x) diseño de derivados del VHC atenuados o defectuosos para la expresión de productos génicos heterólogos para la terapia génica y aplicaciones de vacunas; (xi) uso de glicoproteínas del VHC para la administración dirigida de agentes terapéuticos al hígado y otros tipos de células con receptores adecuados.
- 5 Se describe un procedimiento para infectar un animal con variantes del VHC, en el que el procedimiento comprende administrar una dosis infecciosa del ARN variante del VHC preparado por transcripción de ADN variante del VHC infecciosa. Esto se extiende a un animal no humano infectado con variantes del VHC o transfectado con ARN o ADN de variante del VHC. Igualmente, se describe un procedimiento para propagar variantes del VHC infecciosas in vitro, que comprende cultivar una línea celular en contacto con una cantidad infecciosa de ARN variante del VHC preparado por transcripción del ADN del VHC infeccioso, así como una línea celular in vitro infectada con variantes de VHC. En una realización específica, la línea celular es una línea celular de hepatocitos transfectada o infectada con una variante del VHC en la que se ha diseñado un casete de IRES-resistencia a antibiótico para proporcionar la selección. La variante también puede comprender las mutaciones adaptativas descritas antes.
- 10 De acuerdo con la terapia génica (vacuna genética), también se describe un procedimiento para transducir un gen heterólogo a un animal capaz de replicación del ARN del VHC, que comprende administrar una cantidad del ARN variante del VHC preparado por transcripción del vector de ADN variante del VHC.
- 15 También se describe un procedimiento para producir proteínas de partículas de VHC, que comprende cultivar una línea celular de expresión huésped transfectada con una variante del VHC de la invención, en condiciones que permitan la expresión de las proteínas de partículas de VHC; y aislar proteínas de partículas de VHC del cultivo celular. En una realización específica, dicha línea celular de expresión puede ser una célula seleccionada del grupo que consiste en una célula bacteriana, una célula de levadura, una célula de insecto y una célula de mamífero.
- 20 También se describe un virión de VHC que comprende un genoma de ARN variante del VHC. Dichos viriones se pueden usar en una vacuna para el VHC, preferiblemente después de atenuación, p. ej., por tratamiento térmico o químico, o por selección de variantes atenuadas por los procedimientos descritos antes.
- 25 Las variantes del VHC in vivo e in vitro de la invención permiten la selección controlada de agentes dirigidos contra el VHC (es decir, fármacos para el tratamiento del VHC), así como la evaluación de la resistencia a fármacos. Un procedimiento in vivo para la selección de agentes capaces de modular la replicación del VHC puede comprender administrar un agente candidato a un animal que contiene una variante del VHC, y ensayar el aumento o disminución del nivel de infección, replicación o actividad de la variante del VHC comparado con el nivel de infección, replicación o actividad de la variante de VHC en el animal antes de administrar el agente candidato; en el que una disminución del nivel de infección, replicación o actividad de la variante del VHC comparado con el nivel de infección, replicación o actividad de la variante del VHC en el animal antes de administrar el agente candidato, indica la capacidad del agente para inhibir la infección, replicación o actividad de la variante del VHC. El ensayo del nivel de infección o replicación de la variante del VHC puede implicar medir el título de virus (p. ej., niveles de ARN) en una muestra de suero o tejido del animal; ensayar el nivel de actividad de la variante de VHC puede implicar medir enzimas hepáticas. Alternativamente, un procedimiento in vitro para seleccionar los agentes capaces de modular la replicación del VHC puede comprender poner en contacto una línea celular que soporta una variante del VHC replicativa con un agente candidato; y después ensayar un aumento o disminución en un nivel de replicación o actividad de la variante del VHC comparado con un nivel de replicación o actividad de la variante del VHC en una línea celular de control o en la línea celular antes de la administración del agente candidato, en el que una disminución del nivel de replicación o actividad de la variante del VHC comparado con el nivel de replicación o actividad de la variante del VHC en una línea celular de control o en la línea celular antes de la administración del agente candidato, indica la capacidad del agente para inhibir replicación o actividad de la variante del VHC. En una realización específica, el ensayo del nivel de replicación de la variante del VHC in vitro puede implicar medir el título de VHC (p. ej., niveles de ARN) en el cultivo celular; ensayar el nivel de actividad del VHC in vitro puede implicar medir la replicación del VHC.
- 30
35
40
45
50
55

Además de los clones de ADN variante del VHC específicos y ARN variantes del VHC relacionados, la invención se dirige a un procedimiento para preparar un clon de ADN variante del VHC que es capaz de replicación en un

- huésped o línea celular huésped, que comprende unir de 5' a 3' en el ADN en sentido positivo un promotor; una región 5' no traducida (NTR) del VHC, una región que codifica la poliproteína del VHC; y una región 3' no traducida (NTR), en el que al menos una de estas regiones no es una región que existe de forma natural. Preferiblemente, el promotor se selecciona del grupo que consiste en el bacteriófago T7, T3 y SP6. En una realización específica, el extremo de la secuencia 5'-terminal es homóloga a la SEQ ID NO: 1, p. ej., la secuencia 5'-terminal se puede seleccionar del grupo que consiste en GCCAGCC; GGCCAGCC; UGCCAGCC; AGCCAGCC; AAGCCAGCC; GAGCCAGCC; GUGCCAGCC; y GCGCCAGCC, en el que la secuencia GCCAGCC es el extremo 5' de la SEQ ID NO: 1.
- 10 La 3' NTR poli-U para usar en el procedimiento de preparación de un clon de ADN variante del VHC, puede incluir una región poli-U larga. Igualmente, el extremo de 3' NTR puede ser ARN homólogo a un ADN que tiene la secuencia 5'-TGGTGGCTCCATCTTAGCCCTAGTCACGGCTAGCTGTGAAAGGTCCGTGAGCC GCATGACTGCAGAGAGT-GCTGATACTGGCCTCTCTGCTGATCATGT-3' (SEQ ID NO: 2); en una realización específica, el extremo de 3' NTR tiene la secuencia anterior.
- 15 *Componentes de clones de ADN variantes del VHC funcionales.* Los componentes del ADN variante del VHC funcionales descritos en esta invención se pueden usar para desarrollar ensayos de selección sin células, en cultivo celular y basados en animales, para objetivos antivíricos del VHC conocidos o recién identificados, como se describe a continuación. Para cada objetivo seleccionado, se prefiere que la variante del VHC usada tenga la forma natural del objetivo. Los ejemplos de objetivos conocidos o sospechados y que se ensayan incluyen [Véase Houghton, en "Fields Virology" (B. N. Fields, D. M. Knipe and P. M. Howley, Eds.), Vol. pág. 1035-1058. Raven Press, New York (1996); Rice, (1996) Véase antes; Rice y col., Antiviral Therapy 1, Supl. 4,11-17 (1997); Shimotohno, *Hepatology* 21,:887-8 (1995) para revisiones], pero sin estar limitados a los siguientes:
- 25 La 5' NTR altamente conservada, que contiene elementos esenciales para la traducción del ARN genómico del VHC entrante, es un objetivo. También es probable que esta secuencia, o su complementaria, contenga elementos de ARN importantes para la replicación del ARN y/o el empaquetamiento. Las potenciales estrategias terapéuticas incluyen: oligonucleótidos no codificantes (Véase antes); ribozimas que actúan en *trans* (Véase antes); señuelos de ARN; compuestos moléculas pequeñas que interfieren con la función de este elemento (estos podrían actuar uniéndose al propio elemento de ARN o a factores celulares o víricos cognados necesarios para la actividad).
- 30 Otro objetivo es la proteína C del VHC (cápside o núcleo) que está altamente conservada y se asocia con las siguientes funciones: unión a ARN y encapsidación específica del ARN genómico del VHC; modulación transcripcional de genes celulares [Ray y col., *Virus Res.* 37:209-220 (1995)] y otros genes víricos [Shih y col., *J. Virol.* 69:1160-1171 (1995); Shih y col., *J. Virol.* 67:5823-5832 (1993)]; unión de la helicasa celular [You y col., *J. Virol.* 73:2841-2853 (1999)]; transformación celular [Ray y col., *J. Virol.* 70:4438-4443 (1996a); Ray y col., *J. Biol. Chem.* 272:10983-10986(1997)]; prevención de apoptosis [Ray y col., *Virol.* 226:176-182 (1996b)]; modulación de la respuesta inmunitaria del huésped por unión a miembros de la superfamilia de receptores de TNF [Matsumoto y col., *J. Virol.* 71:1301-1309 (1997)].
- 40 Las glicoproteínas E1, E2 y quizás E2-p7 que forman los componentes de la envuelta del virión son objetivos para anticuerpos potencialmente neutralizantes. Las etapas clave en las que se puede dirigir la intervención incluyen: escisión mediada por la señal peptidasa de estos precursores de la poliproteína [Lin y col., (1994a) Véase antes]; ensamblaje al ER del complejo de glicoproteínas E1E2 y asociación de estas proteínas con chaperonas celulares y maquinaria de plegado [Dubuisson y col., (1994) Véase antes; Dubuisson y Rice, *J. Virol.* 70: 778-786 (1996)]; ensamblaje de las partículas víricas incluyendo interacciones entre la nucleocápside y la envuelta del virión; transporte y liberación de partículas víricas; la asociación de partículas víricas con componentes del huésped tales como VLDL [Hijikatay col., (1993) Véase antes; Thomssen y col., (1992) Véase antes; Thomssen y col., *Med. Microbiol. Immunol.* 182: 329-334 (1993)] que puede tener una función en la elusión de la vigilancia inmunitaria o en la unión y entrada de células que expresan el receptor de LDL; determinantes conservados y variables en el virión que son objetivos para la neutralización por anticuerpos o que se unen a anticuerpos para facilitar la infección de células inmunopotenciada por interacción con receptores Fc cognados; determinantes conservados y variables en el virión importantes para la unión al receptor y entrada; determinantes del virión que participan en la entrada, fusión con las membranas celulares y desprendimiento de la envoltura de la nucleocápside vírica entrante.
- 55 La NS2-3 autoproteasa, que es necesaria para la escisión en el sitio 2/3 es un objetivo adicional.
- La NS3 serina proteasa y el cofactor de NS4A que forma un complejo y media cuatro escisiones en la poliproteína del VHC [Véase Rice, (1997) Véase antes para una revisión] es también otro objetivo adecuado. Los objetivos

incluyen la propia actividad de la serina proteasa; el sitio de coordinación tetraédrico del Zn^{2+} en el dominio C-terminal de la serina proteasa; la interacción del cofactor de NS3-NS4A; la asociación de membrana de NS4A; la estabilización de NS3 por NS4A; el potencial de transformación de la región de NS3 proteasa [Sakamuro y col., *J. Virol.* 69: 3893-6 (1995)].

5

Las actividades de la NTPasa estimulada por el ARN de NS3 [Suzich y col., (1993) Véase antes], ARN helicasa [Jin y Peterson, *Arch. Biochem. Biophys.* 323:47-53 (1995); Kim y col., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 215:160-6 (1995)] y de unión del ARN [Kanai y col., *FEBS Lett.* 376: 221-4 (1995)]; la proteína NS4A como un componente del complejo de replicación de ARN, son otros objetivos potenciales.

10

La proteína NS5A, otro componente de la replicación, representa otro objetivo. Esta proteína es fosforilada predominantemente en restos de serina [Tanji y col., *J. Virol.* 69: 3980-3986 (1995)]. Las actividades de NS5A de modulación de la transcripción, promoción del crecimiento celular e inhibición de la apoptosis [Ghosh y col., *J. Biol. Chem.* 275:7184-7188 (2000)] pueden ser un objetivo. Otras características de NS5A que podrían ser objetivos

15

incluyen la quinasa responsable de la fosforilación de NS5A y su interacción con NS5A, y la interacción con NS5A y otros componentes del complejo de replicación del VHC.

La ARN polimerasa dirigida por ARN de NS5A, que es la enzima responsable de la síntesis real de los ARN de cadena positiva y negativa del VHC, es otro objetivo. Los aspectos específicos de su actividad incluyen la propia actividad de polimerasa [Behrens y col., *EMBO J.* 15:12-22 (1996)]; las interacciones de NS5B con otros componentes de replicasa, incluyendo los ARN del VHC; las etapas implicadas en el inicio de la síntesis del ARN de cadena negativa y positiva; la fosforilación de NS5B [Hwang y col., *Virology* 227:438 (1997)].

20

Otros objetivos incluyen funciones de proteínas estructurales o no estructurales importantes para la replicación del ARN del VHC y/o la modulación de la función de la célula huésped. Los posibles componentes de proteína hidrófobos capaces de formar canales importantes para la entrada de virus, salida o modulación de la expresión de genes de la célula huésped, pueden ser objetivo.

25

La 3' NTR, en especial los elementos altamente conservados (tramo de poli(U/UC); secuencia terminal de 98 bases) puede ser el objetivo. Los procedimientos terapéuticos van en paralelo a los descritos para la 5' NTR, excepto que esta parte del genoma es probable que tenga una función importante en el inicio de la síntesis de la cadena negativa. También puede estar implicado en otros aspectos de la replicación del ARN del VHC, incluyendo la traducción, estabilidad del ARN o empaquetamiento.

30

Las variantes funcionales del VHC de la presente invención pueden codificar todas las proteínas víricas y elementos de ARN necesarios para el empaquetamiento del ARN. Estos elementos pueden ser objetivo para el desarrollo de compuestos antivíricos. Se pueden usar ensayos de desplazamiento por movilidad electroforética, entrecruzamiento por UV, unión al filtro y ensayos de 3 híbridos [SenGupta y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8496-8501 (1996)] para definir la proteína y los elementos de ARN importantes para el empaquetamiento del ARN del VHC y establecer ensayos para seleccionar los inhibidores de este proceso. Dichos inhibidores pueden incluir moléculas pequeñas o señuelos de ARN producidos por selección in vitro [Gold y col., (1995) Véase antes].

35

Se pueden preparar bibliotecas de complejos de las variantes de la presente invención usando barajado por PCR, incorporando secuencias aleatorizadas, tales como las generadas en bibliotecas de "presentación de péptidos". Usando el "procedimiento de fagos" [Scott y Smith, 1990, *Science* 249:386-390 (1990); Cwirla, y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 87:6378-6382 (1990); Devlin y col., *Science*, 249:404-406 (1990)] se pueden construir bibliotecas muy grandes (10^6 - 10^9 entidades químicas). Los clones procedentes de estas bibliotecas se pueden usar para generar otras variantes o quimeras, p. ej., usando diferentes subtipos del VHC. Dichas variantes se pueden generar por métodos conocidos en la materia, sin excesiva experimentación.

45

50

Un clon que incluye un cebador y una secuencia de prueba de transcripción se puede usar directamente para la producción de ARN variante del VHC funcional. Se puede usar un gran número de sistemas de vector-huésped conocidos en la materia. Los ejemplos de vectores incluyen, pero sin estar limitados a *E. coli*, bacteriófagos tales como derivados lambda o plásmidos tales como derivados de pBR322 o derivados plasmídicos de pUC, p. ej., vectores pGEX, pmal-c, pFLAG, pTET, etc. Como se sabe, la inserción en un vector de clonación se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante el ligado del fragmento de ADN a un vector de clonación que tenga extremos cohesivos complementarios. Sin embargo, si los sitios de restricción complementarios usados para la fragmentación del ADN no están presentes en el vector de clonación, los extremos de las moléculas de ADN se pueden modificar enzimáticamente. Alternativamente, se podría producir cualquier sitio deseado mediante ligado de secuencias de

55

nucleótidos (conectores) en los extremos del ADN; estos conectores ligados pueden comprender oligonucleótidos químicamente sintetizados específicos que codifican secuencias de reconocimiento de endonucleasas de restricción. Se pueden introducir moléculas recombinantes en las células huésped por transformación, transfección, infección, electroporación, etc., de modo que se generan muchas copias de la secuencia génica.

5

Expresión del ARN y polipéptidos del VHC

El ADN variante del VHC, que codifica el ARN variante del VHC y las proteínas del VHC, en particular la ARN replicasa del VHC o proteínas de virión, se puede insertar en un vector de expresión adecuado, es decir, un vector que contiene los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia insertada que codifica la proteína. Dichos elementos se denominan en el presente documento un "promotor". Por lo tanto, el ADN variante del VHC de la invención está operacionalmente (u operativamente) asociado a un promotor en un vector de expresión de la invención. Un vector de expresión también incluye preferiblemente un origen de replicación. Las señales de transcripción y traducción necesarias se pueden proporcionar en un vector de expresión recombinante. En una realización preferida para la síntesis in vitro de ARN funcionales, se usa el promotor T7, T3 o SP6.

Los potenciales sistemas de huésped-vector incluyen, pero sin estar limitados a sistemas de células de mamíferos infectadas con virus recombinantes (p. ej., virus vaccinia, adenovirus, virus Sindbis, virus del bosque Semliki, etc.); sistemas de células de insecto infectadas con virus recombinantes (p. ej. baculovirus); microorganismos tales como levaduras que contienen vectores de levaduras; células vegetales; o bacterias transformadas con bacteriófagos, ADN, ADN plasmídico o ADN cósmido. Los elementos de expresión de los vectores varían en su fuerza y especificidad. Dependiendo del sistema huésped-vector usado, se puede usar cualquiera de una serie de elementos de transcripción y traducción adecuados.

La célula en la que se ha introducido el vector recombinante que comprende el clon de ADN variante del VHC se cultiva en un medio de cultivo celular adecuado en condiciones que proporcionan la expresión del ARN del VHC o dichas proteínas del VHC por la célula. Se puede usar cualquiera de los procedimientos previamente descritos para la inserción de fragmentos de ADN en un vector de clonación, para construir vectores de expresión que contienen un gen que consiste en señales de control de la transcripción/traducción adecuadas y las secuencias que codifican las proteínas. Estos procedimientos pueden incluir técnicas de ADN recombinante in vitro y sintéticas y recombinación in vivo (recombinación genética).

La expresión del ARN variante del VHC o proteína se puede controlar mediante cualquier elemento promotor/potenciador conocido en la materia, pero estos elementos reguladores deben ser funcionales en el huésped seleccionado para la expresión. Los promotores que se pueden usar para controlar la expresión incluyen, pero sin estar limitados a la región promotora temprana de SV40 (Benioist y Chambon, 1981, *Nature* 290:304-310), el promotor contenido en la repetición 3' terminal larga del virus del sarcoma de Rous (Yamamoto, y col., 1980, *Cell* 22:787-797), el promotor de la timidina quinasa del virus del herpes (Wagner y col., 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:1441-1445), las secuencias reguladoras del gen de la metalotioneína (Brinster y col., 1982, *Nature* 296:39-42); vectores de expresión procariotas tales como el promotor de la β -lactamasa (Villa-Kamaroff, y col., 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75:3727-3731), o el promotor tac (DeBoer, y col., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80:21-25); elementos promotores de levaduras u otros hongos tales como el promotor de la Gal 4, el promotor de la ADC (alcohol deshidrogenasa), promotor de la PGK (fosfoglicerol quinasa), promotor de la fosfatasa alcalina; y las regiones de control de la transcripción animal, que presentan especificidad de tejido y se han usado en animales transgénicos: región de control del gen de la elastasa I que es activo en células acinares pancreáticas (Swift y col., 1984, *Cell* 38:639-646; Ornitz y col., 1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409; MacDonald, 1987, *Hepatology* 7:425-515); región de control del gen de la insulina que es activo en células beta pancreáticas (Hanahan, 1985, *Nature* 315: 115-122), región de control del gen de la inmunoglobulina que es activo en células linfáticas (Grosschedl y col., 1984, *Cell* 38:647-658; Adames y col., 1985, *Nature* 318:533-538; Alexander y col., 1987, *Mol. Cell. Biol.* 7:1436-1444), región de control del virus del tumor mamario de ratón que es activo en células testiculares, mamarias, linfáticas y mastocitos (Leder y col., 1986, *Cell* 45:485-495), región de control del gen de la albúmina que es activo en el hígado (Pinkert y col., 1987, *Genes and Devel.* 1:268-276), región de control del gen de la alfa-fetoproteína que es activo en el hígado (Krumlauf y col., 1985, *Mol. Cell. Biol.* 5:1639-1648; Hammer y col., 1987, *Science* 235:53-58), región de control del gen de la alfa 1-antitripsina que es activa en el hígado (Kelsey y col., 1987, *Genes and Devel.* 1:161-171), región de control del gen de la beta-globina que es activo en células mieloides (Mogram y col., 1985, *Nature* 315: 338-340; Kollias y col., 1986, *Cell* 46:89-94), región de control del gen de la proteína básica de mielina que es activo en oligodendrocitos en el cerebro (Readhead y col., 1987, *Cell* 48:703-712), región de control del gen de la cadena ligera 2 de miosina que es activo en el músculo esquelético (Sani, 1985, *Nature* 314:283-286), y región de control del gen de la hormona liberadora de gonadotropina que es activo en el

hipotálamo (Mason y col., 1986, *Science* 234:1372-1378).

Se puede usar una gran variedad de combinaciones de huésped/vector de expresión en la expresión de las secuencias de ADN de esta invención. Los vectores de expresión útiles, por ejemplo, pueden consistir en segmentos de secuencias de ADN cromosómico, no cromosómico y sintético. Los vectores adecuados incluyen derivados de SV40 y plásmidos bacterianos conocidos, p. ej., plásmidos de *E. coli* col E1, pCR1, pBR322, pMal-C2, pET, pGEX [Smith y col., 1988, *Gene* 67:31-40], pMB9 y sus derivados, plásmidos tales como RP4; ADN de fagos, p. ej., los numerosos derivados de fago λ , p. ej., NM989 y otros ADN de fago, p. ej., M13 y ADN de fago monocatenario filamentoso; plásmidos de levaduras tales como los plásmidos 2 μ o sus derivados; vectores útiles en células eucariotas, tales como vectores útiles en células de insecto o mamífero; vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN de fago, tales como plásmidos que se han modificado para usar ADN de fago u otras secuencias de control de la expresión; y similares, conocidos en la materia.

Además del análisis de secuencias preferido, se pueden identificar vectores de expresión que contienen un clon de ADN variante del VHC, por cuatro procedimientos generales: (a) amplificación por PCR del ADN plasmídico deseado o ARNm específico, (b) hibridación de ácidos nucleicos, (c) presencia o ausencia de funciones génicas de un marcador de selección, (d) análisis con endonucleasas de restricción adecuadas, y (e) expresión de las secuencias insertadas. En el primer procedimiento, los ácidos nucleicos se pueden amplificar por PCR para proporcionar la detección del producto amplificado. En el segundo procedimiento, la presencia de ácidos nucleicos en un vector de expresión se puede detectar mediante hibridación de ácidos nucleicos usando sondas que comprenden las secuencias que son homólogas al ADN variante del VHC. En el tercer procedimiento, el sistema vector recombinante/huésped se puede identificar y seleccionar basándose en la presencia o ausencia de determinadas funciones génicas de un "marcador de selección" (p. ej., actividad de β -galactosidasa, actividad de timidina quinasa, resistencia a antibióticos, fenotipo de transformación, formación de cuerpos de oclusión en baculovirus, etc.), causada por la inserción de genes exógenos en el vector. En el cuarto procedimiento, los vectores de expresión recombinantes se identifican por digestión con enzimas de restricción adecuadas. En el quinto procedimiento, los vectores de expresión recombinantes se pueden identificar ensayando la actividad, características bioquímicas o inmunológicas del producto génico expresado por ejemplo por el ARN del VHC recombinante, viriones del VHC o proteínas víricas del VHC.

Por ejemplo, en un sistema de expresión de baculovirus, se pueden usar tanto vectores de transferencia de no fusión, tales como, pero sin estar limitados a pVL941 (sitio de clonación de *Bam*HI; Summers), pVL1393 (sitios de clonación de *Bam*HI, *Sma*I, *Xba*I, *Eco*RI, *Not*I, *Xma*III, *Bgl*II y *Pst*II; Invitrogen), pVL1392 (sitios de clonación de *Bgl*II, *Pst*I, *Not*I, *Xma*III, *Eco*RI, *Xba*I, *Sma*I, y *Bam*HI; Summers e Invitrogen), y pBlueBacIII (sitios de clonación de *Bam*HI, *Bgl*II, *Pst*I, *Nco*I y *Hind*III, con posible selección de recombinantes azul/blanco; Invitrogen), como vectores de transferencia de fusión, tales como, pero sin estar limitados a pAc700 (sitios de clonación de *Bam*HI y *Kpn*I, en el que el sitio de reconocimiento de *Bam*HI empieza con el codón de inicio; Summers), pAc701 y pAc702 (iguales que pAc700, con diferentes marcos de lectura), pAc360 (sitio de clonación de *Bam*HI 36 pares de bases en dirección 3' de un codón de inicio de polihedrina; Invitrogen (195)), y pBlueBacHisA, B, C (tres marcos de lectura diferentes, con los sitios de clonación de *Bam*HI, *Bgl*II, *Pst*I, *Nco*I, y *Hind*III, un péptido N-terminal para la purificación por ProBond, y selección de recombinantes azul/blanco de placas; Invitrogen).

Ejemplos de vectores de expresión de mamíferos contemplados para usar en la invención incluyen vectores con promotores inducibles, tales como los promotores de la dihidrofolato reductasa (DHFR), p. ej., cualquier vector de expresión con un vector de expresión de *DHFR* o un vector de amplificación conjunta de *DHFR*/metotrexato tal como pED (sitios de clonación de *Pst*II, *Sal*I, *Sba*I, *Sma*I y *Eco*RI, con el vector que expresa tanto el gen clonado como *DHFR*); [véase, Kaufman, *Current Protocols in Molecular Biology*, 16.12 1991]. Alternativamente, un vector de amplificación conjunta de glutamina sintetasa/metionina sulfoximina, tal como pEE14 (sitios de clonación de *Hind*III, *Xba*I, *Sma*I, *Sba*I, *Eco*RI y *Bcl*I en los que el vector expresa la glutamina sintetasa y el gen clonado; Celltech). En otra realización, se puede usar un vector que dirige la expresión episomal bajo el control del virus Epstein Barr (EBV), tal como pREP4 (sitios de clonación de *Bam*HI, *Sfi*I, *Xho*I, *Not*I, *Nhe*I, *Hind*III, *Nhe*I, *Pvu*II y *Kpn*I, promotor del RSV-LTR constitutivo, marcador seleccionable de higromicina; Invitrogen), pCEP4 (sitios de clonación de *Bam*HI, *Sfi*I, *Xho*I, *Not*I, *Nhe*I, *Hind*III, *Nhe*I, *Pvu*II y *Kpn*I, gen temprano inmediato de hCMV constitutivo, marcador seleccionable de higromicina; Invitrogen), pMEP4 (sitios de clonación de *Kpn*I, *Pvu*I, *Nhe*I, *Hind*III, *Not*I, *Xho*I, *Sfi*I, *Bam*HI, promotor del gen de metalotioneína IIa inducible, marcador seleccionable de higromicina, Invitrogen), pREP8 (sitios de clonación de *Bam*HI, *Xho*I, *Not*I, *Hind*III, *Nhe*I y *Kpn*I, promotor del RSV-LTR, marcador seleccionable de histidinol; Invitrogen), pREP9 (sitios de clonación de *Kpn*I, *Nhe*I, *Hind*III, *Not*I, *Xho*I, *Sfi*I, *Bam*HI, promotor del RSV-LTR, marcador seleccionable de G418; Invitrogen), y pEBVHis (promotor del RSV-LTR, marcador seleccionable de higromicina, péptido N-terminal purificable mediante resina ProBond y escindido mediante enteroquinasa;

Invitrogen). Se pueden usar vectores de expresión de mamífero regulables, tales como Tet y rTet [Gossen y Bujard, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5547-51 (1992); Gossen y col., *Science* 268:1766-1769 (1995)]. Los vectores de expresión de mamífero seleccionables para usar en la invención incluyen pRc/CMV (sitios de clonación de *HindIII*, *BstXI*, *NotI*, *SbaI* y *Apal*, selección de G418, Invitrogen), pRc/RSV (sitios de clonación de *HindIII*, *SpeI*, *BstXI*, *NotI*, *XbaI*, selección de G418, Invitrogen) y otros. Los vectores de expresión de mamífero del virus de vaccinia [véase, Kaufman (1991), Véase antes] para usar en la presente invención incluyen, pero sin estar limitados a pSC11 (sitio de clonación de *SmaI*, selección de TK- y β -gal), pMJ601 (sitios de clonación de *Sall*, *SmaI*, *AflI*, *NarI*, *BspMII*, *BamHI*, *Apal*, *NheI*, *SacII*, *KpnI* y *HindIII*; selección de TK- y β -gal), y pTKgptF1S (sitios de clonación de *EcoRI*, *PstI*, *Sall*, *AccI*, *HindIII*, *SbaI*, *BamHI* y *HpaI*, selección de TK o XPRT).

10 Los ejemplos de sistemas de expresión de levaduras que se pueden usar de acuerdo con la invención, incluyen el vector pYES2 de no fusión (sitios de clonación de *XbaI*, *SphI*, *ShoI*, *NotI*, *GstXI*, *EcoRI*, *BstXI*, *BamHI*, *SacI*, *KpnI* y *HindIII*, Invitrogen), o el de fusión pYESHisA, B, C (sitios de clonación de *XbaI*, *SphI*, *ShoI*, *NotI*, *BstXI*, *EcoRI*, *BamHI*, *SacI*, *KpnI* y *HindIII*, péptido N-terminal purificado con resina ProBond y escindido con enteroquinasa; 15 Invitrogen), por mencionar solo dos.

Además, se puede elegir una cepa de células huésped que module la expresión de las secuencias insertadas, o modifique y procese el producto génico de la forma específica deseada. Las diferentes células huésped tienen características y mecanismos específicos para el procesamiento y modificación traduccional y postraduccional (p. ej., 20 glicosilación, escisión [p. ej., de la secuencia señal]) de proteínas. La expresión en levaduras puede producir un producto glicosilado. La expresión en células eucariotas puede aumentar la probabilidad de glicosilación y plegado "naturales" de una proteína del VHC. Además, la expresión en células de mamífero puede proporcionar una herramienta para reconstituir o constituir viriones de VHC natural o proteínas de partículas víricas.

25 En el presente documento se puede usar una variedad de procedimientos de transfección, útiles para otros estudios de virus de ARN sin excesiva experimentación. Los ejemplos incluyen microinyección, fusión celular, fosfato de calcio, liposomas catiónicos tales como lipofectina [Rice y col., *New Biol.* 1:285-296 (1989); Véase "HCV-based Gene Expression Vectors", Véase a continuación], DE-dextrano [Rice y col., *J. Virol.* 61: 3809-3819 (1987)], y electroporación [Bredenbeek y col., *J. Virol.* 67: 6439-6446 (1993); Liljeström y col., *J. Virol.* 65:4107-4113 (1991)]. 30 También se pueden considerar los procedimientos de carga por raspado [Kumar y col., *Biochem. Mol. Biol. Int.* 32:1059-1066 (1994)] y balísticos [Burkholder y col., *J. Immunol. Meth.* 165:149-156 (1993)] para los tipos de células refractarios a la transfección por esos otros procedimientos. Se puede contemplar un transportador de vector de ADN [véase, p. ej., Wu y col., 1992, *J. Biol. Chem.* 267:963-967; Wu y Wu, 1988, *J. Biol. Chem.* 263:14621-14624; Hartmut y col., solicitud de patente canadiense n° 2.012.311, presentada el 15 de marzo, 1990].

35 Transfección in vitro con variantes del VHC

Identificación de líneas celulares que soportan la replicación del VHC. Un aspecto importante de la invención es un procedimiento que proporciona el desarrollo de una terapia contra el VHC nueva y más eficaz, al conferir la 40 capacidad de evaluar la eficacia de las diferentes estrategias terapéuticas usando un sistema de replicación de variante del VHC in vitro, auténtico y normalizado. Dichos ensayos no se pueden valorar antes de continuar con los ensayos usando animales experimentales raros y valiosos, tales como el chimpancé o pacientes humanos infectados por el VHC. Las variantes adaptativas de la invención son particularmente útiles para este trabajo debido a que su crecimiento en cultivo y su capacidad para aguantar los subpases es superior a las cepas naturales. 45 Además, los replicones descritos en el presente documento son útiles porque la replicación se puede evaluar sin confundir los efectos de las proteínas estructurales.

La tecnología de clones infecciosos de variantes del VHC también se puede usar para establecer sistemas in vitro e in vivo para el análisis de la replicación y empaquetamiento del VHC. Esto incluye, pero no está restringido a (i) la 50 identificación o selección de tipos de células permisivas (para la replicación del ARN, ensamblaje del virión y liberación); (ii) la investigación de parámetros de cultivo celular (p. ej., condiciones de cultivo que varían, activación celular, etc.) o selección de mutaciones adaptativas que aumentan la eficacia de la replicación del VHC en cultivos celulares; y (iii) definición de las condiciones para la producción eficaz de partículas de variantes del VHC infecciosas (liberadas en el líquido sobrenadante del cultivo u obtenidas después de alteración celular). Estas y otras 55 extensiones fácilmente evidentes de la invención tienen una amplia utilidad para el desarrollo terapéutico, de vacunas y de diagnóstico del VHC.

Los procedimientos generales para identificar tipos de células permisivas se resumen más abajo. Los procedimientos óptimos para la transfección del ARN (Véase también antes), varían con el tipo de células y se

determinan usando constructos indicadores de ARN. Estas incluyen, por ejemplo, replicones bicistrónicos descritos antes y en los ejemplos, y virus bicistrónicos [Wang y col., *J. Virol.* 67: 3338-44 (1993)] con la estructura 5-CAT-HCV IRES-LUC-3'. Estas variantes del VHC se usan tanto para optimizar las condiciones de transfección (usando, p. ej., la medición la actividad de la β -galactosidasa o CAT [cloranfenicol acetiltransferasa] para determinar la eficacia de la transfección) como para determinar si el tipo de célula es permisivo para la traducción mediada por IRES de VHC (p. ej., midiendo LUC, actividad de la luciferasa). Para los experimentos reales de transfección de ARN del VHC, la cotransfección con un ARN indicador de luciferasa rematado en 5' [Wang y col., (1993) Véase antes] proporciona una referencia interna para la transfección productiva y traducción. Los ejemplos de tipos de células potencialmente permisivas para la replicación del VHC incluyen, pero no están restringidas, células humanas primarias (p. ej., hepatocitos, linfocitos T, linfocitos B, fibroblastos de prepucio) así como líneas celulares humanas continuas (p. ej., HepG2, Huh7, HUT78, HPB-Ma, MT-2, MT-2C, y otras líneas de linfocitos T infectadas por HTLV-1 y HTLV-II, Namalwa, Daudi, LCL transformadas por EBV). Además, se pueden ensayar líneas celulares de otras especies, en especial aquellas que son transfectadas fácilmente con ARN y permisivas para la replicación de flavivirus o pestivirus (p. ej., SW-13, Vera, BHK-21, COS, PK-15, MBCK, etc.). Las células se transfectan usando un procedimiento como se ha descrito antes.

Para los ensayos de replicación, se preparan transcritos de ARN usando la variante del VHC y el correspondiente derivado no funcional, p. ej., Δ GDD (Véanse ejemplos) como un control negativo, para la persistencia del ARN del VHC y antígeno en ausencia de replicación productiva. El ADN molde (que complica el análisis posterior) se elimina mediante ciclos repetidos de tratamiento con DNasa I y extracción ácida con fenol seguido de purificación por electroforesis en gel o filtración en gel, para lograr preferiblemente menos de una molécula de ADN amplificable por 10^9 moléculas de ARN transcrito. Los transcritos de ARN sin ADN se mezclan con ARN indicador de LUC y se usan para transfectar cultivos celulares usando las condiciones óptimas determinadas antes. Después de recuperar las células, se añade RNasa A al medio para digerir el exceso de ARN introducido y los cultivos se incuban durante diferentes periodos de tiempo. En un tiempo de medición temprano (~1 día después de transfección) se recogerá una muestra y se analizarán la actividad de la LUC (para verificar la transfección productiva) y los niveles de ARN de cadena positiva en las células y líquidos sobrenadantes (como un valor inicial). Se recogen muestras periódicamente durante 2-3 semanas y se ensayan los niveles de ARN de cadena positiva por QC-RT/PCR [Véase Kolykhalov y col., (1996), Véase antes]. Los tipos de células que muestran una diferencia clara y reproducible entre el control del transcrito infeccioso intacto y el derivado no funcional, p. ej., eliminación de Δ GDD, se pueden someter a análisis más profundo para verificar la replicación auténtica. Dichos ensayos incluyen la medición de la acumulación de ARN del VHC de sentido negativo por QC-RT/PCR [Gunji y col., Véase antes; Lanford y col., *Virology* 202: 606-14 (1994)], hibridación por transferencia Northern, o marcaje metabólico [Yoo y col., Véase antes] y procedimientos de una sola célula, tales como hibridación in situ [ISH; Gowans y col., en "Nucleic Acid Probes" (R. H. Symons, Eds.), Vol. pág. 139-158. CRC Press, Boca Raton. (1989)], PCR in situ [seguido de ISH para detectar solo los productos de amplificación específicos del VHC; Haase y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:4971-4975 (1990)], e inmunohistoquímica.

Partículas del VHC para estudiar las interacciones virus-receptor. En combinación con la identificación de las líneas celulares que son permisivas para la replicación del VHC, se pueden usar cepas de variantes del VHC definidas para evaluar la interacción del VHC con receptores celulares. Se pueden preparar ensayos que midan la unión del virus a células susceptibles o la infección productiva, y después usarlos para seleccionar inhibidores para estos procesos.

Identificación de líneas celulares para la caracterización de receptores del VHC. Se pueden seleccionar las líneas celulares permisivas para la replicación del ARN del VHC, ensayado por transfección de ARN, por su capacidad para ser infectadas por el virus usando las variantes del VHC de la presente invención. Las líneas celulares permisivas para la replicación del ARN pero que no pueden ser infectadas por virus homólogos pueden carecer de uno o más receptores del huésped necesarios para la unión del VHC y entrada. Dichas células proporcionan herramientas valiosas para (i) la identificación funcional y clonación molecular de receptores y correceptores del VHC; (ii) la caracterización de las interacciones virus-receptor; y (iii) ensayos de desarrollo para seleccionar compuestos o productos biológicos (p. ej., anticuerpos, ARN de SELEX [Bartel y Szostak, en "RNA-protein interactions" (K. Nagai y I.W. Mattaj, Eds.), Vol. pág. 82-102. IRL Press, Oxford (1995); Gold y col., *Annu. Rev. Biochem.* 64:763-797 (1995)], etc.) que inhiben estas interacciones. Una vez definidos de esta forma, estos receptores del VHC sirven no solo como objetivos terapéuticos sino que también pueden ser expresados en animales transgénicos haciéndolos susceptibles a la infección por el VHC [Koike y col., *Dev. Biol. Stand.* 78:101-7 (1993); Ren y Racaniello, *J. Virol.* 66: 296-304 (1992)]. Dichos modelos de animales transgénicos que soportan la replicación y propagación del VHC tienen importantes aplicaciones para evaluar fármacos dirigidos contra el VHC.

La capacidad de manipular la estructura de glicoproteínas del VHC también se puede usar para crear variantes del

VHC con especificidad por el receptor alterada. En un ejemplo, las glicoproteínas del VHC se pueden modificar para expresar un dominio de unión heterólogo para un receptor de superficie celular conocido. El procedimiento debería permitir el diseño de derivados del VHC con tropismo alterado y quizás infección extendida a modelos de animales pequeños no quiméricos.

5

Procedimientos alternativos para identificar líneas celulares permisivas. Como se ha discutido previamente y se ilustra en los ejemplos, se pueden diseñar variantes funcionales del VHC que comprenden marcadores seleccionables para la replicación del VHC. Por ejemplo, los genes que codifican marcadores seleccionables dominantes pueden ser expresados como parte de la poliproteína del VHC, o como cistrones separados situados en

10

Modelos animales para la infección y replicación del VHC

Además de los chimpancés, la presente invención permite el desarrollo de modelos animales alternativos para estudiar la replicación del VHC y evaluar nuevos productos terapéuticos. Usando clones de las variantes del VHC auténtico descritos en esta invención como materiales de partida, se pueden contemplar múltiples procedimientos para establecer modelos animales alternativos para la replicación del VHC. En una manifestación, las variantes se podrían usar para inocular a ratones inmunodeficientes que albergan tejidos humanos capaces de soportar la replicación del VHC. Un ejemplo de esta técnica es el ratón SCID:Hu, en la que se injerta en ratones con una

20

inmunodeficiencia combinada grave, diferentes tejidos humanos (o de chimpancé), que podrían incluir, pero sin estar limitados a hígado fetal, hígado de adulto, bazo o células mononucleares de sangre periférica. A parte de los ratones SCID, los ratones irradiados normales pueden servir como receptores para el injerto de tejidos humanos o de chimpancé. Estos animales quiméricos serían entonces sustratos para la replicación del VHC después de infección ex vivo o in vivo con inóculos definidos que contienen el virus.

25

En otro ejemplo, las mutaciones adaptativas que permiten la replicación del VHC en especies alternativas, pueden producir variantes que son permisivas para la replicación en esos animales. Por ejemplo, la adaptación del VHC para la replicación y propagación en líneas celulares continuas de roedores o tejidos primarios (tales como hepatocitos) podría permitir que el virus se replicara en modelos de roedores pequeños. Alternativamente, se pueden crear

30

bibliotecas de complejos de variantes del VHC creadas por barajado de ADN [Stemmer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10747 (1994)] u otros procedimientos conocidos en la técnica, y usar para la inoculación de animales potencialmente susceptibles. Dichos animales podrían ser inmunocompetentes o inmunodeficientes, como se ha descrito antes.

35

La actividad funcional de las variantes del VHC se puede evaluar de forma transgénica. En relación con esto, se puede usar un modelo de ratón transgénico [véase, p. ej., Wilmut y col., *Experientia* 47:905 (1991)]. Se puede usar el clon de ARN o ADN del VHC para preparar vectores transgénicos, incluyendo vectores víricos, clones plásmidos o cósmidos (o clones de fagos). Los cósmidos se pueden introducir en ratones transgénicos usando procedimientos publicados [Jaenisch, *Science*, 240:1468-1474 (1988)]. En la preparación de los ratones transgénicos los

40

embrionoblastos se obtienen de embriones en la etapa de blastocisto [Joyner, en *Gene Targeting: A Practical Approach. The Practical Approach Series*, Rickwood, D., and Hames, B. D., Eds., IRL Press: Oxford (1993)] y se transfectan con ADN o ARN variante del VHC. Las células transfectadas se inyectan en embriones tempranos, p. ej. embriones de ratón, como describen [Hammer y col., *Nature* 315:680 (1985); Joyner, Véase antes]. Se han descrito diferentes técnicas para la preparación de animales transgénicos [patente de EE.UU. n° 5.530.177, concedida el 25

45

de junio, 1996; patente de EE.UU. n° 5.898.604, concedida el 31 de diciembre, 1996]. Tienen un interés particular los

50

modelos de animales transgénicos en los que se estudian los efectos fenotípicos o patógenos de un transgén. Por ejemplo, los efectos de un gen de fusión de fosfoenolpiruvato carboxiquinasa-hormona del crecimiento bovina se han estudiado en cerdos [Wieghart y col., *J. Reprod. Fert., Suppl.* 41:89-96 (1996)]. Los ratones transgénicos que expresan un gen que codifica una proteína precursora del amiloide humano asociada a la enfermedad de Alzheimer, se usan para estudiar esta enfermedad y otros trastornos [publicación de patente internacional WO 96/06927, publicada el 7 de marzo, 1996; Quon y col., *Nature* 352:239 (1991)]. También se han creado ratones transgénicos para el agente delta de la hepatitis [Polo y col., *J. Virol.* 69: 5203 (1995)] y para el virus de la hepatitis B [Chisari, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 206:149 (1996)], y en estos animales diseñados se produce la replicación.

55

Por lo tanto, las variantes funcionales del VHC descritas en el presente documento, o partes de las mismas, se pueden usar para crear modelos transgénicos importantes para la replicación del VHC y la patogénesis. En un ejemplo, se pueden crear animales transgénicos que albergan el genoma entero de una variante del VHC. Los constructos adecuados para la expresión transgénica del genoma entero de la variante del VHC en un ratón transgénico de la invención, podrían incluir un promotor nuclear diseñado para producir transcritos con el extremo 5'

- adecuado, la secuencia de ADNc de la variante del VHC de longitud completa, un ribozima de virus delta que escinde en cis [Ball, *J. Virol.* 66: 2335-2345 (1992); Pattnaik y col., *Cell* 69:1011-1020 (1992)] para producir un extremo 3' auténtico, seguido posiblemente de señales que promueven el procesamiento nuclear adecuado y el transporte al citoplasma (donde se produce la replicación del ARN del VHC). Además del genoma entero de la variante del VHC, los animales se pueden diseñar para expresar proteínas del VHC individuales o varias combinaciones y elementos de ARN. Por ejemplo, se pueden usar animales diseñados para expresar un producto génico o gen indicador del VHC bajo el control del IRES del VHC, para evaluar terapias dirigidas contra este objetivo de ARN específico. Se pueden contemplar modelos animales similares para la mayoría de los objetivos del VHC conocidos.
- 10 Dichos modelos animales alternativos son útiles para (i) estudiar los efectos de diferentes agentes antivíricos en la replicación de variantes del VHC, incluyendo replicones, en un sistema de animal entero; (ii) examinar los potenciales efectos citotóxicos directos de los productos génicos del VHC en los hepatocitos y otros tipos de células, definiendo los mecanismos subyacentes implicados, e identificar y ensayar estrategias para la intervención terapéutica; y (iii) estudiar los mecanismos inmunomediados del daño celular y tisular relevante para la patogénesis del VHC e identificar y ensayar estrategias para interferir con estos procedimientos.

Selección y análisis de variantes resistentes a fármacos

- 20 Se pueden usar líneas celulares y modelos animales que soportan la replicación del VHC para examinar el surgimiento de variantes del VHC con resistencia a los procedimientos terapéuticos existentes y nuevos. Como todos los virus de ARN, se supone que la replicasa del VHC carece de actividad de lectura de prueba y por lo tanto la replicación del ARN es propensa al error, dando lugar a un nivel alto de variación [Bukh y col., (1995) Véase antes]. La variabilidad se manifiesta en el paciente infectado a lo largo del tiempo y la considerable diversidad observada entre diferentes aislados. Es probable que el surgimiento de variantes resistentes a fármacos sea una consideración importante en el diseño y la evaluación de monoterapias y terapias de combinación del VHC. Los sistemas de replicación del VHC de la invención, se pueden usar para estudiar el surgimiento de variantes en diferentes formulaciones terapéuticas. Estas pueden incluir monoterapia o diferentes terapias de combinación (p. ej., IFN- α , ribavirina y nuevos compuestos antivíricos). Después se pueden usar mutantes resistentes para definir la base molecular y estructural de resistencia y evaluar nuevas formulaciones terapéuticas, o en los ensayos de selección para los fármacos eficaces dirigidos contra el VHC (Véase a continuación).

Selección de agentes dirigidos contra el VHC

- 35 Las líneas celulares permisivas para el VHC o los modelos animales (preferiblemente modelos de roedores) que comprenden variantes adaptativas del VHC se pueden usar para seleccionar nuevos inhibidores o para evaluar terapias candidatas dirigidas contra el VHC. Dichas terapias incluyen, pero sin estar limitados a (i) oligonucleótidos de sentido contrario o ribozimas dirigidos a los objetivos de ARN del VHC conservados; (ii) compuestos inyectables capaces de inhibir la replicación del VHC; y (iii) compuestos biodisponibles por vía oral, capaces de inhibir la replicación del VHC. Los objetivos para dichas formulaciones incluyen, pero no están restringidos a (i) elementos de ARN del VHC conservados importantes para la replicación del ARN y empaquetamiento del ARN; (ii) enzimas codificadas por el VHC; (iii) interacciones proteína-proteína y proteína-ARN importantes para la replicación del ARN del VHC, ensamblaje del virus, liberación de virus, unión al receptor vírico, entrada vírica, e inicio de la replicación del ARN vírico; (iv) interacciones virus-huésped que modulan la capacidad del VHC para establecer infecciones crónicas; (v) interacciones virus-huésped que modulan la gravedad del daño hepático, incluyendo factores que afectan a la apoptosis y hepatotoxicidad; (vi) interacciones virus-huésped que conducen al desarrollo de desenlaces clínicos más graves que incluyen cirrosis y carcinoma hepatocelular; y (vii) interacciones virus-huésped que dan como resultado otras enfermedades humanas asociadas al VHC, menos frecuentes.
- 50 *Evaluación de las terapias de sentido contrario y de ribozimas.* La presente invención se extiende a la preparación de nucleótidos de sentido contrario y ribozimas en los que se puede ensayar la capacidad para interferir con la replicación del VHC. Este procedimiento usa ácido nucleico de sentido contrario y ribozimas para bloquear la traducción de un ARNm específico, enmascarando este ARNm con un ácido nucleico de sentido contrario o escindiéndolo con una ribozima.

- 55 Los ácidos nucleicos de sentido contrario son moléculas de ADN o ARN que son complementarias a al menos una parte de una molécula de ARNm específica. Las revisiones de la tecnología de sentido contrario incluyen: Baertschi, *Mol. Cell. Endocrinol.* 101:R15-R24(1994); Croke y col., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 36:107-129 (1996); Alama y col., *Pharmacol. Res.* 36:171-178; y Boyer y col., *J. Hepatol.* 32(1 Suppl):98-112(2000). La última revisión discute

la tecnología de sentido contrario cuando se aplica al VHC.

En la célula hibridan con este ARNm formando una molécula de ADN:ARN o ARN:ARN bicatenaria. La célula no traduce un ARNm en esta forma bicatenaria. Por lo tanto, los ácidos nucleicos de sentido contrario interfieren con la expresión del ARNm en proteína. Los oligómeros de aproximadamente 15 nucleótidos y las moléculas que hibridan con el codón de inicio AUG serán particularmente eficaces, puesto que son fáciles de sintetizar y es probable que tengan menos problemas que las moléculas más grandes cuando se introducen en células de órganos. Los procedimientos de sentido contrario se han usado para inhibir la expresión de muchos genes in vitro. Preferiblemente, los nucleótidos de sentido contrario sintéticos contienen análogos de fosfoéster, tales como fosforotiolatos, o tioésteres, en lugar de los enlaces fosfoéster naturales. Dichos análogos de enlaces fosfoéster son más resistentes a la degradación, aumentando la estabilidad y por lo tanto la eficacia de los ácidos nucleicos de sentido contrario.

En el procedimiento genético de sentido contrario, la expresión del alelo natural se elimina debido a la expresión del ARN de sentido contrario. Esta técnica se ha usado para inhibir la síntesis de TK en cultivo tisular y para producir fenotipos de la mutación de *Kruppel* en *Drosophila*, y la mutación de *Shiverer* en ratones [Izant y col., *Cell*, 36:1007-1015 (1984); Green y col., *Annu. Rev. Biochem.*, 55:569-597 (1986); Katsuki y col., *Science*, 241:593-595 (1988)]. Una ventaja importante de este procedimiento es que solo es necesario expresar una pequeña parte del gen para la inhibición eficaz de la expresión del ARNm cognado entero. El transgén de sentido contrario se pondrá bajo el control de su propio promotor u otro promotor expresado en el tipo de célula correcto, y se situará en dirección 5' del sitio poliA de SV40.

Los ribozimas son moléculas de ARN que tienen la capacidad de escindir específicamente otras moléculas de ARN de una cadena de una forma algo análoga a las endonucleasas de restricción del ADN. Las ribozimas se descubrieron a partir de la observación de que determinados ARNm tienen la capacidad de escindir sus propios intrones. Modificando la secuencia de nucleótidos de estos ARN, los investigadores han sido capaces de diseñar moléculas que reconocen secuencias de nucleótidos específicas en una molécula de ARN y escindirla. Las revisiones recientes incluyen Shippy y col., *Mol. Biotechnol.* 12:117-129 (1999); Schmidt, *Mol. Cells* 9:459-463 (1999); Phylactou y col., *Meth. Enzymol.* 313:485-506 (2000); Oketani y col., *J. Hepatol.* 31:628-634 (1999); Macejak y col., *Hepatology* 31:769-776 (2000). Las dos últimas referencias describen el uso de ribozimas para inhibir el VHC. Debido a que son específicos de la secuencia, solo se inactivan los ARNm con secuencias particulares.

Los investigadores han identificado dos tipos de ribozimas, los de tipo *Tetrahymena* y los de tipo "cabeza de martillo". Los ribozimas de tipo *Tetrahymena* reconocen secuencias de 4 bases, mientras que los de tipo "cabeza de martillo" reconocen secuencias de 11 a 18 bases. Cuanto más larga es la secuencia de reconocimiento, más probable es que se produzca exclusivamente en la especie de ARNm objetivo. Por lo tanto, se prefieren los ribozimas de tipo cabeza de martillo a los ribozimas de tipo *Tetrahymena* para inactivar especies de ARNm específicas, y se prefieren las secuencias de reconocimiento de 18 bases a las secuencias de reconocimiento más cortas.

Selección en bibliotecas de compuestos de actividad dirigida contra el VHC. Se puede seleccionar la actividad dirigida contra el VHC en diferentes bibliotecas de productos naturales o sintéticos en modelos in vitro e in vivo que comprenden variantes del VHC proporcionadas por la invención. Un procedimiento para preparar una biblioteca combinatoria usa principalmente procedimientos químicos, de los cuales son ejemplos el procedimiento de Geysen [Geysen y col., *Molecular Immunology* 23:709-715 (1986); Geysen y col., *J. Immunologic. Method* 102:259-274 (1987)] y el procedimiento de Fodor y col. [*Science* 251:767-773 (1991)]. Furka y col. [14th International Congress of Biochemistry, Volume 5, Abstract FR:013 (1988); Furka, *Int. J. Peptide Protein Res.* 37:487-493 (1991)], Houghton [patente de EE.UU. nº 4.631.211, concedida en diciembre de 1986] y Rutter y col. [patente de EE.UU. nº 5.010.175, concedida el 23 de abril, 1991] describen procedimientos para producir una mezcla de péptidos en los que se puede ensayar la actividad dirigida contra el VHC.

En otro aspecto, se pueden usar bibliotecas sintéticas [Needels y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:10700-4 (1993); Ohlmeyer y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:10922-10926 (1993); Lam y col., publicación de patente internacional nº WO 92/00252; Kocis y col., publicación de patente internacional nº WO 9428028], y similares para la selección de compuestos dirigidos contra el VHC de acuerdo con la presente invención. La referencias describen la adaptación de las técnicas de selección de bibliotecas en ensayos biológicos.

Partículas víricas de variantes del VHC definidas/diseñadas para ensayos de neutralización. Las variantes descritas en el presente documento se pueden usar para producir cepas definidas de partículas de VHC para ensayos de

infectividad y neutralización. Se pueden producir cepas homogéneas en el modelo de chimpancé, en sistemas de cultivo celular o usando diferentes sistemas de expresión heteróloga (p. ej., baculovirus, levaduras, células de mamíferos, Véase antes). Estas cepas se pueden usar en cultivo celular o en ensayos in vivo para definir moléculas o procedimientos de terapia génica capaces de neutralizar la producción de partículas de VHC o la infectividad. Los

5 ejemplos de dichas moléculas incluyen, pero no se restringen a anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos artificiales con especificidad diseñada/optimizada, anticuerpos de una cadena (Véase la sección de anticuerpos, a continuación), ácidos nucleicos o ácidos nucleicos derivatizados seleccionados para la unión específica y neutralización, compuestos pequeños biodisponibles por vía oral, etc. Dichos agentes neutralizantes, dirigidos contra los objetivos víricos o celulares conservados, pueden ser específicos de genotipo o de aislado o de

10 reactividad cruzada amplia. Se podrían usar para la inmunoterapia profiláctica o pasiva para reducir la carga vírica y quizás aumentar las posibilidades de un tratamiento más eficaz en combinación con otros agentes antivíricos (p. ej., IFN- α , ribavirina, etc.). La manipulación dirigida de los clones infecciosos del VHC también se puede usar para producir cepas de VHC con cambios definidos en las regiones hipervariables de glicoproteínas o en otros epítomos para estudiar los mecanismos de la neutralización de anticuerpos, reconocimiento de CTL, evasión inmunitaria y

15 potenciación inmunitaria. Estos estudios conducirán a la identificación de otras funciones específicas de virus para la terapia antivírica.

Análisis de la replicación del VHC

20 *Otros ensayos de replicación del VHC.* Esta invención permite el análisis genético molecular dirigido de la replicación del VHC. Se espera que dichos análisis (i) validen objetivos antivíricos que se persiguen actualmente; y (ii) revelen nuevos aspectos inesperados de la replicación del VHC tratables mediante intervención terapéutica. Los objetivos para la validación inmediata mediante estudios de mutagénesis incluyen los siguientes: la 5' NTR, la poliproteína del VHC y productos de escisión, y la 3' NTR. Como se ha descrito antes, se pueden usar análisis que usan variantes

25 del VHC y cultivos celulares permisivos, para comparar los fenotipos de replicación parental y mutante después de transfección de los cultivos celulares con ARN infeccioso. Incluso cuando la RT-PCR permite la detección sensible de la acumulación de ARN vírico, las mutaciones que disminuyen la eficacia de la replicación del ARN pueden ser difíciles de analizar, salvo que se recuperen mutaciones condicionales. Como complemento de un primer ciclo de análisis, se pueden usar ensayos de complementación trans para facilitar el análisis de los fenotipos mutantes del

30 VHC y seleccionar inhibidores. Se pueden usar variantes quiméricas que comprenden partes de sistemas heterólogos (vaccinia, Sindbis, o no vírico) para dirigir la expresión de proteínas ARN replicasa del VHC y/o la maquinaria de empaquetamiento [Véase Lemm y Rice, *J. Virol.* 67:1905-1915 (1993a); Lemm y Rice, *J. Virol.* 67:1916-1926 (1993b); Lemm y col., *EMBO J.* 13: 2925-2934 (1994); Li y col., *J. Virol.* 65: 6714-6723 (1991)]. Si estos elementos son capaces de funcionar en *trans*, entonces la expresión conjunta de los ARN con elementos *cis*

35 adecuados debería producir la replicación/empaquetamiento del ARN. Por lo tanto, dichos sistemas mimetizan las etapas en la replicación del ARN auténtico y el ensamblaje del virión, pero desacoplan la producción de componentes víricos de la replicación del VHC. Si la replicación del VHC es de alguna forma autolimitante, los sistemas heterólogos pueden propulsar niveles significativamente más altos de replicación del ARN o producción de partículas, facilitando el análisis de fenotipos mutantes y la selección antivírica. Un tercer procedimiento es hacer

40 sistemas sin células para la replicación del ARN dependiente de molde del VHC. Se ha descrito un sistema acoplado de traducción/replicación y ensamblaje para polivirus en células HeLa [Barton y Flanagan, *J. Virol.* 67: 822-831 (1993); Molla y col., *Science* 254: 1647-1651 (1991)], y para el virus Sindbis se ha establecido un ensayo in vitro dependiente de molde para el inicio de la síntesis de la cadena negativa. Sistemas similares usando variantes del VHC son inestimables para estudiar muchos aspectos de la replicación del VHC así como para la selección y

45 evaluación de inhibidores. A continuación se da un ejemplo de cada una de estas estrategias.

Complementación trans de la replicación y/o empaquetamiento del ARN del VHC usando sistemas de expresión víricos y no víricos. Se pueden usar sistemas heterólogos para dirigir la replicación del VHC. Por ejemplo, el sistema de expresión citoplasmático vaccinia/T7 ha sido extremadamente útil para la complementación trans de las funciones

50 de la ARN replicasa de virus y empaquetamiento [véase, Ball, (1992) Véase antes; Lemm y Rice, (1993a) Véase antes; Lemm y Rice, (1993b) Véase antes; Lemm y col., (1994) Véase antes; Pattnaik y col., (1992) Véase antes; Pattnaik y col., *Virology* 206: 760-4 (1995); Porter y col., *J. Virol.* 69: 1548-1555 (1995)]. En resumen se usa un virus vaccinia recombinante (vTF7-3) para expresar la ARN polimerasa de T7 (T7RNAPol) en el tipo de célula de interés. Los ADNc objetivo, situados en dirección 3' del promotor de T7, se suministran como recombinantes de vaccinia o

55 mediante transfección de plásmido. Este sistema lleva a un alto nivel de ARN y expresión de proteínas. Una variación de este procedimiento, que obvia la necesidad de vaccinia (que podría interferir con la replicación del ARN del VHC o formación de virión) es el sistema pT7T7, en el que el promotor de T7 dirige la expresión de T7RNAPol [Chen y col., *Nucleic Acids Res.* 22:2114-2120. (1994)]. pT7T7 se mezcla con T7RNAPol (la proteína) y se cotransfecta con el plásmido de interés objetivo dirigido por T7. La T7RNAPol añadida inicia la transcripción,

conduciendo a su propia producción y nivel alto de expresión del gen objetivo. Usando cualquiera de los procedimientos, se pueden producir transcritos de ARN de las variantes con extremos 5' y 3' precisos usando el sitio de inicio de la transcripción de T7 (5') y el ribozima del VHC de escisión en cis (Rz) (3') [Ball, (1992) Véase antes; Pattnaik y col., (1992) Véase antes].

5

Estos sistemas de expresión o similares se pueden usar para establecer ensayos de la replicación del ARN del VHC y formación de partículas usando variantes del VHC, y para evaluar compuestos que pueden inhibir estos procesos. También se pueden usar constructos de expresión de proteínas dirigida por T7 y las variantes del VHC de longitud completa que incorporan el ribozima del VHC después de la 3' NTR. Se puede considerar un plan experimental típico para validar el ensayo como se ha descrito para pT7T7, aunque también ensayos esencialmente similares usando vTF7.3 o líneas celulares que expresan la ARN polimerasa de T7. Las células permisivas al VHC se cotransfectan con pT7T7+T7RNApol+p90/HCVFLlong pU Rz (o un control negativo, tal como ΔGDD). Se siguen en diferentes tiempos la post-transfección, acumulación de proteínas y de ARN del VHC, dirigidos por el sistema pT7T7, por transferencia Western y Northern, respectivamente. Para el ensayo de la función de replicasa específica del VHC, se añade actinomicina D para bloquear la transcripción de T7 dependiente de ADN [Lemm y Rice, (1993a), Véase antes] y se sigue la síntesis del ARN resistente a la actinomicina D mediante marcaje metabólico. La radiactividad se incorporará en los ARN del VHC de longitud completa para p90/HCVFL long pU/Rz, pero no para p90/HCV-FLΔGDD/Rz. Usando las variantes del VHC de la invención, se puede usar este sistema de ensayo, o derivados elaborados, para seleccionar inhibidores y estudiar sus efectos en la replicación del ARN del VHC.

20

Sistemas sin células para ensayar la replicación del VHC y sus inhibidores. Los ensayos sin células para estudiar la replicación del ARN del VHC y seleccionar inhibidores, también se pueden establecer usando las variantes descritas en esta invención. Se usan viriones o ARN transcritos como ARN sustrato. Para el VHC, se pueden usar ARN variantes del VHC de longitud completa transcritos in vitro para programar dichos sistemas in vitro y ensayar la replicación esencialmente como se ha descrito para el polivirus [Véase Barton y col., (1995) Véase antes]. En el caso de que sean necesario factores específicos de hepatocitos u otros factores para la replicación del ARN variante del VHC, el sistema se puede complementar con hepatocitos u otros extractos celulares, o alternativamente, se puede establecer un sistema comparable usando líneas celulares que hayan mostrado ser permisivas para la replicación de las variantes del VHC.

30

Una preocupación sobre este procedimiento es que debe producirse la síntesis sin células y el procesamiento de la poliproteína del VHC adecuados. Puede ser difícil producir las cantidades suficientes de componentes de replicasa adecuadamente procesados. Para superar este problema, se puede usar el sistema de expresión de T7 para expresar niveles altos de componentes de replicasa del VHC en células adecuadas [Véase Lemm y col., (1997) Véase antes]. Las fracciones de membrana P15 de estas células (con tampón, Mg²⁺ y sistema de regeneración de ATP y NTP añadidos) deben poder iniciar y sintetizar los ARN de cadena negativa de longitud completa tras la adición de los ARN moldes específicos del VHC.

El establecimiento de cualquiera o de ambos de los ensayos anteriores permite el análisis rápido y preciso de los efectos de las mutaciones del VHC, factores del huésped implicados en la replicación e inhibidores de las diferentes etapas de la replicación del ARN del VHC. Estos sistemas también establecerán los requisitos para los sistemas de ayuda para preparar los vectores de VHC deficientes en replicación.

Vacunación e inmunidad protectora

45

Todavía hay muchos parámetros desconocidos que afectan al desarrollo de las vacunas eficaces para el VHC. Está claro tanto en el hombre como en el chimpancé que algunos individuos pueden eliminar la infección. Además, el 10-20% de los tratados con IFN o aproximadamente el doble de este porcentaje de los tratados con IFN y ribavirina, muestran una respuesta sostenida, que se pone de manifiesto por la falta de ARN del VHC en la circulación. Otros estudios han mostrado una falta de inmunidad protectora, que se pone de manifiesto por la reinfección con éxito tanto con el virus homólogo como con los tipos de VHC relacionados más de lejos [Farci y col., (1992) Véase antes; Prince y col., (1992) Véase antes]. No obstante, los chimpancés inmunizados con vacunas de subunidades que consisten en oligómeros E1E2 y recombinantes de vaccinia que expresan estas proteínas, están parcialmente protegidos contra estimulaciones de dosis bajas [Choo y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:1294 (1994)]. La tecnología de variantes del VHC descrita en esta invención tiene utilidad no solo para estudios básicos dirigidos a la comprensión de la naturaleza de las respuestas inmunitarias protectoras contra el VHC, sino también para nuevos procedimientos de producción de vacunas.

La inmunidad activa contra el VHC se puede inducir por inmunización (vacunación) con una cantidad inmunógena de

un virión de variante del VHC atenuado o inactivado, o proteínas de partículas de virus VHC, preferiblemente con un adyuvante inmunológicamente eficaz. Un “adyuvante inmunológicamente eficaz” es un material que potencia la respuesta inmunitaria.

5 La selección de un adyuvante depende del sujeto que se va a vacunar. Preferiblemente, se usa un adyuvante farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, una vacuna para un ser humano debe evitar adyuvantes de emulsión de aceite o hidrocarburo, incluyendo adyuvante de Freund completo o incompleto. Un ejemplo de un adyuvante adecuado para usar con seres humanos es alum (gel de alúmina). Sin embargo, una vacuna para un animal puede contener adyuvantes que no son adecuados para usar con seres humanos.

10

Una alternativa a una vacuna tradicional que comprende un antígeno y un adyuvante, implica la introducción in vivo directa de ADN o ARN que codifica el antígeno en tejidos de un sujeto para la expresión del antígeno por las células del tejido del sujeto. Dichas vacunas se denominan en el presente documento vacunas genéticas, vacunas de ADN, vacunación genética o vacunas basadas en ácidos nucleicos. Se pueden usar procedimientos de transfección como se han descrito antes, tales como vectores de ADN o transportadores de vectores, para las vacunas de ADN.

15

Las vacunas de ADN se describen, p. ej. en la publicación de patente internacional WO 95/20660 y publicación de patente internacional WO 93/19183. La capacidad del ADN inyectado directamente que codifica una proteína vírica o genoma, para producir una respuesta inmunitaria protectora se ha demostrado en numerosos sistemas experimentales [Conry y col., *Cancer Res.*, 54:1164-1168 (1994); Cox y col., *Virology*, 67:5664-5667 (1993); Davis y col., *Hum. Mole. Genet.*, 2:1847-1851 (1993); Sedegah y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91:9866-9870 (1994); Montgomery y col., *DNA Cell Biol.*, 12:777-783 (1993); Ulmer y col., *Science*, 259:1745-1749 (1993); Wang y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90:4156-4160 (1993); Xiang y col., *Virology*, 199:132-140 (1994)]. Los estudios para evaluar esta estrategia en la neutralización del virus influenza han usado tanto proteínas víricas de la envuelta como internas para inducir la producción de anticuerpos, pero en particular se han centrado en la proteína hemaglutinina vírica (HA) [Fynan y col., *DNA Cell Biol.*, 12:785-789 (1993A); Fynan y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90:11478-11482 (1993B); Robinson y col., *Vaccine*, 11:957, (1993); Webster y col., *Vaccine*, 12:1495-1498 (1994)].

20

25

La vacunación mediante la inyección directa de ADN o ARN que codifica una proteína para producir una respuesta inmunitaria protectora produce respuestas tanto mediadas por células como humorales. Esto es análogo a los resultados obtenidos con virus vivos [Raz y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91:9519-9523 (1994); Ulmer, 1993, Véase antes; Wang, 1993, Véase antes; Xiang, 1994, Véase antes]. Los estudios con hurones indican que las vacunas de ADN contra proteínas víricas internas conservadas de influenza, junto con glicoproteínas de superficie, son más eficaces contra las variantes antigénicas del virus influenza que las vacunas inactivadas o de subviriones [Donnelly y col., *Nat. Medicine*, 6:583-587 (1995)]. Realmente, se han descrito respuestas inmunitarias reproducibles al ADN que codifica la nucleoproteína, en ratones que duran esencialmente el tiempo de vida del animal [Yankauckas y col., *DNA Cell Biol.*, 12: 771-776 (1993)].

30

35

Una vacuna se puede administrar por cualquier ruta parenteral, incluyendo, pero sin estar limitados a la intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, intraarterial (p. ej., arteria hepática) y similares. Preferiblemente, puesto que el resultado deseado de la vacunación es elucidar una respuesta inmunitaria contra el VHC, la administración se hace directamente, o dirigiendo o eligiendo un vector vírico, indirectamente a tejidos linfáticos, p. ej., nódulos linfáticos o bazo. Puesto que las células inmunitarias se replican continuamente, son objetivos ideales para las vacunas de ácido nucleico basadas en vector retroviral, puesto que los retrovirus requieren células que se replican.

45

Se puede conferir inmunidad pasiva a un sujeto animal que se sospeche que padece una infección por el VHC, administrando al paciente antisuero, anticuerpos policlonales neutralizantes o un anticuerpo monoclonal neutralizante contra el VHC. Aunque la inmunidad pasiva no confiere protección a largo plazo, puede ser una herramienta valiosa para el tratamiento de una infección aguda de un sujeto que no se ha vacunado. Preferiblemente, los anticuerpos administrados para la terapia inmunitaria pasiva son anticuerpos autólogos. Por ejemplo, si el sujeto es un ser humano, los anticuerpos preferiblemente son de origen humano o se han “humanizado”, con el fin de minimizar la posibilidad de una respuesta inmunitaria contra los anticuerpos. Además, se pueden introducir anticuerpos neutralizantes que codifican genes, en vectores para la expresión in vivo, p. ej., en hepatocitos.

50

55

Anticuerpos para la terapia inmunitaria pasiva. Preferiblemente, los viriones de variantes del VHC o proteínas de partículas víricas preparadas como se ha descrito antes, se usan como un inmunógeno para generar anticuerpos que reconocen el VHC. Las variantes usadas deben tener una envoltura natural. Dichos anticuerpos incluyen, pero sin estar limitados a policlonales, monoclonales, quiméricos, de una cadena, fragmentos Fab y una biblioteca de

expresión de Fab. Se pueden usar diferentes procedimientos conocidos en la técnica para producir anticuerpos policlonales contra el VHC. Para la producción de anticuerpos, se pueden inmunizar diferentes animales huésped por inyección con los viriones o polipéptido del VHC, p. ej., como se describe a continuación, incluyendo, pero sin estar limitados a conejos, ratones, ratas, ovejas, cabras, etc. Se pueden usar diferentes adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica, dependiendo de la especie huésped, incluyendo, pero sin estar limitados a adyuvante de Freund (completo o incompleto), geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianinas de lapa de California, dinitrofenol y adyuvantes humanos potencialmente útiles tales como BCG (bacilo de *Calmette-Guerin*) y *Corynebacterium parvum*.

Para preparar anticuerpos monoclonales dirigidos contra el VHC como se ha descrito antes, se puede usar cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpos por líneas celulares continuas en cultivo. Estas incluyen, pero sin estar limitados a la técnica del hibridoma desarrollada originalmente por Kohler y Milstein [*Nature* 256:495-497 (1975)], así como la técnica del trioma, la técnica de hibridoma de linfocitos B humanos [Kozbor y col., *Immunology Today* 4:72 (1983); Cote y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80:2026-2030 (1983)], y la técnica de hibridoma de EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos [Cole y col., en *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pág. 77-96 (1985)]. En una realización adicional de la invención, se pueden producir anticuerpos monoclonales en animales axénicos [publicación de patente internacional nº WO 89/12690, publicada el 28 de diciembre de 1989]. De hecho, de acuerdo con la invención, se pueden usar técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos" [Morrison y col., *J. Bacteriol.* 159:870 (1984); Neuberger y col., *Nature* 312:604-608 (1984); Takeda y col., *Nature* 314:452-454 (1985)] mediante corte y empalme de genes de una molécula de anticuerpo de ratón específica para el VHC junto con genes de una molécula de anticuerpo humano de actividad biológica adecuada; dichos anticuerpos están dentro del alcance de esta invención. Dichos anticuerpos humanos o quiméricos humanizados son preferidos para usar en la terapia de enfermedades o trastornos humanos (descritos más adelante), puesto que es mucho menos probable que los propios anticuerpos humanos o humanizados induzcan una respuesta inmunitaria que los anticuerpos xenogénicos, en particular una respuesta alérgica.

De acuerdo con la invención, las técnicas descritas para producir anticuerpos de una cadena [patentes de EE.UU. nº 5.476.786 y 5.132.405 de Huston; patente de EE.UU. 4.946.778] se pueden adaptar para producir anticuerpos de una cadena específicos para el VHC. Una realización adicional de la invención usa las técnicas descritas para la construcción de bibliotecas de expresión de Fab [Huse y col., *Science* 246:1275-1281 (1989)] para permitir la identificación rápida y fácil de fragmentos de Fab monoclonales con la especificidad deseada.

Los fragmentos de anticuerpos que contienen el idiotipo de la molécula de anticuerpo se pueden generar por técnicas conocidas. Por ejemplo, dichos fragmentos incluyen, pero sin estar limitados a: el fragmento F(ab')₂ que se puede producir por digestión por la pepsina de la molécula de anticuerpo; los fragmentos Fab' que se pueden generar reduciendo los puentes disulfuro del fragmento F(ab')₂, y los fragmentos Fab que se pueden generar tratando la molécula de anticuerpo con papaína y un agente de reducción.

Partículas de VHC para la vacunación con subunidades. Las variantes funcionales del VHC de la presente invención se pueden usar para producir partículas de tipo VHC para la vacunación. La glicosilación, plegado y ensamblaje adecuados de las partículas del VHC puede ser importante para producir adecuadamente vacunas antigénicas y de subunidades protectoras. Se pueden usar varios procedimientos para la producción de partículas. Incluyen el diseño de líneas celulares estables para la expresión inducible o constitutiva de partículas de tipo VHC (usando células bacterianas, de levaduras o de mamíferos), o el uso de sistemas de expresión heterólogos eucariotas de mayor nivel, tales como baculovirus recombinantes, virus vaccinia [Moss, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:11341-11348 (1996)], o alfavirus [Frolov y col., (1996) Véase antes]. Las partículas de VHC para la inmunización se pueden purificar del medio o de células alteradas, dependiendo de su localización. Dichas partículas de VHC purificadas o mezclas de partículas que representan un espectro de genotipos de VHC, se pueden inyectar con o sin diferentes adyuvantes para potenciar la inmunogenicidad.

Partículas de VHC no replicativas infecciosas. En otro ejemplo, se pueden producir partículas de variantes del VHC capaces de unirse al receptor, entrar y traducir el ARN genómico. Los procedimientos de expresión heteróloga para producir dichas partículas incluyen, pero no están restringidas a *E. coli*, levaduras, o líneas celulares de mamíferos, células huésped adecuadas infectadas o que albergan baculovirus recombinantes, virus vaccinia recombinante, alfavirus recombinantes o replicones de ARN, o adenovirus recombinantes, diseñados para expresar los ARN y proteínas adecuados del VHC. En un ejemplo, se diseñan dos baculovirus recombinantes. Un baculovirus expresa las proteínas estructurales del VHC (p. ej., C-E1-E2-p7) necesarias para el ensamblaje de las partículas de VHC. Un

segundo recombinante expresa el ARN genómico del VHC entero, con extremos 5' y 3' precisos, excepto porque incluye una eliminación, tal como Δ GDD o $GDD \rightarrow AAG$ (Véase el ejemplo 1), para inactivar la RDRP de NS5B del VHC. También se podrían usar otras mutaciones que eliminan la replicación productiva del VHC en su lugar o en combinación. La cotransfección de células huésped adecuadas (Sf9, Sf21, etc.) con ambos recombinantes producirá niveles altos de proteínas estructurales del VHC y ARN genómico para el empaquetamiento en partículas de tipo VHC. Dichas partículas se pueden producir con niveles altos, purificar y usar para la vacunación. Una vez introducidas en las vacunas, dichas partículas presentarán la unión al receptor normal e infección de las células susceptibles al VHC. Se producirá la entrada y el ARN genómico se traducirá para producir todos los antígenos del VHC normales, excepto que la replicación posterior del genoma estará completamente bloqueada debido a la NS5B polimerasa inactivada. Se espera que dichas partículas produzcan las respuestas de CTL eficaces contra los antígenos de proteínas estructurales y no estructurales del VHC. Esta estrategia de vacunación sola o preferiblemente en conjunto con la estrategia de la subunidad descrita antes, se puede usar para producir niveles altos tanto de anticuerpos neutralizantes como de respuestas de CTL para ayudar a eliminar el virus. Se puede usar una variedad de diferentes secuencias de ARN genómico del VHC para asegurar respuestas inmunitarias protectoras y de reactividad cruzada amplias. Además, se podría usar la modificación de las partículas de VHC, por ingeniería genética o por derivación in vitro, para dirigir la infección a las células de forma más eficaz al producir respuestas inmunitarias protectoras y de duración larga.

Derivados de VHC vivos atenuados. La capacidad para manipular la secuencia de ARN genómico del VHC y de esta forma producir mutantes con patogenicidad alterada, proporciona un medio de construcción de variantes del VHC vivos atenuados adecuados para la vacunación. Dichos candidatos de vacunas expresan antígenos protectores pero estarían deteriorados en su capacidad para producir enfermedad, establecer infecciones crónicas, producir respuestas autoinmunitarias y transformar células.

Además, los virus propagados en cultivo celular con frecuencia adquieren mutaciones en su ARN genómicos que presentan fenotipos atenuados in vivo, mientras que retienen su inmunogenicidad. Las cepas de virus atenuados estarían deterioradas en su capacidad para producir enfermedad y establecer infecciones crónicas. La producción de variantes del VHC adaptadas para el cultivo tisular pueden representar candidatos potenciales para las vacunas vivas atenuadas. Una posibilidad atractiva es la producción de derivados del VHC que contienen la eliminación en NS5A descritos en esta solicitud como clon I (Véase el ejemplo 1). Es probable que dichas variantes reviertan al tipo natural en el huésped.

Vectores de expresión de genes basados en variantes del VHC

Algunas de las mismas propiedades del VHC que conducen a la infección hepática crónica también pueden tener una gran utilidad para diseñar vectores para la expresión de genes en sistemas de cultivo celular, vacunación genética y terapia génica. Las variantes del VHC descritas en el presente documento se pueden diseñar para producir ARN quiméricos diseñados para la expresión de productos génicos heterólogos (ARN y proteínas). Se han descrito estrategias anteriormente y en otros sitios [Bredenbeek y Rice, (1992) Véase antes; Frolov y col., (1996) Véase antes] e incluyen, pero sin estar limitados a (i) fusión en el marco de las secuencias codificantes heterólogas con la poliproteína del VHC; (ii) creación de cistrones adicionales en el ARN genómico del VHC; y (iii) inclusión de elementos IRES para crear vectores de ARN de VHC auto-replicativos multicistronicos capaces de expresar uno o más genes heterólogos (figura 2). Las cadenas principales del ARN del VHC funcionales usadas para dichos vectores incluyen, pero sin estar limitados a (i) derivados vivos atenuados capaces de replicación y propagación; (ii) derivados de "extremo cerrado" competentes para la replicación del ARN que carecen de uno o más componentes víricos (p. ej., las proteínas estructurales) necesarios para la propagación vírica; (iii) derivados mutantes capaces de síntesis y acumulación en niveles altos y bajos de ARN específicos del VHC; (iv) derivados mutantes adaptados para la replicación en diferentes tipos de células humanas; (v) derivados mutantes diseñados o seleccionados capaces de replicación no citopática prolongada en células humanas. Los vectores componentes para la replicación del ARN pero no para el empaquetamiento y la propagación, se pueden introducir como ARN, ADN desnudos o empaquetados en partículas de tipo virus. Dichas partículas de tipo virus se pueden producir como se ha descrito antes y están compuestas de componentes de viriones del VHC sin modificar o alterados diseñados para la transfección dirigida de los hepatocitos y otros tipos de células humanas. Alternativamente, los vectores de ARN del VHC se pueden introducir en cápside y suministrar usando maquinarias de empaquetamiento vírico heterólogo, o encapsular en liposomas modificados para el suministro génico eficaz. Estas estrategias de empaquetamiento y modificaciones de las mismas, se pueden usar para dirigir de forma eficaz los vectores de ARN del VHC a tipos de células específicos. Usando procedimientos descritos antes, también se pueden obtener sistemas de vectores derivados del VHC similares, competentes para la replicación y expresión en otras especies.

Se pueden usar diferentes procedimientos, p. ej. como se ha expuesto antes en relación con la transfección de células y vacunas de ADN, para introducir un vector de VHC de la invención. Tiene un interés primario la inyección directa de ARN o viriones del VHC funcionales, p. ej., en el hígado. El suministro de genes dirigido se describe en la publicación de patente internacional WO 95/28494, publicada en octubre de 1995. Alternativamente, el vector se puede introducir in vivo por lipofección. Durante la década pasada ha habido un uso creciente de los liposomas para la encapsulación y transfección de ácidos nucleicos in vitro. Se pueden usar los lípidos catiónicos sintéticos diseñados para limitar las dificultades y peligros que se encuentran con la transfección mediada por liposomas, para preparar liposomas para la transfección in vivo de un gen que codifica un marcador [Feigner, y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84:7413-7417 (1987); Véase Mackey, y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:8027-8031 (1988); Ulmer y col., *Science* 259:1745-1748 (1993)]. El uso de lípidos catiónicos puede promover la encapsulación de ácidos nucleicos cargados negativamente y también promover la fusión con membranas celulares cargadas negativamente [Feigner y Ringold, *Science* 337:387-388 (1989)]. El uso de la lipofección para introducir genes exógenos en órganos específicos in vivo, tiene algunas ventajas prácticas. La dirección molecular de los liposomas a células específicas representa un área de beneficio. Está claro que dirigir la transfección a tipos de células particulares sería particularmente ventajoso en un tejido con heterogeneidad celular, tal como el páncreas, hígado, riñón y el cerebro. Los lípidos pueden estar químicamente acoplados a otras moléculas para el propósito de dirigir [Véase Mackey, y col., Véase antes]. Los péptidos dirigidos, p. ej., hormonas o neurotransmisores, y proteínas tales como anticuerpos o moléculas no peptídicas podrían acoplarse químicamente a liposomas. También se pueden usar los procedimientos de suministro de ADN mediado por receptor [Curiel y col., *Hum. Gene Ther.* 3:147-154 (1992); Wu y Wu, *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432 (1987)].

Los ejemplos de aplicaciones para la terapia génica incluyen, pero sin estar limitados a (i) la expresión de enzimas u otras moléculas para corregir los defectos metabólicos heredados o adquiridos; (ii) la expresión de moléculas para promover la curación de heridas; (iii) la expresión de moléculas inmunomoduladoras para promover el retroceso o la eliminación inmunomediadas de cánceres humanos; (iv) expresión dirigida de moléculas tóxicas o enzimas capaces de activar fármacos citotóxicos en tumores; (v) expresión dirigida de agentes antivíricos o antimicrobianos en células infectadas por patógenos. Se pueden insertar diferentes genes heterólogos terapéuticos en un vector de terapia génica de la invención, tal como, pero sin estar limitados a adenosina desaminasa (ADA) para tratar la inmunodeficiencia combinada severa (SCID); genes marcadores o genes de linfoquinas en linfocitos T que infiltran tumores (TIL) [Kasis y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87:473 (1990); Culver y col., mencionado antes 88:3155 (1991)]; genes para los factores de coagulación tales como el Factor VIII y Factor IX para tratar la hemofilia [Dwarki y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:1023-1027 (1995); Thompson, *Thromb. and Haemostatis*, 66:119-122 (1991)]; y otros genes terapéuticos bien conocidos tales como, pero sin estar limitados a -globina, distrofina, insulina, eritropoyetina, hormona del crecimiento, glucocerebrosidasa, -glucuronidasa, α -antitripsina, fenilalanina hidroxilasa, tirosina hidroxilasa, ornitina transcarbamilasa, apolipoproteínas, y similares. En general, Véase la patente de EE.UU. Nº 5.399.346 de Anderson y col.

Los ejemplos de aplicaciones para la vacunación genética (para la protección frente a patógenos distintos del VHC) incluyen, pero sin estar limitados a la expresión de antígenos protectores bacterianos (p. ej., *E. coli*, *Streptococci*, *Staphylococci*, *Nisseria* uropatógenos), parásitos (p. ej., *Plasmodium*, *Leishmania*, *Toxoplasma*), hongos (p. ej., *Candida*, *Histoplasma*), y patógenos humanos víricos (p. ej., HIV, HSV, CMV, influenza). La inmunogenicidad de antígenos protectores expresados usando vectores de expresión de ARN derivados del VHC se puede potenciar usando adyuvantes, incluyendo la coexpresión de moléculas inmunomoduladoras, tales como citoquinas (p. ej., IL-2, GM-CSF) para facilitar el desarrollo de las respuestas Th1 frente a Th2. Dichos adyuvantes se pueden incorporar y coexpresar por los propios vectores del VHC o administrar en combinación con estos vectores usando otros procedimientos.

Procedimientos de diagnóstico para el VHC infeccioso

Líneas celulares de diagnóstico. La invención descrita en el presente documento también se puede usar para obtener líneas celulares para el diagnóstico sensible del VHC infeccioso en muestras de pacientes. Como idea, se usan los componentes funcionales del VHC para ensayar y crear líneas celulares susceptibles (como se han identificado antes) en las que se activan selectivamente sistemas indicadores de ensayo fácil tras la infección por el VHC. Los ejemplos incluyen, pero sin restringir (i) ARN del VHC defectuosos que carecen de componentes de replicasa que se incorporan como transgenes y cuya replicación es favorecida o inducida tras la infección por el VHC; (ii) sistemas indicadores amplificables heterólogos sensibles activados por infección por el VHC. En el primer caso, las señales de ARN necesarias para la amplificación del ARN del VHC flanquean un marcador conveniente o seleccionable (Véase antes). La expresión de dichos ARN quiméricos es dirigida por un promotor nuclear adecuado y elementos necesarios para el procesamiento nuclear adecuado y transporte al citoplasma. Tras infección de la

línea celular diseñada por el VHC, se induce la replicación citoplasmática y amplificación del transgén, desencadenando niveles más altos de expresión de indicador, como un indicador de la infección productiva por el VHC.

- 5 En el segundo ejemplo, las líneas celulares se diseñan para una regulación más estrecha pero una alta amplificación y expresión de genes indicadores inducibles tras infección por el VHC. Aunque este sistema amplificado se describe en el contexto de componentes específicos, se pueden usar otros componentes equivalentes. En dicho sistema, se crea un transgén de replicón de alfa-virus diseñado, que carece de la nsP4 polimerasa del alfa-virus, una enzima totalmente necesaria para la amplificación del ARN del alfa-virus y producida normalmente por escisión de la
- 10 poliproteína no estructural. Las características adicionales de este replicón de alfa-virus defectuoso incluyen un promotor de ARN subgenómico, expresión dirigida de un gen indicador de luciferasa o GFP. Este elemento promotor es inactivo en ausencia de la replicación citoplasmática productiva del alfa-virus. La línea celular contiene un segundo transgén para la expresión de la fusión génica que consiste en la proteína NS4A del VHC y la nsP4 RDRP del alfa-virus. Este gen fusionado es expresado y dirigido al compartimento de la membrana citoplasmática,
- 15 pero esta forma de nsP4 sería inactiva como componente funcional del complejo de replicación del alfa-virus, porque es necesaria una proteína nsP4 discreta con extremo N preciso para la actividad de nsP4 [Lemm y col., *EMBO J.* 13:2925 (1994)]. Un tercer transgén opcional expresa un ARN de alfa-virus defectuoso con señales *cis* para la replicación, transcripción del ARN subgenómico que codifica una fusión de ubiquitina-nsP4, y una señal de empaquetamiento de alfa-virus. Tras la infección de dicha línea celular por el VHC, se produce la NS3 proteinasa del
- 20 VHC, que media la escisión en *trans* de la proteína de fusión NS4A-nsP4, activando la nsP4 polimerasa. Esta polimerasa activa, que funciona en *trans* y es eficaz en cantidades muy pequeñas, forma entonces un complejo de replicación funcional del alfa-virus que conduce a la amplificación del replicación de alfa-virus defectuoso, así como del ARN de alfa-virus defectuoso que codifica la ubiquitina-nsP4. La ubiquitina-nsP4 expresada a partir de su ARN subgenómico, es escindida eficazmente por la ubiquitina carboxi-terminal hidrolasa celular para producir
- 25 adicional, en el caso de que la enzima esté limitando. Una vez activado, este sistema produciría niveles extremadamente altos de la proteína indicadora. La escala de tiempo de dicho ensayo de infectividad del VHC se espera que sea de horas (para una expresión suficiente del gen del indicador).

- Diagnóstico de anticuerpos.* Además de las líneas celulares descritas aquí, se pueden usar partículas víricas de
- 30 variantes del VHC (viriones) o componentes de las mismas, producidas por las líneas celulares transfectadas o infectadas, o aisladas de un animal infectado, como antígenos para detectar los anticuerpos dirigidos contra el VHC en la sangre de pacientes o en productos sanguíneos. Debido a que las partículas víricas de variantes del VHC se obtienen a partir de un genoma del VHC auténtico, los componentes en partículas tales como las proteínas de la envuelta, es probable que tengan propiedades inmunógenas que se parecen más o son idénticas a los virus VHC
- 35 naturales que si estos componentes se produjeran fuera de un VHC replicativo. Los ejemplos de dichas propiedades inmunógenas incluyen la presentación de epítomos inmunógenos de VHC naturales, y modulación de la transcripción de genes que codifican citoquinas de inmunomodulación celular. Estos reactivos se pueden usar para establecer que un paciente está infectado con el VHC detectando la seroconversión, es decir, generación de una población de anticuerpos específicos para el VHC.
- 40

Alternativamente, se pueden usar anticuerpos generados contra los productos variantes del VHC preparados como se describe en el presente documento, para detectar la presencia del VHC en muestras biológicas de un sujeto.

- Se describen realizaciones preferidas de la invención en el siguiente ejemplo. Otras realizaciones dentro del alcance
- 45 de las reivindicaciones del presente documento serán evidentes para el experto en la materia, tras la consideración de la memoria descriptiva o práctica de la invención como se describe en el presente documento. Se pretende que la memoria descriptiva, junto con los ejemplos, se considere solo ilustrativa, estando indicado el alcance de la invención por las reivindicaciones que siguen a los ejemplos.

50 **Ejemplo 1**

Este ejemplos describe la producción y evaluación de replicones que comprenden un marcador seleccionable *neo* y una región que codifica la poliproteína, que codifica proteínas no estructurales del subtipo 1b.

55 **Materiales y procedimientos**

Líneas celulares. Las líneas celulares Huh7 las proporcionaron generosamente Robert Lanford (Southwest Foundation for Biomedical Research, San Antonio, EE.UU.) y Ralf Bartenschlager (Johannes Gutenberg University Mainz, Mainz, Alemania) y se mantuvieron en medio esencial mínimo modificado por Dulbecco (DMEM; Gibco-BRL)

complementado con suero de ternero fetal (FCS) al 10%, y aminoácidos no esenciales.

Ensamblaje de un replicón de subtipo 1 b seleccionable. Se construyó un replicón de subtipo 1b del VHC que es similar al replicón descrito en Lohmann y col., *Science* 285:110-113 (1999). Para esta construcción, se desarrolló un ensayo basado en la PCR por etapas usando la ADN polimerasa KlenTaqLA (Wayne Barnes, Washington University). Se ensamblaron ADNc que abarcaban 600-750 bases de longitud a partir de 10-12 oligonucleótidos purificados en gel (de 60-80 nucleótidos de longitud) con superposiciones complementarias únicas de 16 nucleótidos. Cuatro o seis oligonucleótidos que representaban la parte 5' de la región a ensamblar se reasociaron y extendieron en una PCR estándar. Los 6 oligonucleótidos restantes para la síntesis de la mitad 3' del ADNc pretendido, se mezclaron en una reacción PCR paralela. Después de 12 ciclos de PCR, los productos de ADN de doble cadena extendidos se combinaron y se sometieron a 12 ciclos adicionales. El producto de esta reacción se analizó como una extensión en geles de agarosa que se cortaron y se aisló el ADN de la agarosa. Una quinta parte del producto de ADN de doble cadena purificado se amplificó por la PCR usando una pareja de cebadores externos que contenían sitios de enzimas de restricción únicos para facilitar la clonación direccional en el vector plasmídico pGEM3Zf(+) (Promega). Los productos de la PCR se purificaron, se digirieron con las enzimas de restricción adecuadas y se ligaron en pGEM3Zf(+) escindido de forma similar. Los múltiples clones recombinantes se secuenciaron y se identificaron los clones correctos. Los fragmentos de ADNc que se superponían se ensamblaron en la secuencia de replicón contigua. En paralelo, se construyó un replicón que llevaba la mutación letal en el sitio activo de NS5B (de Gly-Asp-Asp [GDD] a Ala-Ala-Gly [AGG]; pol-).

Transcripción y transfección de ARN. Se sintetizaron transcritos de ARN en una mezcla de reacción de 100 µl que contenía Tris-HCl 40 mM (pH 7,9), NaCl 10 mM, MgCl₂ 12 mM, espermidina 2 mM, ATP, CTP, GTP y UTP 3 mM cada uno, ditiotretol 10 mM, RNasina 100 U (Promega) y ARN polimerasa de T7 100 U (Epicentre) y 2 g de ADN linearizado con Scal. El molde de ADN se eliminó rigurosamente mediante digestiones seriadas con DNasa I 30 U (Boehringer). Se electroporaron 10 µg de transcritos de ARN digeridos con DNasa en 6x10⁶ células Huh7 usando un modelo de Squareporator T820 (BTX), y se cultivaron en placas de 150 mm. Para la selección de células que contenían replicones, el medio se cambió a medio completo que contenía geneticina (G418; 1mg/ml; Gibco-BRL) 24 h después de transfección y después el medio se cambió cada 3-4 días.

Análisis de ARN. Se preincubaron aproximadamente 5x10⁵ células durante 1 h en DMEM que carecía de fosfato complementado con FCS dializado al 5%, la 1/20 parte de la concentración normal de fosfato y actinomicina D (4 µg/ml; Sigma). Se añadió [³²P]ortofosfato (200 µCi/ml; ICN) y la incubación se continuó durante 12 h adicionales. El ARN celular total se extrajo con TRIZOL, se precipitó y se volvió a suspender en H₂O (Gibco-BRL). Se analizó el ARN radiomarcado por electroforesis en gel de agarosa desnaturizante y se visualizó por autorradiografía.

Análisis de proteínas. Para la inmunoprotección, se incubaron monocapas de células durante 4, 8 ó 12 h en MEM deficiente en metionina y cisteína que contenía 1/40 parte de la concentración normal de metionina, FCS dializado al 5% y mezcla de marcaje Express ³⁵S³⁵S Protein (100 µCi/ml; NEN). Las células se lisaron en NaPO₄ 100 mM, pH 7,0, que contenía dodecilsulfato sódico al 1% (SDS) e inhibidores de proteasa, y ADN celular fraccionado por el pase repetido a través de una aguja de calibre 27,5. Se inmunoprecipitaron proteínas víricas esencialmente como se ha descrito previamente (Grakoui y col. 1993), usando suero de paciente, JHF, que reconoce NS3, NS4B y NS5A o anticuerpo dirigido contra NS5B de conejo y células Pansorbin (Calbiochem). Los inmunoprecipitados se separaron en SDS-PAGE al 10% y se visualizaron por autorradiografía.

Inmunotinción. Se fijaron células cultivadas en portaobjetos con cámara de 8 pocillos (Falcon) en acetona durante 10 min a 4°C y se dejaron secar al aire. Las monocapas rehidratadas se incubaron a 37°C con un anticuerpo dirigido contra NS3, seguido de incubación con un anticuerpo secundario conjugado con fluoresceína específico de especie (Pierce), y se montaron en disolución salina de glicerol al 90% que contenía Tris-HCl 50 mM (pH 8,8).

Transcripción inversa (RT)-PCR. Se aisló el ARN de las células usando TRIZOL (Gibco-BRL), se hicieron precipitar y se suspendieron en H₂O. Se cuantificaron los niveles de ARN del VHC usando ensayos competitivos de RT-PCR diseñados para amplificar las secuencias 5' y 3' no traducidas del VHC (Kolykhalov y col., 1996). Para la RT-PCR diseñada para amplificar los fragmentos de ADNc largos, se mezclaron aproximadamente 1000 moléculas de ARN de VHC con el cebador específico del VHC, y el cebador se extendió a 43,5°C durante 1 h usando la transcriptasa inversa Superscript II (Gibco-BRL). Después, los ADNc se amplificaron con la ADN polimerasa KlenTaqLA usando 35 ciclos de 95°C durante 30 s, 55-60°C durante 30 s y 68°C durante 4 min. Los productos de la PCR se recuperaron a partir de electroforesis preparativa con agarosa de bajo punto de fusión por extracción con fenol, y se secuenciaron directamente ~40 ng de producto de la PCR purificado.

Resultados

- Establecimiento de colonias resistentes a G418.** Los replicones similares a los descritos en Lohmann y col., Véase antes, pero obtenidos del clon infeccioso H77, no pudieron conferir resistencia a G418 en 5 líneas celulares de hepatoma diferentes. También se usaron secuencias de subtipo 1b para ensamblar el replicón I377/NS3-3' (número de acceso en EMBL AJ242652). Los ARN de replicones estaban compuestos del sitio de entrada interno al ribosoma (IRES) que dirige la expresión del gen de la neomicina fosfotransferasa (Neo) y el IRES del virus de la encefalomiocarditis (EMCV), que dirige la traducción de las proteínas NS3 a NS5B del VHC, seguido de la 3' NTR (figura 3). Se construyeron dos derivados que o bien carecían de 2 nucleótidos U en el tramo de poli(U/UC) o bien llevaban un sitio de la enzima de restricción Avall en la región variable de 3' NTR, denominados HCVrep1bBartMan/ Δ 2U's y HCVrep1bBartMan/Avall, respectivamente. Antes de la transfección, se confirmaron la traducción y procesamiento correctos de la poliproteína, para cada secuencia de ADNc usando el sistema de expresión de la ARN polimerasa de vaccinia-T7 (no se muestran los datos).
- 15 Los ARN replicones tratados con DNasa se electroporaron en célula Huh7 y después de 2-3 semanas en cultivo, las colonias resistentes a G418 eran claramente visibles. Ambos derivados replicones podían conferir resistencia a G418, y como media sólo 1 en 10^6 células se convertía en resistente a G418. A diferencia de esto, no se observaron nunca colonias para células Huh7 electroporadas en paralelo con ARN replicones que contenían una NS5B polimerasa inactiva.
- 20 **Verificación de la replicación autónoma.** Se aislaron 22 colonias independientes, 5 colonias correspondían a las células Huh7 transfectadas con ARN transcrito de HCVrep1bBartMan/ Δ 2U's y las 17 colonias restantes derivaban del ARN de HCVrep1bBartMan/Avall. Se llevaron a cabo una serie de ensayos para verificar que la resistencia a G418 era mediada por el VHC de replicación autónoma. La amplificación de las secuencias con las 5' y 3' NTR en un ensayo de RT-PCR cuantitativo, puso de manifiesto números de copias en el intervalo de 50 a 5000 moléculas de ARN del VHC por célula (figura 4). Se observó el ARN resistente a la actinomicina D marcada con 32 P del tamaño esperado, en los cuatro clones de células resistentes a G418 independientes analizados (figura 5A). Las proteínas del VHC, NS3, NS4B, NS5A y NS5B, inmunoprecipitaron en los lisatos celulares radiomarcados (figura 5B). Además, la inmunotinción de monocapas celulares puso de manifiesto un patrón de tinción punteado para NS3 en el citoplasma (figura 6), similar a la localización de la proteína del VHC en secciones de hígado de pacientes infectados por el VHC (Blight y Gowans, 1996). En los clones de células resistentes a G418, la señal fluorescente tendía a variar entre células, probablemente reflejando los diferentes niveles de replicación por célula.
- 35 **Identificación de mutaciones en replicones del VHC.** Las colonias resistentes a G418 de baja frecuencia se pueden atribuir a un factor o factores celulares necesarios para la replicación o cambios adaptativos en la secuencia del replicón necesarios para el establecimiento del replicón del VHC. Para abordar esta última posibilidad, se amplificó la secuencia entera del replicón a partir de ADNc obtenido por transcripción inversa del ARN aislado de cinco clones de células resistentes a G418 independientes. Tras la secuenciación directa de la población de la PCR purificada, se identificaron múltiples mutaciones. La observación llamativa era que cada clon de célula llevaba un solo cambio de nucleótido en NS5A que daba como resultado un cambio codificante (figura 7). En un caso, se encontró una eliminación de 47 aminoácidos (I; figura 7) que abarcan la región determinante de la sensibilidad del interferón (ISDR). El análisis de secuencias de NS5A de otros 8 clones de células resistentes a G418 puso de manifiesto mutaciones puntuales similares, aunque se encontró que 2 clones, que tenían niveles bajos de replicación del VHC y velocidades de crecimiento bajas (p. ej., clon E en la figura 4), contenían la NS5A natural. Además de las mutaciones de NS5A identificadas, también se observaron mutaciones de nucleótidos en NS3 y NS4B; el clon II (SEQ ID NO:9) contiene sustituciones en el nt 3550 (NS3) y nt 4573 (NS4B) (de Lys (584) por Glu, y de Ser(925) por Gly de la SEQ ID NO:3, representado en la SEQ ID NO:17), mientras que se mutó el nt 2060 (NS3) en el clon VI (Figura 7, que corresponde a Gln (87) por Arg de la SEQ ID NO:3, representado en la SEQ ID NO:15).
- 50 **Reconstrucción de replicones mutantes.** Para determinar si los cambios de nucleótidos y la eliminación identificada en NS5A eran adaptativas, cada mutación, excepto la mutación II, se volvió a diseñar en la cadena principal de HCVrep1bBartMan/Avall. El ARN transcrito de cada replicón reconstruido se electroporó en células Huh7 vírgenes, y se comparó el número de colonias resistentes a G418 con las obtenidas para el replicón HCVrep1bBartMan/Avall que contenía la NS5A natural. La eliminación de 47 aminoácidos, así como las mutaciones puntuales, eran capaces de aumentar la frecuencia de colonias resistentes a G418 a al menos 1% de la población de células electroporadas inicial (figura 8), indicando que estas mutaciones dirigidas a NS5A son adaptativas y permiten la replicación eficaz del VHC en células Huh7. Además, se observaron colonias resistentes a G418 después de transfección de células HeLa, una línea celular epitelial humana, con el ARN replicón del clon I. Por lo tanto, al menos una de las mutaciones que era adaptativa en células Huh7 también permite el establecimiento de la

replicación del VHC en una línea celular no hepática.

Ejemplo 2

5 Este ejemplo describe la producción de líneas celulares permisivas para la replicación del VHC; un replicón que comprende la región codificante de NS2; y clones de ADNc del VHC de longitud completa que comprenden la sustitución de Ser por Ile en la posición 1179 de la SEQ ID NO: 3.

Generación de líneas celulares. Como se muestra en el ejemplo previo, se aislaron clones de células resistentes a G418 que albergan ARN de HCV de replicación persistente. Dos de estos clones de células resistentes a G418 se trataron extensamente con el antivírico interferón- α , para obtener 2 líneas celulares desprovistas de ARN del VHC. Se hace referencia a estas como líneas celulares I y II tratadas con interferón.

HCVrep1bBartMan/Avall, replicón adaptativo del VHC I o replicón adaptativo del VHC VII, se transfectaron en las líneas celulares tratadas con interferón, I y II. Esto produjo una eficacia de transducción de G418 mayor que la observada para las células Huh-7 parentales (Véase la tabla 1). La amplificación temprana del ARN del VHC después de transfección era mayor para la línea celular tratada con IFN. Estos resultados indican que las líneas celulares, líneas celulares I y II tratadas con interferón, son más permisivas para la replicación del VHC que la línea celular parental Huh-7.

20

Tabla 1: Eficacias de transducción de G418 relativas de replicones del VHC después de transfección en clones de células tratadas con interferón.

Línea celular	Replicón transfectado		
	Bartman	I	VII
Huh-7 parental	0,0005%	0,15%	9%
I tratada con IFN	0,005%	5%	30%
II tratada con IFN	0,001%	1,3%	11%

Dichas líneas celulares no son solo valiosas para el estudio genético del VHC, sino también para examinar los entornos celulares más permisivos para la replicación del VHC. Por ejemplo, la tecnología de micomatrices permitirá observar de forma global las diferencias en los perfiles de expresión de genes entre las diferentes líneas celulares.

Construcción de replicones. Se construyó un replicón en el que la 5' NTR del VHC se fusionó con el IRES del EMCV en la dirección 5' de NS3, creando así un replicón que carecía del gen de la neomicina fosfotransferasa. Este replicón, 5'NTR-EMCV/HCVrepVII (SEQ ID NO: 25), se replica en niveles altos en células Huh7, como se muestra en la figura 10. Se hizo otro replicón, HCVrep/NS2-5B (SEQ ID NO: 22) en el que la proteína no estructural, NS2, está en dirección 5' de NS3. Como se muestra en la figura 10, este replicón también es competente para la replicación en células Huh7. Este último replicón se puede usar ventajosamente, por ejemplo, en el ensayo de compuestos para inhibir la replicación del VHC. La adición de la región que codifica NS2 proporciona un objetivo adicional para dichos compuestos antivíricos, y también proporciona una proteína adicional para el estudio genético.

ARN del VHC de longitud completa. Los clones de ADNc del VHC de longitud completa se ensamblaron. El primero HCV FL (SEQ ID NO: 24), contiene la mutación que codifica una sustitución de Ser por Ile en NS5A, como se muestra en la posición 1179 de la SEQ ID NO: 3 (Véase Figure 9). El segundo, HCV FL-Neo (SEQ ID NO: 23), también codifica la mutación de Ser en Ile, y además comprende el gen de la neomicina fosfotransferasa inmediatamente 3' de la 5' NTR y el IRES de EMCV inmediatamente 5' del marco de lectura abierto del VHC (Véase la figura 9). Ambos clones de longitud completa se replican en la línea celular I tratada con interferón, como se muestra en la figura 10. Este resultado indica que el replicón del VHC no depende del IRES del EMCV que dirige las proteínas no estructurales del VHC, porque las proteínas no estructurales del clon HCV FL son dirigidas por el IRES del VHC en el clon HCV FL de longitud completa.

Además, se ha generado una línea celular resistente a G418 que comprende el clon HCV FL-neo a partir de la línea celular I tratada con interferón, descrita antes. Esta línea celular soporta niveles altos de ARN de HCV FL-Neo de replicación persistente.

50

Apéndice

SEQ ID NO

SEQ ID NO: 1: parte 5' de una 5' NTR del HCV

5

SEQ ID NO: 2: parte 3' de una 3' NTR de un VHC de subtipo 1a natural

TGGTGGCTCCATCTTAGCCCTAGTCACGGCTAGCTGTGAAAGGTCCGTGAGCCGC
ATGACTGCAGAGAGTGCTGATACTGGCCTCTCTGCTGATCATGT

10

SEQ ID NO: 3: Secuencia de aminoácidos de la región de la poliproteína de HCVrep1bBartMan

MAPITAYSQQRGLLGCITSLTGRDRNOVEGEVQVVSTATQSFLATCVNGVCWTVY
HGAGSKTLAGPKGPITQMYTNVDQDLVGVWQAPPGARSLTPCTCGSSDLYLVRHAD
VIPVRRRGDSRGSLLSPRPVSYLKSSGGPLLCPSGHA VGFRAAVCTRVAKAVDFV
PVESMETTMRSPVFTDNSSPPAVPQTFQVAHLHAPTGS GKSTKVPAAAYAAQGYKVL
VLNPSVAATLGFGAÝMSKAHGIDPNIRTGVRTTTTGAPITYSTY GKFLADGGCSGGAY
DIIICDECHSTDSTTILGIGTVLDQAETAGARLVVLATATPPGSVTVPHPNIEEVALSST
GEIPFYGKAIPETIKGGRHLIFCHSKKKCDELA AKLSGLGLNAVAYYRGLDVSVIPTS
GDVIVVATDALMTGFTGDFDSVIDCNTCVTQTVDFSLDPTFTIETTTVPQDAVRSQR
RGRTGRGRMGYRFVTPGERPSGMFDSSVLC ECYDAGCAWYELTPAETSVRLRAYL
NTPGLPVCQDHLEFWEVFTGLTHIDAHFLSQT KQAGDNFPYL VAYQATVCARAQA
PPPSWDQMWKCLIRLKP TLHGPTPLLYRLGAVQNEVTTTHPITKYIMACMSADLEV
TSTWVLVGGVLAALAAAYCLTTGSVVIVGRILSGKPAIIPDREVL YREFDEMEECASH
LPYIEQGMQLAEQFKQKAIGLLQTATKQAEAAAPV VESKWRLEAFWAKHMWNFIS
GIQYLAGLSTLPGNPAIASLMAFTASITSPLTTQHTLLFNILGGWVAAQLAPPSAASAF
VGAGIAGAAVGSIGLGKVLVDILAGYGAGVAGALVAFKVMMSGEMPSTEDLVNLLPA
ILSPGALVVGVVCAAILRRHVGPGE GAVQWMNRLIAFASRGNHVSPHYVPESDAA
ARVTQILSSLTTTQLKRLHQWINE DCSTPCSGSWLRDVWDWICTVLTDFKTWLQSK
LLPRLPGVPPFFSCQRGYKGVWRGDGIMQTTCP CGAQITGHVKNGSMRIVGPRTCSNT
WHGTFPINAYTTGPTPSPAPNYSRALWRVA AEYVEVTRVGD FHYVTGMTTDNVK
CPCQVPAPEFFTEVDGVR LHRYAPACKPLLREEV TFLVGLNQYL VGSQLPCEPEPDV
AVLTSMLTDP SHITAETA KRRLARGSPPSLASSAS QLSAPSLKATCTTRHDS PDADLI
EANLLWRQEMGGNTRVESENKVVILDSFEPLQAEEDEREVS VPAEILRRSRKFPRAM
PIWARPDYNPPLLESWKDPDYVPPVHVGCPL PPAKAPPIPPPRRKRTVVLSESTVSSAL
AELATKTFGSSESAVDSGTATASPDQPSDDGDAGSDVESYSSMPLEGE PGDPDLS
GSWSTVSEEASEDVCCSMSYTWGALITPCAABETKLPINALSNSLLRHHNLVYAT
TSRSAŠLRQKKVTFDRLQVLDDHYRDVLKEMKAKASTVKAKLLSVEACKLTPPHS
ARSKFGYGAKDVRNLSSKAVNHRSVWKD LLEDTETPIDTTIMAKNEVFCVQPEKGG
RKPRLIVFPDLGVRVCEKMALYDVVSTLPQAVMGSSYGFQYSPGQ RVEFLVNAWK
AKKCPMGFAYDTRCFDSTVTENDIRVEESIQCCDLAPEARQAIRSLTERLYIGGPLT
NSKGQNCGYRRCRASGVLTTSCGNTLTCYLKAAAACRAAKLQDCTMLVCGDDL VV
ICESAGTQEDEASLRAFTEAMTRY SAPPGDPPKPEYDLELITSCSSNVSV AHDASGKR
VYYLTRDPTT PLARAAWETARHTPVNSWLG NIMYAPTLWARMILMTHFFSILLAQE
QLEKALDCQIYGACYSIEPLDLPQIIQRLHGLSAFSLHSYSPGEINR VASCLRKLGVPPL
RVWRHRARSVRARLLSQGGRAATCGKYL FNWAVRTK LKLTPIPAASQLDLSSWFVA
GYSGGDIYHSLSRARPRWFMWCLLLSVGVGIYLLPNR

15 SEQ ID NO: 4: Secuencia de aminoácidos de la proteína NS5A de HCVrep1bBartMan

SGSWLRD VWDWICTVL TDFKTW LQSKLLPRLPGV PFFSCQRGYKGVWRGDGIMQTT
 CPCGAQITGHVKN GMSMRIVGPR TCSNTWHGTFPINA YTTGPCTPSPAPNYSRALWRV
 AAEEYVEVTRV GDFHYVTGM TTDNVK CPCQVPAPEFFTEVDGVRLHRYAPACKPLL
 REEVTFLVGLNQYL VGSQ L PCEPEPDVA VLTSMLTDP SHITAETA KRRLARGSPPSLA
 SSSASQLSAPSLKATCTTRH DSPDADLIEANLLWRQEMGGNITRVESENKV VILDSFE
 PLQAEEDEREVS VPAEILRRSRKFPRAMP IWARPDYNP LLESWKDPDYVPPV VHGC
 LPPAKAPPIPPRRKRTV VLSESTVSSALAE LATKTFGSSESAVDSGTATASPDQPSD
 DGDAGSDVESYSSMPPLEGEPGDPDLS DGSWSTVSEEASED VVCC

SEQ ID NO: 5: Secuencia de nucleótidos del clon de ADN HCVrep1bBartMan/Δ2U's

GCCAGCCCCGATTGGGGGCGACTCCACCATAGATCACTCCCCTGTGAGGAAC
 TACTGTCTTACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTGCGTGCAG
 CCTCCAGGACCCCCCTCCCGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTA
 CACCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCTTTCTTGGATCAACCCGCTCAATGCCT
 GGAGATTTGGGCGTGCCCCGCGAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGTCGCGA
 AAGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAGGGTGTTCGCGAGTGCCCCGGGAGGTCTCGT
 AGACCGTGCACCATGAGCACGAATCCTAAACCTCAAAGAAAAACCAAAGGGCGC
 GCCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGA
 GGCTATTCGGCTATGACTGGGCAACAAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGT
 GTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGGCGCCCGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCC
 GGTGCCCTGAATGAACTGCAGGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACG
 ACGGGCGTTCCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACT
 GGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCATCTCACCTGTCTCC
 TGCCGAGAAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGT
 CCGCTACCTGCCCATTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGACGACGCT
 ACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTGCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAG
 GGGCTCGCGCCAGCCGAACTGTTCCGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGACGGC
 GAGGATCTCGTCTGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAA
 ATGGCCGCTTTTCTGGATTTCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTA
 TCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGG
 GCTGACCGCTTCTCGTGTCTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTTCGACGCGCATCGC
 CTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAGTTTAAACAGACCACAACGGTTTCC
 CTCTAGCGGGATCAATTCCGCCCTCTCCCTCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCG
 AAGCCGCTTGGATAAAGGCCGGTGTGCGTTTGTCTATATGTTATTTCCACCATAT
 TGCCGCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAG
 CATTCTAGGGGTCTTTCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTC
 GTGAAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTTCTGTAGCG
 ACCCTTTCAGGCAGCGGAACCCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAA
 AGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCAGTGCACGTTG
 TGAGTTGGATAGTTGTGGAAAGAGTCAAATGGCTCTCTCAAGCGTATTCAACAA
 GGGGCTGAAGGATGCCCAGAAGGTACCCATTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCT
 CGGTGCACATGCTTTACATGTGTTTGTGCGAGGTTAAAAACGTTAGGCCCCCC
 GAACCACGGGGACGTGGTTTTCTTTGAAAAACACGATAATACCATGGCGCCTAT
 TACGGCCTACTCCCAACAGACGCGAGGCCTACTTGGCTGCATCATCACTAGCCTC
 ACAGGCCGGGACAGGAACCAGGTTCGAGGGGGAGGTCCAAGTGGTCTCCACCGCA
 ACACAATCTTTCTGGCGACCTGCGTCAATGGCGTGTGTTGGACTGTCTATCATG
 GTGCCGGCTCAAAGACCCTTGCCGGCCCAAAGGGCCCAATCACCCAAATGTACA

CCAATGTGGACCAGGACCTCGTCGGCTGGCAAGCGCCCCCGGGGCGCGTTCCCT
 GACACCATGCACCTGCGGCAGCTCGGACCTTTACTTGGTCACGAGGCATGCCGAT
 GTCATTCCGGTGGCGCCGGCGGGGCGACAGCGGGGAGCCTACTCTCCCCCAGG
 CCGTCTCCTACTTGAAGGGCTCTTCGGGCGGTCCACTGCTCTGCCCTCGGGGC
 ACGCTGTGGGCATCTTTCGGGCTGCCGTGTGACCCGAGGGGTTGCGAAGGCGGT
 GGACTTTGTACCCGTCGAGTCTATGGAAACCACTATGCGGTCCCCGGTCTTCACG
 GACAACCTCGTCCCCTCCGGCCGTACCGCAGACATTCAGGTGGCCCATCTACACG
 CCCCTACTGGTAGCGGCAAGAGCACTAAGGTGCCGGCTGCGTATGCAGCCCAAG
 GGTATAAGGTGCTTGTCTGAACCCGTCGTCGCCGCCACCCTAGGTTTCGGGGC
 GTATATGTCTAAGGCACATGGTATCGACCCTAACATCAGAACCAGGGGTAAGGAC
 CATCACACGGGTGCCCCATCACGTACTCCACCTATGGCAAGTTTCTTGCCGAC
 GGTGGTTGCTCTGGGGGCGCCTATGACATCATAATATGTGATGAGTGCCACTCAA
 CTGAGCGACCACTATCCTGGGCATCGGCACAGTCTTGACCAAGCGGAGACGG
 CTGGAGCGCGACTCGTCTGCTCGCCACCGCTACGCCTCCGGGATCGGTACCCGT
 GCCACATCCAAACATCGAGGAGGTGGCTCTGTCCAGCACTGGAGAAATCCCCTT
 TATGGCAAAGCCATCCCATCGAGACCATCAAGGGGGGAGGCACCTCATTTTCT
 GCCATTCCAAGAAGAAATGTGATGAGCTCGCCGCGAAGCTGTCCGGCCTCGGACT
 CAATGCTGTAGCATATTACCGGGGCTTGTATGTATCCGTCATACCAACTAGCGGA
 GACGTCATTGTCGTAGCAACGGACGCTCTAATGACGGGCTTACCGGCGATTTCG
 ACTCAGTGATCGACTGCAATACATGTGTACCCAGACAGTCTGACTTCAGCCTGGA
 CCGGACCTTACCATTGAGACGACGACCGTCCACAAGACGCGGTGTACGCTCG
 CAGCGGCGAGGACGACTGGTAGGGGACGGATGGGCATTACAGGTTGTGACT
 CCAGGAGAACGGCCCTCGGGCATGTTGATTCTCGGTTCTGTGCGAGTGCTATG
 ACGCGGGCTGTGCTTGGTACGAGCTCACGCCCGCGAGACCTCAGTTAGGTTGCG
 GGCTTACCTAAACACACCAGGTTGCCCGTCTGCCAGGACCATCTGGAGTTCTGG
 GAGAGCGTCTTACAGGCCTACCCACATAGACGCCCATTTCTTGTCCCAGACTA
 AGCAGGACGAGGACAACTTCCCCTACCTGGTAGCATAACCAGGCTACGGTGTGCG
 CCAGGGCTCAGGCTCCACTCCATCGTGGGACCAAAATGTGGAAGTGTCTACAG
 GCTAAAGCCTACGCTGCACGGGCCAACGCCCTGCTGTATAGGCTGGGACCGGTT
 CAAAACGAGGTTACTACCACACACCCATAACCAAATACATCATGGCATGCATGT
 CGGCTGACCTGGAGGTCGTCACGAGCACCTGGGTGCTGGTAGGCGGAGTCTAG
 CAGCTCTGGCCGCGTATTGCCTGACAACAGGCAGCGTGGTCATTGTGGGCAGGAT
 CATCTTGTCCGAAAGCCGCCATCATTCCCGACAGGGAAGTCTTTACCGGGAG
 TTCGATGAGATGGAAGAGTGCGCCTCACACCTCCCTTACATCGAACAGGGAATGC
 AGCTCGCCGAACAATTCAAACAGAAGGCAATCGGGTTGCTGCAAACAGCCACCA
 AGCAAGCGGAGGCTGCTGCTCCCGTGGTGAATCCAAGTGGCGGACCCCTCGAAG
 CCTTCTGGGCGAAGCATATGTGGAATTCATCAGCGGGATAACAATTTAGCAGG
 CTTGTCCACTCTGCCTGGCAACCCCGCGATAGCATCACTGATGGCATTACAGCC
 TCTATCACCAGCCGCTCACCACCAACATAACCCTCCTGTTTAAACATCCTGGGGG
 GATGGGTGGCCGCCAACTTGTCTCTCCAGCGCTGCTTCTGCTTTCGTAGGCGCC
 GGCATCGCTGGAGCGGCTGTTGGCAGCATAAGGCCTTGGGAAGGTGCTTGTGGATA
 TTTTGGCAGGTTATGGAGCAGGGGTGGCAGGCGCGCTCGTGGCCTTTAAGGTCAT
 GAGCGGCGAGATGCCCTCCACCGAGGACCTGGTTAACCTACTCCCTGCTATCCTC
 TCCCCTGGCGCCCTAGTCGTCGGGGTCTGTGCGCAGCGATACTGCGTCCGGCAG
 TGGGCCCAGGGGAGGGGGCTGTGCAGTGGATGAACCGGCTGATAGCGTTCGCTT
 CGCGGGGTAACCACGTCCTCCCCACGCACTATGTGCCTGAGAGCGACGCTGCAGC
 ACGTGTCACTCAGATCCTCTCTAGTCTTACCATCACTCAGCTGCTGAAGAGGCTTC
 ACCAGTGGATCAACGAGGACTGCTCCACGCCATGCTCCGGCTCGTGGCTAAGAG
 ATGTTTGGGATTGGATATGCACGGTGTGACTGATTCAAGACCTGGCTCCAGTC
 CAAGCTCCTGCCGCGATTGCCGGGAGTCCCCTTCTTCTCATGTCAACGTGGGTAC
 AAGGGAGTCTGGCGGGGCGACGGCATCATGCAAACCACCTGCCCATGTGGAGCA
 CAGATCACCGGACATGTGAAAAACGGTTCATGAGGATCGTGGGGCCTAGGACC
 TGTAAGTAACACGTGGCATGGAACATTCCCCATTAACGCGTACACCACGGGCCCT

GCACGCCCTCCCGGCGCCAAATTATTCTAGGGCGCTGTGGCGGGTGGCTGCTGA
GGAGTACGTGGAGGTTACGCGGGTGGGGGATTTCCTACTACGTGACGGGCATGAC
CACTGACAACGTAAAGTGCCCGTGTACAGGTTCCGGCCCCCGAATTCTTCACAGAA
GTGGATGGGGTGCAGGTTGCACAGGTACGCTCCAGCGTGCAAACCCCTCCTACGGG
AGGAGGTCACATTCTGCTCGGGCTCAATCAATACCTGGTTGGGTACAGCTCCC
ATGCGAGCCCGAACCAGGACGTAGCAGTGCTCACTTCCATGCTCACCGACCCCTCC
CACATTACGGCGGAGACGGCTAAGCGTAGGCTGGCCAGGGGATCTCCCCCTCCT
TGGCCAGCTCATCAGCTAGCCAGCTGTCTGCGCCTTCTTGAAGGCAACATGCAC
TACCCGTGATGACTCCCCGACGCTGACCTCATCGAGGCCAACCTCCTGTGGCGG
CAGGAGATGGGCGGGAACATCACCCGCGTGGAGTCAGAAAATAAGGTAGTAATT
TTGGACTCTTTCGAGCGCTCCAAGCGGAGGAGGATGAGAGGGAAGTATCCGTTT
CGGCGGAGTCTGCGGAGGTCCAGGAAATTCCTCGAGCGATGCCATATGGG
CACGCCCCGATTACAACCTCCACTGTTAGAGTCCCTGGAAGGACCCGGACTACGT
CCCTCCAGTGGTACACGGGTGTCCATTGCCGCCTGCCAAGGCCCTCCGATACCA
CCTCCACGGAGGAAGAGGACGGTTGTCTGTGAGAAATCTACCGTGTCTTCTGCCT
TGGCGGAGCTCGCCACAAAGACCTTCGGCAGCTCCGAATCGTCGGCCGTCGACA
GCGGCACGGCAACGGCCTCTCCTGACCAGCCCTCCGACGACGGCGACGCGGGAT
CCGACGTTGAGTTCGTAATCCATGCCCCCCCTTGAGGGGGAGCCGGGGGATCC
CGATCTCAGCGACGGGCTTGGTCTACCGTAAGCGAGGAGGCTAGTGAGGACGT
CGTCTGCTGCTCGATGTCTACACATGGACAGGCGCCCTGATCACGCCATGCGCT
GCGGAGGAAACCAAGCTGCCCATCAATGCACTGAGCAACTCTTTGCTCCGTCAAC
ACAACCTTGGTCTATGCTACAACATCTCGCAGCGCAAGCCTGCGGCAAGAAGG
TCACCTTTGACAGACTGCAGGTCCTGGACGACCACTACCGGGACGTTGCTCAAGGA
GATGAAAGGCGAAGGCGTCCACAGTTAAGGCTAAACTTCTATCCGTGGAGGAAGC
CTGTAAGCTGACGCCCCACATTCGGCCAGATCTAAATTTGGCTATGGGGCAAAG
GACGTCGCGAACCTATCCAGCAAGGCCGTTAACCACATCCGCTCCGTGTGGAAGG
ACTTGCTGGAAGACACTGAGACACCAATTGACACCACCATCATGGCAAAAAATG
AGGTTTTCTGCGTCCAACCAGAGAAGGGGGGCGCAAGCCAGCTCGCCTTATCGT
ATTCCCAGATTTGGGGGTTCTGTGTGCGAGAAAATGGCCCTTTACGATGTGGTC
TCCACCCTCCCTCAGGCCGTGATGGGCTTTCATACGGATTCCAATACTCTCCTGG
ACAGCGGGTTCGAGTTCCTGGTGAATGCCTGGAAAGCGAAGAAATGCCCTATGGG
CTTCGCATATGACACCCGCTGTTTTGACTCAACGGTCACTGAGAATGACATCCGT
GTTGAGGAGTCAATCTACCAATGTTGTGACTTGGCCCCGAAGCCAGACAGGCCA
TAAGGTCGCTCACAGAGCGGCTTACATCGGGGGCCCCCTGACTAATTCTAAAGG
GCAGAACTGCGGCTATCGCCGGTGCOCGCGAGCGGTTGACTGACGACCAGCTG
CGGTAATAACCTCACATGTTACTTGAAGCCGCTGCGGCCCTGTCGGCCGTAAG
CTCCAGGACTGCACGATGCTCGTATGCGGAGACGACCTTGTGCTTATCTGTGAAA
GCGCGGGGACCCAAGAGGACGAGGCGAGCCTACGGGCCCTCACGGAGGCTATGA
CTAGATACTCTGCCCCCTGGGGACCCGCCCAAACCAGAATACGACTTGGAGTT
GATAACATCATGCTCCTCCAATGTGTGAGTTCGCGCACGATGCATCTGGCAAAGG
GTGTAATCTCACCCGTGACCCACCACCCCTTGGCGGGGCTGCGTGGGAGA
CAGCTAGACACACTCCAGTCAATTCCTGGCTAGGCAACATCATCATGTATGCGCC
CACCTTGTGGGCAAGGATGATCCTGATGACTCATTCTCTCCATCCTTCTAGCTC
AGGAACAACCTGAAAAAGCCCTAGATTGTCAGATCTACGGGGCCTGTTACTCCAT
TGAGCCACTTGACCTACCTCAGATCATTCAACGACTCCATGGCCTTAGCGCATTTT
CACTCCATAGTTACTCTCCAGGTGAGATCAATAGGGTGGCTTCAATGCCTCAGGAA
ACTTGGGGTACCCGCCCTTGCAGTCTGGAGACATCGGGCCAGAAGTGTCCGCGCT
AGGCTACTGTCCAGGGGGGAGGGCTGCCACTTGTGGCAAGTACCTCTTCAACT
GGGCTAGTAAGGACCAAGCTCAAACCTCACTCCAATCCCGGCTGCGTCCAGTTGGA
TTTATCCAGCTGGTTGCTGTTGCTGTTACAGCGGGGGAGACATATATCACAGCCTG
TCTCGTGCCCGACCCCGCTGGTTCATGTGGTGCCTACTCCTACTTTCTGTAGGGGT
AGGCATCTATCTACTCCCAACCGATGAACGGGGAGCTAAACACTCCAGGCCAAT
AGGCCATCCTGTTTTTTTCCCTTTTTTTTTTTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT

TTTTTCTCCTTTTTTTTTTCCCTTTTTTTTCCCTTTTCTTTCCCTTTGGTGGCTCCATCTTA
 GCCCTAGTCACGGCTAGCTGTGAAAGGTCGGTGAGCCGCTTGACTGCAGAGAGTG
 CTGATACTGGCCTCTCTGCAGATCAAGT

SEQ ID NO: 6: Secuencia de nucleótidos del clon de ADN de HCVrep1bBartMan/Avall, en la que el cambio de nucleótido que crea el sitio Avall está en minúsculas y destacado en negrita

5

GCCAGCCCCGATTGGGGGCGACACTCCACCATAGATCACTCCCCTGTGAGGAAC
 TACTGTCTTACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTGCGTGCAG
 CCTCCAGGACCCCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTA
 CACCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCCCTTCTTGGATCAACCCGCTCAATGCCT
 GGAGATTTGGGCGTGCCCCGCGAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGTGCGGA
 AAGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAGGGTGTGCGAGTGCCCCGGGAGGTCTCGT
 AGACCTGTCCACCATGAGCACGAATCCTAAACCTCAAAGAAAAACCAAAGGGCGC
 GCCATTGATGAACAAGATGGATTGCACGCGAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGAGAG
 GGCTATTTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGT
 GTCCCGCTGTCAGCGCAGGGGCGCCCGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCC
 GGTGCCCTGAATGAACTGCAGGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACG
 ACGGGCGTTCCCTTGGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGAAGGGACT
 GGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCTACCTTGCTCC
 TGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGAT
 CCGGCTACCTGCCATTTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGT
 ACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAG
 GGGCTCGCGCCAGCCGAACGTTCGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGACGGC
 GAGGATCTCGTGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAA
 ATGGCCGCTTTTCTGGATTTCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTA
 TCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGG
 GCTGACCGCTTCTCGTGTCTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTTCGACGCGCATCGC
 CTCTAGCGCCTTCTGACGAGTTCTTCTGAGTTTAAACAGACCACAACGTTTCC
 CTCTAGCGGGATCAATTCCGCCCCCTCCCTCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCG
 AAGCEGCTTGGAAATAAGGCCGGTGTGCGTTTGTCTATATGTTATTTTCCACCATAT
 TGCCGCTTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAG
 CATTCTAGGGGTCTTTCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTC
 GTGAAGGAAGCAGTTCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTCTGTAGCG
 ACCCTTTGCAGGCAGCGGAACCCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAA
 AGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCAGTGCCACGTTG
 TGAGTTGGATAGTTGTGGAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACAA
 GGGGCTGAAGGATGCCAGAAAGTACCCCATGTATGGGATCTGATCTGGGGCCT
 CGGTGCACATGCTTACATGTGTTAGTTCGAGGTTAAAAACGTTAGGCCCCCC
 GAACCACGGGGACGTGGTTTTCTTTGAAAAACAGATAATACCATGGCGCCTAT
 TACGGCCTACTCCAACAGACGCGAGGCCTACTTGGCTGCATCATCACTAGCCTC
 ACAGGCCGGGACAGGAACAGGTCGAGGGGGAGGTCCAAGTGGTCTCCACCGCA
 ACACAATCTTCTGGCGACCTGCGTCAATGGCGTGTGTTGGACTGTCTATCATG
 GTGCCGGCTCAAAGACCCCTGCGGGCCCAAAGGGCCCAATCACCCAAATGTACA
 CCAATGTGGACCAAGGACCTCGTCCGGCTGGCAAGCGCCCCCGGGGCGGTTCTT
 GACACCATGCACCTGCGGCAGCTCGGACCTTTACTTGGTACAGGGCATGCCGAT
 GTCATTCCGGTGCGCCGGCGGGGCGACAGCAGGGGGAGCCTACTCTCCCCCAGG
 CCCGTCTCTACTTGAAGGGCTCTCGGGCGGTCCACTGCTCTGCCCTCGGGGC
 ACGCTGTGGGCATCTTTCGGGCTGCCGTGTGACCCGAGGGGTTGCGAAGGCGGT
 GGACTTGTACCCGTCGAGTCTATGGAAACCACTATGCGGTCCCCGGTCTTACG
 GACAACTCGTCCCCTCCGGCCGTACCGCAGACATCCAGGTGGCCCATCTACACG
 CCCCTACTGGTAGCGGCAAGAGCACTAAGGTGCCGGCTGCGTATGCAGCCCAAAG

GGTATAAGGTGCTTGTCTGAACCCGTCCGTCGCCGCCACCCTAGGTTTCGGGGC
GTATATGTCTAAGGCACATGGTATCGACCCTAACATCAGAACCGGGGTAAGGAC
CATCACCACGGGTGCCCCATCACGTACTCCACCTATGGCAAGTTTCTTGCCGAC
GGTGGTTGCTCTGGGGGCGCCTATGACATCATAATATGTGATGAGTGCCACTCAA
CTGACTCGACCACTATCCTGGGCATCGGCACAGTCCTGGACCAAGCGGAGACGG
CTGGAGCGCGACTCGTCGTGCTCGCCACCCTACGCCTCCGGGATCGGTACCCGT
GCCACATCCAAACATCGAGGAGGTGGCTCTGTCCAGCACTGGAGAAAATCCCTTT
TATGGCAAAGCCATCCCATCGAGACCATCAAGGGGGGGAGGCACCTCATTTTCT
GCCATTCCAAGAAGAAATGTGATGAGCTCGCCGCGAAGCTGTCCGGCCTCGGACT
CAATGCTGTAGCATATTACCGGGGCCTTGATGTATCCGTCATACCAACTAGCGGA
GACGTCATTGTCTGTAGCAACGACGCTCTAATGACGGGCTTTACCGGCATTTTCG
ACTCAGTGTGACTGCAATACATGTGTCAACCAGACAGTCGACTTCAGCCTGGA
CCCGACCTTACCATTGAGACGACGACCGTGCCACAAGACGCGGTGTCACGCTCG
CAGCGGCGAGGCAGGACTGGTAGGGGAGGATGGGCATTTACAGGTTTGTGACT
CCAGGAGAACGGCCCTCGGGCATGTTTCGATTCTCGGTTCTGTGCGAGTGCTATG
ACGCGGGCTGTGCTTGGTACGAGCTCACGCCCGCCGAGACCTCAGTTAGGTTGCG
GGCTTACCTAAACACACCAGGGTTGCCCGTCTGCCAGGACCATCTGGAGTTCTGG
GAGAGCGTCTTACAGGCCTCACCCACATAGACGCCCATTTCTTGTCCCAGACTA
AGCAGGCAGGAGACAACCTCCCTACCTGGTAGCATAACCAGGCTACGGTGTGCG
CCAGGGCTCAGGCTCCACCTCCATCGTGGGACCAATGTGGAAGTGTCTCATAAG
GCTAAAGCCTACGCTGCACGGGCAACGCCCTGCTGTATAGGCTGGGAGCCGTT
CAAAACGAGGTTACTACCACACACCCCATAAACCAATACATCATGGCATGCTGT
CGGCTGACCTGGAGGTCTGACGAGCACCTGGGTGCTGGTAGGCGGAGTCCCTAG
CAGCTCTGGCCGCGTATTGCTGACAACAGGCAGCGTGGTCATTGTGGCAGGAT
CATCTGTCCGGAAGCCGCCATCATTCCCGACAGGGAAGTCCTTTACCGGGAG
TTCGATGAGATGGAAGAGTGCCTCACACCTCCCTTACATCGAACAGGGAATGC
AGCTCGCCGAACAATTCAAACAGAAGGCAATCGGGTTGCTGCAAACAGCCACCA
AGCAAGCGGAGGCTGCTGCTCCCGTGGTGGAAATCCAAGTGGCGGACCCCTCGAAG
CCTTCTGGGCGAAGCATATGTGGAATTCATCAGCGGGATAACAATATTTAGCAGG
CTTGTCCACTCTGCCGCGCAACCCGCGATAGCATCACTGATGGCATTACAGCC
TCTATCACCAGCCCGCTCACCCCAACATAACCCTCCTGTTTAAACATCTGGGGG
GATGGGTGGCCGCCAACTTGCTCCTCCAGCGCTGCTTCTGCTTTTCGTAGGCGCC
GGCATCGCTGGAGCGGCTGTTGGCAGCATAAGGCTTGGGAAGGTGCTTGTGGATA
TTTTGGCAGGTTATGGAGCAGGGGTGGCAGGCGGCTCGTGGCCTTTAAGGTCAT
GAGCGGCGAGATGCCCTCCACCGAGGACCTGGTTAACCTACTCCCTATCCCTC
TCCCCTGGCGCCCTAGTCGTGCGGGTCTGTGCGCAGCGATACTGCGTCCGGCAG
TGGGCCAAGGGGAGGGGGCTGTGCAGTGGATGAACCGGCTGATAGCGTTCGCTT
CGCGGGGTAACCACGCTCCCCCACGCACTATGFGCCTGAGAGCGACGCTGCAGC
ACGTGTCACTCAGATCCTCTCTAGTCTTACCATCACTCAGCTGCTGAAGAGGCTTC
ACCAGTGGATCAACGAGGACTGCTCCACGCCATGCTCCGGCTCGTGGCTAAGAG
ATGTTTGGGATTGGATATGCACGGTGTGACTGATTCAAGACCTGGCTCCAGTC
CAAGCTCCTGCCGCGATTGCCGGGAGTCCCCTTCTTCTCATGTCAACGTGGGTAC
AAGGGAGTCTGGCGGGGCGACGGCATCATGCAAACCACCTGCCATGTGGAGCA
CAGATCACCGGACATGTGAAAAACGGTCCATGAGGATCGTGGGGCCTAGGACC
TGTAAGTAAACAGTGGCATGGAACATTCCCCATTAACGCGTACACCACGGGCCCT
GCACGCCCTCCCCGGCGCAAATTATTCTAGGGCGCTGTGGCGGGTGGCTGCTGA
GGAGTACGTGGAGGTTACGCGGGTGGGGGATTTCCACTACGTGACGGGCATGAC
CACTGACAACGTAAAGTGCCCGTGTGAGGTTCCGGCCCCGAATTCTTACAGAA
GTGGATGGGGTGCAGGTTGCACAGGTACGCTCCAGCGTGCAAACCCCTCCTACGGG
AGGAGGTCACATTCCTGGTCCGGCTCAATCAATACCTGGTTGGGTACAGCTCCC
ATGCGAGCCCGAACCGGACGTAGCAGTGTCACTTCCATGCTCACCGACCCCTCC
CACATTACGGCGGAGACGGCTAAGCGTAGGCTGGCCAGGGGATCTCCCCCTCCT
TGGCCAGCTCATCAGCTAGCCAGCTGTCTGCGCCTTCCCTGAAGGCAACATGCAC

TACCCGTCATGACTCCCCGGACGCTGACCTCATCGAGGCCAACCTCCTGTGGCGG
 CAGGAGATGGGCGGGAACATCACCCGCGTGGAGTCAGAAAATAAGGTAGTAATT
 TTGGATCTTTCGAGCCGCTCCAAGCGGAGGAGGATGAGAGGGAAGTATCCGTTT
 CGGCGGAGATCCTGCGGAGGTCCAGGAAATCCCTCGAGCGATGCCCATATGGG
 CACGCCCGGATTACAACCTCCACTGTTAGAGTCCTGGAAGGACCCGGACTACGT
 CCCTCCAGTGGTACACGGGTGTCCATTGCCGCTGCCAAGGCCCTCCGATACCA
 CCTCCACGGAGGAAGAGGACGGTTGTCTGTGTCAGAATCTACCGTGTCTTCTGCCT
 TGGCGGAGCTCGCCACAAAGACCTTCGGCAGCTCCGAATCGTCGGCCGTCGACA
 GCGGCACGGCAACGGCCTCTCCTGACCAGCCCTCCGACGACGGCGACGGGGAT
 CCGACGTTGAGTCGTACTCCTCCATGCCCCCTTGAGGGGGAGCCGGGGGATCC
 CGATCTCAGCGACGGGTCTTGGTCTACCGTAAGCGAGGAGGCTAGTGAGGACGT
 CGTCTGCTGCTCGATGTCCTACACATGGACAGGCGCCCTGATCACGCCATGCGCT
 GCGGAGGAAACCAAGCTGCCATCAATGCACTGAGCAACTCTTTGCTCCGTCACC
 ACAACTTGGTCTATGCTACAACATCTCGCAGCGCAAGCCTGCGGCAGAAGAAGG
 TCACCTTTGACAGACTGCAGGTCCTGGACGACCACTACCGGGACGTGCTCAAGGA
 GATGAAGGCGAAGGCGTCCACAGTTAAGGCTAAACTTCTATCCGTGGAGGAAGC
 CTGTAAGCTGACGCCCCACATTCGGCCAGATCTAAATTTGGCTATGGGGCAAAG
 GACGTCCGGAACCTATCCAGCAAGGCCGTTAACCACATCCGCTCCGTGTGGAAGG
 ACTTGCTGGAAGACACTGAGACACCAATTGACACCACCATCATGGCAAAAAATG
 AGTTTTCTGCGTCCAACAGAGAAAGGGGGCGCAAGCCAGCTCGCCTTATCGT
 ATTCCAGATTTGGGGTTCGTGTGTGCGAGAAAATGGCCCTTTACGATGTGGTC
 TCCACCTCCCTCAGGCCGTGATGGGCTCTTCATACGGATTCCAATACTCTCCTGG
 ACAGCGGGTCGAGTTCCTGGTGAATGCCTGGAAAGCGAAGAAATGCCCTATGGG
 CTTTCGCATATGACACCCGCTGTTTTGACTCAACGGTCACTGAGAATGACATCCGT
 GTTGAGGAGTCAATCTACCAATGTTGTGACTTGGCCCCGAAGCCAGACAGGCCA
 TAAGGTCGCTCACAGAGCGGCTTTACATCGGGGGCCCCCTGACTAATTCTAAAGG
 GCAGAACTGCGGCTATCGCCGGTGC CGCGAGCGGTGTACTGACGACCAGCTG
 CGGTAATAACCTCACATGTTACTTGAAGGCCGCTGCGGCCTGTCGAGCTGCGAAG
 CTCCAGGACTGCACGATGCTCGTATGCGGAGACGACCTTGTGCTTATCTGTGAAA
 GCGCGGGGACCCAAGAGGACGAGGCGAGCCTACGGGCCTTACGGAGGCTATGA
 CTAGATACTTGCCCCCTGGGGACCCGCCAAACCAGAATACGACTTGGAGTT
 GATAACATCATGCTCCTCCAATGTGTGTCAGTCGCGCACGATGCATCTGGCAAAAGG
 GTGTAATCTCACCCGTCACCCACCACCCCTTGC CGCGGGCTGCGTGGGAGA
 CAGCTAGACACTCCAGTCAATTCCTGGCTAGGCAACATCATCATGTATGCGCC
 CACTTGTGGGCAAGGATGATCCTGATGACTCATTCTTCTCCATCCTTCTAGCTC
 AGGAACAACCTGAAAAAGCCCTAGATTGTCAGATCTACGGGGCCTGTTACTCCAT
 TGAGCCACTTGACCTACCTCAGATCATTCAACGACTCCATGGCCTTAGCGCATTTT
 CACTCCATAGTTACTCTCCAGGTGAGATCAATAGGGTGGCTTCATGCCTCAGGAA
 ACTTGGGGTACCGCCCTTGC GAGTCTGGAGACATCGGGCCAGAAGTGTCCGCGCT
 AGGCTACTGTCCAGGGGGGAGGGCTGCCACTTGTGGCAAGTACCTCTTCAACT
 GGGCAGTAAGGACCAAGCTCAAACCTCACTCCAATCCCGGCTGCGTCCAGTTGGA
 TTTATCCAGCTGGTTCGTTGCTGGTTACAGCGGGGAGACATATACAGCCTG
 TCTCGTGCCCGACCCGCTGGTTCATGTGGTGCCTACTCCTACTTTCTGTAGGGGT
 AGGCATCTATCTACTCCCAACCGATGAACGGGGA**c**CTAAACACTCCAGGCCAAT
 AGGCCATCCTGTTTTTTTCCCTTTTTTTTTTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
 TTTTTTCTCCTTTTTTTTTCTCTTTTTTCTTTTCTTTCTTTTGGTGGCTCCATCT
 TAGCCCTAGTCAGGCTAGCTGTGAAAGGTCCGTGAGCCGCTTACTGCAGAGAG
 TGCTGATACTGGCCTCTCTGCAGATCAAGT

SEQ ID NO: 7: Secuencia de nucleótidos del clon de ADN del replicón adaptativo I del VHC, en la que el aminoácido generado por la eliminación se identifica en minúsculas y destacado en negrita

GCCAGCCCCGATTGGGGGCGACTCCACCATAGATCACTCCCCTGTGAGGAAC
TACTGTCTTACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTGCGTGCAG
CCTCCAGGACCCCCCTCCCGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTA
CACCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCTTTCTTGGATCAACCCGCTCAATGCCT
GGAGATTTGGGCGTGCCCCGCGAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGTGCGGA
AAGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAGGGTGTGCGAGTGCCCCGGGAGGTCTCGT
AGACCGTGCACCATGAGCACGAATCCTAAACCTCAAAGAAAAACCAAAGGGCGC
GCCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGA
GGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCCGCT
GTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGCGCCCGTTCTTTTTGTCAAGACCGGACTGTC
GGTGCCCTGAATGAAGTGCAGGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACG
ACGGGCGTTCCTTGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACT
GGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCATCTCACCTTGCTCC
TGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGAT
CCGGCTACCTGCCATTTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGT
ACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAG
GGGCTCGCGCCAGCCGAAGTTCGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGACGGC
GAGGATCTCGTCTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAA
ATGGCCGCTTTTCTGGATTTCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTA
TCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGG
GCTGACCGCTTCTCGTGTCTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTTCGAGCGCATCGC
CTTCTATCGCCTTCTGACGAGTCTCTGAGTTTAAACAGACCACAACGGTTTCC
CTCTAGCGGGATCAATTCCGCCCTCTCCCTCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCG
AAGCCGCTTGAATAAAGCCGGTGTGCGTTTGTCTATATGTTATTTTCCACCATAT
TGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAG
CATTCCTAGGGGTCTTTCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTC
GTGAAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTCTGTAGCG
ACCCTTTCAGGCAGCGGAACCCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAA
AGCCACGTGTATAAGATACACTGCAAAGGCGGCACAACCCCAAGTCCACGTTG
TGAGTTGGATAGTTGTGGAAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACAA
GGGGCTGAAGGATGCCAGAAGGTACCCATTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCT
CGGTGCACATGCTTTACATGTGTTTAGTTCGAGGTTAAAAAACGTTAGGCCCCCC
GAACCAGGGGACGTGGTTTTCTTTGAAAAACACGATAATACCATGGCGCCTAT
TACGGCTACTCCCAACAGACGCGAGGCCTACTTGGCTGCATCATCAGGCTC
ACAGGCCGGGACAGGAACCAGGTGAGGGGGAGGTCCAAGTGGTCTCCACCGCA
ACACAATCTTTCCTGGCGACCTGCGTCAATGGCGTGTGTTGGACTGTCTATCATG
GTGCCGGCTCAAAGACCCTTGCCGGCCAAAGGGCCCAATCACCCAAATGTACA
CCAATGTGGACCAGGACCTCGTCGGCTGGCAAGCGCCCCCGGGGCGGTTCTT
GACACCATGCACCTGCGGCAGCTCGGACCTTTACTTGGTACGAGGCATGCCGAT
GTCATTCCGGTGCGCCGGCGGGGCGACAGCAGGGGGAGCCTACTCTCCCCCAGG
CCCGTCTCTACTTGAAGGGCTCTTCGGGGCGGTCCACTGCTCTGCCCTCGGGGC
ACGCTGTGGGCATCTTTCGGGCTGCCGTGTGACCCGAGGGGTTGCGAAGGCGGT
GGACTTTGTACCCGTCGAGTCTATGGAAACCACTATGCGGTCCCCGGTCTTACAG
GACAACTCGTCCCCTCCGGCCGTACCGCAGACATTCCAGGTGGCCCATCTACAG
CCCCTACTGTTAGCGGCAAGAGCACTAAGGTGCCGGCTGCGTATGCAGCCCAAG
GGTATAAGGTGCTTGTCTGAACCCGTCGCGCCACCCTAGGTTTCGGGGC
GTATATGTCTAAGGCACATGGTATCGACCCTAACATCAGAACCAGGGGTAAGGAC
CATCACACGGGTGCCCCATCACGTAATCCACCTATGGCAAGTTTCTTGCCGAC
GGTGGTTGCTCTGGGGGCGCCTATGACATCATAATATGTGATGAGTGCCACTCAA
CTGACTCGACCACTATCCTGGGCATCGGCACAGTCTGGACCAAGCGGAGACGG
CTGGAGCGCGACTCGTCTGCTCGCCACCGCTACGCCTCCGGGATCGGTCACCGT
GCCACATCCAAACATCGAGGAGGTGGCTCTGTCCAGCACTGGAGAAATCCCCTT
TATGGCAAAGCCATCCCCATCGAGACCATCAAGGGGGGGAGGCACCTCATTTTCT

GCCATTCCAAGAAGAAATGTGATGAGCTCGCCGCGAAGCTGTCCGGCCTCGGACT
 CAATGCTGTAGCATATTACCGGGCCTTGATGTATCCGTCATACCAACTAGCGGA
 GACGTCATTGTCGTAGCAACGGACGCTCTAATGACGGGCTTTACCGGCGATTTCG
 ACTCAGTGATCGACTGCAATACATGTGTCACCCAGACAGTCGACTTCAGCCTGGA
 CCCGACCTTACCATTGAGACGACGACCGGTGCCACAAGACGCGGTGTACGCTCG
 CAGCGGCGAGGCAGGACTGGTAGGGGCAGGATGGGCATTTACAGGTTTGTGACT
 CCAGGAGAACGGCCCTCGGGCATGTTTCGATTCTCGGTTCTGTGCGAGTGCTATG
 ACGCGGGCTGTGCTTGGTACGAGCTCACGCCCGGAGACCTCAGTTAGGTTGCG
 GGCTTACCTAAACACACCAGGGTTGCCGCTGTGCCAGGACCATCTGGAGTTCTGG
 GAGAGCGTCTTACAGGCCTCACCCACATAGACGCCCATTTCTTGTCCCAGACTA
 AGCAGGCAGGAGACAACCTTCCCCTACCTGGTAGCATAACCAGGCTACGGTGTGCG
 CCAGGGCTCAGGCTCCACCTCCATCGTGGGACCAAAATGTGGAAGTGTCTCATAAG
 GCTAAAGCCTACGCTGCACGGGCCAACGCCCTGCTGTATAGGCTGGGAGCCGTT
 CAAAACGAGGTTACTACCACACACCCCATAAACAAATACATCATGGCATGCATGT
 CGGCTGACCTGGAGTCGTACGAGCACCTGGGTGCTGGTAGGCGGAGTCTAG
 CAGCTCTGGCCGCGTATTGCCTGACAACAGGCAGCGTGGTTCATTGTGGGCAGGAT
 CATCTTGTCCGAAAGCCGGCCATCATTCCCGACAGGGAAGTCTTTACCGGGAG
 TTCGATGAGATGGAAGAGTGCCTCACACCTCCCTTACATCGAACAGGGAATGC
 AGCTCGCCGAACAATTCAAACAGAAGGCAATCGGGTTGCTGCAAACAGCCACCA
 AGCAAGCGGAGGCTGCTGCTCCCGTGGTGAATCCAAGTGGCGGACCCTCGAAG
 CCTTCTGGGCGAAGCATATGTGGAATTCATCAGCGGATAACAATATTTAGCAGG
 CTGTCCACTCTGCCTGGCAACCCCGCGATAGCATCACTGATGGCATTACAGCC
 TCTATCACCAGCCCGCTCACCACCCAACATACCCTCCTGTTTAACATCCTGGGGG
 GATGGGTGGCCGCCAACTTGTCTCCAGCGCTGCTTCTGCTTTCGTAGGCGCC
 GGCATCGCTGGAGCGGCTGTTGGCAGCATAGGCCTTGGGAAGGTCTTGTGGATA
 TTTTGGCAGGTTATGGAGCAGGGGTGGCAGGCGCGCTCGTGGCCTTTAAGGTGAT
 GAGCGGCGAGATGCCCTCCACCGAGGACCTGGTTAACCTACTCCCTGCIATCCTC
 TCCCCTGGCGCCCTAGTCGTGGGGTCTGTGTGCGCAGCGATACTGCGTCCGCCAG
 TGGGCCCAGGGGAGGGGGCTGTGCAGTGGATGAACCGGCTGATAGCGTTCGCTT
 CGCGGGGTAACCACGTCTCCCCACGCACTATGTGCCTGAGAGCGACGCTGCAGC
 ACGTGTCACTCAGATCCTCTCTAGTCTTACCATCACTCAGCTGCTGAAGAGGCTTC
 ACCAGTGGATCAACGAGGACTGCTCCACGCCATGCTCCGGCTCGTGGCTAAGAG
 ATGTTTGGGATTGGATATGCACGGTGTGACTGATTTCAAGACCTGGCTCCAGTC
 CAAGCTCCTGCCGCGATTGCCGGGAGTCCCCTTCTTCTCATGTCAACGTGGGTAC
 AAGGGAGTCTGGCGGGGCGACGGCATCATGCAAACCACCTGCCCATGTGGAGCA
 CAGATCACCGGACATGTGAAAAACGGTTCATGAGGATCGTGGGGCCTAGGACC
 TGTAGTAACACGTGGCATGGAACATTCCCCATTAACGCGTACACCACGGGCCCT
 GCACGCCCTCCCCGGCGCCAAATTATTCTAGGGCGCTGTGGCGGGTGGCTGCTGA
 GGAGTACGTGGAGGTTACGCGGGTGGGGGATTTCCACTACGTGACGGGCATGAC
 CACTGACAACGTAAAGTGCCCGTGTACGGTTCCGGCCCCGAATTCTTCACAGAA
 GTGGATGGGGTGCAGTTGCACAGGTACGCTCCAGCGTGCAAACCCCTCCTACGGG
 AGGAGGTCACATTCCTGGTCCGGCTCAATCAATACCTGGTTGGGTACAGCTCCC
 ATGCGAGCCCGAACCGGACGTAGCAGTGCTCACTTCCATGCTCACCGACCCCTCC
 CACATTACGGCGGAGACGGCTAAGCGTAGGCTGGCCAGGGGATCTCCCCCTCCT
 TGGCCAGCTCATCAGCTAGCCAGCTGtacTCTTTCGAGCCGCTCCAAGCGGAGGAG
 GATGAGAGGGAAGTATCCGTTCCGGCGGAGATCCTGCGGAGGTCCAGGAAATC
 CCTCGAGCGATGCCCATATGGGCACGCCGGATTACAACCCTCCACTGTTAGAGT
 CCTGGAAGGACCCGGACTACGTCCTCCAGTGGTACACGGGTGTCCATTGCCGCC
 TGCCAAGGCCCTCCGATAACCACCTCCACGGAGGAAGAGGACGGTTGTCTGTCA
 GAATCTACCGTGTCTTCTGCCTTGGCGGAGCTCGCCACAAAGACCTTCGGGACCT
 CCGAATCGTCGGCCGTCGACAGCGGCAGGCAACGGCCTCTCCTGACCAGCCCTC
 CGACGACGGCGACGCGGATCCGACGTTGAGTCGTACTCCTCCATGCCCCCTT
 GAGGGGGAGCCGGGGATCCCGATCTCAGCGACGGGTCTTGGTCTACCGTAAGC

GAGGAGGCTAGTGAGGACGTCGTCTGCTGCTCGATGTCCTACACATGGACAGGC
 GCCCTGATCACGCCATGCGCTGCGGAGGAAACCAAGCTGCCCATCAATGCACTG
 AGCAACTCITTTGCTCCGTCACCACAACCTTGGTCTATGCTACAACATCTCGCAGCG
 CAAGCCTGCGGCAGAAGAAGGTACCTTTGACAGACTGCAGGTCCTGGACGACC
 ACTACCGGGACGTGCTCAAGGAGATGAAGGCGAAGGCGTCCACAGTTAAGGCTA
 AACTTCTATCCGTGGAGGAAGCCTGTAAGCTGACGCCCCACATTCGGCCAGATC
 TAAATTTGGCTATGGGGCAAAGGACGTCCGGAACCTATCCAGCAAGGCCGTTAA
 CCACATCCGCTCCGTGTGGAAGGACTTGTCTGGAAGACACTGAGACACCAATTGAC
 ACCACCATCATGGCAAATAATGAGGTTTTCTGCGTCCAACCAGAGAAGGGGGC
 CGCAAGCCAGCTCGCCTTATCGTATTCCCAGATTTGGGGGTCGTGTGTGCGAGA
 AAATGGCCCTTTACGATGTGGTCTCCACCCTCCCTCAGGCCGTGATGGGCTCTTCA
 TACGGATTCCAATACTCTCCTGGACAGCGGGTCGAGTTCCTGGTGAATGCCTGGA
 AAGCGAAGAAATGCCCTATGGGCTTCGCATATGACACCCGCTGTTTTGACTCAAC
 GGTCACTGAGAATGACATCCGTGTTGAGGAGTCAATCTACCAATGTTGTGACTTG
 GCCCCGAAGCCAGACAGGCCATAAGGTCGCTCACAGAGCGGCTTTACATCGGG
 GGCCCCCTGACTAATTCTAAAGGGCAGAAGTGCAGGCTATCGCCGTGCCGCGGA
 GCGGTGTAAGTACGACGACCAGCTGCGGTAATACCCTCACATGTTACTTGAAGGCCG
 TGCGGCCTGTGAGCTGCGAAGCTCCAGGACTGCACGATGCTCGTATGCGGAGAC
 GACCTTGTGTTATCTGTGAAAGCGGGGACCCAAGAGGACGAGGCCAGCCTA
 CGGGCCTTACGGAGGCTATGACTAGATACTCTGCCCCCTGGGGACCCGCCCA
 AACCAGAATACGACTTGGAGTTGATAACATCATGCTCCTCCAATGTGTGAGTCGC
 GCACGATGCATCTGGCAAAGGGTGTACTATCTCACCCGTGACCCACCACCCCT
 CTTGCGCGGGCTGCGTGGGAGACAGCTAGACACACTCCAGTCAATTCCTGGCTAG
 GCAACATCATCATGTATGCGCCACCTTGTGGGCAAGGATGATCCTGATGACTCA
 TTTCTTCTCCATCCTTCTAGCTCAGGAACAACCTTGAAAAAGCCCTAGATTGTCAGA
 TCTACGGGGCCTGTTACTCCATTGAGCCACTTGACCTACCTCAGATCATTCAACG
 ACTCCATGGCCTTAGCGCATTTTCACTCCATAGTTACTCTCCAGGTGAGATCAATA
 GGGTGGCTTCATGCCTCAGGAAACTTGGGGTACCGCCCTTGCAGTCTGGAGACA
 TCGGGCCAGAAGTGTCCGCGCTAGGCTACTGTCCAGGGGGGGAGGGCTGCCAC
 TTGTGGCAAGTACCTCTCAACTGGGCAGTAAGGACCAAGCTCAAACCTCACTCCA
 ATCCCGCTGCGTCCCAGTTGGATTTTCCAGCTGGTTCGTGCTGGTTACAGCGG
 GGGAGACATATCACAGCCTGTCTCGTCCCGACCCCGCTGGTTCATGTGGTGC
 CTACTCCTACTTTCTGTAGGGGTAGGCATCTATCTACTCCCAACCGATGAACGG
 GGACCTAAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGTTTTTTTTTCCCTTTTTTTTTTCT
 TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTCCTTTTTTTTTTCTTTTTTCTCT
 TTCTTTCTTTGGTGGCTCCATCTTAGCCCTAGTCACGGCTAGCTGTGAAAGGTCC
 GTGAGCCGCTTGACTGCAGAGAGTGTGATACTGGCCTCTCTGCAGATCAAGT

SEQ ID NO: 8: Secuencia de nucleótidos del clon de ADN del replicón adaptativo VI del VHC, en la que los cambios de nucleótidos están en minúsculas y destacados en negrita

5

GCCAGCCCCGATTGGGGGCGACACTCCACCATAGATCACTCCCCTGTGAGGAAC
 TACTGTCTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTGCTGCAG
 CCTCCAGGACCCCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTA
 CACCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCCCTTTCTTGGATCAACCCGCTCAATGCCT
 GGAGATTTGGGCGTGCCCCCGGAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGTCGCGA
 AAGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAGGGTGTCTGCGAGTGCCCCGGGAGGTCTCGT
 AGACCGTGCACCATGAGCACGAATCCTAAACCTCAAAGAAAAACCAAGGGCGC
 GCCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGA
 GGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGT
 GTTCCGGCTGTGAGCGCAGGGGCGCCCGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCC
 GGTGCCCTGAATGAACTGCAGGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCAG

ACGGGCGTTCCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACT
 GGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCATCTCACCTTGCTCC
 TGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGAT
 CCGGCTACCTGCCATTTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGT
 ACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAG
 GGGCTCGCGCCAGCCGAACGTTCGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGACGGC
 GAGGATCTCGTGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAA
 ATGGCCGCTTTTCTGGATTATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTA
 TCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGG
 GCTGACCGCTTCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTTCGACGCGCATCGC
 CTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCCTTCTGAGTTTAAACAGACCACAACGGTTTCC
 CTCTAGCGGGATCAATTCCGCCCTCTCCCTCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCG
 AAGCCGCTTGAATAAAGCCGGTGTGCGTGTGCTATATGTTATTTCCACCATAT
 TGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGAAACCTGGCCCTGTCTTCTGACGAG
 CATTCTAGGGGTCTTCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTC
 GTGAAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTTCTGTAGCG
 ACCTTTTGCAGGCAGCGGAACCCCCACCTGGCGACAGGTGCTCTGCGGCCAAA
 AGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCAGTGCCACGTTG
 TGAGTTGGATAGTTGTGGAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACAA
 GGGGCTGAAGGATGCCCAGAAGGTACCCATTGTATGGGATCTGATCTGGGGCT
 CGGTGCACATGCTTACATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAACGTCTAGGCCCCCC
 GAACCACGGGGACGTGGTTTTCTTTGAAAAACACGATAATACCATGGCGCCTAT
 TACGGCCTACTCCCAACAGACGCGAGGCCTACTTGGCTGCATCATCACTAGCCTC
 ACAGGCCGGGACAGGAACCAGGTTCGAGGGGGAGGTCCAAGTGGTCTCCACCGCA
 ACACAATCTTTCTGGCGACCTGCGTCAATGGCGTGTGTTGGACTGTCTATCATG
 GTGCCGGCTCAAAGACCTTGCCGGCCAAAGGGCCCAATCACCCAAATGTACA
 CCAATGTGGACCAGGACCTCGTGGCTGGCGAGCGCCCCCGGGGCGCGTTCCTT
 GACACCATGCACCTGCGGCAGCTCGGACCTTACTTGGTACGAGGCATGCCGAT
 GTCATTCCGFTGCGCCGGCGGGGGCAGCAGGGGGAGCCTACTCTCCCCAGG
 CCCGTCTCCTACTTGAAGGGCTCTTCGGGGCGGTCCACTGCTCTGCCCTCGGGG
 ACGCTGTGGGCATCTTTCGGGCTGCCGTGTGACCCGAGGGGTTGCGAAGGCGGT
 GGACTTTGTACCCGTCGAGTCTATGGAAACCACTATGCGGTCCCCGGTCTTACG
 GACAACTCGTCCCCTCCGGCCGTACCGCAGACATTCCAGGTGGCCCATCTACAG
 CCCCTACTGGTAGCGGCAAGAGCACTAAGGTGCCGGCTGCGTATGCAGCCCAAG
 GGTATAAGGTGCTTGTCTGAACCCGTCCGTGCGCGCCACCCTAGGTTTCGGGGC
 GTATATGTCTAAGGCACATGGTATCGACCCTAACATCAGAACCGGGGTAAGGAC
 CATCACACGGGTGCCCCATCACGTACTCCACCTATGGCAAGTTTCTTGGCGAC
 GGTGGTTGCTCTGGGGGCGCCTATGACACTATAATATGTGATGAGTGCCACTCAA
 CTGACTCGACCACTATCCTGGGCATCGGCACAGTCCCTGGACCAAGCGGAGACGG
 CTGGAGCGCGACTCGTCTGTGCTCGCCACCCTACGCCTCCGGGATCGGTACCCGT
 GCCACATCCAAACATCGAGGAGGTGGCTCTGTCCAGCACTGGAGAAATCCCCTTT
 TATGGCAAAGCCATCCCCATCGAGACCATCAAGGGGGGGAGGCACCTCATTTCCT
 GCCATTCCAAGAAGAAATGTGATGAGCTCGCCGCGAAGCTGTCCGGCCTCGGACT
 CAATGCTGTAGCATATTACCGGGCCCTTGATGTATCCGTCATAACCACTAGCGGA
 GACGTCAATTGTGCTAGCAACGGACGCTCTAATGACGGGCTTACCGGCGATTTTCG
 ACTCAGTGATCGACTGCAATACATGTGTACCCAGACAGTCGACTTCAGCCTGGA
 CCCGACCTTACCATTTGAGACGACGACCCTGCCACAAGACGCGGTGTCACGCTCG
 CAGCGGCGAGGCAGGACTGGTAGGGGCAGGATGGGCATTTACAGGTTTGTGACT
 CCAGGAGAACGGCCCTCGGGCATGTTTCGATTCCTCGGTTCTGTGCGAGTGCTATG
 ACGCGGGCTGTGCTTGGTACGAGCTACGCCCGCCGAGACCTCAGTTAGGTTGCG
 GGCTTACCTAAACACACCAGGGTTGCCCGTCTGCCAGGACCATCTGGAGTTCTGG
 GAGAGCGTCTTTACAGGCCTCACCCACATAGACGCCCATTTCTTGTCCAGACTA
 AGCAGGCAGGAGACAACCTTCCCTACCTGGTAGCATACCAGGCTACGGTGTGCG

CCAGGGCTCAGGCTCCACCTCCATCGTGGGACCAAATGTGGAAGTGTCTCATACG
 GCTAAAGCCTACGCTGCACGGGCCAACGCCCTGCTGTATAGGCTGGGAGCCGTT
 CAAAACGAGGTTACTACCACACACCCATAACCAAATACATCATGGCATGCATGT
 CGGCTGACCTGGAGGTCGTACGAGCACCTGGGTGCTGGTAGGCGGAGTCCTAG
 CAGCTCTGGCCGCGTATTGCCTGACAACAGGCAGCGTGGTCATTGTGGGCAGGAT
 CATCTTGTCCGAAAGCCGGCCATCATTCCCGACAGGGAAGTCCTTTACCGGGAG
 TTCGATGAGATGGAAGAGTGCGCCTCACACCTCCCTTACATCGAACAGGGAATGC
 AGCTCGCCGAACAATTCAAACAGAAGGCAATCGGGTTGCTGCAAACAGCCACCA
 AGCAAGCGGAGGCTGCTGCTCCCGTGGTGAATCCAAGTGGCGGACCCTCGAAG
 CCTTCTGGGCGAAGCATATGTGGAATTTTCATCAGCGGGATACAATATTTAGCAGG
 CTTGTCCACTCTGCCTGGCAACCCCGGATAGCATCACTGATGGCATTACAGCC
 TCTATCACCAGCCCGCTCACCACCAACATAACCTCCTGTTTAAACATCCTGGGGG
 GATGGGTGGCCGCCAACTTGTCTCCTCCAGCGCTGCTTCTGCTTTCGTAGGCGCC
 GGCATCGTGGAGCGGCTGTTGGCAGCATAGGCCTTGGGAAGGTGCTTGTGGATA
 TTTTGGCAGGTTATGGAGCAGGGGTGGCAGGCGCGCTCGTGGCCTTTAAGGTCAT
 GAGCGGCGAGATGCCCTCCACCGAGGACCTGGTTAACCTACTCCCTGCTATCCTC
 TCCCCTGGCGCCCTAGTCGTCGGGGTTCGTGTGCGCAGCGATACTGCGTCGGCACG
 TGGGCCCAGGGGAGGGGGCTGTGCAGTGGATGAACCGGCTGATAGCGTTCGCTT
 CGCGGGGTAACCACGTCTCCCCACGCACTATGTGCCTGAGAGCGACGCTGCAGC
 ACGTGTCACTCAGATCCTCTCTAGTCTTACCATCACTCAGCTGCTGAAGAGGCTTC
 ACCAGTGGATCAACGAGGACTGCTCCACGCCATGCTCCGGCTCGTGGCTAAGAG
 ATGTTTGGGATTGGATATGCACGGTGTGACTGATTTCAAGACCTGGCTCCAGTC
 CAAGCTCCTGCCGCGATTGCCGGGAGTCCCTTCTTCTCATGTCAACGTGGGTAC
 AAGGGAGTCTGGCGGGGCGACGGCATCATGCAAACCACCTGCCCATGTGGAGCA
 CAGATCACCGGACATGTGAAAAACGGTTCATGAGGATCGTGGGGCCTAGGACC
 TGTAAGTAAACAGTGGCATGGAACATTCCCCATTAACGCGTACACCAGGGGCCCT
 GCACGCCCTCCCGCGCCAAATTATTCTAGGGCGCTGTGGCGGGTGGCTGCTGA
 GGAGTACGTGGAGGTTACGCGGGTGGGGATTCCACTACGTGACGGGCATGAC
 CACTGACAACGTAAAGTGCCCGTGTCAAGTTCCGGCCCCCGAATTCTTCACAGAA
 GTGGATGGGGTGCGGTTGCACAGGTACGCTCCAGCGTGCAAACCCCTCCTACGGG
 AGGAGGTCACATTCCTGGTTCGGGCTCAATCAATACTGGTTGGGTACAGCTCCC
 ATGCGAGCCCGAACCGGACGTAGCAGTGTCACTCCATGCTCACCGACCCCTCC
 CACATTACGGCGGAGACGGCTAAGCGTAGGCTGGCCAGGGGATCTCCCCCTCCT
 TGGCCAGCTCATCAGCTAACCAGCTGTCTGCGCCTTCTTGAAGGCAACATGCACT
 ACCCGTCACTGACTCCCCGACGCTGACCTCATCGAGGCCAACCTCCTGTGGCGGC
 AGGAGATGGGCGGGAACATCACCCGCGTGGAGTCAGAAAATAAGGTAGTAATTT
 TGGACTCTTTCGAGCCGCTCCAAGCGGAGGAGGATGAGAGGGAAGTATCCGTTCC
 CGGCGGAGATCCTGCGGAGGTCCAGGAAATCCCTCGAGCGATGCCCATATGGG
 CACGCCCGGATTACAACCCCTCCTAGTGTAGAGTCTGGAAGGACCCGGACTACGT
 CCTCCAGTGGTACACGGGTGTCCATTGCCGCTGCCAAGGCCCTCCGATACCA
 CCTCCACGGAGGAAGAGGACGGTGTCTCTGTCAGAAATCTACCGTGTCTTCTGCCT
 TGGCGGAGCTCGCCACAAAGACCTTCGGCAGCTCCGAATCGTCGGCCGTCGACA
 GCGGCACGGCAACGGCCTCTCCTGACCAGCCCTCCGACGACGGCGACGCGGGAT
 CCGACGTTGAGTCGTACTCCTCCATGCCCCCTTGAGGGGGAGCCGGGGGATCC
 CGATCTCAGCGACGGGTCTTGGTCTACCGTAAGCGAGGAGGCTAGTGAGGACGT
 CGTCTGCTGCTCGATGTCTACACATGGACAGGCGCCCTGATCACGCCATGCGCT
 GCGGAGGAAACCAAGCTGCCCATCAATGCACTGAGCAACTCTTTGCTCCGTCACC
 ACAACTTGGTCTATGCTACAACATCTCGCAGCGCAAGCCTGCGGCAGAAGAAGG
 TCACCTTTGACAGACTGCAGGTCTGAGCAGCACTACCGGGACGTAAGGA
 GATGAAGCTGACGCCCCACATTCGGCCAGATCTAAATTTGGCTATGGGGCAAAG
 CTGTAAGCTGACGCCCCACATTCGGCCAGATCTAAATTTGGCTATGGGGCAAAG
 GACGTCCGGAACCTATCCAGCAAGGCCGTTAACACATCCGCTCCGTGTGGAAGG
 ACTTGCTGGAAGACTGAGACACCAATTGACACCACCATCATGGCAAAAAATG

AGGTTTTCTGCGTCCAACCAGAGAAGGGGGGCGCAAGCCAGCTCGCCTTATCGT
 ATCCCAGATTGGGGGTTTCGTGTGTGCGAGAAAATGGCCCTTTACGATGTGGTC
 TCCACCCTCCCTCAGGCCGTGATGGGCTTTTCATACGGATTCCAATACTCTCCTGG
 ACAGCGGGTTCGAGTTCCTGGTGAATGCCTGGAAAGCGAAGAAATGCCCTATGGG
 CTTTCGCATATGACACCCGCTGTTTTGACTCAACGGTCACTGAGAATGACATCCGT
 GTTGAGGAGTCAATCTACCAATGTTGTGACTTGGCCCCGAAGCCAGACAGGCCA
 TAAGGTTCGTCACAGAGCGGCTTTACATCGGGGGCCCCCTGACTAATTCTAAAGG
 GCAGAACTGCGGCTATCGCCGGTGCAGCGCGAGCGGTGTACTGACGACCAGCTG
 CGGTAATACCCTCACATGTTACTTGAAGGCCGCTGCGGCCTGTCGAGCTGCGAAG
 CTCCAGGACTGCACGATGCTCGTATGCGGAGACGACCTTGTCTGTTATCTGTGAAA
 GCGCGGGGACCCAAGAGGACGAGGCGAGCCTACGGGCCTTACCGGAGGCTATGA
 CTAGATACTCTGCCCCCTGGGGACCCGCCAAACCAGAATACGACTTGGAGTT
 GATAACATCATGCTCCTCCAATGTGTGTCAGTTCGCGCACGATGCATCTGGCAAAGG
 GTGTACTATCTCACCCGTGACCCACCACCCCTTGCAGGGGCTGCGTGGGAGA
 CAGCTAGACACACTCCAGTCAATTCCTGGCTAGGCAACATCATCATGTATGCGCC
 CACCTTGTGGGCAAGGATGATCCTGATGACTCATTCTCTCCATCCTTCTAGCTC
 AGGAACAACCTGAAAAAGCCCTAGATTGTGTCAGATCTACGGGGCCTGTTACTCCAT
 TGAGCCACTTGACCTACCTCAGATCATTCAACGACTCCATGGCCTTAGCGCATTTT
 CACTCCATAGTTACTCTCCAGGTGAGATCAATAGGGTGGCTTCATGCCTCAGGAA
 ACTTGGGGTACCGCCCTTGCAGTCTGGAGACATCGGGCCAGAAGTGTCCGCGCT
 AGGCTACTGTCCAGGGGGGAGGGCTGCCACTTGTGGCAAGTACCTTTCAACT
 GGGCAGTAAGGACCAAGCTCAAACCTACTCCAATCCCGGCTGCGTCCCAGTTGGA
 TTTATCCAGCTGGTTCGTGCTGGTTACGAGCGGGGAGACATATACACAGCCTG
 TCTCGTGCCCGACCCCGTGGTTCATGTGGTGCCTACTCCTACTTCTGTAGGGGT
 AGGCATCTATCTACTCCCAACCGATGAACGGGGAGCTAAACACTCCAGGCCAAT
 AGGCCATCCTGTTTTTTTTCCCTTTTTTTTTTTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
 TTTTTCTCTTTTTTTTTCTCTTTTTTTCTTTTCTTTCTTTGTTGGTCCATCTTA
 GCCTAGTCACGGCTAGCTGTGAAAGTCCGTGAGCCGCTTACTGCAGAGAGTG
 CTGATACTGGCCTCTCTGCAGATCAAGT

SEQ ID NO: 9: Secuencia de nucleótidos del clon de ADN del replicón adaptativo II del VHC, en la que los cambios de nucleótidos están en minúsculas y destacado en negrita

5

GCCAGCCCCGATTGGGGGCGACACTCCACCATAGATCACTCCCCTGTGAGGAAC
 TACTGTCTTACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTGCGTGCAG
 CCTCCAGGACCCCCCTCCCGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTA
 CACCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCTTTCTTGGATCAACCCGCTCAATGCCT
 GGAGATTGGGGCGTGCCCCGCGAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGTGCGGA
 AAGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAGGGTGTGCGAGTGCCCCGGGAGGTCTCGT
 AGACCGTGCACCATGAGCACGAATCCTAAACCTCAAAGAAAAACCAAAGGGCGC
 GCCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGA
 GGCTATTTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCCCGT
 GTTCCGGCTGTACGCGCAGGGGCGCCCGTTCTTTTGTCAAGACCGACCTGTCC
 GGTGCCCTGAATGAACTGCAGGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACG
 ACGGGCGTTCCTTGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACT
 GGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCATCTCACCTTGCTCC
 TGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGGCGGCTGCATACGCTTGT
 CCGGCTACCTGCCATTTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGT
 ACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAG
 GGGCTCGCGCCAGCCGAAGTTCGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGACGGC
 GAGGATCTCGTGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTCCGAATATCATGGTGGAAA
 ATGGCCGCTTTTCTGGATTATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTA

TCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGG
GCTGACCGCITTCCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTTCGCAGCGCATCGC
CTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTCTTCTGAGITTAACAGACCACAACGGTTTCC
CTCTAGCGGGATCAATTCCGCCCTCTCCCTCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCG
AAGCCGCTTGAATAAAGCCGGTGTGCGTTTGTCTATATGTTATTTTCCACCATAT
TGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGAAACCTGGCCCTGTCTCTTGACGAG
CATTCTAGGGGCTTTCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTGAATGTC
GTGAAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAGCTTCTGAAGACAAACAACGTCTGTAGCG
ACCTTTGACAGGCAGCGGAACCCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAA
AGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCAGTGCCACGTTG
TGAGTTGGATAGTTGTGGAAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACAA
GGGGTGAAGGATGCCAGAAGGTACCCCATTTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCT
CGGTGCACATGCTTTACATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAAACGTCTAGGCCCC
GAACCACGGGGACGTGGTTTTCCCTTGAAAAACACGATAATACCATGGCGCCTAT
TACGGCCTACTCCCAACAGACGCGAGGCCTACTTGGCTGCATCATCACTAGCCTC
ACAGGCCGGGACAGGAACCAGGTGAGGGGGAGGTCCAAGTGGTCTCCACCGCA
ACACAATCTTTCTGGCGACCTGCGTCAATGGCGTGTGTTGGACTGTCTATCATG
GTGCCGGCTCAAAGACCTTGCCGGCCAAAGGGCCCAATCACCCAAATGTACA
CCAATGTGGACCAGGACCTCGTCGGCTGGCAAGCGCCCCCGGGGCGCGTTCCTT
GACACCATGCACCTGCGGCAGCTCGGACCTTTACTTGGTACGAGGCATGCCGAT
GTCATTCCGGTGCGCCGGCGGGGCGACAGCAGGGGGAGCCTACTCTCCCCCAGG
CCCGTCTCTACTTGAAGGGCTCTTCGGGCGGTCCACTGCTCTGCCCTCGGGGC
ACGCTGTGGGCATCTTTCGGGCTGCCGTGTGCACCCGAGGGGTTGCGAAGGCGGT
GGACTTTGTACCCGTCGAGTCTATGGAAACCACTATGCGGTCCCCGGTCTTACAG
GACAACCTCGTCCCCTCCGGCCGTACCCGACAGACATTCCAGGTGGCCCATCTACAG
CCCCTACTGGTAGCGGCAAGAGCACTAAGGTGCCGGCTGCGTATGCAGCCCAAG
GGTATAAGGTGCTTGTCTGAACCCGTCCGTGCCCGCCACCCTAGTTTTCGGGGC
GTATATGTCTAAGGCACATGGTATCGACCCTAACATCAGAACCAGGGGTAAGGAC
CATCACACGGGTGCCCCATCACGTACTCCACCTATGGCAAGTTTCTTGCCGAC
GGTGGTGTCTTGGGGGCGCCTATGACATCATAATATGTGATGAGTGCCACTCAA
CTGACTCGACCACTATCCTGGGCATCGGCACAGTCTGGACCAAGCGGAGACGG
CTGGAGCGCGACTCGTCTGCTCGCCACCGCTACGCTCCGGGATCGGTACCCGT
GCCACATCCAAACATCGAGGAGGTGGCTCTGTCCAGCACTGGAGAAATCCCCTT
TATGGCAAAGCCATCCCCATCGAGACCATCAAGGGGGGGAGGCACCTCATTTTCT
GCCATTCCAAGAAGAAATGTGATGAGCTCGCCGCGAAGCTGTCCGGCCTCGGACT
CAATGCTGTAGCATATTACCGGGGCTTGTATGATCCGTCATAACCACTAGCGGA
GACGTCATTGTCTAGCAACGGACGCTCTAATGACGGGCTTTACCGGCGATTTG
ACTCAGTGATCGACTGCAATACATGTGTACCCAGACAGTCTGACTTCAGCCTGGA
CCCGACCTTACCATTGAGACGACGACCGTCCACAAAGACGCGGTGTACGCTCG
CAGCGGCGAGGCAAGGACTGGTAGGGGCAAGGATGGGCATTTACAGGTTTGTGACT
CCAGGAGAACGGCCCTCGGGCATGTTGATTCTCGGTTCTGTGCGAGTGCTATG
ACGCGGGCTGTGCTTGGTACGAGCTCACGCCCGCGAGACCTCAGTTAGGTTGCG
GGCTTACCTAAACACACCAGGGTTGCCCGTCTGCCAGGACCATCTGGAGTTCTGG
GAGAGCGTCTTTACAGGCCTACCCACATAGACGCCATTTCTGTCCAGACTA
AGCAGGCAAGGAGACAACCTCCCTACCTGGTAGCATAACAGGCTACGGTGTGCG
CCAGGGCTCAGGCTCAACCTCCATCGTGGGACCAATGTGGAGTGTCTCATACG
GCTAAAGCCTACGCTGCACGGGCCAACGCCCTGCTGTATAGGCTGGGAGCCGTT
CAAAACGAGGTTACTACCACACACCCCATAAACCAATACATCATGGCATGCATGT
CGGCTGACCTGGAGGTCGTCACGAGCACCTGGGTGCTGGTAGGCGGAGTCCATG
CAGCTCTGGCCGCGTATTGCCTGACAACAGGACAGGCGGTGATTTGGGAGGAT
CATCTTGTCCGAAAGCCGGCCATCATCCCGACAGGGAAGTCCCTTACCGGGAG
TTCGATGAGATGGAAGAGTGCCTCACACCTCCCTTACATCGAACAGGGAATGC
AGCTCGCCGAACAATTCAAACAGAAGGCAATCGGGTTGCTGCAAACAGCCACCA

AGCAAĠCGGAGGCTGCTGCTCCCGTGGTGGAAATCCAAGTGGCGGACCCTCGAAG
 CCTTCTGGGCGAAGCATATGTGGAATTTTCATCAGCGGGATACAATATTTAGCAGG
 CTTGTCCACTCTGCCTGGCAACCCCGGATAGCATCACTGATGGCATTACAGCC
 TCTATCACCAGCCCGCTCACCACCAACATACCCCTCCTGTTTAAACATCCTGGGGG
 GATGGGTGGCCGCCAACTTGTCTCTCCAGCGCTGCTTCTGCTTTCGTAGGCGCC
 GGCATCGCTGGAGCGGCTGTTGGCAGCATAGGCCTTGGGAAGGTGCTTGTGGATA
 TTTTGGCAGGTTATGGAGCAGGGGTGGCAGGCGCGCTCGTGGCCTTTAAGGTCAT
 GAGCGGCGAGATGCCCTCCACCGAGGACCTGGTTAACCTACTCCCTGCTATCCTC
 TCCCCTGGCGCCCTAGTCGTCGGGGTCGTGTGCGCAGCGATACTGCGTCGGCAGC
 TGGGCCAGGGGAGGGGGCTGTGCAGTGGATGAACCGGCTGATAGCGTTCGCTT
 CGCGGGGTAACCACGTCTCCCCACGCACTATGTGCCTGAGAGCGACGCTGCAGC
 ACGTGTCACTCAGATCCTCTCTGTCTTACCATCACTCAGCTGCTGAAGAGGCTTC
 ACCAGTGGATCAACGAGGACTGCTCCACGCCATGCTCCGGCTCGTGGCTAAGAG
 ATGTTTGGGATTGGATATGCACGGTGTGACTGATTTCAAGACCTGGCTCCAGTC
 CAAGCTCCTGCCGCGATTGCCGGGAGTCCCCTTCTTCTCATGTCAACGTGGGTAC
 AAGGGAGTCTGGCGGGGCGACGGCATCATGCAAACCACCTGCCCATGTGGAGCA
 CAGATCACCGGACATGTGAAAAACGGTTCATGAGGATCGTGGGGCCTAGGACC
 TGTAGTAACACGTGGCATGGAACATTCCCCATTAACGCGTACACCACGGGCCCT
 GCACGCCCTCCCCGGCGCCAAATTAATCTAGGGCGCTGTGGCGGGTGGCTGCTGA
 GGAGTACGTGGAGGTTACGCGGGTGGGGGATTTCCACTACGTGACGGGCATGAC
 CACTGACAACGTAAGTGCCCGTGTGAGGTTCCGGCCCCCGAATTCTTACAGAA
 GTGGATGGGGTGCAGGTTGCACAGGTACGCTCCAGCGTGCAAACCCCTCCTACGGG
 AGGAGTACATTCCTGGTCCGGCTCAATCAATACCTGGTTGGGTACAGCTCCC
 ATGCGAGCCCGAACCAGGACGTAGCAGTGCTCACTTCCATGCTACCCAGCCCTCC
 CACATTACGGCGGAGACGGCTAAGCGTGGCTGGCCAGGGGATCTCCCCCTCCT
 TGGCCAGCTCATCAGCTAGCCAGCTGTCTGCGCTTCCITGAAGGCAACATGCAC
 TACCCGTGATGACTCCCCGGACGCTGACCTCATCGAGGCCAACCTCCTGTGGCGG
 CAGGAGTGGGCGGGAACATCACCCGCGTGGAGTCAGAAAATAAGGTAGTAAT
 TTGGACTCTTCGAGCCGCTCCAAGCGGAGGAGGATGAGAGGGAAGTATCCGTTT
 CGGCGGAGATCCTGCGGAGTCCAGGAAATTCCCTCGAGCGATGCCCATATGGG
 CACGCCCGGATTACAACCCTCCACTGTTAGAGTCCCTGGAAGGACCCGGACTACGT
 CCTCCAGTGGTACACGGGTGTCCATTGCCGCTGCCAAGGCCCTCCGATACCA
 CCTCCACGGAGGAAGAGGACGGTGTCTGTGTCAGAATCTACCGTGTCTTCTGCCT
 TGGCGGAGCTCGCCACAAAGACCTTCGGCAGCTCCGAATCGTCCGGCGTCGACA
 GCGGCACGGCAACGGCCTCTCCTGACCAGCCCTCCGACGACGGCGACGCGGGAT
 CCGACGTGAGTCGTACTCCTCCATGCCCCCCCTTGAGGGGGAGCCGGGGATCC
 CGATCTCAGCGACGGGTCTTGGTCTACCGTAAGCGAGGAGGCTAGTGAGGACGT
 CGTCTGCTGCTCGATGTCTACACATGGACAGGCGCCCTGATCACGCCATGCGCT
 GCGGAGGAAACCAAGCTGCCCATCAATGCACTGAGCAACTCTTTGCTCCGTACC
 ACAACTTTGCTCTATGCTACAACATCTCGCAGCGCAAGCCTGCGGCAGAAGAAGG
 TCACCTTTGACAGACTGCAGGTCTTGACGACCACTACCGGGACGTGCTCAAGGA
 GATGAAGGCGAAGGCGTCCACAGTTAAGGCTAAACTTCTATCCGTGGAGGAAGC
 CTGTAAGCTGACGCCCCACATTCGGCCAGATCTAAATTTGGCTATGGGGCAAAG
 GACGTCCGGAACCTATCCAGCAAGGCCGTTAACCACATCCGCTCCGTTGTGGAAGG
 ACTTGCTGGAAGACACTGAGACACCAATTGACACCACCATCATGGCAAAAAATG
 AGGTTTTCTGCGTCCAACCAGAGAAGGGGGCCGCAAGCCAGCTCGCCTTATCGT
 ATTCCAGATTTGGGGTTCGTGTGTGCGAGAAAATGGCCCTTTACGATGTGGTC
 TCCACCCTCCCTCAGGCCGTGATGGGCTTTCATACGGATTCCAATACTCTCCTGG
 ACAGCGGGTTCGAGTTCCTGGTGAATGCCTGGAAAGCGAAGAAATGCCCTATGGG
 CTTCGCATATGACACCCGCTGTTTTGACTCAACGGTCACTGAGAATGACATCCGT
 GTTGAAGGATCAATCTACCAATGTTGTGACTTGGCCCCGAAGCCAGACAGGCCA
 TAAGGTCGCTCACAGAGCGGCTTACATCGGGGGCCCCCTGACTAATTCTAAAGG
 GCAGAACTGCGGCTATCGCCGGTGC CGCGAGCGGTGTACTGACGACCAGCTG

CGGTAATACCCTCACATGTTACTTGAAGGCCGCTGCGGCCTGTCGAGCTGCGAAG
CTCCAGGACTGCACGATGCTCGTATGCGGAGACGACCTTGTCGTTATCTGTGAAA
GCGCGGGGACCCAAGAGGACGAGGCGAGCCTACGGGCCTTCACGGAGGCTATGA
CTAGATACTCTGCCCCCCTGGGGACCCGCCAAACCAGAATACGACTTGGAGTT
GATAACATCATGCTCCTCCAATGTGTCAGTCGCGCACGATGCATCTGGCAAAAGG
GTGTACTATCTACCCGTGACCCCACCACCCCTTGCGCGGGGCTGCGTGGGAGA
CAGCTAGACACACTCCAGTCAATTCCTGGCTAGGCAACATCATCATGTATGCGCC
CACCTTGTGGGCAAGGATGATCCTGATGACTCATTCTTCTCCATCCTTCTAGCTC
AGGAACAACCTTGAAAAGCCCTAGATTGTCAGATCTACGGGGCCTGTTACTCCAT
TGAGCCACTTGACCTACCTCAGATCATTCAACGACTCCATGGCCTTAGCGCATTTT
CACTCCATAGTTACTCTCCAGGTGAGATCAATAGGGTGGCTTCATGCCTCAGGAA
ACTTGGGGTACCGCCCTTGCGAGTCTGGAGACATCGGGCCAGAAGTGTCCGCGCT
AGGCTACTGTCCCAGGGGGGAGGGCTGCCACTTGTGGCAAGTACCTCTTCAACT
GGGCAGTAAGGACCAAGCTCAAACACTCCAATCCC GGCTGCGTCCCAGTTGGA
TTTATCCAGCTGGTTCGTTGCTGGTTACAGCGGGGAGACATATACACAGCCTG
TCTCGTGCCCGACCCCGCTGGTTCATGTGGTGCTACTCCTACTTTCTGTAGGGGT
AGGCATCTATCTACTCCCAACCGATGAACGGGGACCTAAACACTCCAGGCCAAT
AGGCCATCCTGTTTTTTTCCCTTTTTTTTTTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
TTTTTTTCTCCTTTTTTTTTTCCCTTTTTTTTCTTTTCTTTTCTTTTGGTGGCTCCATCT
TAGCCCTAGTCACGGCTAGCTGTGAAAGGTCCGTGAGCCGCTTGACTGCAGAGAG
TGCTGATACTGGCCTCTCTGCAGATCAAGT

SEQ ID NO: 10: Secuencia de nucleótidos del clon de ADN del replicón adaptativo V del VHC, en la que el cambio de nucleótido está en minúsculas y destacado en negrita

5

GCCAGCCCCGATTGGGGGCGACACTCCACCATAGATCACTCCCCTGTGAGGAAC
 TACTGTCTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTTCGTGCAG
 CCTCCAGGACCCCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTA
 CACCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCTTTCTTGGATCAACCCGCTCAATGCCT
 GGAGATTTGGGCGTGCCCCGCGAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTTGGGTCGCGA
 AAGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAGGGTGCTTGCAGAGTGCCCCGGGAGGTCTCGT
 AGACCGTGCACCATGAGCACGAATCCTAAACCTCAAAGAAAAACCAAAGGGCGC
 GCCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGA
 GGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGT
 GTTCCGGCTGTCAAGCGAGGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCC
 GGTGCCCTGAATGAACTGCAGGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCAG
 ACGGGCGTTCCTTGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACT
 GGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCATCTCACCTTGCTCC
 TGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGAT
 CCGGCTACCTGCCATTTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGT
 ACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAG
 GGGCTCGCGCCAGCCGAACTGTTCCGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGACGGC
 GAGGATCTCGTTCGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAA
 ATGGCCGCTTTTCTGGATTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTA
 TCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGG
 GCTGACCGCTTCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTTCGAGCGCATCGC
 CTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTCTTCTGAGTTTAAACAGACCACAACGGTTTCC
 CTCTAGCGGGATCAATTCCGCCCTCTCCCTCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCG
 AAGCCGCTTGGAATAAGGCCGGTGTGCGTTTGTCTATATGTTATTTCCACCATAT
 TGCCGTCTTTGGCAATGTGAGGGCCCGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAG
 CATTCCTAGGGGTCTTCCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTC
 GTGAAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTCTGTAGCG

ACCCTTTGCAGGCAGCGGAACCCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAA
 AGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCAGTGCCACGTTG
 TGAGTTGGATAGTTGTGGAAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACAA
 GGGGCTGAAGGATGCCAGAAGGTACCCATTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCT
 CGGTGCACATGCTTTACATGTGTTAGTCGAGGTTAAAAAACGTCTAGGCCCCCC
 GAACCACGGGGACGTGGTTTTCCITTTGAAAAACACGATAATACCATGGCGCCTAT
 TACGGCCTACTCCCAACAGACGCGAGGCCTACTTGGCTGCATCATCACTAGCCTC
 ACAGGCCGGGACAGGAACCAGGTCGAGGGGGAGGTCCAAGTGGTCTCCACCGCA
 ACACAATCTTTCCCTGGCGACCTGCGTCAATGGCGTGTGTTGGACTGTCTATCATG
 GTGCCGGCTCAAAGACCCTTGCCGGCCCAAAGGGCCCAATCACCCAAATGTACA
 CCAATGTGGACCAGGACCTCGTCGGCTGGCAAGCGCCCCCGGGGCGCGTTCCCT
 GACACCATGCACCTGCGGCAGCTCGGACCTTTACTTGGTCACGAGGCATGCCGAT
 GTCATTCCGGTGCGCCGGCGGGGCGACAGCAGGGGGAGCCTACTTCCCCCAGG
 CCCGCTCCTACTTGAAGGGCTCTTCGGGCGGTCCACTGCTCTGCCCTCGGGC
 ACGCTGTGGGCATCTTTCGGGCTGCCGTGTGCACCCGAGGGGTGCGAAGGCGGT
 GGACTTTGTACCCGTCGAGTCTATGGAAACCACTATGCGGTCCCCGFTCTTACAG
 GACAACTCGTCCCCTCCGGCCGTACCGCAGACATTCCAGGTGGCCCATCTACACG
 CCCCTACTGGTAGCGCAAGAGCACTAAGGTGCCGGCTGCGTATGCAGCCCAAG
 GGTATAAGGTGCTTGTCTGAACCCGTCGTCGCCGCCACCCTAGGTTTCGGGGC
 GTATATGTCTAAGGCACATGGTATCGACCCTAACATCAGAACCAGGGGTAAGGAC
 CATCACACGGGTGCCCCATCACGTACTCCACCTATGGCAAGTTTCTTGCCGAC
 GGTGTTGCTCTGGGGGCGCCTATGACATCATAATATGTGATGAGTGCCACTCAA
 CTGACTCGACCACTATCCTGGGCATCGGCACAGTCTGGACCAAGCGGAGACGG
 CTGGAGCGGACTCGTCTGCTCGCCACCGCTACGCCTCCGGGATCGGTCACCGT
 GCCACATCCAAACATCGAGGAGGTGGCTCTGTCCAGCACTGGAGAAATCCCCTTT
 TATGGCAAAGCCATCCCATCGAGACCATCAAGGGGGGGAGGCACCTCATTTTCT
 GCCATTCCAAAGAAGAAATGTGATGAGCTCGCCGCGAAGCTGTCCGGCCTCGGACT
 CAATGCTGTAGCATATTACCGGGGCCTTGATGTATCCGTCATACCAACTAGCGGA
 GACGTCATTGTGCTAGCAACGGACGCTCTAATGACGGGCTTTACCGGCGAATTCG
 ACTCAGTGATCGACTGCAATACATGTGTACCCAGACAGTCGACTTCAGCCTGGA
 CCCGACCTTACCAATTGAGACGACACCGTGCCACAAGACCGCGGTGTACAGTCTG
 CAGCGGGCAGGACTGGTAGGGGACAGGATGGGCATTTACAGGTTTGTGACT
 CCAGGAGAACGGCCCTCGGGCATGTTTCGATTCTCGGTTCTGTGCGAGTGCTATG
 ACGCGGGCTGTGCTTGGTACGAGCTCACGCCCGCGAGACCTCAGTTAGGTTGCG
 GGCTTACCTAAACACACCAGGGTTGCCGCTGTCAGGACCATCTGGAGTTCTGG
 GAGAGCGTCTTTACAGGCCTCACCCACATAGACGCCCATTTCTTGTCCAGACTA
 AGCAGGCAGGAGACAACTTCCCCTACCTGGTAGCATAACCAGGCTACGGTGTGCG
 CCAGGGCTCAGGCTCCACCTCCATCGTGGGACCAAATGTGGAAGTGTCTCATACG
 GCTAAAGCCTACGCTGCACGGGCCAACGCCCTGCTGTATAGGCTGGGAGCCGTT
 CAAAACGAGGTTACTACCACACACCCCATAAACCAAATACATCATGGCATGCATGT
 CGGCTGACCTGGAGGTCGTCACGAGCACCTGGGTGCTGGTAGGCGGAGTCTTAG
 CAGCTCTGGCCGCGTATTGCCTGACAACAGGCAGCGTGGTCATTGTGGGCAGGAT
 CATCTTGTCCGAAAGCCGGCCATCATTTCCCGACAGGGAAAGTCCITTTACCGGGAG
 TTCGATGAGATGGAAGAGTGCGCCTCACACCTCCCTTACATCGAACAGGGAATGC
 AGCTCGCCGAACAATTCAAACAGAAGGCAATCGGGTTGCTGCAAACAGCCACCA
 AGCAAGCGGAGGCTGTGCTCCCGTGGTGAATCCAAGTGGCGGACCCTCGAAG
 CCTTCTGGGCGAAGCATATGTGGAATTCATCAGCGGGATAACAATATTTAGCAGG
 CTTGTCCACTCGCTGGCAACCCCGCATAGCATCACTGATGGCATTACAGCC
 TCTATCACAGCCCGCTACCAACCAACATACCCTCCTGTTTAAACATCCTGGGGG
 GATGGGTGGCCGCCAACTTGCTCCTCCAGCGCTGCTTCTGCTTTGCTAGGCGCC
 GGCATCGCTGGAGCGGCTGTTGGCAGCATAGGCCTTGGGAAGGTGCTTGTGGATA
 TTTTGGCAGGTTATGGAGCAGGGGTGGCAGGCGCGCTCGTGGCCTTTAAGGTCAT
 GAGCGGCGAGATGCCCTCACCGAGGACCTGGTTAACCTACTCCCTGCTATCCTC

TCCCCTGGCGCCCTAGTCGTCGGGGTCGTGTGCGCAGCGATACTGCGTCGGCAG
TGGGCCAGGGGAGGGGGCTGTGCAGTGGATGAACCGGCTGATAGCGTTCGCTT
CGCGGGGTAACCACGTCTCCCCACGCACTATGTGCCTGAGAGCGACGCTGCAGC
ACGTGTCACTCAGATCCTCTCTAGTCTTACCATCACTCAGCTGCTGAAGAGGCTTC
ACCAAGTGGATCAACGAGGACTGCTCCACGCCATGCTCCGGCTCGTGGCTAAGAG
ATGTTTGGGATTGGATATGCACGGTGTGACTGATTTCAAGACCTGGCTCCAGTC
CAAGCTCCTGCCGCGATTGCCGGGAGTCCCCTTCTTCTCATGTCAACGTGGGTAC
AAGGGAGTCTGGCGGGGCGACGGCATCATGCAAACCACTGCCCATGTGGAGCA
CAGATCACCGGACATGTGAAAAACGGTTCATGAGGATCGTGGGGCTAGGACC
TGTAAGTAACACGTGGCATGGAACATTCCCCATTAACGCGTACACCACGGGCCCT
GCACGCCCTCCCCGGCGCAAATTAATTCTAGGGCGCTGTGGCGGGTGGCTGCTGA
GGAGTACGTGGAGGTTACGCGGGTGGGGGATTTCCACTACGTGACGGGCATGAC
CACTGACAACGTAAAGTGCCCGTGTGAGGTTCCGGCCCCCGAATTCTCACAGAA
GTGGATGGGGTGGCGTTGCACAGGTCCAGCTCCAGCGTGCAAACCCCTCTACGGG
AGGAGGTCACATTCCTGTCGGGCTCAATCAATACCTGGTTGGGTCACAGTCCC
ATGCGAGCCGAACCGGACGTAGCAGTGCTCACTTCCATGCTACCCGACCCCTCC
CACATTACGGCGGAGACGGCTAAGCGTAGGCTGGCCAGGGGATCTCCCCCTCCT
TGCCAGCTCATCAGCTAGCCAGCTGTCTGCGCCTTCTTGAAGGCAACATGCACT
ACCCGTCATGACTCCCCGGACGCTGACCTCATCGAGGCCAACCTCCTGTGGCGGC
AGGAGATGGGCGGGAACATCACCCGCGTGGAGTCAGAAAATAAGGTAGTAATTT
TGGACTCTTTCGAGCCGCTCCAAGCGGAGGAGGATGAGAGGGAAGTATCCGTTT
CGGCGGAGATCCTGCGGAGGTCCAGGAAATTCCTCGAGCGATGCCCATATGGG
CACGCCCGGATTACAACCTCCACTGTTAGAGTCTTGAAGGACCCGGACTACGT
CCCTCCAGTGGTACACGGGTGTCCATTGCCGCTGCCAAGGCCCTCCGATACCA
CCTCCACGGAGGAAGAGGACGGTTGTCTGTCAGAACTTACCGTGTCTTCTGCCT
TGGCGGAGCTCGCCACAAAGACCTTCGGCAGCTCCGAATCGTCCGGCCGTCGACA
GCGGCACGGCAACGGCCTCTCCTGACCAGCCCTCCGACGACGGCGACGCGGGAT
CCGACGTTGAGTTCGTAATCCTCCATGCCCCCCCTTGAGGGGGAGCCGGGGGATCC
CGATCTCAGCGACGGGCTTGGTCTACCGTAAGCGAGGAGGCTAGTGAGGACGT
CGTCTGCTCGATGTCTACACATGGACAGGCGCCCTGATCAGCCATCGCT
GCGGAGGAAACCAAGCTGCCATCAATGCACTGAGCAACTCTTTGCTCCGTCACC
ACAACCTGGTCTATGCTACAACATCTCGCAGCGCAAGCTGCGGCAGAAGAAGG
TCACCTTTGACAGACTGCAGGTCTGGACGACCACTACCGGGACGTGCTCAAGGA
GATGAAGGCGAAGGCGTCCACAGTTAAGGCTAAACTTCTATCCGTGGAGGAAGC
CTGTAAGCTGACGCCCCACATTCGGCCAGATCTAAATTTGGCTATGGGGCAAAG
GACGTCCGGAACCTATCCAGCAAGGCCGTTAACCACATCCGCTCCGTGTGGAAGG
ACTTGTGGAAGACACTGAGACACCAATTGACACCACCATCATGGCAAAAAATG
AGGTTTCTGCGTCCAACCAGAGAAGGGGGGCGCAAGCCAGCTCGCCTTATCGT
ATTCCCAGATTTGGGGGTTCTGTGTGCGAGAAAATGGCCCTTACGATGTGGTC
TCCACCTCCCTCAGGCCGTGATGGGCTTTCATACGGATTCCAATACTCTCCTGG
ACAGCGGGTCGAGTTCCTGGTGAATGCCTGGAAGCGAAGAAATGCCCTATGGG
CTTCGCATATGACACCCGCTGTTTTGACTCAACGGTCACTGAGAATGACATCCGT
GTTGAGGAGTCAATCTACCAATGTTGTGACTTGGCCCCCGAAGCCAGACAGGCCA
TAAGGTCGCTCACAGAGCGGCTTTACATCGGGGGCCCCCTGACTAATTCTAAAGG
GCAGAACTGCGGCTATCGCCGGTGCCGCGGAGCGGTTGACTGACGACCAGCTG
CGGTAATAACCTCACATGTTACTTGAAGGCCGCTGCGGCCGTCGAGCTGCGAAG
CTCCAGGACTGCACGATGCTCGTATGCGGAGACGACCTTGTGTTATCTGTGAAA
GCGCGGGGACCCAAGAGGACGAGGCGAGCCTACGGGCCTTACGGAGGCTATGA
CTAGATACTCTGCCCCCCTGGGGACCCGCCCAAACCAGAATACGACTTGGAGTT
GATAACATCATGCTCCTCCAATGTGTGACTGCGCACGATGCATCTGGCAAAGG
GTGTACTATCTCACCCGTGACCCACCACCCCTTGCAGCGGGCTGCGTGGGAGA
CAGCTAGACACACTCCAGTCAATTCTGGCTAGGCAACATCATCATGTATGCGCC
CACCTTGTGGGCAAGGATGATCCTGATGACTCATTTCTTCTCCATCCTTCTAGCTC

AGGAACAACCTGAAAAAGCCCTAGATTGTCAGATCTACGGGGCCTGTTACTCCAT
 TGAGCCACTTGACCTACCTCAGATCATTCAACGACTCCATGGCCTTAGCGCATT
 CACTCCATAGTTACTCTCCAGGTGAGATCAATAGGGTGGCTTCATGCCTCAGGAA
 ACTTGGGGTACCGCCCTTGCAGTCTGGAGACATCGGGCCAGAAGTGTCCGCGCT
 AGGCTACTGTCCCAGGGGGGGAGGGCTGCCACTTGTGGCAAGTACCTCTTCAACT
 GGGCAGTAAGGACCAAGCTCAAACCTCACTCCAATCCCAGGCTGCGTCCCAGTTGGA
 TTTATCCAGCTGGTTCGTTGCTGGTTACAGCGGGGGAGACATATATCACAGCCTG
 TCTCGTGGCCGACCCCGCTGGTTCATGTGGTGCCTACTCCTACTTTCTGTAGGGGT
 AGGCATCTATCTACTCCCAACCGATGAACGGGGACCTAAACTCCAGGCCAAT
 AGGCCATCCTGTTTTTTTCCCTTTTTTTTTTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
 TTTTTTCTCCTTTTTTTTTCTCTTTTTTTCTTTTTCTTTCTTTCTTTGGTGGCTCCATCT
 TAGCCCTAGTCACGGCTAGCTGTGAAAGGTCCGTGAGCCGCTTGACTGCAGAGAG
 TGCTGATACTGGCCTCTCTGCAGATCAAGT

SEQ ID NO: 11: gen de NS5A del clon de ADN del replicón adaptativo VI del VHC, en el que el cambio de nucleótido está en minúsculas y destacado en negrita

5

TCCGGCTCGTGGCTAAGAGATGTTTGGGATTGGATATGCACGGTGTGACTGATT
 TCAAGACCTGGCTCCAGTCCAAGCTCCTGCCGCGATTGCCGGGAGTCCCCTTCTT
 CTCATGTCAACGTGGGTACAAGGGAGTCTGGCGGGGGACGGCATCATGCAAAC
 CACCTGCCCATGTGGAGCACAGATCACCGGACATGTGAAAAACGGTTCATGAG
 GATCGTGGGGCCTAGGACCTGTAGTAACACGTGGCATGGAACATCCCCATTAAC
 GCGTACACCACGGGCCCTGCACGCCCTCCCCGGCGCCAAATTATTCTAGGGCGC
 TGTGGCGGGTGGCTGCTGAGGAGTACGTGGAGGTTACGCGGGTGGGGGATTTCC
 ACTACGTGACGGGCATGACCACTGACAACGTAAAGTGCCCGTGTGAGGTTCCGGC
 CCCCCAATTCCTCACAGAAGTGGATGGGGTGGGTTGCACAGGTACGCTCCAGCG
 TGCAAACCCCTCCTACGGGAGGAGGTCACATTCTGGTGGGCTCAATCAATACC
 TGGTGGGTCACAGCTCCCATGCGAGCCCGAACCGGACGTAGCAGTGCTCACTTC
 CATGCTCACCGACCCCTCCCACATTACGGCGGAGACGGCTAAGCGTAGGCTGGCC
 AGGGGATCTCCCCCTgCTTGGCCAGCTCATCAGCTAGCCAGCTGTCTGCGCCTTC
 CTTGAAGGCAACATGCACTACCCGTGACTCCCCGGACGCTGACCTCATCGAG
 GCCAACCTCCTGTGGCGGCAGGAGATGGGCGGGAACATCACCCGCGTGGAGTCA
 GAAATAAGGTAGTAATTTTGGACTCTTTCGAGCCGCTCCAAGCGGAGGAGGAT
 GAGAGGGAAGTATCCGTTCCGGCGGAGATCCTGCGGAGGTCCAGGAAATTCCT
 CGAGCGATGCCATATGGGCACGCCCGGATTACAACCCTCCACTGTTAGAGTCT
 GGAAGGACCCGGACTACGTCCCTCCAGTGGTACACGGGTGTCCATTGCCGCTGC
 CAAGGCCCTCCGATACCACCTCCACGGAGGAAGAGGACGGTGTCTCTGTCAGA
 ATCTACCGTGTCTTCTGCTTGGCGGAGCTCGCCACAAAGACCTTCGGCAGCTCC
 GAATCGTCGGCCGTCGACAGCGGCACGGCAACGGCCTCTCCTGACCAGCCCTCCG
 ACGACGGCGACGCGGGATCCGACGTTGAGTCGTACTCCTCCATGCCCCCCCTTGA
 GGGGGAGCCGGGGGATCCCGATCTCAGCGACGGGTCTTGGTCTACCGTAAGCGA
 GGAGGCTAGTGAGGACGTCGTCTGCTGC

SEQ ID NO: 12: gen de NS5A del replicón adaptativo III del VHC, en el que el cambio de nucleótido está en minúsculas y destacado en negrita

10

TCCGGCTCGTGGCTAAGAGATGTTTGGGATTGGATATGCACGGTGTGACTGATT
TCAAGACCTGGCTCCAGTCCAAGCTCCTGCCGCGATTGCCGGGAGTCCCCTTCTT
CTCATGTCAACGTGGGTACAAGGGAGTCTGGCGGGGCGACGGCATCATGCAAAC
CACCTGCCCATGTGGAGCACAGATCACCGGACATGTGAAAAACGGTTCATGAG
GATCGTGGGGCCTAGGACCTGTAGTAACACGTGGCATGGAACATTCCCCATTAAC

GCGTACACCACGGGCCCCCTGCACGCCCTCCCCGGCGCCAAATTATTCTAGGGCGC
TGTTGGCGGGTGGCTGCTGAGGAGTACGTGGAGGTTACGCGGGTGGGGGATTTCC
ACTACGTGACGGGCATGACCACTGACAACGTAAGTGCCCGTGTACAGGTTCCGGC
CCCCGAATTCTTACAGAAGTGGATGGGGTGGCGTTGCACAGGTACGCTCCAGCG
TGCAAACCCCTCCTACGGGAGGAGGTACATTCTGGTTCGGGCTCAATCAATACC
TGGTTGGGTACAGCTCCCATGCGAGCCCCGAACCGGACGTAGCAGTGTCACTTC
CATGCTCACCGACCCCTCCACATTACGGCGGAGACGGCTAAGCGTAGGCTGGCC
AGGGGATCTCCCCCCTTGGCCAGCTCATCAGCTAGCCAGCTGTCTGCGCCTTC
CTTGAAGGCAACATGCACTACCCGTCATGACTCCCCGGACGCTGACCTCATCGAG
GCCAACCTCCTGTGGCGGCAGGAGATGGGCGGGAACATCACCCGCGTGGAGTCA
GAAAATAAGGTAGTAATTTTGGACTCTTTCGAGCCGCTCCAAGCGGAGGAGGAT
GAGAGGGAAGTATCCGTTCCGGCGGAGATCCTGCGGAGGTCCAGGAAATTCCT
CGAGCGATGCCCATATGGGCACGCCCGGATTACAACCCTCCACTGTTAGAGTCTC
GGAAGGACCCGGACTACGTCCCTCCAGTGGTACACGGGTGTCCATTGCCGCCTGC
CAAGGCCCTCCGATACCACCTCCACGGAGGAAGAGGACGGTTGTCCTGTCAGA
ATCTACCGTGTCTTCTGCCCTGGCGGAGCTCGCCACAAAGACCTTCGGCAGCTCC
GAATCGTCGGCCGTCGACAGCGGCACGGCAACGGCCTCTCCTGACCAGCCCTCCG
ACGACGGCGACGCGGGATCCGACGTTGAGTCGTAICTCTCCATGCCCCCCTTGA
GGGGGAGCCGGGGGATCCCGATCTCAGCGACGGGTCTTGGTCTACCGTAAGCGA
GGAGGCTAGTGAGGACGTCGTCTGTGC

SEQ ID NO: 13: Secuencia de nucleótidos del clon de ADN del replicón adaptativo VII del VHC, en el que el cambio de nucleótido está en minúsculas y destacado en negrita

5

GCCAGCCCCCGATTGGGGGGCGACACTCCACCATAGATCACTCCCCTGTGAGGAACTACTGTCTTACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTGCGTGCAGCCTCCAGGACCCCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGAATTGCCAGGACGACCGGGTCCTTTCTTGGATCAACCCGCTCAATGCCTGGAGATTTGGGCGTGCCTCCGCGAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGTGCGGA AAGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAGGGTGTGCGAGTGCCTCCGGGAGGTCTCGT AGACCGTGCACCATGAGCACGAATCCTAAACCTCAAAGAAAAACCAAAGGGCGC GCCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGA GGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGT GTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGCGCCCGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCC GGTGCCCTGAATGAACTGCAGGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACG ACGGGCGTTCCTTGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGAGT GGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCTGGGCGAGGATCTCCTGTCACTCATCTACCTTGCTCC TGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGAT CCGGCTACCTGCCATTTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGT ACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAG GGGCTCGCGCCAGCCGAAGTTCGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGACGGC GAGGATCTCGTGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAA ATGGCCGCTTTTCTGGATTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTA TCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGG GCTGACCGCTTCCTCGTGTCTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTTCGAGCGCATCGC CTCTATCGCCTTCTGACGAGTTCTTCTGAGTTTAAACAGACCACAACGGTTTCC CTCTAGCGGGATCAATCCGCCCCTCTCCCTCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCG AAGCCGCTTGAATAAGGCCGGTGTGCGTTTGTCTATATGTTATTTTCCACCATAT TGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGAACGAG CATTCTAGGGGTCTTCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTC GTGAAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTCTGTAGCG ACCCTTTCAGGCAGCGGAACCCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAA

AGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCCAGTGCCACGTTG
 TGAGTTGGATAGTTGTGGAAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACAA
 GGGGCTGAAGGATGCCAGAAGGTACCCATTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCT
 CGGTGCACATGCTTTACATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAACGTCTAGGCCCCCC
 GAACCACGGGACGTGGTTTTCTTTGAAAAACACGATAATACCATGGCGCCTAT
 TACGGCCTACTCCCAACAGACGCGAGGCCTACTTGGCTGCATCATCACTAGCCIC
 ACAGGCCGGGACAGGAACCAGGTGAGGGGGAGGTCCAAGTGGTCTCCACCGCA
 ACACAATCTTTCTGGCGACCTGCGTCAATGGCGTGTGTTGGACTGTCTATCATG
 GTGCCGGCTCAAAGACCCTTGCCGGCCAAAGGGCCCAATCACCCAAATGTACA
 CCAATGTGGACCAGGACCTCGTCGGCTGGCAAGCGCCCCCGGGGCGGTTCTT
 GACACCATGCACCTGCGGCAGCTCGGACCTTTACTTGGTACGAGGCATGCCGAT
 GTCATTCCGGTGCGCCGGCGGGGCGACAGCAGGGGGAGCCTACTCTCCCCAGG
 CCCGTCTCCTACTTGAAGGGCTCTTCGGGCGGTCCACTGCTCTGCCCTCGGGG
 ACGCTGTGGGCATCTTTTCGGGCTGCCGTGTGCACCCGAGGGGTTGCGAAGCCGGT
 GGACTTTGTACCCGTCGAGTCTATGGAAACCACTATGCGGTCCCCGGTCTTACAG
 GACAACCTCGTCCCCCTCCGGCCGTACCGCAGACATTCCAGGTGGCCCATCTACAG
 CCCCTACTGFTAGCGGCAAGAGCACTAAGGTGCCGGCTGCGTATGCAGCCCAAG
 GGTATAAGGTGCTTGTCTGAACCCGTCGTCGCGCCACCCTAGGTTTCGGGGC
 GTATATGTCTAAGGCACATGGTATCGACCCTAACATCAGAACCAGGGTAAGGAC
 CATCACACGGGTGCCCCATCACGTACTCCACCTATGGCAAGTTTCTTGCCGAC
 GGTGGTTGCTCTGGGGGCGCCTATGACATCATAATATGTGATGAGTGCCACTCAA
 CTGACTCGACCACTATCCTGGGCATCGGCACAGTCTGGACCAAGCGGAGACGG
 CTGGAGCGCGACTCGTCTGCTCGCCACCCTACGCCTCCGGGATCGGTACCCGT
 GCCACATCCAAACATCGAGGAGGTGGCTCTGTCCAGCACTGGAGAAATCCCCTT
 TATGGCAAAGCCATCCCCATCGAGACCATCAAGGGGGGAGGCACCTCATTTTCT
 GCCATTCCAAGAAGAAATGTGATGAGCTCGCCGCGAAGCTGTCCGGCCTCGGACT
 CAATGCTGTAGCATATTACCGGGCCTTGATGTATCCGTCATAACCACTAGCGGA
 GACGTCAATTGTCGTAGCAACGGACGCTCTAATGACGGGCTTACCGGCGATTTG
 ACTCAGTGATCGACTGCAATACATGTGTCACCCAGACAGTCGACTTCAGCCTGGA
 CCCGACCTTACCATTGAGACGACGACCGTGCCACAAGACGCGGTGTCACGCTCG
 CAGCGGCGAGGACTGGTGGTGGGCGAGGATGGGCATTTACAGGTTTGTGACT
 CCAGGAGAACGGCCCTCGGGCATGTTCCGATTCCTCGGTTCTGTGCGAGTCTATG
 ACGCGGGCTGTGCTTGGTACGAGCTCACGCCCGCGAGACCTCAGTTAGGTTGCG
 GGCTTACCTAAACACACCAGGGTTGCCGCTCTGCCAGGACCATCTGGAGTTCTGG
 GAGAGCGTCTTTACAGGCCTCACCCACATAGACGCCATTTCCTTGTCCAGACTA
 AGCAGGCAGGAGACAACCTTCCCCTACCTGGTAGCATAACCAGGCTACGGTGTGCG
 CCAGGGCTCAGGCTCCACCTCCATCGTGGGACCAATGTGGAAGTGTCTCATAAG
 GCTAAAGCCTACGCTGCACGGGCCAACGCCCTGCTGTATAGGCTGGGAGCCGTT
 CAAAACGAGGTTACTACCACACACCCCATAAACCAATACATCATGGCATGCATGT
 CGGCTGACCTGGAGGTCGTCACGAGCACCTGGGTGCTGGTAGGGCGGATCCTAG
 CAGCTCTGGCCGCTATTGCCTGACAACAGGCAGCGTGGTCATTGTGGGCAGGAT
 CATCTTGTCCGAAAGCCGGCCATCATTCGACAGGGAAAGTCCCTTACCAGGAG
 TTCGATGAGATGGAAGAGTGGCCTCACACCTCCCTTACATCGAACAGGGAAATGC
 AGCTCGCCGAACAATTCAAACAGAAGGCAATCGGGTTGCTGCAAACAGCCACCA
 AGCAAGCGGAGGCTGCTGCTCCCCTGGTGGAAATCCAAGTGGCGGACCCCTCGAAG
 CCTTCTGGGCGAAGCATATGTGGAATTCATCAGCGGGATACAATATTAGCAGG
 CTTGTCCACTCTGCTGGCAACCCCGCATAGCATCACTGATGGCATTCACAGGG
 TCTATCACCTAGCCGCTCACCCCAACATAACCTCCTGTTTAAACATTCGCGGG
 GATGGGTGGCCGCCAACTTGCTCCTCCAGCGCTGCTTCTGCTTTCGTAGGCGCC
 GGCATCGCTGGAGCGGCTGTTGGCAGCATAGGCCTTGGGAAGGTGCTTGTGGATA
 TTTTGGCAGGTTATGGAGCAGGGTGGCAGGCGCGCTCGTGGCCTTAAAGGTCAT
 GAGCGGCGAGATGCCCTCCACCGAGGACCTGGTTAACCTACTCCCTGCTATCCTC
 TCCCCTGGCGCCCTAGTCGTGGGGTCTGTGTGCGCAGCGATACTGCGTCCGCACG

TGGGCCAGGGGAGGGGGCTGTGCAGTGGATGAACCGGCTGATAGCGTTCGCTT
 CGCGGGGTAACCACGTCTCCCCACGCACTATGTGCCTGAGAGCGACGCTGCAGC
 ACGTGTCACTCAGATCCTCTCTAGTCTTACCATCACTCAGCTGCTGAAGAGGCTTC
 ACCAGTGGATCAACGAGGACTGCTCCACGCCATGCTCCGGCTCGTGGCTAAGAG
 ATGTTTGGGATTGGATATGCACGGTGTGACTGATTTCAAGACCTGGCTCCAGTC
 CAAGCTCCTGCCGCGATTGCCGGGAGTCCCCTTCTTCTCATGTCAACGTGGGTAC
 AAGGGAGTCTGGCGGGGCGACGGCATCATGCAAACCACCTGCCCATGTGGAGCA
 CAGATCACCGGACATGTGAAAAACGGTTCATGAGGATCGTGGGGCCTAGGACC
 TGTAGTAAACAGTGGCATGGAACATTCCCATTAACGCGTACACCACGGGCCCT
 GCACGCCCTCCCCGGCGCCAAATTATTCTAGGGCGCTGTGGCGGGTGGCTGCTGA
 GGAGTACGTGGAGGTTACGCGGGTGGGGGATTTCCACTACGTGACGGGCATGAC
 CACTACAACGTAAAGTGCCCGTGCAGGTTCCGGCCCCGAATTCTTCACAGAA
 GTGGATGGGGTGCGGTTGCACAGGTACGTTCCAGCGTGCAAAACCCCTCCTACGGG
 AGGAGGTACATTTCCTGGTCCGGCTCAATCAATACCTGGTGGGTCACAGTCCC
 ATGCGAGCCGAACCGGACGTAGCAGTGTCTACTTCCATGCTCACCGACCCCTCC
 CACATTACGGCGGAGACGGCTAAGCGTAGGCTGGCCAGGGGATCTCCCCCTCCT
 TGGCCAGCTCATCAGCTAACCAGCTGTCTGCGCCTTCTTGAAGGCAACATGCACT
 ACCCGTCACTGACTCCCCGGACGCTGACCTCATCGAGGCCAACCTCCTGTGGCGGC
 AGGAGATGGGCGGGAACATCACCCGCGTGGAGTCAGAAAATAAGGTAGTAATTT
 TGGACTCTTTCGAGCCGCTCCAAGCGGAGGAGGATGAGAGGGAAGTATCCGTT
 CGGCGGAGATCCTGCGGAGGTCCAGGAAATTCCTCGAGCGATGCCCATATGGG
 CACGCCCGGATTACAACCTCCACTGTTAGAGTCTTGAAGGACCCGGACTACGT
 CCTCCAGTGGTACACGGGTGTCCATTGCCGCCTGCCAAGGCCCTCCGATACCA
 CCTCCACGGAGGAAGAGGACGGTGTCTGTCAGAACTTACCGTGTCTTCTGCT
 TGGCGGAGTCCGCCAAAAGACCTTCGGCAGCTCCGAATCGTCGGCCGTGACA
 GCGGCACGGCAACGGCCTCTCCTGACCCAGCCCTCCGACGACGGCGACGGGGAT
 CCGACGTTGAGTCTACTCCTCCATGCCCCCCCTTGAGGGGGAGCCGGGGATCC
 CGATCTCAGCGACGGGTCTTGGTCTACCGTAAAGCGAGGAGGCTAGTGAGGACGT
 CGTCTGCTGCTCGATGTCTACACATGGACAGGGCCCTGATCACGCCATGCGCT
 GCGGAGGAAACCAAGCTGCCCATCAATGCACTGAGCAACTCTTTGCTCCGTCACC
 ACAACTTGGTCTATGCTACAACATCTCGCAGCGCAAGCCTGCGGCAGAAGAAGG
 TCACCTTGACAGACTGCAGTCTTGGACGACCACTACCGGGACGTGCTCAAGGA
 GATGAAGGCGAAGGCGTCCACAGTTAAGGCTAAACTTCTATCCGTGGAGGAAGC
 CTGTAAGCTGACGCCCCACATTCGGCCAGATCTAAATTTGGCTATGGGGCAAAG
 GACGTCCGGAACCTATCCAGCAAGGCCGTTAACACATCCGCTCCGTGTGGAAGG
 ACTTGTGGAAGACTGAGACACCAATTGACACCACCATCATGGCAAAAATG
 AGGTTTTCTGCGTCCAACCAAGAGAAGGGGGGGCCGCAAGCCAGCTCGCCTTATCGT
 ATCCCAGATTTGGGGTTCGTGTGTGCGAGAAAAATGGCCCTTACGATGTGGTC
 TCCACCTCCCTCAGGCCGTGATGGGCTTTCATACGGATTCCAATACTCCTCTGG
 ACAGCGGGTTCGAGTTCCTGGTGAATGCCTGGAAAGCGAAGAAATGCCCTATGGG
 CTTCCGATATGACACCCGCTGTTTTGACTCAACGGTCACTGAGAATGACATCCGT
 GTTGAGGAGTCAATCTACCAATGTTGTGACTTGGCCCCGAAGCCAGACAGGCCA
 TAAGGTCGCTCACAGAGCGGCTTACATCGGGGGCCCCCTGACTAATTCTAAAGG
 GCAGAACTGCGGCTATCGCCGGTGCCGCGGAGCGGTGACTGACGACCAGCTG
 CGGTAATACCTCACATGTTACTTGAAGGCCGCTGCGGCCTGTCGAGCTGCGAAG
 CTCCAGGACTGCACGATGCTCGTATGCGGAGACGACCTTGTCTTATCTGTGAAA
 GCGCGGGGACCCAAGAGGACGAGGGGAGCCTACGGGCCCTTACGGAGGCTATGA
 CTAGATACTTCCCCCTGGGGACCCGCCAAACCAGAATACGACTTGGAGTT
 GATAACATATGCTCCTCCAATGTGTGACTGCGCGACGATGCATCTGGCAAAAAGG
 GTGTACTATCTCACCCGTGACCCCAACCCCTTGGCGGGCTGCGTGGGAGA
 CAGCTAGACACACTCCAGTCAATTCCTGGCTAGGCAACATCATCATGTATGCGCC
 CACCTTGTGGGCAAGGATGATCCTGATGACTCATTTCTTCTCCATCCTTACTGCTC
 AGGAACAACCTGAAAAAGCCCTAGATTGTGAGATCTACGGGGCCTGTACTCCAT

TGAGCCACTTGACCTACCTCAGATCATTCAACGACTCCATGGCCTTAGCGCATTTT
CACTCCATAGTTACTCTCCAGGTGAGATCAATAGGGTGGCTTCATGCCTCAGGAA
ACTTGGGGTACCGCCCTTTCGAGTCTGGAGACATCGGGCCAGAAGTGTCCGCGCT
AGGCTACTGTCCCAGGGGGGGAGGGCTGCCACTTGTGGCAAGTACCTCTTCAACT
GGCAGTAAGGACCAAGCTCAAACCTCACTCCAATCCCGGCTGCGTCCCAGTTGGA
TTTATCCAGCTGGTTCGTTGCTGGTTACAGCGGGGAGACATATATCACAGCCTG
TCTCGTGCCCGACCCCGCTGGTTCATGTGGTGCCTACTCCTACTTCTGTAGGGGT
AGGCATCTATCTACTCCCAACCGATGAACGGGGAGCTAAACACTCCAGGCCAAT
AGGCCATCCTGTTTTTTCCTTTTTTTTTTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
TTTTCTCCTTTTTTTTCTCCTTTTTTTTCTTTTCTTTTCTTTGGTGGCTCCATCTTA
GCCCTAGTCACGGCTAGCTGTGAAAGGTCCGTGAGCCGCTTGACTGCAGAGAGTG
CTGATACTGGCCTCTCTGCAGATCAAGT

SEQ ID NO: 14: Secuencia de aminoácidos de la proteína NS5A del replicón adaptativo I del VHC, en la que el aminoácido generado está destacado en negrita

5

SGSWLRDVWDWICTVLTDFKTLWLSKLLPRLPGVPPFFSCQRGYKGVWRGDGIMQTT
CPCGAQITGHVKNGSMRIVGPRTCNTWHGTFPINA YTTGPCTPSPAPNYSRALWRV
AAEYVEVTRVGFHYVTGMTDENVKPCQVPAPEFFTEVDGVRLHRYAPACKPLL
REEVFLVGLNQYLVGSQLPCEPEPDVAVLTSMLTDP SHITAETA KRRLARGSPPSLA
SSSASQLYSFEPLQAEEDEREVSVP AEILRRSRKFPRAMP IWARPDYNP LLESWKDP
DYVPPVHGCPLPPAKAPP PPRRKR TVV LSESTVSSALAE LATKTFGSSESSA VDSG
TATASPDQPSDDGDAGSDVESYSSMPPLEGEPGDPDLS DGSWSTVSE EASEDVVCC

SEQ ID NO: 15: Secuencia de aminoácidos de la región que codifica la poliproteína del replicón adaptativo VI del VHC, en la que los cambios de aminoácidos están destacados en negrita

10

MAPITAYSQQTRGLLGCIITSLTGRDRNQVEGEVQVVSTATQSFLATCVNGVCWTVY
 HGAGSKTLAGPKGPITQMYTNVDQDLVGVWRAPPGARSLTPCTCGSSDLYLVTRHAD
 VIPVRRRGDSRGSLLSPRPVSYLKSSGGPLLCPGHA VGI FRAAVCTRGVAKAVDFV
 PVESMETMRSPVFTDNSSPPAVPQTFQVAHLHAPTGS GKSTKVPAA YAAQGYKVL
 VLNPSVAATLGF GAYMSKAHGIDPNIR TGVRTTTTGAPITYSTY GKFLADGGCSGGAY
 DIIICDECHSTDSTTILGIGTVLDQAETAGARLVVLATATPPGSVTVPHPNIEVALSST
 GEIPFYGKAIP IETIKGGRHLIFCHSKKKCELA AKLSGLGLNAVAYYRGLDVSVIPTS
 GDVIVVATDALMTGFTGDFDSVIDCNTCVTQTVDFSLDPTFTIETTTVPQDAVSRSQR
 RGRTGRGRMGYRFVTPGERPSGMFDSSVLCECYDAGCAWYELTPAETSVRLRAYL
 NTPGLPVCQDHLEFWEVFTGLTHIDAHFLSQTQAGDNFPYLVAYQATVCARAQA
 PPPSWDQMWKCLIRLKP TLHGPTPLLYRLGAVQNEVTTTHPITKYIMACMSADLEVY
 TSTWVLVGGVLAALAA YCLTTGSVVIVGRILSGKPAIIPDREVL YREFDEMEECASH
 LPYIEQGMQLAEQFKQKAIGLLQTATKQAEAAAPVVESKWR TLEAFWAKHMWNFIS
 GIQYLAGLSTLPGNPAIASLMAFTASITSPLTTQHTLLFNILGGVWAAQLAPPSAASAF
 VGAGIAGA AVGSIGLGKVLVDILAGY GAGVAGALVAFKVMSEMPSTEDLVNLLPA
 ILSPGALVVGVVCAAILRRHVGPGE GAVQWMNRLIAFASRGNHVSPHYVPESDAA
 ARVTQILSSLITITQLLKR LHQWINE DCSTPCSGSWLRDVWDWICTVLTDFKTWLOSK
 LLPRLPGVPPFFSCQRGYKGVWRGDGIMQTTCPGQAQITGHVKNGSMRIVGPRTCSNT
 WHGTFPINAYTTGPCTPSPAPNYSRALWRVAAEYVEVTRV GDFHYVTGMTTDNVK
 CPCQVPAPEFFTEVDG VRLHRYAPACKP LLREEVTFLVGLNQYL VGSQLPCEPEPDV
 AVLTSM L TDP SHITAETA KRRLARGSPPSLASSAIQLSAPSLKATCTTRHDS PDADLI
 EANLLWRQEMGGNITRVESENKV VILDSFEPLQAEEDEREVS VPAEILRRSRKFPRAM
 PIWARPDYNP PLESWKDPDYVPPV VHGCP LPPAKAPP I P P P P R R K R T V V L S E S T V S S A L
 AELATKTFGSS E S S A V D S G T A T A S P D Q P S D D G A G S D V E S Y S S M P P L E G E P G D P D L S D

GSWSTVSEEASEDVVCCSMSYTWGALITPCAAEETKLPINALSNSLLRHHNLVYAT
 TERSASLRQKKVTFDRLQVLDDHYRDVLKEMKAKASTVKAKLLSVEEACKLTPPHS
 ARSKFGYGAKDVRNLSSKAVNHRSVWKDLLEDTE TPIDTTIMAKNEVFCVQPEKGG
 RKPARIIVFPDLGV R VCEKMALYDVVSTLPQAVMGSSYGFQYSPGQ RVEFLVNAWK
 AKKCPMGFA YDTRCFDSTVTENDIRVEESIYQCCDLAPEARQAIRSLTERLYIGP L T
 NSKGQNCGYRRCRASGVLTTSCGNLTCYLKAAAACRAAKLQDCTMLVCGDDL VV
 ICESAGTQEDEASLRAFTEAMTRYSAPPDPPKPEYDLELITSCSSNVSAHDASGKR
 VYYLTRDPTT PLARA A WETARHTPVNSWLGNIIMYAPTLWARMILMTHFFSILLAQE
 QLEKALDCQIYGACYSIEPLDLPQHQLHGLSAFSLHSYSPGEINRVASCLRKLGVPPL
 RVWRHRARSVRARLLSQGGRAATCGKYLFNWA VRTKLKLTPIPAASQLDLSSWFVA
 GYSGGDIYHLSRARPRWFMWCLLLLSVGVGIYLLPNR

SEQ ID NO: 16: Secuencia de aminoácidos de la proteína NS5A del replicón adaptativo VII del VHC, en el que el cambio de aminoácido está destacado en negrita

5

SGSWLRDVWDWICTVLTDFKTWLOSKLLPRLPGVPPFFSCQRGYKGVWRGDGIMQTT
 CPCGAQITGHVKNGSMRIVGPRTCSNTWHGTFPINAYTTGPCTPSPAPNYSRALWRV
 AAEEYVEVTRV GDFHYVTGMTTDNVK CPCQVPAPEFFTEVDG VRLHRYAPACKP LL
 REEVTFLVGLNQYL VGSQLPCEPEPDVAVLTSM L TDP SHITAETA KRRLARGSPPSLA
 SSSAIQLSAPSLKATCTTRHDS PDADLIEANLLWRQEMGGNITRVESENKV VILDSFEPL
 LQAEEDEREVS VPAEILRRSRKFPRAMPIWARPDYNP PLESWKDPDYVPPV VHGCP
 LPPAKAPP I P P P P R R K R T V V L S E S T V S S A L A E L A T K T F G S S E S S A V D S G T A T A S P D Q P S D
 D G D A G S D V E S Y S S M P P L E G E P G D P D L S D G S W S T V S E E A S E D V V C C

SEQ ID NO: 17: Secuencia de aminoácidos de la poliproteína del replicón adaptativo II del VHC, en la que los cambios de aminoácidos están destacados en negrita

MAPITAYSQTRGLLGCIITSLTGRDRNQVEGEVQVVSTATQSF~~L~~ATCVNGVCWTVY
 HGAGSKTLAGPKGPITQMYTNVDQDLV~~G~~WQAPPGARSLTPCTCGSSDLYL~~V~~TRHAD
 VIPVRRRGDSRGSLLSPRPVSYLK~~G~~SSGGPLLCP~~S~~GHAVGIFRAAVCTR~~G~~VAKAVDFV
 PVESMETMRS~~P~~VFTDNSSPPAVPQTFQVAHLHAPT~~G~~SGKSTKVPAA~~Y~~AAQGYKVL
 VLNPSVAATLGF~~G~~AYMSKAHGIDPNIR~~T~~GVRTITTTGAPITYSTY~~G~~KFLADGGC~~S~~GGAY
 DIIICDECHSTDSTTILGIGTVLDQAETAGARLVVLATATPPGSVTVPH~~P~~NIEVALSST
 GEIPFYGKAIP~~I~~ETIKGGRHLIFCHSKKKCDELA~~A~~AKLSGLGLNAVAYRGLDVSVIPTS
 GDVIVVATDALMTGFTGDFDSVIDCNCVTQTVD~~F~~SLDPTFTIETTTVPQDAVSR~~S~~QR
 RGRTRGRMRMG~~I~~YRFVTPGERPSGMFDSSVLCECYDAGCAWYELTPAETS~~V~~RRLRAYL
 NTPGLPVCQD~~H~~LEFWESVFTGLTHIDAH~~F~~LSQTKQAGDNFPYLVAYQATVCARAQA
 PPPSWDQMWECLIRL~~K~~PTLHGPTPLLYRLGAVQNEVTTTHPITKYIMACMSADLEV
 TSTWVLVGGVLAALAA~~Y~~CLTTGSVVIVGRILSGKPAIPDREVL~~Y~~REFDEMEECASH
 LPYIEQGMQLAEQFKQKAIGLLQTATKQAEAAAPV~~V~~ESKWR~~T~~LEAFWAKHMWNFIS
 GIQYLAGLSTLPGNPAIASLMAFTASITSPLTTQHTLLFNILGGWVAAQLAPPSAASAF
 VGAGIAGAAVGSIGL~~G~~KVLVDILAGYGAGVAGALVAFKVM~~S~~GEMPSTEDLVNLLPA
 ILSPGALVVG~~V~~VCAAILRRHVGPGE~~G~~AVQWMNRLIAFASRGNHVSPTHYV~~P~~ESDAA
 ARVTQILSGLTTTQLL~~K~~R~~L~~HQWINE~~D~~CSTPCSGSWLRDVWDWICTVL~~T~~DFKTWLQSK
 LLPRLPGV~~P~~FFSCQ~~R~~GYKGVWRGDGIMQTTCPGQAQITGHVKNGSMRIVGPRTCSNT
 WHGTFPINA~~Y~~TTGPCTPSPAPNYSRALWRVA~~A~~E~~E~~YVEVTRV~~G~~DFHYVTGM~~T~~TDNVK
 CPCQVPAPEFFTEVDG~~V~~RLHRYAPACKPLLREEV~~T~~FLVGLN~~Q~~YLVGSQ~~L~~PCEPEPDV
 AVLTSMLTDP~~S~~HITAETA~~K~~RGLARGSPPSLASSASQLSAPSLKATCTTRHDS~~P~~DADLI
 EANLLWRQEMGGNITR~~V~~ESENKVVILDSFEPLQAEEDERE~~V~~SVPAEILRRSRK~~F~~FRAM
 PIWARPDYNP~~P~~LESW~~K~~DPDYVPPV~~V~~HGCP~~L~~PPAKAPP~~I~~PPRRKRTVVLSE~~S~~T~~V~~SSAL
 AELATKTFGSSESSAVDSGTATASPDQPSDDGDAGSDVESYSSMP~~P~~LEGE~~P~~GD~~P~~DLSD

GSWSTVSEASED~~V~~VCCSMSY~~T~~WTGALITPCAAEETKLPINALSNSLLRHHNLVYAT
 T~~S~~RSASLRQKKVTFDRLQVLD~~D~~H~~Y~~RDVLKEMKAKASTVKAKLLS~~V~~E~~E~~ACKLTPPHS
 ARSKFGYGA~~K~~DVRNLSKAVNHRSV~~W~~KDLLEDTETPIDTTIMAKNEVFCVQPEKGG
 R~~K~~PARLIVFPDLGVRVCEKMALYDVVSTLPQA~~V~~MGSSYGFQYSPGQ~~R~~VEFLVNAWK
 AKKCPMGFA~~Y~~DRCFDSTVTENDIRVEESTYQCCDLAPEARQAIRSLTERLYIGG~~P~~L
 NSKGQNCGYRRCRASGVL~~T~~SCGNTLTCYLKAAAACRAAKLQDC~~T~~MLVCGDDLVV
 ICESAGTQEDEASLR~~A~~FTEAMTRYSAPP~~G~~DPKPEYDLELITSCSSNVSV~~A~~H~~D~~ASGKR
 VY~~Y~~LTRDPTT~~P~~LARAAWETARHTPVNSWLG~~N~~IMYAPTLWARMILMTHFFSILLAQE
 QLEKALDCQIYGACYSIEPLDLPQIIQLHGLSAFSLHSYSPGEINRVASCLR~~K~~LGV~~P~~PL
 RVWRHRARSVRARLLSQGGRAATCGK~~Y~~FNWAVR~~T~~KLKLTPIPAASQLDLSSW~~F~~V
 GYSGGDIYHSLSRARPRWFMWCLLLSVGVGIYLLPNR

5

SEQ ID NO: 18: Secuencia de aminoácidos de la proteína NS5A del replicón adaptativo II del VHC, en la que el cambio de aminoácido está destacado en negrita

SGSWLRDVWDWICTVL~~T~~DFKTWLQSKLLPRLPGV~~P~~FFSCQ~~R~~GYKGVWRGDGIMQTT
 CPCGAQITGHVKNGSMRIVGPRTCSNTWHGTFPINA~~Y~~TTGPCTPSPAPNYSRALWRV
 AAEEYVEVTRV~~G~~DFHYVTGM~~T~~TDNVKPCQVPAPEFFTEVDG~~V~~RLHRYAPACKPLL
 REEV~~T~~FLVGLN~~Q~~YLVGSQ~~L~~PCEPEPDVAVLTSMLTDP~~S~~HITAETA~~K~~RGLARGSPPSLA
 SSSASQLSAPSLKATCTTRHDS~~P~~DADLIEANLLWRQEMGGNITR~~V~~ESENKVVILDSFE
 PLQAEEDERE~~V~~SVPAEILRRSRK~~F~~FRAMP~~I~~WARPDYNP~~P~~LESW~~K~~DPDYVPPV~~V~~HGCP
 LPPAKAPP~~I~~PPRRKRTVVLSE~~S~~T~~V~~SSALAE~~L~~ATKTFGSSESSAVDSGTATASPDQPSD
 DGDAGSDVESYSSMP~~P~~LEGE~~P~~GD~~P~~DLSDGSWSTVSEASED~~V~~VCC

10

SEQ ID NO: 19: Secuencia de aminoácidos de la proteína NS5A del replicón adaptativo V del VHC, en la que el cambio de aminoácido está destacado en negrita

SGSWLRDVVDWICTVLDFKTLWLSKLLPRLPGVPPFFSCQRGYKGVWRGDGIMQTT
CPCGAQITGHVKNGSMRIVGPRTCSENTWHGTFPINAYTTGPCTPSPAPNYSRALWRV
AAEYVEVTRVGDFHYVTGMTTDNVKPCQVPAPEFFTEVDGVRLHRYAPACKPLL
REEVTFLVGLNQYLVGSQLPCEPEPDVAVLTSMMLTDP SHITAETA KRRLARGSPPSLS
SSASQLSAPSLKATCTTRHDSPDADLIEANLLWRQEMGGNITRVESENKVVILDSFE
PLQAEEDEREVSVP AEILRRSRKFPRAMPIWARPDYNP LLESWKDPDYVPPV VHGCP
LPPAKAPPPIPPRRKRTVVLSESTVSSALAE LTKTFGSSESAVDSGTATASPDQPSD
DGDAGSDVESYSSMPPLEGEPGDPDLSDGSWSTVSEEASED VVCC

5

SEQ ID NO: 20: Secuencia de aminoácidos de la proteína NS5A del replicón adaptativo IV del VHC, en la que el cambio de aminoácido está destacado en negrita

SGSWLRDVVDWICTVLDFKTLWLSKLLPRLPGVPPFFSCQRGYKGVWRGDGIMQTT
CPCGAQITGHVKNGSMRIVGPRTCSENTWHGTFPINAYTTGPCTPSPAPNYSRALWRV
AAEYVEVTRVGDFHYVTGMTTDNVKPCQVPAPEFFTEVDGVRLHRYAPACKPLL
REEVTFLVGLNQYLVGSQLPCEPEPDVAVLTSMMLTDP SHITAETA KRRLARGSPPCA
SSASQLSAPSLKATCTTRHDSPDADLIEANLLWRQEMGGNITRVESENKVVILDSFE
PLQAEEDEREVSVP AEILRRSRKFPRAMPIWARPDYNP LLESWKDPDYVPPV VHGCP
LPPAKAPPPIPPRRKRTVVLSESTVSSALAE LTKTFGSSESAVDSGTATASPDQPSD
DGDAGSDVESYSSMPPLEGEPGDPDLSDGSWSTVSEEASED VVCC

10

SEQ ID NO: 21: Secuencia de aminoácidos de la proteína NS5A del replicón adaptativo III del VHC, en la que el cambio de aminoácido está destacado en negrita

SGSWLRDVVDWICTVLDFKTLWLSKLLPRLPGVPPFFSCQRGYKGVWRGDGIMQTT
CPCGAQITGHVKNGSMRIVGPRTCSENTWHGTFPINAYTTGPCTPSPAPNYSRALWRV
AAEYVEVTRVGDFHYVTGMTTDNVKPCQVPAPEFFTEVDGVRLHRYAPACKPLL
REEVTFLVGLNQYLVGSQLPCEPEPDVAVLTSMMLTDP SHITAETA KRRLARGSPPLA
SSASQLSAPSLKATCTTRHDSPDADLIEANLLWRQEMGGNITRVESENKVVILDSFE
PLQAEEDEREVSVP AEILRRSRKFPRAMPIWARPDYNP LLESWKDPDYVPPV VHGCP
LPPAKAPPPIPPRRKRTVVLSESTVSSALAE LTKTFGSSESAVDSGTATASPDQPSD
DGDAGSDVESYSSMPPLEGEPGDPDLSDGSWSTVSEEASED VVCC

15

SEQ ID NO: 22: Secuencia de nucleótidos del clon de ADN del replicón adaptativo del VHC HCVrep/NS2-5B (Véase Figure 9)

GCCAGCCCCGATTGGGGGCGACACTCCACCATAGATCACTCCCCTGTGAGGAAC
 TACTGTCTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTGCGTGCAG
 CCTCCAGGACCCCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTA
 CACCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCTTTCTTGGATCAACCCGCTCAATGCCT
 GGAGATTTGGGCGTGCCCCGCGAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGTGCGGA
 AAGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAGGGTGTTCGCGAGTGCCCCGGGAGGTCTCGT
 AGACCGTGCACCAGACCACAACGGTTTCCCTCTAGCGGGATCAATTCCGCCCCCTC
 TCCCTCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGGAATAAGGCCGGTGT
 GCGTTTGTCTATATGTTATTTCCACCATATTGCCGCTTTTTGGCAATGTGAGGGC
 CCGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCCTAGGGGTCTTTCCCTCTCG
 CCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAG
 CTCTTGAAGACAACAACGCTGTAGCGACCCTTTGCAGGCAGCGGAACCCCC
 ACGTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTATAAGATAACACTGC
 AAAGGCGGCACAACCCAGTGCCACGTTGTGAGTTGGATAGTTGTGGAAAGAGT
 CAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGATGCCAGAAGGT
 ACCCCATTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTGCACATGCTTTACATGTGTTT
 AGTCGAGGTTAAAAAACGTCTAGGCCCCCCGAACCACGGGGACGTGGTTTTCTT
 TGAAAAACACGATAATACCATGGACCGGGAGATGGCAGCATCGTGCAGGAGGCG
 GGTTTTCGTAGGTCTGATACTTGTACCTTGTACCCGCACTATAAGCTGTTCTCTG
 CTAGGCTCATATGGTGGTTACAATATTTATCACCAGGGCCGAGGCACACTTGCA
 AGTGTGGATCCCCCCCCCAACGTTCCGGGGGGCCGCGATGCCGTCATCCTCCTC
 ACGTGCAGGATCCACCCAGAGCTAATCTTTACCATCACCAAATCTTGCTCGCCA
 TACTCGGTCCACTCATGGTGCTCCAGGCTGGTATAACCAAAGTGCCGTACTTCGT
 GCGCGCACACGGGCTCATTTCGTGCATGCATGCTGGTGCAGGAAAGGTTGCTGGGGGT
 CATTATGTCCAAATGGCTCTCATGAAGTTGGCCGCACTGACAGGTACGTACGTTT
 ATGACCATCTCACCCCACTGCGGGACTGGGCCACGCGGGCCTACGAGACCTTGC
 GGTGGCAGTTGAGCCCGTCTTCTCTGATATGGAGACCAAGGTTATCACCTGG
 GGGCAGACACCGCGGCGTGTGGGGACATCATCTTGGGCCTGCCCGTCTCCGCC
 GCAGGGGGAGGGAGATACATCTGGGACCGGCAGACAGCCTTGAAGGGCAGGGG
 TGCGACTCCTCGGCCTATTACGGCCTACTCCCAACAGACGCGAGGCCTACTTG
 GCTGCATCATCACTAGCCTCACAGGCCGGGACAGGAACCAGGTGCGAGGGGGAGG
 TCCAAGTGGTCTCCACCGCAACACAATCTTTCTGGCGACCTGCGTCAATGGCGT
 GTGTTGGACTGTCTATCATGGTGCCGGCTCAAAGACCCTTGCCGGCCCCAAAGGGC
 CCAATCACCCAAATGTACACCAATGTGGACCAGGACCTCGTCCGGCTGGCAAGCG
 CCCCCGGGGCGGTTCTTGACACCATGCACCTGCGGCAGCTCGGACCTTTACT
 TGGTACGAGGCATGCCGATGTCATTCCGGTGCGCCGGCGGGGCGACAGCAGGG
 GGAGCCTACTCTCCCCAGGCCGCTCTCCTACTTGAAGGGCTCTTCGGGCGGTCC
 ACTGCTCTGCCCTCGGGCACGCTGTGGGCATCTTTCGGGCTGCCGTGTGCACC

CGAGGGGTTGCGAAGGCGGTGGACTTTGTACCCGTCGAGTCTATGGAAACCACTA
 TGCGGTCCCCGGTCTTCACGGACAACCTCGTCCCCCTCCGGCCGTACCGCAGACATT
 CCAGGTGGCCCATCTACACGCCCTACTGGTAGCGGCAAGAGCACTAAGGTGCC
 GGCTGCGTATGCAGCCCAAGGGTATAAGGTGCTTGTCTGAACCCGTCCGTCCGC
 GCCACCCTAGGTTTCGGGGCGTATATGTCTAAGGCACATGGTATCGACCCCTAACA
 TCAGAACCGGGGTAAGGACCATCACCACGGGTGCCCCCATCACGTACTCCACCTA
 TGGCAAGTTTCTTGCCGACGGTGGTTGCTCTGGGGGCGCCTATGACATCATAATA
 TGTGATGAGTGCCACTCAACTGACTCGACCACTATCCTGGGCATCGGCACAGTCC
 TGGACCAAGCGGAGACGGCTGGAGCGGACTCGTCTGTGCTCGCCACCGCTACGC
 CTCCGGGATCGGTCACCGTGCCACATCCAAACATCGAGGAGGTGGCTCTGTCCAG
 CACTGGAGAAATCCCTTTTATGGCAAAGCCATCCCATCGAGACCATCAAGGGG
 GGGAGGCACCTCATTTTCTGCCATTCCAAGAAGAAATGTGATGAGCTCGCCGCGA
 AGCTGTCCGGCCTCGGACTCAATGCTGTAGCATATTACCGGGGCCTTGATGTATC
 CGTCATAACCAACTAGCGGAGACGTCATTGTCTAGCAACGGACGCTCTAATGACG
 GGCTTTACCGGCGATTTGACTCAGTGATCGACTGCAATACATGTGTACCCAGA
 CAGTTCGACTTCAGCCTGGACCCGACCTTACCATTGAGACGACGACCGTGCCAC
 AAGACGCGGTGTACGCTCGCAGCGGCGAGGCAGGACTGGTAGGGGCAGGATGG
 GCATTTACAGGTTTGTGACTCCAGGAGAACGGCCCTCGGGCATGTTTCGATTCCCTC
 GGTCTGTGCGAGTGTCTATGACGCGGGCTGTGCTTGGTACGAGCTCACGCCCGCC
 GAGACCTCAGTTAGGTTGCGGGCTTACCTAAACACACCAGGGTTGCCCGTCTGCC
 AGGACCATCTGGAGTTCTGGGAGAGCGTCTTTACAGGCCCTACCCACATAGACGC
 CCATTTCTTGTCAGACTAAGCAGGCAGGAGACAACCTCCCTACCTGGTAGCA
 TACCAGGCTACGGTGTGCGCCAGGGCTCAGGCTCCACCTCCATCGTGGGACCAAA
 TGTGGAAGTGTCTCATAACGGCTAAAGCCTACGCTGCACGGGCCAACGCCCTGTCT
 GTATAGGCTGGGAGCCGTTCAAACGAGGTTACTACCACACACCCCATAAACAA
 ATACATCATGGCATGCATGTCCGGTGAACCTGGAGGTCGTCACGAGCACCTGGGTG
 CTGGTAGGCGGAGTCTAGCAGCTCTGGCCGCGTATTGCTGACAACAGGCAGCG
 TGGTCAATTGTGGGCAGGATCATCTTGTCCGAAAGCCGGCCATCATTCCCGACAG
 GGAAGTCCCTTACCGGGAGTTTCGATGAGATGGAAGAGTGCAGCTCACACCTCCCT
 TACATCGAACAGGGAATGCAGCTCGCCGAACAATTCAAACAGAAGGCAATCCGGG
 TTGCTGCAAACAGCCACCAAGCAAGCGGAGGCTGTGCTCCCGTGGTGAATCC
 AAGTGGCGGACCCTCGAAGCCTTCTGGGCGAAGCATAATGTGGAATTCATCAGCG
 GGATACAATATTTAGCAGGCTTGTCCACTCTGCCTGGCAACCCCGCGATAGCATC
 ACTGATGGCATTACAGCCTCTATCACCAGCCCGCTCACCACCAACATAACCTC
 CTGTTTAAACATCCTGGGGGGATGGGTGGCCGCCAACTTGCTCCTCCAGCGCT
 GCTTCTGCTTTCGTAGGCGCCGGCATCGCTGGAGCGGCTGTTGGCAGCATAGGCC
 TTGGGAAGGTGCTTGTGGATATTTGGCAGGTTATGGAGCAGGGGTGGCAGGCGC
 GCTCGTGGCCTTTAAGGTCATGAGCGGCGAGATGCCCTCCACCGAGGACCTGGTT
 AACCTACTCCCTGCTATCCTCTCCCTGGCGCCCTAGTCGTGCGGGTGTGTGCGC
 AGCGATACTGCGTCGGCACGTGGGCCAGGGGAGGGGGCTGTGCAGTGGATGAA
 CCGGCTGATAGCGTTTCGCTTCGCGGGGTAACCACGTCCTCCCCACGCACTATGTG
 CCTGAGAGCGACGCTGCAGCACGTGCACTCAGATCCTCTCTAGTCTTACCATCA
 CTCAGCTGCTGAAGAGGCTTACCAGTGGATCAACGAGGACTGCTCCACGCCATG
 CTCCGGCTCGTGGCTAAGAGATGTTTGGGATTGGATATGCACGGTGTGACTGAT
 TTCAAGACCTGGCTCCAGTCCAAGCTCCTGCCGCGATTGCCGGGAGTCCCCTTCTT
 CTCATGTCAACGTGGGTACAAGGGAGTCTGGCGGGGCGACGGCATCATGCAAAC
 CACCTGCCCATGTGGAGCACAGATCACCAGGACATGTGAAAAACGGTTCCATGAG
 GATCGTGGGGCCTAGGACCTGTAGTAACACGTGGCATGGAACATTCCCCATTAAC
 GCGTACACCACGGGCCCTGCACGCCCTCCCGGGCCCAAATTATCTAGGGCCG
 TGTGGCGGGTGGCTGTGAGGAGTACGTGGAGGTTACGCGGGTGGGGGATTTCC
 ACTACGTGACGGGCATGACCACTGACAACGTAAAGTGCCCGTGTGAGGTTCC
 GGCCCCGAATTCTTACAGAAGTGGATGGGGTGGGTTGCACAGGTACGCTCCA
 GCGTGCAAACCCCTCCTACGGGAGGAGGTCACATTCCTGGTCCGGCTCAATCAAT

ACCTGGTTGGGTCACAGCTCCCATGCGAGCCCGAACCGGACGTAGCAGTGCTCAC
 TTCCATGCTCACCGACCCCTCCACATTACGGCGGAGACGGCTAAGCGTAGGGCTG
 GCCAGGGGATCTCCCCCTCCTTGGCCAGCTCATCAGCTATCCAGCTGTCTGCGC
 CTTCCCTGAAGGCAACATGCACTACCCGTCATGACTCCCCGGACGCTGACCTCAT
 CGAGGCCAACCTCCTGTGGCGGCAGGAGATGGGCGGGAACATCACCCGCGTGGA
 GTCAGAAAATAAGGTAGTAATTTTGGACTCTTTTCGAGCCGCTCCAAGCGGAGGAG
 GATGAGAGGGAAGTATCCGTTCCGGCGGAGATCCTGCGGAGGTCCAGGAAATTC
 CCTCGAGCGATGCCCATATGGGCACGCCCGGATTACAACCCTCCACTGTTAGAGT
 CCTGGAAGGACCCGGACTACGTCCCTCCAGTGGTACACGGGTGTCCATTGCCGCC
 TGCCAAGGCCCTCCGATACCACCTCCACGGAGGAAGAGGACGGTTGTCTGTCA
 GAATCTACCGTGTCTTCTGCCTTGGCGGAGCTCGCCACAAGACCTTCGGCAGCT
 CCGAATCGTCGGCCGTCGACAGCGGCACGGCAACGGCCTCTCCTGACCAGCCCTC
 CGACGACGGCGACGCGGGATCCGACGTTGAGTCGTA CTCTCCATGCCCCCCTT
 GAGGGGGAGCCGGGGGATCCCGATCTCAGCGACGGGTCTTGGTCTACCGTAAGC
 GAGGAGGCTAGTGAGGACGTGCTCTGCTGCTCGATGTCCTACACATGGACAGGC
 GCCCTGATCACGCCATGCGCTGCGGAGGAAACCAAGCTGCCCATCAATGCACTG
 AGCAACTCTTTGCTCCGTCACCACAACCTTGGTCTATGCTACAACATCTCGCAGCG
 CAAGCCTGCGGCAGAGAAGGTACCTTTGACAGACTGCAGGTCTGGACGACC
 ACTACCGGGACGTGCTCAAGGAGATGAAGGCGAAGGCGTCCACAGTTAAGGCTA
 AACTTCTATCCGTGGAGGAAGCCTGTAAGCTGACGCCCCACATTCCGCCAGATC
 TAAATTTGGCTATGGGGCAAAGGACGTCCGGAACCTATCCAGCAAGGCCGTTAA
 CCACATCCGCTCCGTGTGGAAGGACTTGCTGGAAGACACTGAGACACCAATTGAC
 ACCACCATCATGGCAAAAAATGAGGTTTTCTGCGTCCAACCAGAGAAGGGGGGC
 CGCAAGCCAGCTCGCCTTATCGTATTCCCAGATTTGGGGGTTTCGTGTGTGCGAGA
 AAATGGCCCTTTACGATGTGGTCTCCACCCTCCCTCAGGCCGTGATGGGCTCTTCA
 TACGGATTCCAATACTCTCTGGACAGCGGGTTCGAGTTCTGTTGAATGCCTGGA
 AAGCGAAGAAATGCCCTATGGGCTTCGCATATGACACCCGCTGTTTTCGACTCAAC
 GGTCATGAGAATGACATCCGTGTTGAGGAGTCAATCTACCAATGTTGTGACTTG
 GCCCCGAAGCCAGACAGGCCATAAGGTCGCTCACAGAGCGGCTTTACATCGGG
 GGCCCCCTGACTAATTCTAAAGGGCAGAACTGCGGCTATCGCCGGTGC CGCGCGA
 GCGGTGTA CTGACGACCAGCTGCGGTAATAACCTCACATGTTACTTGAAGGCCGC
 TGCGGCCTGTGAGCTGCGAAGCTCCAGGACTGCACGATGCTCGTATGCGGAGAC
 GACCTGTGCGTTATCTGTGAAAGCGCGGGGACCCAAGAGGACGAGGCGCACTA
 CGGGCCTTACGGAGGCTATGACTAGATACTCTGCCCCCTGGGGACCCGCCCA
 AACCAGAATACGACTTGGAGTTGATAACATCATGCTCCTCCAATGTGTGAGTCGC
 GCACGATGCATCTGGCAAAAGGGTGTACTATCTCACCCGTGACCCACCACCCCT
 CTTGCGCGGGCTGCGTGGGAGACAGCTAGACACACTCCAGTCAATTCCTGGCTAG
 GCAACATCATCATGTATGCGCCACCTTGTGGCAAGGATGATCCTGATGACTCA
 TTTCTTCTCCATCCTTCTAGCTCAGGAACAACCTGAAAAAGCCCTAGATTGTCAGA
 TCTACGGGGCCTGTTACTCCATTGAGCCACTTGACCTACCTCAGATCATTCAACG
 ACTCCATGGCCTTAGCGCATTTTCACTCCATAGTTACTCTCCAGGTGAGATCAATA
 GGGTGGCTTCATGCCTCAGGAAACTTGGGGTACCGCCCTTGCAGTCTGGAGACA
 TCGGGCCAGAAGTGTCCGCGCTAGGCTACTGTCCCAGGGGGGGAGGGCTGCCAC
 TTGTGGCAAGTACCTCTTCAACTGGGCAGTAAGGACCAAGCTCAAACCTCACTCCA
 ATCCCGGCTGCGTCCCAGTTGGATTTATCCAGCTGGTTCGTTGCTGGTTACAGCGG
 GGGAGACATATATCACAGCCTGTCTCGTCCCCGACCCCGCTGGTTTCATGTGGTGC
 CTACTCCTACTTTCTGTAGGGGTAGGCCATCTACTCTCCCAACCGATGAACGG
 GGACCTAAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGTTTTTTTCCCTTTTTTTTTTCT
 TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTCCTTTTTTTTTTCCCTTTTTTCT
 TTCTTTCTTTGGTGGCTCCATCTTAGCCCTAGTCACGGCTAGCTGTGAAAGGTCC
 GTGAGCCGCTTGACTGCAGAGAGTGCTGATACTGGCCTCTCTGCAGATCAAGT

SEQ ID NO: 23: Secuencia de nucleótidos del clon de ADNc del VHC de longitud completa que contiene la mutación

de Ser en Ile en la posición 1179 de la SEQ ID NO: 3, y en la que la 5' NTR está fusionada con el gen de la neomicina fosfotransferasa y el IRES del EMCV está insertado en la dirección 5' del marco de lectura abierto del VHC (Véase Figure 9)

GCCAGCCCCGATTGGGGGCGACACTCCACCATAGATCACTCCCCTGTGAGGAAC
TACTGTCTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTCTGTCAG
CCTCCAGGACCCCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTA
CACCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCCCTTTCTTGGATCAACCCGCTCAATGCCT
GGAGATTTGGGCGTGCCCCGCGAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGTGCGCA
AAGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAGGGTGTCTGCGAGTGCCCCGGGAGGTCTCGT
AGACCGTGCACCATGAGCACGAATCCTAAACCTCAAAGAAAAACCAAAGGGGCGC
GCCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGA
GGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGT
GTTCCGGCTGTGACGCGAGGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCC
GGTGCCCTGAATGAACTGCAGGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACG
ACGGGCGTTCCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCCTGAAGCGGGAAGGGACT
GGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCATCTCACCTTGCTCC
TGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGAT
CCGGCTACCTGCCATTTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGT
ACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAG
GGGCTCGCGCCAGCCGAACTGTTCCGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGACGGC
GAGGATCTCGTGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAA
ATGGCCGCTTTTCTGGATTTCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTA
TCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGG
GCTGACCGCTTCTCGTGTCTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTCCGACGCGCATCGC
CTTCTATCGCTTCTTGACGAGTCTTCTGAGTTTAAACAGACCACAACGGTTTCC
CTATAGCGGGATCAATTCCGCCCTCTCCCTCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCG
AAGCCGCTTGGAAATAAGGCCGGTGTGCGTTTGTCTATATGTTATTTCCACCATAT
TGCCGCTTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAG
CATTCTAGGGGCTTTCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTC
GTGAAGGAAGCAGTTCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTCTGTAGCG
ACCCTTTGCAGGCAGCGGAACCCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAA
AGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCAGTGCCACGTTG
TGAGTTGGATAGTTGTGGAAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACAA
GGGGCTGAAGGATGCCCAGAAGGTACCCATTGTATGGGATCTGATCTGGGGCT
CGGTGCACATGCTTTACATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAACGTCTAGGCCCCCC
GAACCACGGGACGTGGTTTTCTTTGAAAAACACGATAATAATGAGCACGAAT
CCTAAACCTCAAAGAAAAACCAAACGTAACCAACCGCCGCCACAGGACGTC
AAGTCCCAGGGCGGTGGTCAGATCGTCCGGTGGAGTTACCTGTTGCCGCGCAGGG
GCCCCAGGTTGGGTGTGCGCGCGACTAGGAAGACTTCCGAGCGGTGCAACCTC
GTGGAAGGCGACAACCTATCCCCAAGGCTCGCCAGCCGAGGGTAGGGCTGGG
CTCAGCCCGGTACCCCTGGCCCTCTATGGCAATGAGGGCTTGGGGTGGGCAGG
ATGGTCTCTGTCACCCCGTGGCTCTCGGCCTAGTTGGGGCCCCACGGACCCCCGG
CGTAGGTCGCGCAATTTGGGTAAGGTCATCGATAACCTCACGTGCGGCTTCGCCG
ATCTCATGGGGTACATTCCGCTCGTCCGGCGCCCCCTAGGGGGCGCTGCCAGGGC
CCTGGCGCATGGCGTCCGGGTTCTGGAGGACGGCGTGAACCTATGCAACAGGGAA
TCTGCCCGGTTGCTCCTTTTCTATCTTCTTTTGGCTTTGCTGTCTGTTTGACCAT
CCCAGCTTCCGCTTATGAAGTGCACAACGTATCCGGAGTGTACCATGTCACGAAC
GACTGCTCCAACGCAAGCATTGTGTATGAGGCAGCGGACATGATCATGCATACCC
CCGGGTGCGTGCCCTGCGTTCGGGAGAACAACCTCTCCCGCTGCTGGGTAGCGCT
CACTCCACGCTCGCGGCCAGGAACGCTAGCGTCCCCACTACGACGATACGACGC
CATGTGATTTGCTCGTTGGGGCGGCTGCTCTGCTCCGCTATGTACGTGGGAG

ATCTCTGCGGATCTGTTTTCTCGTCGCCAGCTGTTACCTTCTCGCCTCGCCGG
 CACGAGACAGTACAGGACTGCAATTGCTCAATATATCCCGGCCACGTGACAGGTC
 ACCGTATGGCTTGGGATATGATGATGAACTGGTCACCTACAGCAGCCCTAGTGGT
 ATCGCAGTTACTCCGGATCCCACAAGCTGTCGTGGATATGGTGGCGGGGGCCCAT
 TGGGGAGTCCTAGCGGGCCTTGCTACTATTCCATGGTGGGGAACCTATGTGACAGG
 TCTGATTGTGATGCTACTCTTTGCCGGCGTTGACGGGGGAACCTATGTGACAGG
 GGGGACGATGGCCAAAACACCCCTCGGGATTACGTCCCTCTTTACCCGGGTCA
 TCCCAGAAAATCCAGCTTGTAAACACCAACGGCAGCTGGCACATCAACAGGACT
 GCCCTGAACTGCAATGACTCCCTCAACACTGGGTTCCCTTGCTGCGCTGTTCTACGT
 GCACAAGTTCAACTCATCTGGATGCCAGAGCGCATGGCCAGCTGCAGCCCCATC
 GACCGGTTCTGCTCAGGGGTGGGGGCCCATCACTTACAATGAGTCACACAGCTCGG
 ACCAGAGGCCTTATTGTTGGCACTACGCACCCCGGCCGTGCCGTATCGTACCCGC
 GCGCAGGTGTGTGGTCCAGTGTACTGCTTACCCCAAGCCCTGTCTGTTGGTGGG
 ACGACCGACCGGTTCCGGCTCCCTACGTACAGTTGGGGGAGAATGAGACGGAC
 GTGCTGCTTCTTAACAACACGCGGCCCGCAAGGCAACTGGTTTGGCTGTACAT
 GGATGAATAGCACTGGGTTACCAAGACGTGCGGGGGCCCCCGTGAACATCG
 GGGGGATCGGCAATAAAACCTTGACCTGCCCCACGGACTGCTTCCGGAAGCACC
 CCGAGGCCACTTACACCAAGTGTGGTTCGGGGCCTTGGTTGACACCCAGATGCTT
 GGTCCTACTACCATAACAGGCTTGGCACTACCCCTGCACTGTCAACTTACCATCT
 TCAAGGTTAGGATGTACGTGGGGGGAGTGGAGCACAGGCTCGAAGCCGCATGCA
 ATTGGACTCGAGGAGAGCGTTGTAACCTGGAGGACAGGGACAGATCAGAGCTTA
 GCCCGTCTGCTGCTACAACGGAGTGGCAGGTATTGCCCTGTTCTTACCAC
 CCTACCGGCTCTGTCCACTGGTTGATCCATCTCCATCAGAACGTGGGACGTAC
 AATACCTGTACGGTATAGGGTCGGCGTTGTCTCCTTTGCAATCAAATGGGAGTA
 TGTCTGTTGCTTCTTCTTCTTGGCGGACGCGCGCGTCTGTGCTGCTTGTGGA
 TGATGCTGCTGATAGCTCAAGCTGAGGCCGCCCTAGAGAACCTGGTGGTCTCAA
 CGCGGCATCCGTGGCCGGGGCGCATGGCATTCTCTCCTTCTCGTGTCTTCTGTG
 CTGCCTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCCCTTACGG
 CGTATGGCCGCTACTCCTGCTCCTGCTGGCGTTACCACCACGAGCATAACGCCATG
 GACCGGGAGATGGCAGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTCGTAGGTCTGATACTCT
 TGACCTTGTACCCGCACTATAAGCTGTTCCCTCGCTAGGCTCATATGGTGGTTACAA
 TATTTTATCACCAGGGCCGAGGCACACTTGC AAGTGTGGATCCCCCCCCTCAACG
 TTCGGGGGGCCGCGATGCCGTCATCTCCTCACGTGCGCGATCCACCCAGAGCT
 AATCTTTACCATCACCAAAATCTTGCTCCCATACTCGGTCCACTCATGGTGTCTCC
 AGGCTGGTATAACCAAAGTGCCGTA CTTCGTGCGCGCACACGGGCTATTGCTGC
 ATGCATGCTGGTGGGAAGGTTGCTGGGGGTCA TTATGTCCAAATGGCTCTCATG
 AAGTTGGCCGCACTGACAGGTACGTACGTTTATGACCATCTCACCCCACTGCGGG
 ACTGGGCCCACGCGGGCCTACGAGACCTTGGCGTGGCAGTTGAGCCCGTCTCTT
 CTCTGATATGGAGACCAAGGTTATCACCTGGGGGGCAGACACCCGCGCGTGTGG
 GGACATCATCTTGGGCTGCCCGTCTCCGCCG CAGGGGGAGGGAGATAACATCTG
 GGACCGGCAGACAGCCTTGAAGGGCAGGGGTGGCGACTCCTCGCGCCTATTACG
 GCCTACTCCAACAGACGCGAGGCCTACTTGGCTGCATCATCACTAGCCTCACAG
 GCCGGGACAGGAACCAAGGTCGAGGGGGAGGTCCAAGTGGTCTCCACCGCAACAC
 AATCTTTCTGGCGACCTGCGTCAATGGCGTGTGTTGACTGTCTATCATGGTGGC
 GGCTCAAAGACCCCTTGCCGGCCAAAGGGCCCAATCACCCAAATGTACACCAAT
 GTGGACCAGGACCTCGTCGGCTGGCAAGCGCCCCCGGGGCGCGTTCCTTGACAC
 CATGCACCTGCGGCAGCTCGGACCTTTACTTGGTACGAGGCATGCCGATGTCAT
 TCCGGTGGCGCCGGCGGGGCGACAGCGGGGGAGCCTACTCTCCCCAGGCCCGT
 CTCCTACTTGAAGGGCTCTTGGGGCGGTCCACTGCTCTGCCCTCGGGGCACGCT
 GTGGGCATCTTTCGGGCTGCCGTGTGCACCCGAGGGGTTGCGAAGGCGGTGGACT
 TTGTACCCGTCGAGTCTATGAAACCACTATGCGGTCCCCGGTCTTACGGGACAA
 CTCGTCCCCTCCGGCCGTACCGCAGACATTCAGGTGGCCCATCTACACGCCCT
 ACTGGTAGCGGCAAGAGCACTAAGGTGCCGGCTGCGTATGCAGCCCAAGGGTAT

AAGGTGCTTGTCTGAACCCGTCGCGCCACCCTAGGTTTCGGGGCGTATA
 TGTCTAAGGCACATGGTATCGACCCTAACATCAGAACCAGGGTAAGGACCATCA
 CCACGGGTGCCCCATCACGTAATCCACCTATGGCAAGITTTCTTGCCGACGGTGG
 TTGCTCTGGGGGCGCCTATGACATCATAATATGTGATGAGTGCCACTCAACTGAC
 TCGACCACTATCCTGGGCATCGGCACAGTCCTGGACCAAGCGGAGACGGCTGGA
 GCGCGACTCGTTCGTCTGCCACCGCTACGCCTCCGGGATCGGTCACCGTGCCAC
 ATCCAAACATCGAGGAGGTGGCTCTGTCCAGCACTGGAGAAATECCCTTTTATGG
 CAAAGCCATCCCCATCGAGACCATCAAGGGGGGGAGGCACCTCATTTTTCTGCCAT
 TCCAAGAAGAAATGTGATGAGCTCGCCGCGAAGCTGTCCGGCCTCGGACTCAAT
 GCTGTAGCATATTACCGGGGCTTGATGTATCCGTCATAACCAACTAGCGGAGACG
 TCATTGTCTAGCAACGGACGCTCTAATGACGGGCTTTACCGGGCATTTTCGACTC
 AGTGATCGACTGCAATACATGTGTACCCAGACAGTCGACTTCAGCCTGGACCCG
 ACCTTCACCATTGAGACGACGACCGTGCCACAAGACGCGGTGTACGCTCGCAGC
 GCGGAGGCAGGACTGGTAGGGGAGGATGGGCATTTACAGGTTTGTGACTCCAG
 GAGAACGGCCCTCGGGCATGTTTCGATTCTCGGTTCTGTGCGAGTGCTATGACGC
 GGGCTGTGCTTGGTACGAGCTCACGCCGCGGAGACCTCAGTTAGGTTGCGGGCT
 TACCTAAACACACCAGGTTGCCCGTCTGCCAGGACCATCTGGAGTTCTGGGAGA
 GCGTCTTTACAGGCCTCACCCACATAGACGCCATTTCTTGTCCAGACTAAGCA
 GGCAGGAGACAACCTCCCCTACCTGGTAGCATAACAGGCTACGGTGTGCGCCAG
 GGCTCAGGCTCCACCTCCATCGTGGGACCAAATGTGGAAGTGTCTCATAACGGCTA
 AAGCCTACGCTGCACGGGCCAACGCCCTGCTGTATAGGCTGGGAGCCGTTCAA
 ACGAGTTACTACCACACACCCATAACCAAATACATCATGGCATGCTGTGCGC
 TGACCTGGAGGTCGTACGAGCACCTGGGTGCTGGTAGGCGGAGTCTAGCAGCT
 CTGGCCGCGTATTGCCTGACAACAGGCAGCGTGGTCAATTGTGGGCAGGATCATCT
 TGTCCGAAAGCCGGCCATCATTCCCGACAGGGAAGTCCTTTACCGGGAGTTGGA
 TGAGATGGAAGAGTGGCGCTCACACCTCCCTTACATCGAACAGGGAATGCAGCTC
 GCCGAACAATTCAAACAGAAGGCAATCGGGTTGCTGCAAACAGCCACCAAGCAA
 GCGGAGGCTGCTGCTCCCGTGGTGGAAATCCAAGTGGCGGACCCTCGAAGCCTTCT
 GGGCGAAGCATATGTGGAATTTTCATCAGCGGGATAACAATTTAGCAGGCTTGT
 CACTCTGCCTGGCAACCCCGGATAGCATCACTGATGGCATTACAGCCTCTATC
 ACCAGCCCTCACCACCCAACATAACCCTCCTGTTTAAACATCCTGGGGGGATGGG
 TGGCCCGCAACTTGTCTCCAGCGCTGCTTCTGCTTTTCGTAGGCGCCGGCATC
 GCTGGAGCGGCTGTTGGCAGCATAGGCTTGGGAAGGTGCTTGTGGATATTTGG
 CAGGTTATGGAGCAGGGGTGGCAGGCGCGCTCGTGGCCTTTAAGGTCATGAGCG
 GCGAGATGCCCTCCACCGAGGACCTGGTTAACCTACTCCCTGCTATCCTCTCCCCT
 GGCGCCCTAGTGTGCGGGTGTGTGCGCAGCGATACTGCGTCGGCACGTGGGGCC
 CAGGGGAGGGGGCTGTGCAAGTGGATGAACCGGCTGATAGCGTTTCGCTTCGCGGG
 GTAACCACTCTCCCCACGCACTATGTGCCTGAGAGCGACGCTGCAGCACGTTGT
 CACTCAGATCCTCTAGTCTTACCATCACTCAGCTGCTGAAGAGGCTTCACCAGT
 GGATCAAACGAGGACTGCTCCACGCCATGCTCCGGCTCGTGGCTAAGAGATGTTG
 GGATTGGATATGCACGGTGTGACTGATTTCAAGACCTGGCTCCAGTCCAAGCTC
 CTGCCGCGATTGCOGGGAGTCCCCTTCTTTCATGTCAACGTGGGTACAAGGGAG
 TCTGGCGGGGCGACGGCATCATGCAAACCACTGCCCATGTGGAGCACAGATCA
 CCGGACATGTGAAAAACGGTTCATGAGGATCGTGGGGCCTAGGACCTGTAGTA
 ACACGTGGCATGGAACATTCCCCATTAACGCGTACACCACGGGGCCCCTGCACGCC
 CTCCCCGGCGCAAATTAATTCTAGGGCGCTGTGGCGGGTGGCTGCTGAGGAGTAC
 GTGGAGGTTACGCGGGTGGGGGATTTCCACTACGTGACGGGCATGACCACTGAC
 AACGTAAGTGGCCGTGTACAGGTTCCGGCCCCCGAATTCTTACAGAAGTGGATG
 GGGTGGGTTGCACAGGTACGCTCCAGCGTGCAAACCCCTCCTACGGGAGGAGG
 TCACATTCCTGGTCCGGCTCAATCAATACCTGGTTGGGTCACAGCTCCCATGCGA
 GCCCGAACCGGACGTAGCAGTGTCACTTCCATGCTCACCGACCCCTCCCACATT
 ACGGCGGAGACGGCTAAGCGTAGGCTGGCCAGGGGATCTCCCCCTCCTTGGCC
 AGCTCATCAGCTATCCAGCTGTCTGCGCCTTCTTGAAGGCAACATGCACTACCC

GTCATGACTCCCCGGACGCTGACCTCATCGAGGCCAACCTCCTGTGGCGGCAGGA
 GATGGGCGGGAACATCACCCGCGTGGAGTCAGAAAATAAGGTAGTAATTTTGGGA
 CTCITTCGAGCCGCTCCAAGCGGAGGAGGATGAGAGGGAAAGTATCCGTTCCGGC
 GGAGATCCTGCGGAGGTCCAGGAAATTCCCTCGAGCGATGCCCATATGGGCACG
 CCCGGATTACAACCCTCCACTGTTAGAGTCTTGAAGGACCCGGACTACGTCCCT
 CCAGTGGTACACGGGTGTCCATTGCCGCTGCCAAGGCCCTCCGATAACCACCTC
 CACGGAGGAAGAGGACGGTTGTCTGTGCAAACTACCGTGTCTTCTGCCTTGGC
 GGAGCTCGCCACAAAGACCTTCGGCAGCTCCGAATCGTCGGCCGTCGACAGCGG
 CACGGCAACGGCCTCTCCTGACCAGCCCTCCGACGACGGCGACGCGGGATCCGA
 CGTTGAGTCGTACTCCTCCATGCCCCCTTGAGGGGGAGCCGGGGATCCCGAT
 CTCAGCGACGGGTCTTGGTCTACCGTAAGCGAGGAGGCTAGTGAGGACGTCTCT
 GCTGCTCGATGTCTACACATGGACAGGCGCCCTGATCACGCCATGCGCTGCGGA
 GGAAACCAAGCTGCCCATCAATGCACTGAGCAACTCTTTGCTCCGTCACCACAAC
 TTGGTCTATGCTACAACATCTCGCAGCGCAAGCCTGCGGCAGAAGAAGGTCACCT
 TTGACAGACTGCAGGTCCTGGACGACCACTACCGGGACGTGCTCAAGGAGATGA
 AGGGCAAGGCGTCCACAGTTAAGGCTAAACTTCTATCCGTGGAGGAAGCCTGTA
 AGCTGACGCCCCACATTCGGCCAGATCTAAATTTGGCTATGGGGCAAAGGACGT
 CCGGAACCTATCCAGCAAGGCCGTTAACCACATCCGCTCCGTGTGGAAGGACTTG
 CTGGAAGACACTGAGACACCAATTGACACCACCATCATGGCAAAAAATGAGGTT
 TTCTGCGTCCAACCAGAGAAGGGGGGCCGCAAGCCAGCTCGCCTTATCGTATTCC
 CAGATTTGGGGGTTTCGTGTGTGCGAGAAAATGGCCCTTACGATGTGGTCTCCAC
 CCTCCCTCAGGCCGTGATGGGCTCTTCATACGGATTCCAATACTCTCCTGGACAG
 CGGGTCGAGTTCCCTGGTGAATGCCTGGAAAGCGAAGAAATGCCCTATGGGCTTCG
 CATATGACACCCGCTGTTTTGACTCAACGGTCACTGAGAATGACATCCGTGTTGA
 GGAGTCAATCTACCAATGTTGTGACTTGGCCCCGAAGCCAGACAGGCCATAAG
 GTCGCTCACAGAGCGGCTTTACATCGGGGGCCCCCTGACTAATTCTAAAGGGCAG
 AACTGCGGCTATCGCCGTTGCCGCGGAGCGGTGTACTGACGACCAGCTGCGGT
 AATACCCTCACATGTTACTTGAAGGCCGCTGCGGCCGTGCGAGCTGCGAAGCTCC
 AGGACTGCACGATGCTCGTATGCGGAGACGACCTTGTCTGTTATCTGTGAAAGCGC
 GGGGACCCAAGAGGACGAGGCGAGCCTACGGGCTTCACGGAGGCTATGACTAG
 AACTCTGCCCCCTGGGGACCCGCCAAACCAGAATACGACTTGGAGTTGATA
 ACATCATGCTCCTCCAATGTGTGTCAGTTCGCGCACGATGCATCTGGCAAAAGGGTGT
 ACTATCTCACCCGTGACCCACCACCCCTTGC GCGGGCTGCGTGGGAGACAGC
 TAGACACACTCCAGTCAATTCCTGGCTAGGCAACATCATCATGTATGCGCCCACC
 TTGTGGGCAAGGATGATCCTGATGACTCATTCTCTCCATCCTTCTAGCTCAGGA
 ACAACTGAAAAAGCCCTAGATTGTGAGATCTACGGGGCCTGTTACTCCATTGAG
 CCACTTGACCTACCTCAGATCATTCAACGACTCCATGGCCTTAGCGATTTTCACT
 CCATAGTTACTCTCCAGGTGAGATCAATAGGGTGGCTTCATGCCTCAGGAACTT
 GGGGTACCGCCCTTGCAGTCTGGAGACATCGGGCCAGAAGTGTCCGCGCTAGG
 CTAATGTCCCAGGGGGGAGGGCTGCCACTTGTGGCAAGTACCTCTTCAACTGGG
 CAGTAAGGACCAAGCTCAAACCTCACTCCAATCCCGGCTGCGTCCCAGTTGGATTT
 ATCCAGCTGGTTTCGTTGCTGGTTACAGCGGGGGAGACATATATCACAGCCGTCT
 CGTGCCCGACCCCGCTGGTTTCATGTGGTGCCTACTCCTACTTTCTGTAGGGGTAGG
 CATCTATCTACTCCCAACCGATGAACGGGGACCTAAACACTCCAGGCCAATAGG
 CCATCCGTTTTTTTCCCTTTTTTTTTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
 TTTTCTCTTTTTTTTCCCTTTTTTTTCTTTTTTCTTTTCTTTTCTTTGGTGGCTCCATCTTAG
 CCTAGTCACGGCTAGCTGTGAAAGGTCCTGAGCCGCTTGAAGTGCAGAGAGTGC
 TGATACTGGCCTCTCTGCAGATCAAGT

SEQ ID NO: 24: Secuencia de nucleótidos del clon de ADNc del VHC de longitud completa que contiene la mutación de Ser en Ile en la posición 1179 de la SEQ ID NO: 3 (Véase Figure 9)

5

GCCAGCCCCGATTGGGGGCGACTCCACCATAGATCACTCCCCTGTGAGGAAC
TACTGTCTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTGCGTGCAG
CCTCCAGGACCCCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTA
CACCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCTTTCTTGGATCAACCCGCTCAATGCCT
GGAGATTTGGGCGTGCCCCGCGAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGTCGCGA
AAGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAGGGTGTGCGAGTGCCCCGGGAGGTCTCGT
AGACCGTGCACCATGAGCACGAATCCTAAACCTCAAAGAAAAACCAAACGTAAC
ACCAACCGCCGCCACAGGACGTCAAGTTCCTCCGGGCGGTGGTCAGATCGTCGGT
GGAGTTTACCTGTTGCCGCGCAGGGGCCAGGTTGGGTGTGCGCGCAGACTAGGA
AGACTCCGAGCGGTGCAACCTCGTGAAGGCGACAACCTATCCCCAAGGCTC
GCCAGCCCAGGGTAGGGCCTGGGCTCAGCCCGGTACCCCTGGCCCCCTCTATGG
CAATGAGGGCTTGGGGTGGGCAGGATGGCTCCTGTCAACCCGTGGCTCTCGGCCT
AGTTGGGGCCCCACGGACCCCCGGCGTAGGTCGCGCAATTTGGGTAAGGTCATCG
ATACCCTCACGTGCGGCTTCGCCGATCTCATGGGGTACATTCCGCTCGTCGGCGC
CCCCCTAGGGGGCGCTGCCAGGGCCCTGGCGCATGGCGTCCGGGTTCTGGAGGA
CGGCGTGAACATGCAACAGGGAATCTGCCCGGTTGCTCCTTTCTATCTTCTTT
TGGCTTGTCTGCTCTGTTGACCATCCCAGCTTCCGCTTATGAAGTGCGCAACGTA
TCCGGAGTGTACCATGTACGAACGACTGCTCCAACGCAAGCATTGTGTATGAGG
CAGCGGACATGATCATGCATACCCCGGGTGCCTGCCCTGCGTTCGGGAGAACA
ACTCCTCCCGCTGCTGGGTAGCGCTCACTCCACGCTCGCGGCCAGGAACGCTAG
CGTCCCCACTACGACGATACGACGCGCATGTCGATTTGCTCGTTGGGGCGGCTGCT
CTCTGCTCCGCTATGTACGTGGGAGATCTCTGCGGATCTGTTTTCTCGTCGCCA
GCTGTTCACCTTCTCGCTCGCCGGCACGAGACAGTACAGGACTGCAATTGCTCA
ATATATCCCGGCCACGTGACAGGTCACCGTATGGCTTGGGATATGATGATGAACT
GGTCACCTACAGCAGCCCTAGTGGTATCGCAGTTACTCCGGATCCCACAAGCTGT
CGTGGATATGGTGGCGGGGGCCATTGGGGAGTCCTAGCGGGCCTTGCCTACTAT
TCCATGGTGGGGAACCTGGGCTAAGGTTCTGATTGTGATGCTACTCTTTGCCGGCG
TTGACGGGGGAACCTATGTGACAGGGGGGACGATGGCCAAAACACCCTCGGGA
TTACGTCCCTCTTTTACCCGGGTATCCCAGAAAATCCAGCTTGTAACACCAA
CGGCAGCTGGCACATCAACAGGACTGCCCTGAACTGCAATGACTCCCTCAACT
GGGTTCTTGCTGCGCTGTTCTACGTGCACAAGTTCAACTCATCTGGATGCCAG
AGCGTATGGCCAGCTGCAGCCCCATCGACGCGTTGCTCAGGGGTGGGGCCCA
TCACTTACAATGAGTACACAGCTCGGACCAGAGGCCTTATTGTTGGCACTACGC
ACCCCGCCGTGCGGTATCGTACCCGCGCGCAGGTGTGTGGTCCAGTGTACTGC
TTCACCCCAAGCCCTGCTGTTGGGGACGACCGACCGGTTCCGGCTCCCTACGT
ACAGTTGGGGGGAGAATGAGACGGACGTGCTGCTTCTTAAACAACGCGGCCGC
CGCAAGGCAACTGGTTTGGCTGTACATGGATGAATAGCACTGGGTTACCAAGAC
GTGCGGGGGCCCCCGTGTAAACATCGGGGGGATCGGCAATAAAACCTTGACCTG
CCCCACGGACTGCTTCCGGAAGCACCCCGAGGCCACTTACACCAAGTGTGGTTCC
GGGCCTTGGTTGACACCCAGATGCTTGGTCCACTACCCATACAGGCTTTGGCACT
ACCCCTGCACTGTCAACTTTACCATCTTCAAGGTTAGGATGTACGTGGGGGGAGT
GGAGCACAGGCTCGAAGCCGATGCAATTGGACTCGAGGAGAGCGTTGTAACCT
GGAGGACAGGGACAGATCAGAGCTTAGCCCGCTGCTGCTGTCTACAACGGAGTG
GCAGGTATTGCCCTGTTCTTACCACCCCTACCCGCTCTGTCCACTGGTTTGATCC
ATCTCCATCAGAACGTGCGTGGACGTACAATACTGTACGGTATAGGGTCGGCGGT
TGTCTCCTTTGCAATCAAATGGGAGTATGCTCTGTTGCTCTTCTTCTTCTGGCGG
ACGCGCGCGTCTGTGCTGCTTGTGGATGATGCTGCTGATAGCTCAAGCTGAGGC
CGCCCTAGAGAACCTGGTGGTCTCAACGCGGCATCCGTGGCCGGGGCGCATGG
CATCTCTCCTTCTCGTGTCTTCTGTGCTGCCTGGTACATCAAGGGCAGGCTGG
TCCCTGGGGCGGCATATGCCCTTACGGCGTATGGCCGCTACTCCTGCTCCTGCTG
GCGTTACCACCACGAGCATAACCCATGGACCGGGAGATGGCAGCATCGTGCAGG
GGCGCGGTTTTCTGAGGCTGATACTTTGACCTTGTACCCGCACTATAAGCTGTT
CCTCGTAGGCTCATATGGTGGTTACAATATTTTATCACCAGGGCCGAGGCACAC

TTGCAAGTGTGGATCCCCCCCCCTCAACGTTTCGGGGGGGCGCGATGCCGTCATCC
 TCCTCACGTGCGGATCCACCCAGAGCTAATCTTTACCATCACAAAATCTTGCTC
 GCCATACTCGGTCCACTCATGGTGCTCCAGGCTGGTATAACCAAAGTGCCGTA
 TCGTGCGCGCACACGGGCTCATTTCGTGCATGCATGCTGGTGCGGAAGGTTGCTGG
 GGGTCATTATGTCCAAATGGCTCTCATGAAGTTGGCCGCACTGACAGGTACGTAC
 GTTTATGACCATCTCACCCCACTGCGGGACTGGGCCACGCGGGCCTACGAGACC
 TTGCGGTGGCAGTTGAGCCCGTCTCTCTGATATGGAGACCAAGGTTATCAC
 CTGGGGGGCAGACACCGCGGGCTGTGGGGACATCATCTTGGGCCTGCCGCTCTCC
 GCCCGCAGGGGGAGGGAGATACATCTGGGACCGGCAGACAGCCTTGAAGGGCAG
 GGGTGGCGACTCCTCGCGCTATTACGGCCTACTCCCAACAGACGCGAGGCCTAC
 TTGGCTGCATCATCACTAGCCTCACAGGCCGGGACAGGAACAGGTCGAGGGGG
 AGGTCCAAGTGGTCTCCACCGCAACACAATCTTTCTGGCGACCTGCGTCAATGG
 CGTGTGTGGACTGTCTATCATGGTGGCGGCTCAAAGACCCTTGCCGGCCAAAG
 GGCCCAATCACCCAAATGTACACCAATGTGGACCAGGACCTGCTCGGTGACAA
 GCGCCCCCGGGGCGGTTCCCTTGACACCATGCACCTGCGGCAGCTCGGACCTTT
 ACTTGGTACAGGGCATGCCGATGTCATTCCGGTGCGCCGGCGGGGCGACAGCA
 GGGGGAGCCTACTCTCCCCAGGCCGCTCTCCTACTTGAAGGGCTCTTCGGGGCG
 TCCACTGCTCTGCCCTCGGGGCACGCTGTGGGCATCTTTCGGGCTGCCGTGTGC
 ACCCGAGGGGTTGCGAAGGCGGTGGACTTTGTACCCGTCGAGTCTATGGAAACC
 ACTATGCGGTCCCCGGTCTTACCGGACAACCTCGTCCCCCTCGGGCCGTACCGCAGA
 CATTCCAGGTGGCCATCTACACGCCCTACTGGTAGCGGCAAGAGCACTAAGGT
 GCCGGTGCATGTCAGCCCAAGGGTATAAGGTGCTTGTCTGAACCCGTCCGTC
 GCCGCCACCCTAGGTTTCGGGGCGTATATGTCTAAGGCACATGGTATCGACCCTA
 ACATCAGAACCGGGTAAGGACCATCACACGGGTGCCCCCATCACGTA
 CCTATGGCAAGTTTCTTGGCGACGGTGGTGTCTTGGGGGCGCCTATGACATCAT
 AATATGTGATGAGTGCCACTCAACTGACCTGACCACTATCCTGGGCATCGGCACA
 TCTCTGGACCAAGCGGAGACGGCTGGAGCGCGACTCGTCTGTGCTCGCCACCCT
 ACGCCTCCGGGATCGGTACCGTGCACATCCAAACATCGAGGAGGTGGCTCTGT
 CCAGCACTGGAGAAATCCCCTTTTATGGCAAAGCCATCCCATCGAGACCATCAA
 GGGGGGGAGGCACCTCATTTTTCTGCCATTCCAAGAAGAAATGTGATGAGCTCGCC
 GCGAAGCTGTCCGGCCTCGGACTCAATGCTGTAGCATATTACCGGGCCTTGATG
 TATCCGTACATACTAGCGGAGACGTCATTGTCTGATGCAACGACGCTCTAAT
 GACGGGCTTTACCGGCGATTCGACTCAGTGTGACTGCAATACATGTGTACCC
 CAGACAGTGCAGTTCAGCCTGGACCCGACCTTACCATTGAGACGACGACCGTGC
 CACAAGACGCGGTGTACGCTCGCAGCGGGAGGACGACTGGTAGGGGCAGGA
 TGGGCATTTACAGGTTTGTGACTCCAGGAGAACGGCCCTCGGGCATGTTTCGATT
 CTCGGTCTGTGCGAGTGTATGACGCGGGCTGTGCTTGGTACGAGCTCACGCC
 GCCGAGACCTCAGTTAGGTTGCGGGTTACCTAAACACACCAGGTTGCCCGTCT
 GCCAGGACCATCTGGAGTTCTGGGAGACGCTCTTTACAGGCCCTACCCACATAGA
 CGCCCATTTCTTGTCCAGACTAAGCAGGCAGGAGACAACCTTCCCCTACCTGGTA
 GCATACCAGGCTACGGTGTGCGCCAGGGCTCAGGCTCCACCTCCATCGTGGGACC
 AAATGTGGAAGTGTCTCATAACGGCTAAAGCCTACGCTGCACGGGCCAACGCCCT
 GCTGTATAGGCTGGGAGCCGTTCAAACGAGGTTACTACCACACACCCATAACC
 AAATACATCATGGCATGCATGTGCGCTGACCTGGAGGTGCTCACGACACCTGGG
 TGCTGGTAGGCGGAGTCTAGCAGCTCTGGCCGCTATTGCTGACAACAGGCAG
 CGTGGTCAATTGTGGGCAGGATCATCTTGTCCGAAAGCCGGCCATCATTCCCGAC
 AGGGAAGTCTTTACCGGGAGTTCGATGAGATGGAAGAGTGCCTCACACCTCC
 CTTACATCGAACAGGGAATGCAGCTCGCCGAACAATTCAAACAGAAGGCAATCG
 GGTGTGTCGAAACAGCCACCAAGCAAGCGGAGGCTGCTGCTCCCGATTGGAAT
 CCAAGTGGCGGACCCCTCGAAGCCTTCTGGGCGAAGCATATGTGGAATTTACATCAG
 CGGGATACAAATTTAGCAGGCTTGTCCACTCTGCTGGCAACCCCGGATAGCA
 TCACTGATGGCATTACAGCCTCTATCACCAGCCGCTCACCACCCAACATACCC
 TCCTGTTTAAACATCCTGGGGGGATGGGTGGCCGCCAACTTGTCTCTCCAGCGC

TGCTTCTGCTTTTCGTAGGCGCCGGCATCGCTGGAGCGGCTGTTGGCAGCATAGGC
 CTITGGGAAGGTGCTTGTGGATATTTTGGCAGGTTATGGAGCAGGGGTGGCAGGCG
 CGCTCGTGGCCTTTAAGGTCATGAGCGGCGAGATGCCCTCCACCGAGGACCTGGT
 TAACCTACTCCCTGCTATCCTCTCCCTGGCGCCCTAGTCGTGCGGGTTCGTGTGCG
 CAGCGATACTGCGTCCGCACGTGGGCCAGGGGAGGGGGCTGTGCAGTGGATGA
 ACCGGCTGATAGCGTTCGCTTCGCGGGGTAACCACGTCTCCCCACGCACTATGT
 GCCTGAGAGCGACGCTGCAGCACGTGTCACTCAGATCCTCTCTAGTCTTACCATC
 ACTCAGCTGCTGAAGAGGCTTACCAGTGGATCAACGAGGACTGCTCCACGCCAT
 GCTCCGGCTCGTGGCTAAGAGATGTTTGGGATTGGATATGCACGGTGTGACTGA
 TTTCAAGACTGGCTCCAGTCCAAGCTCCTGCCGCGATTGCCGGGAGTCCCCTTCT
 TCTCATGTCAACGTGGGTACAAGGGAGTCTGGCGGGGCGACGGCATCATGCAA
 CCACCTGCCATGTGGAGCACAGATCACCGACATGTGAAAAACGGTTCATGA
 GGATCGTGGGGCCTAGGACCTGTAGTAACACGTGGCATGGAACATTCCCCATTA
 CGCGTACACCACGGGCCCTGCACGCCCTCCCCGGCGCAAATTAATTAGGGCG
 CTGTGGCGGGTGGCTGCTGAGGAGTACGTGGAGGTTACGCGGGTGGGGGATTC
 CACTACGTGACGGGCATGACCACTGACAACGTAAAGTGCCCGTGTGAGGTTCCGG
 CCCCCGAATTCCTCACAGAAGTGGATGGGGTGGGTTGCACAGGTACGCTCCAGC
 GTGCAAACCCCTCCTACGGGAGGAGGTACATTCCTGGTCCGGCTCAATCAATAC
 CTGTTTGGGTACAGCTCCCATGCGAGCCGAACCGGACGTAGCAGTGTCTCACT
 CCATGCTACCGACCCCTCCACATTACGGCGGAGACGGCTAAGCGTAGGCTGGC
 CAGGGGATCTCCCCCTCCTTGGCCAGCTCATCAGCTATCCAGCTGTCTGCGCCTT
 CTTGAAGGCAACATGCACTACCCGTCATGACTCCCCGGACGCTGACCTCATCGA
 GGCCAACCTCCTGTGGCGGCAGGAGATGGGCGGGAACATACCCCGCTGGAGTC
 AGAAAATAAGGTAGTAATTTTGGACTCTTTCGAGCCGCTCCAAGCGGAGGAGGA
 TGAGAGGGAAGTATCCGTTCCGGCGGAGATCCTGCGGAGGTCCAGGAAATCCC
 TCGAGCGATGCCCATATGGGCACGCCCGGATTACAACCTCCACTGTTAGAGTCC
 TGGAAGGACCCGGACTACGTCCCTCCAGTGGTACACGGGTGTCCATTGCCGCTG
 CCAAGGCCCTCCGATAACACCTCCACGGAGGAAGAGGACGGTGTCTCTGTCAG
 AATCTACCGTGTCTTCTGCCTTGGCGGAGCTCGCCACAAAGACCTTCGGCAGCTC
 CGAATCGTCCGCGCCGACAGCGGCACGGCAACGGCCCTCCTGACACCCCTCC
 GACGACGGCGACGCGGGATCCGACGTTGAGTCGTACTIONCTCCATGCCCCCTTG
 AGGGGGAGCCGGGGGATCCCGATCTCAGCGACGGGTCTTGGTCTACCGTAAGCG
 AGGAGGCTAGTGAGGACGTCTGCTGCTGCTCGATGTCTACACATGGACAGGCGC
 CCTGATCACGCCATGCGCTGCGGAGGAAACCAAGCTGCCCATCAATGCACTGAG
 CAACTCTTTGCTCCGTCACCACAACCTTGGTCTATGCTACAACATCTCGCAGCGCA
 AGCCTGCGGCAGAAGAAGGTACCTTTGACAGACTGCAGGTCTGGACGACCAC
 TACCGGGACGTGCTCAAGGAGATGAAGGCGAAGGCGTCCACAGTTAAGGCTAAA
 CTTCTATCCGTGGAGGAAGCCTGTAAGCTGACGCCCCACATTCGGCCAGATCTA
 AATTTGGCTATGGGGCAAAGGACGTCCGGAACCTATCCAGCAAGGCCGTTAACC
 ACATCCGCTCCGTGTGGAAGGACTTGTGGAAGACACTGAGACACCAATTGACA
 CCACCATCATGGCAAAAAATGAGGTTTTCTGCGTCCAACCAGAGAAGGGGGCC
 GCAAGCCAGCTCGCCTTATCGTATTCCCAGATTTGGGGGTTCTGTGTGCGAGAA
 AATGGCCCTTTACGATGTGGTCTCCACCCTCCCTCAGGCCGTGATGGGCTCTTCAT
 ACGGATTCCAATACTCTCCTGGACAGCGGGTCGAGTTCCTGGTGAATGCCCTGGAA
 AGCGAAGAAATGCCCTATGGGCTTCGCATATGACACCCGCTGTTTTGACTCAACG
 GTCACTGAGAATGACATCCGTGTTGAGGAGTCAATCTACCAATGTTGTGACTTGG
 CCCCCGAAGCCAGACAGGCCATAAGGTGCTCACAGAGCGGCTTTACATCGGGG
 GCCCCTGACTAATTCTAAAGGGCAGAACTGCGGCTATCGCCGGTGCCGCGCGAG
 CGGTGTACTGACGACCAGCTGCGGTAATACCCTCACATGTTACTTGAAGCCGCT
 CGGGCCTGTCGAGCTGCGAAGCTCAGGACTGCACGATGCTCGTATGCGGAGAC
 GACCTTGTCTTATCTGTGAAAGCGCGGGGACCCAAGAGGACGAGGCGAGCCTA
 CGGGCCTTACGGAGGCTATGACTAGATACTCTGCCCCCTGGGGACCCGCCCA
 AACCAGAATACGACTTGGAGTTGATAACATCATGCTCCTCCAATGTGTCAGTCCG

GCACGATGCATCTGGCAAAAGGGTGTACTATCTCACCCGTGACCCCACCACCCCC
 CTTGCGCGGGCTGCGTGGGAGACAGCTAGACACACTCCAGTCAATTCCTGGCTAG
 GCAACATCATCATGTATGCGCCACCTTGTGGGCAAGGATGATCCTGATGACTCA
 TTTCTTCTCCATCCTTCTAGCTCAGGAACAACCTTGAAAAAGCCCTAGATTGTCAGA
 TCTACGGGGCCTGTACTCCATTGAGCCACTTGACCTACCTCAGATCATTCAACG
 ACTCCATGGCCTTAGCGCATTTTCACTCCATAGTTACTCTCCAGGTGAGATCAATA
 GGGTGGCTTCATGCCTCAGGAAACTTGGGGTACCGCCCTTGCAGTCTGGAGACA
 TCGGGCCAGAAGTGTCCGCGCTAGGCTACTGTCCAGGGGGGGAGGGCTGCCAC
 TTGTGGCAAGTACCTCTTCAACTGGGCAGTAAGGACCAAGCTCAAACCTCACTCCA
 ATCCCGGCTGCGTCCCAGTTGGATTTATCCAGCTGGTTCGTTGCTGGTTACAGCGG
 GGGAGACATATATCACAGCCTGTCTCGTGCCCGACCCCGCTGGTTCATGTGGTGC
 CTACTCCTACTTTCTGTAGGGGTAGGCATCTATCTACTCCCAACCCGATGAACGG
 GGACCTAAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGTTTTTTTCCCTTTTTTTTTTCT
 TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTCCTTTTTTTTCCCTTTTTTTCTT
 TTCTTTCTTTGGTGGCTCCATCTTAGCCCTAGTCACGGCTAGCTGTGAAAGGTCC
 GTGAGCCGCTTGACTGCAGAGAGTGTGATACTGGCCTCTCTGCAGATCAAGT

SEQ ID NO: 25: Secuencia de nucleótidos del clon de ADN del replicón adaptativo del VHC 5'NTR-EMCV/HCVrepVII

GCCAGCCCCGATTGGGGGCGACACTCCACCATAGATCACTCCCCTGTGAGGAAC
 TACTGTCTTACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTGCGTGCAG
 CCTCCAGGACCCCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTA
 CACCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCTTTCTTGGATCAACCCGCTCAATGCCT
 GGAGATTTGGGCGTGCCCCGCGAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGTGCGGA
 AAGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAGGGTGTGCGAGTGCCCCGGGAGGTCTCGT
 AGACCGTGCACCAGACCACAACGGTTTCCCTCTAGCGGGATCAATTCGCCCCCTC
 TCCCTCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGAATAAGGCCGGTGT
 GCGTTTGTCTATATGTTATTTTCCACCATATTGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGC
 CCGGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCTAGGGGTCTTTCCCTCTCG
 CCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTCGTAAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAG
 CTTCTTGAAGACAACAACGCTCTGTAGCGACCCCTTGCAGGCAGCGGAACCCCC
 ACCTGGCGACAGGTGCCCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTATAAGATACACCGG
 AAAGCGGCACAAACCCAGTCCACGTTGTGAGTTGGATAGTTGTGAAAGAGT
 CAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGATGCCAGAAGGT
 ACCCCATTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTGCACATGCTTTACATGTGTTT
 AGTCGAGGTTAAAAACGTCTAGGCCCCCCGAACCACGGGGACGTGGTTTTCTT
 TGAAAAACACGATAATACCATGGCGCCTATTACGGCCTACTCCCAACAGACGG
 AGGCCTACTTGGCTGCATCATCACTAGCCTCACAGGCCGGGACAGGAACCAGGTC
 GAGGGGGAGGTCCAAGTGGTCTCCACCGCAACACAATCTTTCTGGCGACCTGCG
 TCAATGGCGTGTGTTGGACTGTCTATCATGGTGGCGGCTCAAAGACCCTTGCCGG
 CCCAAAGGGCCCAATCACCCAAATGTACACCAATGTGGACCAGGACCTCGTCGG
 CTGGCAAGCGCCCCCGGGGCGCGTTCCTTGACACCATGCACCTGCGGCAGCTCG
 GACCTTTACTTGGTCACGAGGCATGCCGATGTCATTCCGGTGCGCCGGCGGGGCG
 ACAGCAGGGGGAGCCTACTCTCCCCAGGCCGCTCTCCTACTTGAAGGCTCTTC
 GGGCGGTCCACTGCTGCCCCCTCGGGGCACGCTGTGGGCATCTTTCGGGCTGCC
 GTGTGCACCCGAGGGGTTGCGAAGGCGGTGGACTTTGTACCCGTCGAGTCTATGG
 AAACCACTATGCGGTCCCCGGTCTTACGGACAACCTCGTCCCCTCCGGCCGTACC
 GCAGACATTCCAGGTGGCCCATCTACACGCCCTACTGGTAGCGGCAAGAGCACT
 AAGGTGCCGGCTGCGTATGCAGCCAAAGGGTATAAGGTGCTTGTCTGAACCCGT
 CCGTCCCGCCACCCTAGGTTTCGGGGCGTATATGTCTAAGGCACATGGTATCGA
 CCCTAACATCAGAACCAGGGTAAGGACCATCACACGGGTGCCCCATCACGTA
 CTCCACCTATGGCAAGTTTCTTGCCGACGGTGGTTGCTCTGGGGGCGCCTATGAC

ATCATAATATGTGATGAGTGCCACTCAACTGACTCGACCACTATCCTGGGCATCG
 GCACAGTCCTGGACCAAGCGGAGACGGCTGGAGCGCGACTCGTCGTGCTCGCCÁ
 CCGCTACGCCTCCGGGATCGGTACCGTGCCACATCCAAACATCGAGGAGGTGGC
 TCTGTCCAGCACTGGAGAAATCCCCTTTTATGGCAAAGCCATCCCCATCGAGACC
 ATCAAGGGGGGGAGGCACCTCATTTTTCTGCCATTCCAAGAAGAAATGTGATGAG
 CTCGCCGCGAAGCTGTCCGGCCTCGGACTCAATGCTGTAGCATATTACGGGGGCC
 TTGATGTATCCGTCATACCAACTAGCGGAGACGTCATTGTGCTAGCAACGGACGC
 TCTAATGACGGGCTTTACCGGGGATTTGACTCAGTGATCGACTGCAATACATGT
 GTCACCCAGACAGTCGACTTCAGCCTGGACCCGACCTTACCATTGAGACGACGA
 CCGTGCCACAAGACGCGGTGTCACGCTCGCAGCGGGCAGGCAGGACTGGTAGGG
 GCAGGATGGGCATTTACAGGTTTGTGACTCCAGGAGAACGGCCCTCGGGCATGTT
 CGATTCTCGGTTCTGTGCGAGTGCTATGACGCGGGCTGTGCTTGGTACGAGCTC
 ACGCCCGCCGAGACCTCAGTTAGGTTGCGGGCTTACCTAAACACACCAGGTTGC
 CCGTCTGACAGGACCATCTGGAGTTCTGGGAGAGCGTCTTTACAGGCCTCACCCA
 CATAGACGCCATTTCTTGTCCAGACTAAGCAGGCAGGAGACAACCTCCCCTAC
 CTGGTAGCATAACCAGGCTACGGTGTGCGCCAGGGCTCAGGCTCCACCTCCATCGT
 GGGACCAAATGTGGAAGTGTCTCATAACGGCTAAAGCCTACGCTGCACGGGCCAA
 CGCCCTGCTGTATAGGCTGGGAGCCGTTCAAACGAGGTTACTACCACACACCC
 CATAACCAAATACATCATGGCATGCATGTGCGCTGACCTGGAGGTCGTCACGAGC
 ACCTGGGTGCTGGTAGGCGGAGTCTAGCAGCTCTGGCCGCGTATTGCCTGACAA
 CAGGCAGCGTGGTCATTTGTGGCAGGATCATCTTGTCCGAAAGCCGGCCATCAT
 TCCCGACAGGGAAGTCCTTTACCGGGAGTTCGATGAGATGGAAGAGTGCCTC
 ACACCTCCCTTACATCGAACAGGGAATGCAGCTCGCCGAACAATTCAAACAGAA
 GGCAATCGGGTTGCTGCAAACAGCCACCAAGCAAGCGGAGGCTGCTGCTCCCGT
 GTTGGAATCCAAGTGGCGGACCCTCGAAGCCTTCTGGGCGAAGCATATGTGAA
 TTTCATCAGCGGGATACAATATTTAGCAGGCTTGTCCACTCTGCCTGGCAACCC
 GCGATAGCATCACTGATGGCATTACAGCCTCTATACCAGCCCTCACCAACCC
 AACATAACCTCCTGTTAACATCCTGGGGGATGGGTGGCCGCCAACTTGCTCC
 TCCCAGCGCTGCTTCTGCTTTCTGATGGCGCCGGCATCGCTGGAGCGGCTGTTGGC
 AGCATAGGCCTTGGGAAGGTGCTTGTGGATATTTTGGCAGGTTATGGAGCAGGGG
 TGGCAGGCGCGCTCGTGGCCTTTAAGGTCATGAGCGGCGAGATGCCCTCCACCGA
 GGACCTGGTTAACCTACTCCCTGCTATCCTCTCCCCTGGCGCCCTAGTCGTCGGG
 TCGTGTGCGCAGCGATACTGCGTCGGCACGTTGGGCCAGGGGAGGGGGCTGTGC
 AGTGGATGAACCGGCTGATAGCGTTCGCTTCGCGGGGTAACCACGTCCTCCCCAC
 GCACTATGTGCCTGAGAGCGACGCTGCAGCACGTTGCTCACTCAGATCCTCTAGT
 CTTACCATCACTCAGCTGCTGAAGAGGCTTACCAGTGGATCAACGAGGACTGCT
 CCACGCCATGCTCCGGCTCGTGGCTAAGAGATGTTTGGGATTGGATATGCACGGT
 GTTGACTGATTTCAAGACCTGGCTCCAGTCCAAGCTCCTGCCGATTGCCGGGA
 GTCCCCTTCTTCTCATGTCAACGTGGGTACAAGGGAGTCTGGCGGGGCGACGGCA
 TCATGCAAACCACCTGCCATGTGGAGCACAGATCACCGGACATGTGAAAAACG
 GTTCCATGAGGATCGTGGGGCCTAGGACCTGTAGTAACACGTTGGCATGGAACATT
 CCCCATTAACGCGTACACCACGGGCCCTGCACGCCCTCCCCGGCGCCAAATTAT
 TCTAGGGCGCTGTGGCGGGTGGCTGCTGAGGAGTACGTTGAGGTTACGCGGGTG
 GGGGATTTCCACTACGTGACGGGCATGACCACTGACAACGTAAGTGCCCGTGTG
 AGGTTCCGGCCCCCGAATCTTACAGAAGTGGATGGGGTGGGTTGCACAGGTA
 CGCTCCAGCGTGCAAACCCCTCTACGGGAGGAGGTCACATTCTGGTTCGGGCTC
 AATCAATACCTGGTTGGGTCACAGCTCCCATGCGAGCCCGAACCGGACGTAGCA
 GTGCTCACTTCCATGCTCACCGACCCCTCCCACATTACGGCGGAGACGGCTAAGC
 GTAGGCTGGCCAGGGGATCTCCCCCTCCTTGGCCAGCTCATCAGCTATCCAGCT
 GTCGTGCGCTTCTTGAAGGCAACATGCCTACCCGTCATGACTCCCCGACGCT
 GACCTCATCGAGGCAACCTCCTGTGGCGGCAGGAGATGGGGCGGCAACATCC
 CGGTTGGAGTCAGAAAATAAGGTAGTAATTTTGGACTCTTTCGAGCCCTCCAAG
 CGGAGGAGGATGAGAGGGAAGTATCCGTTCCGGCGGAGATCCTGCGGAGGTCCA

GGAAATTCCCTCGAGCGATGCCCATATGGGCACGCCCGGATTACAACCCTCCACT
GTTAGAGTCTGGAAGGACCCGGACTACGTCCCTCCAGTGGTACACGGGTGTCCA
TTGCCGCTGCCAAGGCCCTCCGATACCACCTCCACGGAGGAAGAGGACGGTTG
TCCTGTCAGAATCTACCGTGTCTTCTGCCTTGGCGGAGCTCGCCACAAAGACCTTC
GGCAGCTCCGAATCGTCGGCCGTCGACAGCGGCACGGCAACGGCCTCTCCTGACC
AGCCCTCCGACGACGGCGACGCGGGATCCGACGTTGAGTCGTACTCCTCCATGCC
CCCCCTGAGGGGGAGCCGGGGGATCCCGATCTCAGCGACGGGTCTTGGTCTACC
GTAAGCGAGGAGGCTAGTGAGGACGTCGTCTGCTGCTCGATGTCCTACACATGGA
CAGGCGCCCTGATCACGCCATGCGCTGCGGAGGAAACCAAGCTGCCCATCAATG
CACTGAGCAACTCTTTGCTCCGTCACCACTTGGTCTATGCTACAACATCTCGC
AGCGCAAGCCTGCGGCAGAAGAAGGTCACCTTTGACAGACTGCAGGTCTGGAC
GACCACTACCGGGACGTGCTCAAGGAGATGAAGGCGAAGGCGTCCACAGTTAAG
GCTAAACTTCTATCCGTGGAGGAAGCCTGTAAGCTGACGCCCCACATTCGGCCA
GATCTAAATTTGGCTATGGGGCAAAGGACGTCCGGAACCTATCCAGCAAGGCCG
TTAACCACATCCGCTCCGTGTGGAAGGACTTGCTGGAAGACACTGAGACACCAAT
TGACACCACCATCATGGCAAAAAATGAGGTTTTCTGCGTCCAACCAGAGAAGGG
GGGCCGCAAGCCAGCTCGCCTTATCGTATTCCAGATTTGGGGTTCGTGTGTGC
GAGAAAAATGGCCCTTACGATGTGGTCTCCACCCTCCCTCAGGCCGTGAGGGCT
CTTCATACCGATTCCAATACTCTCCTGGACAGCGGGTCGAGTTCCTGGTGAATGC
CTGGAAGCGAAGAAATGCCCTATGGGCTTCGCATATGACACCCGCTGTTTTGAC
TCAACGGTCACTGAGAATGACATCCGTGTTGAGGAGTCAATCTACCAATGTTGTG
ACTTGGCCCCGAAGCCAGACAGGCCATAAGGTCGCTCACAGAGCGGCTTTACAT
CGGGGGCCCCCTGACTAATTCTAAAGGGCAGAAGTGCAGGCTATCGCCGGTGCCTG
GCGAGCGGTGTACTGACGACCAGCTGCGGTAATACCCTCACATGTTACTTGAAGG
CCGCTGCGGCCTGTCGAGCTGCGAAGCTCCAGGACTGCACGATGCTCGTATGCGG
AGACGACCTTGTGTTATCTGTGAAAGCGCGGGGACCCAAGAGGACGAGGCGAG
CCTACGGGCCTTACGGAGGCTATGACTAGATACTCTGCCCCCTGGGGACCCG
CCCAAACCAGAATACGACTTGGAGTTGATAACATCATGCTCCTCCAATGTGTGAG
TCGCGCACGATGCATCTGGCAAAAGGGTGTACTATCTCACCCGTGACCCACCAC
CCCCCTTGC GCGGGCTGCGTGGGAGACAGCTAGACACACTCCAGTCAATTCTGG
CTAGGCAACATCATCATGTATGCGCCACCTTGTGGGCAAGGATGATCCTGATGA
CTCATTTCTTCCATCCTTCTAGCTCAGGAACAACCTGAAAAAGCCCTAGATTGT
CAGATCTACGGGCCTGTTACTCCATTGAGCCACTTGACCTACCTCAGATCATT
AACGACTCCATGGCCTTAGCGCATTTTCACTCCATAGTTACTCTCCAGGTGAGATC
AATAGGGTGGCTTCATGCCTCAGGAACTTGGGGTACCGCCCTTGGGAGTCTGGA
GACATCGGGCCAGAAGTGTCCGCGCTAGGCTACTGTCCAGGGGGGGAGGGCTG
CCACTTGTGGCAAGTACCTCTTCAACTGGGCAGTAAGGACCAAGCTCAAATCAC
TCCAATCCCGGCTGCGTCCCAGTTGGATTTATCCAGCTGGTTCGTTGCTGGTTACA
GCGGGGGAGACATATATCACAGCCTGTCTCGTGCCCGACCCCGCTGGTTCATGTG
GTGCTACTCCTACTTTCTGTAGGGGTAGGCATCTATCTACTCCCCAACCGATGAA
CGGGGACCTAAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGTTTTTTTTCCCTTTTTTTT
TCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTCCTTTTTTTTTCTCTTTTTTT
CCTTTTCTTCTTTGGTGGCTCCATCTTAGCCCTAGTCACGGCTAGCTGTGAAAG
GTCCGTGAGCCGCTTGACTGCAGAGAGTGCTGATACTGGCCTCTCTGCAGATCAA
GT

REIVINDICACIONES

1. Un polinucleótido que comprende una secuencia del VHC no natural que es capaz de replicación productiva en una célula huésped, o es capaz de ser transcrito en una secuencia de VHC no natural, que es capaz de replicación productiva en una célula huésped, en el que la secuencia del VHC comprende, de 5' a 3' en el ácido nucleico de sentido positivo, una región funcional 5' no traducida (5' NTR); una o más regiones que codifican proteínas, incluyendo al menos una región que codifica la poliproteína que es capaz de replicar el ARN del VHC; y una región funcional 3' no traducida del VHC (3' NTR); en el que la región que codifica la poliproteína comprende un gen de NS5A que comprende una mutación adaptativa (i) que codifica un cambio en la secuencia de aminoácidos, seleccionado del grupo que consiste en Ser (1179) en Ile, Arg (1164) en Gly, Ala (1174) en Ser, Ser (1172) en Cys, Ser (1172) en Pro, de la SEQ ID NO: 3, o (ii) que comprende una eliminación de nucleótidos que corresponde a los nucleótidos de 5345 a 5485 de la SEQ ID NO: 6.
2. El polinucleótido de la reivindicación 1, que tiene una eficacia de transfección en células de mamífero mayor que 0,01%.
3. El polinucleótido de la reivindicación 1, que tiene una eficacia de transfección en células de mamífero mayor que 0,1%.
4. El polinucleótido de la reivindicación 1, que tiene una eficacia de transfección en células de mamífero mayor que 1%.
5. El polinucleótido de la reivindicación 1, que tiene una eficacia de transfección en células de mamífero de aproximadamente 6%.
6. El polinucleótido de la reivindicación 1, en el que el polinucleótido es capaz de replicación en una célula no hepática.
7. El polinucleótido de la reivindicación 6, en el que la célula no hepática es una célula HeLa.
8. El polinucleótido de la reivindicación 1, en el que el VHC está deteriorado en su capacidad para producir enfermedad, establecer infecciones crónicas, producir respuestas autoinmunitarias y transformar células.
9. El polinucleótido de la reivindicación 1, en el que el polinucleótido comprende al menos un IRES seleccionado del grupo que consiste en un IRES vírico, un IRES celular y un IRES artificial.
10. El polinucleótido de la reivindicación 9, en el que la región que codifica la poliproteína del VHC codifica todas las proteínas estructurales y no estructurales del VHC.
11. El polinucleótido de la reivindicación 9, en el que la región que codifica la poliproteína no es capaz de hacer partículas de VHC infecciosas.
12. El polinucleótido de la reivindicación 11, en el que la región que codifica la poliproteína comprende una mutación y/o eliminación en la región que codifica las proteínas estructurales.
13. El polinucleótido de la reivindicación 10 o la reivindicación 12, que además comprende un gen exógeno operativamente unido a un primer IRES y la región que codifica la poliproteína del VHC operativamente unida a un segundo IRES.
14. El polinucleótido de la reivindicación 13, en el que el gen exógeno es un gen que codifica un marcador seleccionable o un gen indicador.
15. El polinucleótido de la reivindicación 14, en el que:
 - (a) el primer IRES es un IRES del VHC;
 - (b) el gen exógeno es un gen neo; y
 - (c) el segundo IRES es un IRES de EMCV.

16. El polinucleótido de la reivindicación 15, en el que la secuencia del VHC es una secuencia del VHC del genotipo 1.
- 5 17. El polinucleótido de la reivindicación 16, en el que la secuencia del VHC es del subtipo 1b.
18. El polinucleótido de la reivindicación 15, que comprende la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6.
19. El polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en el que el polinucleótido es ADN de
10 doble cadena.
20. Un vector que comprende el polinucleótido de la reivindicación 19 operativamente asociado a un promotor.
- 15 21. Una célula que comprende el vector de la reivindicación 20.
22. Una célula huésped que comprende el polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en la que la célula huésped es una célula de mamífero.
- 20 23. La célula huésped de la reivindicación 22, en la que la célula huésped es una célula humana.
24. La célula huésped de la reivindicación 23, en la que la célula huésped se selecciona del grupo que consiste en una célula hepática, un linfocito T, un linfocito B y una célula HeLa.
- 25 25. La célula huésped de la reivindicación 24, en la que la célula huésped es una célula HeLa.

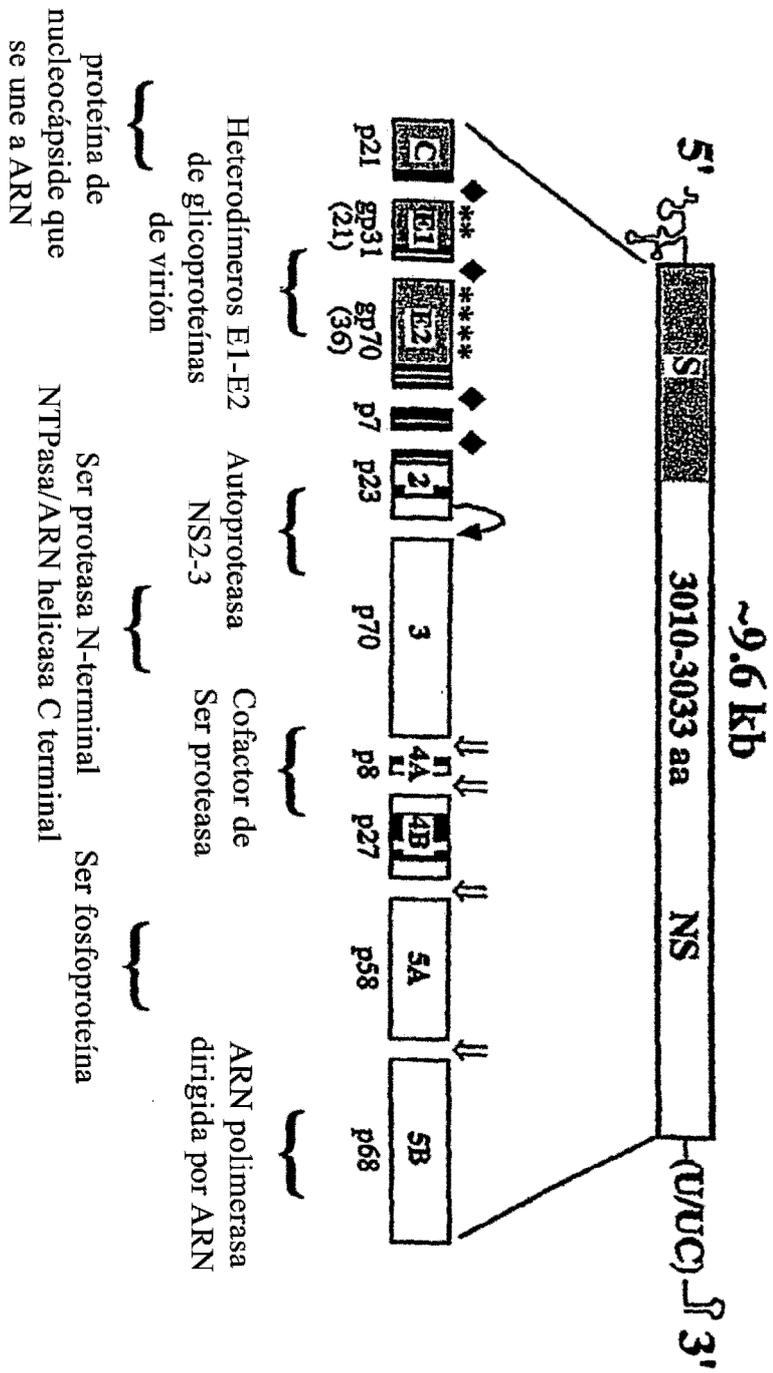


FIGURA 1

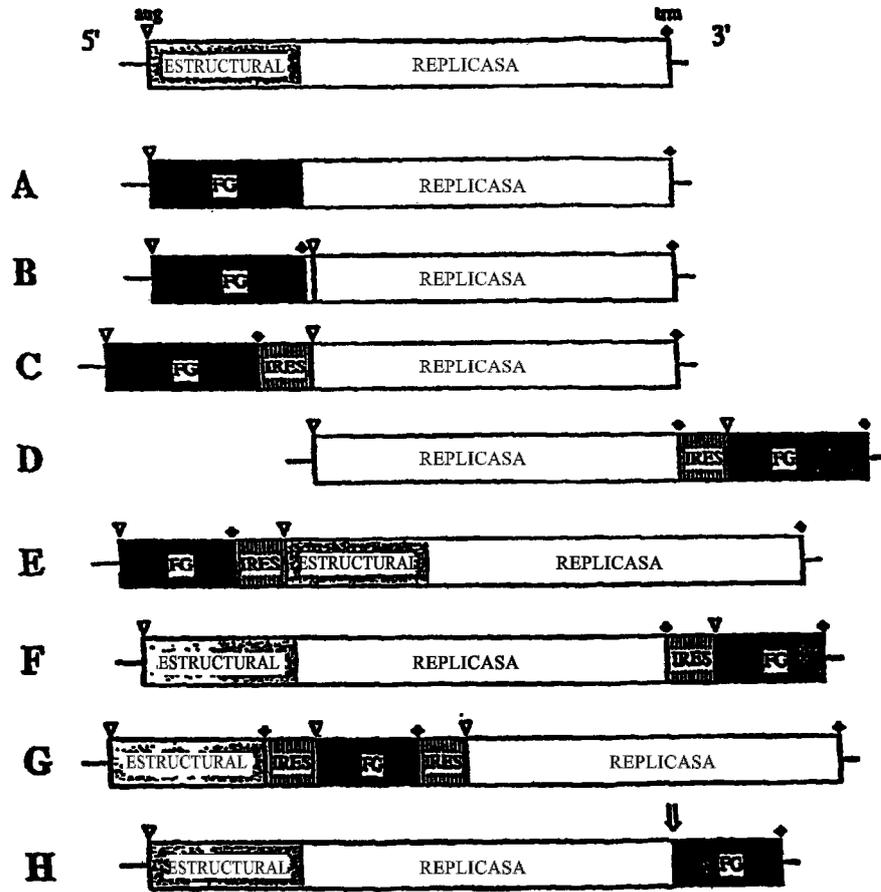


Figura 2

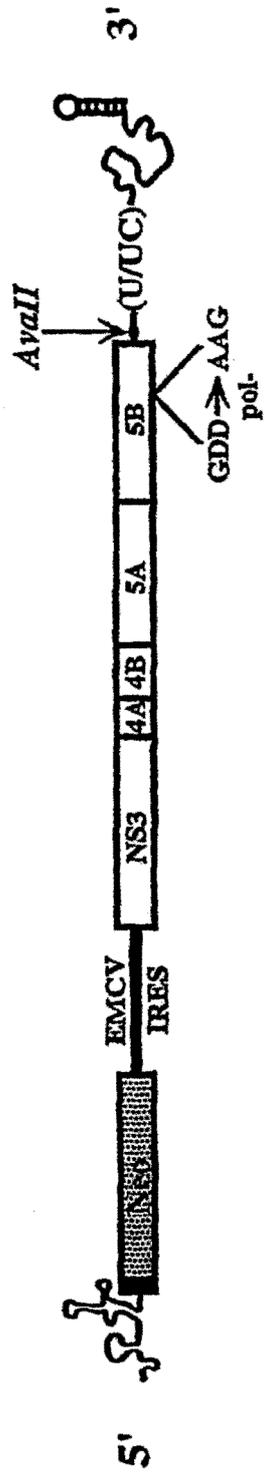
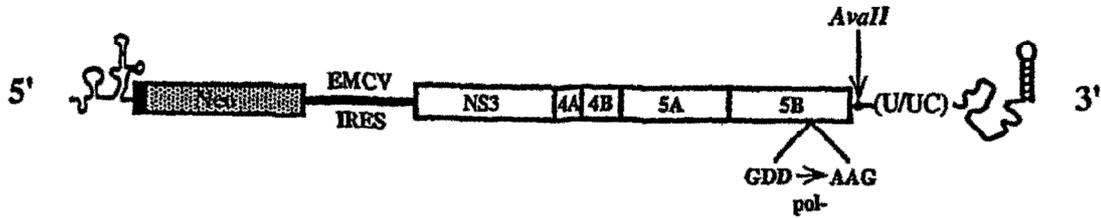


Figura 3

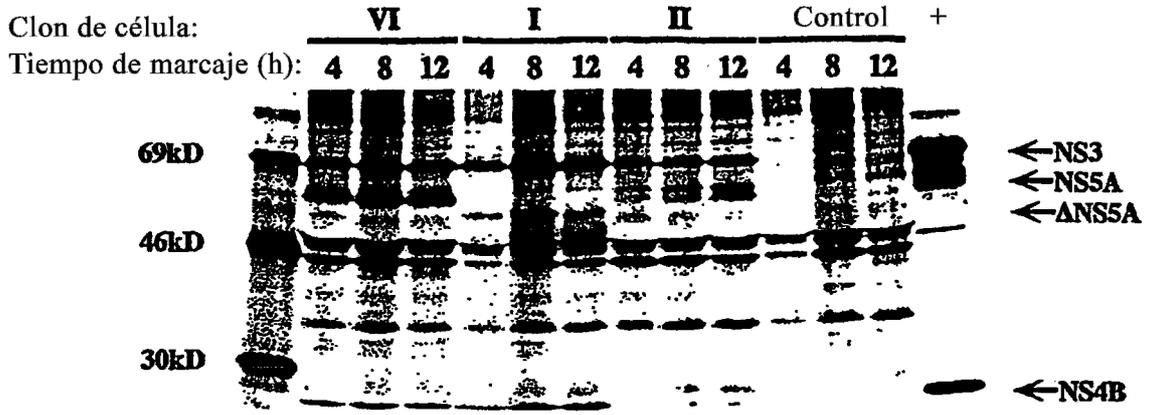


- La DNasa digiere los transcritos de ARN
- Electroporación de ARN en célula Huh7
- - Se generaron colonias resistentes a G418 con frecuencia baja
- Se seleccionaron 28 colonias y 90% de estas se podían someter a pase
- No se observaron colonias para el ARN replicón que contiene una RDRP inactiva

Clon	Número de copias/célula	NS3 citoplasmático	Velocidad de crecimiento
I	>1000	Si	Rápida
II	~1000-5000	Si	Rápida
IV	ND	Si	Rápida
V	500	ND	Moderada
VI	~1000	Si	Rápida
VII	>800	Si	Rápida
Clon E	<400	No	Muy lenta

Figure 4

A.



B.

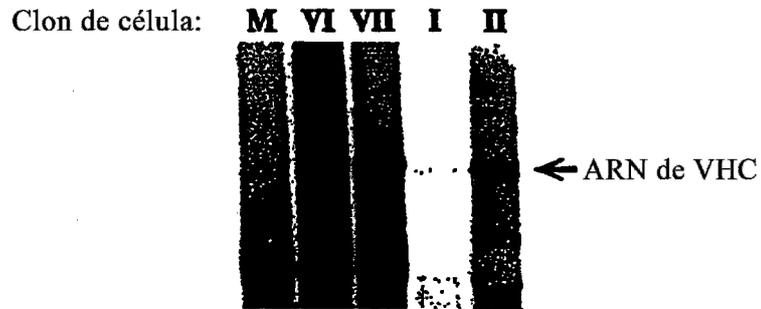


Figura 5

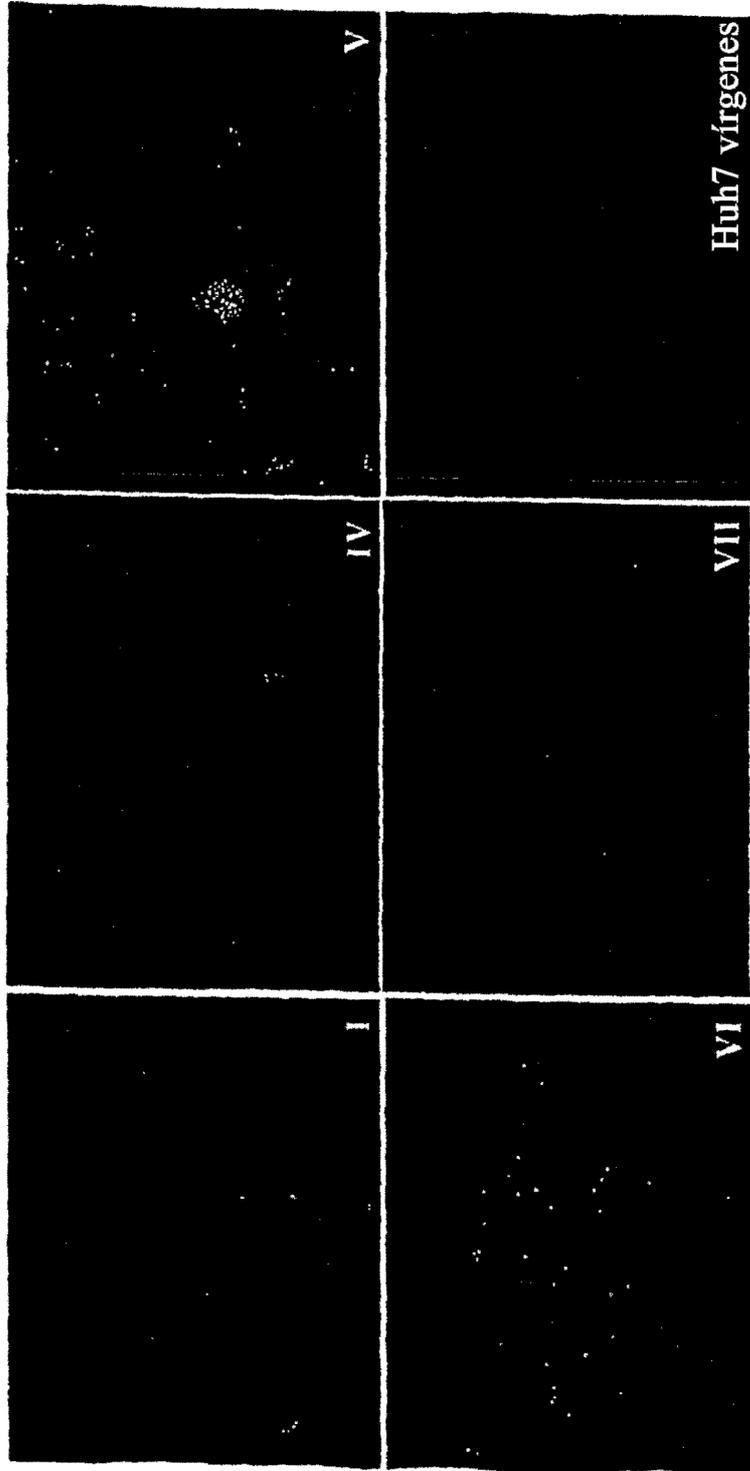
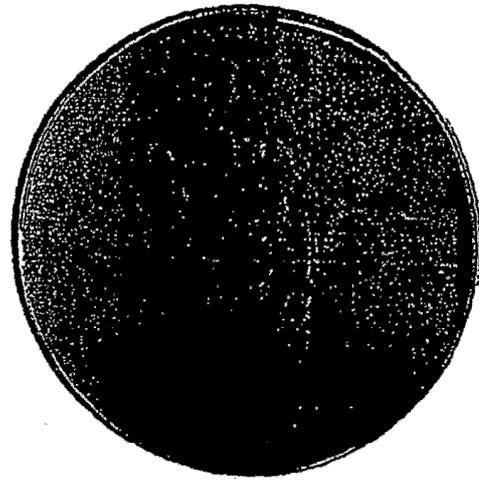


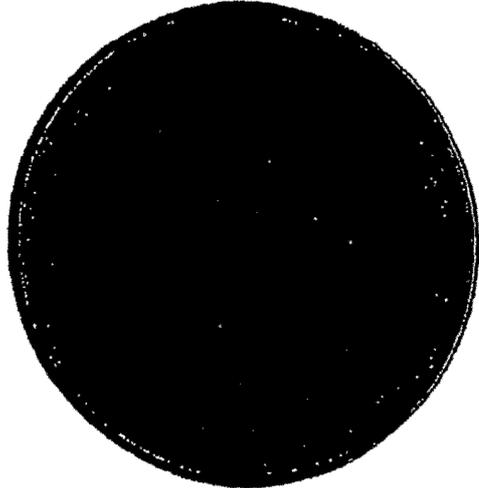
Figura 6

	1163	1182	1229
	ATG ATG Leu Ala Arg Gly Ser Pro Pro Ser Leu Ala Ser Ser Ala Ser Gln Leu Ser Asp		
	CGT AGG CTG GCC AGG GGA TCT CCC CCC TCC TCC TTG GCC AGC TCA TCA GCT AGC CAG CTG TCT		GAC
I
	Gly		TYR
II GGC	Δ47aa
III	Pro CCC
IV	Cys TGC
V	Ser TCC
VI/VII	Ile ATC

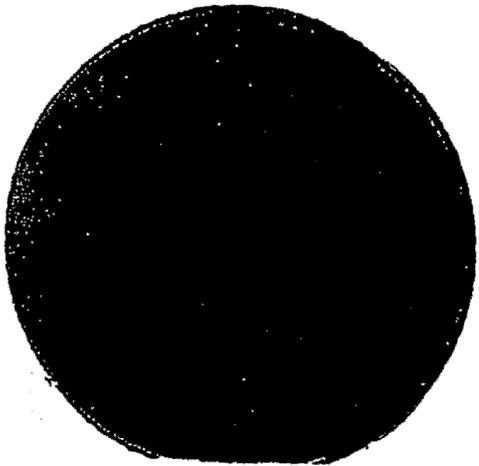
Figura 7



pol-



Variante I



HCVrepBartMan/AvaII

Figura 8

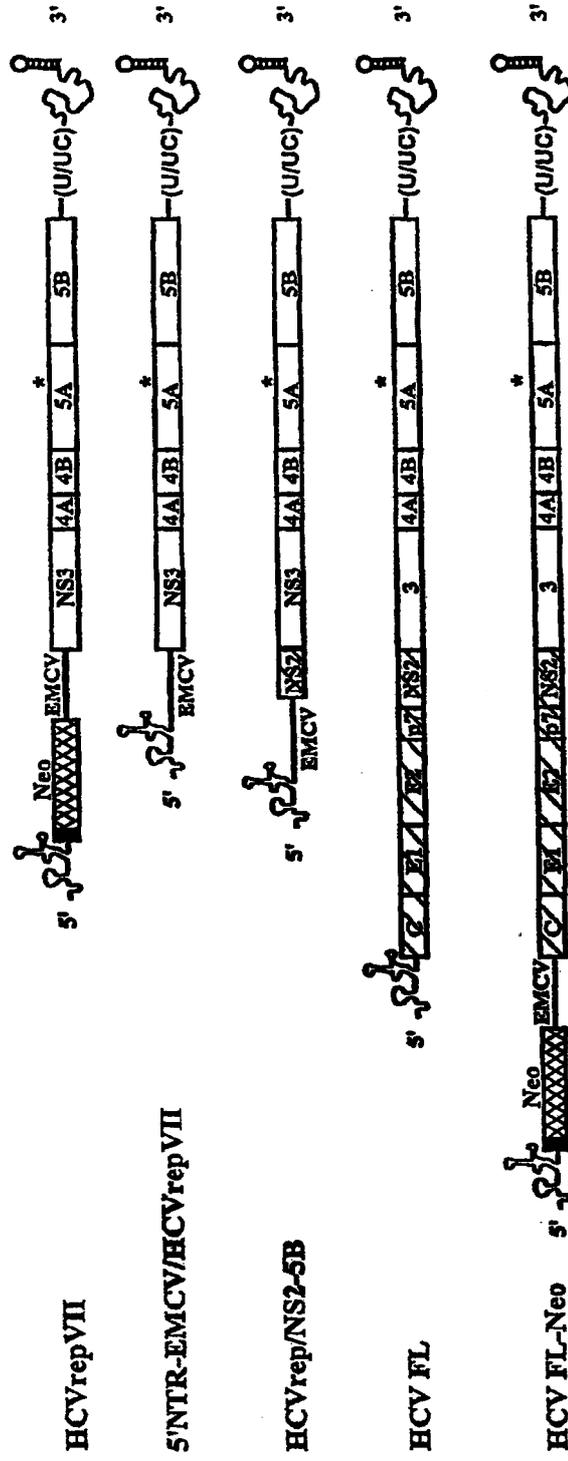


Figura 9

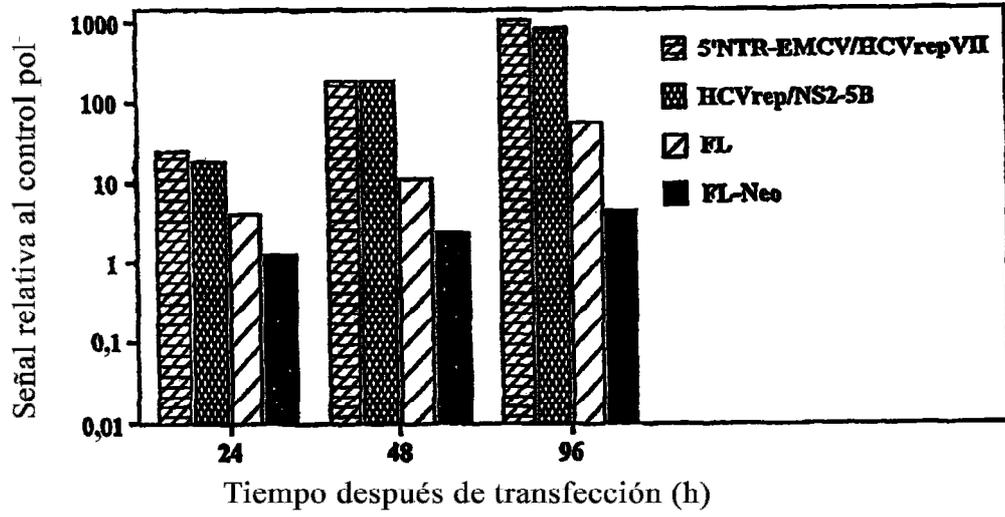


Figura 10