

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 546 190**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/70** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

**C07K 14/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.10.2009 E 09740083 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.06.2015 EP 2342363**

54 Título: **Método para determinar mutaciones de resistencia a fármacos en cualquiera de las regiones de proteína no estructural NS3 a NS5B del virus de la hepatitis C (HCV) para los genotipos 1 a 6**

30 Prioridad:

**06.10.2008 EP 08165949**

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

**21.09.2015**

73 Titular/es:

**JANSSEN DIAGNOSTICS BVBA (100.0%)  
Turnhoutseweg 30  
2340 Beerse, BE**

72 Inventor/es:

**STUYVER, LIEVEN JOZEF;  
KOLETZKI, DIANA;  
BERKE, JAN MARTIN;  
VANDENBROUCKE, INA ISABEL y  
VIJGEN, LEEN ROGER**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 546 190 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

Método para determinar mutaciones de resistencia a fármacos en cualquiera de las regiones de proteína no estructural NS3 a NS5B del virus de la hepatitis C (HCV) para los genotipos 1 a 6

5 La presente invención se refiere a un método para determinar mutaciones de resistencia a fármacos en cualquiera de las regiones de proteína no estructural NS3 a NS5B del virus de la hepatitis C (HCV) para los genotipos 1 a 6, más en particular para los genotipos específicos de subtipo 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 4a y 4d.

10 El HCV es un virus de ARN de cadena positiva monocatenario, con un genoma de aproximadamente 9.600 bases que pertenece a la familia *Flaviviridae* de virus del género hepacivirus. La región NS5B del poligen de ARN codifica un ARN de 65 kDa dependiente de ARN polimerasa (RdRp), que es esencial para la replicación viral. Después de la infección aguda inicial, la mayoría de los individuos infectados desarrolla hepatitis crónica porque HCV se replica preferentemente en hepatocitos pero no es directamente citopático. En particular, la ausencia de una respuesta vigorosa de linfocitos T y la alta propensión del virus a mutar parecen promover una alta tasa de infección crónica. La hepatitis crónica puede progresar hasta fibrosis hepática, conduciendo a cirrosis, enfermedad hepática de fase final, y HCC (carcinoma hepatocelular), haciendo que sea la causa principal de trasplantes de hígado.

20 La transmisión de HCV puede suceder a través de contacto con sangre o productos sanguíneos contaminados, por ejemplo después de transfusión sanguínea o uso de fármacos intravenosos. La introducción de ensayos de diagnóstico usados en exploración de sangre ha conducido a una tendencia descendente en la incidencia de HCV post-transfusión. Sin embargo, dada la lenta progresión hasta la enfermedad hepática de fase final, las infecciones existentes continuarán presentando una carga médica y económica importante durante décadas.

25 Existen seis genotipos principales de HCV y más de 50 subtipos, que están distribuidos geográficamente de forma diferente. El HCV de genotipo 1 es el genotipo predominante en Europa y los Estados Unidos. La extensiva heterogeneidad genética de HCV tiene implicaciones clínicas y de diagnóstico importantes, que quizá explican las dificultades en el desarrollo de vacunas y la ausencia de respuesta a las terapias actuales.

30 La variabilidad genética de HCV complica los procesos de amplificación, secuenciación y genotipado. Estos procesos dependen del uso de los llamados cebadores complementarios a y capaces de hibridar con secuencias correspondientes de ácido nucleico del genoma de HCV. Debido al alto grado de variabilidad del genoma de HCV, los cebadores complementarios a una especie de HCV pueden no ser complementarios para otra especie.

35 Para determinar el subtipo de un aislado clínico de HCV un método preciso y directo es secuenciar el genoma viral en una región que es suficientemente divergente entre diversas especies para distinguir entre genotipos y subtipos de HCV consecuentemente. Se usa el análisis filogenético de las secuencias generadas a partir de estas regiones para determinar el subtipo de aislados clínicos.

40 Actualmente se están evaluando varios fármacos antivirales selectivos y potentes contra infección por virus de la hepatitis C crónica (HCV) en ensayos clínicos. La aparición de mutaciones de resistencia a fármacos se demostró en ensayos previos, creando una necesidad de controlar a los pacientes para el desarrollo de dichas mutaciones de resistencia a fármacos.

45 Para mejorar la identificación de los tipos y subtipos de HCV con fines de análisis clínico y la toma de decisiones terapéuticas por un médico asistente, sigue existiendo una necesidad continuada de mejorar los ensayos de HCV basados en secuenciación.

50 El virus de la hepatitis C está clasificado actualmente, como se ha mencionado anteriormente, en al menos 6 genotipos principales (Fig. 1). Cada genotipo difiere de los otros en un 30% a un 35% a nivel de nucleótidos y puede dividirse adicionalmente en varios subtipos con diversidad de secuencia típicamente entre el 20% y el 25% (Simmonds et al., *Hepatology* 2005; 42(4), 962-973).

55 La presente invención se refiere al desarrollo de ensayos específicos de subtipo para el análisis de resistencia del genotipo de HCV adecuado para ensayos clínicos y documentos reguladores.

60 En más detalle, la invención se refiere a ensayos de genotipado que cubren la región codificante completa desde NS3 hasta NS5B desarrollados en un gran panel de muestras clínicas incluyendo protocolos para los subtipos 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 4a y 4d.

La presente invención se refiere a un ensayo de subtipado basado en secuencia de NS5B que detecta los seis genotipos de HCV y discrimina entre los diferentes subtipos.

65 Un aspecto de la invención se refiere a un método para determinar mutaciones de resistencia a fármacos en cualquiera de las regiones de proteína no estructural NS3 a NS5B del virus de la hepatitis C (HCV) para los genotipos 1 a 6, más en particular para los genotipos específicos de subtipo 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 4a y 4d, presentes en

una muestra que comprende:

- a) obtener dicha muestra de un paciente,
- b) extraer el material genético viral de dicha muestra,
- c) amplificar la región NS5B de HCV para generar un amplicón de ADN de 388 pares de bases usando cebadores que tienen las secuencias seleccionadas entre el grupo que consiste en las SEC ID N° 1-5,
- d) secuenciar el amplicón para obtener una secuencia de 329 pares de bases usando las secuencias seleccionadas entre el grupo que consiste en las SEC ID N° 3-5,
- e) realizar análisis de árboles filogenéticos usando la información de secuencia de 329 pares de bases de NS5B para obtener información del subtipo de HCV en dicha muestra del paciente,
- f 1) usar cebadores específicos de subtipo que tienen las secuencias seleccionadas entre el grupo que consiste en las SEC ID N° 6-9, 42-45, 104-107, 120-123, 145-148 ó 180-183 para la generación de un amplicón de ADN que comprende la proteína no estructural NS3 (181 aminoácidos N-terminales),
- g 1) secuenciar el amplicón de NS3 para obtener una secuencia de 543 pares de bases usando las secuencias seleccionadas entre el grupo que consiste en las SEC ID N° 8 y 9; 43 y 45-46; 104 y 106; 120 y 122; 146 y 148 ó 180 y 182
- o
- f 2) usar cebadores específicos de subtipo que tienen las secuencias seleccionadas entre el grupo que consiste en las SEC ID N° 13-16, 54 y 59-66, 124-133, 158 y 160-168 ó 194-197 para la generación de un amplicón de ADN que comprende la polimerasa NS5B,
- g 2) secuenciar el amplicón de la polimerasa NS5B para obtener una secuencia de 1776 pares de bases usando las secuencias seleccionadas entre el grupo que consiste en las SEC ID N° 15-16 y 87-92; 54, 59 y 61-66; 124 y 127-133; 158-159, 161 y 163-168 ó 197-204
- o
- f 3) usar cebadores específicos de subtipo que tienen las secuencias seleccionadas entre el grupo que consiste en las SEC ID N° 30-33, 67-70, 93-96, 108-111, 134-137 ó 169-172 para la generación de un amplicón de ADN que comprende NS3/4A,
- g 3) secuenciar el amplicón de la proteasa NS3/4A para obtener una secuencia de 2055 pares de bases usando las secuencias seleccionadas entre el grupo que consiste en las SEC ID N° 34-41; 68 y 71-77; 95 y 97-103; 112-119; 136 y 138-144 ó 171 y 173-179
- o
- f 4) usar cebadores específicos de subtipo que tienen las secuencias seleccionadas entre el grupo que consiste en las SEC ID N° 47-50, 78-81, 149-151 y 159 ó 184-187 para la generación de un amplicón de ADN que comprende NS4B/5A,
- g 4) secuenciar el amplicón de NS4B/5A para obtener una secuencia de los dos genes NS4B y NS5A usando las secuencias seleccionadas entre el grupo que consiste en las SEC ID N° 51-57; 79 y 81-87; 152-159 ó 185 y 187-193;
- h) alinear la secuencia obtenida en la etapa (g 1), (g 2), (g 3) o (g 4) con una secuencia de HCV de referencia o de tipo silvestre,
- i) determinar una o más mutaciones de resistencia a fármacos en el material genético viral presente en la muestra del paciente.

Otra realización de la presente invención es que el método anterior comprende adicionalmente las etapas de realizar un ensayo de fenotipado de NS3 por

- j) generación de un amplicón de NS3 partiendo del amplicón de ADN que comprende el NS3 (181 aminoácidos N-terminales) obtenido en la etapa (f 1) de la reivindicación 1 usando cebadores que tienen la secuencia de las SEC ID N° 11 y 12,
- k) inserción, por clonación mediante InFusion™ o recombinación in vitro, de dicho amplicón obtenido en la etapa j) en un vector lanzadera que contiene marcador de replicación incompetente con NS3 delecionado que tiene la secuencia de las SEC ID N° 10 para obtener un replicón de HCV recombinante competente en replicación de NS3,
- l) generación de ARN, por transcripción in vitro, a partir de dicho replicón de HCV obtenido en la etapa (k)
- m) transfección de dicho ARN en células adecuadas,
- n) determinación, en base a la expresión del gen marcador, del valor de CE<sub>50</sub> y/o el cambio factorial como una medida para la presencia de mutaciones de resistencia a fármacos en una muestra.

En otra realización, la invención se refiere al método mencionado anteriormente que comprende adicionalmente las etapas de realizar un ensayo de fenotipado de NS5B por

- o) generación de un amplicón de NS5B partiendo del amplicón de ADN que comprende el NS5B obtenido en la etapa (f 2) de la reivindicación 1 usando cebadores que tienen la secuencia de las SEC ID N° 28 y 29,
- p) inserción, por recombinación in vitro, de dicho amplicón obtenido en la etapa (o) en un vector lanzadera que contiene marcador de replicación incompetente con NS5B delecionado que tiene la secuencia de las SEC ID N° 21 o SEC ID N° 27 para obtener un replicón de HCV recombinante competente en replicación de NS5B,
- q) generación de ARN, por transcripción in vitro, a partir de dicho replicón de HCV obtenido en la etapa (p)
- r) transfección de dicho ARN en células adecuadas,
- s) determinación, en base a la expresión del gen marcador, del valor de CE<sub>50</sub> y/o el cambio factorial como una medida para la presencia de mutaciones de resistencia a fármacos en una muestra.

También se describe un vector que comprende el genoma de HCV y una delección que abarca la región de 181 aminoácidos N-terminal de NS3 de HCV, en particular el vector pFK I341 PI luc  $\Delta$ NS3 7-192\_ET (SEC ID N° 10) y un vector que comprende el genoma de HCV y una delección que abarca la región NS5B de HCV, en particular el vector pFK\_I341\_PI\_NS3-3\_ET\_dNS5a/b\_5a440-5b591-Scal (SEC ID N° 21) y el vector que comprende el genoma de HCV y una delección que abarca la región NS5B de HCV, en particular el vector pFK\_I341\_PI\_NS3-3\_ET\_dNS5a/b\_5a440-5b591-Xbal (SEC ID N° 27).

Además del uso de cualquiera de los vectores anteriores en cualquiera de los métodos mencionados, se describen los cebadores con las SEC ID N° 1-5 para la amplificación de la región NS5B de HCV, obtenida de una muestra de un paciente infectado con HCV.

También se describe el uso de los cebadores con las SEC ID N° 1-5 para la preparación de un ensayo para subtipado de HCV basado en secuencia para detectar los genotipos de HCV 1, 2, 3 y 4 y para discriminar entre los subtipos 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 4a y 4d.

### Explicación de las Figuras.

**Figura 1:** Árbol filogenético de las secuencias completas de fase de lectura abierta de HCV que muestra los 6 genotipos principales y sus subtipos más comunes. (Simmonds et al. 2005 Hepatology 2005; 42(4), 962-973)

**Figura 2:** Sinopsis de amplicones para la plataforma HCV integrada.

**Figura 3:** Estado del desarrollo de los ensayos de subtipado y genotipado específico de subtipo de HCV y sus características de rendimiento.

Los números en paréntesis muestran la cantidad de muestras ensayadas.

**Figura 4:** Vector pFK I341 PI luc  $\Delta$ NS3 7-192\_ET (SEC ID N° 10)

**Figura 5:** Sinopsis del proceso.

Se recogió un panel de 603 muestras clínicas que cubren los seis genotipos (G). Se desarrollaron dos sistemas de ensayo: un ensayo de subtipado basado en secuencia de NS5B y una serie de ensayos de genotipado específico de subtipo para determinar mutaciones de resistencia a fármacos en las siguientes regiones diana: (1) inhibidores de proteasa (NS3/4A completo y los 181aa N-terminales de NS3), (2) inhibidores de polimerasa (NS5B completo), y (3) otros (región NS4B/5A completa). Todas las series de cebadores se han optimizado para la especificidad de subtipo y para permitir el uso del mismo protocolo de PCR para una región diana independiente del subtipo (Figura 2). Todos los métodos y protocolos se optimizaron y validaron para soportar un procesamiento de alto rendimiento de los ensayos de resistencia genotípica en un entorno operativo rutinario.

El ensayo de subtipado basado en secuencia de NS5B se ensayó en una serie de 603 muestra clínicas que contenían los seis genotipos con una sensibilidad clínica (tasa de éxito de amplificación de muestras de alta carga viral) del 91%.

Para los ensayos de genotipado específico de subtipo, se ensayaron series de muestras clínicas de, en promedio, n=94 para G1a/b, n=16 para G2a/b, n=76 para G3a, y n=83 para G4a/d en los diferentes ensayos para evaluar la sensibilidad clínica. Se consiguieron tasas de éxito de amplificación de entre el 90% y el 100%, y tasas de éxito de secuenciación de entre el 95% y el 100% (Figura 3).

### Sección de ejemplos

#### Resumen general:

El flujo general del proceso se visualiza en la Figura 5. Comienza con la determinación del subtipo de HCV de una muestra clínica (Subtipado). Esta información de subtipo se usa después en el posterior proceso de genotipado para seleccionar los cebadores específicos de subtipo apropiados para la amplificación y secuenciación de la región diana de interés. El resultado final del proceso de genotipado es la información de la secuencia de nucleótidos y aminoácidos de esa región. Por comparación con una secuencia viral de tipo silvestre o de referencia se proporciona información acerca de la existencia de cambios de aminoácidos. Se usarán los productos de PCR del proceso de genotipado en el proceso de fenotipado para generar replicones subgenómicos quiméricos para la evaluación de susceptibilidad a fármacos. Los resultados del fenotipado son valores de CE<sub>50</sub> que pueden usarse para la interpretación de la susceptibilidad a fármacos (es decir, calculando los valores de cambio factorial de CE<sub>50</sub>) del aislado clínico. Puede compararse la información de secuencia de la región diana y la susceptibilidad a fármacos.

#### 1. Subtipado

Se generó un amplicón a partir del ARN plasmático viral derivado de pacientes por RT-PCR de una etapa seguido por PCR anidada. Este amplicón, mencionado adicionalmente como el amplicón de subtipado de NS5B, contiene una secuencia de 329 pb del dominio de polimerasa NS5B, que se usa para el análisis de árboles filogenéticos para obtener información del subtipo del aislado clínico. El ensayo se llama el **ensayo de subtipado basado en**

**secuencia de NS5B.** La información de subtipo del aislado clínico se usará en una siguiente etapa para seleccionar los cebadores apropiados de amplificación específica de subtipo y secuenciación para obtener información de secuencia de la región de interés en el ensayo de genotipado.

5 2. Genotipado

Usando cebadores específicos de subtipo, se genera un amplicón del dominio de proteasa NS3 del ARN plasmático viral derivado del paciente por RT-PCR de una etapa seguido por PCR anidada. Este amplicón, mencionado adicionalmente como el amplicón de NS3, contiene el dominio catalítico de la proteasa NS3. Este amplicón va a ser secuenciado con cebadores de secuenciación específicos de subtipo en el **ensayo genotípico de proteasa NS3 de HCV.**

Usando cebadores específicos de subtipo, también puede generarse un amplicón de la polimerasa completa NS5B a partir del ARN plasmático viral derivado del paciente por RT-PCR de una etapa seguido por PCR anidada. Este amplicón, mencionado adicionalmente como el amplicón de NS5B, contiene el gen completo de NS5B. Este amplicón va a ser secuenciado con cebadores de secuenciación específicos de subtipo en el **ensayo genotípico de polimerasa NS5B de HCV.**

Puede conseguirse lo mismo usando cebadores específicos de subtipo para otras regiones HCV específicas como NS3/NS4A o NS4B/NS5A y similares.

20 3. Fenotipado

Se ha generado un vector lanzadera incompetente en replicación con NS3 delecionado, mencionado adicionalmente como la estructura delta[NS3], basado en la secuencia con 1b del replicón subgenómico. Se genera el amplicón de NS3, a partir del material derivado del paciente, el ADN plasmídico del replicón, genes sintéticos o productos de PCR del ARN de replicón, por PCR usando el producto de RT-PCR de una etapa del ensayo genotípico de proteasa NS3 de HCV. La clonación por In-Fusion™ (Clontech) del amplicón de NS3 generado por PCR y la estructura delta[NS3] produjo un replicón de HCV recombinante competente en replicación que se usó en experimentos para evaluar la **resistencia fenotípica a fármacos de NS3 de HCV.**

Se ha generado un vector lanzadera incompetente en replicación con NS5B delecionado, mencionado adicionalmente como la estructura delta[NS5B], basado en la secuencia con 1b del replicón subgenómico. Se genera el amplicón de NS5B, a partir del material derivado del paciente, el ADN plasmídico del replicón, genes sintéticos o productos de PCR del ARN de replicón, por PCR usando el producto de RT-PCR de una etapa del ensayo genotípico de polimerasa NS5B de HCV. La clonación in vitro (usando BD In-Fusion™, Clontech Laboratories Inc.) del amplicón de NS5B generado por PCR y la estructura delta[NS5B] produjo un replicón de HCV recombinante competente en replicación que se usó en experimentos para evaluar la **resistencia fenotípica a fármacos de NS5B de HCV.**

40 Ejemplo 1

Ensayo de subtipado basado en secuencia de NS5B

45 A. Extracción de ARN

A partir de un total de 500 µl de plasma, se extrajo el ARN total usando la plataforma de extracción de ARN EasyMAG™ (BioMerieux). Después de elución en 60 µl de tampón de elución, el ARN se almacenó a -80°C hasta su uso para la generación del amplicón.

50 B. RT-PCR de una etapa

Se mezclaron 5 µl de ARN con tampón de reacción 2x, 120 ng/ml de ARNt de levadura (Ambion Inc., Woodward, EE.UU.), cebador NS5Bsubtype\_A (TGGGGTTCGCGTATGATACCCGCTGCTTTGA) (SEC ID N° 1) 0,2 µM, cebador NS5Bsubtype\_B (TGGGGTTTTCTTACGACACCAGGTGCTTTGA) (SEC ID N° 2) 0,2 µM, cebador Pr2 0,2 µM (publicado en Sandres-Saunes et al. 2003) y 0,5 µl de la mezcla enzimática Superscript™ III RT/Platinum Taq High Fidelity del sistema de RT-PCR de una etapa Superscript™ III (Invitrogen) en un volumen total de 25 µl. La síntesis del ADNc se realizó durante 30 min a 52°C seguido por una etapa de desnaturalización a 94°C durante 2 min. El ciclado térmico consistía en 50 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 15 seg, hibridación a 63°C durante 30 seg y elongación a 72°C durante 30 seg. La extensión final tuvo lugar a 72°C durante 5 min. Se usó una alícuota del producto de amplificación resultante para una etapa de PCR anidada.

60 C. PCR interna

65 Para una PCR anidada, se mezclaron 2,5 µl del producto de RT-PCR de una etapa con tampón 2 10x del kit Expand™ High Fidelity (Roche), dNTP 0,35 mM (Promega), cebador NS5Bsubtype\_C

(CCGTATGATACCCGCTGCTTTGACTCAAC) (SEC ID NO: 3) 0,3  $\mu$ M, cebador NS5Bsubtype\_D (TCCTAGGACACCAGGTGCTTTGATTCAAC) (SEC ID N° 4) 0,4  $\mu$ M, cebador NS5Bsubtype\_E (AATTCTGGTCATAGCCTCCGTGAAGACTC) (SEC ID N° 5) 0,4  $\mu$ M y 0,075 U/ $\mu$ l de ADN polimerasa (Roche, Basilea, Suiza) para dar un volumen total de 50  $\mu$ l. La desnaturalización inicial fue a 94°C durante 2 min y el ciclado térmico consistió en 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 15 seg, hibridación a 56°C durante 30 seg y elongación a 72°C durante 30 seg. La extensión final tuvo lugar a 72°C durante 5 min. Los amplicones se purificaron usando el kit de purificación de PCR QIAquick 96 (Qiagen). El volumen final de los amplicones purificados fue de 100  $\mu$ l.

#### 10 D. Análisis de secuencia sin procesar

La reacción de secuenciación se realizó de acuerdo con procedimientos convencionales usando los cebadores de la PCR anidada para secuenciar ambas direcciones, directa e inversa. Se recuperaron los electroferogramas del secuenciador capilar ABI3730 y se importaron a Seqscape v2.5 (Applied Biosystems). Los extremos de las secuencias se recortaron en base a valores de calidad y la longitud de 329 pb de la secuencia de referencia de subtipo; abarcando la última las regiones entre los cebadores de amplificación. No se permitió que aparecieran inserciones, deleciones o codones de parada en las secuencias.

#### 20 E. Análisis de árboles filogenéticos

Se combinaron las secuencias de muestra con una longitud de 329 pb con secuencias de referencia de subtipo en BioEdit (Ibis Therapeutics; fuente pública, internet: [www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html](http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html)) y posteriormente se analizaron en MEGA v3.1 (fuente pública, internet: <http://www.megasoftware.net/>) usando el árbol de Neighbour-Joining y el modelo de distancia de Jukes-Cantor.

25

#### **Resultados:**

##### **Secuencias de subtipado de NS5B de pacientes infectados con HCV-1b:**

30 &gt;Subtipado de NS5B Pt 1

AGTCACCGAGAATGATATCCGTGTTGAGGAGTCAATTTACCAATGCTGTGACTTGGCCCCGAAGCCAAACAGG  
 CCATAAGGTCGCTCACAGAGCGGCTTTAYATCGGGGGTCCCCTGACTAATTCAAAAGGGCAGAAGCTGCGGTTAT  
 CGCCGGTGCCGCGCGAGCGGCGTGCTGACGACCAGCTGCGGTAATACCCTCACCTGTTACTTGAAGGCCACC  
 GCGGCCTGTGAGCTGCAAAGCTCCAGGACTGCACGATGCTCGTGTGCGGGGACGACCTTGTGCTTATCTGTG  
 35 AAAGCGCGGGAACCCAAGAGGACGCGGCGAACCTAC

> Subtipado de NS5B Pt 2

TGTCACYGAGAGTGACATCCGYGTTGAGGAGTCAATCTACCAATGTTGTGACTTGGCCCCGAAGCCAGACAGG  
 CCATAAAGTCGCTCACAGAGCGGCTTTAYATCGGGGGTCCCGTGACTAAYTCAAAGGRCAGAAGCTGCGGYTAT  
 40 CGCCGGTGCCGCGCGAGCGGCGTGCTGACGACTAGGTGCGGYAACACCCTCACMTGTTACTYGAAGGCCTCT  
 GCAGCCTGTGAGCTGCRAAGCTCCAGGACTGCACGATGCTCGTGTGCGGGGACGACCTTGTGCTTATCTGCG  
 AGAGTGCTGGGACCCAGGAGGACGYGGCGAGCCTAC

> Subtipado de NS5B Pt 3

GGTCACTGAGAATGACATTCGTGTGAGGAGTCGATCTACCAATGCTGTGACTTGGCCCCGAAGCCAGACARG  
 CCATAAGGTCGCTCACGGAGCGGCTTTATATCGGGGGTCCCCTGACTAATTCAAAAGGGCAGAAGCTGCGGTTAT  
 45 CGCCGGTGCCGCGCGAGCGGCTGACTGACGACCAGCTGTGTAATACCCTCACATGTTACTTGAAGGCCTCTG  
 CGGCCTGTGAGCTGCCAAGCTCCAGGACTGCACGATGCTCGTGAACGGAGACGACCTTGTGCTTATCTGTGA  
 GAGCGCGGGAACCCAARAGGACGACGCGAACCTAC

50

> Subtipado de NS5B Pt 4

RGTCAGCGAGAGKGACATCCGTGTTGAGGAGTCRATYTACCAATGTTGTGACTTGGCCCCGAAGCCAGACAG  
 GCCATAAAGTCGCTCACRGAGCGGCTCTATATCGGGGGCCCCCTGACTAATTCAAAAGGGCAGAAGCTGCGGTTA  
 TCGCCGGTGCCGCGCCAGGGGCGTRCTGACGACCAGCTGCGGTAATACCCTCACATGTTACTTGAAGGCCTCT  
 55 GCGGCCTGTGAGCTGCAAAGCTCCAGGACTGCACGATGCTTGTGTGYGGAGACGACCTYGTGCTTATCTGTG  
 AGAGCGCGGGGACCCAGGAGGACGCGGCGAGCCTAC

> Subtipado de NS5B Pt 5

GGTCACTGAGAGTGAYATCCGTGTYGAGGAGTCAATATACCAATGTTGTGACTTGGCCCCGAAGCCAGACAGG  
 CCATAAAGTCGCTCACAGAGCGGCTCTATGTTGGGGTCCCCTGACTAAYTCAAAGGGCAGAAGCTGCGGTTAT  
 60 CGCCGGTGCCGCGCCAGCGGCGTGCTGACGACCAGCTGCGGTAATACCCTCACTTGTACTTGAAGGCCTCTG  
 CRGCCTGTGAGCTGCGAAGCTCCAGGACTGCACGATGCTCGTGTGTGGAGACGACCTTGTGCTTATCTGCGA  
 AAGCGCGGGAACCCAGGAGGACGCGGCGAGCCTAC

65

> Subtipado de NS5B Pt 12

AGTCACTGAGAGTGACATCCGCGTTGAGGAGTCAATCTACCAATGTTGTGACTTGGCCCCCGAAGCCAAACAGG  
 CCATAAAGTTCGCTCACAGAGCGGCTTTACATCGGGGGTCCCCTGACTAATTCAAAGGGCAGAACTGCGGCTAT  
 5 CGCCGGTGCCGCGCCAGCGGGCTACTGACGACCAGCTGTGGTAATACCCTCACATGTTACTTGAAGCCTCTG  
 CGGCCTGTGAGCTGCAAAGCTCCAGGACTGCACGATGCTCGTGTGCGGAGACGACCTTGTCTGTTATCTGTGA  
 GAGCGCGGGAACCCAGGAGGACGCGGCGAGCCTAC

> Subtipado de NS5B Pt 13

GGTCACTGAGAGTGATATCCGTAAGTACTGAGGAGTCTATTTACCAATGTTGTGACTTGGCCCCCGAAGCTAGACAAG  
 10 TCATAAAGTTCGCTCACAGAGCGGCTTTAYATYGGGGGGTCCCCTGACTAATTCAAAGGGCAGAACTGCGGTTAT  
 GGCCGGTGCCGYGCGAGCGGGCTGCTGACGACTAGCTGCGGTAATACCCTCACATGTTACTTGAAGCCTCTG  
 CGGCCTGTGAGCTGCAAAGCTCCGGGACTGCACGATGCTCGTGTGCGGAGACGACCTCGTCTGTTATCTGTGA  
 AAGCGCGGGGACCCAGGAGGACGCGGCTAGCCTAC

> Subtipado de NS5B Pt 14

AGTCAACGAGAATGATATCCGTGTTGAGGAGTCAATTTACCAATGCTGTGACTTGGCCCCCGAAGCCAAACAGG  
 15 CCATAAAGTTCGCTCACAGAGCGGCTTTAYATCGGGGGTCCCCTGACTAATTCAAAGGGCAGAACTGCGGTTAT  
 CGCCGGTGCCGCGCGAGCGGGCTGCTGACGACCAGCTGCGGTAATACCCTCACCTGTTACTTGAAGGCCACC  
 GCGGCCTGTGAGCTGCAAAGCTCCAGGACTGCACGATGCTCGTGTGCGGGGACGACCTTGTCTGTTATCTGTG  
 20 AAAGCGCGGGAACCCAAGAGGACGCGGCGAACCTAC

> Subtipado de NS5B Pt 15

GGTCACYGAGAGYGACATCCGTAAGTACTGAGGAGTCAATTTACCAATGTTGTGACTTGGCCCCCGAAGCCAGACAGG  
 25 TTATAAAGTTCGCTCACAGAGCGGCTTTATATCGGGGGTCCCTYTACTAATTCAAAGGGCAGAACTGCGGCTAT  
 CGCCGGTGTCGCGCAAGCGGGCTGCTGACGACCAGCTGCGGCAATACCCTCACATGTTACTTGAAGGCCACTG  
 CAGCCTGTGAGCTGCGAAGCTCCAGGACTGCACAATGCTTGTGTGTGGGGACGACCTTGTCTGYATCTGTGA  
 GAGCGCGGGGACCCAAGAGGACGCGAGCGAGCCTAC

> Subtipado de NS5B Pt 16

GGTCACTGAGAATGACATYCGTGTGAGGAGTCAATTTACCAATGTTGTGACTTGGCYCCCGAAGCCAGACAGG  
 30 YCATAAAGTTCGCTCACAGAGCGGCTTTAYATCGGGGGTCCYCTAACCAATTCAAAGGGCAAACCTGCGGTTAT  
 CGCCGGTGTCGCGCRAGCGGGCTGCTGACGACTAGCTGCGGCAAYACCCTTACATGTTACTTGAARGCCTCTG  
 CRGCCTGTGAGCTGCGAAGCTCCAGGACTGCACGATGCTCGTGTGCGGAGACGACCTCGTCTGTTATCTGTGA  
 35 GAGCGCGGGGACCCACGAGGATGCGGCGAGCCTAC

Estas secuencias se subtiparon usando análisis filogenético. La Tabla 1 muestra el resultado.

Tabla 1

| ID de muestra | Secuencia de NS5B basada en información de subtipo después de análisis filogenético |
|---------------|---|
| Pt 1          | 1b  |
| Pt 2          | 1b  |
| Pt 3          | 1b  |
| Pt 4          | 1b  |
| Pt 5          | 1b  |
| Pt 12         | 1b  |
| Pt 13         | 1b  |
| Pt 14         | 1b  |
| Pt 15         | 1b  |
| Pt 16         | 1b  |

40 En base a la información de subtipo basada en secuencia de NS5B, se seleccionaron los cebadores específicos de subtipo apropiados para la amplificación del dominio de proteasa NS3.

**Ejemplo 2**

45 **Ensayo de genotipado de NS3 de HCV**

A. RT-PCR de una etapa

50 Se mezclaron cinco µl de ARN con tampón de reacción 2x, 120 ng/ml de ARNt de levadura, cebador directo 1b-NS3\_out\_F (GCGTGTGGGGACATCATCTTAGG) (SEC ID N° 6) 0,2 µM, cebador 1b\_NS3\_out\_R (GCTGCCAGTGGGAGCGTG) (SEC ID N° 7) y 0,5 µl de la mezcla de enzimas Superscript™ III RT/Platinum Taq High Fidelity del sistema de RT-PCR de una etapa Superscript™ III (Invitrogen) en un volumen total de 25 µl. La síntesis de ADNc se realiza durante 30 min a 52°C seguido de una etapa de desnaturalización a 94°C durante 2 min.

El ciclado térmico consistió en 50 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 15 s, hibridación a 58°C durante 30 s y elongación a 72°C durante 1 min. La extensión final tuvo lugar a 72°C durante 5 min. Se usó una alícuota del producto de amplificación resultante para una etapa de PCR anidada.

5 B. PCR interna

Para la PCR anidada, se mezclaron 2,5 µl del producto de RT-PCR de una etapa con tampón 2 10x del kit Expand™ High Fidelity (Roche), dNTP 0,35 mM (Promega), cebador 1b\_NS3\_in\_F (TCATCTTAGGCCTGCCGTCTC) (SEC ID N° 8) 0,4 µM, cebador 1 b\_NS3\_in\_R (GGGAGCGTGTAGATGGGCCAC) (SEC ID N° 9) 0,4 µM y 0,075 U/µl de ADN polimerasa Expand™ High Fidelity (Roche) para dar un volumen total de 50 µl. La desnaturalización inicial fue a 94°C durante 2 min y el ciclado térmico consistió en 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 15 s, hibridación a 58°C durante 30 s y elongación a 72°C durante 1 min. La extensión final tuvo lugar a 72°C durante 5 min. Los amplicones se purificaron usando el kit de purificación de QIAQuick 96 PCR (Qiagen). El volumen final de los amplicones purificados fue 100 µl.

15 C. Análisis de secuencia sin procesar

La reacción de secuenciación se realizó de acuerdo con procedimientos convencionales usando los cebadores de la PCR anidada para secuenciar en ambas direcciones, directa e inversa (SEC ID N° 8-9). Se recuperaron los electroferogramas del secuenciador capilar ABI3730 y se importaron en Seqscape v2.5 (Applied Biosystems). Los extremos de las secuencias se recortaron en base a valores de calidad y la longitud de 543 pb (secuencia codificante para los 181 aa N-terminales de NS3) de la secuencia de referencia de subtipo; abarcando la última las regiones entre los cebadores de amplificación. No se permitió que aparecieran inserciones, deleciones o codones de PARADA en las secuencias.

25 Resultado:

Secuencias de proteasa NS3 de cinco (5) aislados de HCV-1b de pacientes

30 >NS3 Pt 1  
 GCGCCTATCACGGCCTACGCCARCAAACACGGGGCTTGTGGCTGTAT  
 CATCACTAGCCTCACAGGCCGGGACAAGAACCAGGTCGAGGGGGAGGTC  
 CAAGTGGTTTCCACCGCCACACAATCTTCTGGCGACCTGTGTCAACGG  
 TGKTGTTGGACTGTCTTCCACGGCGCCGGTCAAAGACCCTGGCTGGCC  
 35 CAAAGGGYCCAATCACCCAAATGTACACCAATGTAGACCAGGACCTCGTC  
 GGCTGGCCGGCCCCCYGGGGCGCGCTCTTRACACCATGCACCTGTG  
 GCAGCTCGGACCTTTACTTGGTCACGAGGCATGCTGATGTTATCCCGGTG  
 CGCCGGCGGGGCGACAGTAGGGGRAGCCTACTCTCCCCAGGCCTGTG  
 TCCTACTTAAAGGCTCTTCGGGTGGWCCRCTGCTCTGCCCTCGGGG  
 40 ACGCTGTGGGCGTCTTCCGGGCTGCTGTGTGCACCCGGGGGTGCGGA  
 AGGCGGTGGACTTTGTACCCGTAGAGTCTATGGAGACTACCATGCGGTCC

>NS3 Pt 2  
 GCGCCCATCACGGCCTACGCCAACARACGAGGGGCTACTTGGCTGTA  
 45 TCATCACCAGCTCACAGGCCGGGACAAGAACCAGGTYGAGGGGGAGGT  
 TCAGGTGGTCTCCACTGCAACACAGTCCTTCTGGCRACTTGCATCAACG  
 GCGTGTGTTGGACTGTCTTTCATGGAGCCGGCTCTAAGACCCTAGCCGGC  
 CCAAAGGGGCCGATCACCCAGATGTACACCAATGTAGACCAGGACCTCGT  
 CGGCTGGCAAGCGCCCCYGGGGCGCGTTCCTTGACACCGTGCAGCTGC  
 50 GGCAGCTCGGACCTTTACTTGGTCACGAGGCATGCGGATGTCATTCCGGT  
 GCGCCGGCGAGGTGACAGCAGGGGGAGCTTGTCTCCCCCGGCCAT  
 TTCYACTTAAAGGCTCTTCCGGGTGGTGCRTYTGCTCTGCCCTCGGGG  
 ACGCYGTGGGCATCTTCCGGGCTGCCGTGTGCACYGGGGGGTTGCCAA  
 GGCRGTGGATTTTGTACCCGTTGAGTCTATGGAACTACYATGCGGTCC

>NS3 Pt 3  
 GCGCCTATTACGGCCTACGCCAACAGACGAGGGGCTATTAGGCTGCA  
 TCATCACTAGCCTCACAGGCCGAGACAAGAACCAGGTCGAGGGGGAGGT  
 TCAGGTGGTTTCTACCGCAACACAATCTTCTAGCGACTTTCGTCAACG  
 60 GCGTGTGTTGGACTGTCTATCATGGCGCCGGCTCTAAGACCTTAGCCGGC  
 CCAAAGGGGCTGTACCCAAATGTACACCAATGTAGACCAAGACCTCGT  
 CGGCTGGCCAGCGCCCCCGGGCGCGTTCCTTGACACCATGTACTTGC  
 GGCAGTTCCGACCTTTACTTGGTCACGAGACATGCCGATGTCATTCCGGT  
 GCGCCGGCGGGGCGACAGCAGGGGGAGCCTGCTCTCCCCAGGCCTGT  
 65 CTCCTATTTGAAGGCTCTTCCGGGTGGTCCACTGCTCTGCCCTTCAGGGC  
 ACGCCGTGGGCATCTTCCGGGCTGCCGTGTGCACCCGAGGGGTTGCCAA





Los amplicones de NS3 de estos cinco aislados de HCV-1b se usaron adicionalmente en el ensayo de fenotipado del replicón de NS3.

**Ensayo de genotipado de la polimerasa NS5B de HCV**

5 RT-PCR de una etapa:  
 Se mezclaron cinco µl de ARN con tampón de reacción 2x, 120 ng/ml de ARNt de levadura (Ambion Inc.), cebador 1b\_NS5B\_out\_F (TAGAGTCCTGGAAGGACCCGG) (SEC ID N° 13) 0,2 µM, cebador 1 b\_NS5B\_out\_R (GGCCTGGAGTGGTTAGCTCCCC) (SEC ID N° 14) 0,2 µM y 0,5 µl de la mezcla de enzimas Superscript™ III RT/Platinum Taq High Fidelity del sistema de RT-PCR de una etapa Superscript™ III (Invitrogen) en un volumen total de 25 µl. La síntesis de ADNc se realiza durante 30 min a 47°C seguido de una etapa de desnaturalización a 94°C durante 2 min. El ciclado térmico consistió en 50 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 15 s, hibridación a 59°C durante 30 s y elongación a 68°C durante 2 min 30 s. La extensión final tuvo lugar a 68°C durante 5 min. Se usó una alícuota del producto de amplificación resultante para una etapa de PCR anidada.

PCR interna:

20 Para la PCR anidada, se mezclaron 2,5 µl del producto de RT-PCR de una etapa con tampón 1 10x del kit Expand™ Long Template High Fidelity (Roche, Basilea, Suiza), dNTP 0,35 mM (Promega), cebador 1b\_NS5B\_in\_F (TGGAAGGACCCGGACTACG) (SEC ID N° 15) 0,4 µM, cebador 1b\_NS5B\_in\_R (GAGTGGTTAGCTCCCCGTTCA) (SEC ID N° 16) 0,4 µM y 0,075 U/µl de ADN polimerasa Expand™ High Fidelity (Roche,) para dar un volumen total de 50 µl. La desnaturalización inicial fue a 94°C durante 2 min y el ciclado térmico consistió en 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 15 s, hibridación a 59°C durante 30 s y elongación a 68°C durante 2 min 30 s. La extensión final tuvo lugar a 68°C durante 5 min. Los amplicones se purificaron usando el kit de purificación de PCR QIAQuick 96 (Qiagen). El volumen final de los amplicones purificados fue 100 µl.

Análisis de secuencia sin procesar

30 La reacción de secuenciación se realizó de acuerdo con procedimientos convencionales usando 8 cebadores de secuenciación (SEC ID N° 15-16 y 87-92) para cubrir ambas direcciones, directa e inversa. Se recuperaron los electroferogramas del secuenciador capilar ABI3730 y se importaron en Seqscape v2.5 (Applied Biosystems). Los extremos de las secuencias se recortaron en base a valores de calidad y la longitud de 1776 pb (secuencia codificante de la polimerasa NS5B) de la secuencia de referencia específica de subtipo; abarcando la última las regiones entre los cebadores de amplificación. No se permitió que aparecieran inserciones, deleciones o codones de PARADA en las secuencias.

Resultado:

Secuencias de polimerasa NS5B de cinco aislados clínicos de HCV-1b

40 >NS5B Pt12  
 TCGATGTCCTACACGTGGACGGGCGCCCTGATCAGCCGTGCGCCGCGG  
 AGGAAAGCAAGCTGCCTATCAATGCATTGAGCAACTCACTGCTGCGTCAC  
 CACAATATGGTTTATGCTACAACATCCCGCAGCGCAAGCCAGCGGCAGAA  
 45 GAAGGTCACCTTTTACAGACTGCAAGTCCTGGACGACCACTACCGGGACG  
 TGCTCAAGGAGATGAAGGCGAAGGCGTCCACAGTTAAGGCTAAGCTTCTA  
 TCTGTAGAGGAAGCCTGTAAGTACTGACGCCCCACATTCGGCCAGATCCAA  
 ATTTGGCTAYGGGGCAAAGGACGTCCGGAACCTATCCAGCAAGGCCGTTA  
 ACCACATCCGCTCCGTGTGGAAGGACTTGCTGGAAGACACTGAGACACCA  
 50 ATTGACACCACCATCATGGCAAAAACGAGGTYTTCTGCGTCCAACCAGA  
 GAAAGGAGGCCGCAAGCCAGCTCGCCTTATCGTGTTCAGACTTGGA  
 GTTCGTGTGTGCGAGAAAATGGCCCTTACGACGTGGTCTCCACTCTTCC  
 TCAAGCCGTGATGGGCTCCTCATATGGATTCCAGTACTGTCTGGACAGC  
 GGGTTGAATTCTGGTGAATGCCTGGAAGTCAAGAAGAACCCTATGGGC  
 55 TTCGCATATGACACCCGCTGTTTTGACTCAACAGTCACTGAGAGTGACATC  
 CGCGTTGAGGAGTCAATCTACCAATGTTGTGACTTGCCCGCCGAAGCCAA  
 ACAGGCCATAAAGTCGCTCACAGAGCGGCTTTACATCGGGGTCCCCTG  
 ACTAATTCAAAGGGCAGAACTGCGGCTATCGCCGGTGCCGCGCCAGCG  
 GCGTACTGACGACCACTGTGGTAATACCCTCACATGTTACTTCAAAGCC  
 60 TCTGCGCCTGTCCAGCTGCAAGGCTCCAGGACTGCACGATGCTCGTGT  
 GCGGAGACGACCTTGTGCTTATCTGTGAGAGCGGGGAACCCAGGAGGA  
 CGGGGCGAGCCTACGAGTCTTACGGAGGCTATGACTAGGTAAGTCCGGC  
 CCCCCGGGGACCCGCCAGCCAGAGTACGACTTGAGGTTGATAACAT  
 CATGCTCCTCAAACGTGTGGTGGCGCACGATGCATCCGGCAAACGGGT  
 65 GTATTACCTACCCGTGACCCACCACCCCTCGCGAGGGCTGCGTGG



ES 2 546 190 T3

CGTGTTGAGGAGTCAATTTACCAATGCTGTGACTTGGCCCCGAAGCCAA  
ACAGGCCATAAGGTCGCTCACAGAGCGGCTTTAYATCGGGGGTCCCCTG  
ACTAATTCAAAAGGGCAGAAGTGCAGGTTATCGCCGGTGCCGCGGAGCG  
5 GCGTGCTGACGACCAGCTGCGGTAATACCCTCACCTGTTACTTGAAGGCC  
ACCGCGGCCTGTCGAGCTGCAAAGCTCCAGGACTGCACGATGCTCGTGT  
GCGGGGACGACCTTGTGTTATCTGTGAAAGCGCGGGAACCCAAGAGGA  
CGCGGCGAACCTACGAGTCTTCACGGAGGCTATGACTAGGTATTCTGGCC  
CCCCGGGGACCCGCCCAACCAGAATACGACTTGGARTTGATAACATCA  
10 TGCTCCTCCAACGTGTCGGTGCAGCAGATGCATCTGGCAAGCGGGTGT  
AYTACCTCACCCGCGACCCACCACCCCTYGCACGGGCTGCGTGGGA  
RACAGCTAGACACACTCCAGTTAACTCCTGGCTAGGCAACATTATCATGTA  
TGCGCCACCTTATGGGCAAGGATGATCCTGATGACTCACTTCTTCTCCAT  
CCTTCTAGCTCAGGAAGAAGCTTAAAAAGCCCTGGATTGYCAAATCTACG  
15 GGGCCTGTTACTCCATTGAGCCACTTGCAGTACCTCAGATCATTGAGGA  
CTCCATGGCCTTAGCGCATTTCCTCCACAGTTACTCTCCAGGTGAGATC  
AATAGGGTGGCTTCATGCCTCAGGAACTTGGGGTACCACCTTGCAGT  
CTGGAGACATCGGGCCAGAAGTGTCCGCGCTAAGCTACTGTGCCAGGGA  
GGGAGGGCCGCACTTGTGGCAGGTACCTCTTCAATTGGGCAGTAAGGA  
20 CCAAGCTTAACTCACTCCAATCCCGGCTGCGTCCCAGTTGGACTTGTCC  
GGCTGGTTCGTTGCTGGGTACAGCGGGGGAGACATATCACAGCCTGT  
CTCGTCCCCGACCCCGCTGGTTCCTGTGGTGCCTACTCCTACTTTCTGTA  
GGGTAGGCATCTACCTGCTCCCCAACCGATGA

>NS5B P15  
25 TCGATGTCCTAYACATGGACAGGCGCCCTGATCACGCCATGCGCCGCGG  
ARGAAAGCAAGCTGCCATCAATGCGTTGAGCAACTCTTTGCTGCGTCAC  
GATAAYATGGTCTACGCCACAACATCCCGCAGCGCAAGCCAGCGGCAGA  
AGAAGGTCACCTTTGAGAGACTGCAGGTCCTGGACGACCACTACCGGGA  
CGTGCTTAAGGAGATGAAGGCGAAGGCGTCCACAGTTAAGGCTAGACTTC  
30 TATCYGTAGAAGAAGCCTGCAAGCTGACGCCCCCACTCAGCCAGATCC  
AAATTTGGCTATGGGGCGAAGGACGTCCGGAACCTATCTAGCAAGGCCGT  
TAACCACATCCGCTCCGTGTGGAAGGACTTGTGGAAGACACTGAAACAC  
CAATCGACGCTACCATCATGGCAAAAAATGAGGTTTTCTGCGTCCAACCA  
GAGAAAGGAGGTCGCAAGCCRGCTCGCCTTATCGTGTTCAGATTTGG  
35 GAGTCCGTGTGTCGAGAAAAATGGCCCTTACGACGTTGGTCTCCACCCTT  
CCTCAGCCCGTGTGCGGCCCCCTCATACGATTCCAATACTCCTGGACA  
GCGGGTTCAGTTCTGGTGAATGCGTGGAAATCAAAGAAAAACCCTATGG  
GCTTCTCATATGACACCCGCTGYTTTGACTCTACGGTCACYGAGAGYGAC  
ATCCGTAAGTACTGAGGAGTCAATTTACCAATGTTGTGACTTGGCCCCGAAGC  
40 CAGACAGGTTATAAGGTCGCTCACAGAGCGGCTTTATATCGGGGGTCCY  
TGACTAATTCAAAAGGGCAGAAGTGCAGGCTATCGCCGGTGTGCGCAAG  
GCGCGTGTGTCGACGACGAGTGCAGGCAATACCCTCACATGTTACCTGAAG  
GCCACTGCAGCCTGTGAGCTGCGAAGCTCCAGGACTGCACAATGCTTG  
TGTGTGGGGACGACCTTGTGTYATCTGTGAGAGCGCGGGGACCCAAGA  
45 GGACGCAGCGAGCCTACGAGTCTTCACGGAGGCTATGACTAGGTAATCT  
GCTCCCCCGGGGACCCGCCCGGCGGAATACGACTTGGARTTAATAA  
CATCATGCTCCTCCAACGTGTGCGTGCAGCAGCAGCAYGGCAAAAG  
GGTGTACTACCTCACCCGTGACCCACACCCCTTGCAGCGGGCYGCA  
TGGGAGACAGCTAGACACACTCCAGTCAACTCCTGGCTAGGCAACATCAT  
50 CATGTATGCGCCACCTTGTGGCAAGGATGATYCTGATGACYCATTCTT  
CTCCATCCTTCTAGCCAGGAGCAACTTAAAAAGCCCTAGATTGTCAGAT  
CTACGGGGCCTGTTACTCCATTGAGCCACTTGACCTACCTCAGATCATTCA  
GCGACTCCATGGTCTTAGCGCATTTCCTCCACAGTTACTCTCCAGGTGA  
GATCAATAGGGTGGCTTCATGCCTCAGGAACTTGGGGTACCACCCCTGC  
55 GAGTCTGGAGACATCGGGCCAGAAGTGTCCGCGCTAAGCTGCTGTCCCG  
GGGGGGAGGGCTGCCACTTGTGGCAAGTACCTCTTCAACTGGGCRGTA  
AGGACCAAGCTCAAACACTCCAATCCCGGCTGCGTTCAAGCTGGACTT  
GTCCGGCTGGTTGCTGTTACAGCGGGGGAGACATATATCACAGC  
CTGTCTCGTGCCCGACCCCGCTGGTYYRTGTGGTGCCTACTCCTACTTTC  
60 TGTAGGGGTAGGCATCTACCTGCTCCCCAACCGATGA

>NS5B P16  
TCGATGTCCTACACATGGACAGGCGCCTTGTATCACACCGTGCAGTGCAGG  
ARGAGAGCAAGCTGCCATCAAYGCGCTGAGCAAGTCTTTGYTGCGYCAC  
65 CATAACATGRTCTATGCCACAACATCCCGCAGCGCYAGCCAAMGGCAGAR  
GAAGGTCACCTTTGAYAGACTGCARGTCTGGACGACCACTACCGGGACG

TGCTYAAGGAGATGAAGGCGAAGGCGTCCACAGTCAAGGCTAAACTTCTA  
 TCCGTAGARGAAGCCTGYAAGCTGACRCCCCACACTCGGCCAGATCYAA  
 ATTTGGCTATGGGGCAAAGGACGTCCGGAACCTATCCAGCAAGGCCGTTA  
 5 ACCACATCCACTGCGTGTGGAAGGACTTGCTGGAAGACACTGACACACCA  
 ATTGACACCACCATCATGGCAAAAAATGAGGTTTTCTGYATCCAACCAGAG  
 AAAGGAGGCCGCAAGCCAGCTCGCCTTATCGTRTACCCAGACCTGGGGG  
 TCCGRGTGTGCGAGAAGATGGCTCTTTAYGATGTGGTCTCCACYCTTCCT  
 CAGGCCGTGATGGGCCCTCRTACGGATTTAGTACTCTCCTGGACAGC  
 10 GGGTTGAGTTCCTGGTGAAWGCCTGGAARTCAAAGAAATGGCCTATGGG  
 CTTCGCRATGACACCCGCTGCTTYGACTCRACGGTCACTGAGAATGACA  
 TYCGTGTGAGGAGTCAATTTACCAATGTTGTGACTTGGCYCCCGAAGCC  
 AGACAGGYCATAAGGTGCGTCAACAGAGCGGCTTTAYATCGGGGGTCCYCT  
 AACCAATTCAAAAGGGCAAAACTGCGGTTATCGCCGGTGTGCGGCRAGC  
 15 GCGGTGACTGACGACTAGCTGCGGCAAYACCCTTACATGTTACTTGAARGC  
 CTCTGCRGCCTGTGAGCTGCGAAGCTCCAGGACTGCACGATGOTCGTG  
 TGCGGAGACGACCTCGTCTTATCTGTGAGAGCGCGGGGACCCACGAGG  
 ATGCGGCGAGCCTACGAGTCTTYACGGAGGCTATGACTAGGTACTCCGG  
 CCCCCYGGGGACCCGCTCAGCCAGAATACGACTTAGAGCTGATAACAT  
 20 CATGCTCTTCAAAYGTGTCRGTCGCGCACGATGCATCYGGCAAAGGGTR  
 TACTACCTCACCCGTGACCCACCACCCCTTGCRGCGGGCTGCGTQGG  
 ARACAGCTAGACACACTCCAGTYAACTCCTGGCTAGGCAACATCATCATG  
 TAYGCGCCACCYTATGGGCAAGGATGATCCTGATGACTCATTCTTGTCC  
 ATCCTTCTAGCTCAGGAGCAACTGAAAAGCCCTAGATTGTCAGATCTAY  
 25 GGGCCTGTTACTCCATTGAACCACTTGACCTACCTCAAATCATTARGGA  
 CTCCATGGTATTAGCGGTTTTACTCCAYAGTTACTCTCCAGGWWGAGAT  
 CAATAGGGTGGCTTATGCCTCAGGAACTTGGGGTACCRCCCTTGCGAG  
 TCTGGAGACATCGGGCCAGGAGTGTCCGCGCTAAGYACTGTCCCAGGG  
 GGGGAGGGCTGCCACTTGTGGCAARTACCTTTCAACTGGGCAGTAARAA  
 30 CCAAGCTTAATCTCACTCCAATTCCGGCTGCGTCCAAGCTGGATTTATCCR  
 GCTGGTTGGTTGCCGGYTACAGCGGGGGAGACATATATCACAGCGTGTCT  
 CMTGCCCGACCCCGCTGGTTCATGTGGTGCCTRGTGCTACTKTCTGTAGG  
 RGTAGGCATCTACCTGCTYCCAACCGATGA

35 D. Alineación de secuencias con la secuencia de referencia

La alineación muestra la secuencia de nucleótidos del dominio polimerasa NS5B de un aislado de HCV-1b de un paciente no tratado. La secuencia se alineación frente a una secuencia de referencia. Las homologías entre las dos secuencias se representan como puntos.

```

13      20      30      40      50      60      70      80      90      100
conlb referencia .....
Pt 12 NS5B      tcgatgtcctacacatggacagggccctgatcacgccatgcgctgaggagaaaccaagctgccatcaatgcaactgagcaactcttgcctcgtcacc
.....
110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
conlb referencia .....
Pt 12 NS5B      acaacttggctctatgctacaacatctcgcagcgaagcctggggcagaagaggtcacctttgacagactgcaggtcctggacgaccactaccgggagct
.....
210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
conlb referencia .....
Pt 12 NS5B      gctcaaggagtgagggcgaagggctcccagctcaaggtcaactctatccgtggaggagcctgcaagctgacgccccccacatcggccagatctaaa
.....
310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
conlb referencia .....
Pt 12 NS5B      tctggctatggggcaaggagctccggaacctatccagcaaggccgttaaccacatccgctccgctgggaaggacttctggagacactgagacaccaa
.....
410     420     430     440     450     460     470     480     490     500
conlb referencia .....
Pt 12 NS5B      ttgacaccaccatcatggcaaaaatgaggtttctgggtcccaaccagagagggggggccgcaagccagctgccttaccgtattcccagattgggggt
.....
510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
conlb referencia .....
Pt 12 NS5B      tctgtgtcgcgagaaaatggcccttaccgtgtgtctccacacctccctcagggcgtgagggctcttccatccggttccatctctctggacaggg
.....
610     620     630     640     650     660     670     680     690     700
conlb referencia .....
Pt 12 NS5B      gtcgagctcctggtgaatgctcggaaagcgaagaatgcctatgggcttcgcatatgacaccgctgctctgactcaacggctcactgagatgacatcc
.....
710     720     730     740     750     760     770     780     790     800
conlb referencia .....
Pt 12 NS5B      ggtgtgaggagtcaatctaccatgtgtgacttggcccccgaagccagacagggcacaaggtgctccagagcggcttaccatcgggggccctgac
.....
810     820     830     840     850     860     870     880     890     900
conlb referencia .....
NS5B Pt 12      taattcaaggcgaactcgggtatcgccgggtggcggcggagcgggtactgacgaccagctgcggtaataccctcacatgtacttgaagggcct
.....
910     920     930     940     950     960     970     980     990     1000
conlb referencia .....
NS5B Pt 12      gggcctgtcagagtcgaaagctccaggactgcacgatgctgtatggggagcagccttgcgttaccgtgaaagcggggaccacagggagagg
.....
1010    1020    1030    1040    1050    1060    1070    1080    1090    1100
conlb referencia .....
NS5B Pt 12      cgagcctacggccctcagggagctatgactagatacttgcgccctggggaccggcccaaacagaaatcagactggagttgatcaatcatgctc
.....
1110    1120    1130    1140    1150    1160    1170    1180    1190    1200
conlb referencia .....
NS5B Pt 12      ctcaatgtctcagtcgagcagatgcabctggcaaaaggggtgactatctcaccgtgacccaccacccctcggcgggctgctggggagacagct
.....
1210    1220    1230    1240    1250    1260    1270    1280    1290    1300
conlb referencia .....
NS5B Pt 12      agacacactccagcnaatcctggtcaggaacatcatatgtatgcgccaccttggggcaggatgactctgatgactcattctctccatctctc
.....
1310    1320    1330    1340    1350    1360    1370    1380    1390    1400
conlb referencia .....
NS5B Pt 12      tagctcaggaacactgaaaagcctcagattgtcagatctacggggcctgtactccattgagccactgacctacctcagatcattcaacgactcca
.....
1410    1420    1430    1440    1450    1460    1470    1480    1490    1500
conlb referencia .....
NS5B Pt 12      tggccttagcgtcttccatccatagttactctcaggtgagatcaatagggcgtctcatgctcaggaacttgggtaccgcccttgcagctcgg
.....
1510    1520    1530    1540    1550    1560    1570    1580    1590    1600
conlb referencia .....
NS5B Pt 12      agacatcgggccaagtgccgcctaggtactgtcccaggggggagggctgccacttgggcaagtaacctctcaactgggcagtaaggacaggc
.....
1610    1620    1630    1640    1650    1660    1670    1680    1690    1700
conlb referencia .....
NS5B Pt 12      tcaaacctcactccaatcccggctggctcccagttgatttatccagctggctgctgggtacagcggggagacabatcacagcctgtctcgtgc
.....
1710    1720    1730    1740    1750    1760    1770
conlb referencia .....
NS5B Pt 12      ccgaccctcggctcatggtgctcctcctactcttctgagggtaggcactctactccccaccagatga
.....

```

**Ejemplo 3**

**Ensayo de fenotipado de NS3**

5

**Construcción de vector lanzadera Delta [NS3]**

10

El plásmido 11pFK I341 PI luc NS3-3'\_ET se basa en la construcción descrita en Krieger et al. 2001 y la proporcionó amablemente el Prof. Bartenschlager (Heidelberg, Alemania). Para generar un vector lanzadera para el fenotipado de NS3, se modificó por mutagénesis dirigida al sitio para introducir dos sitios de restricción SacII en la posición 3338 y 3899. En una siguiente etapa, el plásmido modificado se digirió con SacII y posteriormente se religó para dar el

vector lanzadera delta[NS3] pFK I341 PI luc ΔNS3 7-192\_ET (SEC ID N° 10).

Para la clonación InFusion, se linealizó la estructura delta[NS3] pFK I341 PI luc ΔNS3 7-192\_ET (**SEC ID N° 10**) por digestión con SacII.

5

#### **Ejemplo 4**

Clonación de los amplicones de PCR de NS3 de pacientes infectados en el vector lanzadera delta[NS3]

##### 10 A. Generación del amplicón de NS3 a partir de aislados de pacientes infectados con HCV

Para la PCR, se mezcló 1 µl del producto de RT-PCR de una etapa del ensayo de genotipado de NS3 con cebador 1b\_InFu\_NS3\_F (SEC ID N° 11) 0,2 µM, cebador 1b\_InFu\_NS3\_R (SEC ID N° 12) 0,2 µM y mezcla maestra Herculase™ Hotstart (Stratagene) 2x para dar un volumen total de 50 µl. La desnaturalización inicial fue a 95°C durante 2 min y el ciclado térmico consistió en 10 ciclos seguidos de otros 20 ciclos que consistían en 15 desnaturalización a 95°C durante 30 s, hibridación a 60°C durante 30 s y elongación a 72°C durante 1 min (más 10 s por ciclo). La extensión final tuvo lugar a 72°C durante 10 min. Los amplicones se purificaron usando el kit de purificación de gel QIAQuick (Qiagen).

##### 20 B. Preparación del vector lanzadera delta [NS3]

Se digirió la estructura lanzadera subgenómica de NS3 con un exceso de la endonucleasa de restricción SacII (NEB) y tampón 4 de enzima de restricción (NEB) 1x a 37°C durante una noche. En una siguiente etapa, se añadió fosfatasa intestinal de ternera y la mezcla se incubó durante 40 min a 37°C para desfosforilar la estructura lanzadera linealizada. El vector desfosforilado se purificó mediante electroforesis en gel de agarosa (violeta cristal) seguido de extracción del gel usando el kit de QIAGEN. El vector linealizado se almacenó a -20°C hasta uso adicional.

25

##### C. Clonación de NS3 derivado de aislados de pacientes en el vector lanzadera delta [NS3] linealizado

Los productos de PCR y el vector linealizado se descongelaron y el producto de PCR se almacenó en hielo hasta la clonación. Inmediatamente antes de la clonación por In-Fusion™, el vector linealizado se desnaturalizó durante 5 min a 60°C y posteriormente se puso en hielo. Para la reacción de clonación, se añadió 1 µl del producto de PCR y 1 µl de la preparación de vector a 8 µl de agua libre de Dnasa/Rnasa. La mezcla completa (10 µl) se añadió en un tubo que contenía mezcla de reacción Dry-Down In-Fusion™ (Clontech) y se pipeteó cuidadosamente arriba y abajo. Las etapas de pipeteo se realizaron en hielo. Los tubos de PCR que contenían la mezcla de clonación In-Fusion™ se transfirieron posteriormente a un termociclador y se incubaron durante 30 min a 42°C. Después de la incubación los tubos se transfirieron inmediatamente a hielo.

35

##### D. Transformación del ADN de replicón recombinante

La transformación de células de *Escherichia coli* se realizó inmediatamente después de la etapa de clonación por In-Fusion™. Se usaron células Ultracompetentes XL10-Gold® (Stratagene) para la transformación. Se transformaron 50 µl de las células con 5 µl de la mezcla de clonación In-Fusion™ de acuerdo con el protocolo de Stratagene. La mezcla de transformación completa se sembró en placas LB Petri que contenían ampicilina y se incubaron durante una noche a 37°C. Las colonias se combinaron aplicando 1 ml de medio LB que contenía ampicilina a las placas Petri y retirando las colonias por raspado. La suspensión bacteriana se transfirió a un tubo Falcon de 15 ml. Las placas Petri se lavaron una segunda vez con 1 ml del medio LB que contenía ampicilina y la solución se transfirió de nuevo al tubo Falcon. Se añadieron 2 ml de medio LB que contenía ampicilina y las células se cultivaron a 37°C hasta que alcanzaron la fase logarítmica (aproximadamente 4-5 horas). Se usaron 1,5 ml del cultivo celular para la inoculación de 200 ml de medio LB que contenía ampicilina. Las células se cultivaron durante una noche a 37°C para la preparación de ADN. El ADN se preparó usando el kit de purificación de ADN Maxiprep de QIAGEN.

50

#### **Ejemplo 5**

##### 55 **Ensayo fenotípico de replicón de NS3**

##### A. Linealización del ADN plasmídico del replicón recombinante

El ADN plasmídico del replicón (10 µg por muestra) se linealizó usando 1,5 µl de Asel (NEB) y 3 µl de Seal (NEB) junto con 4 µl de tampón 3 de NEB para dar un volumen total de 40 µl. La mezcla de reacción se incubó durante 4 horas a 37°C. El vector linealizado se separó de los fragmentos resultantes mediante electroforesis en gel de agarosa y se purificó usando el kit de extracción de gel de QIAGEN. La concentración de ADN se midió usando el espectrofotómetro Nanodrop® (proporción DO260 nm/DO280 nm). El ADN purificado se almacenó a -20°C hasta su uso adicional.

65

B. Preparación de ARN de replicón transcrito in vitro

La transcripción in vitro se realizó usando el kit de transcripción de alto rendimiento MEGAscript (Ambion) de acuerdo con el protocolo HCV\_SP\_038.vs2 en la Laboratory Operation Unit en Tibotec. En resumen, se usó 1 µg del ADN de replicón linealizado y purificado por reacción para transcripción in vitro y se añadió a una mezcla que contenía 44 µl de agua sin nucleasa, 4 µl de solución de ATP, 4 µl de solución de CTP, 4 µl de solución de GTP, 4 µl de solución de UTP y tampón de reacción 10x. Se añadieron posteriormente cuatro µl de la mezcla de enzimas. El pipeteo se realizó a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se incubó durante 4 horas a 37°C. Se añadieron posteriormente dos µl de DNasa TURBO (Ambion) y la mezcla se incubó durante 15 min a 37°C para destruir el modelo de ADN. El ARN se purificó usando el kit MEGAclean™ (Ambion). El ARN se cuantificó usando el espectrofotómetro Nanodrop® (proporción DO260 nm/DO280 nm). El ARN purificado se almacenó en alícuotas de 10 µg a -80°C hasta su uso adicional.

C. Línea celular de hepatoma

Se cultivó la línea celular de hepatoma curada Huh7 a 37°C en una atmósfera humidificada con CO<sub>2</sub> al 5% en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Biowhittaker, Cat nº BE12-917F) suplementado con L-Glutamina y FCS al 10%.

D. Determinación de replicación transitoria del replicón

Se transfectaron 4x10<sup>6</sup> células con 10 µg de ARN de replicón transcrito in vitro mediante electroporación. Para la determinación de la CE<sub>50</sub>, se sembraron 4.000 células/pocillo en un volumen de 30 µl de medio en placas blancas de compuesto de 384 pocillos. Las placas de compuesto contenían 10 µl/pocillo de la dilución respectiva de compuesto en medio (que contenía DMSO al 2%), lo que conduce a un volumen total de 40 µl por pocillo con una concentración final de DMSO al 0,5%. Las diluciones de compuesto se prepararon por cuadruplicado. Las placas de cultivo celular se incubaron durante 48 h a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5%. Los experimentos se realizaron por triplicado. La lectura de quimioluminiscencia de luciferasa de luciérnaga se realizó usando el reactivo Steady-Lite (PerkinElmer). Los valores de CE<sub>50</sub> se evaluaron como la concentración inhibitoria a la que se observó una reducción del 50% en el nivel de indicador luciferasa de luciérnaga en comparación con el nivel de señal de luciferasa de luciérnaga sin la adición de compuestos. Los resultados de los estudios que ensayan el efecto inhibitorio de un inhibidor de proteasa ejemplar, SCH 503034, sobre la replicación de replicón WT y replicones con secuencias de NS3 derivadas de pacientes se muestran en la Tabla 2.

La Tabla 2 muestra que el vector lanzadera con NS3 restablecido se replica. GND sirve como control de replicón sin replicación.

La Tabla 3 muestra los valores de CE<sub>50</sub> de un inhibidor de proteasa de HCV ensayado en el sistema lanzadera de replicón de NS3 con 5 aislados de pacientes.

Resultados:

Tabla 2: Nivel de replicación de replicones (formato de 96 pocillos\*)

| Plásmido                                  | Estructura del vector                 | Nivel RLU <sup>1</sup> | Nivel de replicación <sup>2</sup> |
|---|---------------------------------------|------------------------|-----------------------------------|
| rep PI-luc/ET (WT)                        | rep PI-luc/ET (WT)                    | 1637 ±348              |                                   |
| rep PI-luc/ET NS3 7-192 InFu restablecido | Rep PI-luc/ET delta [NS3 7-192] SacII | 1047 ± 151             | Nivel WT                          |
| GND                                       |                                       | 17 ±2                  | Sin replicación                   |

Se sembraron 15000 células por pocillo en placas de 96 pocillos.

<sup>1</sup> RLU representa el nivel de señal de luciferasa de luciérnaga observado después de 48 horas post-transfección.

<sup>2</sup> El nivel de replicación es comparado con el vector de tipo silvestre (WT).

Tabla 3: Valores de CE<sub>50</sub> (formato de 384 pocillos)

| Secuencia de NS3     | SCH 503034 CE <sub>50</sub> [µM]* |
|----------------------|-----------------------------------|
| rep PI-luc/ET (WT)   | 0,140 ± 0,069                     |
| Aislado clínico Pt 1 | 0,341 ± 0,130                     |
| Aislado clínico Pt 2 | 0,090 ± 0,046                     |
| Aislado clínico Pt 3 | 0,124 ± 0,023                     |
| Aislado clínico Pt 4 | 0,126 ± 0,018                     |
| Aislado clínico Pt 5 | 0,120 ± 0,068                     |

\* Inhibición por SCH 503034 de la replicación transitoria de ARN del replicón de HCV que contiene NS3 de aislados clínicos del genotipo 1b insertado en el vector lanzadera pFK PI-luc delta[NS3 7-192]\_ET; valor medio de EC<sub>50</sub> de al menos n=3 experimentos.



**Ejemplo 6****Ensayo de fenotipado de NS5B****5 Construcción de estructura delta[NS5B]**

El plásmido 11pFK I341 PI luc NS3-3'-ET se basa en la construcción descrita en Krieger et al. 2001 y la proporcionó amablemente el Prof. Bartenschlager (Heidelberg, Alemania). Para generar un vector lanzadera, se modificó por mutagénesis dirigida al sitio para introducir dos sitios de restricción AflIII en la posición 7481 y 9287. Primero, se introdujo un sitio de restricción AflIII por mutagénesis dirigida al sitio en el 3' NCR directamente después del codón de parada de NS5B en Medigenomix (Múnich, Alemania) produciendo el plásmido pFKi341 luc\_NS3-3'-ET-AflIII (SEC ID N° 17). A continuación, se introdujo un segundo sitio de restricción AflIII 8 aa cadena arriba del sitio de escisión de NS5A/NS5B usando el kit de mutagénesis dirigida al sitio Quick Change (Stratagene La Jolla, CA, EEUU) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante con el par de cebadores SDM AflIII-5A-fwd (5'-accgtaagcgaggagccttaaggctagtggagcgc-3') (SEC ID N° 18) y AflIII-5A-rev (5'-gacgtcctcactagccttaaggctcctcgcttacggt-3') (SEC ID N° 19) produciendo el plásmido pFKi341 luc\_NS3-3'-ET-2xAflIII (SEC ID N° 20). En una siguiente etapa, el plásmido modificado se digirió con AflIII y posteriormente se religó produciendo la estructura delta[NS5B] pFK\_I341\_PI\_NS3-3\_ET\_dNS5a/b\_5a440-5b591-Scal (SEC ID N° 21).

En paralelo, se generó una construcción de fenotipado de NS5B con un sitio de restricción XbaI en el extremo 3' usando el plásmido pFKi341 luc\_NS3-3'-ET-2xAflIII (SEC ID N° 20) como molde. Primero, se mutó un sitio XbaI en el gen de la luciferasa de luciérnaga mediante un enfoque de mutagénesis dirigida al sitio, produciendo una mutación silenciosa, usando el par de cebadores XbaI-mut-fwd (5'-ggcgccattctatcccactagaggatggaacc-3') (SEC ID N° 22) y XbaI-mut-rev (5'-ggttcactctctagtgatagatggcgcc-3') (SEC ID N° 23). En una segunda reacción SDM, se introdujo un sitio de restricción XbaI en el extremo 3' del 3' NCR de HCV en lugar del sitio Scal usando el par de cebadores XbaI-add-fwd (5'-gagtgctgatactggcctctctgcagatcaagctagaaagtccttagtgagggttaattc-3') (SEC ID N° 24) y XbaI-add-rev (5'-gaattaaccctcactaaagggacttctagacttgatctgcagagaggccagatcagcactc-3') (SEC ID N° 25) produciendo el plásmido pFKi341 luc\_NS3-3'-ET-2xAflIII-XbaI (SEC ID N° 26). En una siguiente etapa, el plásmido modificado se digirió con AflIII y posteriormente se religó produciendo la estructura delta[NS5B] pFK\_I341\_PI\_NS3-3\_ET\_dNS5a/b\_5a440-5b591-XbaI (SEC ID N° 27).

La linealización con XbaI produce un extremo 3' de HCV auténtico y ofreció la posibilidad de amplicones lanzadera de aislados clínicos que albergan un sitio Scal en la secuencia codificante de NS5B.

Para la clonación por InFusion, se linealizó la estructura delta[NS5B] pFK\_I341\_PI\_NS3-3\_ET\_dNS5a/b\_5a440-5b591-Scal (SEC ID N° 21) o pFK\_I341\_PI\_NS3-3\_ET\_dNS5a/b\_5a440-5b591-XbaI (SEC ID N° 27) por digestión con AflIII.

**Ejemplo 7****40 Clonación de los amplicones de PCR de NS5B de pacientes infectados con HCV en el vector lanzadera delta [NS5B]****A. Generación de amplicón de NS5B a partir de aislados de pacientes infectados con HCV**

Para la PCR InFusion™, se mezcló 1 µl del producto de RT-PCR de una etapa del ensayo de genotipado de NS5B con cebador 1b\_NS5B\_F\_AflIII-Infusion (5'-AAGCGAGGAGCTTAAGGCYRGTGAGGACGT-3') (SEC ID N° 28) 0,2 µM, cebador 1b\_NS5B\_R\_AflIII-Infusion (5'-AGTCTCCCGTCTTAAGTCAYCGGTTGGGG-3') (SEC ID N° 29) 0,2 µM y mezcla maestra Herculase™ Hotstart (Stratagene La Jolla, CA, EEUU) 2x para dar un volumen total de 50 µl. La desnaturalización inicial fue a 95°C durante 2 min y el ciclado térmico consistió en 10 ciclos seguidos de otros 20 ciclos que consistían en desnaturalización a 95°C durante 30 s, hibridación a 60°C durante 30 s y elongación a 72°C durante 1 min 30 s (más 10 s por ciclo). La extensión final tuvo lugar a 72°C durante 10 min. Los amplicones se purificaron usando el kit de purificación de gel QIAquick (Qiagen, Hilden, Alemania). El volumen final de los amplicones purificados fue 30 µl.

**55 B. Preparación de vector lanzadera delta [NS5B]**

Se digirió la estructura lanzadera subgenómica de NS5B con un exceso de la endonucleasa de restricción AflIII (NEB) y tampón 4 de enzima de restricción (NEB) 1x a 37°C durante una noche. En una siguiente etapa, se añadió fosfatasa intestinal de ternera y la mezcla se incubó durante 1 h a 37°C para desfosforilar la estructura lanzadera linealizada. El vector desfosforilado se purificó mediante electroforesis en gel de agarosa (violeta cristal) seguido de extracción del gel usando el kit de QIAGEN. El vector linealizado se almacenó a -20°C hasta su uso adicional.

**C. Clonación de NS5B derivado de aislados de pacientes en el vector lanzadera delta [NS5B] linealizado**

Los productos de PCR y el vector linealizado se descongelaron y el producto de PCR se almacenó en hielo hasta la clonación. Inmediatamente antes de la clonación por In-Fusion™, el vector linealizado se desnaturalizó durante 5

min a 60°C y posteriormente se puso en hielo. Para la reacción de clonación, se añadieron 2 µl del producto de PCR y 1-3 µl de la preparación de vector a 5-8 µl de agua sin Dnasa/Rnasa. La mezcla completa (10 µl) se añadió en un tubo que contenía la mezcla de reacción Dry-Down In-Fusion™ (Clontech) y se pipeteó cuidadosamente arriba y abajo. Las etapas de pipeteo se realizaron en hielo. Los tubos de PCR que contenían la mezcla de clonación In-Fusion™ se transfirieron posteriormente a un termociclador y se incubaron durante 30 min a 42°C. Después de la incubación los tubos se transfirieron inmediatamente a hielo.

#### D. Transformación de ADN de replicón recombinante

La transformación de células de *Escherichia coli* se realizó inmediatamente después de la etapa de clonación por In-Fusion™. Se usaron las células Ultracompetentes XL10-Gold® (Stratagene) para la transformación. Se transformaron 50 µl de las células con 5 µl de la mezcla de clonación In-Fusion™ de acuerdo con el protocolo de Stratagene. La mezcla de transformación completa se sembró en placas LB Petri que contenían ampicilina y se incubaron durante una noche a 37°C. Las colonias se combinaron aplicando 1 ml de medio LB que contenía ampicilina a las placas Petri y retirando las colonias por raspado. La suspensión bacteriana se transfirió a un tubo Falcon de 15 ml. Las placas Petri se lavaron una segunda vez con 1 ml del medio LB que contenía ampicilina y la solución se transfirió de nuevo al tubo Falcon. Se añadieron 2 ml de medio LB que contenía ampicilina y las células se cultivaron a 37°C hasta que alcanzaron la fase logarítmica (aproximadamente 4-5 horas). Se usaron 1,5 ml del cultivo celular para la inoculación de 200 ml de medio LB que contenía ampicilina. Las células se cultivaron durante una noche a 37°C para la preparación de ADN. El ADN se preparó usando el kit de purificación de ADN Maxiprep de QIAGEN.

#### **Ejemplo 8**

#### **25 Ensayo fenotípico de replicón de NS5B**

##### A. Linealización del ADN plasmídico del replicón recombinante

El ADN plasmídico del replicón (10 µg por muestra) se linealizó usando 3 µl de XbaI (NEB) junto con 10 µl de tampón NEB 4 y 1 µl de una solución madre de BSA concentrada 100x (NEB) para dar un volumen total de 100 µl. La mezcla reacción se incubó durante 4 horas a 37°C. El vector linealizado se separó de los fragmentos resultantes mediante electroforesis en gel de agarosa y se purificó usando el kit de extracción de gel de QIAGEN. La concentración de ADN se midió usando el espectrofotómetro Nanodrop® (proporción DO260 nm/DO280 nm). El ADN purificado se almacenó a -20°C hasta su uso adicional.

##### B. Preparación de ARN de replicón transcrito in vitro

La transcripción in vitro se realizó usando el kit de transcripción de alto rendimiento MEGAscript (Ambion) de acuerdo con el protocolo HCV\_SP\_038.vs2 en la Laboratory Operation Unit en Tibotec. En resumen, se usó 1 µg del ADN de replicón linealizado y purificado por reacción para la transcripción in vitro y se añadió a una mezcla que contenía 44 µl de agua sin nucleasa, 4 µl de solución de ATP, 4 µl de solución de CTP, 4 µl de solución de GTP, 4 µl de solución de UTP y tampón de reacción 10x. Posteriormente se añadieron cuatro µl de la mezcla de enzimas. El pipeteo se realizó a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se incubó durante 4 horas a 37°C. Posteriormente se añadieron dos µl de DNasa TURBO (Ambion) y la mezcla se incubó durante 15 min a 37°C para destruir el molde de ADN. El ARN se purificó usando el kit MEGAclean™ (Ambion). El ARN se cuantificó usando el espectrofotómetro Nanodrop® (proporción DO260 nm/DO280 nm). El ARN purificado se almacenó en alícuotas de 10 µg a -80°C hasta su uso adicional.

##### C. Línea celular de hepatoma

Se cultivó la línea celular de hepatoma curada Huh7 a 37°C en una atmósfera humidificada con CO<sub>2</sub> al 5% en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Biowhittaker, Cat n° BE12-917F) suplementado con L-Glutamina y FCS al 10%.

##### D. Determinación de replicación transitoria del replicón

Se transfectaron 4x10<sup>6</sup> células con 10 µg de ARN de replicón transcrito in vitro mediante electroporación. Para la determinación de CE<sub>50</sub> se sembraron 4.000 células/pocillo en un volumen de 30 µl de medio en placas blancas de compuesto de 384 pocillos. Las placas de compuesto contenían 10 µl/pocillo de la dilución respectiva de compuesto en medio (que contenía DMSO al 2%), lo que conduce a un volumen total de 40 µl por pocillo con una concentración final de DMSO al 0,5%. Las diluciones del compuesto se prepararon por cuadruplicado. Las placas de cultivo celular se incubaron durante 48 h a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5%. Los experimentos se realizaron al menos por duplicado. La lectura de quimioluminiscencia de luciferasa de luciérnaga se realizó usando el reactivo Steady-Lite (PerkinElmer). Los valores de CE<sub>50</sub> se evaluaron como la concentración inhibitoria a la que se observó una reducción del 50% en el nivel de indicador de luciferasa de luciérnaga en comparación con el nivel de señal de luciferasa de luciérnaga sin la

adición de compuestos. Los resultados de estudios que ensayan el efecto inhibitor de un inhibidor de polimerasa ejemplar, ácido tiofeno-2-carboxílico, sobre la replicación de replicón WT y replicones con secuencias NS5B derivadas del paciente se muestran en la Tabla 4.

- 5 La Tabla 4 muestra los valores de CE<sub>50</sub> de un inhibidor de polimerasa de HCV ensayado en el sistema lanzadera de replicón de NS5B con 5 aislados de pacientes.

Resultados:

- 10 Tabla 4: Valores de CE<sub>50</sub> (formato de 384 pocillos)

| Secuencia de NS5B     | Ácido tiofeno-2-carboxílico CE <sub>50</sub> [μM]* |
|-----------------------|--|
| Rep PI-luc/ET (WT)    | 0,58   |
| Aislado clínico Pt 12 | 0,28   |
| Aislado clínico Pt 13 | 0,59   |
| Aislado clínico Pt 14 | 1,0**  |
| Aislado clínico Pt 15 | 0,63   |
| Aislado clínico Pt 16 | 3,96   |

\* Inhibición por ácido tiofeno-2-carboxílico de replicación transitoria de ARN del replicón de HCV que contiene NS5B de aislados clínicos de genotipo 1b insertado en el vector lanzadera pFK PI-luc delta[NS5B]\_ET; valor medio de CE<sub>50</sub> de al menos n=2 experimentos.

\*\* medido una vez

- 15

Tabla 5

| SEC ID N° | Nombre de cebador                 | Secuencia (5' a 3')                           | Observación   | Amplificación/ Secuenciación  |
|-----------|-----------------------------------|---|---|-------------------------------|
| 1         | NS5Bsubtype_A                     | TGGGGTTCGCGTA<br>TGATACCCGCTGC<br>TTTGA       | ensayo de subtipado basado en secuencia de NS5B     | Amplificación                 |
| 2         | NS5Bsubtype_B                     | TGGGGTTTTCTTA<br>CGACACCAGGTG<br>CTTTGA       | ensayo de subtipado basado en secuencia de NS5B     | Amplificación                 |
| 3         | NS5Bsubtype_C                     | CCGTATGATACCC<br>GCTGCTTTGACTC AAC            | ensayo de subtipado basado en secuencia de NS5B     | Amplificación y secuenciación |
| 4         | NS5Bsubtype_D                     | TCCTACGACACCA<br>GGTGCTTTGATTC AAC            | ensayo de subtipado basado en secuencia de NS5B     | Amplificación y secuenciación |
| 5         | NS5Bsubtype_E                     | AATTCCTGGTCAT<br>AGCCTCCGTGAA<br>GACTC        | ensayo de subtipado basado en secuencia de NS5B     | Amplificación y secuenciación |
| 6         | 1b_NS3_out_F                      | GCGTGTGGGGAC<br>ATCATCTTAGG                   | 181 aa N-terminales del ensayo de genotipado de NS3 | Amplificación                 |
| 7         | 1b_NS3_out_R                      | GCTGCCAGTGGG<br>AGCGTG                        | 181 aa N-terminales del ensayo de genotipado de NS3 | Amplificación                 |
| 8         | 1b_NS3_in_F                       | TCATCTTAGGCCT<br>GCCCGTCTC                    | 181 aa N-terminales del ensayo de genotipado de NS3 | Amplificación y secuenciación |
| 9         | 1b_NS3_in_R                       | GGGAGCGTGTAG<br>ATGGGCCAC                     | 181 aa N-terminales del ensayo de genotipado de NS3 | Amplificación y secuenciación |
| 10        | pFK I341 PI luc deltaNS3 7-192 ET | Secuencia plasmídica de estructura delta[NS3] | Fenotipado de estructura lanzadera                  | NA                            |
| 11        | 1b_InFu_NS3_F                     | ATGGCGCCTATTA<br>CCGCCTACTCCA<br>ACAGACG      | Fenotipado de cebador de amplificación              | Amplificación                 |
| 12        | 1b_InFu_NS3_R                     | AATGTCTGCGGTA<br>CCGCCGGGGGG<br>ATGAGTTGTC    | Fenotipado de cebador de amplificación              | Amplificación                 |
| 13        | 1b_NS5B_out_F                     | TAGAGTCTGGA<br>AGGACCCGG                      | Ensayo de genotipado de polimerasa (NS5B)           | Amplificación                 |
| 14        | 1b_NS5B_out_R                     | GGCCTGGAGTGG<br>TTAGCTCCCC                    | Ensayo de genotipado de polimerasa (NS5B)           | Amplificación                 |

ES 2 546 190 T3

| SEC ID N° | Nombre de cebador                              | Secuencia (5' a 3')   | Observación                               | Amplificación/ Secuenciación  |
|-----------|--|---|---|-------------------------------|
| 15        | 1b_NS5B_in_F                                   | TGGAAGGACCCG<br>GACTACG   | Ensayo de genotipado de polimerasa (NS5B) | Amplificación y secuenciación |
| 16        | 1b_NS5B_in_R                                   | GAGTGGTTAGCTC<br>CCCGTTCA   | Ensayo de genotipado de polimerasa (NS5B) | Amplificación y secuenciación |
| 17        | pFKi341 luc NS 3-3'-ET-AfIII                   | plásmido con 1er sitio AfIII (plásmido intermedio)                                | Fenotipado de estructura lanzadera        | NA                            |
| 18        | AfIII-5A-fwd                                   | (5'-accgtaagcaggag<br>cttaaggctagtggagcgtc -3')                                   | Fenotipado para clonación                 |                               |
| 19        | AfIII-5A-rev                                   | (5'-gacgtcctcactagcctt<br>aagctcctcgcttacggt-3')                                  | Fenotipado para clonación                 |                               |
| 20        | pFKi341 luc NS 3-3'-ET-2xAfIII                 | plásmido con 2o sitio AfIII (plásmido intermedio)                                 | Fenotipado de estructura lanzadera        | NA                            |
| 21        | pFK_I341 PI NS 3-3 ET dNS5A/b_5a440-5b591-Scal | Secuencia plasmídica de estructura delta[NS5B] Scal                               | Fenotipado de estructura lanzadera        | NA                            |
| 22        | Xbal-mut-fwd                                   | (5'-ggcgccattctatccac<br>tagaggatggaacc-3')                                       | Fenotipado para clonación                 |                               |
| 23        | Xbal-mut-rev                                   | (5'-ggttcatcctctagtg<br>gatagaatggcgcc-3')  | Fenotipado para clonación                 |                               |
| 24        | Xbal-add-fwd                                   | (5'-gagtgctgatactggcc<br>tctctgcagatcaagtctaga<br>aagtccttagtgagggtta<br>attc-3') | Fenotipado para clonación                 |                               |
| 25        | Xbal-add-rev                                   | (5-gaattaaccctcactaaa<br>gggacttctagacttgatctg<br>cagagaggccagtatcagc<br>actc-3') | Fenotipado para clonación                 |                               |
| 26        | pFKi341 luc NS 3-3'-ET-2xAfII-Xbal             | Plásmido intermedio   | Fenotipado de estructura lanzadera        | NA                            |
| 27        | pFK_I341 PI NS 3-3_ET dNS5A/b_5a440-5b591-Xbal | Secuencia plasmídica de estructura delta[NS5B] Xbal                               | Fenotipado de estructura lanzadera        | NA                            |
| 28        | 1b_NS5B_F_AfII I-Infusion                      | AAGCGAGGAGCT<br>TAAGGCYRGTGA<br>GGACGT  | Fenotipado de cebador de amplificación    | Amplificación                 |
| 29        | 1b_NS5B_R_AfII I-Infusion                      | AGTCCCCGTCTT<br>AAGTCAYCGTT<br>GGGG   | Fenotipado de cebador de amplificación    | Amplificación                 |
| 30        | 1a_NS3/4A_out_R                                | GGGACCTCACCG<br>CTCATGAT  | Ensayo de genotipado de proteasa (NS3/4A) | Amplificación                 |
| 31        | 1a_NS3/4A_in_R                                 | CTCACCGCTCATG<br>ATCTTGAATGC  | Ensayo de genotipado de proteasa (NS3/4A) | Amplificación                 |
| 32        | 1a_NS3/4A_out_F                                | CGGAGGTCATTA<br>CGTGCAAATG  | Ensayo de genotipado de proteasa (NS3/4A) | Amplificación                 |
| 33        | 1a_NS3/4A_in_F                                 | CGTGCAAATGGC<br>CATCATCAAG  | Ensayo de genotipado de proteasa (NS3/4A) | Amplificación                 |
| 34        | 1a_NS2_F1sb                                    | GCGCTTACTGGCA<br>CCTATG   | Ensayo de genotipado de proteasa (NS3/4A) | Secuenciación                 |
| 35        | 1a_NS3_F1s                                     | AGGCACGCCGAT<br>GTCAT   | Ensayo de genotipado de proteasa (NS3/4A) | Secuenciación                 |
| 36        | 1a_NS3_R2s                                     | CGGGACCTTGGT<br>GCTCTT  | Ensayo de genotipado de proteasa (NS3/4A) | Secuenciación                 |
| 37        | 1a_NS3_F2s                                     | CGGCACTGTCCTT<br>GACCA  | Ensayo de genotipado de proteasa (NS3/4A) | Secuenciación                 |
| 38        | 1a_NS3_R3s                                     | GAGTCGAAGTCG<br>CCGGTA  | Ensayo de genotipado de proteasa (NS3/4A) | Secuenciación                 |
| 39        | 1a_NS3_F3s                                     | CC GAGACTACAG<br>TTAGGCTACG   | Ensayo de genotipado de proteasa (NS3/4A) | Secuenciación                 |

ES 2 546 190 T3

| SEC ID N° | Nombre de cebador | Secuencia (5' a 3')          | Observación   | Amplificación/ Secuenciación  |
|-----------|-------------------|------------------------------|---|-------------------------------|
| 40        | 1a_NS3_R4s        | GCATGTCATGATG<br>TATTTGGTG   | Ensayo de genotipado de proteasa (NS3/4A)           | Secuenciación                 |
| 41        | 1a_NS4B_R1s       | ACGAGGACCTTC<br>CCCAGT       | Ensayo de genotipado de proteasa (NS3/4A) y NS4B/5A | Secuenciación                 |
| 42        | 1a_NS3_out_R      | GCTGCCGGTGGG<br>AGCATG       | 181 aa N-terminales del ensayo de genotipado de NS3 | Amplificación                 |
| 43        | 1a_NS3_in_R       | GAGCATGCAGGT<br>GGCCAC       | 181 aa N-terminales del ensayo de genotipado de NS3 | Amplificación y secuenciación |
| 44        | 1a_NS3_out_F      | GCGGCGACATCA<br>TCAACGG      | 181 aa N-terminales del ensayo de genotipado de NS3 | Amplificación                 |
| 45        | 1a_NS3_in_F       | CATCAACGGCTTG<br>CCCGTCTC    | 181 aa N-terminales del ensayo de genotipado de NS3 | Amplificación y secuenciación |
| 46        | 1a_NS3_Fs_BU      | GACCTTTACCTGG<br>TCACGAG     | 181 aa N-terminales del ensayo de genotipado de NS3 | Secuenciación                 |
| 47        | 1a_NS4B/5A_out_R  | GCTGTCCAGAACT<br>TGCAGTCTGTC | Ensayo de genotipado de NS4B/5A                     | Amplificación                 |
| 48        | 1a_NS4B/5A_in_R   | CCTTTGGCAAGCA<br>CTGCGTG     | Ensayo de genotipado de NS4B/5A                     | Amplificación                 |
| 49        | 1a_NS4B/5A_out_F  | CTGCGTGGTCATA<br>GTGGGCAG    | Ensayo de genotipado de NS4B/5A                     | Amplificación                 |
| 50        | 1a_NS4B/5A_in_F   | TGTCTTGTCCGGG<br>AAGCCGG     | Ensayo de genotipado de NS4B/5A                     | Amplificación                 |
| 51        | 1a_NS4B_F2s       | CGTCACTGCCATA<br>CTCAGCA     | Ensayo de genotipado de NS4B/5A                     | Secuenciación                 |
| 52        | 1a_NS5A_R1s       | CGTCCCCTTTTTG<br>ACATG       | Ensayo de genotipado de NS4B/5A                     | Secuenciación                 |
| 53        | 1a_NS5A_R2s       | TGACTCAACCCTG<br>GTGATGTT    | Ensayo de genotipado de NS4B/5A                     | Secuenciación                 |
| 54        | 1a_NS5A_F2s       | CGGTGGTCCTCAC<br>CGAA        | Ensayo de genotipado de NS4B/5A y polimerasa (NS5B) | Secuenciación                 |
| 55        | 1a_NS4A_F1s       | TTGTCCGGAAGCCG               | Ensayo de genotipado de NS4B/5A                     | Secuenciación                 |
| 56        | 1a_NS5B_R1s       | TGGCAAGCACTGCGTG             | Ensayo de genotipado de NS4B/5A                     | Secuenciación                 |
| 57        | 1a_NS5A_F1s       | TTGACGTCCATGC<br>TCACTG      | Ensayo de genotipado de NS4B/5A                     | Secuenciación                 |
| 58        | 1a_NS5B_out_R     | AGGCC GGAGTGT<br>TTACCCCAAC  | Ensayo de genotipado de polimerasa (NS5B)           | Amplificación                 |
| 59        | 1a_NS5B_in_R      | GGAGTGTTTACCC<br>CAACCTTCA   | Ensayo de genotipado de polimerasa (NS5B)           | Amplificación y secuenciación |
| 60        | 1a_NS5B_out_F     | TGACTATGAACC<br>ACCTGTGGTCC  | Ensayo de genotipado de polimerasa (NS5B)           | Amplificación                 |
| 61        | 1a_NS5B_in_F      | CACCTGTGGTCCA<br>TGGCTG      | Ensayo de genotipado de polimerasa (NS5B)           | Amplificación y secuenciación |
| 62        | 1a_NS5B_F1s       | CATCAACTCCGTG<br>TGGAAAG     | Ensayo de genotipado de polimerasa (NS5B)           | Secuenciación                 |
| 63        | 1a_NS5B_R1s       | CAGCGGGTATGA<br>TAGGAGAA     | Ensayo de genotipado de polimerasa (NS5B)           | Secuenciación                 |
| 64        | 1a_NS5B_F2s       | GCACCATGCTCGT<br>GTGTG       | Ensayo de genotipado de polimerasa (NS5B)           | Secuenciación                 |
| 65        | 1a_NS5B_R2s       | GTCATCAGTATCA<br>TCCTCGCC    | Ensayo de genotipado de polimerasa (NS5B)           | Secuenciación                 |
| 66        | 1a_NS5B_F3s       | CGACTC CATGGTC<br>TTAGCG     | Ensayo de genotipado de polimerasa (NS5B)           | Secuenciación                 |

ES 2 546 190 T3

| SEC ID N° | Nombre de cebador | Secuencia (5' a 3')                  | Observación   | Amplificación/ Secuenciación  |
|-----------|-------------------|--------------------------------------|---|-------------------------------|
| 67        | 1b_NS3/4A out_R   | GAGCGCCTTCTGT<br>TTGAATTG            | Ensayo de genotipado de proteasa (NS3/4A)           | Amplificación                 |
| 68        | 1b_NS3/4A_in_R    | CTGTTTGAATTGC<br>TCGGCGAG            | Ensayo de genotipado de proteasa (NS3/4A)           | Amplificación y secuenciación |
| 69        | 1b_NS3/4A_out_F   | ATGCATGCTGGTG<br>CGGAA               | Ensayo de genotipado de proteasa (NS3/4A)           | Amplificación                 |
| 70        | 1b_NS3/4A_in_F    | TGGTGCAGAAAG<br>TCGCTGG              | Ensayo de genotipado de proteasa (NS3/4A)           | Amplificación                 |
| 71        | 1b_NS2_F1s        | GGTCATTATGTCC<br>AAATGGC             | Ensayo de genotipado de proteasa (NS3/4A)           | Secuenciación                 |
| 72        | 1b_NS3_F1s        | CGGCAGCTCGGA<br>CCTTTA               | Ensayo de genotipado de proteasa (NS3/4A)           | Secuenciación                 |
| 73        | 1b_NS3_R2s        | CACTTGGAAATGTC<br>TGCGGTAC           | Ensayo de genotipado de proteasa (NS3/4A)           | Secuenciación                 |
| 74        | 1b_NS3_F2s        | GATGAGTGCCAC<br>TCAACTGACT           | Ensayo de genotipado de proteasa (NS3/4A)           | Secuenciación                 |
| 75        | 1b_NS3_R3s        | CGTCTGTTGCCAC<br>GACAA               | Ensayo de genotipado de proteasa (NS3/4A)           | Secuenciación                 |
| 76        | 1b_NS3_F3s        | CTATGACGCGGG<br>CTGTG                | Ensayo de genotipado de proteasa (NS3/4A)           | Secuenciación                 |
| 77        | 1b_NS3_R4s        | AGCCGTATGAGA<br>CACTTCCAC            | Ensayo de genotipado de proteasa (NS3/4A)           | Secuenciación                 |
| 78        | 1b_NS4B/5A_out_R  | GCATAGACCATG<br>TTGTGGTGACG          | Ensayo de genotipado de NS4B/5A                     | Amplificación                 |
| 79        | 1b_NS4B/5A_in_R   | GTGACGCAGCAA<br>AGAGTTGCTCA          | Ensayo de genotipado de NS4B/5A                     | Amplificación y secuenciación |
| 80        | 1b_NS4B/5A_out_F  | AGCGTGGTCATTG<br>TGGGCAG             | Ensayo de genotipado de NS4B/5A                     | Amplificación                 |
| 81        | 1b_NS4B/5A_in_F   | GGGC AGG ATC AT<br>CTTGTGCGG         | Ensayo de genotipado de NS4B/5A                     | Amplificación y secuenciación |
| 82        | 1b_NS4B_R1s       | TTCCAAGGCCTA<br>TGCTG                | Ensayo de genotipado de NS4B/5A                     | Secuenciación                 |
| 83        | 1b_NS4B_F2s       | GGATGAACCGGC<br>TGATAGC              | Ensayo de genotipado de NS4B/5A                     | Secuenciación                 |
| 84        | 1b_NS5A_R1s       | ATGGAACCGTTTT<br>TGACATGT            | Ensayo de genotipado de NS4B/5A                     | Secuenciación                 |
| 85        | 1b_NS5A_F1s       | GGGCATGACCAC<br>TGACAAC              | Ensayo de genotipado de NS4B/5A                     | Secuenciación                 |
| 86        | 1b_NS5A_R2s       | CCACAGGAGGTT<br>GGCCT                | Ensayo de genotipado de NS4B/5A                     | Secuenciación                 |
| 87        | 1b_NS5A_F2s       | CACGGGTGCCCA TTGC                    | Ensayo de genotipado de NS4B/5A y polimerasa (NS5B) | Secuenciación                 |
| 88        | 1b_NS5B_F1s       | AAGGAGATGAAG<br>GCGAAGG              | Ensayo de genotipado de polimerasa (NS5B)           | Secuenciación                 |
| 89        | 1b_NS5B_R1s       | CATCACGGCCTG<br>AGGAAG               | Ensayo de genotipado de polimerasa (NS5B)           | Secuenciación                 |
| 90        | 1b_NS5B_F2s       | TCGCTCACAGAG<br>CGGCT                | Ensayo de genotipado de polimerasa (NS5B)           | Secuenciación                 |
| 91        | 1b_NS5B_R2s       | TGGAGGAGCATG<br>ATGTTATCA            | Ensayo de genotipado de polimerasa (NS5B)           | Secuenciación                 |
| 92        | 1b_NS5B_F3s       | CGACTCCATGGTC<br>TTAGCG              | Ensayo de genotipado de polimerasa (NS5B)           | Secuenciación                 |
| 93        | 2a_NS3/4A in_F    | GTAGGTGGACTG<br>GCACTTACATCTA<br>TGA | Ensayo de genotipado de proteasa (NS3/4A)           | Amplificación                 |
| 94        | 2a_NS3/4A out_F   | CGCTATTAGCCCT<br>TGGTAGGTGG          | Ensayo de genotipado de proteasa (NS3/4A)           | Amplificación                 |
| 95        | 2a_NS3/4A in_R    | AAATGCCCCGAC<br>CATACCC              | Ensayo de genotipado de proteasa (NS3/4A)           | Amplificación y secuenciación |

ES 2 546 190 T3

| SEC ID N° | Nombre de cebador | Secuencia (5' a 3')              | Observación   | Amplificación/ Secuenciación  |
|-----------|-------------------|----------------------------------|---|-------------------------------|
| 96        | 2a_NS3/4A out_R   | GGCTTCTCGCCAG<br>ACATGATCTT      | Ensayo de genotipado de proteasa (NS3/4A)           | Amplificación                 |
| 97        | 2a_NS2_F2sb       | CACGGACTTCCCG<br>TGTC            | Ensayo de genotipado de proteasa (NS3/4A)           | Secuenciación                 |
| 98        | 2a_NS3_R1sb       | TGCCAGTTGGGG CATG                | Ensayo de genotipado de proteasa (NS3/4A)           | Secuenciación                 |
| 99        | 2a_NS3_F1s        | TCCGGGCAGCTGT GTG                | Ensayo de genotipado de proteasa (NS3/4A)           | Secuenciación                 |
| 100       | 2a_NS3_R2s        | CGTCTTGAGGGA<br>CAGTCTGTG        | Ensayo de genotipado de proteasa (NS3/4A)           | Secuenciación                 |
| 101       | 2a_NS3_F2s        | GGAGGGTGAGAT<br>CCCCTTCTA        | Ensayo de genotipado de proteasa (NS3/4A)           | Secuenciación                 |
| 102       | 2a_NS4B_R1s       | GAAGTTCACAT<br>GTGTTTGGC         | Ensayo de genotipado de proteasa (NS3/4A)           | Secuenciación                 |
| 103       | 2a_NS3_F3s        | GTAGTGCTCTGTG<br>AGTGCTACG       | Ensayo de genotipado de proteasa (NS3/4A)           | Secuenciación                 |
| 104       | 2a_NS3_in_F       | ATCTTAGACGGAC<br>TCCCCGTGTC      | 181 aa N-terminales del ensayo de genotipado de NS3 | Amplificación y secuenciación |
| 105       | 2a_NS3_out_F      | ATGCGGGGACAT<br>CTTACACGG        | 181 aa N-terminales del ensayo de genotipado de NS3 | Amplificación                 |
| 106       | 2a_NS3_in_R       | TGGGGCATGCAA<br>GTACCCGAC        | 181 aa N-terminales del ensayo de genotipado de NS3 | Amplificación y secuenciación |
| 107       | 2a_NS3_out_R      | CACTGCCAGTTGG<br>GGCATG          | 181 aa N-terminales del ensayo de genotipado de NS3 | Amplificación                 |
| 108       | 2b_NS3/4A_in_F    | TACGGATACCAT<br>AGTTTGTGAGGGC    | Ensayo de genotipado de proteasa (NS3/4A)           | Amplificación                 |
| 109       | 2b_NS3/4A out F   | TCTCTGCT AC GG A<br>TACCATACTTTG | Ensayo de genotipado de proteasa (NS3/4A)           | Amplificación                 |
| 110       | 2b_NS3/4A_in_R    | TCCACCAGTATCT<br>TACCCAGCCTA     | Ensayo de genotipado de proteasa (NS3/4A)           | Amplificación                 |
| 111       | 2b_NS3/4A_out_R   | ACGTCCACCAGT<br>ATCTTACCCA       | Ensayo de genotipado de proteasa (NS3/4A)           | Amplificación                 |
| 112       | 2b_NS2_F1s        | ACGAGTGTGTAC<br>CCTGGTGA         | Ensayo de genotipado de proteasa (NS3/4A)           | Secuenciación                 |
| 113       | 2b_NS3_F1s        | GACCCCTGTACCT<br>GCGG            | Ensayo de genotipado de proteasa (NS3/4A)           | Secuenciación                 |
| 114       | 2b_NS3_R2s        | GCAAGTAGCCCA<br>CCTGGTAAG        | Ensayo de genotipado de proteasa (NS3/4A)           | Secuenciación                 |
| 115       | 2b_NS3_F2s        | GCCATTAGTGG<br>ACGCCAC           | Ensayo de genotipado de proteasa (NS3/4A)           | Secuenciación                 |
| 116       | 2b_NS3_R3s        | CCTTGAGTTGGTA<br>TAACGGAGAC      | Ensayo de genotipado de proteasa (NS3/4A)           | Secuenciación                 |
| 117       | 2b_NS3_F3s        | GCTCTGTGAGTGC<br>TATGATGC        | Ensayo de genotipado de proteasa (NS3/4A)           | Secuenciación                 |
| 118       | 2b_NS3_R4s        | GGTAGGACCAGT<br>CAGTGTAGGTTT     | Ensayo de genotipado de proteasa (NS3/4A)           | Secuenciación                 |
| 119       | 2b_NS4B_R1s       | CAACGAAGCCAG<br>TGGCTC           | Ensayo de genotipado de proteasa (NS3/4A)           | Secuenciación                 |
| 120       | 2b_NS3_in_F       | TGCATGGCCTCCC<br>GGTTTC          | 181 aa N-terminales del ensayo de genotipado de NS3 | Amplificación y secuenciación |
| 121       | 2b_NS3_out_F      | CATGTGGAGACA<br>TCCTGCATGG       | 181 aa N-terminales del ensayo de genotipado de NS3 | Amplificación                 |
| 122       | 2b_NS3_in_R       | TTGGTGCATGCAA<br>GTAGCCAC        | 181 aa N-terminales del ensayo de genotipado de NS3 | Amplificación y secuenciación |

ES 2 546 190 T3

| SEC ID N° | Nombre de cebador | Secuencia (5' a 3')                 | Observación   | Amplificación/ Secuenciación  |
|-----------|-------------------|-------------------------------------|---|-------------------------------|
| 123       | 2b_NS3_out_R      | CGCTGCCTGTTGG<br>TGCATG             | 181 aa N-terminales del ensayo de genotipado de NS3 | Amplificación                 |
| 124       | 2b_NS5B_in_F      | CTTCTGTACCATC<br>AGAGTACCTGAT<br>CA | Ensayo de genotipado de polimerasa (NS5B)           | Amplificación y secuenciación |
| 125       | 2b_NS5B_out_F     | GTGAGCCTTCTGT<br>ACCATCAGAGTA<br>C  | Ensayo de genotipado de polimerasa (NS5B)           | Amplificación                 |
| 126       | 2b_NS5B_out_R     | ATGGAGTGTAGC<br>TAGGGTTTGCC         | Ensayo de genotipado de polimerasa (NS5B)           | Amplificación                 |
| 127       | 2b_NS5B_R_in      | TGTAGCTAGGGTT<br>TGCCGCTCTA         | Ensayo de genotipado de polimerasa (NS5B)           | Amplificación y secuenciación |
| 128       | 2b_NS5A_F2s       | GAACCACCCACT<br>GTCCTAGG            | Ensayo de genotipado de polimerasa (NS5B)           | Secuenciación                 |
| 129       | 2b_NS5B_F1s       | GCACACTATGACT<br>CAGTCTTGCA         | Ensayo de genotipado de polimerasa (NS5B)           | Secuenciación                 |
| 130       | 2b_NS5B_R1s       | CATCTTTTCGCAC<br>ACCCTG             | Ensayo de genotipado de polimerasa (NS5B)           | Secuenciación                 |
| 131       | 2b_NS5B_F2s       | TAG GTAGG AGGG<br>CCCATG            | Ensayo de genotipado de polimerasa (NS5B)           | Secuenciación                 |
| 132       | 2b_NS5B_R2s       | AGCGCTACCGAT<br>ACGTTTG             | Ensayo de genotipado de polimerasa (NS5B)           | Secuenciación                 |
| 133       | 2b_NS5B_F3s       | CCGGGCATAATTG<br>AAAGG              | Ensayo de genotipado de polimerasa (NS5B)           | Secuenciación                 |
| 134       | 3a_NS3/4A_in_F    | ATGCTCGTGCCT<br>CCGTGAT             | Ensayo de genotipado de proteasa (NS3/4A)           | Amplificación '               |
| 135       | 3a_NS3/4A_out_F   | CTTTGCATGCTCG<br>TGCGCTC            | Ensayo de genotipado de proteasa (NS3/4A)           | Amplificación                 |
| 136       | 3a_NS3/4A_in_R    | TACTATGGGCTCA<br>ATGACAGC TTGTT G   | Ensayo de genotipado de proteasa (NS3/4A)           | Amplificación y secuenciación |
| 137       | 3a_NS3/4A_out_R   | GGTAGCTACTATG<br>GGCTCAATGACA<br>GC | Ensayo de genotipado de proteasa (NS3/4A)           | Amplificación                 |
| 138       | 3a_NS2_F1s        | TACTTCCAGATGA<br>TCATACTGAGC        | Ensayo de genotipado de proteasa (NS3/4A)           | Secuenciación                 |
| 139       | 3a_NS3_F1s        | ACTTATACTTGGT<br>TACGCGCG           | Ensayo de genotipado de proteasa (NS3/4A)           | Secuenciación                 |
| 140       | 3a_NS3_R2s        | TCTTACCGCTGCC<br>GGTC               | Ensayo de genotipado de proteasa (NS3/4A)           | Secuenciación                 |
| 141       | 3a_NS3_F2s        | TCTTAGATCAGGC<br>TGAGACGG           | Ensayo de genotipado de proteasa (NS3/4A)           | Secuenciación                 |
| 142       | 3a_NS3_R3s        | CTGTTGTTGGTAT<br>GACGGACA           | Ensayo de genotipado de proteasa (NS3/4A)           | Secuenciación                 |
| 143       | 3a_NS3_F3s        | AGCCCGCTGAGA<br>CCACA               | Ensayo de genotipado de proteasa (NS3/4A)           | Secuenciación                 |
| 144       | 3a_NS3_R4s        | ATGTAGTGTTGGC<br>TTAAGCCG           | Ensayo de genotipado de proteasa (NS3/4A)           | Secuenciación                 |
| 145       | 3a_NS3_out_R      | CTGCCGGTCCGGG<br>GCATG              | 181 aa N-terminales del ensayo de genotipado de NS3 | Amplificación                 |
| 146       | 3a_NS3_in_R       | GGTCGGGGCATG<br>AAGGTATCCTAC        | 181 aa N-terminales del ensayo de genotipado de NS3 | Amplificación y secuenciación |
| 147       | 3a_NS3_out_F      | CTTGCGGAGATAT<br>TCTTTGCGG          | 181 aa N-terminales del ensayo de genotipado de NS3 | Amplificación                 |
| 148       | 3a_NS3_in_F       | TTGCGGGCTGCCC<br>GTCTC              | 181 aa N-terminales del ensayo de genotipado de NS3 | Amplificación y secuenciación |



ES 2 546 190 T3

| SEC ID N° | Nombre de cebador | Secuencia (5' a 3')                    | Observación   | Amplificación/ Secuenciación  |
|-----------|-------------------|--|---|-------------------------------|
| 149       | 3a NS4B/5A_out_R  | CGACGTTGAATA<br>GACTAGGTTATG<br>ATGTCT | Ensayo de genotipado de NS4B/5A                     | Amplificación                 |
| 150       | 3a NS4B/5A_out_F  | CCCTAGCGGCCTA<br>CTGCTTG               | Ensayo de genotipado de NS4B/5A                     | Amplificación                 |
| 151       | 3a NS4B/5A_in_F   | GGCCTACTGCTTG<br>TCAGTCGG              | Ensayo de genotipado de NS4B/5A                     | Amplificación                 |
| 152       | 3a_NS4A_F1s       | GCCTACTGCTTGT<br>CAGTCGG               | Ensayo de genotipado de NS4B/5A                     | Secuenciación                 |
| 153       | 3a_NS4B_R1s       | ATACCCCTATGG<br>CAGCG                  | Ensayo de genotipado de NS4B/5A                     | Secuenciación                 |
| 154       | 3a_NS4B_F2s       | ACAGTGGATGAA<br>CAGGCTCAT              | Ensayo de genotipado de NS4B/5A                     | Secuenciación                 |
| 155       | 3a_NS5A_R1s       | TGACAGGAAATG<br>AAGGGCAG               | Ensayo de genotipado de NS4B/5A                     | Secuenciación                 |
| 156       | 3a_NS5A_F1s       | TGAAGTGGATGG<br>GGTGAGA                | Ensayo de genotipado de NS4B/5A                     | Secuenciación                 |
| 157       | 3a_NS5A_R2s       | TGAGGCCTATGC<br>GTCTGG                 | Ensayo de genotipado de NS4B/5A                     | Secuenciación                 |
| 158       | 3a_NS5A_F2s       | CACCAACTGTCC<br>ATGGATG                | Ensayo de genotipado de NS4B/5A y polimerasa (NS5B) | Secuenciación                 |
| 159       | 3a NS4B/5A_in_R   | TTATGATGTCTCA<br>ACAAGGAGTTGC<br>TGA   | Ensayo de genotipado de NS4B/5A                     | Amplificación y secuenciación |
| 160       | 3a_NS5B_out_R     | AGTGTTATCTTAC<br>CAGCTCACCGAG<br>C     | Ensayo de genotipado de polimerasa (NS5B)           | Amplificación                 |
| 161       | 3a_NS5B_in_R      | ATCTTACCAGCTC<br>ACCGAGCTGGC           | Ensayo de genotipado de polimerasa (NS5B)           | Amplificación y secuenciación |
| 162       | 3a_NS5B_out_F     | GTATCCTCCAGCC<br>CTTCCTATCTG           | Ensayo de genotipado de polimerasa (NS5B)           | Amplificación                 |
| 163       | 3a_NS5B_in_F      | CAGCCCTCCTAT<br>CTGGGCTAG              | Ensayo de genotipado de polimerasa (NS5B)           | Amplificación y secuenciación |
| 164       | 3a_NS5B_F1s       | TCGGGTATAGTGC<br>GAAGGA                | Ensayo de genotipado de polimerasa (NS5B)           | Secuenciación                 |
| 165       | 3a_NS5B_R1s       | CTTCAGCAGACGT<br>TCGACC                | Ensayo de genotipado de polimerasa (NS5B)           | Secuenciación                 |
| 166       | 3a_NS5B_F2s       | TACATCAAGGCC<br>ACAGCG                 | Ensayo de genotipado de polimerasa (NS5B)           | Secuenciación                 |
| 167       | 3a_NS5B_R2s       | CTGGAGTGTGAC<br>GAGCTGT                | Ensayo de genotipado de polimerasa (NS5B)           | Secuenciación                 |
| 168       | 3a_NS5B_F3s       | CTTGGAGACATC<br>GGGCAC                 | Ensayo de genotipado de polimerasa (NS5B)           | Secuenciación                 |
| 169       | 4a/d NS3/4A_in_F  | GCGCGTCCCTTAC<br>TTCGTGAG              | Ensayo de genotipado de proteasa (NS3/4A)           | Amplificación                 |
| 170       | 4a/d NS3/4A_out_F | GCTCCTGCGCGTC<br>CCTTAC                | Ensayo de genotipado de proteasa (NS3/4A)           | Amplificación                 |
| 171       | 4a/d NS3/4A_in_R  | GTAGCCAGCGAG<br>GATGTCCACTAG           | Ensayo de genotipado de proteasa (NS3/4A)           | Amplificación y secuenciación |
| 172       | 4a/d NS3/4A_out_R | CATCTCGCCGCTC<br>ATGATCTT              | Ensayo de genotipado de proteasa (NS3/4A)           | Amplificación                 |
| 173       | 4a/d_NS2_F1s      | GCGTCC CTTACTT<br>CGTGAG               | Ensayo de genotipado de proteasa (NS3/4A)           | Secuenciación                 |
| 174       | 4a/d_NS3_F1s      | CCGTGCGCAGGA GAGG                      | Ensayo de genotipado de proteasa (NS3/4A)           | Secuenciación                 |
| 175       | 4a/d_NS3_F2s      | C AC GGTCTTGG AC<br>CAAGC              | Ensayo de genotipado de proteasa (NS3/4A)           | Secuenciación                 |
| 176       | 4a/d_NS3_F3s      | GCCTGGTACGAA<br>CTGACACC               | Ensayo de genotipado de proteasa (NS3/4A)           | Secuenciación                 |
| 177       | 4a/d_NS3_R2s      | GCCACTTCTGTT<br>GGTGC                  | Ensayo de genotipado de proteasa (NS3/4A)           | Secuenciación                 |

ES 2 546 190 T3

| SEC ID N° | Nombre de cebador  | Secuencia (5' a 3')            | Observación   | Amplificación/ Secuenciación  |
|-----------|--------------------|--------------------------------|---|-------------------------------|
| 178       | 4a/d_NS3_R3s       | CTGAGTCAAAGT<br>CGCCGGT        | Ensayo de genotipado de proteasa (NS3/4A)           | Secuenciación                 |
| 179       | 4a/d_NS3_R4s       | GACATGCAGGCC<br>ATGATGTA       | Ensayo de genotipado de proteasa (NS3/4A)           | Secuenciación                 |
| 180       | 4a/d_NS3_in_F      | TAAGGGGATTAC<br>CTGTCTCGGC     | 181 aa N-terminales del ensayo de genotipado de NS3 | Amplificación y secuenciación |
| 181       | 4a/d_NS3_out_F     | AGTTGTGTTACAG<br>CCCATGGAG     | 181 aa N-terminales del ensayo de genotipado de NS3 | Amplificación                 |
| 182       | 4a/d_NS3_in_R      | GGGACTTTGGTGC<br>TCTTGCC       | 181 aa N-terminales del ensayo de genotipado de NS3 | Amplificación y secuenciación |
| 183       | 4a/d_NS3_out_R     | TCGATGCCATATG<br>CCTTGGAC      | 181 aa N-terminales del ensayo de genotipado de NS3 | Amplificación                 |
| 184       | 4a/d_NS4B/5A_out_F | TTTCAGTGGGCAG<br>CGTGTT        | Ensayo de genotipado de NS4B/5A                     | Amplificación                 |
| 185       | 4a/d_NS4B/5A_in_F  | AGCGTGGTGATC<br>GTCGGGAG       | Ensayo de genotipado de NS4B/5A                     | Amplificación y secuenciación |
| 186       | 4a/d_NS4B/5A_out_R | CCTGCAGGCGGT<br>CGAAGG         | Ensayo de genotipado de NS4B/5A                     | Amplificación                 |
| 187       | 4a/d_NS4B/5A_in_R  | CGAAGGTCACCTT<br>CTTCTGCCG     | Ensayo de genotipado de NS4B/5A                     | Amplificación y secuenciación |
| 188       | 4a/d_NS4B_R1s      | AGACATGAGGGA<br>AGCAATGG       | Ensayo de genotipado de NS4B/5A                     | Secuenciación                 |
| 189       | 4a/d_NS4B_F1sb     | TGTGCAGTGGAT<br>GAACCG         | Ensayo de genotipado de NS4B/5A                     | Secuenciación                 |
| 190       | 4a/d_NS5A_R1s      | ACTCTGCGAACCT<br>CCACG         | Ensayo de genotipado de NS4B/5A                     | Secuenciación                 |
| 191       | 4a/d_NS5A_F1s      | GTTGACAGACCC<br>ATCACACAT      | Ensayo de genotipado de NS4B/5A                     | Secuenciación                 |
| 192       | 4a/d_NS5A_R2s      | TCGTCTGTCTCAA<br>CCCTGGT       | Ensayo de genotipado de NS4B/5A                     | Secuenciación                 |
| 193       | 4a/d_NS5A_F2sb     | TCTTACTCGTCAA<br>TGCTCC        | Ensayo de genotipado de NS4B/5A                     | Secuenciación                 |
| 194       | 4a/d_NS5B_out_F    | CGGGGTAACACA<br>AGATAACATCAA G | Ensayo de genotipado de polimerasa (NS5B)           | Amplificación                 |
| 195       | 4a/d_NS5B_out_R    | ACCCTAAGGTCCG<br>GAGTGTTAAGCT  | Ensayo de genotipado de polimerasa (NS5B)           | Amplificación                 |
| 196       | 4a/d_NS5B_in_F     | ACAAGATAACAT<br>CAAGTGCCCCTG   | Ensayo de genotipado de polimerasa (NS5B)           | Amplificación                 |
| 197       | 4a/d_NS5B_in_R     | AAGGTCGGAGTG<br>TTAAGCTGCCTA   | Ensayo de genotipado de polimerasa (NS5B)           | Amplificación y secuenciación |
| 198       | 4a/d_NS5A_F2sc     | CTTATTCGTCAAT<br>GCCTCCAC      | Ensayo de genotipado de polimerasa (NS5B)           | Secuenciación                 |
| 199       | 4a/d_NS5B_F1s      | ATCATGGCCAAA<br>AATGAGGT       | Ensayo de genotipado de polimerasa (NS5B)           | Secuenciación                 |
| 200       | 4a/d_NS5B_F2s      | GCCTTACGGAG<br>GCTATGAC        | Ensayo de genotipado de polimerasa (NS5B)           | Secuenciación                 |
| 201       | 4a/d_NS5B_F3bs     | TGTGGCATATACC<br>TCTTTAACTGG   | Ensayo de genotipado de polimerasa (NS5B)           | Secuenciación                 |
| 202       | 4a/d_NS5B_R2s      | GGAGTCAAAGCA<br>GCGGG          | Ensayo de genotipado de polimerasa (NS5B)           | Secuenciación                 |
| 203       | 4a/d_NS5B_R3s      | CAGGAATTGACT<br>GGAGTGTGTC     | Ensayo de genotipado de polimerasa (NS5B)           | Secuenciación                 |
| 204       | 4a/d_NS5B_R4s      | GCACAGGAGTAA<br>ATAGCGGG       | Ensayo de genotipado de polimerasa (NS5B)           | Secuenciación                 |

LISTADO DE SECUENCIAS

|    |   |    |
|----|---|----|
|    | <110> Virco BVBA  |    |
| 5  | <120> Método para determinar mutaciones de resistencia a fármacos en cualquiera de las regiones de las proteínas no estructurales NS3 a NS5B del virus de la hepatitis C (VHC) para los genotipos 1 a 6 |    |
|    | <130> VIP 030 PCT   |    |
| 10 | <150> EP08165949<br><151> 06-10-2008  |    |
|    | <160> 204   |    |
| 15 | <170> PatentIn versión 3.3  |    |
|    | <210> 1<br><211> 31<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C   |    |
| 20 | <400> 1<br>tggggttcgc gtatgatacc cgctgctttg a   | 31 |
| 25 | <210> 2<br><211> 31<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C   |    |
| 30 | <400> 2<br>tggggtttc ttacgacacc aggtgctttg a  | 31 |
| 35 | <210> 3<br><211> 29<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C   |    |
| 40 | <400> 3<br>ccgatgata cccgctgctt tgactcaac   | 29 |
| 45 | <210> 4<br><211> 29<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C   |    |
| 50 | <400> 4<br>tcctacgaca ccaggtgctt tgattcaac  | 29 |
| 55 | <210> 5<br><211> 30<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C   |    |
| 60 | <400> 5<br>aattcctggt catagcctcc gtgaagactc   | 30 |
| 65 | <210> 6<br><211> 23<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C   |    |
|    | <400> 6<br>gcgtgtgggg acatcatctt agg  | 23 |
| 65 | <210> 7<br><211> 18   |    |

ES 2 546 190 T3

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

5 <400> 7  
gctgccagtg ggagcgtg 18

10 <210> 8  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> Virus de la hepatitis C

15 <400> 8  
tcacttagg cctgcccgtc tc 22

20 <210> 9  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Virus de la hepatitis C

25 <400> 9  
gggagcgtgt agatggcca c 21

<210> 10  
<211> 12003  
<212> ADN  
<213> Virus de la hepatitis C

<400> 10

ctccaccata gatcactccc ctgtgaggaa ctactgtctt cacgcagaaa gcgtctagcc 60

atggcgtag tatgagtgtc gtgcagctc caggaccccc cctcccggga gagccatagt 120

ggtctgcgga accggtgagt acaccggaat tgccaggacg accgggtcct ttcttgatc 180

aaccgctca atgcctggag atttggcgt gcccccgcga gactgctagc cgagttagtgt 240

tgggtcgcga aaggccttgt ggtactgct gataggggtc ttgcgagtgc cccgggaggt 300

ctcgtagacc gtgcaccgtt taaacccccg tgctgctgga agtcgatttc gcttagggta 360

accgtggacc tcgaaaacag acgcacaaaa ccaagttcaa tagaaggggg taaaaaccag 420

taccaccag aacaagcaact tetgtttccc cggatgatgc gtatagactg cttgcgtggt 480

30 tgaaagcgac ggatccgta tccgcttatg tacttcgaga agcccagtac cacctcggaa 540

ES 2 546 190 T3

tcttcgatgc gttgcgctca gcactcaacc ccagagtgta gcttaggctg atgagctctgg 600  
acatccctca ccggtgacgg tggccaggc tgcggtggcg gcctacctat ggctaacgcc 660  
atgggacgct agttgtgaac aagggtgtgaa gagcctattg agctacataa gaatcctccg 720  
gcccctgaat gcggctaate ccaacctcgg agcagggtggc cacaaccag tgattggcct 780  
gtcgtaacgc gcaagtcctg ggcggaaccg actactttgg gtgtccgtgt ttccttttat 840  
tttattgtgg ctgcttatgg tgacaatcac agattgttat cataaagcga attggattgg 900  
ccatccggtg aaagtgagac tcattatcta tctgtttgct ggatccgctc cattgagtgt 960  
gtttactcta agtacaattt caacagttat tccaatcaga caattgtatc ataatggcgg 1020  
gcccagaaga cgccaaaaac ataaaggaag gccggcgccc attctatcct ctagaggatg 1080  
gaaccgctgg agagcaactg cataaggcta tgaagagata cgccctggtt cctggaacaa 1140  
ttgcttttac agatgcacat atcgaggta acatcacgta cgcggaatac ttcgaaatgt 1200  
ccgttcgggtt ggcagaagct atgaaacgat atgggctgaa tacaacacac agaatcgtcg 1260  
tatgcagtga aaactctctt caattcttta tgccgggtgtt gggcgcgta tttatcggag 1320  
ttgcagttgc gcccgcgaac gacatttata atgaacgtga attgctcaac agtatgaaca 1380  
tttcgcagcc taccgtagtg tttgtttcca aaaaggggtt gcaaaaaatt ttgaacgtgc 1440  
aaaaaaaaatt accaataatc cagaaaatta ttatcatgga ttctaaaacg gattaccagg 1500  
gatttcagtc gatgtacacg ttcgtcacat ctcatctacc tcccggtttt aatgaatacg 1560  
atthttgtacc agagtccttt gatcgtgaca aaacaattgc actgataatg aattcctctg 1620  
gatctactgg gttacctaag ggtgtggccc ttcgcgatag aactgcctgc gtcagattct 1680  
cgcatgccag agatcctatt tttggcaatc aaatcattcc ggatactgcg attttaagtg 1740  
ttgttccatt ccatcacggt tttggaatgt ttactacact cggatatttg atatgtggat 1800  
ttcgagtcgt cttaatgtat agatttgaag aagagctggt tttacgatcc cttcaggatt 1860  
acaaaattca aagtgcggtg ctagtaccaa ccctatthtc attcttcgcc aaaagcactc 1920  
tgattgacaa atacgattta tctaatttac acgaaattgc ttctgggggc gcacctcttt 1980  
cgaaagaagt cggggaagcg gttgcaaac gcttccatct tccagggata cgacaaggat 2040  
atgggctcac tgagactaca tcagctattc tgattacacc cgaggggggat gataaacggg 2100  
gcgoggtcgg taaagttggt ccattthttg aagcgaagggt tgtggatctg gataccggga 2160  
aaacgctggg cgthaatcag agaggcgaat tatgtgtcag aggacctatg attatgtccg 2220  
gttatgtaaa caatccggaa gcgaccaacg ccttgattga caaggatgga tggctacatt 2280  
ctggagacat agcttactgg gacgaagacg aacacttctt catagttgac cgcttgaagt 2340  
ctthtaattaa atacaaagga taccaggtgg cccccgctga attggaatcg atattgttac 2400

ES 2 546 190 T3

aacaccccaa catcttcgac gcgggcgtgg caggtcttcc cgacgatgac gccgggtgaac 2460  
ttcccgcgcg cgttgttggt ttggagcacg gaaagacgat gacggaaaaa gagatcgtgg 2520  
attacgtcgc cagtcaagta acaaccgcga aaaagttgcg cggaggagtt gtgtttgtgg 2580  
acgaagtacc gaaaggtctt accggaaaac tcgacgcaag aaaaatcaga gagatcctca 2640  
taaaggccaa gaagggcgga aagtccaaat tgtaagcggc cgcggttgta aacagaccac 2700  
aacggtttcc ctctagcggg atcaattccg ccccccccc ctaacgttac tagccgaagc 2760  
cgcttggaat aaggccggtg tgcgtttgtc tatatgttat ttccaccat attgccgtct 2820  
tttggcaatg tgagggcccg gaaacctggc cctgtcttct tgacgagcat tcctaggggt 2880  
ctttcccctc tcgccaaggt aatgcaaggt ctggtgaatg tcgtgaagga agcagttcct 2940  
ctggaagctt cttgaagaca aacaacgtct gtagcgcacc tttgcaggca gccggaacccc 3000  
ccacctggcg acaggtgcct ctgcggccaa aagccacgtg tataagatac acctgcaaag 3060  
gcggcacaac cccagtgcc a gttgtgagt tggatagttg tggaaagagt caaatggctc 3120  
tcctcaagcg tattcaacaa ggggctgaag gatgcccaga aggtacccca ttgtatggga 3180  
tctgatctgg ggccctcgtg cacatgcttt acatgtgttt agtcgaggtt aaaaaaacgt 3240  
ctaggccccc cgaaccacgg ggacgtggtt ttcccttgaa aaacacgata ataccatggc 3300  
gcctattacc gcggtaccgc agacattcca ggtggcccat ctacacgccc ctactggtag 3360  
cggcaagagc actaaggtgc cggctgcgta tgcagcccaa gggataaagg tgcttgcct 3420  
gaacccgtcc gtcgccgcca ccttaggttt cggggcgtat atgtctaagg cacatggtat 3480  
cgaccctaac atcagaatcg gggtaaggac catcaccacg ggtgccccca tcacgtactc 3540  
cacctatggc aagtttcttg ccgacggtgg ttgctctggg ggcgcctatg acatcataat 3600  
atgtgatgag tgccactcaa ctgactcgac cactatcctg ggcacggca cagtcctgga 3660  
ccaagcggag acggctggag cgcgactcgt cgtgctcgcc accgctacgc ctccgggatc 3720  
ggtcaccgtg ccacatccaa acatcgagga ggtggctctg tccagcactg gagaaatccc 3780  
cttttatggc aaagccatcc ccatcgagac catcaagggg gggaggcacc tcattttctg 3840  
ccattccaag aagaaatgtg atgagctcgc cgcgaagctg tccggcctcg gactcaatgc 3900  
tgtagcatat tacoggggcc ttgatgtatc cgtcatacca actagcggag acgtcattgt 3960  
cgtagcaacg gacgctctaa tgacgggctt taccggcgat ttcgactcag tgatcgactg 4020  
caatacatgt gtcaccaga cagtcgactt cagcctggac ccgacctca ccattgagac 4080  
gacgaccgtg ccacaagacg cgggtgcacg ctgcgacgg cgaggcagga ctggtagggg 4140  
caggatgggc atttacaggt ttgtgactcc aggagaacgg cctcgggca tgttcgattc 4200

ES 2 546 190 T3

ctcggttctg tgcgagtgct atgacgcggg ctgtgcttgg tacgagctca cgcccccca 4260  
gacctcagtt aggttgccgg cttacctaaa cacaccaggg ttgcccgctc gccaggacca 4320  
tctggagttc tgggagagcg tctttacagg cctcaccacc atagacgccc atttcttgtc 4380  
ccagactaag caggcaggag acaacttccc ctacctggta gcataccagg ctacgggtgtg 4440  
cgccagggtc caggctccac ctccatcgtg ggaccaaaatg tggagtgctc tcatacggct 4500  
aaagcctacg ctgcacgggc caacgcccct gctgtatagg ctgggagccg ttcaaaacga 4560  
ggttactacc acacacccca taaccaaata catcatggca tgcattgtcg ctgacctgga 4620  
ggtcgtcagc agcacctggg tgcctggtag cggagtccta gcagctctgg ccgcgtattg 4680  
cctgacaaca ggcagcgtgg tcattgtggg caggatcctc ttgtccgaa agccggccat 4740  
cattcccagc agggaagtcc tttaccggga gttcagtag atggaagagt gcgcctcaca 4800  
cctcccttac atcgaacagg gaatgcagct cgcgaacaa ttcaaacaga aggcaatcg 4860  
gttgcctgca acagccacca agcaagcggg ggctgctgct ccgctgggtg aatccaagt 4920  
gcggacctc gaagccttct gggcgaagca tatgtggaat ttcatcagcg ggatacaata 4980  
tttagcaggc ttgtccactc tgcttgcaa ccccgcgata gcactactga tggcattcac 5040  
agcctctatc accagccccg tcaccaccca acataccctc ctgtttaaca tctgggggg 5100  
atgggtggcc gcccaacttg ctctcccag cgtgcttctc gctttcgtag gcgcggcat 5160  
cgctggagcg gctgttgca gcataggcct tgggacgggtg cttgtggata ttttggcagg 5220  
ttatggagca ggggtggcag gcgcgctcgt ggcccttaag gtcattgagcg gcgagatgcc 5280  
ctccaccgag gacctggtta acctactccc tgctatcctc tcccctggcg ccttagtctg 5340  
cggggtcgtg tgcgcagcga tactgcgtcg gcaagtgggc ccaggggagg gggctgtgca 5400  
gtggatgaac cggctgatag cgttcgcttc gcggggtaac cacgtctccc ccacgacta 5460  
tgtgcctgag agcgacgctg cagcaogtgt cactcagatc ctctctagtc ttaccatcac 5520  
tcagctgctg aagaggcttc accagtggat caacgaggac tgctccacgc catgctccgg 5580  
ctcgtggcta agagatgttt gggattggat atgcaoggtg ttgactgatt tcaagacctg 5640  
gctccagtc aagctcctgc cgcgattgcc gggagtcccc ttcttctcat gtcaacgtgg 5700  
gtacaagga gtctggcggg gcgacggcat catgcaaacc acctgcccac gtggagcaca 5760  
gatcaccgga catgtgaaaa acggttccat gaggatcgtg gggcctagga cctgtagtaa 5820  
cacgtggcat ggaacattcc ccattaacgc gtacaccaac ggccccctgca cgccctcccc 5880  
ggcgccaaat tattctaggg cgtgtggcg ggtggctgct gaggagtacg tggaggttac 5940  
gcgggtgggg gatttccact acgtgacggg catgaccact gacaacgtaa agtgcccgtg 6000  
tcaggttccg gccccgaat tcttcacaga agtggatggg gtgcgggttc acaggtacgc 6060

ES 2 546 190 T3

tccagcgtgc aaacccctcc tacgggagga ggtcacatcc ctggctggggc tcaatcaata 6120  
cctggttggg tcacagctcc catgcgagcc cgaaccggac gtagcagtgcc tcaacttccat 6180  
gctcaccgac cctcccaca ttacggcgga gacggctaag cgtaggctgg ccaggggatc 6240  
tccccctcc ttggccagct catcagctag ccagctgtct ggccttctc tgaaggcaac 6300  
atgcactacc cgtcatgact ccccgagcc tgacctcacc gaggccaacc tctgtggcg 6360  
gcaggagatg ggcgggaaca tccccgcgt ggagtcagaa aataaggtag taattttggg 6420  
cttttctgag ccgctccaag cggaggagga tgagaggga gtatccgttc cggcggagat 6480  
cctgcggagg tccaggaat tccctcgagc gatgcccata tgggcaagcc cggattacaa 6540  
ccctccactg ttagagtctt ggaaggaccc ggactacgtc cctccagtgg tacacgggtg 6600  
tccattgccg cctgccaagg cccctccgat accacctcca cggaggaaga ggacggttgt 6660  
cctgtcagaa tctaccgtgt cttctgcctt ggcgagctc gccacaaaga ccttcggcag 6720  
ctccgaatcg tcggcctcg acagcggcac ggcaacggcc tctcctgacc agccctccga 6780  
cgacggcgac gcgggatccg acgttgagtc gtactcctcc atgccccccc ttgaggggga 6840  
gccgggggat cccgatctca gcgacgggtc ttggtctacc gtaagcgagg aggctagtga 6900  
ggacgtcgtc tgctgctcga tgtcctacac atggacaggc gcctgatca cgcctatgccc 6960  
tgcgaggaa accaagctgc ccatcaatgc actgagcaac tttttgctcc gtcaccacaa 7020  
cttggctctat gctacaacat ctgcagcgc aagcctgccc cagaagaagg tcacctttga 7080  
cagactgcag gtcttgagc accactaccg ggacgtgctc aaggagatga aggccaaggc 7140  
gtccacagtt aaggctaac ttctatccgt ggaggaagcc tgtaagctga cgcctccaca 7200  
ttcgccaga tctaaattg gctatggggc aaaggacgtc cggaacctat ccagcaaggc 7260  
cgttaaccac atccgctccg tgtggaagga cttgctggaa gacctgaga caccaattga 7320  
caccaccatc atggcaaaa atgaggtttt ctgcgtccaa ccagagaagg ggggcccga 7380  
gccagctcgc cttatcgtat tcccagattt gggggttcgt gtgtgcgaga aaatggccct 7440  
ttacgatgtg gtctccacc tccctcagc cgtgatgggc ttttcatacg gattccaata 7500  
ctctctgga cagcgggtcg agttcctggt gaatgcctgg aaagccaaga aatgcctat 7560  
ggcttcgca tatgacacc gctgttttga ctcaacggtc actgagaatg acatccgtgt 7620  
tgaggagtca atctaccaat gttgtgactt ggccccgaa gccagacagg ccataaggtc 7680  
gctcacagag cggctttaca tcgggggccc cctgactaat tctaaagggc agaactgcgg 7740  
ctatgcggg tgccgcgca gcggtgtact gacgaccagc tgcggttaata cctccacatg 7800  
ttacttgaag gccgctgcgg cctgtcgagc tgccaagctc caggactgca cgatgctcgt 7860



ES 2 546 190 T3

atgoggagac gaccttgtcg ttatctgtga aagcgogggg acccaagagg acgaggcgag 7920  
cctacggggcc ttcacggagg ctatgactag atactctgcc cccctgggg acccgcccaa 7980  
accagaatac gacttggagt tgataacatc atgctcctcc aatgtgtcag tegcgcacga 8040  
tgcatctggc aaaaggggtg actatctcac ccgtgacccc accaccccc ttgogggggc 8100  
tgcggtgggag acagctagac aactccagt caattcctgg ctaggcaaca tcatcatgta 8160  
tgcgcccacc ttgtgggcaa ggatgatcct gatgactcat ttcttctcca tcttctagc 8220  
tcaggaacaa cttgaaaaag cctagattg tcagatctac ggggcctggt actccattga 8280  
gccacttgac ctacctcaga tcattcaacg actccatggc cttagcgcat tttcaactcca 8340  
tagttactct ccaggtgaga tcaatagggt ggcttcatgc ctcaggaaac ttgggggtacc 8400  
gcccttgoga gtctggagac atcggggccag aagtgtccgc gctaggctac tgtcccaggg 8460  
ggggagggct gccacttgtg gcaagtacct cttcaactgg gcagtaagga ccaagctcaa 8520  
actcaactcca atcccggctg cgtcccagtt ggatttatcc agctggttcg ttgctggtta 8580  
cagcggggga gacatatatc acagcctgtc tcgtgcccga ccccgctggt tcatgtggtg 8640  
cctactccta ctttctgtag gggtaggcat ctatctactc cccaaccgat gaacggggag 8700  
ctaaacactc caggccaata ggccatcctg ttttttccc ttttttttt tcttttttt 8760  
ttttttttt ttttttttt tttttctcc ttttttttc ctctttttt ccttttcttt 8820  
cctttggtgg ctccatctta gcctagtea cgctagctg tgaaaggtec gtgagccgct 8880  
tgactgcaga gagtgtgat actggcctct ctgcagatca agtactacta gtccttttag 8940  
tgagggtaa ttcaattctt gaagacgaaa gggcctcgtg atacgcctat ttttataggt 9000  
taatgtcatg ataataatg tttcttagac gtcaggtggc acttttcggg gaaatgtgog 9060  
cggaaccctt atttgtttat ttttctaat acattcaaat atgtatccgc tcatgagaca 9120  
ataaccctga taaatgcttc aataatattg aaaaaggaag agtatgagta ttcaacattt 9180  
ccgtgtcgcc cttattcctt ttttgccgc atttgcctt cctgtttttg ctcaccaga 9240  
aacgctggtg aaagtaaaag atgctgaaga tcagttgggt gcacgagtgg gttacatoga 9300  
actggatctc aacagcggta agatccttga gagttttcgc ccgaagaac gttttccaat 9360  
gatgagcact tttaaagttc tgctatgtgg cgcggtatta tcccggttg acgcgggga 9420  
agagcaactc ggtcgccgca tacactattc tcagaatgac ttggttgagt actcaccagt 9480  
cacagaaaag catcttacgg atggcatgac agtaagagaa ttatgcagtg ctgccataac 9540  
catgagtgat aacctgagg ccaacttact tetgacaacg atcggaggac cgaaggagct 9600  
aacgcctttt ttgcacaaca tgggggatca tgtaactcgc cttgatcgtt gggaaaccgga 9660  
gctgaatgaa gccataccaa acgacgagcg tgacaccacg atgcctgcag caatggcaac 9720

ES 2 546 190 T3

aacgttgogc aaactattaa ctggcgaact acttactcta gttccccggc aacaattaat 9780  
agactggatg gaggcggata aagttgcagg accacttctg cgctcggccc ttccggctgg 9840  
ctggtttatt gctgataaat ctggagccgg tgagcgtggg tctcgggta tcattgcagc 9900  
actggggcca gatgtaagc cctcccgat cgtagttatc tacacgacgg ggagtcaggc 9960  
aactatggat gaacgaaata gacagatcgc tgagataggt gcctcactga ttaagcattg 10020  
gtaactgtca gaccaagttt actcatatat actttagatt gatttaaac ttcattttta 10080  
atntaaaagg atctaggtga agatcctttt tgataatctc atgacaaaaa tcccttaacg 10140  
tgagttttcg ttccactgag cgtcagaccc cgtagaaaag atcaaaggat cttcttgaga 10200  
tcttttttt ctgcgcgtaa totgctgctt gcaaacaaaa aaaccaccgc taccagcggg 10260  
ggtttggttg ccggatcaag agctaccaac tctttttccg aaggtaactg gcttcagcag 10320  
agcgcagata ccaaatactg tctttctagt gttagccgtg ttaggccacc acttcaagaa 10380  
ctctgtagca ccgcctacat acctcgctct gctaactctg ttaccagtgg ctgctgccag 10440  
tggcgataag tcgtgtctta cggggttggg ctcaagacga tagttaccgg ataaggcgca 10500  
gcggtcgggc tgaacggggg gttcgtgcac acagcccagc ttggagcgaa cgacctacac 10560  
cgaactgaga tacctacagc gtgagctatg agaaagcgc acgcttccg aagggagaaa 10620  
ggcggacag tatccggtaa gggcagggc ggaacaggag agcgcacgag ggagctcca 10680  
gggggaaacg cctggtatct ttatagtcct gtcgggttc gccacctctg acttgagcgt 10740  
cgattttgt gatgctcgtc aggggggagg agcctatgga aaaacgccag caacgcggcc 10800  
tttttacggt tcttgccctt ttgctggcct tttgctcaca tgttctttcc tgcgttatcc 10860  
cctgattctg tggataaccg tattaccgcc tttgagtgag ctgataccgc tcgccgcagc 10920  
cgaacgaccg agcgcagcga gtcagtgagc gaggaagcgg aagagcgct gatgcggtat 10980  
ttctcctta cgcactctgt cggatattca caccgcatat ggtgactct cagtacaatc 11040  
tgctctgatg ccgcatagtt aagccagtat acactccgct atcgctacgt gactgggtca 11100  
tggetgcgcc ccgacaccgg ccaacaccgg ctgacgcgcc ctgacgggct tgtctgetcc 11160  
cggcatccgc ttacagacaa gctgtgaccg tctccgggag ctgcatgtgt cagaggtttt 11220  
cacgctcatc accgaaacgc gcgaggcagc tgccgtaaag ctcatcagcg tggctcgtgaa 11280  
gcgattcaca gatgtctgcc tgttcatecg cgtccagctc gttgagttc tccagaagcg 11340  
ttaatgtctg gcttctgata aagcgggcca tgtaagggc ggtttttcc tgtttggtca 11400  
ctgatgcctc cgtgtaaggg ggatttctgt tcatgggggt aatgataccg atgaaacgag 11460  
agaggatgct cacgataccg gttactgatg atgaacatgc ccggttactg gaacgttgtg 11520

ES 2 546 190 T3

|    |   |       |
|----|---|-------|
|    | agggtaaaca actggcggta tggatgcggc gggaccagag aaaaatcaact caggggtcaat | 11580 |
|    | gccagcgctt cgttaataca gatgtaggtg ttccacaggg tagccagcag catcctgcga   | 11640 |
|    | tgcagatccg gaacataatg gtgcagggcg ctgacttcog cgtttccaga ctttacgaaa   | 11700 |
|    | cacggaaacc gaagaccatt catggtgttg ctcaggtcgc agacgttttg cagcagcagt   | 11760 |
|    | cgcttcacgt tcgctcgcgt atcgggtgatt cattctgcta accagtaagg caacccccgc  | 11820 |
|    | agcctagccg ggtcctcaac gacaggagca cgatcatgcg caccogtggc caggacccaa   | 11880 |
|    | cgctgccoga gatgcgcgcg gtgcggctgc tggagatggc ggaocgcgatg gatatgttct  | 11940 |
|    | gccaaagctaa gctgcctgca ggtaatacga ctcactatag ccagcccccg attggggggcg | 12000 |
|    | aca   | 12003 |
| 5  | <210> 11<br><211> 33<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C  |       |
| 10 | <400> 11<br>atggcgccta ttaccgccta ctccaacag acg                     | 33    |
| 15 | <210> 12<br><211> 35<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C  |       |
| 20 | <400> 12<br>aatgtctcgc gtaccgccgg gggggatgag ttgtc                  | 35    |
| 25 | <210> 13<br><211> 21<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C  |       |
| 30 | <400> 13<br>tagagtctcg gaaggaccgg g                                 | 21    |
| 35 | <210> 14<br><211> 22<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C  |       |
| 40 | <400> 14<br>ggcctggagt ggtagctcc cc                                 | 22    |
| 45 | <210> 15<br><211> 19<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C  |       |
|    | <400> 15<br>tggaaggacc cggactacg                                    | 19    |
|    | <210> 16<br><211> 21<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C  |       |
|    | <400> 16  |       |

ES 2 546 190 T3

gagtggttag ctccccgttc a

21

5

<210> 17  
 <211> 12573  
 <212> ADN  
 <213> Virus de la hepatitis C

<400> 17

```

gccagcccc gattgggggc gacactccac catagatcac tcccctgtga ggaactactg      60
tcttcacgca gaaagcgtct agccatggcg ttagtatgag tgtcgtgcag cctccaggac      120
ccccctccc gggagagcca tagtggtctg cggaaccggt gagtacaccg gaattgccag      180
gaagaccggg tctttctctg gatcaaccgg ctcaatgcct ggagatttgg gcgtgcccc      240
gagagactgc tagccgagta gtgttgggtc gcgaaaggcc ttgtggtact gcctgatagg      300
gtgcttgcca gtgccccggg aggtctcgta gaccgtgcac cgtttaaacc cccgtgctgc      360
tggaagtcga tttcaggctt agggtaaccg tggacctcga aaacagacgc acaaaaccaa      420
gttcaataga aggggtaca aaccagtacc accacgaaca agcacttctg tttccccggt      480
gatgtcgtat agactgcttg cgtgggtgaa agcagcggat ccgttatccg cttatgtact      540
tcgagaagcc cagtaccacc tcggaatctt cgatgcgctt gcctcagcac tcaaccccag      600
agtgtagctt aggctgatga gtctggacat cctcaccggg tgacggtggt ccaggetgcg      660
ttggcggcct acctatgget aacgccatgg gacgctagtt gtgaacaagg tgtgaagagc      720
ctattgagct acataagaat cctccggccc ctgaatgcgg ctaatcccaa cctcggagca      780
ggtggtcaca aaccagtgat tggcctgtcg taacgcgcaa gtcctggcg gaaccgacta      840
ctttgggtgt cgtgtttcc ttttatttta ttgtggctgc ttatggtgac aatcacagat      900
tgttatcata aagcgaattg gattggccat ccggtgaaag tgagactcat tatctatctg      960
tttgcctgat ccgctccatt gagtgtgttt actctaagta caatttcaac agttatttca     1020
atcagacaat tgtatcataa tggcgggccc agaagacgcc aaaaacataa agaaaggccc     1080
ggcgccattc tctctctag aggatggaac cgctggagag caactgcata aggctatgaa     1140
gagatacggc ctggttctcg gaacaattgc ttttacagat gcacatatcg aggtgaacat     1200
cacgtaacgg gaataactcg aatgtccgt tcggttgcca gaagctatga aacgatatgg     1260
gctgaataca aatcacagaa tcgtcgtatg cagtgaaaac tctcttcaat tctttatgcc     1320
    
```

10

ES 2 546 190 T3

ggtggtgggc gcgttattta toggagttgc agttgcgccc gcgaacgaca tttataatga 1380  
 acgtgaattg ctcaacagta tgaacatttc gcagcctacc gtagtgtttg tttccaaaaa 1440  
 gggggtgcaa aaaattttga acgtgcaaaa aaaattacca ataatccaga aaattattat 1500  
 catggattct aaaacggatt accagggatt tcagtcgatg tacacgttcg tcacatctca 1560  
 totacctccc ggttttaatg aatacagattt tgtaccagag tcctttgatc gtgacaaaac 1620  
 aattgcaactg ataatgaatt cctctggate tactgggtta cctaagggty tggcccttcc 1680  
 gcatagaact gcctgcgtca gattctcgca tgccagagat cctatTTTTg gcaatcaaat 1740  
 cattccggat actgcgattt taagtgttgt tccattccat cacggTTTTg gaatgtttac 1800  
 tacactogga tatttgatat gtggatttcg agtcgtctta atgtatagat ttgaagaaga 1860  
 gctgtTTTTa cgatcccttc aggattacaa aattcaaagt gcgttgctag taccaacctt 1920  
 attttcattc ttogccaaaa gcaactctgat tgacaaatac gatttatcta atttacacga 1980  
 aattgcttct gggggcgcac ctctttcgaa agaagtcggg gaagcggtyg caaaacgctt 2040  
 ccatcttcca gggatacgac aaggatatgg gctcactgag actacatcag ctattctgat 2100  
 tacaccogag ggggatgata aaccggggcgc ggtcggtaaa gttgttccat tttttgaagc 2160  
 gaaggttytg gatctggata ccgggaaaac gctggggcgtt aatcagagag gcgaattatg 2220  
 tgtcagagga cctatgatta tgtccggtta tgtaaacaat ccggaagcga ccaacgcctt 2280  
 gattgacaag gatggatggc tacattctgg agacatagct tactgggacg aagacgaaca 2340  
 ctcttccata gttgaccgct tgaagtcttt aattaaatac aaaggatctc aggtggcccc 2400  
 cgctgaattg gaatogatat tgttacaaca cccaacatc ttcgacgcgg gcgtggcagg 2460  
 tottccogac gatgacgcog gtgaaacttc ccgcgcgctt gttgttttyg agcacggaaa 2520  
 gacgatgacg gaaaaagaga togtggatta cgtcgcctagt caagtaacaa ccgcgaaaaa 2580  
 gttgcgcgga ggagtttgtt ttgtggacga agtaccgaaa ggtcttaccg gaaaactcga 2640  
 cgcaagaaaa atcagagaga tctcataaaa ggccaagaag ggcggaaagt ccaaattgta 2700  
 agcggcgcgg ttgttaaaca gaccacaacg gtttccctct agcgggatca attccgcccc 2760  
 cccccctaa cgttactggc cgaagccgct tggaataagg ccggtgtgcy tttgtctata 2820  
 tgttattttc caccatattg ccgtctttty gcaatgtgag ggcccggaaa cctggccctg 2880  
 tcttcttgac gagcattcct aggggtcttt cccctctcgc caaaggaaty caaggtctgt 2940  
 tgaatgtcgt gaaggaagca gttcctctgg aagcttctty aagacaaaca acgtctgtag 3000  
 cgacccttyg caggcagcgg aacccccac ctggcgacag gtgcctctgc ggccaaaagc 3060  
 cacgtgtata agatacacct gcaaaggcgg cacaacccca gtgccacgty gtgagttgga 3120

ES 2 546 190 T3

tagttgtgga aagagtcaaa tggctctcct caagcgtatt caacaagggg ctgaaggatg 3180  
cccagaaggt accccattgt atgggatctg atctggggcc tcggtgcaca tgctttacat 3240  
gtgttttagtc gaggttaaaa aaacgtctag gcccccgaa ccacggggac gtggttttcc 3300  
tttgaaaaac acgataatac catggcgccct attacggcct actcccaaca gacgcgaggc 3360  
ctacttggtt gcatcatcac tagcctcaca ggccgggaca ggaaccaggt cgagggggag 3420  
gtccaagtgg tctccaccgc aacacaatct ttcttggega cctgcgtcaa tggcgtgtgt 3480  
tggactgtct atcatggtgc cggctcaaag acccttgccg gcccaaaggg cccaatcacc 3540  
caaatgtaca ccaatgtgga ccaggacctc gtccgctggc aagcgcctcc cggggcgctg 3600  
tccttgacac catgcacctg cggcagctcg gacctttact tggtcacgag gcatgccgat 3660  
gtcattccgg tgcgcggcg ggccgacagc agggggagcc tactctcccc caggcccgtc 3720  
tcctacttga agggctcttc gggcggtcca ctgctctgcc cctcggggca cgtgtggggc 3780  
atctttcggg ctgcctgtg cacccgaggg gttgcgaagg cggtagactt tgtaccctgc 3840  
gagtctatgg gaaccactat gcggctcccc gtcttcacgg acaactcgtc ccctccggcc 3900  
gtaccgcaga cattccaggt ggcccatcta cagccctcta ctggtagcgg caagagcact 3960  
aagggtgccg ctgcgtatgc agcccaaggg tataaggtgc ttgtctgaa cccgtccgtc 4020  
gccgccaccc taggtttcgg ggcgtatatg tetaaggcac atggtatcga cctaacatc 4080  
agaatcgggg taaggaccat caccacgggt gccccatca cgtactccac ctatggcaag 4140  
tttcttgccg acgggtggtg ctctgggggc gcctatgaca tcataatatg tgatgagtgc 4200  
cactcaactg actcgaccac tctctgggc atcggcacag tcctggacca agcggagacg 4260  
gctggagcgc gactcgtcgt gctcgccacc gctacgcctc cgggatcggg caccgtgcc 4320  
catccaaaca tcgaggaggt ggctctgtcc agcactggag aatccccctt ttatggcaaa 4380  
gccatcccca tcgagaccat caaggggggg aggcacctca tttctgcca ttccaagaag 4440  
aaatgtgatg agctcgcgc gaagctgtcc ggctcggac tcaatgctgt agcatattac 4500  
cggggccttg atgtatcct cataccaact agcggagacg tcattgtcgt agcaacggac 4560  
gctctaataga cgggctttac cggcgatttc gactcagtga tcgactgcaa tacatgtgtc 4620  
accagacag tcgacttcag cctggaccgg accttcacca ttgagacgac gaccgtgcc 4680  
caagacgcgg tgctacgctc gcagcggcga ggcaggactg gtaggggag gatgggcatt 4740  
tacaggtttg tgactccagg agaacggccc tcgggcatgt tcgattctc ggttctgtgc 4800  
gagtgtatg acgcgggctg tgcttggtac gagctcacgc ccgccgagac ctcagttagg 4860  
ttgcgggctt acctaaacac accagggttg cccgtctgcc aggacctct ggagttctgg 4920  
gagagcgtct ttacaggcct caccacata gacgccatt tcttgtcca gactaagcag 4980

ES 2 546 190 T3

gcaggagaca acttccccta cctggtagca taccaggcta cgggtgtgcg cagggctcag 5040  
gctccacctc catcgtggga ccaaagtgg aagtgtctca tacggctaaa gcctacgctg 5100  
cacgggccaa cgcacctgct gtataggctg ggagccgttc aaaacgaggt tactaccaca 5160  
caccataa ccaaatacat catggcatgc atgtcggctg acctggaggt cgtcacgagc 5220  
acctgggtgc tggtaggcgg agtcctagca gctctggccg cgtattgcct gacaacaggc 5280  
agcgtggtea ttgtgggcag gatcatcttg tccggaaagc cggccatcat tcccacagc 5340  
gaagtccctt accgggagtt cgatgagatg gaagagtgcg cctcacacct cccttacatc 5400  
gaacagggaa tgcagctcgc cgaacaatc aaacagaagg caatcgggtt gctgcaaaca 5460  
gccaccaagc aageggagge tgctgctccc gtggtggaat ccaagtggcg gaccctcgaa 5520  
gccttctggg cgaagcatat gtggaatttc atcagcggga tacaatattt agcaggcttg 5580  
tccactctgc ctggcaaccc cgcgatagca tcaactgatg cattcacagc ctctatcacc 5640  
agcccgtcga ccaccaaca taccctcctg tttaacatcc tggggggatg ggtggccgcc 5700  
caacttgctc ctcccagcgc tgcttctgct ttcgtaggcg ccggcatcgc tggagcggct 5760  
gttggcagca taggccttgg gacgggtgctt gtggatattt tggcaggta tggagcaggg 5820  
gtggcagggc cgtcgtggc cttaaggtc atgagcggcg agatgcctc caccgaggac 5880  
ctggttaacc tactccctgc tatectctcc cctggcgcgc tagtcgtcgg ggtcgtgtgc 5940  
gcagcgatac tgcgtcggca cgtgggcca ggggaggggg ctgtgcagtg gatgaaccgg 6000  
ctgatagcgt tcgcttcgcg gggtaaccac gtctcccca cgcactatgt gcctgagagc 6060  
gacgctgcag cacgtgtcac tcagatcctc tctagtctta ccatcactca gctgctgaag 6120  
aggttcacc agtggatcaa cgaggactgc tccacgccat gctccggctc gtggctaaga 6180  
gatgtttggg attggatatg cacgggtgtg actgatttca agacctggct ccagtccaag 6240  
ctcctgcgcg gattgcgggg agtcccctc ttctcatgtc aacgtgggta caagggagtc 6300  
tggcggggcg acggcatcat gcaaaccacc tgcccatgtg gagcacagat caccggacat 6360  
gtgaaaaacg gttccatgag gatcgtgggg cctaggacct gtagtaacac gtggcatgga 6420  
acattcccca ttaacgcgta caccacgggc cctgcacgc cctccccggc gccaaattat 6480  
tctagggcgc tgtggcgggt ggctgctgag gagtacgtgg aggttacgcg ggtgggggat 6540  
ttccactacg tgaocgggcat gaccactgac aacgtaaagt gcccggtgtca ggttccggcc 6600  
ccogaattct tcacagaagt ggatgggggt cggttgcaca ggtacgctcc agcgtgcaaa 6660  
cccctoctac gggaggaggt cacattcctg gtcgggctca atcaatacct ggttgggtca 6720  
cagctcccat gogagccoga accggacgta gcagtgtctca cttccatgct caccgacccc 6780

ES 2 546 190 T3

tcccacatta cggcggagac ggctaagcgt aggctggcca ggggatctcc cccctccttg 6840  
gccagctcat cagctagcca gctgtctgcg ccttccttga aggcaacatg cactaccoct 6900  
catgactccc cggacgctga cctcatcgag gccaacctcc tgtggcggca ggagatgggc 6960  
gggaacatca cccgcgtgga gtcagaaaat aaggtagtaa ttttggactc tttcgagccg 7020  
ctccaagcgg aggaggatga gagggaaagta tccgttccgg cggagatcct gcgagggtcc 7080  
aggaaattcc ctcgagcgat gcccatatgg gcacgcccgg attacaacc ccaactgtta 7140  
gagtcctgga aggaccggga ctacgtccct ccagtgttac acgggtgtcc attgcccct 7200  
gccaaaggccc ctccgatacc acctccacgg aggaagagga cggttgtcct gtcagaatct 7260  
accgtgtctt ctgccttggc ggagctcgcc acaaagacct tcggcagctc cgaatcgctg 7320  
gcctcgaca gcggcacggc aacggcctct cctgaccagc cctccgacga cggcgacgcg 7380  
ggatccgacg ttgagtcgta ctctccatg ccccccttg agggggagcc gggggatccc 7440  
gatctcagcg acgggtcttg gtctaccgta agcgaggagg ctagtgagga cgtcgtctgc 7500  
tgctcgatgt cctacacatg gacaggcgcc ctgatcacgc catgcgctgc ggaggaaacc 7560  
aagctgccc tcaatgcact gagcaactct ttgctccgtc accacaactt ggtctatgct 7620  
acaacatctc gcagcgcaag cctgcggcag aagaaggta cctttgacag actgcaggtc 7680  
ctggacgacc actaccggga cgtgctcaag gagatgaagg cgaaggcgtc cacagttaag 7740  
gctaaaactt tatccgtgga ggaagcctgt aagctgacgc ccccacatte ggccagatct 7800  
aaatttggt atggggcaaa ggacgtccgg aacctatcca gcaaggccgt taaccacatc 7860  
cgctccgtgt ggaaggactt gctggaagac actgagacac caattgacac caccatcatg 7920  
gcaaaaaatg aggttttctg cgtccaacca gagaagggg gccgcaagcc agctcgcctt 7980  
atcgtattcc cagatttggg ggttcgtgtg tgcgagaaa tggcccttta cgatgtggtc 8040  
tccacctcc ctcaggccgt gatgggctct tcatacggat tccaatactc tctggacag 8100  
cgggtogagt tcttgggtaa tgcttgaaa gcgaagaaat gccctatggg ctctcagat 8160  
gacacctcgt gttttgactc aacggctact gagaatgaca tccgtgttga ggagtcaatc 8220  
taccaatggt gtgacttggc ccccgaagcc agacaggcca taaggctcgt cacagagcgg 8280  
ctttacatcg ggggccccct gactaattct aaagggcaga actgcggcta tcgcccgtgc 8340  
cgcgcgagcg gtgtactgac gaccagctgc ggtaataccc tcacatgtta cttgaaggcc 8400  
gctgcggcct gtcgagctgc gaagctccag gactgcacga tgctcgtatg cggagacgac 8460  
cttgtcgtta tctgtgaaag cgcggggacc caagaggacg aggcgagcct acgggccttc 8520  
acggaggcta tgactagata ctctgcccc cctggggacc cgcccaaacc agaatacagc 8580  
ttggagttga taacatcatg ctctccaat gtgtcagctg cgcacgatgc atctggcaaa 8640



ES 2 546 190 T3

aggggtgtact atctcaccocg tgaccccacc accccccttg cgcgggctgc gtgggagaca 8700  
 gctagacaca ctccagtcaa ttcttggtca ggcaacatca tcatgtatgc gccaccttg 8760  
 tgggcaagga tgatcctgat gactcatttc ttctccatcc ttctagctca ggaacaactt 8820  
 gaaaaagccc tagattgtca gatctacggg gcctgttact ccattgagcc acttgacctt 8880  
 cctcagatca ttcaacgact ccatggcett agcgcatttt cactccatag ttactctcca 8940  
 ggtgagatca atagggtggc ttcatgcctc aggaaacttg gggtagccgc cttgcgagtc 9000  
 tggagacatc gggccagaag tgtccgcgct aggctactgt cccagggggg gagggctgcc 9060  
 acttgtggca agtacctctt caactgggca gtaaggacca agctcaaact cactccaatc 9120  
 coggctgcgt cccagttgga tttatccagc tggttcgttg ctggttacag cgggggagac 9180  
 atatatcaca gcctgtctcg tgcccagacc cgetggttca tgtggtgcct actcctactt 9240  
 tctgtagggg taggcatcta tctactcccc aaccgatgac ttaagacggg gagctaaaca 9300  
 ctccaggcca ataggccatc ctgttttttt ccttttttt tttcttttt ttttttttt 9360  
 ttttttttt ttttttttct tcttttttt ttctctttt tttcttttc tttcttttg 9420  
 tggctccatc ttagccctag tcacggctag ctgtgaaagg tccgtgagcc gcttgactgc 9480  
 agagagtgc gatactggcc tctctgcaga tcaagtacta ctagtccctt tagtgagggt 9540  
 taattcaatt cttgaagacg aaagggcctc gtgatacgc tatttttata ggtaaatgtc 9600  
 atgataataa tggtttctta gacgtcaggt ggcacttttc ggggaaatgt gcgcggaacc 9660  
 cctatttggt tatttttcta aatacattca aatatgtatc cgetcatgag acaataacc 9720  
 tgataaatgc ttcaataata ttgaaaaagg aagagtatga gtattcaaca tttccgtgtc 9780  
 gcccttatte ctttttttgc ggcattttgc cttcctggtt ttgctcacc agaaacgctg 9840  
 gtgaaagtaa aagatgctga agatcagttg ggtgcacgag tgggttacat cgaactggat 9900  
 ctcaacagcg gtaagatcct tgagagtttt cgcgccgaag aacgttttcc aatgatgagc 9960  
 acttttaag ttctgctatg tggcgcggtt ttatcccgtg ttgacgccg gcaagagcaa 10020  
 ctgggtcgcc gcatacacta ttctcagaat gacttggttg agtactcacc agtcacagaa 10080  
 aagcatctta cggatggcat gacagtaaga gaattatgca gtgctgcat aacctgagt 10140  
 gataaacctg cggccaactt acttctgaca acgatcggag gaccgaagga gctaaccgct 10200  
 tttttgcaca acatggggga tcatgtaact cgccttgatc gttgggaacc ggagctgaat 10260  
 gaagccatac caaacgacga gcgtgacacc acgatgcctg cagcaatggc aacaacgttg 10320  
 cgcaactat taactggcga actacttact ctagcttccc ggcaacaatt aatagactgg 10380  
 atggaggcgg ataaagtgc aggaccactt ctgcgctcgg ccttccggc tggctggttt 10440

ES 2 546 190 T3

attgctgata aatctggagc cggtgagcgt gggctctcgc gtatcattgc agcaactgggg 10500  
 ccagatggta agccctcccg tatcgtagtt atctacacga cggggagtca ggcaactatg 10560  
 gatgaacgaa atagacagat cgctgagata ggtgcctcac tgattaagca ttggtaactg 10620  
 tcagaccaag tttactcata tatactttag attgatttaa aacttcattt ttaattttaa 10680  
 aggatctagg tgaagatcct ttttgataat ctcatgacca aaatccctta acgtgagttt 10740  
 tcgttccact gagcgtcaga ccccgtagaa aagatcaaag gatcttcttg agatcctttt 10800  
 tttctgcgcg taatctgctg cttgcaaaca aaaaaaccac cgctaccagc ggtggtttgt 10860  
 ttgcgggac aagagctacc aactcttttt ccgaaggtaa ctggcttcag cagagcgcag 10920  
 ataccaaata ctgtccttct agtgtagccg tagttaggcc accacttcaa gaactctgta 10980  
 gcaccgccta catacctcgc tetgctaate ctggtaccag tggctgctgc cagtggcgat 11040  
 aagtcgtgtc ttaccgggtt ggactcaaga cgatagttac cggataaggc gcagcggctg 11100  
 ggctgaacgg ggggttcgtg cacacagccc agcttgagc gaacgacct aaccgaactg 11160  
 agatacctac agcgtgagct atgagaaagc gccacgcttc ccgaaggag aaaggcggac 11220  
 aggtatccgg taagcggcag ggtcggaaca ggagagcgc caagggagct tccaggggga 11280  
 aacgcctggg atctttatag tctgtcggg tttcgccacc totgacttga gcgctgattt 11340  
 ttgtgatgct cgtcaggggg gggagccta tggaaaaacg ccagcaacgc ggccttttta 11400  
 cggttcctgg ctttttgctg gccttttgc cecatgttct ttctgcggtt atcccctgat 11460  
 tctgtggata accgtattac cgcctttgag tgagctgata ccgctcgcg cagccgaacg 11520  
 accgagcgc aagcagtcagt gagcaggaa gcggaagagc gcctgatgcg gtattttctc 11580  
 cttacgcate tgtgcgggat ttcacacgc atatggtgca ctctcagtac aatctgctct 11640  
 gatgcgcgat agttaagcca gtatacactc cgtatcgcct acgtgactgg gtcattggctg 11700  
 cgcctcgcaca cccgccaaca cccgctgagc cgcctgagc ggcttgtctg ctcccggcat 11760  
 ccgcttacag acaagctgtg accgtctcgc ggagctgcat gtgtcagagg ttttcaccgt 11820  
 catcaccgaa acgcgcgagg cagctgcggt aaagctcctc agcgtggctg tgaagcgatt 11880  
 cacagatgtc tgctgttca tccgcgtcca gctcgtttag tttctccaga agcgttaatg 11940  
 tctggcttct gataaagcgg gccatgttaa gggcggtttt ttctgtttg gtcactgatg 12000  
 cctcctgta agggggattt ctgttcattg gggtaatgat accgatgaaa cgagagagga 12060  
 tgctcaccgat acgggttact gatgatgaac atgcccgtt actggaacgt tgtgagggta 12120  
 aacaactggc ggtatggatg cggcgggacc agagaaaaat cactcagggt caatgccagc 12180  
 gcttcgttaa tacagatgta ggtgttccac agggtagcca gcagcatcct gcgatgcaga 12240  
 tccggaacat aatggtgcag ggcgctgact tccgcgtttc cagactttac gaaacacgga 12300

ES 2 546 190 T3

aaccgaagac cattcatggt gttgctcagg tcgcagaagt tttgcagcag cagtcgcttc 12360  
 acgttcgctc gcgtatcggg gattcattct gctaaccagt aaggcaacct cgccagccta 12420  
 gccgggtcct caacgacagg agcacgatca tgcgcacctg tggccaggac ccaacgctgc 12480  
 ccgagatgcg ccgcgtgcgg ctgctggaga tggcggacgc gatggatatg ttctgccaag 12540  
 ctaagctgcc tgcaggtaat acgactcaat ata 12573

5  
 <210> 18  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Virus de la hepatitis C

10  
 <400> 18  
 accgtaagcg aggagcttaa ggctagtgag gacgtc 36

15  
 <210> 19  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Virus de la hepatitis C

20  
 <400> 19  
 gacgtcctca ctacgcttaa gctcctcgtc tacggt 36

25  
 <210> 20  
 <211> 12579  
 <212> ADN  
 <213> Virus de la hepatitis C

5  
 <400> 20

gcccagcccc gattgggggc gacactccac catagatcac tcccctgtga ggaactactg 60  
 tottcaagca gaaagcgtct agccatggcg ttagtatgag tgcctgtcag cctccaggac 120  
 cccccctccc gggagagcca tagtggctct cggaaccggt gactacaccg gaattgccag 180  
 gacgaccggg tcccttcttg gatcaacctg ctcaatgcct ggagatttgg gcgtgcccc 240  
 gcgagactgc tagccgagta gtgttgggtc gcgaaaggcc ttgtggtact gcctgatagg 300  
 gtgcttgcca gtgccccggg aggtctcgtc gaccgtgcac cgtttaaacc cccgtgctgc 360  
 tggaaagtcga ttccaggctt agggtaaccg tggacctcga aaacagacgc acaaaaccaa 420  
 gttcaataga aggggggtaca aaccagtacc accacgaaca agcacttctg tttccccggg 480  
 gatgtcgtat agactgcttg cgtgggtgaa agcagcggat ccgttatccg cttatgtact 540  
 tcgagaagcc cagtaccacc tcggaatctt cgatgcgttg cgctcagcac tcaaccccag 600  
 agtgtagctt aggctgatga gtctggacat cctcaccgg tgacgggtgt ccaggctgcg 660  
 ttggcggcct acctatggct aacgccatgg gacgctagtt gtgaacaagg tgtgaagagc 720  
 ctattgagct acataagaat cctccggccc ctgaatgcgg ctaatcccaa cctcggagca 780

ES 2 546 190 T3

ggtggtcaca aaccagtgat tggcctgtcg taacgcgcaa gtccgtggcg gaaccgacta 840  
 ctttgggtgt ccgtgtttcc ttttatttta ttgtggctgc ttatggtgac aatcacagat 900  
 tgttatcata aagcgaattg gattggccat ccggtgaaag tgagactcat tatctatctg 960  
 tttgctggat ccgctccatt gagtgtgttt actetaagta caatttcaac agttatttca 1020  
 atcagacaat tgtatcataa tggcgggccc agaagacgcc aaaaacataa agaaaggccc 1080  
 ggcgccattc tatcctctag aggatggaac cgctggagag caactgcata aggetatgaa 1140  
 gagatacgcc ctggttctcg gaacaattgc ttttacagat gcacatatcg aggtgaacat 1200  
 cacgtacgcy gaatacttcg aatgtccgt tcggttgga gaagctatga aacgatatgg 1260  
 gctgaataca aatcacagaa tcgtcgtatg cagtgaaaac tctcttcaat tctttatgcc 1320  
 ggtgttgggc gcgttattta tcggagttgc agttgcgccc gcgaacgaca tttataatga 1380  
 acgtgaattg ctcaacagta tgaacatttc gcagcctacc gtagtgtttg tttccaaaaa 1440  
 ggggttgcaa aaaattttga acgtgcaaaa aaaattacca ataatccaga aaattattat 1500  
 catggattct aaaacggatt accagggatt tcagtcgatg tacacgttcg tcacatctca 1560  
 tctacctccc ggttttaatg aatacgattt tgtaccagag tcctttgatc gtgacaaaac 1620  
 aattgcactg ataatgaatt cctctggatc tactgggtta cctaagggtg tggcccttcc 1680  
 gcatagaact gcctgcgtca gattctcgca tgccagagat cctatttttg gcaatcaaat 1740  
 cattccggat actgcgattt taagtgttgt tccattccat cacggttttg gaatgtttac 1800  
 tacactcgga tatttgatat gtggatttcg agtcgtctta atgtatagat ttgaagaaga 1860  
 gctgttttta cgatcccttc aggattacaa aattcaaagt gcgttgetag taccaaccct 1920  
 attttcattc ttgcceaaaa gcactctgat tgacaaatac gatttatcta atttacacga 1980  
 aattgcttct gggggcgcac ctctttcgaa agaagtcggg gaagcgggtg caaacgctt 2040  
 ccattctcca gggatacgac aaggatatgg gctcactgag actacatcag ctattctgat 2100  
 tacacccgag ggggatgata aaccgggcgc ggtcggtaaa gttgttccat tttttgaagc 2160  
 gaaggttgtg gatctggata ccgggaaaac gctgggcggt aatcagagag gogaattatg 2220  
 tgtcagagga cctatgatta tgtccgggta tgtaaacaat ccggaagcga ccaacgcctt 2280  
 gattgacaag gatggatggc tacattctgg agacatagct tactgggacg aagacgaaca 2340  
 cttcttcata gttgaccgct tgaagtcttt aattaaatac aaaggatatac aggtggcccc 2400  
 cgctgaattg gaatcgatat tgttacaaca cccaacatc ttcgacgcgg gcgtggcagg 2460  
 tcttcccgac gatgacgccg gtgaacttcc cgcgcgctt gttgttttg agcacggaaa 2520  
 gacgatgacg gaaaaagaga tcgtggatta cgtcgcctcag caagtaacaa ccgcgaaaaa 2580

ES 2 546 190 T3

gttgogcgga ggagttgtgt ttgtggaoga agtaccgaaa ggtottaccg gaaaactcga 2640  
 cgcaagaaaa atcagagaga tctcataaa ggccaagaag ggcggaaagt ccaaattgta 2700  
 agcggccgcg ttgttaaaca gaccacaacg gtttccctct agcgggatca attccgcccc 2760  
 cccccctaa cgttactggc cgaagccgct tggaataagg ccggtgtgcg tttgtctata 2820  
 tgttattttc caccatattg ccgtcttttg gcaatgtgag ggcccggaaa cctggccctg 2880  
 tcttcttgac gagcattcct aggggtcttt cccctctcgc caaaggaatg caaggtctgt 2940  
 tgaatgtcgt gaaggaagca gttcctctgg aagcttcttg aagacaaaca acgtctgtag 3000  
 cgaccctttg caggcagcgg aacccccac ctggcgacag gtgcctctgc ggccaaaagc 3060  
 cacgtgtata agatacacct gcaaaggcgg cacaacccca gtgccacggt gtgagttgga 3120  
 tagttgtgga aagagtcaaa tggtctctct caagcgtatt caacaagggg ctgaaggatg 3180  
 ccagaaggt accccattgt atgggatctg atctggggcc tcgggtgcaca tgctttacat 3240  
 gtgtttagtc gaggttaaaa aaacgtctag gccccccgaa ccacggggac gtggttttcc 3300  
 tttgaaaaac acgataatac catggcgctt attacggcct actcccaaca gacgcgaggc 3360  
 ctacttggtt gcatcatcac tagcctcaca ggccgggaca ggaaccaggt cgagggggag 3420  
 gtccaagtgg tctccaccgc aacacaatct ttctgggoga cctgcgtcaa tggcgtgtgt 3480  
 tggactgtct atcatggtgc cggctcaaag acccttgccg gcccaaaggg cccaatcacc 3540  
 caaatgtaca ccaatgtgga ccaggacctc gtccgctggc aagcgcctcc cggggcgctt 3600  
 tcttgacac catgcacctg cggcagctcg gacctttact tggtcacgag gcatgccgat 3660  
 gtcattccgg tgcgccggcg gggcgacagc agggggagcc tactctcccc caggccctc 3720  
 tctacttga agggctcttc gggcgggtcca ctgctctgcc cctcggggca cgtgtgggc 3780  
 atctttcggg ctgccgtgtg cccccgaggg gttgogaagg cgggtggactt tgtaccctc 3840  
 gagtctatgg gaaccactat gcggtccccg gtcttcacgg acaactcgtc cctcgggc 3900  
 gtaccgcaga cattccaggt ggcccatcta cacgccccta ctggtagcgg caagagcact 3960  
 aaggtgccgg ctgcgtatgc agcccaaggg tataaggtgc ttgtctgaa cccgtccgtc 4020  
 gcgccaccc taggtttcgg ggcgtatatg tctaaggcac atggtatcga ccctaacatc 4080  
 agaatogggg taaggacat caccacgggt gccccatca cgtactccac ctatggcaag 4140  
 tttcttgccg acgggtggtt ctctgggggc gcctatgaca tcataatag tgatgagtgc 4200  
 cactcaactg actcgaccac tatcctgggc atcggcacag tctggacca agcggagacg 4260  
 gctggagcgc gactcgtcgt gctcgccacc gctacgcctc cgggatcggg cacctgcca 4320  
 catccaaaca tcgaggaggt ggctctgtcc agcactggag aaatcccctt ttatggcaaa 4380  
 gccatcccca tcgagacat caaggggggg aggcacctca tttctgcca ttccaagaag 4440

ES 2 546 190 T3

aaatgtgatg agctcgccgc gaagctgtcc ggcctcggac tcaatgctgt agcatattac 4500  
 cggggccttg atgtatccgt cataccaact agcgggagacg tcattgtcgt agcaacggac 4560  
 gctotaatga cgggctttac cggcgatttc gactcagtga tcgactgcaa tacatgtgtc 4620  
 acccagacag tcgacttcag cctggaccgc accttcacca ttgagacgac gaccgtgcca 4680  
 caagacgagg tgtaacgctc gcagcggcga ggcaggactg gtaggggcag gatgggcatt 4740  
 tacaggtttg tgactccagg agaacggccc tcgggcatgt tcgattcctc ggttctgtgc 4800  
 gagtgcctatg acgcgggctg tgcttggtag gagctcacgc ccgccgagac ctgagttagg 4860  
 ttgogggctt acctaaacac accagggttg ccggtctgcc aggaccatct ggagttctgg 4920  
 gagagcgtct ttacaggcct cacccacata gacgcccatt tcttgtccca gactaagcag 4980  
 gcaggagaca acttccccta cctggtagca taccaggcta cgggtgtgcgc cagggctcag 5040  
 gctccacctc catcgtggga ccaaagtggg aagtgtctca taaggctaaa gcctacgctg 5100  
 cacgggcca cccccctget gtatagctg ggagccgttc aaaacgaggt tactaccaca 5160  
 caccocataa ccaaatacat catggcatgc atgtcggctg acctggaggt cgtcacgagc 5220  
 acctgggtgc tggtaggcgg agtcctagca gctctggccg cgtattgcct gacaacaggc 5280  
 agcgtggtea ttgtgggcag gatcatcttg tccggaaagc cggccatcat tcccgacagg 5340  
 gaagtccttt accgggagtt cgatgagatg gaagagtgcg cctcacacct cccttacatc 5400  
 gaacagggaa tgcagctcgc cgaacaatc aacagaagg caatcggggt gctgcaaaca 5460  
 gccaccaagc aagcggaggc tgctgctccc gtggtggaat ccaagtggcg gaccctcgaa 5520  
 gccttctggg cgaagcatal gtggaatttc atcagcggga tacaatattt agcaggcttg 5580  
 tccactctgc ctggcaacce cgcgatagca tcaactgatg cattcacagc ctctatcacc 5640  
 agcccgtca ccaccaaca taccctctg tttaacatcc tgggggatg ggtggccgcc 5700  
 caacttgctc ctcccagcgc tgcttctgct ttogtagggc cggcatcgc tggagcggct 5760  
 gttggcagca taggccttg gacggtgctt gtggatattt tggcaggtta tggagcaggg 5820  
 gtggcaggcg cgtcgtggc cttaaggctc atgagcggcg agatgcctc caccgaggac 5880  
 ctggttaacc tactcctgc tatcctctcc cctggcgcct tagtcgtcgg ggtcgtgtgc 5940  
 gcagcgatac tgcgtcggca cgtgggcca gggaggggg ctgtgcagtg gatgaaccgg 6000  
 ctgatagcgt tcgcttcggg gggttaaccac gtctccccc cgcactatgt gcctgagagc 6060  
 gacgctgcag cacgtgtcac tcagatcctc tctagtotta ccatcactca gctgctgaag 6120  
 aggcttcacc agtggatcaa cgaggactgc tccacgccat gctccggctc gtggctaaga 6180  
 gatgtttggg attggatag cacggtggtg actgatttca agacctggct ccagtccaag 6240

ES 2 546 190 T3

ctcctgccgc gattgcccgg agtccccttc ttctcatgtc aacgtgggta caagggagtc 6300  
tggcggggcg acggcatcat gcaaaccacc tgcccatgtg gagcacagat caccggacat 6360  
gtgaaaaacg gttccatgag gatcgtgggg cctaggacct gtagtaacac gtggcatgga 6420  
acattcccca ttaacgcgta caccacgggc cctgcaecgc cctccccggc gccaaaattat 6480  
tctagggcgc tgtggcgggt ggctgctgag gactacgtgg aggttacgcg ggtgggggat 6540  
ttccactacg tgacgggcat gaccactgac aacgtaaagt gcccggtgca ggttccggcc 6600  
cccgaattct tcacagaagt ggatgggggt cggttgcaaca ggtacgctcc agcgtgcaaaa 6660  
ccctcctac gggaggagggt cacattcctg gtcgggctca atcaatacct ggttgggtca 6720  
cagctcccat gcgagcccga accggacgta gcagtgtca cttccatgct caccgacccc 6780  
tcccacatta cggcggagac ggctaagcgt aggctggcca ggggatctcc ccctccttg 6840  
gccagctcat cagctagcca gctgtctgag ccttccttga aggcaacatg cactaccogt 6900  
catgactccc cggacgctga cctcatcgag gccaacctcc tgtggcggca ggagatgggc 6960  
gggaacatca cccgcgtgga gtcagaaaat aaggtagtaa ttttgactc tttcgagccg 7020  
ctccaagcgg aggaggatga gagggaagta tccgttccgg cggagatcct gcggaggtcc 7080  
aggaaattcc ctcgagcgat gcccatatgg gcacgcccgg attacaacce tccactgtta 7140  
gagtcctgga aggaccggga ctacgtccct ccagtggtag acgggtgtcc attgccgcct 7200  
gccaaggccc ctccgatacc acctccacgg aggaagagga cggttgtcct gtcagaatct 7260  
accgtgtctt ctgccttggc ggagctcgcc acaaagacct tcggcagctc cgaatcgctg 7320  
gccgtcgaca gcggcacggc aacggcctct cctgaccagc cctccgacga cggcgacgcg 7380  
ggatccgacg ttgagtcgta ctctccatg ccccccttg agggggagcc gggggatccc 7440  
gatctcagcg acgggtcttg gtctaccgta agcgaggagc ttaaggctag tgaggacgtc 7500  
gtctgctgct cgatgtccta cacatggaca ggcgcctga tcacgccatg cgctgcccag 7560  
gaaaccaagc tgcccatcaa tgcaactgac aactctttgc tccgtcacca caacttggtc 7620  
tatgtacaaa catctcgcag cgcaagcctg cggcagaaga aggtcacctt tgacagactg 7680  
caggtcctgg acgaccacta cggggacgtg ctcaaggaga tgaaggcga ggcgtccaca 7740  
gttaaggcta aacttctatc cgtggaggaa gcctgtaagc tgacgcccc acattcggcc 7800  
agatctaaat ttggctatgg ggcaaaggac gtcgggaacc tatccagcaa ggccgttaac 7860  
cacatccgct ccgtgtggaa ggacttctg gaagacactg agacaccaat tgacaccacc 7920  
atcatggcaa aaaatgaggt tttctgcgtc caaccagaga aggggggccc caagccagct 7980  
cgcttatcg tattccaga tttgggggtt cgtgtgtgag agaaaatggc cctttacgat 8040  
gtggtctcca ccctccctca ggccgtgatg ggctcttcat acggattcca atactctcct 8100

ES 2 546 190 T3

ggacagcggg tcgagttcct ggtgaatgcc tggaaagcga agaaatgcc tatgggcttc 8160  
 gcatatgaca cccgctgttt tgactcaacg gtcactgaga atgacatccg tgttgaggag 8220  
 tcaatctacc aatgttgtga cttggccccc gaagccagac aggccataag gtcgctcaca 8280  
 gagcggcttt acatcggggg ccccctgact aattctaaag ggcagaactg cggctatcgc 8340  
 cggtgccgcg cgagcgggtg actgacgacc agctgcggtg ataccctcac atgttacttg 8400  
 aaggccgctg cggcctgtcg agctgcgaag ctccaggact gcacgatgct cgtatgcgga 8460  
 gacgaccttg tcgttatctg tgaaagcgcg gggaccecaag aggaacgaggc gagcctacgg 8520  
 gccttcacgg aggetatgac tagatactct gccccccctg gggaccocgc caaaccagaa 8580  
 tacgacttgg agttgataac atcatgctcc tccaatgtgt cagtcgcgca cgatgcatct 8640  
 ggcaaaaggg tgtaactatct caccctgac cccaccacc ccttgccgcg ggetgcgtgg 8700  
 gagacagcta gacacactcc agtcaattcc tggctagga acatcatcat gtatgcgccc 8760  
 accttgtggg caaggatgat cctgatgact catttctctc ccatccttct agctcaggaa 8820  
 caacttgaaa aagccotaga ttgtcagatc tacggggcct gttactccat tgagccactt 8880  
 gacctacctc agatcattca acgactccat ggccttagcg cattttcact ccatagttac 8940  
 tctccaggtg agatcaatag ggtggcttca tgccctagga aacttggggg accgcccctg 9000  
 cgagtctgga gacatcgggc cagaagtgtc cgcgctaggc tactgtccca gggggggagg 9060  
 gctgccactt gtggcaagta cctcttcaac tgggcagtaa ggaccaagct caaactcact 9120  
 ccaatcccgg ctgcgtccca gttggattta tccagctggt tcgttgettg ttacagcggg 9180  
 ggagacatat atcacagcct gtctcgtgcc cgaccccgt ggttcatgtg gtgcctactc 9240  
 ctactttctg taggggtagg catctatcta ctcccccaacc gatgacttaa gacgggggagc 9300  
 taaacactcc aggccaatag gccatcctgt ttttttcct ttttttttt cttttttttt 9360  
 ttttttttt ttttttttt tttttctct ttttttttc ttttttttc cttttttttc 9420  
 ctttgggtggc tccatcttag ccctagtcac ggctagctgt gaaaggctcg tgagccgctt 9480  
 gactgcagag agtgetgata ctggcctctc tgcagatcaa gtactactag tccctttagt 9540  
 gagggttaat tcaattcttg aagacgaaag ggctcgtgta tacgcctatt tttataggtt 9600  
 aatgtcatga taataatggg ttcttagacg tcagggtgga ctttcggggg aatgtgcgc 9660  
 ggaaccocct tttgtttatt tttctaaata cattcaaata tgtatccgct catgagacaa 9720  
 taaccctgat aaatgottca ataatttga aaaaggaaga gtatgagtat tcaacatttc 9780  
 cgtgtcgcgc ttattccctt ttttgccgca ttttgcttc ctgtttttgc tcaccagaa 9840  
 acgctggtga aagtaaaaga tgctgaagat cagttgggtg cacgagtggg ttacatogaa 9900



ES 2 546 190 T3

ctggatctca acagcggtaa gatccttgag agttttcgcc ccgaagaacg ttttccaatg 9960  
 atgagcactt ttaaagttct gctatgtggc gcggtattat cccgtgttga cgccgggcaa 10020  
 gagcaactcg gtcgcgcgat acactattct cagaatgact tggttgagta ctcaccagtc 10080  
 acagaaaagc atcttacgga tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc tgccataacc 10140  
 atgagtgata acactgcggc caacttactt ctgacaacga tcggaggacc gaaggagcta 10200  
 accgcttttt tgcacaacat gggggatcat gtaactcgcc ttgatcgttg ggaaccggag 10260  
 ctgaatgaag ccataccaaa cgacgagcgt gacaccacga tgccctgcagc aatggcaaca 10320  
 acgttgcgca aactattaac tggcgaacta cttactctag cttcccggca acaattaata 10380  
 gactggatgg aggcggataa agttgcagga ccacttctgc gctcggccct tccggetggc 10440  
 tggtttattg ctgataaate tggagccggg gagcgtgggt ctgcgggtat cattgcagca 10500  
 ctggggccag atggtaagcc ctcccgtatc gtagttatct acacgacggg gagtcaggca 10560  
 actatggatg aacgaaatag acagatcgct gagatagggt cctcactgat taagcattgg 10620  
 taactgtcag accaagttta ctcatatata ctttagattg atttaaaact tcatttttaa 10680  
 tttaaaagga tctaggtgaa gatccttttt gataatctca tgaccaaaat cccttaacgt 10740  
 gagttttcgt tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat 10800  
 ctttttttct tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaaaaa aaccaccgct accagcggtg 10860  
 gtttgtttgc cggatcaaga gctaccaact ctttttccga aggtaactgg cttcagcaga 10920  
 gcgcagatac caaatactgt ccttctagtg tagccgtagt taggccacca cttcaagaac 10980  
 tctgtagcac cgcctacata cctcgtcttg ctaatcctgt taccagtggc tgctgccagt 11040  
 ggcgataagt cgtgtcttac cgggttggac tcaagacgat agttaccgga taaggcgcag 11100  
 cggtcgggct gaacggggggg ttcgtgcaca cagcccagct tggagcgaac gacctacacc 11160  
 gaactgagat acctacagcg tgagctatga gaaagcgcca cgcttcccga agggagaaaag 11220  
 gcggacaggt atccggtaag cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag ggagcttcca 11280  
 gggggaaaacg cctggtatct ttatagtctt gtcgggttct gccacctctg acttgagcgt 11340  
 cgatttttgt gatgctcgtc agggggggcg agcctatgga aaaacgccag caacgcggcc 11400  
 ttttacgggt tcttgccctt ttgctggcct ttgctcaca tgttctttcc tgcgttatcc 11460  
 cctgattctg tgataaaccg tattaccgcc ttgagtgag ctgataaccg tcgccgcagc 11520  
 cgaacgaccg agcgcagcga gtcagtgagc gaggaagcgg aagagcgctt gatgcggtat 11580  
 tttctcctta cgcactctgt cggatattca caccgcata ggtgcactct cagtacaatc 11640  
 tgctctgatg ccgcatagtt aagccagtat aactccgct atcgctacgt gactgggtca 11700  
 tggctgcgcc ccgacaccgg ccaacaccgg ctgacgcgcc ctgacgggct tgtctgctcc 11760

ES 2 546 190 T3

cgccatccgc ttacagacaa gctgtgaccg tctccgggag ctgcatgtgt cagaggtttt 11820  
cacogtcate accgaaacgc gcgaggcagc tgcggtaaag ctcatcagcg tggctgtgaa 11880  
gogattcaca gatgtctgcc tgttcatccg cgtccagctc gttgagtttc tccagaagcg 11940  
ttaatgtctg gcttctgata aagcgggcca tgttaagggc ggttttttcc tgtttgtca 12000  
ctgatgcctc cgtgtaaggg ggatttctgt tcatgggggt aatgataccg atgaaacgag 12060  
agaggatgct cacgatacgg gttactgatg atgaacatgc ccggttactg gaacgttggtg 12120  
agggtaaaca actggcggta tggatgcggc gggaccagag aaaaatcact cagggtcaat 12180  
gccagcgctt cgtaataca gatgtaggtg ttccacaggg tagccagcag catcctgcga 12240  
tgcagatccg gaacataatg gtgcagggcg ctgacttccg cgtttccaga ctttacgaaa 12300  
cacggaaacc gaagaccatt catgttgttg ctcaggtcgc agacgttttg cagcagcagt 12360  
cgcttcacgt tcgctcgcgt atcggtgatt cattctgcta accagtaagg caaccccgcc 12420  
agcctagccg ggtcctcaac gacaggagca cgatcatgcg caccctgggc caggacccaa 12480  
cgctgcccga gatgcgccgc gtgcggctgc tggagatggc ggacgcgatg gatatgttct 12540  
gccaaagctaa gctgcctgca ggtaatacga ctcaactata 12579

<210> 21  
<211> 10773  
<212> ADN  
<213> Virus de la hepatitis C

5

<400> 21

gccagccccc gattgggggc gacactccac catagatcac tcccctgtga ggaactactg 60  
tcttcacgca gaaagcgtct agccatggcg ttagtatgag tgtcgtgcag cctccaggac 120  
ccccctccc gggagagcca tagtggctcg cggaaccggt gagtacaccg gaattgccag 180  
gacgaccggg tcctttcttg gateaaccog ctcaatgcct ggagatttgg gcgtgcccc 240  
gcgagactgc tagccagta gtgttgggtc gcgaaaggcc ttgtggtact gcctgatagg 300  
gtgcttgcca gtgccccggg aggtctcgta gaccgtgcac cgtttaaacc cccgtgctgc 360  
tggaaagcga tttcaggctt agggtaaccg tggacctcga aacagacgc aaaaaccaa 420  
gttcaataga aggggtaca aaccagtacc accacgaaca agcacttctg tttccccggt 480  
gatgtcgtat agactgcttg cgtggttgaa agcgacggat ccgttatccg cttatgtact 540  
tcgagaagcc cagtaccacc tcggaatctt cgatgcgttg cgctcagcac tcaaccccag 600  
agtgtagctt aggctgatga gtctggacat cctcaccggt tgacgggtgt ccaggctgcg 660  
ttggcggcct acctatggtt aacgccatgg gacgctagtt gtgaacaagg tgtgaagagc 720  
ctattgagct acataagaat cctccggccc ctgaatgcgg ctaatcccaa cctcggagca 780

10

ES 2 546 190 T3

ggtggtcaca aaccagtgat tggcctgtcg taacgcgcaa gtccgtggcg gaaccgacta 840  
 ctttgggtgt cegtgtttcc ttttatttta ttgtggctgc ttatggtgac aatcacagat 900  
 tgttatcata aagcgaattg gattggccat ccggtgaaag tgagactcat tatctatctg 960  
 tttgctggat ccgctccatt gagtgtgttt actctaagta caatttcaac agttatttca 1020  
 atcagacaat tgtatcataa tggcgggccc agaagacgcc aaaaacataa agaaaggccc 1080  
 ggcgccattc tatcctctag aggatggaac cgctggagag caactgcata aggctatgaa 1140  
 gagatacgcc ctggttcctg gaacaattgc ttttacagat gcacatatcg aggtgaacat 1200  
 cacgtacgcg gaatacttcg aaatgtccgt tcggttggca gaagctatga aacgatatgg 1260  
 gctgaataca aatcacagaa tcgtcgtatg cagtgaaaac tctcttcaat tctttatgcc 1320  
 ggtgtttgggc gcgttattta tcggagttgc agttgcgccc gcgaacgaca tttataatga 1380  
 acgtgaattg ctcaacagta tgaacatttc gcagcctacc gtagtgtttg tttccaaaaa 1440  
 gggggtgcaa aaaattttga acgtgcaaaa aaaattacca ataatccaga aaattattat 1500  
 catggattct aaaacggatt accagggatt tcagtcgatg tacacgttcg tcacatctca 1560  
 tctacctccc ggttttaatg aatacgattt tgtaccagag tcctttgatc gtgacaaaaa 1620  
 aattgcactg ataatgaatt cctctggatc tactgggtta cctaaggggtg tggcccttcc 1680  
 gcatagaact gcctgcgtca gattctcgca tgccagagat cctatttttg gcaatcaaat 1740  
 cattccgat actgcgattt taagtgttgt tccattccat cacggttttg gaatgtttac 1800  
 tacactcgga tatttgatat gtggatttcg agtcgtctta atgtatagat ttgaagaaga 1860  
 gctgttttta cgatcccttc aggattacaa aattcaaagt gcgttgctag taccaaccct 1920  
 attttcattc ttcccaaaa gcactctgat tgacaaatac gatttatcta atttacacga 1980  
 aattgcttct gggggcgcac ctctttcgaa agaagtcggg gaagcgggtg caaaacgctt 2040  
 ccattctcca gggatacgac aaggatatgg gctcactgag actacatcag ctattctgat 2100  
 tacacccgag ggggatgata aaccgggcgc ggtcggtaaa gttgttccat tttttgaagc 2160  
 gaaggttggtg gatctggata ccgggaaaaa gctgggcggtt aatcagagag gcgaattatg 2220  
 tgtcagagga cctatgatta tgtccggtta tgtaaacaat ccggaagcga ccaacgcctt 2280  
 gattgacaag gatggatggc tacattctgg agacatagct tactgggacg aagacgaaca 2340  
 cttcttcata gttgaccgct tgaagtcttt aattaaatac aaaggatata aggtggcccc 2400  
 cgctgaattg gaatcgatat tgttacaaca ccccaacatc ttcgacgcg gctgtgcagg 2460  
 tcttcccgac gatgacgccg gtgaacttcc cgcgcgctt gttgttttg agcacgaaa 2520  
 gacgatgacg gaaaaagaga tcgtggatta cgtcgcagc caagtaaca ccgcgaaaaa 2580

ES 2 546 190 T3

gttgcgcgga ggagttgtgt ttgtggacga agtaccgaaa ggtcttaccg gaaaactcga 2640  
 cgcaagaaaa atcagagaga tcctcataaa ggccaagaag ggccgaaagt ccaaattgta 2700  
 agcggccgcg ttgttaaaca gaccacaacg gtttccctct agcgggatea attccgcccc 2760  
 cccccctaa cgttactggc cgaagccgct tggaataagg ccggtgtgcg tttgtctata 2820  
 tgttattttc caccatattg ccgtcttttg gcaatgtgag ggccccgaaa cctggccctg 2880  
 tcttcttgac gagcattcct aggggtcttt ccctctcgc caaaggaatg caaggtctgt 2940  
 tgaatgtcgt gaaggaagca gttcctctgg aagcttcttg aagacaaaca acgtctgtag 3000  
 cgacccttg caggcagcgg aacccccac ctggcgacag gtgcctctgc ggccaaaagc 3060  
 cacgtgtata agataacct gcaaaggcgg cacaacccca gtgccacgtt gtgagttgga 3120  
 tagttgtgga aagagtcaaa tggtctcct caagcgtatt caacaagggg ctgaaggatg 3180  
 ccagaaggt accccattgt atgggatctg atctggggcc tcggtgcaca tgctttacat 3240  
 gtgtttagtc gaggttaaaa aaacgtctag gcccccgaa ccacggggac gtggttttcc 3300  
 tttgaaaaac acgataatac catggcgcct attacggcct actcccaaca gacgcgaggc 3360  
 ctacttggt gcacatcac tagcctcaca ggccgggaca ggaaccaggt cgagggggag 3420  
 gtccaagtgg tctccaccgc aacacaatct ttctggcga cctgcgtcaa tggcgtgtgt 3480  
 tggactgtct atcatgggtgc ccgctcaaag acccttgccg gcccaaaggg cccaatcacc 3540  
 caaatgtaca ccaatgtgga ccaggacctc gtcggctggc aagcgccccc cggggcgcgt 3600  
 tccttgacac catgcacctg ccgacgctcg gaccttact tggtaacgag gcatgccgat 3660  
 gtcattccgg tgcgcggcg gggcgacagc agggggagcc tactctccc caggcccgtc 3720  
 tctacttga agggctcttc gggcgggtcca ctgctctgcc cctcggggca cgctgtgggc 3780  
 atctttcggg ctgccgtgtg caccocaggg gttgcgaagg cggtgactt tgtaccocgtc 3840  
 gagtctatgg gaaccactat gcgggtcccc gtcttcacgg acaactcgtc ccctccggcc 3900  
 gtaccgcaga cattccaggt ggcccataca cacgccccta ctggtagcgg caagagcact 3960  
 aaggtgccgg ctgcgtatgc agcccaaggg tataaggtgc ttgtcctgaa ccctccgtc 4020  
 gccgccacc taggtttcgg ggcgtatatg tctaaggcac atggtatcga ccctaacatc 4080  
 agaatcgggg taaggaccat caccacgggt gccccatca cgtactccac ctatggcaag 4140  
 tttcttgccg acggtggttg ctctgggggc gcctatgaca tcataatatg tgatgagtgc 4200  
 cactcaactg actcgaccac tatcctgggc atcggcacag tcctggacca agcggagacg 4260  
 gctggagcgc gactcgtcgt gctcgcacc gctacgcctc cgggatcggc cacogtgcca 4320  
 catccaaaca tcgaggaggt ggctctgtcc agcactggag aatccccctt ttatggcaaa 4380  
 gccatcccca tcgagaccat caaggggggg aggcacctca tttctgcca ttccaagaag 4440

ES 2 546 190 T3

aaatgtgatg agctcgccgc gaagctgtcc ggccctcggac tcaatgctgt agcatattac 4500  
 cggggccttg atgtatccgt cataccaact agcggagacg tcattgtcgt agcaacggac 4560  
 gctctaataga cgggctttac cggcgatttc gactcagtga togactgcaa tacatgtgtc 4620  
 acccagacag tcgacttcag cctggacccg accttcacca ttgagacgac gaccgtgcc 4680  
 caagacgcgg tgtcacgctc gcagcggcga ggcaggactg gtaggggcag gatgggcatt 4740  
 tacaggtttg tgactccagg agaacggccc tcgggcatgt tcgattcctc ggttctgtgc 4800  
 gagtgtatg acgcgggctg tgcttggtag gagctcagc ccgccgagac ctcaagttagg 4860  
 ttgcgggctt acctaaacac accagggttg ccgctctgcc aggaccatct ggagttctgg 4920  
 gagagcgtct ttacaggcct cacccacata gacgccatt tcttgtcca gactaagcag 4980  
 gcaggagaca acttccccta cctggtagca taccaggcta cggtgtgcgc cagggtcag 5040  
 gctccacctc catcgtggga ccaaagtgg aagtgtctca tacggctaaa gcctacgctg 5100  
 cacgggcca cgcacctgct gtataggctg ggagccgttc aaaacgaggt tactaccaca 5160  
 caccccataa ccaaatacat catggcatgc atgtcggctg acctggaggt cgtcacgagc 5220  
 acctgggtgc tggtaggcgg agtcctagca gctctggccg cgtattgcct gacaacaggc 5280  
 agcgtggtca ttgtgggcag gatcatcttg tccgaaagc cggccatcat tcccagacag 5340  
 gaagtccttt accgggagtt cgatgagatg gaagagtgcg cctcacacct cccttacatc 5400  
 gaacagggaa tgcagctcgc cgaacaattc aaacagaagg caatcgggtt gctgcaaaca 5460  
 gccaccaagc aagcggaggc tgetgctccc gtgggtggaat ccaagtggcg gaccctcgaa 5520  
 gccttctggg cgaagcatat gtggaatttc atcagcggga tacaatattt agcaggcttg 5580  
 tccactctgc ctggcaacct cgcgatagca tcaactgatg cattcacagc ctctatcacc 5640  
 agcccgtca ccaccaaca taccctctg ttaacatcc tgggggatg ggtggccgcc 5700  
 caacttgctc ctcccagcgc tgcttctgct ttcgtaggcg ccggcatcgc tggagcggct 5760  
 gttggcagca taggccttg gacgggtgct gtggatattt tggcaggtta tggagcaggg 5820  
 gtggcaggcg cgtcgtggc cttaaggtc atgagcggcg agatgcctc caccgaggac 5880  
 ctggtaacc tactccctgc tatectctc cctggcgccc tagtcgtcgg ggtcgtgtgc 5940  
 gcagcgatac tgcgtcggca cgtgggcca gggaggggg ctgtgcagt gatgaaccgg 6000  
 ctgatagcgt tcgcttcgcg gggtaaccac gtctccccc cgcactatgt gcctgagagc 6060  
 gacgctgcag cacgtgtcac tcagatctc tctagtctta ccatcactca gctgctgaag 6120  
 aggcttcacc agtggatcaa cgaggactgc tccacgcat gctccggctc gtggctaaga 6180  
 gatgtttggg attggatag cacgggtgtg actgatttca agacctggt ccagtccaag 6240

ES 2 546 190 T3

ctcctgcccg gattgcccgg agtccccctt ttctcatgtc aacgtgggta caagggagtc 6300  
 tggcggggcg acggcatcat gcaaaccacc tgcccatgtg gagcacagat caccggacat 6360  
 gtgaaaaacg gttccatgag gatcgtgggg cctaggacct gtagtaacac gtggcatgga 6420  
 acattcccc a ttaacgcgta caccacgggc cctgcaocg cctccccggc gccaaattat 6480  
 tctagggcgc tgtggcgggt ggctgctgag gagtacgtgg aggttacgcg ggtgggggat 6540  
 ttccactacg tgacgggcat gaccactgac aacgtaaagt gcccggtgca ggttccggcc 6600  
 cccgaattct tcacagaagt ggatgggggt cggttgca ca ggtacgctcc agcgtgcaaa 6660  
 cccctcctac gggaggaggt cacattcctg gtcgggctca atcaatacct ggttgggtca 6720  
 cagctcccat gcgagcccga accggacgta gcagtgtca ctccatgct caccgacccc 6780  
 tcccacatta cggcgggagac ggctaagcgt aggtggcca ggggatctcc cccctccttg 6840  
 gccagctcat cagctagcca gctgtctgcg ccttccttga aggcaacatg cactaccgct 6900  
 catgactccc cggacgctga cctcatcgag gccaacctcc tgtggcggca ggagatgggc 6960  
 gggaacatca cccgcgtgga gtcagaaaat aaggtagtaa ttttgactc tttcgagccg 7020  
 ctccaagcgg aggaggatga gagggaaagta tccgttccgg cggagatcct gggaggtcc 7080  
 aggaaattcc ctcgagcgat gcccatatgg gcacgcccgg attacaaccc tccactgtta 7140  
 gagtccctgga aggaccccga ctacgtccct ccagtggtag accgggtgccc attgcccct 7200  
 gccaaaggccc cttegatacc acctccacgg aggaagagga cggttgtcct gtcagaattct 7260  
 accgtgtctt ctgccttggc ggagctcgcc acaaagacct tcggcagctc cgaatcgtcg 7320  
 gccgtcgaca gcggcacggc aacggcctct cctgaccagc cctccgacga cggcgacgcg 7380  
 ggatccgacg ttgagtcgta ctctccatg ccccccttg agggggagcc gggggatccc 7440  
 gatctcagcg acgggtcttg gctaccgta agcggaggagc ttaagacggg gagctaaaca 7500  
 ctccaggcca ataggccatc ctgtttttt ccttttttt tttcttttt ttttttttt 7560  
 ttttttttt ttttttttc tcctttttt ttctctttt tttcttttc tttcttttg 7620  
 tggctccatc ttagccctag tcacggetag ctgtgaaagg tccgtgagcc gcttgactgc 7680  
 agagagtgtt gatactggcc tctctgcaga tcaagtaacta ctagtccctt tagtgaggg 7740  
 taattcaatt ctggaagacg aaaggcctc gtgatacgcc ttttttata ggttaatgtc 7800  
 atgataataa tggtttctta gacgtcaggt ggcacttttc ggggaaatgt ggcggaacc 7860  
 cctatttggt ttttttcta aatacattca aatatgtatc cgctcatgag acaataaccc 7920  
 tgataaatgc ttcaataata ttgaaaagg aagagtatga gtattcaaca tttcogtgc 7980  
 gcccttatc ccttttttgc ggcattttgc ctctctgtt ttgctcacc agaaacgctg 8040  
 gtgaaagtaa aagatgctga agatcagttg ggtgcacgag tgggttacat cgaactggat 8100

ES 2 546 190 T3

ctcaacagcg gtaagatcct tgagagtttt cgccccgaag aacgttttcc aatgatgagc 8160  
 acttttaaag ttctgctatg tggcgcggtg ttatcccgtg ttgacgccgg gcaagagcaa 8220  
 ctcggtcgcc gcatacacta ttctcagaat gacttggttg agtactcacc agtcacagaa 8280  
 aagcatctta cggatggcat gacagtaaga gaattatgca gtgctgccat aaccatgagt 8340  
 gataaactg cgccaactt acttctgaca acgatcggag gaccgaagga gctaaccgct 8400  
 tttttgcaca acatggggga tcatgtaact cgccttgatc gttgggaacc ggagctgaat 8460  
 gaagccatac caaacgacga gcgtagacacc acgatgcctg cagcaatggc aacaacgttg 8520  
 cgcaaaactat taactggcga actacttact ctagcttccc ggcaacaatt aatagactgg 8580  
 atggagggcg ataaagttgc aggaccactt ctgcgctcgg ccttccggc tggtggttt 8640  
 attgctgata aatctggagc cggtagcgt ggggtctcgg gtatcattgc agcactgggg 8700  
 ccagatggta agccctcccg tatcgtagtt atctacacga cggggagtca ggcaactatg 8760  
 gatgaacgaa atagacagat cgtgagata ggtgcctcac tgattaagca ttggtaactg 8820  
 tcagaccaag tttactcata tatactttag attgatttaa aacttcattt ttaatttaa 8880  
 aggatctag tgaagatcct ttttgataat ctcatgacca aatccctta acgtgagttt 8940  
 tegtccact gagcgtcaga ccccgtagaa aagatcaaag gatcttcttg agatcctttt 9000  
 tttctgcgcg taatctgctg cttgcaaaca aaaaaaccac cgctaccagc ggtggtttgt 9060  
 ttgccggatc aagagctacc aactctttt ccgaaggtaa ctggcttcag cagagcgcag 9120  
 ataccaaata ctgtccttct agtgtagccg tagttaggcc accacttcaa gaactctgta 9180  
 gcaccgcta catacctcgc totgctaate ctgttaccag ttgctgctgc cagtggcgat 9240  
 aagtcgtgtc ttaccgggtt ggaactcaaga cgatagttac cggataaggc gcagcggctg 9300  
 ggctgaacgg ggggttcgtg cacacagccc agcttggagc gaacgaccta caccgaactg 9360  
 agatacctac agcgtgagct atgagaaagc gccacgcttc ccgaaggag aaaggcggac 9420  
 aggtatccgg taagcggcag ggtcggaaaca ggagagcgca cgaggagct tccaggggga 9480  
 aacgcctggt atctttatag tctgtcggg tttcggcacc tetgaactga gctcgattt 9540  
 ttgtgatgct cgtcaggggg gggagccta tggaaaaacg ccagcaacgc ggccttttta 9600  
 cggttcctgg ccttttgctg gccttttgct cacatgttct tctctcgtt atcccctgat 9660  
 tctgtggata accgtattac cgcctttgag tgagctgata ccgctcggc cagccgaacg 9720  
 accgagcgca gcgagtcagt gagcggaggaa gcggaagagc gcctgatgcg gtattttctc 9780  
 cttacgcac tgtgcggtat ttcacaccgc atatggtgca ctctcagtac aatctgctct 9840  
 gatgccgat agttaagcca gtatacactc cgctatcgt acgtgactgg gtcatggctg 9900

ES 2 546 190 T3

cgccccgaca cccgccaaaca cccgctgaag cgccctgaag ggcttgtctg ctcccggcat 9960  
 ccgcttacag acaagctgtg accgtctccg ggagctgcat gtgtcagagg ttttcaccgt 10020  
 catcaccgaa acgcgcgagg cagctgcggg aaagctcatt agcgtggtcg tgaagcgatt 10080  
 cacagatgtc tgccctgttca tccgcgtcca gctcgttgag tttctccaga agcgttaatg 10140  
 tctggcttct gataaagcgg gccatgttaa gggcggtttt ttctgtttg gtcactgatg 10200  
 cctccgtgta agggggattt ctgttcatgg gggtaatgat accgatgaaa cgagagagga 10260  
 tgctcacgat acgggttact gatgatgaac atgcccgggt actggaacgt tgtgagggta 10320  
 aacaactggc ggtatggatg cggcgggacc agagaaaaat cactcagggt caatgccagc 10380  
 gcttcgttaa tacagatgta ggtgttccac agggtagcca gcagcatcct gcgatgcaga 10440  
 tccggaacat aatggtgcag ggcgctgact tccgcgttcc cagactttac gaaacacgga 10500  
 aaccgaagac cattcatggt gttgctcagg tcgcagacgt tttgcagcag cagtcgcttc 10560  
 acgttcgctc gcgtatcggg gattcattct gctaaccagt aaggcaacc cgcacgcta 10620  
 gccgggtcct caacgacagg agcagatca tgcgcaccoc tggccaggac ccaacgctgc 10680  
 ccgagatgag ccgcgtgcgg ctgctggaga tggcggacgc gatggatatg ttctgccaaag 10740  
 ctaagctgcc tgcaggtaat acgactcact ata 10773

5  
 <210> 22  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Virus de la hepatitis C

10  
 <400> 22  
 ggcgccattc tatccactag aggatggaac c 31

15  
 <210> 23  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Virus de la hepatitis C

<400> 23  
 ggtccatcc tctagtggat agaatggcgc c 31

20  
 <210> 24  
 <211> 63  
 <212> ADN  
 <213> Virus de la hepatitis C

25  
 <400> 24  
 gagtgcgat actggcctct ctgcagatca agtctagaaa gtccctttag tgagggttaa 60  
 ttc 63

30  
 <210> 25  
 <211> 63  
 <212> ADN  
 <213> Virus de la hepatitis C



ES 2 546 190 T3

<400> 25

gaattaaccc tcaactaaagg gactttctag acttgatctg cagagaggcc agtatcagca 60  
ctc 63

5 <210> 26  
<211> 12579  
<212> ADN  
<213> Virus de la hepatitis C

10 <400> 26

gccagcccc gattgggggc gacactccac catagatcac tcccctgtga ggaactactg 60  
tcttcacgca gaaagcgtct agccatggcg ttagtatgag tgtcgtgcag cctccaggac 120  
ccccctccc gggagagcca tagtggctctg cggaaaccggt gagtacaccg gaattgccag 180  
gacgaccggg tctttctctg gatcaaccgg ctcaatgcct ggagatttg gcggtgcccc 240  
gcgagaactgc tagccgagta gtgttgggtc gcgaaaggcc ttgtgggtact gcctgatagg 300  
gtgcttgcca gtgccccggg aggtctcgta gaccgtgcac cgtttaaacc cccgtgctgc 360  
tggaaagtcga tttcaggctt agggtaaccg tggacctcga aaacagacgc acaaaaccaa 420  
gttcaataga aggggtaca aaccagtacc accacgaaca agcacttctg tttccccggt 480  
gatgtcgtat agaactgctt cgtggttgaa agcgcaggat ccgttatccg cttatgtact 540  
tcgagaagcc cagtaccacc tcggaatctt cgatgcgctt cgcctcagcac tcaaccccag 600  
agtgtagctt aggctgatga gtctggacat cctcaccggg tgacgggtggc ccaggctgcg 660  
ttggcggcct acctatggct aacgccatgg gacgctagtt gtgaacaagg tgtgaagagc 720  
ctattgagct acataagaat cctccggccc ctgaatgcgg ctaatcccaa cctcggagca 780  
gggtggtcaca aaccagtgat tggcctgtcg taacgcgcaa gtccgtggcg gaaccgacta 840  
ctttgggtgt ccgtgtttcc ttttatttta ttgtggctgc ttatgggtgac aatcacagat 900  
tgttatcata aagcgaattg gattggccat ccggtgaaag tgagactcat tatctatctg 960  
tttgcctggat ccgctccatt gagtgtgttt actctaagta caatttcaac agttatttca 1020  
atcagacaat tgtatcataa tggcggggccc agaagacgcc aaaaacataa agaaaggccc 1080  
ggcgccattc tatccactag aggatggaac cgctggagag caactgcata aggctatgaa 1140  
gagatacggc ctggttcctg gaacaattgc ttttacagat gcacatatcg aggtgaacat 1200  
cacgtacggc gaataactcg aatgtccgt tcggttggca gaagctatga aacgatatgg 1260  
gctgaataca aatcacagaa tcgtcgtatg cagtgaaaac tctcttcaat tctttatgcc 1320  
gggtgttggc gcgttattta tcggagttgc agttgcgccc gcgaacgaca tttataatga 1380

ES 2 546 190 T3

acgtgaattg ctcaacagta tgaacatttc gcagcctacc gtagtgtttg tttccaaaa 1440  
 ggggttgcaa aaaatthttga acgtgcaaaa aaaattacca ataatccaga aaattattat 1500  
 catggattct aaaacggatt accagggatt tcagtcgatg tacacgttcg tcacatctca 1560  
 tctacctccc ggthtttaatg aatacagattt tgtaccagag tcctttgate gtgacaaaac 1620  
 aattgcactg ataatgaatt cctctggate tactgggtta cctaaggggtg tggccttcc 1680  
 gcatagaact gcctgcgtca gattctcgca tgccagagat cctatthtttg gcaatcaaat 1740  
 cattccggat actgcgattt taagtgttgt tccattccat cacggthtttg gaatgtttac 1800  
 taaactcgga tathttgatat gtggatttcg agtcgtctta atgtatagat ttgaagaaga 1860  
 gctgtthttta cgatcccttc aggattacaa aattcaaaagt gcgttgctag taccaacct 1920  
 atthttcattc ttcgccaaaa gcactctgat tgacaaaatac gatttatcta atthtacga 1980  
 aattgcttct gggggcgcac ctctthtcgaa agaagtcggg gaagcggttg caaaacgctt 2040  
 ccatcttcca gggatacgac aaggatatgg gctcaactgag actacatcag ctattctgat 2100  
 tacaccogag ggggatgata aaccgggccc ggtcggtaaa gttgttccat thtttgaagc 2160  
 gaaggttggt gatctggata ccgggaaaac gctgggcgtt aatcagagag gcgaattatg 2220  
 tgtcagagga cctatgatta tgtccggta tghtaaacaat ccggaagcga ccaacgcctt 2280  
 gattgacaag gatggatggc tacattctgg agacatagct tactgggacg aagacgaaca 2340  
 cttcttcaata gttgaccgct tgaagtcttt aattaaatac aaaggatctc aggtggcccc 2400  
 cgctgaattg gaatcgatat tgttacaaca ccccaacatc ttcgacgcgg gcgtggcagg 2460  
 tcttcccgac gatgacgccg gtgaacttcc cgcgcgctt gttgtthttgg agcacggaaa 2520  
 gacgatgacg gaaaaagaga tcgtggatta cgtcgccagt caagtaacaa ccgcgaaaaa 2580  
 gttgcgcgga ggagttgtgt ttgtggacga agtaccgaaa ggtcttaacc gaaaactcga 2640  
 cgcaagaaaa atcagagaga tctcataaa ggccaagaag ggcggaaagt ccaaattgta 2700  
 agcggccgcg ttgttaaaca gaccacaacg gthttccctc agcgggatca attccgcccc 2760  
 cccccctaa cgttactggc cgaagccgct tghtaataagg ccggtgtgcg thttgtctata 2820  
 tgttathttc caccatattg ccgtctthttg gcaatgtgag ggccccgaaa cctggccctg 2880  
 tcttcttgac gagcattctc aggggtcttt cctctctcgc caaaggaatg caaggtctgt 2940  
 tgaatgtcgt gaaggaagca gthctctctg aagcttcttg aagacaaaaca acgtctgtag 3000  
 cgaccctthg caggcagcgg aacccccac ctggcgacag gtgcctctgc ggccaaaagc 3060  
 cacgtgtata agatacacct gcaaaggcgg cacaacccca gtgccacgth gtgagttgga 3120  
 tagttgtgga aagagtcaaa tggctctctc caagcgtatt caacaagggg ctgaaggatg 3180

ES 2 546 190 T3

cccagaaggt accccattgt atgggatctg atctggggcc tcggtgcaca tgctttacat 3240  
 gtgtttagtc gaggttaaaa aaacgtctag gcccccgaa ccaocggggac gtggttttcc 3300  
 tttgaaaaac acgataatac catggegect attacggcct actcccaaca gacgcgagggc 3360  
 ctacttggtt gcatcatcac tagcctcaca ggccgggaca ggaaccaggt ogagggggag 3420  
 gtccaagtgg tctccaccgc aacacaatct ttcttggcga cctgcgtcaa tggcgtgtgt 3480  
 tggactgtct atcatggtgc cggctcaaag acccttgcg gcccaaaggg cccaatcacc 3540  
 caaatgtaca ccaatgtgga ccaggacctc gtggctggc aagcgcccc oggggcgct 3600  
 tccttgacac catgcacctg cggcagctcg gaccttact tggtcacgag gcatgcgat 3660  
 gtcattccgg tgcgcggcg gggcgacagc agggggagcc tactctccc caggcccgtc 3720  
 tcctacttga agggctcttc gggcgtcca ctgctctgcc cctcggggca cgctgtgggc 3780  
 atctttcggg ctgcccgtgt cacccgagg gttgcgaagg cggtagactt tgtaccgctc 3840  
 gagtctatgg gaaccactat gggtecccc gtcttcaagg acaactcgtc cctccggcc 3900  
 gtaccgcaga cattccaggt ggcccatcta cagccccta ctggtagcgg caagagcact 3960  
 aaggtagcgg ctgcgtatgc agcccaagg tataaggtgc ttgtcctgaa ccgctccgtc 4020  
 gccgccccc taggtttcgg ggcgtatatg tctaaggcac atggtatcga cctaacatc 4080  
 agaatcgggg taaggaccat caccacgggt gccccatca cgtactccac ctatggcaag 4140  
 tttcttgccg acggtggttg ctctgggggc gcctatgaca tcataatatg tgatgagtgc 4200  
 cactcaactg actcgaccac tctctgggc atcggcacag tctggacca agcggagacg 4260  
 gctggagcgc gactcgtcgt gctcgcacc gctacgctc cgggatcggg caccgtgcca 4320  
 catccaaaca tcgaggaggt ggctctgtcc agcactggag aaatcccctt ttatggcaaa 4380  
 gccatcccca tcgagaccat caagggggg aggcacctca tttctgcca ttccaagaag 4440  
 aaatgtgatg agctcgcgc gaagctgtcc ggctcggac tcaatgctgt agcatattac 4500  
 cggggccttg atgtatcgt cataccaact agcggagacg tcattgtcgt agcaacggac 4560  
 gctetaatga cgggctttac cggcgatttc gactcagtga tcgactgcaa tacatgtgtc 4620  
 accagacag tcgacttcag cctggaccgg acctcacca ttgagacgac gaccgtgcca 4680  
 caagacgagg tgtcacgctc gcagcggcga ggcaggactg gtaggggcag gatgggcatt 4740  
 tacaggtttg tgactccagg agaacggccc tcgggcatgt tcgattcctc ggttctgtgc 4800  
 gagtgtatg acgcgggctg tgcttggtag gagctcacgc ccgccgagac ctcaagttagg 4860  
 ttgcgggctt acctaaacac accagggttg ccgctctgcc aggaccatct ggagttctgg 4920  
 gagagcgtct ttacaggcct caccacata gacgccatt tottgtccca gactaagcag 4980  
 gcaggagaca acttccccta cctggtagca taccaggcta cgggtgtgcgc cagggctcag 5040

ES 2 546 190 T3

gctccacctc catcgtggga ccaaagtgtg aagtgtctca tacggctaaa gcctacgctg 5100  
 cacgggceaa cgcccctgct gtataggctg ggagccgttc aaaacgaggt tactaccaca 5160  
 caccataa ccaaatacat catggcatgc atgtcggctg acctggaggt cgtcacgagc 5220  
 acctgggtgc tggtagggg agtcctagca gctctggcgg cgtattgcct gacaacaggc 5280  
 agcgtggtca ttgtgggcag gatcatcttg tccggaaagc cggccatcat tcccacagc 5340  
 gaagtccttt accgggagtt cgatgagatg gaagagtgcg cctcacacct cccttacatc 5400  
 gaacagggaa tgcagctcgc cgaacaattc aaacagaagg caatcgggtt gctgcaaaca 5460  
 gccaccaagc aagcggaggc tgcctctccc gtgggtggaat ccaagtggcg gaccctcgaa 5520  
 gccttctggg cgaagcatat gtggaatttc atcagcggga tacaatattt agcaggcttg 5580  
 tccactctgc ctggaacccc cgcgatagca tcaactgatg cattcacagc ctctatcacc 5640  
 agcccgtca ccaccaaca taccctcctg tttaacatcc tggggggatg ggtggccgcc 5700  
 caacttctc ctcccagcgc tgccttctgct ttcgtaggcg ccggcatcgc tggagcggct 5760  
 gttggcagca taggccttgg gacggtgctt gtggatattt tggcaggta tggagcaggg 5820  
 gtggcaggcg cgtcgtggc ctttaaggtc atgagcggcg agatgcctc caccgaggac 5880  
 ctggttaacc tactccctgc tatectctcc cctggcgccc tagtcgtcgg ggtcgtgtgc 5940  
 gcagcgatac tgcgtcggca cgtgggccc ggggaggggg ctgtgcagtg gatgaaccgg 6000  
 ctgatagcgt tcgcttcgcg gggtaaccac gtctccccc cgcactatgt gcctgagagc 6060  
 gacgctgcag cacgtgtcac tcagatcctc tctagtctta ccatcactca gctgctgaag 6120  
 aggettacc agtggatcaa cgaggactgc tccacgccat gctccggctc gtggctaaga 6180  
 gatgtttggg attggatatg cacggtgttg actgatttca agacctggct ccagtccaag 6240  
 ctctgcgcg gattgcccgg agtccccttc ttctcatgtc aacgtgggta caagggagtc 6300  
 tggcggggcg acggcatcat gcaaaccacc tgcccatgtg gagcacagat caccggacat 6360  
 gtgaaaaacg gttccatgag gatcgtgggg cctaggacct gtagtaacac gtggcatgga 6420  
 acattccca ttaacgcgta caccacgggc ccctgcacgc cctcccggc gccaaattat 6480  
 tctagggcgc tgtggcgggt ggctgctgag gagtacgtgg aggttacgcg ggtgggggat 6540  
 ttcaactacg tgacgggcat gaccactgac aacgtaaagt gcccggtgca ggttccggcc 6600  
 cccgaattct tcacagaagt ggatggggtg cggttgcaca ggtacgctcc agcgtgcaaa 6660  
 ccctcctac gggaggaggt cacattcctg gtcgggctca atcaatacct ggttgggtca 6720  
 cagctcccat gcgagcccga accggacgta gcagtgtca ctccatgct caccgacccc 6780  
 tcccacatta cggcggagac ggctaagcgt aggctggcca ggggatctcc ccctccttg 6840

ES 2 546 190 T3

gccagctcat cagctagcca gctgtctgcg ccttccttga aggcaacatg cactaccegt 6900  
 catgactccc cggacgctga cctcatcgag gccaacctcc tgtggcgcca ggagatgggc 6960  
 gggaacatca cccgctgga gtcagaaaat aaggtagtaa ttttgactc tttcgagccg 7020  
 ctccaagcgg aggaggatga gagggaagta tccgttcogg cggagatcct ggggaggtcc 7080  
 aggaaattcc ctcgagcgat gcccatatgg gcacgcccgg attacaaccc tccactgtta 7140  
 gagtcttga aggaccgga ctacgtccct ccagtggtag acgggtgtcc attgccgctt 7200  
 gccaaaggccc ctccgatacc acctccacgg aggaagagga cggttgtcct gtcagaatct 7260  
 accgtgtctt ctgccttggc ggagctcggc aaaaagacct tcggcagctc cgaatcgtcg 7320  
 gccgtcgaca gcggcacggc aacggcctct cctgaccagc cctccgacga cggcgacggc 7380  
 ggatccgacg ttgagtcgta ctctccatg ccccccttg agggggagcc gggggatecc 7440  
 gatctcagcg acgggtcttg gtctaccgta agcgaggagc ttaaggctag tgaggacgtc 7500  
 gtctgctgct cgatgtccta cacatggaca ggcgcctga tcacgccatg cgctgaggag 7560  
 gaaaccaagc tgcccatcaa tgcaactgagc aactctttgc tcogtcacca caacttggtc 7620  
 tatgctacaa catctcgag cgcaagcctg cggcagaaga aggtcacctt tgacagactg 7680  
 caggctctgg acgaccacta cggggacgtg ctcaaggaga tgaaggcga ggcgtccaca 7740  
 gttaaggcta aacttctatc cgtggaggaa gcctgtaagc tgacgcccc acattcggcc 7800  
 agatctaaat ttggctatgg ggcaaaggac gtccggaacc tatccagcaa ggccgttaac 7860  
 cacatccgct ccgtgtggaa ggacttctg gaagacactg agacaccaat tgacaccacc 7920  
 atcatggcaa aaaatgaggt tttctgcgtc caaccagaga agggggggccg caagccagct 7980  
 cgcttatcg tattcccaga tttgggggtt cgtgtgtgcg agaaaatggc cctttacgat 8040  
 gtggtctcca cctccctca ggcctgatg ggctcttcat acggattcca atactctct 8100  
 ggacagcggg tcgagttcct ggtgaatgcc tgaaagcga agaaatgcc tatgggcttc 8160  
 gcatatgaca cccgctgttt tgactcaacg gtcactgaga atgacatccg tgttgaggag 8220  
 tcaatctacc aatgttgtga cttggcccc gaagccagac aggcataag gtcgctcaca 8280  
 gagcggcttt acatcggggg cccctgact aattctaaag ggcagaactg cggctatcgc 8340  
 cggtgccggc cgagcgggtg actgacgacc agctgcggta ataccctcac atgttacttg 8400  
 aaggccgctg cggcctgtcg agctgcgaag ctccaggact gcacgatgct cgtatgcgga 8460  
 gacgaccttg tcgttatctg tgaaagcggc gggacccaag aggacgaggc gagcctacgg 8520  
 gccttcacgg aggetatgac tagatactct gccccctg gggaccgccc caaaccagaa 8580  
 taogacttgg agttgataac atcatgctcc tccaatgtgt cagtcgcgca cgatgcctt 8640  
 ggcaaaaggg tgtactatct cacccgtgac cccaccaacc cccttgcggc ggctgcgtgg 8700

ES 2 546 190 T3

gagacagcta gacacactcc agtcaattcc tggctaggca acatcatcat gtatgcgccc 8760  
accttggtggg caaggatgat cctgatgact catttcttct ccacccctct agctcaggaa 8820  
caacttgaaa aagccctaga ttgtcagatc tacggggcct gttactccat tgagccactt 8880  
gacctacttc agatcattca acgactccat ggcccttagcg cattttcact ccatagttac 8940  
tctccaggtg agatcaatag ggtggcttca tgcctcagga aacttggggg accgccccttg 9000  
cgagtctgga gacatcgggc cagaagtgtc cgcgctagge tactgtccca gggggggagg 9060  
gctgcccactt gtggcaagta cctcttcaac tgggcagtaa ggaccaagct caaactcact 9120  
ccaatcccgg ctgcgtccca gttggattta tccagctggt tcggtgctgg ttacagcggg 9180  
ggagacatat atcacagcct gtctcgtgcc cgaccccgct ggttcatgtg gtgcctactc 9240  
ctactttctg taggggtagg catctatcta ctcccacc gatgacttaa gacggggagc 9300  
taaactctcc aggccaatag gccatcctgt tttttccct ttttttttt cttttttttt 9360  
ttttttttt ttttttttt tttttctct tttttttcc ttttttttc cttttctttc 9420  
ctttggtggc tccatcttag ccctagtcac ggctagetgt gaaaggtcg tgagccgctt 9480  
gactgcagag agtgcctgata ctggcctctc tgcagatcaa gtctagaaag tccctttagt 9540  
gagggttaat tcaattcttg aagaagaaag ggccctcgtg tacgcctatt tttatagggt 9600  
aatgctatga taataatggt ttcttagacg tcaggtggca cttttcggg aaatgtgcgc 9660  
ggaaccocct tttgtttatt tttctaaata cattcaaata tgtatccgct catgagacaa 9720  
taaccctgat aaatgcttca ataatttga aaaaggaaga gtatgagtat tcaacatttc 9780  
cgtgtcggcc ttattccctt ttttgcgga ttttgccctc ctgtttttgc tcaccagaa 9840  
acgctggtga aagtaaaaga tgctgaagat cagttgggtg cacgagtggg ttacatcgaa 9900  
ctggatctca acagcggtaa gatccttgag agttttcgcc ccgaagaacg ttttccaatg 9960  
atgagcactt ttaaagttct gctatgtggc gcggtattat cccgtgttga cgcgggcaa 10020  
gagcaactcg gtgcgcgcat aactattct cagaatgact tggttgagta ctcaccagtc 10080  
acagaaaagc atcttacgga tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc tgccataacc 10140  
atgagtgata aactgcggc caacttactt ctgacaacga tcggaggacc gaaggagcta 10200  
accgcttttt tgcacaacat gggggatcat gtaactcgcc ttgatcgttg ggaaccggag 10260  
ctgaatgaag ccataccaaa cgacgagcgt gacaccacga tgccctgcgc aatggcaaca 10320  
acgttgcgca aactattaac tggcgaacta ctactctag ctcccggca acaattaata 10380  
gactggatgg aggcggataa agttgcagga ccacttctgc gctcggccct tccggctggc 10440  
tggtttattg ctgataaatc tggagccggt gacgctgggt ctgcgggtat cattgcagca 10500

ES 2 546 190 T3

ctggggccag atggtaagcc ctcccgtatc gtagttatct acacgacggg gagtcaggca 10560  
 actatggatg aacgaaatag acagatcgct gagatagggtg cctcaactgat taagcattgg 10620  
 taactgtcag accaagttta ctcatatata ctttagattg atttaaaaact tcatttttta 10680  
 tttaaaagga tctaggtgaa gatccttttt gataatctca tgacaaaat cccttaacgt 10740  
 gagttttcgt tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat 10800  
 ccttttttcc tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaacaaa aaccaccgct accagcggtg 10860  
 gtttgtttgc cggatcaaga gctaccaact ctttttccga aggtaactgg cttcagcaga 10920  
 ggcgagatac caaataactgt ccttctagtg tagccgtagt taggccacca cttcaagaac 10980  
 tetgtagcac cgctacata cctogctctg ctaatcctgt taccagtggc tgetgccagt 11040  
 ggcgataagt cgtgtcttac cgggttgac tcaagacgat agttaccgga taaggcgcag 11100  
 cggtcgggct gaacgggggg ttcgtgcaca cagcccagct tggagcgaac gacctacacc 11160  
 gaactgagat acctacagcg tgagctatga gaaagcgcca cgcttccga agggagaaag 11220  
 gcggacaggt atccggtaag cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag ggagcttcca 11280  
 gggggaaaac cctggtatct ttatagtcct gtcgggtttc gccacctctg acttgagcgt 11340  
 cgatttttgt gatgctcgtc agggggggcg agcctatgga aaaacgccag caacgcggcc 11400  
 ttttacggt tcttggcctt ttgetggcct tttgctcaca tgttcttcc tgcgttatcc 11460  
 cctgattctg tggataaccg tattaccgcc tttgagtgag ctgataccgc tcgccgcagc 11520  
 cgaacgaccg agcgcagcga gtcagtgagc gaggaagcgg aagagcgcct gatgcggtat 11580  
 tttctcctta cgcactctgt cggatattca caccgcata ggtgcactct cagtacaatc 11640  
 tgetctgatg ccgcatagtt aagccagtat aactccgct atcgtactgt gactgggtca 11700  
 tggctgcgcc ccgacacccg ccaacacccg ctgacgcgcc ctgacgggct tgtctgctcc 11760  
 cggcatccgc ttacagacaa gctgtgaccg tctccgggag ctgcatgtgt cagaggtttt 11820  
 caccgtcatc accgaaacgc gcgaggcagc tgcggtaaag ctcatcagcg tggctcgtgaa 11880  
 gcgattcaca gatgtctgcc tgttcatecc cgtccagctc gttgagtttc tccagaagcg 11940  
 ttaatgtctg gcttctgata aagcgggcca tgttaagggc ggtttttcc tgtttggtca 12000  
 ctgatgcctc cgtgtaaggg ggatttctgt tcatgggggt aatgataccg atgaaacgag 12060  
 agaggatgct caggatacgg gttactgatg atgaacatgc ccggttactg gaacgttggt 12120  
 agggtaaaca actggcggta tggatgcggc gggaccagag aaaaatcact cagggtcaat 12180  
 gccagcgtt cgtaataaca gatgtagggt tccacaggg tagccagcag catcctgcga 12240  
 tgcagatccg gaacataatg gtgcagggcg ctgacttccg cgtttccaga ctttacgaaa 12300  
 cacggaaacc gaagaccatt catgttggtg ctcaggtcgc agacgttttg cagcagcagt 12360

ES 2 546 190 T3

cgottcacgt tcgctcgcgt atcgggtgatt cattctgcta accagtaagg caacccccgcc 12420  
 agcctagccg ggtcctcaac gacaggagca cgatcatgcg caccocgtggc caggacccaa 12480  
 cgctgccccga gatgcgccgc gtgcggctgc tggagatggc ggacgcgatg gatatgttct 12540  
 gccaaagctaa gctgcctgca ggtaatacga ctcaactata 12579

<210> 27  
 <211> 12579  
 <212> ADN  
 <213> Virus de la hepatitis C

5

<400> 27

gccagcccc gattgggggc gacactccac catagatcac tcccctgtga ggaactactg 60  
 tcttcacgca gaaagcgtct agccatggcg ttagtatgag tgcctgacag cctccaggac 120  
 cccccctccc gggagagcca tagtggctctg cggaaaccggg gagtacaccg gaattgccag 180  
 gacgaccggg tcctttcttg gatcaaccocg ctcaatgcct ggagatttgg gcggtccccc 240  
 gcgagactgc tagccgagta gtggtgggtc gcgaaaggcc ttgtgggtact gctgatagg 300  
 gtgcttgcca gtgccccggg aggtctcgtc gaccgtgcac cgtttaaacc cccgtgctgc 360  
 tggaaagtcga tttcaggctt agggtaaccg tggacctoga aacagacgc acaaaaccaa 420  
 gttcaataga aggggtaca aaccagtacc accacgaaca agcacttctg tttccccggg 480  
 gatgtcgtat agactgcttg cgtgggtgaa agcgacggat ccgttatccg cttatgtact 540  
 tcgagaagcc cagtaccacc tcggaatctt cgatgcgctg cgtcagcac tcaaccccag 600  
 agtgtagctt aggctgatga gtctggacat cctcaccgg tgaccggtggc ccaggctgcg 660  
 ttggcggcct acctatggct aacgccatgg gacgctagtt gtgaacaagg tgtgaagagc 720  
 ctattgagct acataagaat cctccggccc ctgaatgcgg ctaatcccaa cctcggagca 780  
 ggtggtcaca aaccagtgat tggcctgtcg taacgcgcaa gtcctggcg gaaccgacta 840  
 ctttgggtgt ccgtgtttcc ttttatttta ttgtggctgc ttatgggtgac aatcacagat 900  
 tgttatcata aagcgaattg gattggccat ccggtgaaag tgagactcat tatctatctg 960  
 tttgctggat ccgctccatt gagtgtggtt actetaagta caatttcaac agttatttca 1020  
 atcagacaat tgtatcataa tggcgggccc agaagacgcc aaaaacataa agaaaggccc 1080  
 ggcgccattc taccactag aggatggaac cgtcggagag caactgcata aggetatgaa 1140  
 gagatacgc ctggttccctg gaacaattgc ttttacagat gcacatatcg aggtgaacat 1200  
 cacgtacgcg gaataactcg aaatgtccgt tcgggtggca gaagetatga aacgatatgg 1260  
 gctgaataca aatcacagaa tcgtcgtatg cagtgaaaac tctcttcaat tctttatgcc 1320  
 ggtgttgggc gcgttattta tcggagttgc agttgcgccc gcgaacgaca tttataatga 1380

10



ES 2 546 190 T3

acgtgaattg ctcaacagta tgaacatttc gcagcctacc gtagtgtttg tttccaaaa 1440  
 ggggttgcaa aaaatthtga acgtgcaaaa aaaattacca ataatccaga aaattattat 1500  
 catggattct aaaacggatt accagggatt tcagtcgatg tacacgttcg tcacatctca 1560  
 tctacctccc ggthttaatg aatacgtatt tgtaccagag tcctttgatc gtgacaaaac 1620  
 aattgcactg ataatgaatt cctctggatc tactgggtta cctaaggggtg tggccttcc 1680  
 gcatagaact gcctgcgtca gattctcgca tgccagagat cctatthttg gcaatcaaat 1740  
 cattccggat actgcgattt taagtgttgt tccattccat cacggthttg gaatgtttac 1800  
 tacactcgga tathtgatat gtggatttgc agtcgtctta atgtatagat ttgaagaaga 1860  
 gctgtthtta cgatcccttc aggattacaa aattcaaagt gcgttgctag taccaacct 1920  
 atthtcatc ttcgcaaaa gcaactctgat tgacaaatac gatttatcta atttacacga 1980  
 aattgcttct gggggcgcac ctctttcgaa agaagtcggg gaagcgggtg caaacgcctt 2040  
 ccatcttcca gggatacgac aaggatatgg gctcaactgag actacatcag ctattctgat 2100  
 tacaccogag ggggatgata aaccggggcgc ggtcggtaaa gttgttccat thtttgaagc 2160  
 gaaggttgtg gatctggata ccgggaaaac gctggggcgtt aatcagagag gcgaattatg 2220  
 tgtcagagga cctatgatta tgtccggtta tgtaaacaaat ccggaagcga ccaacgcctt 2280  
 gattgacaag gatggatggc tacattctgg agacatagct tactgggacg aagacgaaca 2340  
 cttcttcata gttgaccgct tgaagtcttt aattaaatac aaaggatatac aggtggcccc 2400  
 cgctgaattg gaatcgatat tgttacaaca cccaacatac ttcgacgcgg gcgtggcagg 2460  
 tcttcccagc gatgacgccg gtgaacttcc cgcgcctgtt gttgtthttg agcacggaaa 2520  
 gacgatgacg gaaaaagaga tcgtggatta cgtcgccagt caagtaacaa ccgcgaaaaa 2580  
 gttgcgcgga ggagtttgtt ttgtggacga agtaccgaaa ggtcttaccg gaaaactcga 2640  
 cgcaagaaaa atcagagaga tcttcataaa ggccaagaag ggcggaaagt ccaaattgta 2700  
 agcggccgcg ttgttaaaca gaccacaacg gthtccctct agcgggatca attcgcccc 2760  
 cccccctaa cgttactggc cgaagccgct tggaataagg ccggtgtgcg thtgtctata 2820  
 tgthathttc caccatattg ccgtctthttg gcaatgtgag ggccccgaaa cctggcctg 2880  
 tcttcttgac gagcattcct aggggtcttt ccctctcgc caaaggaatg caaggtctgt 2940  
 tgaatgtcgt gaaggaagca gthcctctgg aagcttcttg aagacaaaca acgtctgtag 3000  
 cgaccctthg caggcagcgg aacccccac ctggcgacag gtgcctctgc ggcaaaaagc 3060  
 cacgtgtata agatacacct gcaaaggcgg cacaacccca gtgccacgtt gtgagttgga 3120  
 tagttgtgga aagagtcaaa tggctctcct caagcgtatt caacaagggg ctgaaggatg 3180

ES 2 546 190 T3

cccagaaggt accccattgt atgggatctg atctggggcc tcgggtgcaca tgctttacat 3240  
 gtgttttagtc gaggttaaaa aaacgtctag gccccccgaa ccacggggac gtggttttcc 3300  
 tttgaaaaac acgataatac catggcgccct attacggcct actcccaaca gacgcgaggc 3360  
 ctacttggct gcatcatcac tagcctcaca ggccgggaca ggaaccaggt cgagggggag 3420  
 gtccaagtgg tetccaccgc aacacaatct ttcttgoga cctgcgtcaa tggcgtgtgt 3480  
 tggactgtct atcatggtgc cggctcaaag acccttgccg gcccaaaggg cccaatcacc 3540  
 caaatgtaca ccaatgtgga ccaggacctc gtcggctgga aagcgcccc cgggcgcgct 3600  
 tccttgacac catgcacctg cggcagctcg gacctttact tggtcacgag gcatgccgat 3660  
 gtcattccgg tgcgccggcg gggcgacagc agggggagcc tactctcccc caggccccgc 3720  
 tcctacttga agggctcttc gggcgggtcca ctgctctgcc cctcggggca cgctgtgggc 3780  
 atctttcggg ctgcccgtgtg caccogaggg gttgogaagg cgggtggactt tgtaccgcgc 3840  
 gagtctatgg gaaccactat gcggtccccg gtcttccagg acaactcgtc ccctccggcc 3900  
 gtaccgcaga cattccaggt ggcccatcta cacgccccta ctggtagcgg caagagcact 3960  
 aaggtgccgg ctgcgtatgc agcccaaggg tataagggtgc ttgtctgaa cccgtccgc 4020  
 gccgccacc taggtttcgg ggcgtatatg totaaggcac atggtatcga ccctaacatc 4080  
 agaatcgggg taaggaccat caccacgggt gccccatca cgtactccac ctatggcaag 4140  
 tttcttgccg acggtggttg ctctgggggc gcctatgaca tcataatatg tgatgagtgc 4200  
 cactcaactg actcgaccac tatcctgggc atcggcacag tcctggacca agcggagacg 4260  
 gctggagcgc gactcgtcgt gctcgccacc gctacgcctc cgggatcggg caccgtgcca 4320  
 catccaaaca tcgaggaggt ggctctgtcc agcactggag aaatcccctt ttatggcaaa 4380  
 gccatcccc a tcgagaccat caaggggggg aggcacctca ttttctgcca ttccaagaag 4440  
 aaatgtgatg agctcgccgc gaagctgtcc ggctcggac tcaatgctgt agcatattac 4500  
 cggggccttg atgtatccgt cataccaact agcggagacg tcattgtcgt agcaacggac 4560  
 gctctaatga cgggctttac cggcgatttc gactcagtga tcgactgcaa tacatgtgtc 4620  
 acccagacag tcgacttcag cctggaccgg accttcacca ttgagacgac gaccgtgcca 4680  
 caagacgcgg tgtcacgctc gcagcggcga ggcaggactg gtaggggcag gatgggcatt 4740  
 tacaggtttg tgactccagg agaacggccc tcgggcatgt tcgattcctc ggttctgtgc 4800  
 gagtgcctatg acgcgggctg tgcttggtac gagctcagc ccgccgagac ctcagttagg 4860  
 ttgcgggctt acctaaacac accagggttg cccgtctgcc aggaccatct ggagttctgg 4920  
 gagagcgtct ttacaggcct caccacata gacgcccatt tcttgtecca gactaagcag 4980  
 gcaggagaca acttccccta cctggtagca taccaggcta cgggtgtgcgc cagggtcag 5040

ES 2 546 190 T3

gctccacctc catcgtggga ccaaagtggg aagtgtctca tacggctaaa gcctacgctg 5100  
 cacgggcaa cgcacctgct gtataggctg ggagccgttc aaaacgaggt tactaccaca 5160  
 caccocataa ccaaatacat catggcatgc atgtcggctg acctggaggt cgtcacgagc 5220  
 acctgggtgc tggtagggcg agtcctagca gctctggccg cgtattgcct gacaacaggc 5280  
 agcgtggtea ttgtgggcag gatcatcttg tccggaaage cggccatcat tcccgacagg 5340  
 gaagtccctt accgggagtt cgatgagatg gaagagtgcg cctcacacct cccttacatc 5400  
 gaacagggaa tgcagctcgc cgaacaatc aaacagaagg caatcgggtt gctgcaaaca 5460  
 gccaccaage aagcggagge tgctgctccc gtgggtggaat ccaagtggcg gaccctcgaa 5520  
 gccttctggg cgaagcatat gtggaatttc atcagcggga tacaatattt agcaggcttg 5580  
 tccactctgc ctggcaaccc cgcgatagca tcaactgatg cattcacagc ctctatcacc 5640  
 agcccgctca ccaccaaca taccctctg tttaacatcc tgggggggatg ggtggccgcc 5700  
 caacttgctc ctcccagcgc tgcttctgct ttcgtaggcg ccggcatcgc tggagcggct 5760  
 gttggcagca taggccttgg gacgggtgctt gtggatattt tggcaggtta tggagcaggg 5820  
 gtggcagggc cgtcgtggc cttaaggte atgagcggcg agatgcctc caccgaggac 5880  
 ctggttaacc tactccctgc tatectctcc cctggcgccc tagtcgtcgg ggtcgtgtgc 5940  
 gcagcgatac tgcgtcggca cgtgggccc ggggaggggg ctgtgcagtg gatgaaccgg 6000  
 ctgatagcgt tcgcttcggc gggtaaccac gtctccccc cgcactatgt gcctgagagc 6060  
 gagcctgcag cacgtgtcac tcagatctc tctagtctta ccatcactca gctgctgaag 6120  
 aggcttcacc agtggatcaa cgaggactgc tccacgccat gctccggctc gtggctaaga 6180  
 gatgtttggg attggatatg cacgggtgtg actgatttca agacctggct ccagtccaag 6240  
 ctctgcgcg gattgcggg agtcccctc ttctcatgct aacgtgggta caagggagtc 6300  
 tggcggggcg acggcatcat gcaaaccacc tgccatgtg gagcacagat caccggacat 6360  
 gtgaaaaacg gttccatgag gatcgtgggg cctaggacct gtagtaacac gtggcatgga 6420  
 acattcccca ttaacgcgta caccacgggc cctgcacgc cctccccggc gccaaattat 6480  
 tctagggcgc tgtggcgggt ggctgctgag gactacgtgg aggttacgcg ggtgggggat 6540  
 ttccactacg tgaocggcat gaccactgac aacgtaaagt gcccggtgca ggttccggcc 6600  
 cccgaattct tcacagaagt ggatggggty cggttgcaca ggtacgctcc agcgtgcaaa 6660  
 cccctctac gggaggaggt cacattctg gtcgggctca atcaatacct ggttgggtca 6720  
 cagctcccat gcgagcccg aaccggacgta gcagtgtca ctccatgct caccgacccc 6780  
 tcccacatta cggcggagac ggctaagcgt aggctggcca ggggatctcc ccctccttg 6840

ES 2 546 190 T3

gccagctcat cagctagcca gctgtctgcg ccttccttga aggcaacatg cactacccgt 6900  
 catgactccc eggacgctga cctcatcgag gccaacctcc tgtggcggca ggagatgggc 6960  
 gggaacatca cccgcgtgga gtcagaaaat aaggtagtaa ttttggaactc tttcgagccg 7020  
 ctccaagcgg aggaggatga gaggggaagta tccgttccgg cggagatcct gcggaggtcc 7080  
 aggaaattcc ctcgagcgat gcccatatgg gcacgcccgg attacaacc tccactgta 7140  
 gagtctgga aggaccggga ctacgtccct ccagtggtag acgggtgtcc attgccgcct 7200  
 gccaaaggccc ctccgatacc acctccacgg aggaagagga cggttgtcct gtcagaatct 7260  
 accgtgtctt ctgccttggc ggagctcgcc acaaagacct tcggcagctc cgaatcgtcg 7320  
 gccgtcgaca gcggcacggc aacggcctct cctgaccagc cctccgacga cggcgacgcg 7380  
 ggatccgacg ttgagtcgta ctctccatg ccccccttg agggggagcc gggggatccc 7440  
 gatctcagcg acgggtcttg gtctaccgta agcgaggagc ttaaggctag tgaggacgtc 7500  
 gtctgctgct cgatgtecta cacatggaca ggcgccctga tcacgccatg cgctgcggag 7560  
 gaaaccaagc tgcccatcaa tgcaactgagc aactctttgc tccgtcacca caacttggtc 7620  
 tatgctacaa catctcgcag cgcaagcctg cggcagaaga aggtcacctt tgacagactg 7680  
 caggtcctgg acgaccacta cggggacgtg ctcaaggaga tgaaggcga ggcgtccaca 7740  
 gttaaggcta aacttctatc cgtggaggaa gectgtaagc tgacgcccc acattcggcc 7800  
 agatctaaat ttggctatgg ggcaaaggac gtccggaacc tatccagcaa ggccgttaac 7860  
 cacatccgct ccgtgtggaa ggacttgctg gaagacactg agacaccaat tgacaccacc 7920  
 atcatggcaa aaaatgaggt tttctgcgtc caaccagaga aggggggccc caagccagct 7980  
 cgccttatcg tattcccaga tttgggggtt cgtgtgtgcg agaaaatggc cctttacgat 8040  
 gtggtctcca cctcctca ggccgtgatg ggctcttcat acggattcca atactctcct 8100  
 ggacagcggg tcgagttcct ggtgaatgcc tggaaagcga agaaatgcc tatgggettcc 8160  
 gcatatgaca cccgctgttt tgactcaacg gtcactgaga atgacatccg tgttgaggag 8220  
 tcaatctacc aatgttgtga cttggccccc gaagccagac aggccataag gtcgctcaca 8280  
 gagcggcttt acatcggggg cccctgact aattctaaag ggcagaactg cggctatcgc 8340  
 cggtgcccgcg cgagcgggtg actgacgacc agctgcggta atacctcac atgttacttg 8400  
 aaggccgctg cggcctgtcg agctgcgaag ctccaggact gcacgatgct cgtatgcgga 8460  
 gacgaccttg tcgttatctg tgaaagcgcg gggacccaag aggacgaggc gagcctacgg 8520  
 gccttcaagg aggctatgac tagatactct gccccccctg gggaccgcc caaaccagaa 8580  
 tacgacttgg agttgataac atcatgctcc tccaatgtgt cagtcgcgca cgatgcatct 8640  
 ggcaaaaggg tgtactatct caccctgac cccaccacc ccttgcgcg ggetgcgtgg 8700

ES 2 546 190 T3

gagacagcta gacacactcc agtcaattcc tggctaggca acatcatcat gtatgcgccc 8760  
accttggtgg caaggatgat cctgatgact cattttctct ccacccctct agctcaggaa 8820  
caacttgaaa aagccctaga ttgtcagatc tacggggcct gttactccat tgagccaact 8880  
gacctacctc agatcattca acgactccat ggccttagcg ctttttctact ccatagttac 8940  
tctccagggtg agatcaatag ggtggcttca tgcctcagga aacttgggggt accgcccctg 9000  
cgagtctgga gacatcgggc cagaagtgtc cgcgctaggc tactgtccca gggggggagg 9060  
gctgccactt gtggcaagta cctcttcaac tgggcagtaa ggaccaagct caaactcact 9120  
ccaatcccgg ctgcgtccca gttggattta tccagctggt tcggttctgg ttacagcggg 9180  
ggagacatat atcacagcct gtctctgtcc cgaccccctt ggttcatgtg gtgcctactc 9240  
ctactttctg taggggtagg catctatcta ctccccacc gatgacttaa gacggggagc 9300  
taaacactcc aggccaatag gccatcctgt ttttttccct tttttttttt cttttttttt 9360  
tttttttttt tttttttttt tttttctcct ttttttttcc tttttttttc cttttctttc 9420  
ctttggtggc tccatcttag ccctagtcac ggctagctgt gaaaggctcg tgagccgctt 9480  
gactgcagag agtgcctgata ctggcctctc tgcagatcaa gtctagaaag tccctttagt 9540  
gagggttaat tcaattcttg aagacgaaag ggctctgtga tacgcctatt tttataggtt 9600  
aatgtcatga taataatggt ttcttagacg tcaggtggca cttttcgggg aaatgtgcgc 9660  
ggaaccccta tttgtttatt tttctaaata cattcaaata tgtatccgct catgagacaa 9720  
taaccctgat aaatgcttca ataatttga aaaaggaaga gtatgagtat tcaacatttc 9780  
cgtgtcggcc ttattccctt ttttgccgca ttttgcttcc ctgtttttgc tcaccagaa 9840  
acgctggtga aagtaaaaga tgctgaagat cagttgggtg cacgagtggg ttacatcgaa 9900  
ctggatctca acagcggtaa gatccttgag agttttcggc ccgaagaacg ttttccaatg 9960  
atgagcactt ttaaagttct gctatgtggc gcggtattat cccgtgttga cgcggggcaa 10020  
gagcaactcg gtgcgcgcat aactattctc cagaatgact tggttgagta ctcaccagtc 10080  
acagaaaagc atcttacgga tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc tgccataacc 10140  
atgagtgata aactgcggc caacttactt ctgacaacga tcggaggacc gaaggagcta 10200  
accgcttttt tgcacaacat gggggatcat gtaactcgcc ttgatcgttg ggaaccggag 10260  
ctgaatgaag ccataccaaa cgacgagcgt gacaccacga tgctgcagc aatggcaaca 10320  
acgttgcgca aactattaac tggcgaacta cttactctag cttcccggca acaattaata 10380  
gactggatgg aggcggataa agttgcagga ccacttctgc gctcggccct tccggctggc 10440  
tggtttattg ctgataaate tggagccggt gagcgtgggt ctcgcggtat cattgcagca 10500

ES 2 546 190 T3

ctggggccag atggtaagcc ctcccgtatc gtagttatct acacgaagg gagtcaggca 10560  
 actatggatg aacgaaatag acagatcgct gagataggtg cctcactgat taagcattgg 10620  
 taactgtcag accaagttta ctcatatata ctttagattg atttaaaact tcatttttaa 10680  
 tttaaaagga tctaggtgaa gatccctttt gataatctca tgacaaaat cccttaacgt 10740  
 gagttttcgt tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat 10800  
 cctttttttc tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaacaaa aaccaccgct accagcggtg 10860  
 gtttgtttgc cggatcaaga gctaccaact ctttttcoga aggtaactgg cttcagcaga 10920  
 gcgcagatac caaatactgt ccttctagtg tagccgtagt taggccacca cttcaagaac 10980  
 tctgtagcac cgctacata cctcgtctctg ctaatcctgt taccagtggc tgctgccagt 11040  
 ggcgataagt cgtgtcttac cgggttgac tcaagacgat agttaccgga taaggcgcag 11100  
 cggtcgggct gaaacggggg ttcgtgcaca cagcccagct tggagcgaac gacctacacc 11160  
 gaactgagat acctacagcg tgagctatga gaaagcgcca cgcttcccga agggagaaaag 11220  
 gcggacaggt atccggtaag cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag ggagcttcca 11280  
 gggggaaacg cctggtatct ttatagtcct gtcgggttcc gccacctctg acttgagcgt 11340  
 cgatttttgt gatgctcgtc aggggggctg agcctatgga aaaacgccag caacgcggcc 11400  
 tttttacggt tcttggcctt ttgctggcct tttgctcaca tgttcttcc tgctttatcc 11460  
 cctgattctg tggataaccg tattaccgcc tttgagtgag ctgataccgc tcgccgcagc 11520  
 cgaacgaccg agcgcagcga gtcagtgagc gaggaagcgg aagagcgct gatgcggtat 11580  
 tttctcctta cgcatctgtg cggtatctca caccgcatac ggtgcaactc cagtacaatc 11640  
 tgctctgatg ccgcatagtt aagccagtat acaactcgtc atcgtactgt gactgggtca 11700  
 tggctgcgcc ccgacacccg ccaacaccog ctgacgcgcc ctgacgggct tgtctgctcc 11760  
 cggcatccgc ttacagacaa gctgtgaccg tctccgggag ctgcatgtgt cagaggtttt 11820  
 caccgtcctc accgaaacgc gcgaggcagc tgcggtaaag ctcatcagcg tggctcgtgaa 11880  
 gcgattcaca gatgtctgcc tgttcatccg cgtccagctc gttgagtctc tccagaagcg 11940  
 ttaatgtctg gcttctgata aagcgggcca tgtaaggggc ggttttttcc tgtttggtca 12000  
 ctgatgcctc cgtgtaaggg ggatttctgt tcatgggggt aatgataccg atgaaacgag 12060  
 agaggatgct cacgatacgg gttactgatg atgaacatgc ccggttactg gaacgttgtg 12120  
 agggtaaaca actggcggta tggatgcggc gggaccagag aaaaatcact cagggtcaat 12180  
 gccagcgtt cgtaataaca gatgtaggtg ttccacaggg tagccagcag catcctgcga 12240  
 tgcagatccg gaacataatg gtgcagggcg ctgacttccg cgtttcaga ctttacgaaa 12300  
 cacggaaacc gaagaccatt catgttggtg ctcaggctgc agacgttttg cagcagcagt 12360

ES 2 546 190 T3

|    |  |       |
|----|--|-------|
|    | cgcttcaacgt tcgctcgcgt atcgggtgatt cattctgcta accagtaagg caacccccgcc | 12420 |
|    | agcctagccg ggtcctcaac gacaggagca cgatcatgcg caccctggc caggacccaa     | 12480 |
|    | cgctgccccga gatgcgcgcg gtgctggctgc tggagatggc ggacgcgatg gatatgttct  | 12540 |
|    | gccaaagctaa gctgcctgca ggtaatacga ctactata                           | 12579 |
| 5  | <210> 28<br><211> 30<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C   |       |
| 10 | <400> 28<br>aagcgaggag ctaaggcyr gtgaggacgt                          | 30    |
| 15 | <210> 29<br><211> 29<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C   |       |
| 20 | <400> 29<br>agctccccgt ctaagtcaay cggttgggg                          | 29    |
| 25 | <210> 30<br><211> 20<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C   |       |
| 30 | <400> 30<br>gggacctcac cgctcatgat                                    | 20    |
| 35 | <210> 31<br><211> 24<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C   |       |
| 40 | <400> 31<br>ctcaccgctc atgatctga atgc                                | 24    |
| 45 | <210> 32<br><211> 22<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C   |       |
| 50 | <400> 32<br>cggaggtcat tacgtgcaaa tg                                 | 22    |
| 55 | <210> 33<br><211> 22<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C   |       |
|    | <400> 33<br>cgtgcaaatg gccatcatca ag                                 | 22    |
|    | <210> 34<br><211> 19<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C   |       |
|    | <400> 34<br>gcgcttactg gcacctatg                                     | 19    |

ES 2 546 190 T3

|    |                               |    |
|----|-------------------------------|----|
|    | <210> 35                      |    |
|    | <211> 17                      |    |
|    | <212> ADN                     |    |
| 5  | <213> Virus de la hepatitis C |    |
|    | <400> 35                      |    |
|    | aggcacgccg atgtcat            | 17 |
| 10 | <210> 36                      |    |
|    | <211> 18                      |    |
|    | <212> ADN                     |    |
|    | <213> Virus de la hepatitis C |    |
| 15 | <400> 36                      |    |
|    | cgggacctg gtgctctt            | 18 |
| 20 | <210> 37                      |    |
|    | <211> 18                      |    |
|    | <212> ADN                     |    |
|    | <213> Virus de la hepatitis C |    |
|    | <400> 37                      |    |
|    | cggcactgtc cttgacca           | 18 |
| 25 | <210> 38                      |    |
|    | <211> 18                      |    |
|    | <212> ADN                     |    |
|    | <213> Virus de la hepatitis C |    |
| 30 | <400> 38                      |    |
|    | gagtcgaagt cgccgga            | 18 |
| 35 | <210> 39                      |    |
|    | <211> 22                      |    |
|    | <212> ADN                     |    |
|    | <213> Virus de la hepatitis C |    |
|    | <400> 39                      |    |
| 40 | cggagactac agttaggcta cg      | 22 |
| 45 | <210> 40                      |    |
|    | <211> 22                      |    |
|    | <212> ADN                     |    |
|    | <213> Virus de la hepatitis C |    |
|    | <400> 40                      |    |
|    | gcatgtcatg atgtattgg tg       | 22 |
| 50 | <210> 41                      |    |
|    | <211> 18                      |    |
|    | <212> ADN                     |    |
|    | <213> Virus de la hepatitis C |    |
|    | <400> 41                      |    |
| 55 | acgaggacct tccccagt           | 18 |
| 60 | <210> 42                      |    |
|    | <211> 18                      |    |
|    | <212> ADN                     |    |
|    | <213> Virus de la hepatitis C |    |
|    | <400> 42                      |    |
|    | gctgccggtg ggagcatg           | 18 |
| 65 | <210> 43                      |    |
|    | <211> 19                      |    |



ES 2 546 190 T3

|    |  |    |
|----|--|----|
|    | <212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C                         |    |
| 5  | <400> 43<br>gagcatgcag gtgggccac                                   | 19 |
| 10 | <210> 44<br><211> 19<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 15 | <400> 44<br>gcggcgacat catcaacgg                                   | 19 |
| 20 | <210> 45<br><211> 21<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 25 | <400> 45<br>catcaacggc ttgccgtct c                                 | 21 |
| 30 | <210> 46<br><211> 20<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 35 | <400> 46<br>gacctttacc tggcaccgag                                  | 20 |
| 40 | <210> 47<br><211> 24<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 45 | <400> 47<br>gctgtccaga acttgcatgc tgtc                             | 24 |
| 50 | <210> 48<br><211> 20<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 55 | <400> 48<br>cctttggcaa gcactgcgtg                                  | 20 |
| 60 | <210> 49<br><211> 21<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 65 | <400> 49<br>ctgcgtggtc atagtgggca g                                | 21 |
| 70 | <210> 50<br><211> 20<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 75 | <400> 50<br>tgtctgtcc gggaagccgg                                   | 20 |
| 80 | <210> 51<br><211> 20<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |

ES 2 546 190 T3

|    |  |    |
|----|--|----|
|    | <400> 51<br>cgtcactgcc atactcagca                                  | 20 |
| 5  | <210> 52<br><211> 18<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 10 | <400> 52<br>cgccccgttt ttgacatg                                    | 18 |
| 15 | <210> 53<br><211> 21<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 20 | <400> 53<br>tgactcaacc ctggatgatg t                                | 21 |
| 25 | <210> 54<br><211> 17<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 30 | <400> 54<br>cgggtgtcct caccgaa                                     | 17 |
| 35 | <210> 55<br><211> 15<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 40 | <400> 55<br>ttgtccggga agccg                                       | 15 |
| 45 | <210> 56<br><211> 16<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 50 | <400> 56<br>tgcaagcac tgcgtg                                       | 16 |
| 55 | <210> 57<br><211> 19<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 60 | <400> 57<br>ttgacgtcca tgctcactg                                   | 19 |
| 65 | <210> 58<br><211> 22<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
|    | <400> 58<br>aggccggagt gttacccca ac                                | 22 |
|    | <210> 59<br><211> 22<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
|    | <400> 59   |    |

ES 2 546 190 T3

|    |  |    |
|----|--|----|
|    | ggagtgttta ccccaacctt ca   | 22 |
| 5  | <210> 60<br><211> 23<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 10 | <400> 60<br>tgactatgaa ccacctgtgg tcc                              | 23 |
| 15 | <210> 61<br><211> 19<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
|    | <400> 61<br>cacctgtggt ccatggctg                                   | 19 |
| 20 | <210> 62<br><211> 20<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 25 | <400> 62<br>catcaactcc ggtggaaag                                   | 20 |
| 30 | <210> 63<br><211> 20<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
|    | <400> 63<br>cagcgggtat catacgagaa                                  | 20 |
| 35 | <210> 64<br><211> 18<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 40 | <400> 64<br>gcaccatgct cgtgtgtg                                    | 18 |
| 45 | <210> 65<br><211> 21<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 50 | <400> 65<br>gtcatcagta tcatcctcgc c                                | 21 |
| 55 | <210> 66<br><211> 19<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
|    | <400> 66<br>cgactccatg gtcttagcg                                   | 19 |
| 60 | <210> 67<br><211> 21<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 65 | <400> 67<br>gagcgcttc tgttgaatt g                                  | 21 |

# ES 2 546 190 T3

|    |                               |    |
|----|-------------------------------|----|
|    | <210> 68                      |    |
|    | <211> 21                      |    |
|    | <212> ADN                     |    |
| 5  | <213> Virus de la hepatitis C |    |
|    | <400> 68                      |    |
|    | ctgtttgaat tgctcggcga g       | 21 |
| 10 | <210> 69                      |    |
|    | <211> 18                      |    |
|    | <212> ADN                     |    |
|    | <213> Virus de la hepatitis C |    |
| 15 | <400> 69                      |    |
|    | atgcatgctg gtgcggaa           | 18 |
| 20 | <210> 70                      |    |
|    | <211> 19                      |    |
|    | <212> ADN                     |    |
|    | <213> Virus de la hepatitis C |    |
|    | <400> 70                      |    |
|    | tggtgcggaa agtcgctgg          | 19 |
| 25 | <210> 71                      |    |
|    | <211> 20                      |    |
|    | <212> ADN                     |    |
|    | <213> Virus de la hepatitis C |    |
| 30 | <400> 71                      |    |
|    | ggtcattatg tccaaatggc         | 20 |
| 35 | <210> 72                      |    |
|    | <211> 18                      |    |
|    | <212> ADN                     |    |
|    | <213> Virus de la hepatitis C |    |
| 40 | <400> 72                      |    |
|    | cggcagctcg gaccttta           | 18 |
| 45 | <210> 73                      |    |
|    | <211> 21                      |    |
|    | <212> ADN                     |    |
|    | <213> Virus de la hepatitis C |    |
|    | <400> 73                      |    |
|    | cacttgaat gtctcggta c         | 21 |
| 50 | <210> 74                      |    |
|    | <211> 22                      |    |
|    | <212> ADN                     |    |
|    | <213> Virus de la hepatitis C |    |
| 55 | <400> 74                      |    |
|    | gatgagtgcc actcaactga ct      | 22 |
| 60 | <210> 75                      |    |
|    | <211> 18                      |    |
|    | <212> ADN                     |    |
|    | <213> Virus de la hepatitis C |    |
|    | <400> 75                      |    |
|    | cgtctgttgc cacgacaa           | 18 |
| 65 | <210> 76                      |    |
|    | <211> 17                      |    |

ES 2 546 190 T3

|    |  |    |
|----|--|----|
|    | <212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C                         |    |
| 5  | <400> 76<br>ctatgacgcg ggctgtg                                     | 17 |
| 10 | <210> 77<br><211> 21<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 15 | <400> 77<br>agccgtatga gacactcca c                                 | 21 |
| 20 | <210> 78<br><211> 23<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 25 | <400> 78<br>gcatagacca tgtgtggtg acg                               | 23 |
| 30 | <210> 79<br><211> 23<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 35 | <400> 79<br>gtgacgcagc aaagagttgc tca                              | 23 |
| 40 | <210> 80<br><211> 20<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 45 | <400> 80<br>agcgtggtca ttgtggcag                                   | 20 |
| 50 | <210> 81<br><211> 21<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 55 | <400> 81<br>gggcaggatc atctgtccg g                                 | 21 |
| 60 | <210> 82<br><211> 18<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 65 | <400> 82<br>ttccaaggc ctatgctg                                     | 18 |
| 70 | <210> 83<br><211> 19<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 75 | <400> 83<br>ggatgaaccg gctgatagc                                   | 19 |
| 80 | <210> 84<br><211> 21<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |

ES 2 546 190 T3

|    |  |    |
|----|--|----|
|    | <400> 84<br>atggaaccgt tttgacatg t                                 | 21 |
| 5  | <210> 85<br><211> 19<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 10 | <400> 85<br>gggcatgacc actgacaac                                   | 19 |
| 15 | <210> 86<br><211> 17<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 20 | <400> 86<br>ccacaggagg ttgcct                                      | 17 |
| 25 | <210> 87<br><211> 16<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 30 | <400> 87<br>cacgggtgcc cattgc                                      | 16 |
| 35 | <210> 88<br><211> 19<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 40 | <400> 88<br>aaggagatga aggcgaagg                                   | 19 |
| 45 | <210> 89<br><211> 18<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 50 | <400> 89<br>catcacggcc tgaggaag                                    | 18 |
| 55 | <210> 90<br><211> 17<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 60 | <400> 90<br>tcgctcacag agcggct                                     | 17 |
| 65 | <210> 91<br><211> 21<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
|    | <400> 91<br>tggaggagca tgatgtatc a                                 | 21 |
|    | <210> 92<br><211> 19<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
|    | <400> 92   |    |

ES 2 546 190 T3

|    |   |    |
|----|---|----|
|    | cgactccatg gtcttagcg  | 19 |
| 5  | <210> 93<br><211> 28<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C  |    |
| 10 | <400> 93<br>gtaggtggac tggcacttac atctatga                          | 28 |
| 15 | <210> 94<br><211> 23<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C  |    |
|    | <400> 94<br>cgctattagc ccttggtagg tgg                               | 23 |
| 20 | <210> 95<br><211> 19<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C  |    |
| 25 | <400> 95<br>aatgcccgc accatacc                                      | 19 |
| 30 | <210> 96<br><211> 23<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C  |    |
|    | <400> 96<br>ggcttctcgc cagacatgat ctt                               | 23 |
| 35 | <210> 97<br><211> 17<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C  |    |
| 40 | <400> 97<br>cacggacttc ccgtgtc                                      | 17 |
| 45 | <210> 98<br><211> 16<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C  |    |
| 50 | <400> 98<br>tgccagttgg ggcacg                                       | 16 |
| 55 | <210> 99<br><211> 16<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C  |    |
|    | <400> 99<br>tccgggcagc tgtgtg                                       | 16 |
| 60 | <210> 100<br><211> 21<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 65 | <400> 100<br>cgtctgagg gacagtctgt g                                 | 21 |

ES 2 546 190 T3

|    |                               |    |
|----|-------------------------------|----|
|    | <210> 101                     |    |
|    | <211> 21                      |    |
|    | <212> ADN                     |    |
| 5  | <213> Virus de la hepatitis C |    |
|    | <400> 101                     |    |
|    | ggagggtgag atcccctct a        | 21 |
| 10 | <210> 102                     |    |
|    | <211> 21                      |    |
|    | <212> ADN                     |    |
|    | <213> Virus de la hepatitis C |    |
| 15 | <400> 102                     |    |
|    | gaagtccac atgtgttg c          | 21 |
| 20 | <210> 103                     |    |
|    | <211> 22                      |    |
|    | <212> ADN                     |    |
|    | <213> Virus de la hepatitis C |    |
|    | <400> 103                     |    |
|    | gtagtgctct gtgagtgcta cg      | 22 |
| 25 | <210> 104                     |    |
|    | <211> 23                      |    |
|    | <212> ADN                     |    |
|    | <213> Virus de la hepatitis C |    |
| 30 | <400> 104                     |    |
|    | atcttacacg gactccccgt gtc     | 23 |
| 35 | <210> 105                     |    |
|    | <211> 21                      |    |
|    | <212> ADN                     |    |
|    | <213> Virus de la hepatitis C |    |
| 40 | <400> 105                     |    |
|    | atgcggggac atcttacacg g       | 21 |
| 45 | <210> 106                     |    |
|    | <211> 21                      |    |
|    | <212> ADN                     |    |
|    | <213> Virus de la hepatitis C |    |
|    | <400> 106                     |    |
|    | tggggcatgc aagtaccga c        | 21 |
| 50 | <210> 107                     |    |
|    | <211> 19                      |    |
|    | <212> ADN                     |    |
|    | <213> Virus de la hepatitis C |    |
| 55 | <400> 107                     |    |
|    | cactgccagt tggggcatg          | 19 |
| 60 | <210> 108                     |    |
|    | <211> 25                      |    |
|    | <212> ADN                     |    |
|    | <213> Virus de la hepatitis C |    |
|    | <400> 108                     |    |
|    | tacggatacc atacttgtg agggc    | 25 |
| 65 | <210> 109                     |    |
|    | <211> 25                      |    |



|    |   |    |
|----|---|----|
|    | <212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C                          |    |
| 5  | <400> 109<br>tctctgctac ggataccata ctttg                            | 25 |
| 10 | <210> 110<br><211> 25<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 15 | <400> 110<br>tccaccagta tcttaccag gccta                             | 25 |
| 20 | <210> 111<br><211> 22<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 25 | <400> 111<br>acgtccacca gtatcttacc ca                               | 22 |
| 30 | <210> 112<br><211> 20<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 35 | <400> 112<br>acgagtgtgt acctgggta                                   | 20 |
| 40 | <210> 113<br><211> 17<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 45 | <400> 113<br>gaccctgta cctgcgg                                      | 17 |
| 50 | <210> 114<br><211> 21<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 55 | <400> 114<br>gcaagtagcc cacctggtaa g                                | 21 |
| 60 | <210> 115<br><211> 19<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 65 | <400> 115<br>gccattcagt ggacgccac                                   | 19 |
| 70 | <210> 116<br><211> 23<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 75 | <400> 116<br>ccttgagtg gtataacgga gac                               | 23 |
| 80 | <210> 117<br><211> 21<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |

ES 2 546 190 T3

|    |   |    |
|----|---|----|
|    | <400> 117<br>gctctgtgag tgctatgatg c                                | 21 |
| 5  | <210> 118<br><211> 24<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 10 | <400> 118<br>ggtaggacca gtcagtgtag gttt                             | 24 |
| 15 | <210> 119<br><211> 18<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 20 | <400> 119<br>caacgaagcc agtggctc                                    | 18 |
| 25 | <210> 120<br><211> 19<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 30 | <400> 120<br>tgcatggcct cccggtttc                                   | 19 |
| 35 | <210> 121<br><211> 22<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 40 | <400> 121<br>catgtggaga catcctgcat gg                               | 22 |
| 45 | <210> 122<br><211> 22<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 50 | <400> 122<br>ttggtgcatg caagtagccc ac                               | 22 |
| 55 | <210> 123<br><211> 19<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 60 | <400> 123<br>cgctgcctgt tgggtgcatg                                  | 19 |
| 65 | <210> 124<br><211> 27<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
|    | <400> 124<br>cttctgtacc atcagagtac ctgatca                          | 27 |
|    | <210> 125<br><211> 26<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
|    | <400> 125   |    |

ES 2 546 190 T3

|    |   |    |
|----|---|----|
|    | gtgagccttc tgtaccatca gagtac  | 26 |
| 5  | <210> 126<br><211> 23<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 10 | <400> 126<br>atggagtgtg gctagggtt gcc                               | 23 |
| 15 | <210> 127<br><211> 23<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 20 | <400> 127<br>tgtagctagg gttgccgct cta                               | 23 |
| 25 | <210> 128<br><211> 20<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 30 | <400> 128<br>gaaccacca ctgtcctagg                                   | 20 |
| 35 | <210> 129<br><211> 23<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 40 | <400> 129<br>gcacactatg actcagtctt gca                              | 23 |
| 45 | <210> 130<br><211> 19<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 50 | <400> 130<br>catcttttcg cacaccctg                                   | 19 |
| 55 | <210> 131<br><211> 18<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 60 | <400> 131<br>tacgtaggag ggcccatg                                    | 18 |
| 65 | <210> 132<br><211> 19<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 70 | <400> 132<br>agcgctaccg atacgttg                                    | 19 |
| 75 | <210> 133<br><211> 18<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 80 | <400> 133<br>ccggcataa ttgaaagg                                     | 18 |

ES 2 546 190 T3

|    |                               |    |
|----|-------------------------------|----|
|    | <210> 134                     |    |
|    | <211> 20                      |    |
|    | <212> ADN                     |    |
| 5  | <213> Virus de la hepatitis C |    |
|    | <400> 134                     |    |
|    | atgctcgtgc gctccgtgat         | 20 |
| 10 | <210> 135                     |    |
|    | <211> 20                      |    |
|    | <212> ADN                     |    |
|    | <213> Virus de la hepatitis C |    |
| 15 | <400> 135                     |    |
|    | cttgcacgc tcgtgcgctc          | 20 |
| 20 | <210> 136                     |    |
|    | <211> 27                      |    |
|    | <212> ADN                     |    |
|    | <213> Virus de la hepatitis C |    |
|    | <400> 136                     |    |
|    | tactatgggc tcaatgacag ctgttg  | 27 |
| 25 | <210> 137                     |    |
|    | <211> 27                      |    |
|    | <212> ADN                     |    |
|    | <213> Virus de la hepatitis C |    |
| 30 | <400> 137                     |    |
|    | ggtagctact atgggctcaa tgacagc | 27 |
| 35 | <210> 138                     |    |
|    | <211> 24                      |    |
|    | <212> ADN                     |    |
|    | <213> Virus de la hepatitis C |    |
| 40 | <400> 138                     |    |
|    | tactccaga tgatcact gagc       | 24 |
| 45 | <210> 139                     |    |
|    | <211> 21                      |    |
|    | <212> ADN                     |    |
|    | <213> Virus de la hepatitis C |    |
|    | <400> 139                     |    |
|    | actatactt ggtaccgc g          | 21 |
| 50 | <210> 140                     |    |
|    | <211> 17                      |    |
|    | <212> ADN                     |    |
|    | <213> Virus de la hepatitis C |    |
| 55 | <400> 140                     |    |
|    | tctaccgct gccgctc             | 17 |
| 60 | <210> 141                     |    |
|    | <211> 21                      |    |
|    | <212> ADN                     |    |
|    | <213> Virus de la hepatitis C |    |
|    | <400> 141                     |    |
|    | tcttagatca ggctgagacg g       | 21 |
| 65 | <210> 142                     |    |
|    | <211> 21                      |    |

|    |   |    |
|----|---|----|
|    | <212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C                          |    |
| 5  | <400> 142<br>ctgtgttg tatgacggac a                                  | 21 |
| 10 | <210> 143<br><211> 17<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 15 | <400> 143<br>agcccgtga gaccaca                                      | 17 |
| 20 | <210> 144<br><211> 21<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 25 | <400> 144<br>atgtagtgt ggcttaagcc g                                 | 21 |
| 30 | <210> 145<br><211> 17<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 35 | <400> 145<br>ctgccggtcg gggcatg                                     | 17 |
| 40 | <210> 146<br><211> 24<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 45 | <400> 146<br>ggtcggggca tgaaggtatc ctac                             | 24 |
| 50 | <210> 147<br><211> 22<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 55 | <400> 147<br>cttgcggaga tattcttgc gg                                | 22 |
| 60 | <210> 148<br><211> 18<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 65 | <400> 148<br>ttgcgggctg cccgtctc                                    | 18 |
| 70 | <210> 149<br><211> 30<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 75 | <400> 149<br>cgacgtgaa tagactaggt tatgatgtct                        | 30 |
| 80 | <210> 150<br><211> 20<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |

ES 2 546 190 T3

|    |   |    |
|----|---|----|
|    | <400> 150<br>ccctagcggc ctactgctg                                   | 20 |
| 5  | <210> 151<br><211> 21<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 10 | <400> 151<br>ggcctactgc ttgcagtcg g                                 | 21 |
| 15 | <210> 152<br><211> 20<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 20 | <400> 152<br>gcctactgct tgcagtcgg                                   | 20 |
| 25 | <210> 153<br><211> 18<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 30 | <400> 153<br>ataccacctta tggcagcg                                   | 18 |
| 35 | <210> 154<br><211> 21<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 40 | <400> 154<br>acagtggatg aacaggctca t                                | 21 |
| 45 | <210> 155<br><211> 20<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 50 | <400> 155<br>tgacaggaaa tgaagggcag                                  | 20 |
| 55 | <210> 156<br><211> 19<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 60 | <400> 156<br>tgaagtggat ggggtgaga                                   | 19 |
| 65 | <210> 157<br><211> 18<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
|    | <400> 157<br>tgaggcctat gcgtctgg                                    | 18 |
|    | <210> 158<br><211> 19<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
|    | <400> 158   |    |

ES 2 546 190 T3

|    |   |    |
|----|---|----|
|    | caccaactgt cgatggatg  | 19 |
| 5  | <210> 159<br><211> 28<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 10 | <400> 159<br>ttatgatgtc tcaacaagga gttgctga                         | 28 |
| 15 | <210> 160<br><211> 26<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
|    | <400> 160<br>agtgttatct taccagctca ccgagc                           | 26 |
| 20 | <210> 161<br><211> 24<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 25 | <400> 161<br>atctaccag ctcaccgagc tggc                              | 24 |
| 30 | <210> 162<br><211> 24<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 35 | <400> 162<br>gtatcctcca gcccttcta tctg                              | 24 |
| 40 | <210> 163<br><211> 22<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
|    | <400> 163<br>cagccctcc tatctgggct ag                                | 22 |
| 45 | <210> 164<br><211> 19<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 50 | <400> 164<br>tcgggatag tgccaagga                                    | 19 |
| 55 | <210> 165<br><211> 19<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
|    | <400> 165<br>cttcagcaga cgttcgacc                                   | 19 |
| 60 | <210> 166<br><211> 18<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 65 | <400> 166<br>tacaatcaagg ccacagcg                                   | 18 |

ES 2 546 190 T3

|    |                               |    |
|----|-------------------------------|----|
|    | <210> 167                     |    |
|    | <211> 20                      |    |
|    | <212> ADN                     |    |
| 5  | <213> Virus de la hepatitis C |    |
|    | <400> 167                     |    |
|    | ctggagtgtg acgagctgtt         | 20 |
| 10 | <210> 168                     |    |
|    | <211> 18                      |    |
|    | <212> ADN                     |    |
|    | <213> Virus de la hepatitis C |    |
| 15 | <400> 168                     |    |
|    | ctggagaca tcgggcac            | 18 |
| 20 | <210> 169                     |    |
|    | <211> 21                      |    |
|    | <212> ADN                     |    |
|    | <213> Virus de la hepatitis C |    |
|    | <400> 169                     |    |
|    | gcgcgtccct tactctgtga g       | 21 |
| 25 | <210> 170                     |    |
|    | <211> 19                      |    |
|    | <212> ADN                     |    |
|    | <213> Virus de la hepatitis C |    |
| 30 | <400> 170                     |    |
|    | gctctgcgc gtcccttac           | 19 |
| 35 | <210> 171                     |    |
|    | <211> 24                      |    |
|    | <212> ADN                     |    |
|    | <213> Virus de la hepatitis C |    |
| 40 | <400> 171                     |    |
|    | gtagccagcg aggatgtcca ctag    | 24 |
| 45 | <210> 172                     |    |
|    | <211> 21                      |    |
|    | <212> ADN                     |    |
|    | <213> Virus de la hepatitis C |    |
|    | <400> 172                     |    |
|    | catctgcgccc ctcgatct t        | 21 |
| 50 | <210> 173                     |    |
|    | <211> 19                      |    |
|    | <212> ADN                     |    |
|    | <213> Virus de la hepatitis C |    |
| 55 | <400> 173                     |    |
|    | gcgtccctta ctcgtgag           | 19 |
| 60 | <210> 174                     |    |
|    | <211> 16                      |    |
|    | <212> ADN                     |    |
|    | <213> Virus de la hepatitis C |    |
|    | <400> 174                     |    |
|    | ccgtgcgcag gagagg             | 16 |
| 65 | <210> 175                     |    |
|    | <211> 18                      |    |



ES 2 546 190 T3

|    |   |    |
|----|---|----|
|    | <212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C                          |    |
| 5  | <400> 175<br>cacggtcttg gaccaagc                                    | 18 |
| 10 | <210> 176<br><211> 20<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 15 | <400> 176<br>gcctgtacg aactgacacc                                   | 20 |
| 20 | <210> 177<br><211> 18<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 25 | <400> 177<br>gccactcct gttggtgc                                     | 18 |
| 30 | <210> 178<br><211> 19<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 35 | <400> 178<br>ctgagtcaaa gtcgccggt                                   | 19 |
| 40 | <210> 179<br><211> 20<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 45 | <400> 179<br>gacatgcagg ccatgatgta                                  | 20 |
| 50 | <210> 180<br><211> 22<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 55 | <400> 180<br>taaggggatt acctgtctcg gc                               | 22 |
| 60 | <210> 181<br><211> 22<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 65 | <400> 181<br>agttgtgttc acgccatgg ag                                | 22 |
| 70 | <210> 182<br><211> 20<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 75 | <400> 182<br>gggactttgg tgctctgcc                                   | 20 |
| 80 | <210> 183<br><211> 21<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |

ES 2 546 190 T3

|    |   |    |
|----|---|----|
|    | <400> 183<br>tcgatgccat atgccttga c                                 | 21 |
| 5  | <210> 184<br><211> 19<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 10 | <400> 184<br>ttcagtgga cagcgtgt                                     | 19 |
| 15 | <210> 185<br><211> 20<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 20 | <400> 185<br>agcgtggtga tcgtcggag                                   | 20 |
| 25 | <210> 186<br><211> 18<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 30 | <400> 186<br>cctgcaggcg gtcgaagg                                    | 18 |
| 35 | <210> 187<br><211> 22<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 40 | <400> 187<br>cgaaggtcac cttctctgc cg                                | 22 |
| 45 | <210> 188<br><211> 20<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 50 | <400> 188<br>agacatgagg gaagcaatgg                                  | 20 |
| 55 | <210> 189<br><211> 18<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 60 | <400> 189<br>tgtcagtg atgaaccg                                      | 18 |
| 65 | <210> 190<br><211> 18<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
|    | <400> 190<br>actctgcgaa cctccacg                                    | 18 |
|    | <210> 191<br><211> 21<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
|    | <400> 191   |    |

ES 2 546 190 T3

|    |   |    |
|----|---|----|
|    | gttgacagac ccatcacaca t   | 21 |
| 5  | <210> 192<br><211> 20<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 10 | <400> 192<br>tcgtctgtct caaccctggt                                  | 20 |
| 15 | <210> 193<br><211> 20<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 20 | <400> 193<br>tcttactcgt caatgcctcc                                  | 20 |
| 25 | <210> 194<br><211> 25<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 30 | <400> 194<br>cggggaaca caagataaca tcaag                             | 25 |
| 35 | <210> 195<br><211> 24<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 40 | <400> 195<br>accctaaggt cggagtgtta agct                             | 24 |
| 45 | <210> 196<br><211> 24<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 50 | <400> 196<br>acaagataac atcaagtgcc cctg                             | 24 |
| 55 | <210> 197<br><211> 24<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 60 | <400> 197<br>aaggcggag tgtaagctg ccta                               | 24 |
| 65 | <210> 198<br><211> 21<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 70 | <400> 198<br>cttattcgtc aatgcctcca c                                | 21 |
| 75 | <210> 199<br><211> 20<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
| 80 | <400> 199<br>atcatggcca aaaatgaggt                                  | 20 |

# ES 2 546 190 T3

|    |   |    |
|----|---|----|
| 5  | <210> 200<br><211> 20<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
|    | <400> 200<br>gccttcacgg aggctatgac                                  | 20 |
| 10 | <210> 201<br><211> 24<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
|    | <400> 201<br>tgggcatat acctcttaa ctgg                               | 24 |
| 20 | <210> 202<br><211> 17<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
|    | <400> 202<br>ggagtcaaag cagcggg                                     | 17 |
| 25 | <210> 203<br><211> 22<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
|    | <400> 203<br>caggaattga ctggagtgtg tc                               | 22 |
| 35 | <210> 204<br><211> 20<br><212> ADN<br><213> Virus de la hepatitis C |    |
|    | <400> 204<br>gcacaggagt aaatagcggg                                  | 20 |
| 40 |   |    |

## REIVINDICACIONES

1. Métodos para determinar mutaciones resistencia a fármacos en cualquiera de las regiones de proteína no estructural NS3 a NS5B del virus de la Hepatitis C (HCV) para los genotipos 1 a 6, más en particular para los genotipos específicos de subtipo 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 4a y 4d, presentes en una muestra que comprende:

- a) obtener dicha muestra de un paciente,  
 b) extraer material genético viral de dicha muestra,  
 c) amplificar la región NS5B de HCV para generar un amplicón de ADN de 388 pares de bases usando cebadores que tienen secuencias seleccionadas entre el grupo que consiste en las SEC ID N° 1-5,  
 d) secuenciar el amplicón para obtener una secuencia de 329 pares de bases usando las secuencias seleccionadas entre el grupo que consiste en las SEC ID N° 3-5,  
 e) realizar análisis de árboles filogenéticos usando la información de secuencia de 329 pares de bases de NS5B para obtener información de subtipo de HCV en dicha muestra del paciente,  
 f 1) usar cebadores específicos de subtipo que tienen las secuencias seleccionadas entre el grupo que consiste en las SEC ID N° 6-9, 42-45, 104-107, 120-123, 145-148 o 180-183 para la generación de un amplicón de ADN que comprende la proteína no estructural NS3 (181 aminoácidos N-terminales),  
 g 1) secuenciar el amplicón de NS3 para obtener una secuencia de 543 pares de bases usando las secuencias seleccionadas entre el grupo que consiste en las SEC ID N° 8 y 9; 43 y 45-46; 104 y 106; 120 y 122; 146 y 148 o 180 y 182  
 o  
 f2) usar cebadores específicos de subtipo que tienen las secuencias seleccionadas entre el grupo que consiste en las SEC ID N° 13-16, 54 y 59-66, 124-133, 158 y 160-168 o 194-197 para la generación de un amplicón de ADN que comprende la polimerasa NS5B,  
 g 2) secuenciar el amplicón de la polimerasa NS5B para obtener una secuencia de 1776 pares de bases usando las secuencias seleccionadas entre el grupo que consiste en las SEC ID N° 15-16 y 87-92; 54, 59 y 61-66; 124 y 127-133; 158-159, 161 y 163-168 o 197-204  
 o  
 f 3) usar cebadores específicos de subtipo que tienen las secuencias seleccionadas entre el grupo que consiste en las SEC ID N° 30-33, 67-70, 93-96, 108-111, 134-137 o 169-172 para la generación de un amplicón de ADN que comprende NS3/4A,  
 g 3) secuenciar el amplicón de la proteasa NS3/4A para obtener una secuencia de 2055 pares de bases usando las secuencias seleccionadas entre el grupo que consiste en las SEC ID N° 34-41; 68 y 71-77; 95 y 97-103; 112-119; 136 y 138-144 o 171 y 173-179  
 o  
 f4) usar cebadores específicos de subtipo que tienen las secuencias seleccionadas entre el grupo que consiste en las SEC ID N° 47-50, 78-81, 149-151 y 159 o 184-187 para la generación de un amplicón de ADN que comprende NS4B/5A,  
 g 4) secuenciar el amplicón de NS4B y NS5A para obtener una secuencia de los dos genes NS4B y NS5A usando las secuencias seleccionadas entre el grupo que consiste en las SEC ID N° 51-57; 79 y 81-87; 152-159 o 185 y 187-193;  
 h) alinear la secuencia obtenida en la etapa (g1), (g2), (g3) o (g4) con una secuencia de HCV de referencia o de tipo silvestre,  
 i) determinar una o más mutaciones de resistencia a fármacos en el material genético viral presente en la muestra del paciente.

2. Método de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende adicionalmente las etapas para realizar un ensayo de fenotipado de NS3 por

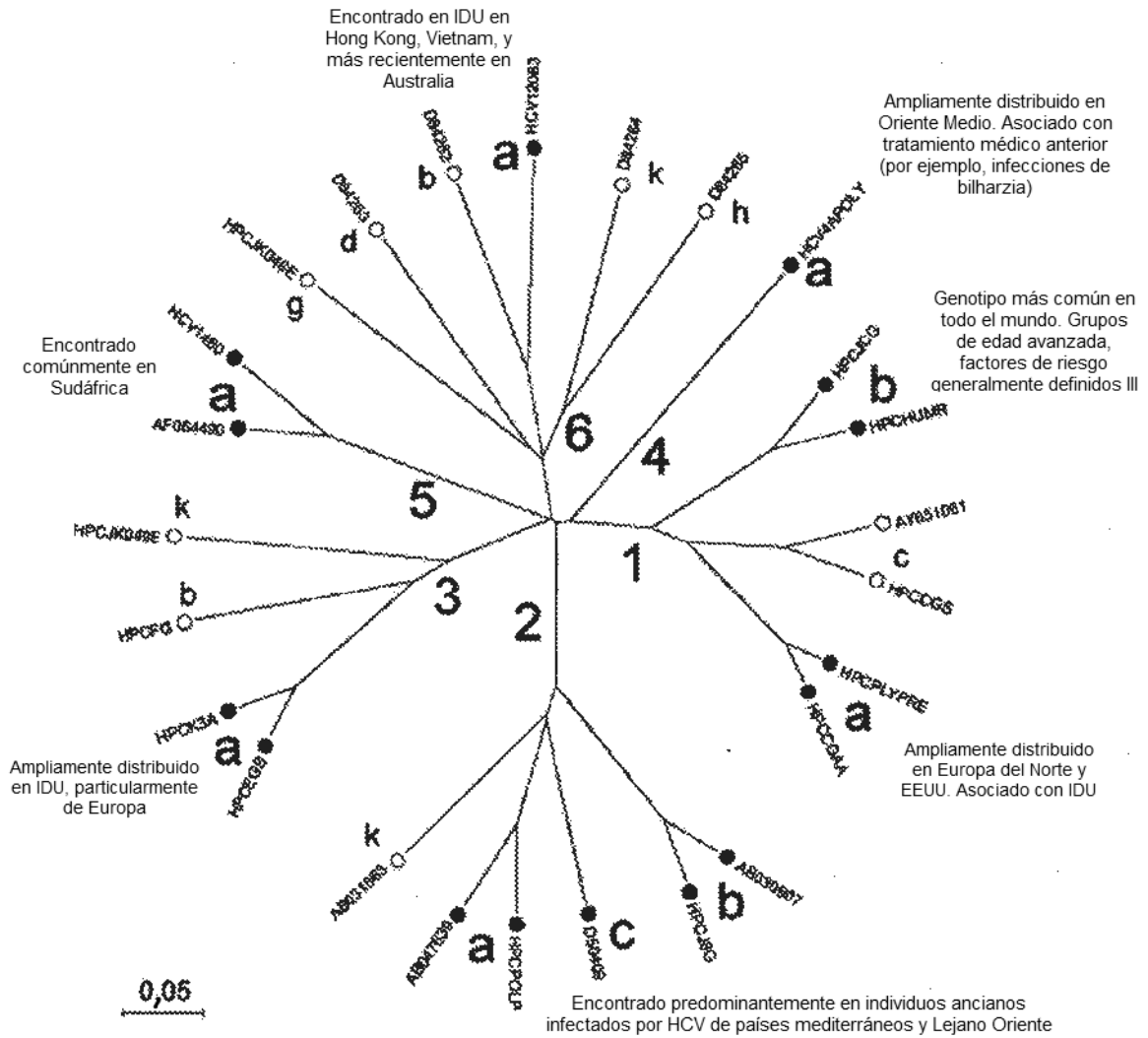
- j) generación de un amplicón de NS3 partiendo del amplicón de ADN que comprende NS3 (181 aminoácidos N-terminales) obtenido en la etapa (f1) de la reivindicación 1 usando cebadores que tienen la secuencia de la SEC ID N° 11 y 12,  
 k) inserción, por clonación InFusion™ o recombinación in vitro, de dicho amplicón obtenido en la etapa (j) en un vector lanzadera que contiene marcador incompetente en replicación con NS3 delecionado que tiene la secuencia de la SEC ID N° 10 para obtener un replicón de HCV recombinante competente en replicación de NS3,  
 l) generación de ARN, por transcripción in vitro, a partir de dicho replicón de HCV obtenido en la etapa (k)  
 m) transfección de dicho ARN en células adecuadas,  
 n) determinación, en base a la expresión del gen marcador, del valor de CE<sub>50</sub> y/o el cambio factorial como una medida para la presencia de mutaciones de resistencia a fármacos en una muestra.

3. Método de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende adicionalmente las etapas para realizar un ensayo de fenotipado de NS5B por

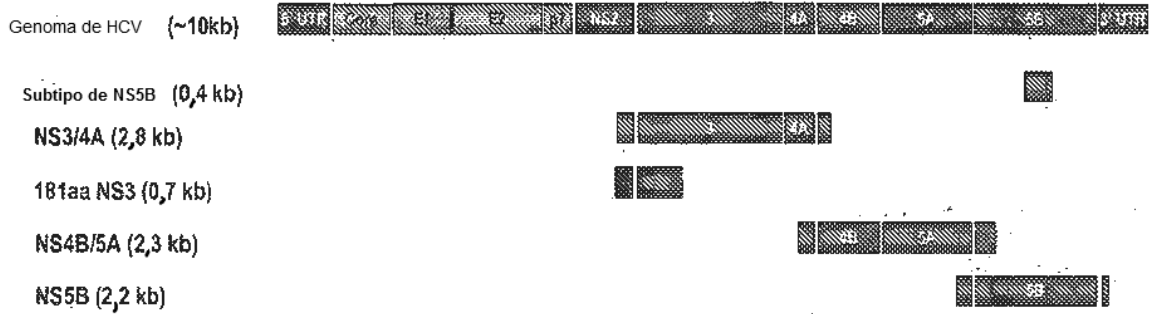
- o) generación de un amplicón de NS5B partiendo del amplicón de ADN que comprende NS5B obtenido en la etapa (f2) de la reivindicación 1 usando cebadores que tienen la secuencia de la SEC ID N° 28 y 29,

- p) inserción, por recombinación in vitro, de dicho amplicón obtenido en la etapa (o) en un vector lanzadera incompetente en replicación con NS5B deletado que tiene la secuencia de la SEC ID N° 21 o SEC ID N° 27 para obtener un replicón de HCV recombinante competente en replicación de NS5B,
- q) generación de ARN, por transcripción in vitro, de dicho replicón de HCV obtenido en la etapa (p)
- 5 r) transfección de dicho ARN en células adecuadas,
- s) determinación, en base a la expresión del gen marcador, del valor de CE50 y/o el cambio factorial como una medida para la presencia de mutaciones de resistencia a fármacos en una muestra.
- 10 4. Uso del vector pFK I341 PI luc ΔNS3 7-192\_ET (SEC ID N° 10) que comprende el genoma de HCV con una delección que abarca la región de 181 aminoácidos N-terminales de NS3 HCV en el método de acuerdo con la reivindicación 2.
- 15 5. Uso del vector pFK\_I341\_PI\_NS3-3\_ET\_dNS5a/b\_5a440-5b591-ScaI (SEC ID N° 21) que comprende el genoma de HCV con una delección que abarca la región de NS5B de HCV o el vector pFK\_I341\_PI\_NS3-3\_ET\_dNS5a/b\_5a440-5b591-XbaI (SEC ID N° 27) que comprende el genoma de HCV con una delección que abarca la región de NS5B de HCV en el método de acuerdo con la reivindicación 3.

Figura 1.



**Figura 2: Sinopsis de amplicones generados para ensayos de subtipado y genotipado**



**Figura 3**

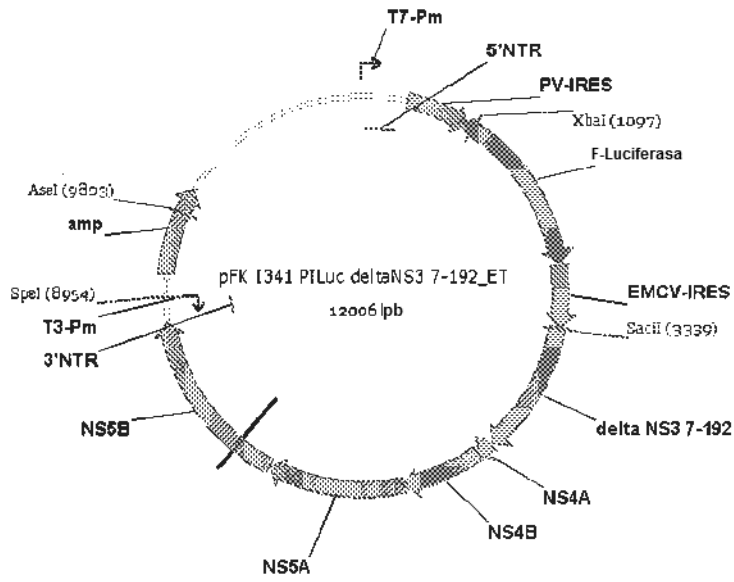
|  |   | Muestras clínicas             |  |  |                               |  |
|--|---|-------------------------------|--|--|-------------------------------|--|
|  |   | Genotipado de proteasa NS3/4A | Genotipado de 181 aa N-terminales de NS3 | Genotipado de región NS4B/5 <sup>a</sup> | Genotipado de polimerasa NS5B |  |
| Subtipado basado en secuencia de NS5B (G1-6) | CS: 91% (603)<br>SS: >95%                     |                               |  |  |                               |  |
|  | Protocolos disponibles específicos de subtipo | 1a<br>1b                      | CS: 93% (94)<br>SS: >95%                 | CS: 93% (92)<br>SS: >95%                 | CS: 93% (92)<br>SS: >95%      | CS: 93% (93)<br>SS: >95%                     |
|  |   | 2a<br>2b                      | CS: 90% (20)<br>SS: 95%                  | CS: 100% (15)<br>SS: >95%                | No disponibles                | CS: 93% (14)<br>SS: >95%<br>Sólo muestras 2b |
|  |   | 3a                            | CS: 99% (72)<br>SS: >95%                 | CS: 98% (84)<br>SS: >95%                 | CS: 99% (71)<br>SS: >95%      | CS: 97% (72)<br>SS: >95%                     |
| 4a/g   |   | CS: 96% (84)<br>SS: >95%      | CS: 92% (83)<br>SS: >95%                 | CS: 98% (86)<br>SS: >95%                 | CS: 98% (81)<br>SS: >95%      |  |

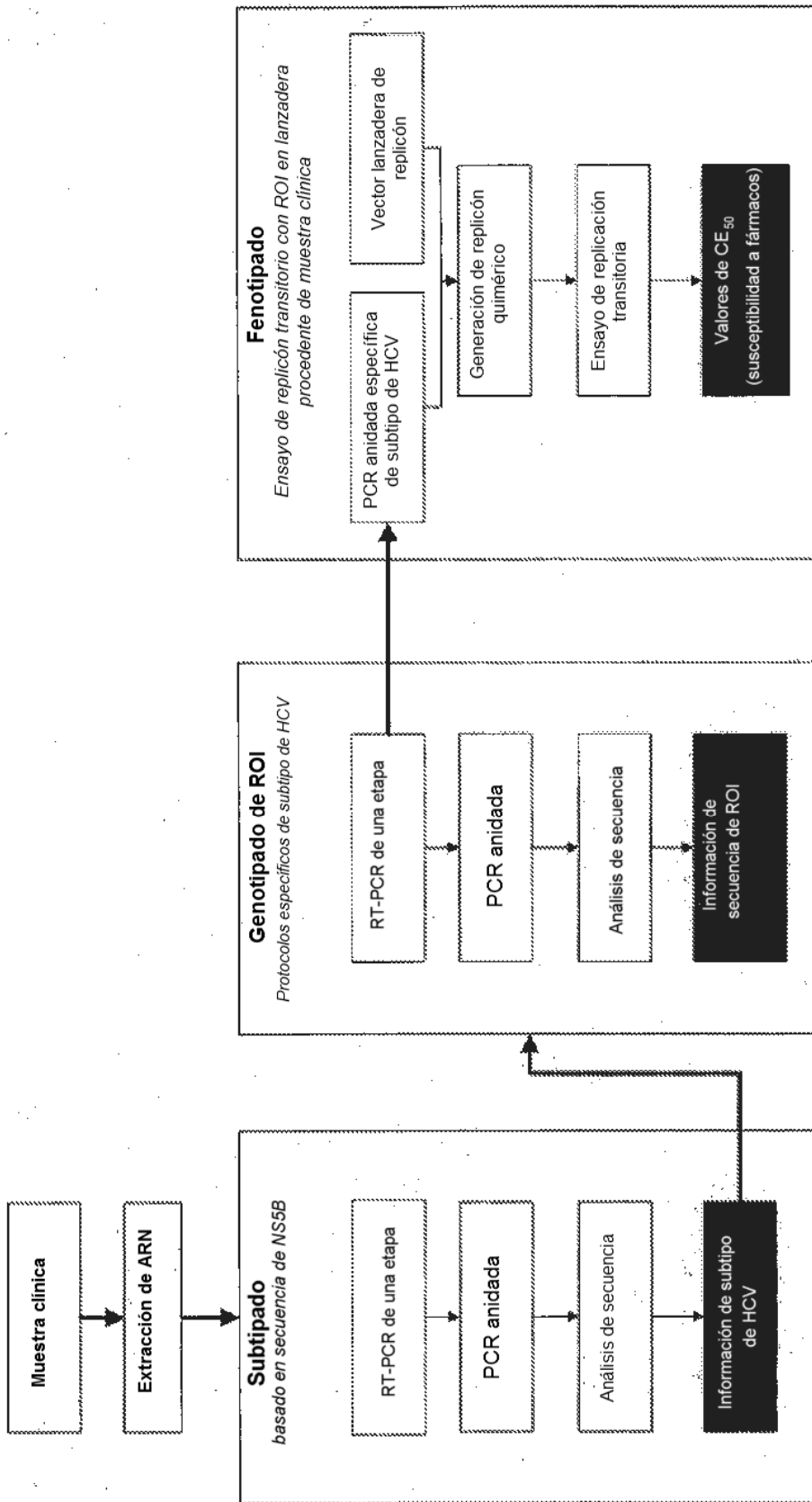
**C.S:** Sensibilidad clínica (tasa de aciertos de amplificación a alta carga en %;

**S.S:** Sensibilidad clínica (tasa de aciertos de secuenciación de amplicones generados) en %; números en paréntesis = cantidad total de muestras HCV-positivas ensayadas



**Figura 4**





**Figura 5:** Sinopsis del proceso ROI, región de interés.