



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11) **EP 1 043 399 B9**

(12) **KORRIGIERTE EUROPÄISCHE PATENTSCHRIFT**

Hinweis: Bibliographie entspricht dem neuesten Stand

(15) Korrekturinformation:
Korrigierte Fassung Nr. 1 (W1 B1)
Korrekturen, siehe Seite(n) 27-60

(51) Int Cl.7: **C12N 15/86**, C12N 7/01,
C12N 7/04, C12N 5/10,
C07K 14/18, A61K 49/00,
A61K 48/00

(48) Corrigendum ausgegeben am:
08.10.2003 Patentblatt 2003/41

(45) Veröffentlichungstag und Bekanntmachung des
Hinweises auf die Patenterteilung:
09.04.2003 Patentblatt 2003/15

(21) Anmeldenummer: **00105929.4**

(22) Anmeldetag: **23.03.2000**

(54) **Hepatitis C Virus Zellkultursystem**

Hepatitis C Virus cell culture system

Système de culture du virus de l'hépatite C

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU
MC NL PT SE
Benannte Erstreckungsstaaten:
AL LT LV MK RO SI

(30) Priorität: **03.04.1999 DE 19915178**

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
11.10.2000 Patentblatt 2000/41

(73) Patentinhaber: **Bartenschlager, Ralf, Dr.**
55239 Gau-Odernheim (DE)

(72) Erfinder: **Bartenschlager, Ralf, Dr.**
55239 Gau-Odernheim (DE)

(74) Vertreter: **Rudolph, Ulrike, Dr.**
Patentanwältin
In der Schanz 10
69198 Schriesheim (DE)

(56) Entgegenhaltungen:
WO-A-98/39031 WO-A-99/04008
WO-A-99/67394 US-A- 5 851 758
US-A- 5 874 565

- **YOO ET AL: "Transfection of differentiated Huh7 with in vitro transcribed HCV RNA and establishment of a culture infected with HCV" JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, Bd. 69, Nr. 1, 1995, Seiten 32-38, XP002022696 ISSN: 0022-538X**
- **DASH SRIKANTA ET AL: "Transfection of HepG2 cells with infectious hepatitis C virus genome." AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY, Bd. 151, Nr. 2, 1997, Seiten 363-373, XP001029512 ISSN: 0002-9440**
- **DATABASE EMBL [Online] 11. März 1998 (1998-03-11) retrieved from EBI Database accession no. D89815 XP002180379**
- **DATABASE EMBL [Online] 18. April 1997 (1997-04-18) retrieved from EBI Database accession no. D85516 XP002180641**
- **DATABASE EMBL [Online] 29. November 1995 (1995-11-29) retrieved from EBI Database accession no. D63922 XP002180380**
- **LOHMANN V ET AL: "REPLICATION OF SUBGENOMIC HEPATITIS C VIRUS RNAS IN A HEPATOMA CELLLINE" SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE,, US, Bd. 285, 2. Juli 1999 (1999-07-02), Seiten 110-113, XP000960693 ISSN: 0036-8075**
- **DATABASE EMBL [Online] 5. Juli 1999 (1999-07-05) retrieved from EBI Database accession no. AJ238799 XP002180381**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist. (Art. 99(1) Europäisches Patentübereinkommen).

EP 1 043 399 B9

- BLIGHT K.J. ET AL: 'Efficient initiation of HCV RNA Replication in cell culture' SCIENCE Bd. 290, 08 Dezember 2000, Seiten 1972 - 1974

Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft ein Hepatitis-C-Virus (HCV)-RNA-Konstrukt mit der Fähigkeit zur Replikation in eukaryontischen Zellen sowie ein Hepatitis C Virus (HCV) Zellkultursystem, das im wesentlichen eukaryontische Zellen umfaßt, die eingeschleustes HCV-spezifisches Genmaterial enthalten, d.h. die mit HCV-spezifischem Genmaterial transfigiert sind.

[0002] Das Hepatitis C Virus (HCV) ist eine der Hauptursachen chronischer und sporadischer Leberkrankungen weltweit. Die meisten HCV-Infektionen verlaufen ohne erkennbare klinische Symptome, allerdings werden 80-90% der Infizierten dauerhafte Virusträger und bei 50% dieser dauerhaften Virusträger kommt es zu einer chronischen Leberentzündung mit unterschiedlichen Schweregraden. Ca. 20% der chronisch Infizierten entwickeln im Laufe von 10 bis 20 Jahren eine Leberzirrhose, auf deren Basis sich ein primäres Leberzellkarzinom entwickeln kann. Die chronische Hepatitis C ist heute die Hauptindikation für eine Lebertransplantation. Eine Kausaltherapie gibt es bisher noch nicht. Die einzige derzeit verfügbare Therapie ist die hochdosierte Verabreichung von Interferon-Alpha oder eine Kombination aus Interferon-Alpha und dem Purin-Nukleosidanalogon Ribavirin. Allerdings sprechen nur ca. 60 % aller Behandelten auf diese Therapie an und bei diesen kommt es in mehr als der Hälfte aller Fälle nach dem Absetzen der Behandlung zu einer erneuten Virämie.

Aufgrund der hohen Prävalenz, gerade auch in den Industrieländern, den schwerwiegenden Folgen chronischer Infektionen und dem Fehlen einer Kausaltherapie ist die Entwicklung einer HCV-spezifischen Chemotherapie ein wesentliches Ziel der pharmazeutischen Forschung und Entwicklung. Hauptproblem hierbei ist bisher das Fehlen eines geeigneten Zellkultursystems, das ein Studium der Virus-Replikation und der Pathogenese in eukaryontischen Zellen ermöglicht.

[0003] Aufgrund der geringen Virusmengen im Blut bzw. Gewebe, dem Fehlen geeigneter Zellkultursysteme oder Tiermodelle (bis heute ist der Schimpanse das einzige mögliche Versuchstier) sowie dem Fehlen effizienter Systeme zur Produktion virus-ähnlicher Partikel, konnte die molekulare Zusammensetzung des HCV-Partikels bis heute noch nicht eingehend untersucht bzw. aufgeklärt werden. Die derzeit vorliegenden Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen: Das HCV ist ein umhülltes Plusstrang RNA Virus mit einem Partikeldurchmesser von 50-60 nm und einer mittleren Dichte von 1,03-1,1g/ml. Es wurde erstmals 1989 molekular kloniert und charakterisiert (Choo et al., 1989: Science, 244, 359-362). Die HCV-RNA hat eine Länge von ca. 9.6 kb (= 9600 Nukleotide), eine positive Polarität und besitzt ein einziges offenes Leseraster (ORF = open reading frame), das ein lineares Polyprotein von ca 3010 Aminosäuren kodiert (siehe Rice 1996, in Virology, B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley, Eds. (Lippincott-Raven, Philadelphia, PA, 1996), vol. 1, pp.931-960; Clarke 1997, J. Gen. Virol. 78, 2397; und Bartenschlager 1997, Intervirology 40, 378 und vgl. Fig. 1 A). Bei der Virusreplikation wird das Polyprotein durch zelluläre und virale Proteasen in die reifen und funktionell aktiven Proteine gespalten.

Innerhalb des Polyproteins sind die Proteine wie folgt angeordnet (vom Amino- zum Carboxyterminus): Core-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B. Das Core-Protein ist die Hauptkomponente des Nukleokapsids. Die Glykoproteine E1 und E2 sind Transmembranproteine und Hauptkomponenten der Virushülle. Sie spielen wahrscheinlich bei der Anheftung des Virus an die Wirtszelle eine wesentliche Rolle. Diese drei Proteine Core, E1 und E2 bauen den Viruspartikel auf und werden deshalb als Strukturproteine bezeichnet. Die Funktion des Proteins p7 ist noch unklar. Das Protein NS2 ist wahrscheinlich die katalytische Domäne der NS2-3 Protease, die für die Prozessierung zwischen den Proteinen NS2 und NS3 verantwortlich ist. Das Protein NS3 hat zwei Funktionen, nämlich in der aminoterminalen Domäne eine Proteaseaktivität, die für die Polyproteinprozessierung essentiell ist, und in der carboxyterminalen Domäne eine NTPase/Helikase-Funktion, die wahrscheinlich bei der Replikation der viralen RNA eine Rolle spielt. Das Protein NS4A ist ein Kofaktor der NS3-Protease. Die Funktion des Proteins NS4B ist unbekannt.

[0004] Das offene Leseraster ist an seinem 5' Ende von einer ca 340 Nukleotide langen nicht-translatierten Region (NTR = non-translated region) flankiert, die als interne Ribosomenansatzstelle (IRES = internal ribosome entry site) fungiert, und an seinem 3'Ende von einer ca. 230 Nukleotide langen NTR, die höchstwahrscheinlich für die Genomreplikation von Bedeutung ist. Eine solche 3'NTR ist Gegenstand der Patentanmeldung PCT/US 96/14033. Die Strukturproteine in dem amino-terminalen Viertel des Polyproteins werden von der Signalpeptidase der Wirtszelle gespalten. Die Nicht-Strukturproteine (NS) 2 bis (NS) 5B werden von zwei viralen Enzymen prozessiert, nämlich von der NS2-3 und der NS3/4A Proteinase. Die NS3/4A Proteinase wird für alle Spaltungen jenseits des Carboxyterminus von NS3 benötigt. Die Rolle von NS4B ist nicht bekannt. NS5A, ein hoch phosphoryliertes Protein, scheint für die Interferon Resistenz verschiedener HCV-Genotypen verantwortlich zu sein (vgl. Enomoto et al. 1995, J. Clin. Invest. 96, 224; Enomoto et al. 1996, N. Engl. J. Med. 334, 77; Gale Jr. et al. 1997, Virology 230, 217; Kaneko et al. 1994, Biochem. Biophys. Res. Commun. 205, 320; Reed et al., 1997, J. Virol. 71, 7187) und NS5B wurde als die RNA-abhängige RNA Polymerase identifiziert.

[0005] Anhand dieser Erkenntnisse wurden erste Diagnosesysteme entwickelt, die entweder auf dem Nachweis von HCV-spezifischen Antikörpern in Patientenserum oder auf dem Nachweis von HCV-spezifischer RNA mittels RT-PCR (= Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) beruhen, und die mittlerweile routineund/oder vorschrittmäßig

bei allen Blutkonserven angewendet werden (müssen).

[0006] Seit der Erstbeschreibung des Genoms 1989 wurden mit Hilfe der PCR-Methode zahlreiche Teil- und Kompletsequenzen des HCV kloniert und charakterisiert. Ein Vergleich dieser Sequenzen zeigt eine hohe Variabilität des viralen Genoms, insbesondere im Bereich des NS5B-Gens, was letztendlich zu einer Einteilung in 6 Genotypen geführt hat, die selbst nochmals in Subtypen a, b, und c untergliedert sind. Die genomische Varianz ist nicht gleichmäßig über das Genom verteilt. So sind die 5'NTR und Teile der 3'NTR hoch konserviert, während bestimmte kodierende Sequenzen z.T. sehr stark variieren, vor allem die Hüllproteine E1 und E2.

[0007] Die klonierten und charakterisierten Teil- und Kompletsequenzen des HCV-Genoms wurden außerdem hinsichtlich geeigneter Angriffsziele für ein prospektives antivirales Therapeutikum untersucht. Dabei wurden drei virale Enzyme gefunden, die sich als solches Angriffsziel anbieten. Diese sind (1) der NS3/4A Proteasekomplex, (2) die NS3 Helikase und (3) die NS5B RNA-abhängige RNA Polymerase. Der NS3/4A Proteasekomplex und die NS3 Helikase konnten bereits kristallisiert und hinsichtlich ihrer dreidimensionalen Struktur aufgeklärt werden (Kim et al., 1996, Cell, 87,343; Yem et al., 1998, Protein Science, 7, 837; Love et al., 1996, Cell, 87, 311; Kim et al., 1998, Structure, 6, 89; Yao et al., 1997, Nature Structural Biology, 4, 463, Cho et al., 1998, J. Biol. Chem., 273, 15045); bei der NS5B RNA-abhängigen RNA Polymerase ist dies bis heute noch nicht gelungen.

Obwohl mit diesen Enzymen bedeutsame Angriffsziele für eine Therapieentwicklung der chronischen HCV-Infektion definiert sind, und obwohl sowohl mit Hilfe von 'rational drug design' als auch mit Hilfe von 'high throughput screens' weltweit intensiv nach geeigneten Inhibitoren gesucht wird, leidet die Therapieentwicklung an einem großen Defizit, nämlich dem Fehlen von Zellkultursystemen oder einfachen Tiermodellen, die es erlauben, HCV-RNA oder HCV-Antigene direkt, zuverlässig und mit einfachen laborüblichen Methoden nachzuweisen. Das Fehlen solcher Zellkultursysteme ist auch der Hauptgrund dafür, daß das Verständnis der HCV-Replikation bis heute noch sehr lückenhaft und in weiten Teilen nur hypothetisch ist.

[0008] Obwohl nach Meinung der Fachwelt eine enge evolutionäre Beziehung zwischen HCV und den Flavi- und Pestiviren besteht und für diese autonom replizierende RNAs beschrieben sind, die in verschiedenen Zelllinien ohne weiteres zur Replikation gebracht werden können und dabei relativ hohe Ausbeuten zeigen (siehe Khromykh et al., 1997, J. Virol. 71, 1497; Behrens et al., 1998, J. Virol. 72, 2364; Moser et al., 1998, J. Virol. 72, 5318), waren ähnliche Versuche mit HCV bisher nicht erfolgreich.

[0009] Zwar ist aus verschiedenen Publikationen bekannt, daß Zelllinien oder primäre Zellkulturen mit HCV-haltigem, hochtitrigem Patientenserum infiziert werden können, (Lanford et al. 1994, Virology 202, 606; Shimizu et al. 1993, Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 90, 6037-6041; Mizutani et al. 1996, Journal of Virology, 70, 7219-7223; M. Ikeda et al. 1998, Virus Res. 56, 157; Fournier et al. 1998, J. Gen. Virol. 79, 2376 und darin zitierte Literaturstellen, Ito et al. 1996, Journal of General Virology, 77, 1043-1054), diese virusinfizierten Zelllinien oder Zellkulturen erlauben jedoch nicht den direkten Nachweis von HCV-RNA oder HCV-Antigenen. Die virale RNA in diesen Zellen ist weder in einem Northern-Blot (einem Standardverfahren zum quantitativen Nachweis von RNA) noch sind die viralen Protein in einem Western-Blot oder mittels Immunpräzipitation detektierbar. Nur mit sehr aufwendigen und indirekten Methoden ist es überhaupt gelungen, eine HCV-Replikation nachzuweisen. Diese nachteiligen Umstände zeigen klar, daß die Replikation in diesen bekannten virusinfizierten Zelllinien oder Zellkulturen absolut unzureichend ist.

[0010] Desweiteren ist aus den Publikationen von Yoo et al. (1995, Journal of Virology, 69, 32-38) und von Dash et al., (1997, American Journal of Pathology, 151, 363-373) bekannt, daß Hepatomazelllinien mit synthetischer HCV-RNA, die mittels in vitro Transkription von kloniertem HCV-Genom gewonnen wurde, transfiziert werden können. In beiden Publikationen gingen die Autoren von dem Grundgedanken aus, daß das virale HCV-Genom eine Plusstrang-RNA ist, die nach dem Einschleusen in die Zelle direkt als mRNA fungiert, an die sich Ribosomen anheften und im Zuge von Translationsprozessen Virusproteine bilden, aus denen sich letztendlich neue HCV-Partikel bilden (können). Diese Virusreplikation, d.h. diese neu gebildeten HCV-Viren bzw. deren RNA wurde mittels RT-PCR nachgewiesen. Die publizierten Ergebnisse der durchgeführten RT-PCR sprechen jedoch dafür, daß die Effizienz der HCV-Replikation in den beschriebenen HCV-transfizierten Hepatomazellen nur sehr gering ist und jedenfalls nicht ausreicht, um Schwankungen in der Replikationsrate nach gezielter Einwirkung mit prospektiven antiviralen Therapeutika auch nur qualitativ, geschweige denn quantitativ zu messen. Außerdem ist im Stand der Technik mittlerweile bekannt (Yanagi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 2291-95, 1999), daß die hochkonservierte 3' NTR essentiell ist für die Virusreplikation, was in klarem Widerspruch zu den Behauptungen von Yoo et al. und Dash et al. steht, die für ihre Versuche in Unkenntnis des authentischen 3' Endes des HCV-Genoms ausschließlich HCV-Genome mit verkürzten 3' NTRs verwendet haben.

[0011] Rice et al. beschreiben in der WO 98 39031 die Herstellung eines infektiösen HCV Genoms und dessen Testung im Schimpansen. Die Autoren behaupten, daß solche infektiösen HCV Genome oder Teilen davon für verschiedene Zwecke, u.a. zum Aufbau von Zellkultursystemen für das HCV geeignet seien, es ist jedoch an keiner Stelle der D1 ein spezifisches, nacharbeitbares HCV-Konstrukt, das tatsächlich in Zellkultur repliziert, beschrieben.

[0012] In der WO 99/04008 ist ein kloniertes HCV Genom beschrieben, das im Schimpansen infektiös ist. Eine Infektiosität im Schimpansen erlaubt jedoch nicht den Schluß, daß das betreffende Genom auch in Zellkultur bzw. im In-vitro-Model repliziert.

[0013] Die US 5,851,758 beschreibt von der humanen T Zelllinie H9 abgeleitete Zellklone, die mit HCV infizierbar sind, wobei nach der Infektion mit HCV zytopathische Effekte auftreten. Zur Infektion der Zellen wird Patientenserum mit nicht definiertem HCV verwendet. Im Unterschied zum Gegenstand der vorliegenden Patentanmeldung werden keine klonierten HCV-Genome verwendet und insbesondere keine klonierten HCV-Genome mit einem integrierten Selektionsmarker bzw. Reportergen, und die Zellkultur erfolgt nicht mit Hepatomzellen sondern mit humane T-Zellen. Die D5 nimmt die HCV-Konstrukte und das damit hergestellte Zellkulturmodell gemäß geltender Anspruchsfassung deshalb weder vorweg noch legt sie diese/dieses nahe.

[0014] In der US 5,874,565 ist eine konservierte Sequenz am 3' Ende des HCV beschrieben, die für die virale Replikation essentiell ist. Es genügt jedoch nicht, die beschriebene 3'-Sequenz an ein beliebiges Genom anzuhängen und dadurch Replikation in Zellkultur zu erhalten, denn diese Sequenz ist zwar notwendig für die Replikation in Zellkultur, aber nicht hinreichend.

[0015] Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung eines Hepatitis-C-Virus (HCV)-RNA-Konstrukts mit der Fähigkeit zur Replikation in eukaryontischen Zellen sowie eines HCV- Zellkultursystems, bei dem die virale RNA in den transfizierten Zellen autonom und mit so hoher Effizienz repliziert, daß Schwankungen in der Replikationsrate nach gezielter Einwirkung mit virus- und insbesondere HCV-spezifischen antiviralen Therapeutika qualitativ und quantitativ und mit Hilfe gängiger, laborüblicher Meßverfahren gemessen werden können.

[0016] Eine Lösung dieser Aufgabe besteht in der Bereitstellung eines Hepatitis-C-Virus (HCV)-RNA-Konstrukts der eingangs genannten Art, das sich dadurch auszeichnet, daß es eine Nukleotidsequenz gemäß einem der Sequenzprotokolle SEQ ID NO: 1 bis SEQ ID NO: 11 umfaßt, welche zumindest für die HCV-spezifischen RNA-Abschnitte 5' NTR, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B und 3' NTR und zusätzlich ein selektierbares Markergen (Selektionsgen) kodieren, wobei das selektierbare Markergen das Neomycinphosphotransferasegen ist und wobei anstelle des Neomycinphosphotransferasegens ein anderes Antibiotikaresistenzgen oder sonstiges Resistenzgen enthalten sein kann. Eine weitere Lösung dieser Aufgabe besteht in der Bereitstellung eines HCV-Zellkultursystems der eingangs genannten Art, bei dem die eukaryontischen Zellen humane Zellen, insbesondere Hepatomzellen sind, die vorzugsweise von einer handelsüblichen Hepatomzelllinie abstammen, aber auch aus einer entsprechenden Primärzellkultur gewonnen sein können, und bei dem das eingeschleuste HCV-spezifische Genmaterial ein HCV-RNA-Konstrukt ist, das eine Nukleotidsequenz gemäß einem der Sequenzprotokolle SEQ ID NO: 1 bis SEQ ID NO: 11 umfaßt, welche zumindest für die HCV-spezifischen RNA-Abschnitte 5'NTR, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B und 3' NTR und zusätzlich ein selektierbares Markergen (Selektionsgen) kodieren, wobei das selektierbare Markergen das Neomycinphosphotransferasegen ist und wobei anstelle des Neomycinphosphotransferasegens ein anderes Antibiotikaresistenzgen oder sonstiges Resistenzgen enthalten sein kann. "NTR" steht hier und im folgenden für "nicht-translatierte Region" und ist dem einschlägigen Fachmann als Begriff bzw. Abkürzung bekannt und geläufig. Der Begriff "HCV-RNA-Konstrukt" umfaßt hier und im folgenden sowohl Konstrukte, die das komplette HCV-Genom enthalten, als auch solche, die lediglich einen Teil davon, d.h. ein HCV-Subgenom enthalten.

[0017] Der Begriff 5' NTR bzw. NS3 bzw. NS4A bzw. NS4B bzw. NS5A bzw. NS5B bzw. 3' NTR umfaßt im vorliegenden Zusammenhang jede Nukleotidsequenz, die im Stand der Technik als Nukleotidsequenz für den jeweils betreffenden funktionellen Abschnitt des HCV-Genoms beschrieben ist.

Die Bereitstellung des erfindungsgemäßen HCV-RNA-Konstrukts ermöglicht erstmals eine detaillierte Analyse der HCV - Replikation, - Pathogenese und - Evolution in Zellkulturen. Die HCV-spezifische virale RNA kann - als vollständiges Genom oder als Subgenom - gezielt in beliebigen Mengen erzeugt werden, und es besteht die Möglichkeit, das RNA-Konstrukt zu manipulieren und damit die HCV-Funktionen auf genetischer Ebene zu untersuchen und aufzuklären.

Da alle zur Zeit als Hauptangriffsziel für eine Therapie untersuchten HCV-Enzyme, nämlich die NS3/4A Protease, die NS3 Helikase und die NS5B Polymerase, in dem erfindungsgemäßen HCV-RNA-Konstrukt enthalten sind, kann es für alle entsprechenden Untersuchungen benutzt werden.

[0018] Das in den erfindungsgemäßen HCV-RNA-Konstrukten enthaltene selektierbare Markergen (Selektionsgen), vorzugsweise ein Resistenzgen, insbesondere ein Antibiotikaresistenzgen, hat den Vorteil, daß die mit diesem Konstrukt transfizierten Zellen leicht von den nicht transfizierten Zellen selektiert werden können, indem dem Zellkulturmedium z.B. im Fall eines Antibiotikaresistenzgens das betreffende Antibiotikum zugegeben wird.

Unter 'Antibiotikum' wird im vorliegenden Zusammenhang jede Substanz verstanden, die die nicht-transfizierten Wirtszellen oder die Zellen, in denen die HCV-RNA nur mit geringer Effizienz repliziert, am Leben oder Wachstum hindert, insbesondere Zellgifte wie z.B. Puromycin, Hygromycin, Zeocin, Bleomycin oder Blastidin.

[0019] Eine Alternative zu Antibiotikaresistenzgenen ist z.B. das Thymidin-Kinase-Gen, mit dem eine HAT-Selektion durchgeführt werden kann.

[0020] Die Position des selektierbaren Markergens (Selektionsgens), bzw. des bevorzugten Resistenzgens bzw. des besonders bevorzugten Antibiotikaresistenzgens in dem HCV-RNA-Konstrukt liegt vorzugsweise hinter der HCV 5' NTR, d.h. strangabwärts der 5' NTR bzw. strangaufwärts des HCV-Leserasters. Denkbar ist aber auch eine Insertion im Bereich der 3' NTR oder an anderer Stelle des HCV-Genoms oder -Subgenoms, z.B. innerhalb des Polyproteins.

[0021] Bei einer alternativen Ausführungsform des erfindungsgemäßen HCV-RNA-Konstrukts ist das selektierbare Markergen (Selektionsgen), insbesondere ein Antibiotikumresistenzgen, über ein Ribozym bzw. eine Erkennungsstelle für ein Ribozym mit der HCV-RNA bzw. der HCV-Genom- oder -Subgenomsequenz verbunden.

Damit geht der Vorteil einher, daß nach erfolgter Selektion derjenigen Zellen, in denen die HCV-RNA produktiv repliziert, in den daraus gewonnenen Zellklonen das Resistenzgen durch ribozymvermittelte Spaltung von der HCV-Subgenomsequenz abgetrennt werden kann, nämlich durch Aktivierung des einklonierten Ribozyms oder, im Fall eines Konstrukts mit einer Erkennungsstelle für ein Ribozym, durch Einschleusen des Ribozyms in die Zellen (z.B. mittels Transfektion eines Ribozymkonstrukts oder Infektion mit einem viralen Expressionsvektor, in den das entsprechende Ribozym eingesetzt wurde). Auf diese Weise wird ein authentisches HCV-Genom-Konstrukt ohne Resistenzgen erhalten, das zur Bildung authentischer infektiöser Viruspartikel befähigt ist.

[0022] Eine weitere bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen HCV-RNA-Konstrukts zeichnet sich dadurch aus, daß das Konstrukt anstelle des Markergens oder zusätzlich zu dem Markergen ein integriertes Reportergen aufweist.

Unter Reportergen wird im folgenden jedes Gen verstanden, dessen Anwesenheit sich nach Überführung in einen Zielorganismus leicht und im allgemeinen mit einfachen biochemischen oder auch histochemischen Methoden nachweisen läßt, d.h. das für ein Protein kodiert, welches auch in geringen Mengen einfach und zuverlässig mit den laborüblichen Meßmethoden nachgewiesen und quantifiziert werden kann.

Diese Variante des HCV-RNA-Konstrukts hat den Vorteil, daß der Umfang der Replikation dieses Konstrukts anhand des Reportergenprodukts einfach und schnell mit laborüblichen Methoden gemessen werden kann.

Das Reportergen ist vorzugsweise ein Gen aus der Gruppe bestehend aus den Luziferasegenen, dem CAT-Gen (Chloramphenicol-Acetyl-Transferase-Gen), dem lacZ-Gen (beta-Galaktosidasegen), den GFP-Genen (green-fluorescence-protein-Gen), dem GUS-Gen (Glukuronidasegen) oder dem SEAP-Gen (Sezemerte-Alkalische-Phosphatase-Gen). Diese Reportergene bzw. deren Produkte, nämlich die entsprechenden Reporterproteine, können z.B. mittels Fluoreszenz, Chemilumineszenz, colorimetrisch oder mit Hilfe immunologischer Methoden (z.B. ELISA) bestimmt werden.

Als Reportergen kommt aber auch ein Surrogatmarkergen in Betracht. Darunter sind in diesem Zusammenhang solche Gene zu verstehen, die für zelluläre Proteine, Nukleinsäuren oder — allgemein — für solche Funktionen kodieren, die einer von der Virusreplikation abhängigen Variation unterliegen, und die infolgedessen in denjenigen Zellen, in denen sich das HCV bzw. das HCV-RNA-Konstrukt vermehrt, entweder reprimiert oder aktiviert werden. Das heißt: die Reduktion bzw. Aktivierung dieser Funktion ist ein Ersatzmarker für die Virusreplikation bzw. die Replikation des HCV-RNA-Konstrukts. Eine Variante des erfindungsgemäßen HCV-RNA-Konstrukts ist folglich dadurch gekennzeichnet, daß dessen Replikation die Expression eines (zellulären) Surrogatmarkergens beeinflusst.

[0023] Das Reportergen und das selektierbare Markergen können derart räumlich in dem Konstrukt angeordnet sein, daß sie gemeinsam ein Fusionsprotein exprimieren. Hierbei besteht die vorteilhafte Möglichkeit, daß diese beiden Gene so in dem HCV-RNA-Konstrukt angeordnet sind, daß ihre beiden exprimierten Proteine zunächst über eine Schnittstelle für eine Protease (z.B. Ubiquitin) oder über ein selbstspaltendes Peptid (z.B. das 2A-Protein der Picornaviren) fusioniert sind und erst später proteolytisch wieder getrennt werden.

[0024] Ebenso gut können diese beiden Positionen aber auch derart getrennt voneinander liegen, daß beide Genprodukte separat exprimiert werden. (z.B. in der Reihenfolge: Marker- bzw. Resistenzgen — interne Ribosomenbindungsstelle — Reportergen).

Im Fall des Reportergens hat sich eine Ausführungsvariante besonders bewährt, bei der das Reportergen in das offene Leseraster des HCV-Genoms oder -Subgenoms einkloniert ist, und zwar derart, daß es erst nach einer proteolytischen Prozessierung in eine aktive Form überführt wird.

[0025] Das erfindungsgemäße HCV-RNA-Konstrukt für sich genommen kann in allen seinen Variationen ebenfalls für vielfältige Zwecke eingesetzt werden. Dazu gehören vor allem:

- Die Konstruktion attenuierter Hepatitis C Viren bzw. HCV-ähnlicher Partikel und deren Produktion in Zellkulturen:

Durch zufällige oder gezielt hervorgerufene Mutationen, beispielsweise Punktmutationen, Deletionen oder Insertionen, können attenuierte HCV- oder HCV-ähnliche Partikel erzeugt werden, d.h. Viren bzw. virusähnliche Partikel mit voller Replikationskompetenz aber verringerter bzw. fehlender Pathogenität. Solche attenuierte HCV- oder HCV-ähnliche Partikel sind insbesondere als Impfstoff einsetzbar.

- Die Konstruktion von HCV-RNA-Konstrukten mit integrierten Fremdgenen, beispielsweise zur Verwendung als leberzellspezifische Genfährten in der Genthherapie. Auf Grund des ausgeprägten Leberzelltropismus des HCV und der Möglichkeit, Teile des Genoms durch heterologe Sequenzen zu ersetzen, lassen sich HCV-RNA-Konstrukte herstellen, bei denen beispielsweise die Strukturproteine durch ein therapeutisch wirksames Gen ersetzt werden. Das so erhaltene HCV-RNA-Konstrukt wird in Zellen eingeschleust, vorzugsweise mittels Transfektion, die

die fehlenden HCV-Funktionen, beispielsweise die Strukturproteine, konstitutiv oder induzierbar exprimieren. Durch diese dem Fachmann unter dem Begriff der 'Transkomplementation' bekannte Technik lassen sich Viruspartikel erzeugen, in die das HCV-RNA-Konstrukt eingebaut wird. Die so erhaltenen Partikel können für die Infektion vorzugsweise von Leberzellen verwendet werden. In diesen wird das therapeutisch wirksame Fremdgen zur Expression gebracht und entfaltet damit seine therapeutische Wirkung.

- Das Auffinden permissiver Zellen, d.h. Zellen, in denen eine produktive Virusvermehrung erfolgt. Zu diesem Zweck wird entweder eines der vorgenannten HCV-RNA-Genomkonstrukte verwendet, das zur Bildung kompletter infektiöser Viren befähigt ist, oder es wird eines der vorgenannten HCV-Subgenom-Konstrukte eingesetzt, das allerdings zunächst gemäß vorgenanntem Beispiel in eine Zelllinie transfiziert wird, die die fehlenden Funktionen konstitutiv oder induzierbar exprimiert. In all diesen Fällen entstehen Viruspartikel, die zusätzlich zur HCV-Sequenz ein Resistenz- und/oder Reportergen tragen. Zum Auffinden von Zellen, in denen das HCV replizieren kann, werden diese Zellen mit den so hergestellten Viren infiziert und einer Antibiotikums Selektion unterzogen oder, in Abhängigkeit vom HCV-RNA-Konstrukt, mittels Nachweis der Expression des Reportergens untersucht. Da eine Antibiotikumsresistenz bzw. eine Expression des Reportergens nur dann nachweisbar ist, wenn das HCV-RNA-Konstrukt repliziert, müssen die so gefundenen Zellen permissiv sein. Auf diese Weise lassen sich nahezu beliebige Zelllinien oder primäre Zellkulturen hinsichtlich der Permissivität testen und auffinden.

[0026] Eine andere Variante des erfindungsgemäßen HCV-RNA-Konstrukts ist dadurch gekennzeichnet, daß das HCV-RNA-Konstrukt ein integriertes Fremdgen aufweist und dazu geeignet ist, dieses Fremdgen in eine Zielzelle einzuschleusen, die zur Expression dieses Fremdgens geeignet ist.

[0027] Eine weitere Variante des erfindungsgemäßen HCV-RNA-Konstrukts zeichnet sich dadurch aus, daß das HCV-RNA-Konstrukt Nukleotid- und/oder Aminosäure-Mutationen aufweist, zellkultur-adaptiert ist, mit hoher Effizienz repliziert und dadurch erhältlich ist, daß man ein erfindungsgemäßes Zellkultursystem gemäß Anspruch 1, bei dem das eingeschleuste HCV-spezifische Genmaterial ein erfindungsgemäßes HCV-RNA-Konstrukt mit Selektionsgen nach einem der Ansprüche 1 bis 6 ist, auf/in dem dem Selektionsgen entsprechenden Selektionsmedium kultiviert, daß man die gewachsenen Zellklone erntet, und daß man aus diesen Zellklonen das HCV-RNA-Konstrukt oder Teile davon isoliert.

Eine Weiterbildung dieser Variante besteht darin, daß man das aus den Zellklonen isolierte HCV-RNA-Konstrukt oder Teile davon wenigstens einmal erneut passagiert, nämlich in Zellen des erfindungsgemäßen Zellkultursystems nach Anspruch 11 einschleust und diese Zellen auf/in dem dem Selektionsgen entsprechenden Selektionsmedium zu kultivieren, daß man die gewachsenen Zellklone erntet, und daß man aus diesen Zellklonen das HCV-RNA-Konstrukt oder Teile davon isoliert.

[0028] Ein ganz bevorzugtes HCV-RNA-Konstrukt mit hoher und sehr hoher Replikationseffizienz und infolgedessen sehr guter Eignung für die praktische Anwendung ist dadurch gekennzeichnet, daß es einen oder mehrere oder alle der in Tabelle 3 aufgelisteten Aminosäure- bzw. Nukleotidaustausche und/oder einen oder mehrere der nachfolgend aufgelisteten Aminosäureaustausche aufweist: 1283 arg -> gly, 1383 glu -> ala, 1577 lys -> arg, 1609 lys -> glu, 1936 pro -> ser, 2163 glu -> gly, 2330 lys -> glu, 2442 ile -> val. (Die Zahlen beziehen sich auf die Aminosäurepositionen des Polyproteins des HCV-Isolats con1, siehe Tabelle 1).

[0029] Eine bevorzugte Variante des erfindungsgemäßen Zellkultursystems, die sich in der Praxis sehr gut bewährt hat, ist unter der Nummer DSM ACC2394 (Laborbezeichnung HuBI 9-13) bei der DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH in Braunschweig, Deutschland, hinterlegt.

[0030] Mit dem erfindungsgemäßen Zellkultursystem wird erstmals ein in-vitro-System bereit gestellt, in dem HCV-RNA intrazellulär, autonom und in ausreichend großen Mengen repliziert und exprimiert wird, so daß eine quantitative Bestimmung sowohl der HCV-RNA-Mengen als auch der HCV-spezifischen Proteine mit konventionellen und zuverlässig genauen biochemischen Meßmethoden durchgeführt werden kann. Das heißt: es steht erstmals ein annähernd authentisches zellgestütztes ("cell-based") HCV-Replikationssystem zur Verfügung, das für die Entwicklung und Erprobung von antiviralen Pharmazeutika dringend benötigt wird. Dieses Testsystem bietet nun die Möglichkeit, potentielle Angriffsziele für eine wirksame HCV-spezifische Therapie zu identifizieren und HCV-spezifische Chemotherapeutika zu entwickeln und zu evaluieren.

[0031] Die Erfindung basiert auf der überraschenden Erkenntnis, daß eine effiziente Replikation der HCV-RNA nur dann in Zellen stattfindet, wenn diese mit einem HCV-RNA-Konstrukt transfiziert wurden, das mindestens die 5' und die 3' nicht-translatierten Regionen (NTR) und die Nichtstrukturproteine (NS) 3 bis 5B umfaßt und zusätzlich ein selektierbares Markergen (Selektionsgen) aufweist. Offensichtlich sind die Strukturgene für den Ablauf der Replikation ohne wesentliche Bedeutung, während andererseits eine effiziente Replikation der HCV-RNA anscheinend nur dann stattfindet, wenn die transfizierten Zellen einem permanenten Selektionsdruck unterzogen werden, der durch das mit der HCV-RNA verbundene selektierbare Markergen (Selektionsgen) vermittelt wird. Das Markergen (Selektionsgen) scheint somit einerseits die Selektion derjenigen Zellen zu provozieren, in denen die HCV-RNA produktiv repliziert, und andererseits scheint es die Effizienz der RNA-Replikation wesentlich zu steigern.

[0032] Das erfindungsgemäße Zellkultursystem in allen seinen Variationen kann für vielfältige Zwecke eingesetzt werden. Diese umfassen:

- Das Auffinden antiviral wirksamer Substanzen. Dies können beispielsweise sein: organische Verbindungen, die unmittelbar oder mittelbar in die Virusvermehrung eingreifen (z.B. Inhibitoren der viralen Proteasen, der NS3-Helikase, der NS5B RNA-abhängigen RNA Polymerase), antisense Oligonukleotide, die an eine beliebige Zielsequenz innerhalb des HCV-RNA-Konstrukts (z.B. die 5' NTR) hybridisieren und unmittelbar oder mittelbar zu einer Beeinflussung der Virusvermehrung führen z.B. auf Grund einer Reduktion der Translation des HCV-Polypeptids oder Ribozyme, die eine beliebige HCV-RNA-Sequenz spalten und damit die Virusreplikation beeinträchtigen.
- Die Evaluierung jeglicher Art antiviral wirksamer Substanzen in Zellkultur. Solche Substanzen können beispielsweise mittels 'rational drug design' oder 'highthroughput screening' am isolierten gereinigten Enzym gefunden werden. Unter Evaluierung sind vor allem die Bestimmung der inhibitorischen Eigenschaften der entsprechenden Substanz sowie deren Wirkungsmechanismus zu verstehen.
- Die Identifikation neuer Angriffsziele, viralen oder zellulären Ursprungs, für eine HCV-spezifische antivirale Therapie. Ist beispielsweise ein zelluläres Protein essentiell für die Virusreplikation, kann mittels Hemmung dieses zellulären Proteins die Virusreplikation ebenfalls beeinflusst werden. Das Auffinden solcher auxiliären Faktoren ist mit dem erfindungsgemäßen System ebenfalls möglich.
- Der Einsatz für die Resistenzbestimmung. Es ist anzunehmen, daß auf Grund der hohen Mutationsrate des HCV-Genoms Therapieresistenzen auftreten. Solche Resistenzen, die gerade bei der klinischen Zulassung einer Substanz von großer Bedeutung sind, lassen sich mit dem erfindungsgemäßen Zellkultursystem ermitteln. Zelllinien in denen sich das HCV-RNA-Konstrukt bzw. das HCV-Genom oder - Subgenom repliziert, werden mit steigenden Konzentrationen der entsprechenden Substanz inkubiert und die Replikation der viralen RNA wird entweder anhand eines eingebrachten Reporters oder durch qualitative oder quantitative Bestimmung der viralen Nukleinsäuren oder Proteine bestimmt. Resistenz ist dann gegeben, wenn bei normaler Wirkstoffkonzentration keine Hemmung der Replikation zu beobachten ist. Durch Reklonierung der HCV-RNA (z.B. mittels RT-PCR) und Sequenzanalyse können die für Therapieresistenz verantwortlichen Nukleotid- bzw. Aminosäureaustausche ermittelt werden. Durch Einklonieren der/des entsprechenden Austausch/s in das Ursprungs-konstrukt kann deren Kausalität für die Therapieresistenz bewiesen werden.
- Die Produktion von authentischen Virusproteinen (Antigene) für die Entwicklung und/oder Evaluierung von Diagnostika. Das erfindungsgemäße Zellkultursystem erlaubt auch die Expression von HCV-Antigenen in Zellkulturen. Diese Antigene können prinzipiell auch für den Aufbau diagnostischer Nachweisverfahren eingesetzt werden.
- Die Produktion von HCV Viren und virus-ähnlichen Partikeln insbesondere zur Entwicklung oder Herstellung von Therapeutika und Impfstoffen sowie für diagnostische Zwecke. Insbesondere zellkultur-adaptierte vollständige HCV-Genome, die mit dem erfindungsgemäßen Zellkultursystem hergestellt werden können, sind in der Lage, mit hoher Effizienz in Zellkulturen zu replizieren. Diese Genome besitzen alle Funktionen des HCV und sind deshalb in der Lage infektiöse Viren zu produzieren.

[0033] Die Erfindung betrifft deshalb auch die Verwendung eines erfindungsgemäßen Zellkultursystems und/oder eines erfindungsgemäßen HCV-RNA-Konstrukts zur Herstellung und/oder Evaluierung und/oder Testung von Therapeutika und/oder Diagnostika zur Behandlung von insbesondere HCV-Infektionen sowie zur Herstellung eines Impfstoffes gegen HCV-Infektionen.

[0034] Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung eines erfindungsgemäßen HCV-RNA-Konstrukts zur Herstellung einer leberzellspezifischen Genfähe für die Gentherapie.

[0035] Das erfindungsgemäße Zellkultursystem erlaubt auch das gezielte Auffinden von HCV-RNA-Konstrukten, bei denen es auf Grund von Mutationen, die sich entweder zufällig im Rahmen der HCV-RNA-Replikation ereignen oder die gezielt in das Konstrukt eingeführt werden, zu einer Steigerung der Replikationseffizienz kommt. Solche Mutationen, die zu einer Veränderung der Replikation des HCV-RNA-Konstrukts führen, sind dem Fachmann als adaptive Mutationen bekannt.

Die Erfindung umfaßt deshalb auch die Verwendung eines erfindungsgemäßen HCV-RNA-Konstrukts nach einem der Ansprüche 1 bis 6 zur Gewinnung von zellkultur-adaptierten Mutanten eines erfindungsgemäßen HCV-RNA-Konstrukts gemäß vorstehender Beschreibung, wobei die Mutanten gegenüber dem originären HCV-RNA-Konstrukt eine erhöhte Replikationseffizienz aufweisen. Diese Verwendung ist dadurch gekennzeichnet, daß man ein Zellkultursystem gemäß Anspruch 11 oder 12, das HCV-RNA-Konstrukte gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 enthält, auf/in dem dem Selektionsgen entsprechenden Selektionsmedium kultiviert, daß man die gewachsenen Zellklone erntet, und daß man aus diesen Zellklonen die HCV-RNA-Konstrukte oder Teile davon isoliert. Eine vorteilhafte Variante dieser Verwendung besteht darin, daß man die isolierten HCV-RNA-Konstrukte wenigstens einmal erneut passagiert, nämlich in Zellen eines erfindungsgemäßen Zellkultursystems einschleust und diese auf/in dem dem Selektionsgen entsprechenden Selektionsmedium kultiviert, die gewachsenen Zellklone erntet und aus diesen Zellklonen die HCV-RNA-Konstrukte

oder Teile davon isoliert. Mit dieser Verfahrensvariante kann der Grad der adaptiven Mutationen und damit der Grad der Replikationseffizienz in den betreffenden HCV-RNA-Konstrukten noch gesteigert werden.

Die erfindungsgemäß hergestellten zellkultur-adaptierten HCV-RNA-Konstrukte mit hoher Replikationseffizienz sind dadurch gekennzeichnet, daß sie durch Nukleotid- und/oder Aminosäureaustausche von einem HCV-RNA-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1 bis 6 ableitbar sind und daß sie mit einem der beiden vorstehend genannten Herstellungsverfahren erhältlich sind.

[0036] Die Erfindung umfaßt desweiteren die Verwendung eines HCV-RNA-Konstrukts nach einem der Ansprüche 1 bis 6 zur Herstellung von Mutanten eines HCV-RNA-Vollängengenoms oder eines HCV-RNA-Teilgenoms oder eines beliebigen HCV-RNA-Konstrukts mit im Vergleich zu dem ursprünglichen HCV-RNA-Vollängengenom oder - Teilgenom oder HCV-RNA-Konstrukt erhöhter Replikationseffizienz. Diese Verwendung ist dadurch gekennzeichnet, daß man gemäß Anspruch 16 oder Anspruch 17 eine zellkultur-adaptierte Mutante des HCV-RNA-Konstrukts herstellt, daß man die Nukleotid- und Aminosäuresequenz dieser Mutante bestimmt und durch Vergleich mit der Nukleotid- und Aminosäuresequenz des ursprünglichen HCV-RNA-Konstrukts die Art, Anzahl und Positionen der Nukleotid- und Aminosäuremutationen bestimmt, und daß man diese Mutationen entweder durch gezielte Mutagenese oder durch Austausch von Sequenzabschnitten, die die betreffenden Mutationen enthalten, in ein (isoliertes) HCV-Vollängengenom oder ein HCV-Teilgenom oder ein beliebiges HCV-RNA-Konstrukt einführt.

[0037] Zum Nachweis bzw. zur Verifizierung derjenigen Mutationen, die tatsächlich eine Veränderung der Replikation und insbesondere eine Replikationssteigerung bewirken, kann ein Test durchgeführt werden, bei dem die bestimmten Nukleotid- und/oder Aminosäureaustausche in das ursprüngliche HCV-RNA-Konstrukt eingeführt und dieses wiederum in Zellkultur eingeschleust wird. Wenn die eingeführte Mutation tatsächlich zu einer Steigerung der Replikation führt, sollte im Fall eines HCV-RNA-Konstrukts mit selektierbarem Markergen die Zahl der resistenten Zellklone bei dem künstlich mutierten Konstrukt deutlich höher sein als bei dem unbehandelten Konstrukt. Im Fall eines Konstrukts mit einem Reportergen sollte die Aktivität bzw. Menge des Reporters bei dem künstlich mutierten Konstrukt deutlich höher sein als bei dem unbehandelten.

[0038] Diese zellkultur-adaptierten HCV-RNA-Konstrukte können dazu verwendet werden, beliebige HCV-RNA-Konstrukte oder HCV-Vollängen- oder Teilgenome mit erhöhter Replikationseffizienz herzustellen. Dabei können sowohl Konstrukte mit einem selektierbaren Resistenzgen als auch Konstrukte ohne ein solches bzw. mit einem nichtselektierbaren Reportergen (z.B. Luziferase) hergestellt werden, denn aufgrund der sehr hohen Replikationseffizienz des zellkultur-adaptierten HCV-RNA-Konstrukts kann dessen Replikation auch in nicht-selektionierten Zellen nachgewiesen werden.

Die erfindungsgemäßen zellkultur-adaptierten Mutanten eines HCV-RNA-Konstrukts oder eines HCV-Vollängengenoms oder eines HCV-Teilgenoms mit im Vergleich zu dem ursprünglichen HCV-RNA-Konstrukt oder dem ursprünglichen HCV-Vollängengenom erhöhter Replikationseffizienz, sind dadurch charakterisiert, daß sie mit einem Verfahren erhältlich sind, bei dem man in einem zellkultur-adaptierten HCV-RNA-Konstrukt durch Sequenzanalyse und Sequenzvergleich die Art und Anzahl der Mutationen bestimmt und diese Mutationen in ein HCV-RNA-Konstrukt, insbesondere in ein HCV-RNA-Konstrukt gemäß einem der Ansprüche 4 bis 19, oder in ein (isoliertes) HCV-RNA-Vollängengenom einführt, entweder durch gezielte Mutagenese oder durch Austausch von Sequenzabschnitten, die die betreffenden Mutationen enthalten.

[0039] Nicht zuletzt betrifft die Erfindung auch die Verwendung eines HCV-RNA-Konstrukts nach einem der Ansprüche 1 bis 10 zur Erzeugung von Hepatitis C Viruspartikeln oder virus-ähnlichen Partikeln.

Besondere Eigenschaften der in den Sequenzprotokollen angegebenen Sequenzen:

[0040]

SEQ ID-NO: 1

Name: I389/Core-3'/wt

Aufbau (Nukleotidpositionen):

1. 1-341: HCV 5' nicht-translatierte Region
2. 342-1193: HCV Core Protein-Neomycin Phosphotransferase Fusionsprotein; selektionierbarer Marker
3. 1202-1812: Interne Ribosomenbindungsstelle des Encephalomyokarditis Virus; erlaubt die Translation des dahinterliegenden HCV offenen Leserasters
4. 1813-10842: HCV Polyprotein von Core bis Nichtstrukturprotein 5B
5. 1813-2385: HCV Core Protein; Strukturprotein
6. 2386-2961: Hüllprotein 1 (envelope protein 1); Strukturprotein
7. 2962-4050: Hüllprotein 2 (envelope protein 2); Strukturprotein
8. 4051-4239: Protein p7

EP 1 043 399 B9 (W1B1)

9. 4240-4890: Nichtstrukturprotein 2 (NS2); HCV NS2-3 Protease
10. 4891-6783: Nichtstrukturprotein 3 (NS3); HCV NS3 Protease/Helikase
11. 6784-6945: Nichtstrukturprotein 4A (NS4A); NS3 Protease Kofaktor
12. 6946-7728: Nichtstrukturprotein 4B (NS4B)
13. 7729-9069: Nichtstrukturprotein 5A (NS5A)
14. 9070-10842: Nichtstrukturprotein 5B (NS5B); RNA-abhängige RNA-Polymerase
15. 10846-11076: HCV 3' nicht-translatierte Region

SEQ ID-NO: 2

Name: I337/NS2-3'/wt

Aufbau (Nukleotidpositionen):

1. 1-341: HCV 5' nicht-translatierte Region
2. 342-1181: HCV Core Protein-Neomycin Phosphotransferase Fusionsprotein; selektionierbarer Marker
3. 1190-1800: Interne Ribosomenbindungsstelle des Encephalomyokarditis Virus; erlaubt die Translation des dahinterliegenden HCV offenen Leserasters
4. 1801-8403: HCV Polyprotein von Nichtstrukturprotein 2 bis Nichtstrukturprotein 5B
5. 1801-2451: Nichtstrukturprotein 2 (NS2); HCV NS2-3 Protease
6. 2452-4344: Nichtstrukturprotein 3 (NS3); HCV NS3 Protease/Helikase
7. 4345-4506: Nichtstrukturprotein 4A (NS4A); NS3 Protease Kofaktor
8. 4507-5289: Nichtstrukturprotein 4B (NS4B)
9. 5290-6630: Nichtstrukturprotein 5A (NS5A)
10. 6631-8403: Nichtstrukturprotein 5B (NS5B); RNA-abhängige RNA-Polymerase
11. 8407-8637: HCV 3' nicht-translatierte Region

SEQ ID-NO: 3

Name: I389/NS3-3'/wt

Aufbau (Nukleotidpositionen):

1. 1-341: HCV 5' nicht-translatierte Region
2. 342-1193: HCV Core Protein-Neomycin Phosphotransferase Fusionsprotein; selektionierbarer Marker
3. 1202-1812: Interne Ribosomenbindungsstelle des Encephalomyokarditis Virus; erlaubt die Translation des dahinterliegenden HCV offenen Leserasters
4. 1813-7767: HCV Polyprotein von Nichtstrukturprotein 3 bis Nichtstrukturprotein 5B
5. 1813-3708: Nichtstrukturprotein 3 (NS3); HCV NS3 Protease/Helikase
6. 3709-3870: Nichtstrukturprotein 4A (NS4A); NS3 Protease Kofaktor
7. 3871-4653: Nichtstrukturprotein 4B (NS4B)
8. 4654-5994: Nichtstrukturprotein 5A (NS5A)
9. 5995-7767: Nichtstrukturprotein 5B (NS5B); RNA-abhängige RNA-Polymerase
10. 7771-8001: HCV 3' nicht-translatierte Region

SEQ ID-NO: 4

Name: I337/NS3-3'/wt

Aufbau (Nukleotidpositionen):

1. 1-341: HCV 5' nicht-translatierte Region
2. 342-1181: HCV Core Protein-Neomycin Phosphotransferase Fusionsprotein; selektionierbarer Marker
3. 1190-1800: Interne Ribosomenbindungsstelle des Encephalomyokarditis Virus; erlaubt die Translation des dahinterliegenden HCV offenen Leserasters
4. 1801-7758: HCV Polyprotein von Nichtstrukturprotein 3 bis Nichtstrukturprotein 5B
5. 1801-3696: Nichtstrukturprotein 3 (NS3); HCV NS3 Protease/Helikase
6. 3697-3858: Nichtstrukturprotein 4A (NS4A); NS3 Protease Kofaktor
7. 3859-4641: Nichtstrukturprotein 4B (NS4B)
8. 4642-5982: Nichtstrukturprotein 5A (NS5A)
9. 5983-7755: Nichtstrukturprotein 5B (NS5B); RNA-abhängige RNA-Polymerase

EP 1 043 399 B9 (W1B1)

10. 7759-7989: HCV 3' nicht-translatierte Region

SEQ ID-NO: 5

Name: I389/NS2-3'/wt

Aufbau (Nukleotidpositionen):

1. 1-341: HCV 5' nicht-translatierte Region
2. 342-1193: HCV Core Protein-Neomycin Phosphotransferase Fusionsprotein; selektionierbarer Marker
3. 1202-1812: Interne Ribosomenbindungsstelle des Encephalomyokarditis Virus; erlaubt die Translation des dahinterliegenden HCV offenen Leserasters
4. 1813-8418: HCV Polyprotein von Nichtstrukturprotein 2 bis Nichtstrukturprotein 5B
5. 1813-2463: Nichtstrukturprotein 2 (NS2); HCV NS2-3 Protease
6. 2464-4356: Nichtstrukturprotein 3 (NS3); HCV NS3 Protease/Helikase
7. 4357-4518: Nichtstrukturprotein 4A (NS4A); NS3 Protease Kofaktor
8. 4519-5301: Nichtstrukturprotein 4B (NS4B)
9. 5302-6642: Nichtstrukturprotein 5A (NS5A)
10. 6643-8415: Nichtstrukturprotein 5B (NS5B); RNA-abhängige RNA-Polymerase
11. 8419-8649: HCV 3' nicht-translatierte Region

SEQ ID-NO: 6

Name: I389/NS3-3'/9-13F

Aufbau (Nukleotidpositionen):

1. 1-341: HCV 5' nicht-translatierte Region
2. 342-1193: HCV Core Protein-Neomycin Phosphotransferase Fusionsprotein; selektionierbarer Marker
3. 1202-1812: Interne Ribosomenbindungsstelle des Encephalomyokarditis Virus; erlaubt die Translation des dahinterliegenden HCV offenen Leserasters
4. 1813-7767: HCV Polyprotein von Nichtstrukturprotein 3 bis Nichtstrukturprotein 5B der zellkultur-adaptierten Mutante 9-13F
5. 1813-3708: Nichtstrukturprotein 3 (NS3); HCVNS3 Protease/Helikase
6. 3709-3870: Nichtstrukturprotein 4A (NS4A); NS3 Protease Kofaktor
7. 3871-4653: Nichtstrukturprotein 4B (NS4B)
8. 4654-5994: Nichtstrukturprotein 5A (NS5A)
9. 5995-7767: Nichtstrukturprotein 5B (NS5B); RNA-abhängige RNA-Polymerase 7771-8001: HCV 3' nicht-translatierte Region

SEQ ID-NO: 7

Name: I389/Core-3'/9-13F

Aufbau (Nukleotidpositionen):

1. 1-341: HCV 5' nicht-translatierte Region
2. 342-1193: HCV Core Protein-Neomycin Phosphotransferase Fusionsprotein; selektionierbarer Marker
3. 1202-1812: Interne Ribosomenbindungsstelle des Encephalomyokarditis Virus; erlaubt die Translation des dahinterliegenden HCV offenen Leserasters
4. 1813-10842: HCV Polyprotein von Core bis Nichtstrukturprotein 5B der zellkultur-adaptierten Mutante 9-13F
5. 1813-2385: HCV Core Protein; Strukturprotein
6. 2386-2961: Hüllprotein 1 (envelope protein 1); Strukturprotein
7. 2962-4050: Hüllprotein 2 (envelope protein 2); Strukturprotein
8. 4051-4239: Protein p7
9. 4240-4890: Nichtstrukturprotein 2 (NS2); HCV NS2-3 Protease
10. 4891-6783: Nichtstrukturprotein 3 (NS3); HCV NS3 Protease/Helikase
11. 6784-6945: Nichtstrukturprotein 4A (NS4A); NS3 Protease Kofaktor
12. 6946-7728: Nichtstrukturprotein 4B (NS4B)
13. 7729-9069: Nichtstrukturprotein 5A (NS5A)
14. 9070-10842: Nichtstrukturprotein 5B (NS5B); RNA-abhängige RNA-Polymerase

EP 1 043 399 B9 (W1B1)

15. 10846-11076: HCV 3' nicht-translatierte Region

SEQ ID-NO: 8

Name: I389/NS3-3'/5.1

Aufbau (Nukleotidpositionen):

1. 1-341: HCV 5' nicht-translatierte Region
2. 342-1193: HCV Core Protein-Neomycin Phosphotransferase Fusionsprotein; selektionierbarer Marker
3. 1202-1812: Interne Ribosomenbindungsstelle des Encephalomyokarditis Virus; erlaubt die Translation des dahinterliegenden HCV offenen Leserasters
4. 1813-7767: HCV Polyprotein von Nichtstrukturprotein 3 bis Nichtstrukturprotein 5B der zellkultur-adaptierten Mutante 5.1

5. 1813-3708: Nichtstrukturprotein 3 (NS3); HCV NS3 Protease/Helikase
6. 3709-3870: Nichtstrukturprotein 4A (NS4A); NS3 Protease Kofaktor
7. 3871-4653: Nichtstrukturprotein 4B (NS4B)
8. 4654-5994: Nichtstrukturprotein 5A (NS5A)
9. 5995-7767: Nichtstrukturprotein 5B (NS5B); RNA-abhängige RNA-Polymerase 7771-8001: HCV 3' nicht-translatierte Region

SEQ ID-NO: 9

Name: I389/Core-3'/5.1

Aufbau (Nukleotidpositionen):

1. 1-341: HCV 5' nicht-translatierte Region
2. 342-1193: HCV Core Protein-Neomycin Phosphotransferase Fusionsprotein; selektionierbarer Marker
3. 1202-1812: Interne Ribosomenbindungsstelle des Encephalomyokarditis Virus; erlaubt die Translation des dahinterliegenden HCV offenen Leserasters
4. 1813-10842: HCV Polyprotein von Core bis Nichtstrukturprotein 5B der zellkultur-adaptierten Mutante 5.1

5. 1813-2385: HCV Core Protein; Strukturprotein
6. 2386-2961: Hüllprotein 1 (envelope protein 1); Strukturprotein
7. 2962-4050: Hüllprotein 2 (envelope protein 2); Strukturprotein
8. 4051-4239: Protein p7
9. 4240-4890: Nichtstrukturprotein 2 (NS2); HCV NS2-3 Protease
10. 4891-6783: Nichtstrukturprotein 3 (NS3); HCV NS3 Protease/Helikase
11. 6784-6945: Nichtstrukturprotein 4A (NS4A); NS3 Protease Kofaktor
12. 6946-7728: Nichtstrukturprotein 4B (NS4B)
13. 7729-9069: Nichtstrukturprotein 5A (NS5A)
14. 9070-10842: Nichtstrukturprotein 5B (NS5B); RNA-abhängige RNA-Polymerase
15. 10846-11076: HCV 3' nicht-translatierte Region

SEQ ID-NO: 10

Name: I389/NS3-3'/19

Aufbau (Nukleotidpositionen):

1. 1-341: HCV 5' nicht-translatierte Region
2. 342-1193: HCV Core Protein-Neomycin Phosphotransferase Fusionsprotein; selektionierbarer Marker
3. 1202-1812: Interne Ribosomenbindungsstelle des Encephalomyokarditis Virus; erlaubt die Translation des dahinterliegenden HCV offenen Leserasters
4. 1813-7767: HCV Polyprotein von Nichtstrukturprotein 3 bis Nichtstrukturprotein 5B der zellkultur-adaptierten Mutante 19

5. 1813-3708: Nichtstrukturprotein 3 (NS3); HCV NS3 Protease/Helikase
6. 3709-3870: Nichtstrukturprotein 4A (NS4A); NS3 Protease Kofaktor
7. 3871-4653: Nichtstrukturprotein 4B (NS4B)
8. 4654-5994: Nichtstrukturprotein 5A (NS5A)
9. 5995-7767: Nichtstrukturprotein 5B (NS5B); RNA-abhängige RNA-Polymerase 7771-8001: HCV 3'

nicht-translatierte Region

SEQ ID-NO: 11

Name: I389/Core-3'/19

Aufbau (Nukleotidpositionen):

1. 1-341: HCV 5' nicht-translatierte Region
2. 342-1193: HCV Core Protein-Neomycin Phosphotransferase Fusionsprotein; selektionierbarer Marker
3. 1202-1812: Interne Ribosomenbindungsstelle des Encephalomyokarditis Virus; erlaubt die Translation des dahinterliegenden HCV offenen Leserasters
4. 1813-10842: HCV Polyprotein von Core bis Nichtstrukturprotein 5B der zellkultur-adaptierten Mutante 19
5. 1813-2385: HCV Core Protein; Strukturprotein
6. 2386-2961: Hüllprotein 1 (envelope protein 1); Strukturprotein
7. 2962-4050: Hüllprotein 2 (envelope protein 2); Strukturprotein
8. 4051-4239: Protein p7
9. 4240-4890: Nichtstrukturprotein 2 (NS2); HCV NS2-3 Protease
10. 4891-6783: Nichtstrukturprotein 3 (NS3); HCV NS3 Protease/Helikase
11. 6784-6945: Nichtstrukturprotein 4A (NS4A); NS3 Protease Kofaktor
12. 6946-7728: Nichtstrukturprotein 4B (NS4B)
13. 7729-9069: Nichtstrukturprotein 5A (NS5A)
14. 9070-10842: Nichtstrukturprotein 5B (NS5B); RNA-abhängige RNA-Polymerase
15. 10846-11076: HCV 3' nicht-translatierte Region

[0041] Die Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen und dazugehörigen Tabellen und Figuren näher erläutert. Die erwähnten Figuren zeigen

Fig. 1 A: Die Struktur eines erfindungsgemäßen HCV-RNA-Konstrukts
Ganz oben ist eine schematische Darstellung der Struktur des kompletten parentalen HCV-Genoms gegeben mit den Positionen der Gene für die Spaltungsprodukte core, E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B innerhalb des Polyproteins, und den 5' und 3' nichttranslatierten Regionen (5' NTR und 3' NTR) — als Horizontalbalken dargestellt —, und mit den beiden für die Erzeugung der Subgenom-Konstrukte ausgewählten Positionen, nämlich der Position der 'GDD-katalytischen Domäne' der NS5B RNA Polymerase (GDD) und der Position der 3' Grenze der HCV-IRES (Nukleotidpositionen 1 bis 377 bzw. 1 bis 389) — oberhalb des Genomschemas eingezeichnet —. Die Zahlen unterhalb des Genomschemas bezeichnen die entsprechenden Nukleotidpositionen.
Darunter sind schematische Darstellungen der Strukturen zweier erfindungsgemäßer, modifizierter HCV-RNA-Konstrukte (Subgenom) gezeigt, bestehend aus der 5' HCV-IRES, dem Neomycinphosphotransferasegen (Neo^R), der EMCV-IRES (E-I) und den HCV Sequenzen von NS2 bzw. NS3 bis zum authentischen 3' Ende. Die Position der das NS5B Polymerase GDD-Motiv umfassenden 10 Aminosäuren-Deletion ist jeweils mit einem Dreieck (Δ) markiert.

Fig. 1 B: Das Ergebnis einer denaturierenden Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese zum Nachweis von replizierter Plusstrang-RNA in transfizierten subpassagierten Huh-7 Zellklonen. Die Positionen der HCV-spezifischen RNAs (Pfeile) und der 28S rRNA sind rechts von Spur 12 angegeben, die Größen (Anzahlen der Nukleotide) der RNA-Marker (M) sind links von Spur 1 angegeben.

Fig. 1 C: Das Ergebnis eines PCR-Tests mit nachfolgendem Southern-Blot zum Nachweis der Abwesenheit von integrierter Replikon-DNA in den meisten der selektierten Zellklone.
Spuren 1 und 2 zeigen die Positivkontrollen, Spur 13 die Negativ-Kontrolle. Die Zahlenangaben links der Spur 1 bezeichnen die Größe der Nukleotid-Marker-Moleküle.

Fig. 2 A: Das Ergebnis eines PCR-Tests mit nachfolgendem Southern-Blot zum sensitiven Ausschluß integrierter Replikon-DNA (Plasmid Moleküle I₃₇₇/NS3-3'/wt) in einem HCV-RNA-Konstrukt-haltigen Zellklon (9-13). Die Spuren 7 bis 11 repräsentieren das Ergebnis einer Titration von DNA-Molekülen des Konstrukts I₃₇₇/NS3-3'/wt ohne Zugabe von Gesamt-DNA des Zellklons 9-13 und die Spuren 2 - 6 repräsentieren die gleichen Plasmidmoleküle mit Zugabe von jeweils 1 µg 9-13 DNA vor der PCR (zwecks Ausschluß eines Inhibitors der PCR in der DNA-Präparation). Spur 13 repräsentiert die Negativ-Kontrolle (PCR ohne

DNA-Sonde). Spur 1 zeigt das Ergebnis, das mit einem µg Gesamt-DNA des Zellkons 9-13 erhalten wurde.

Fig. 2 B: Das Ergebnis eines Northern-Blot-Tests zur Quantifizierung von HCV Plus- und Minusstrang RNA. Die Pfeile markieren die Positionen von Replikon-RNA. Die "plus" und "minus" -Abgaben bezeichnen die positive (plus) bzw. negative (minus) Polarität der RNA-Kontrollen, die auf das Gel aufgetragen wurden. "Minusstrang" und "Plusstrang" bezeichnen die Spezifität der radioaktiven RNA-Sonden.

Fig. 2 C: Ergebnis einer Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese nach radioaktiver Markierung der intrazellulär replizierten HCV-RNA zum Nachweis der Resistenz der HCV-RNA-Replikation gegen Dactinomycin.

Fig. 3 A: Nachweis von HCV-spezifischen Antigenen in den selektierten Zellklonen mittels Immunopräzipitation nach metabolischer Radioaktivmarkierung. Die Spuren 7 - 9 repräsentieren authentische Größenmarker (die nach transienter Expression eines HCV-RNA-Konstrukts in Huh-7-Zellen erhalten wurden); identifizierte HCV-Proteine sind am linken Rand von Spur 1 markiert, die Molekulargewichte (in Kilodalton) sind am rechten Rand von Spur 9 angegeben.

Fig. 3 B: Ergebnisse eines Immunfluoreszenztests zum Nachweis der subzellulären Lokalisation von HCV Antigenen.

Fig. 4 : Schematische Darstellung der Struktur eines erfindungsgemäßen selektierbaren HCV-RNA-Konstrukts (komplettes Genom) bestehend aus der 5' HCV-IRES, dem Neomycinphosphotransferasegen (NeoR), einem heterologen IRES-Element, z.B. des Encephalomyocarditisvirus (E-I), dem vollständigen HCV-Leseraster und der authentischen 3' NTR.

Fig. 5: Schematische Darstellung der Struktur von HCV-RNA-Konstrukten mit insertiertem Antibiotikumresistenzgen **(A)** innerhalb der für das Polyprotein kodierenden Nukleotidsequenz (monocistronische RNA), und **(B)** innerhalb der 3' NTR (bicistronische RNA).

Fig. 6: Schematische Darstellung der Struktur von HCV-RNA-Konstrukten mit insertiertem Reportergen **(A)** als Teil eines HCV-Replikons von NS3 bis NS5B; — das Reporterprotein wird letztendlich durch virale oder durch zelluläre Proteasen aus dem Polyprotein gespalten und das selektierbare Markergen (Selektionsgen) bzw. das Resistenzgen durch Kontransfektion in die Zellen einschleust, **(B)** als Teil eines Fusionsgens aus Resistenz- und Reportergen (z.B. für die Neomycinphosphotransferase und green fluorescent Protein) **(C)** als Teil eines Replikons aus Resistenz- und Reportergen (z.B. für die Neomycinphosphotransferase und das green fluorescent Protein), die über eine Nukleotidsequenz verbunden sind, welche für eine Aminosäuresequenz kodiert (schraffierter Bereich), die von einer Protease gespalten werden kann oder die über eine selbstspaltende (autokatalytische) Aktivität verfügt, **(D)** als unabhängiges Gen (hier green fluorescent protein), das von einer eigenen internen Ribosomenbindungsstelle (IRES) aus exprimiert wird; — das Resistenzgen (hier: Neomycinphosphotransferase-Gen) wird davon unabhängig ebenfalls von einer eigenen internen Ribosomenbindungsstelle (IRES) aus exprimiert (polycistronisches Konstrukt).

Fig. 7: Schematische Darstellung der Struktur eines HCV-RNA-Konstrukts bei dem das Resistenzgen über ein Ribozym bzw. eine Erkennungsstelle für ein Ribozym mit der HCV-RNA-Sequenz verbunden ist. Die dicken Linien stellen die HCV 5' und 3' NTRs dar, E-I ist eine heterologe interne Ribosomenbindungsstelle, die für die Expression des Resistenzgens notwendig ist, und das graue Quadrat stellt das Ribozym bzw. eine Erkennungsstelle für ein Ribozym dar.

Fig. 8: Schematische Darstellung der Struktur eines HCV-RNA-Konstrukts mit Resistenzgen und integriertem Fremdgen.

Fig. 9: Methodisches Vorgehen zum Vergleich der spezifischen Infektiosität (ausgedrückt als Anzahl gebildeter Zellkolonien) von Gesamt-RNA versus in vitro Transkripte. HCV-RNA wird mittels in vitro Transkription eines entsprechenden RNA-Konstrukts hergestellt und durch Messung der optischen Dichte bei 260 nm (OD 260 nm) quantifiziert. Eine definierte Anzahl dieser Moleküle wird mit einer bestimmten Menge Gesamt-RNA von naiven Huh-7 Zellen gemischt und diese Mischung mit Hilfe der Elektroporation in naive Huh-7 Zellen eingeschleust. Parallel dazu wird die Gesamt-RNA eines Zellklons, der mit der in Figur 1

beschriebenen Methode hergestellt wurde, mit einem im Stand der Technik bekannten Verfahren isoliert und die Menge der darin enthaltenen HCV-RNA mittels Northernblot unter Verwendung einer HCV-spezifischen RNA-Sonde und anschließender Quantifizierung mittels Phosphorimager bestimmt. Eine definierte Menge dieser Gesamt-RNA wird analog den in vitro Transkripten in naive Huh-7 Zellen transfiziert. Diese Zellen in beiden Ansätzen werden danach einer G418-Selektion unterzogen und die Anzahl der gebildeten Kolonien durch Auszählen nach fixieren und anfärben mit Coomassie-Brilliant-Blau bestimmt. Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz wird jedem Transfektionsansatz 1 µg eines Plasmids zugesetzt, das die Expression der Luziferase erlaubt. Ein Aliquot der transfizierten Zellen wird nach 24 Stunden geerntet und die Luziferaseaktivität im jeweiligen Zellysat bestimmt. Die Anzahl der Kolonien wird jeweils auf die Luziferaseexpression normiert.

Fig. 10: Sequenzanalyse der 9-13 Klone. Gesamt-RNA des Zellklons 9-13, der durch Transfektion des HCV-RNA-Konstrukts I377/NS3-3' entstand, wurde mit einem im Stand der Technik bekannten Verfahren isoliert und das HCV-RNA-Konstrukt von Nukleotidposition 59 bis 9386 mit Hilfe der 'long-distance RT-PCR' unter Verwendung der primer S59 und A9413 amplifiziert. Die PCR-Fragmente wurden kloniert und 11 Klone (genannt 9-13 A - K) vollständig sequenziert, wobei sich die Klone D und I, E und G sowie H und J als identisch erwiesen. Die Positionen der Aminosäureunterschiede in der NS3-5B Region zwischen den reklonierten HCV-RNAs und dem parentalen Konstrukt sind mit einem dicken vertikalen Strich beim jeweiligen Klon markiert. Jeder Klon wurde mit dem Restriktionsenzym *Sfi* I verdaut und das jeweilige Fragment in das parentale Konstrukt inseriert. Diese Klone wurden jeweils in Huh-7 Zellen transfiziert und die Zellen wie in Figur 1 beschrieben einer Selektion unterzogen. Die Anzahl der mit jedem Konstrukt erhaltenen Zellklone ist rechts neben dem jeweiligen Konstrukt vermerkt.

Fig. 11 A: Prinzip der Replikationsbestimmung mit Hilfe eines Reportergens. Im oberen Teil der Figur ist das HCV-DNA-Konstrukt I₃₈₉/Luc/NS3-3' dargestellt, bestehend aus der HCV 5' NTR (Nukleotidposition 1-389), dem Luziferasegen (*luc*), der IRES des Encephalomyocarditis Virus, dem HCV NS3-5B und der 3' NTR. Die Position des aktiven Zentrums der NS5B RNA-Polymerase, in das ein inaktivierender Aminosäureaustausch eingeführt wurde, ist mit 'GND' angedeutet. Die Plasmide, die für das replikationskompetente bzw. das defekte HCV-RNA-Konstrukt kodieren, werden mit dem Restriktionsenzym *Sca* I verdaut und in eine in vitro Transkription mit der T7 RNA-Polymerase eingesetzt. Nach Entfernung der Matrizen-DNA werden die jeweiligen HCV-RNA-Konstrukte mittels Elektroporation in naive Huh-7 Zellen eingeschleust und diese in regelmäßigen Abständen geerntet.

Fig. 11 B: Vergleich der Luziferaseaktivitäten in Zellen transfiziert mit dem parentalen HCV-RNA-Konstrukt I₃₈₉/Luc/NS3-3'/wt (wt) oder den folgenden Varianten: Der inaktiven RNA (318 DN), der Variante 9-13F oder der Variante 5.1. Die Zellen wurden 6 (nicht gezeigt), 24, 48, 72, 96, 120, 144 und 168 Stunden nach der Transfektion geerntet und die Luziferaseaktivitäten luminometrisch bestimmt.

Fig. 12: Selektionierbare HCV-Vollängengenome (Konstrukte I₃₈₉/core-3'/5.1 und I₃₈₉/core-3'/9-13F).

(A) Schematische Darstellung des Vollängenkonstrukts. Der Bereich zwischen den beiden angedeuteten Erkennungsstellen für das Restriktionsenzym *Sfi* I entspricht den Sequenzen der hoch-adaptierten RNA-Varianten 5.1. oder 9-13F.

(B) Anzahl der Kolonien die nach Transfektion von jeweils 0,1 µg in vitro transkribierter RNA der unter A dargestellten Konstrukte I₃₈₉/core-3'/5.1 in HUH7-Zellen erhalten wurden. Angegeben ist das Ergebnis eines repräsentativen Experimentes.

(C) Nachweis autonom replizierender HCV-Vollängen-RNAs in G418-resistenten Zellklonen, die nach Transfektion des entsprechenden in vitro Transkripts erhalten wurden. Die Abbildung zeigt das Autoradiogramm eines Northern Blots, der mit einer Sonde gegen das *neo*-Resistenzgen und der HCV 5' NTR hybridisiert wurde. Die in Spur 1 und 2 dargestellten Kontrollen entsprechen jeweils 10⁸ Molekülen der angegebenen in vitro Transkripte, gemischt mit Gesamt-RNA aus naiven Huh-7 Zellen. Die Negativkontrolle enthält ausschließlich Gesamt RNA aus naiven Huh-7 Zellen (Spur 3). Die Spuren 4-9 enthalten 3-10 µg Gesamt-RNA aus G418-resistenten Zellklonen, die nach Transfektion von in vitro transkribierter I₃₈₉/core-3'/5.1-RNA bzw. I₃₈₉/core-3'/9-13F-RNA erhalten wurden. Die für die Selektion verwendete G418-Konzentration ist jeweils angegeben. Fünf der dargestellten Zellklone enthalten die hoch adaptierte RNA-Variante 5.1 (Spur 4-8), einer die adaptierte RNA-Variante 9-13F (Spur 9).

Fig. 13: HCV-RNA-Konstrukte mit einem Reportergen. (A) Bicistronische HCV-RNA-Konstrukte. Das Reporter-

gen wird mit Hilfe einer separaten IRES translatiert. (B) Monocistronische HCV-RNA-Konstrukte. Das Reporter-genprodukt wird als Fusionsprotein mit einem HCV-Protein exprimiert. Die beiden Anteile sind über eine Erkennungssequenz für eine virale oder zelluläre Protease verbunden, die eine proteolytische Trennung der beiden fusionierten Proteinanteile erlaubt. Im gezeigten Beispiel wurden das Reporter-genprodukt und das jeweilige HCV-Protein über eine Erkennungssequenz für Ubiquitin (Ub) fusioniert.

Fig. 14: Tricistronisches Vollängen HCV-RNA-Konstrukt, das zusätzlich zum Resistenzgen ein Fremdgen inseriert besitzt.

Fig. 15: Monocistronische HCV-RNA-Konstrukte, bei denen das Resistenzgenprodukt als Fusionsprotein mit dem HCV-Anteil exprimiert wird. Das Resistenzgen (RG) ist entweder als Fusionsprotein aktiv oder es wird so mit einer proteolytisch spaltbaren Sequenz mit dem HCV-Anteil fusioniert, daß das Resistenzgenprodukt durch eine zelluläre oder virale Protease vom HCV-Anteil abgespalten wird. Im gezeigten Beispiel wurde das Resistenzgen über die für Ubiquitin (Ub) kodierende Sequenz mit dem jeweiligen HCV-Anteil fusioniert.

Beispiel 1: Herstellung von HCV-RNA-Konstrukten

(A) Synthese und Klonierung eines vollständigen HCV-Konsensusgenoms mittels RT-PCR

[0042] Aus der Leber eines chronisch infizierten Patienten wurde das HCV-Genom, d.h die HCV-RNA wie nachfolgend beschrieben isoliert:

[0043] Aus ca. 100 mg Leber wurde die komplette RNA gemäß dem Verfahren von Chomczynski und Sacchi (1987, Anal. Biochem. 162, 156) isoliert. Mit 1 µg dieser isolierten RNA wurde eine reverse Transkription mit den Primern A6103 (GCTATCAGCCGGTTCATCCACTGC) oder A9413 (CAGGATGGCCTATTGG CCTGGAG) und dem 'expand reverse transcriptase'-System (Boehringer Mannheim, Deutschland) nach den Vorschriften des Herstellers durchgeführt. Mit den Produkten dieser reversen Transkription (RT) wurde eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR=polymerase chain reaction) durchgeführt, und zwar unter Verwendung des 'expand long template'-Systems (Boehringer Mannheim, Deutschland), wobei der Puffer mit 2% Dimethylsulfoxid-Gehalt eingesetzt wurde. Nach einer Stunde bei 42°C wurde 1/8 dieses Reaktionsansatzes in einem ersten PCR-Durchgang mit den Primern A6103 und S59 (TGTCTTCACGCA-GAAAGCGTCTAG) oder A9413 und S4542 (GATGAGCT CGCCGCGAAGCTGTCC) eingesetzt. Nach 40 Zyklen wurde 1/10 dieses Reaktionsansatzes in einem zweiten PCR-Durchgang mit den Primern S59 und A4919 (AGCACAGC-CCGCGTCATAGCACTCG) oder S4542 und A9386 (TTAGCTCCCCG TTCATCGGTTGG) eingesetzt. Nach 30 Zyklen wurden die PCR-Produkte mittels präparativer Agarose-Gel-Elektrophorese gereinigt und die dabei eluierten Fragmente wurden in den Vektor pCR2.1 (Invitrogen) oder pBSK II (Stratagene) ligiert. Vier Klone von jedem Fragment wurden analysiert und sequenziert, und es wurde eine Konsensus-Sequenz ermittelt. Zu diesem Zweck wurden die DNA-Sequenzen miteinander verglichen. Die Positionen, an denen sich die Sequenz eines der Fragmente von den übrigen unterschied, wurde als unerwünschte Mutation betrachtet. Im Fall von Mehrdeutigkeiten der Sequenz wurden kürzere sich überlappende PCR-Fragmente der betreffenden Region amplifiziert und mehrere Klone sequenziert. Auf diese Weise konnten zahlreiche potentielle Mutationen in jedem Fragment identifiziert und somit eine isolat-spezifische Konsensussequenz etabliert werden. Diese etablierte Konsensussequenz bzw. dieses Genom gehört zum weltweit verbreiteten Genotyp 1b. Die nicht translatierte Region am 3'-Ende (=3' NTR) wurde mittels konventioneller PCR erhalten, wobei ein Antisense-Primer eingesetzt wurde, der die letzten 24 Nukleotide des im Stand der Technik bekannten 'X-tails' (Tanaka et al., 1995, Biochem. Biophys. Res. Commun. 215, 744; und Rice, PCT/US 96/14033) abdeckt. Die authentische nicht translatierte Region am 5'-Ende (=5' NTR) strangabwärts vom T7 Promotor wurde mittels PCR erzeugt, wobei zum einen ein Oligonukleotid verwendet wurde, das einem verkürzten T7 Promotor (TAA TAC GAC TCA CTA TAG) und den ersten 88 Nukleotiden von HCV entspricht, und zum anderen eines der vorgenannten Plasmide eingesetzt wurde, das eines der 5' Fragmente des Genoms trägt. Aus den subgenomischen Fragmenten mit der geringsten Anzahl an Nicht-Konsensus-Austauschen wurde ein komplettes HCV-Konsensusgenom zusammengesetzt und in einen modifizierten pBR322-Vektor inseriert. Abweichungen von der Konsensussequenz wurden mittels ortsgerichteter Mutagenese ("site-directed mutagenesis") beseitigt. Um "run-off"-Transkripte mit einem authentischen 3' Ende herzustellen, wurde die 3'-NTR der Isolate (mit dem Ende TGT) zu AGT modifiziert (gemäß der Sequenz vom Genotyp 3 = Klon 'WS' nach Kolykhalov et al., 1996, J. Virol. 70, 3363) und außerdem wurde ein zusätzlicher Nukleotidaustausch an Position 9562 vorgenommen, um die A:T Basenpaarung in der Haarnadelstruktur am 3'Ende der 3' NTR (Kolykhalov et al. ibid.) beizubehalten. Um eine interne Restriktionsstelle für das Enzym Scal zu beseitigen, wurde ferner ein sog. stiller ("silent") Nukleotidaustausch vorgenommen. Nach dem Zusammenfügen des Vollängen-Genoms mit passenden 5'- und 3' NTRen wurde die komplette HCV-Sequenz überprüft. Dabei wurde kein ungewünschter Nukleotidaustausch gefunden.

[0044] Das auf diese Weise hergestellte HCV-Genom sollte per Definition hepatotrop sein.

(B) Synthese selektierbarer HCV-Subgenom-Konstrukte

[0045] Unter Verwendung des unter (A) beschriebenen Konsensusgenoms wurden HCV-Subgenom-Konstrukte hergestellt, die das Antibiotikumresistenzgen Neomycin-Phosphotransferase (NPT) und zwei Sequenzen von internen Ribosomenbindungsstellen (IRES) enthalten. Die hierfür angewendeten biochemischen Verfahrenstechniken sind dem Fachmann bekannt und geläufig (siehe: Sambrook, J., E.F. Fritsch, T. Maniatis, 1989, *Molecularcloning: a laboratory manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.; Ausubel et al. (eds.), 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1-3, John Wiley & Sons Inc., New York). Das Antibiotikumresistenzgen wurde unmittelbar hinter der 5' NTR inseriert, wodurch eine bicistronische RNA erhalten wurde (siehe Fig. 1 A). Ebenso gut kann das Antibiotikumresistenzgen aber auch an anderer Stelle des HCV-Subgenom-Konstrukts inseriert werden, beispielsweise innerhalb der für das Polyprotein kodierenden Nukleotidsequenz, wodurch eine monocistronische RNA erhalten wird (siehe Fig. 5 A) oder in die 3' NTR (siehe Fig. 5 B). Bei den IRES-Elementen handelt es sich zum einen um eine der beiden HCV-IRES-Varianten Nukleotide 1-377 oder Nukleotide 1-389, und zum anderen um die IRES des Encephalomyocarditis Virus, die die Translation der HCV Sequenz strangabwärts von den Genen für NS2 oder NS3 bis zu dem authentischen 3' Ende des Genoms steuert.

[0046] Die beiden genannten HCV-IRES-Varianten wurden wie folgt ermittelt:

Auf der Basis von Deletionsanalysen der 3' Grenze der HCV-IRES (Reynolds et al. 1995, *EMBO J.* 14, 6010) wurden verschiedene Abschnitte der 5' NTR mit dem NPT Gen fusioniert und anhand von Kotransfektionen mit einem das T7 RNA Polymerase Gen enthaltenden Plasmid hinsichtlich der maximalen Anzahl gebildeter Kolonien analysiert. Die besten Ergebnisse wurden mit den HCV Sequenzen von 1-377 und 1-389 erhalten. Da sich das AUG-Startkodon des HCV Polyproteins an Position 342 befindet und somit in der IRES-Sequenz enthalten ist, kommt es zu einer Fusion von 12 bzw. 16 Aminosäuren des HCV-Kapsidproteins ("Core-Proteins") mit der Neomycin Phosphotransferase (siehe Fig. 1 A).

[0047] Diese modifizierten HCV-Subgenom-Konstrukte erhielten dementsprechend die Bezeichnungen I₃₇₇/NS2-3' (oder I₃₇₇/NS3-3') und I₃₈₉/NS2-3' (oder I₃₈₉/NS3-3'). Sie sind in Fig. 1A schematisch dargestellt.

[0048] Mit in-vitro-Transkripten dieser modifizierten parentalen HCV-Subgenom-Konstrukte I₃₇₇/NS2-3' (oder I₃₇₇/NS3-3') und I₃₈₉/NS2-3' (oder I₃₈₉/NS3-3') wurden verschiedene Zelllinien und Primärzellkulturen von menschlichen Hepatocyten transfiziert.

[0049] Als parallele Negativ-Kontrolle zu allen Transfektionsexperimenten wurde zu jedem modifizierten parentalen HCV-Subgenom-Konstrukt ein entsprechend modifiziertes aber defektes Subgenom konstruiert, das sich von dem parentalen dadurch unterscheidet, daß es innerhalb des Leserasters eine Deletion von 10 Aminosäuren aufweist, die das aktive Zentrum der NS5B RNA Polymerase umfaßt (Behrens et al., 1996, *EMBO J.* 15, 12; und Lohmann et al., 1997, *J. Virol.* 71, 8416).

(C) Synthese selektierbarer HCV-Genom-Konstrukte

[0050] Ein NS2-3' Subgenomkonstrukt, das am 5' Ende mit einem Fragment des Luziferasegens und der vollständigen EMCV-IRES verbunden ist, wurde mit NcoI und SpeI restringiert und mittels präparativer Agarosegelelektrophorese gereinigt. Der so erhaltene Vektor wurde in einer 3-Faktor Ligation mit einem NcoI/NotI-HCV-Fragment, entsprechend den Nukleotidpositionen 342 bis 1968 des HCV-Genoms und mit einem NotI/SpeI-Fragment, entsprechend den Nukleotidpositionen 1968-9605 ligiert. Das entstandene Konstrukt, bei dem das vollständige HCV-Leseraster und die 3' NTR stromabwärts dem Luziferasegenfragment und der EMCV-IRES liegen, wurde danach mit PmeI und SpeI restringiert und mit dem analog restringierten I₃₈₉/NS3-3'/wt-Subgenomkonstrukt-Vektor ligiert. Dieses selektionierbare HCV-Genomkonstrukt ist in Fig. 4 dargestellt.

(D) Herstellung von den HCV-RNA-Konstrukten entsprechenden in-vitro-Transkripten

[0051] Die vorstehend beschriebenen gereinigten Plasmid DNAs wurden mit Scal linearisiert und nach Phenol/Chloroform-Extraktion und Isopropanol-Präzipitation in eine In-vitro-Transkriptionsreaktion eingesetzt unter Verwendung der folgenden Komponenten: 80 mM HEPES, pH 7.5, 12,5 mM MgCl₂, 2 mM Spermidin, 40 mM Dithiothreitol, 2 mM von jedem NTP, 1 Einheit RNasin/µl, 50 µg/ml restringierte DNA und ca. 2 Einheiten/µl T7 RNA Polymerase. Nach 2 Std. bei 37°C wurde die Hälfte der Menge an T7 Polymerase zugegeben und der Reaktionsansatz weitere 2h inkubiert. Zur Entfernung von DNA wurde die Mischung mit saurem Phenol extrahiert (U. Kedzierski, J.C. Porte, 1991, *Bio Techniques* 10, 210), mit Isopropanol präzipitiert, das Pellet in Wasser gelöst und mit DNase (2 Einheiten pro µg DNA) für 60 Min. bei 37°C inkubiert. Nach anschließender Extraktion mit saurem Phenol, saurem Phenol/Chloroform und Chloroform und Isopropanol-Präzipitation wurde die gelöste RNA mittel optischer Dichtemessungen quantifiziert und ihre

Unversehrtheit mittels Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

Beispiel 2: Transfektionsexperimente mit der Hepatomazelllinie Huh-7

[0052] Bei sämtlichen Transfektionsexperimenten wurde sorgfältig darauf geachtet, daß jegliche Matrizen-DNA zuvor entfernt worden war, um zu vermeiden, daß solche DNA in transfizierte Zellen integrieren und diesen unabhängig von einer HCV-Replikation eine Neomycin-Resistenz vermitteln konnte. Deshalb wurde im Anschluß an die in-vitro-Transkription (Beispiel 1 D) die Reaktionsmischung mit 2 Einheiten DNase pro µg DNA für 60 Min. bei 37°C behandelt und mit saurem Phenol, saurem Phenol/Chloroform und Chloroform extrahiert. Vor der Verwendung für die Transfektion wurde die präzipitierte RNA mittels Formaldehyd Agarose Gel Elektrophorese analysiert.

[0053] Es wurden drei separate Transfektionsexperimente mit der hoch differenzierten humanen Hepatomazelllinie Huh-7 (gemäß Nakabayashi et al. 1982, Cancer Res. **42**, 3858) durchgeführt. Dabei wurde jeweils 15 µg RNA in 8 x 10⁶ Huh-7-Zellen mit Hilfe der Elektroporation eingebracht und diese Zellen anschließend in Kulturschalen von 10 cm Durchmesser ausgesät. 24 Stunden nach der Aussaat wurde Neomycin (= G418) in einer Endkonzentration von 1 mg/ml zugegeben. Das Kulturmedium wurde zweimal pro Woche gewechselt. Nach 3 - 5 Wochen waren kleine Kolonien erkennbar, die isoliert und unter den gleichen Kulturbedingungen passagiert wurden.

[0054] Die Zellklone, die im Verlauf des ersten Experiments erhalten wurden, wurden isoliert und subpassagiert. Während dieser Prozedur starben die meisten Klone und die Endausbeute betrug nur noch 9 Klone von Zellen, die mit den parentalen HCV-Subgenom-Konstrukten transfiziert worden waren und 1 Klon (Klon 8-1) von Zellen, die mit einem defekten HCV-Genom-Konstrukt, nämlich einer defekten NS2-3' HCV-RNA transfiziert worden waren. Außer einer verkürzten Verdopplungszeit und dem gelegentlichen Auftreten von irregulär geformten Zellen wurden keine beständigen morphologischen Unterschiede zwischen diesen 9 Zellklonen und dem einen Zellklon (Klon 8-1) oder den parentalen Huh-7 Zellen gefunden.

[0055] Die Hauptkriterien für funktionierende HCV-Genomkonstrukte sind die Bildung von viraler RNA mit korrekter Größe und die Abwesenheit von (integrierter) Plasmid DNA, die eine G418-Resistenz übertragen bzw. vermitteln könnte.

[0056] Um die HCV-RNA in den Huh-7-Zellen zu bestimmen, wurde die Gesamt-RNA isoliert und mittels des gängigen Northern-Blot Verfahrens unter Verwendung einer Plusstrang-spezifischen Ribosonde (= RNA-Sonde) analysiert. Hierfür wurde von den jeweiligen Zellklonen Gesamt-RNA nach der Methode von Chomczynski und Sacchi 1987, *Anal. Biochem.* 162, 156 isoliert, und 10 µg RNA, was dem Gesamt-RNA-Gehalt von 0,5 - 1 x 10⁶ Zellen entspricht, mittels denaturierender Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (Spuren 3 bis 12 der Fig. 1 B). Als Größenmarker mit authentischer Sequenz wurden gleichzeitig 10⁹ in-vitro-Transkripte (ivtr.), die zu den I₃₈₉/NS2-3'/wt oder den I₃₈₉/NS3-3'/wt Replikon-RNAs korrespondieren, mit aufgetrennt (Spur 1 bzw. Spur 2). Die aufgetrennte RNA wurde auf Nylon-Membranen transferiert und mit radioaktiv markierter Plusstrang-spezifischer RNA-Sonde, die komplementär zu dem kompletten NPT-Gen und der HCV-IRES von Nukleotid 377 bis Nukleotid 1 war, hybridisiert. Die Positionen der HCV-spezifischen RNAs (Pfeile) und der 28S rRNA sind rechts von Spur 12 angegeben, die Größen (Anzahlen der Nukleotide) der RNA-Marker sind links von Spur 1 angegeben. Die RNA Marker-Fragmente enthalten HCV-Sequenzen und hybridisieren deshalb mit der Ribosonde (= RNA-Sonde). Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Fig. 1 B dargestellt.

[0057] Mit Ausnahme des mit dem defekten HCV-Genom-Konstrukt transfizierten Klons 8-1, lieferten alle Zellklone homogene HCV-RNAs korrekter Länge (ca. 8640 Nukleotide im Fall des NS2-3' und ca. 7970 Nukleotide im Fall des NS3-3' Replikons). Dieser Befund ist ein Indiz dafür, daß die funktionalen Replikons bzw. die funktionalen HCV-Genom-Konstrukte die G418 Resistenz übertragen. Um auszuschließen, daß die G418 Resistenz auf eine Plasmid-DNA zurückzuführen ist, die in das Genom der Huh-7 Wirtszelle integriert ist und unter der Kontrolle eines zellulären Promotors transkribiert wird, wurde von jedem Klon die DNA mittels einer NPT-Gen-spezifischen PCR untersucht. Hierbei wurde aus den selektierten Huh-7-Zellklonen die DNA mittels Verdau mit Proteinase K (40µg/ml, 1h, 37°C) in 10mMTris, pH7,5, 1mM EDTA, 0,5% SDS und anschließender Extraktion mit Phenol, Phenol/Chloroform und Isopropanolpräzipitation isoliert. Das DNA-Präzipitat wurde in 10 mM Tris (pH 7,5) und 1 mM EDTA gelöst und 1 Stunde mit Rnase A inkubiert. Im Anschluß an eine Phenol/Chloroform Extraktion und Ethanol Präzipitation wurde 1 µg DNA, entsprechend 4 - 8 x 10⁴ Zellen, mittels PCR unter Einsatz NPT-Gen-spezifischer Primer (5'-TCAAGACCGACCTG TCCGGTGCCC-3' und 5'-CTTGAGCCTGGCGAACAGTTCGGC-3') analysiert und ein DNA-Fragment bestehend aus 379 Nukleotiden erzeugt. Die Spezifität des PCR-Produkts wurde mittels Southern Blot Verfahren nachgewiesen, wobei ein Digoxigenin-markiertes DNA Fragment eingesetzt wurde, das zu dem NPT-Gen korrespondiert. Als Positiv-Kontrollen (zum Nachweis etwa vorhandener kontaminierender Nukleinsäuren) wurde das PCR-Verfahren mit 10⁷ Plasmid Molekülen oder 1 µg DNA aus einer BHK Zelllinie, die stabil mit einem Neomycin-Resistenz-Gen transfiziert war, durchgeführt, und als Negativ-Kontrolle wurde die PCR mit denselben Reagenzien aber ohne zugesetzte DNA durchgeführt.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Fig. 1 C dargestellt. Die Spuren 1 und 2 repräsentieren die Positiv-Kontrollen, Spur 13 repräsentiert die Negativ-Kontrolle. Die Zahlenangaben links der Spur 1 bezeichnen die Größe der

Nukleotid-Marker-Moleküle. Außer in Klon 7-3 (Fig. 1C, Spur 3), der von Zellen nach Transfektion mit einem NS2-3' Replikon/NS2-3'HCV-Genom-Konstrukt stammt, und in Klon 8-1 (Fig. 1C, Spur 12), der von Zellen nach Transfektion mit einem defekten HCV-Genom-Konstrukt stammt, war in keinem Zellklon eine NPT-DNA nachweisbar. Dieser Befund ist ein weiteres Indiz dafür, daß die G418 Resistenz der meisten Klone durch die replizierende HCV-RNA vermittelt wurde. Aber auch unabhängig von diesen Ergebnissen ist es unwahrscheinlich, daß HCV-RNAs mit korrekter Größe von integrierter Plasmid DNA erzeugt wird, denn die für die in-vitro-Transkription verwendeten Plasmide enthalten weder einen eukaryontischen Promotor noch ein Polyadenylierungssignal. Im Fall des Klons 7-3 ist die Resistenz deshalb höchst wahrscheinlich sowohl durch das HCV-RNA-Konstrukt bzw. die replizierende HCV-RNA als auch durch eine integrierte NPT DNA Sequenz vermittelt worden, während die Resistenz der Zellen von Klon 8-1 ausschließlich auf die integrierte Plasmid DNA zurückzuführen ist.

[0058] Um zu bestätigen, daß die G418 Resistenz von einer autonom replizierenden HCV-RNA vermittelt ist, wurde der Klon 9-13 (Fig. 1 B, Spur 11) weiteren Tests unterworfen. Klon 8-1, der integrierte Kopien des NPT-Gens trägt, wurde überall als Negativkontrolle eingesetzt. Mit dem Ziel, die Anwesenheit von NPT-DNA im Klon 9-13 rigoros auszuschließen, wurde eine PCR durchgeführt, die den Nachweis von < 1000 NPT-Gen-Kopien in ~ 40.000 Zellen erlaubt. Das Ergebnis dieser PCR ist in Fig. 2A dargestellt. Im einzelnen wurde bei dieser PCR wie folgt verfahren: Es wurden jeweils 10^6 - 10^2 Plasmid Moleküle (I_{377} /NS3-3'/wt) entweder direkt (Spuren 7 - 11) oder nach Zugabe von jeweils 1 µg 9-13 DNA (Spuren 2 - 6) in dem Test eingesetzt. Die Spezifität der amplifizierten DNA Fragment wurde mittels Southern Blot unter Verwendung einer NPT-spezifischen Sonde bestimmt. Eine PCR ohne DNA-Sonde wurde als Negativ-Kontrolle durchgeführt (Spur 12).

Selbst mit dieser sensitiven Methode wurde in einem µg DNA des Zellklons 9-13 keine Plasmid DNA gefunden (Spur 1). Um die Menge an HCV Plus- und Minusstrang RNAs in diesen Zellen abzuschätzen, wurde eine Verdünnungsreihe von Gesamt-RNA mit dem Northern-Blot-Verfahren unter Verwendung einer Plus- oder Minusstrang-spezifischen radioaktiv markierten Ribosonde (= RNA-Sonde) analysiert. Hierfür wurden jeweils 8, 4 oder 2 µg Gesamt-RNA, die aus den Zellklonen 9-13 und 8-1 isoliert worden waren, parallel zu bekannten Mengen analoger in-vitro-Transkripte mit Plus- oder Minusstrang-Polarität (Kontroll-RNAs) im Northern-Blot-Verfahren analysiert und anschließend einer Hybridisierung unterworfen. Die Hybridisierung wurde mit einer Plusstrang-spezifischen Ribosonde, die das komplette NPT-Gen und die HCV-IRES abdeckte ('plusstrang', obere Bildtafel), oder mit einer Minusstrang-spezifischen RNA-Sonde, die zu der NS3-Sequenz komplementär war ('minusstrang', untere Bildtafel) durchgeführt. Die Pfeile markieren die Positionen von Replikon-RNA. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Fig. 2 B dargestellt.

Im Fall des Plusstrangs wurden ca. 10^8 Kopien/µg Gesamt-RNA nachgewiesen, was 1000 - 5000 HCV-RNA-Molekülen pro Zelle entspricht, während die Menge an Minusstrang-RNA 5- bis 10-fach niedriger war. Dieses Ergebnis stimmt mit der Annahme überein, daß die Minusstrang RNA die replikative Zwischenform bzw. Zwischenkopie ist, die als Vorlage für die Synthese der Plusstrang Moleküle dient.

Da die Reaktion im wesentlichen von der viralen RNA-abhängigen RNA Polymerase katalysiert wird, sollte die Synthese der HCV-RNAs resistent gegen Dactinomycin sein, einem Antibiotikum, das selektiv die RNA-Synthese von DNA-Matrizen inhibiert, nicht jedoch die RNA-Synthese von RNA-Matrizen. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurden Zellen mit [3 H] Uridin in Anwesenheit von Dactinomycin inkubiert, die radioaktiv markierten RNAs extrahiert, mittels denaturierender Agarose-Gel-Elektrophorese aufgetrennt und mit Hilfe eines handelsüblichen Bio-Imagers unter Verwendung einer [3 H]-sensitiven Bildplatte analysiert. Hierfür wurden jeweils ca. 5×10^5 Zellen der Klone 9-13 und 8-1 mit 100 µCi [3 H]Uridin für 16 Std. in Abwesenheit (-) oder Gegenwart (+) von 4 µg/ml Dactinomycin (Dact) inkubiert. Im Anschluß an diese Markierungsreaktion wurde die Gesamt-RNA präpariert und mittels Formaldehyd-Agarose-Gel-Elektrophorese analysiert. In den beiden ersten Spuren ist nur 1/10 der Gesamt-RNA dargestellt. Die radioaktiv markierte RNA wurden mit einem BAS-2500 Bio-Imager (Firma Fuji) sichtbar gemacht.

Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Fig. 2 C dargestellt. In Übereinstimmung mit dem Inhibitor-Profil der NS5B Polymerase (Behrens et al., 1996, *EMBOJ.* 15, 12 und Lohmann et al., 1997, *J. Virol.* 71, 8416) war die Replikation der HCV RNA nicht durch Dactinomycin beeinflusst worden, während die Synthese von zellulärer RNA gehemmt worden war. Um die Identität der viralen RNA zu bestätigen, wurde eine RT-PCR zur Reklonierung der replizierten Sequenzen durchgeführt. Die Sequenzanalyse der reklonierten RNA zeigte, daß die RNA in dem Klon 9-13 HCV-spezifisch ist und mit dem transkribierten Transkript des HCV-Konstrukts I_{377} /NS3-3'/wt übereinstimmt.

[0059] Zur Analyse der viralen Proteine wurden die betreffenden Zellen zunächst metabolisch mit [35 S] Methionin/ Cystein radioaktiv markiert, anschließend lysiert und danach die HCV-spezifischen Proteine mittels Immunopräzipitation aus den Zell-Lysaten isoliert. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Fig. 3 A dargestellt. Im einzelnen wurde dabei wie folgt verfahren: Zellen der Zellklone 9-13 (wt) und 8-1 (Δ) waren durch Behandlung für 16 Stunden mit einer dem Fachmann geläufigen und im Handel erhältlichen Protein-Markierungs-Mischung (z.B. NEN Life Science) metabolisch radioaktiv markiert worden. Mittels Immunopräzipitation (IP) unter nichtdenaturierenden Bedingungen (z.B. nach Bartenschlager et al., 1995, *J. Virol.* 69, 7519) und unter Verwendung von drei verschiedenen Antiseren (3/4, 5A, 5B, gemäß Markierung am oberen Ende der Spuren 1 bis 12) waren die HCV-spezifischen Proteine vom Zell-Lysat abgetrennt worden. Die Immunkomplexe wurden mittels Tricine SDS-PAGE analysiert und mittels Autoradiographie

sichtbar gemacht. Um authentische Größenmarker zu erhalten, wurde das homologe Replikonstrukt I₃₇₇/NS3-3'/wt einer transienten Expression mit dem Vaccinia Virus T7-Hybrid System in Huh-7 Zellen unterworfen. Die dabei erhaltenen Produkte waren als Größenmarker (Spuren 7 - 9) parallel zu den Zellen der Klone 9-13 und 8-1 behandelt worden. Identifizierte HCV-Proteine sind am linken Rand von Spur 1 markiert, die Molekulargewichte (in Kilodalton)

sind am rechten Rand von Spur 9 angegeben. Es ist anzumerken, daß das verwendete NS3/4-spezifische Antiserum ('3/4') bevorzugt mit NS4A und NS4B reagiert, was zu einer Unterrepräsentation von NS3 führt.

[0060] Alle viralen Antigene waren eindeutig nachweisbar und ihre apparenten Molekulargewichte zeigten keine Abweichungen gegenüber denjenigen, die nach transienter Expression desselben bicistronischen HCV-RNA-Konstrukts in den ursprünglichen Huh-7 Zellen ermittelt wurden. Um die subzelluläre Verteilung der viralen Antigene zu bestimmen, wurde eine Immunofluoreszenz-Nachweisreaktion unter Einsatz von NS3- und NS5A-spezifischen Antiseren durchgeführt (z.B. nach Bartenschlager et al., 1995, *J. Virol.* 69, 7519). Hierfür wurden Zellen der Klone 9-13 (wt) und 8-1 (Δ) 24 Std. nach dem Aussäen auf Deckgläsern mit Methanol/Azeton fixiert und mit polyklonalen NS3- oder NS5A-spezifischen Antiseren inkubiert. Die gebundenen Antikörper wurden mit einem kommerziell erhältlichen FITC-konjugierten Anti-Kaninchen-Antiserum sichtbar gemacht. Zur Unterdrückung unspezifischer Fluoreszenzsignale wurden die Zellen mit dem Farbstoff 'Evans Blue' gegengefärbt.

[0061] Die Ergebnisse dieses Nachweistests sind in Fig. 3 B dargestellt. Mit beiden Antiseren war eine starke Fluoreszenz im Zytoplasma nachweisbar. Die NS5A-spezifischen Antiseren führten außerdem zu einer schwachen Zellkern-Fluoreszenz, was darauf hindeutet, daß zumindest kleine Mengen dieses Antigens auch zum Zellkern gelangen. Die generell dominierende Präsenz der viralen Antigene im Zytoplasma ist jedoch ein starkes Indiz dafür, daß die HCV-RNA Replikation im Zytoplasma stattfindet — so wie das bei den meisten RNA-Viren der Fall ist.

[0062] Diese Ergebnisse belegen klar, daß mit dem hier beschriebenen Versuchsansatz der Aufbau eines Zellkultursystems für das HCV gelungen ist, dessen Effizienz alles bisher bekannte um Größenordnungen übersteigt und erstmalig den Nachweis viraler Nukleinsäuren und Proteine mit konventionellen und bewährten biochemischen Methoden erlaubt. Erst diese Effizienz erlaubt überhaupt detaillierte Untersuchungen der HCV-Pathogenese, genetische Analysen verschiedener HCV-Funktionen und ein genaues Studium der Virus-/Wirtszellwechselwirkungen, wodurch sich neue Ansatzpunkte für die Entwicklung einer antiviralen Therapie definieren lassen.

Beispiel 3: Transfektion von Huh-7 Zellen mit HCV-Genomkonstrukten

[0063] Huh-7 Zellen werden wie in Beispiel 2 beschrieben transfiziert und selektioniert, wobei hier jedoch selektionierbare Konstrukte verwendet werden, die das vollständige Virusgenom enthalten. Die erhaltenen Zellklone werden analog dem Beispiel 2 mittels PCR auf Abwesenheit von HCV-DNA untersucht und die produktive Replikation der HCV-RNA wird danach mittels Northern Blot, [³H]Uridinmarkierung in Anwesenheit von Dactinomycin, Nachweis der viralen Proteine bzw. Antigene vorzugsweise mit Hilfe des Western Blots, der Immunopräzipitation oder der Immunfluoreszenz nachgewiesen. Im Gegensatz zu den im Beispiel 2 beschriebenen Ansätzen lassen sich mit dem hier beschriebenen Konstrukt außerdem vollständige und sehr wahrscheinlich infektiöse Viren erhalten, was bei den dort (in Beispiel 2) beschriebenen Subgenomkonstrukten nicht der Fall ist. Diese Viren, die in der Zelle und dem Zellkulturüberstand vorhanden sind, werden beispielsweise mittels Ultrazentrifugation, Immunpräzipitation oder Fällung mit Polyethylenglykol konzentriert und alle exogenen, d.h. nicht im Viruspartikel eingebauten Nukleinsäuren werden mittels Inkubation mit Nukleasen (RNase, DNase, Mikrococcusnuklease) verdaut. Auf diese Weise lassen sich alle kontaminierenden Nukleinsäuren, die nicht im schützenden Viruspartikel enthalten sind, entfernen. Die geschützte virale RNA wird nach Inaktivierung der Nukleasen, beispielsweise mittels Inkubation mit Proteinase K in einem SDS-haltigen Puffer durch Extraktion mit Phenol und Phenol/Chloroform isoliert und mittels Northern Blot oder RT-PCR unter Verwendung HCV-spezifischer Primer nachgewiesen. Auch in diesem Versuchsansatz ist die Kombination des beschriebenen HCV-Konsensusgenoms mit einem Selektionsmarker entscheidend für die effiziente Produktion von viraler RNA, viralem Protein und damit von HCV-Partikeln.

Beispiel 4: Herstellung und Anwendung eines HCV-RNA Konstrukts, bei dem das Resistenzgen über ein Ribozym bzw. eine Erkennungsstelle für ein Ribozym mit der HCV-Subgenom-Sequenz verbunden ist.

[0064] Es wird ein HCV-RNA-Konstrukt gemäß Beispiel 1 oder Beispiel 3 hergestellt, bei dem ein Antibiotikumresistenzgen über ein Ribozym bzw. eine Erkennungsstelle für ein Ribozym mit der HCV-RNA-Sequenz verbunden ist. Solche Konstrukte sind in Fig. 7 schematisch dargestellt. Huh-7 Zellen werden wie in Beispiel 2 beschrieben mit diesem HCV-RNA-Konstrukt transfiziert. Nach der Transfektion in die Zellen erfolgt zunächst die Selektion mit dem entsprechenden Antibiotikum. In den dabei erhaltenen Zellklonen wird das einklonierte Ribozym aktiviert oder, im Fall eines Konstrukts, das eine Erkennungsstelle für ein Ribozym trägt, wird das Ribozym in die Zelle eingeschleust (z.B. mittels Transfektion eines Ribozymkonstrukts oder Infektion mit einem viralen Expressionsvektor, in den das entsprechende Ribozym eingesetzt wurde). In beiden Fällen wird durch die ribozymvermittelte Spaltung das Resistenzgen von der

HCV-RNA-Sequenz abgetrennt. Das Ergebnis ist im Fall des HCV-Genom-Konstrukts ein authentisches HCV-Genom ohne Resistenzgen, das zur Bildung authentischer infektiöser Viruspartikel befähigt ist. Im Fall des HCV-Subgenom-Konstrukts entsteht ein HCV-Replikon ohne Resistenzgen.

Beispiel 5: Kotransfektion eines HCV-RNA-Konstrukts mit einem separaten Luziferase-Transfektionskonstrukt

[0065] Es wird ein HCV-RNA-Konstrukt gemäß Beispiel 1 (A) oder Beispiel 3 oder Beispiel 4 hergestellt. Parallel dazu wird ein Transfektionskonstrukt hergestellt, welches das Luziferasegen umfaßt, wobei dieses Luziferasegen vermittels einer ersten Nukleotidsequenz, die für eine HCV-Protease- (z.B. NS3-Protease-) Spaltungsstelle kodiert, mit einer zweiten Nukleotidsequenz, die für ein anderes Protein oder einen Teil eines anderen Proteins kodiert, verbunden ist. HCV-RNA-Konstrukt und Transfektionskonstrukt werden in beliebige Wirtszellen, vorzugsweise Hepatomazellen, insbesondere Huh-7-Zellen, eingeschleust. Dies kann auf die in Beispiel 2 beschriebene Art und Weise geschehen. Das Produkt des modifizierten Luziferasegens ist ein Luziferase-Fusionsprotein, in dem die Luziferase auf Grund der Fusion mit dem Fremdanteil inaktiv ist. In transfizierten Zellen mit hoher HCV-Replikation wird das Fusionsprotein, das ja eine Schnittstelle für eine HCV-Protease enthält, gespalten und damit die aktive Form der Luziferase freigesetzt, die sich durch luminometrische Messung bestimmen läßt. Wird die Replikation des HCV-RNA-Konstrukts gehemmt, wird das Fusionsprotein nicht gespalten und keine aktive Luziferase freigesetzt. Infolgedessen ist die quantitative Bestimmung der Luziferase ein Maß für die Replikation des HCV-Subgenom-Konstrukts. Anstelle des Luziferasegens kann ebenso ein anderes Reportergen verwendet werden, das in analoger Weise modifiziert ist, so daß seine Expression von der Virusreplikation abhängt, obwohl dieses Reportergen nicht Bestandteil des HCV-Subgenom-Konstrukts ist. Es kann auch ein zelluläres Protein, welches durch die HCV-Proteine oder Nukleinsäure inaktiviert oder aktiviert wird, als sogenannter Surrogatmarker verwendet werden. In diesem Fall ist die Expression bzw. Aktivität dieses Surrogatmarkers ein Maß für die Replikation der viralen DNA.

Beispiel 6: Herstellung von HCV-Subgenom-Konstrukten mit integrierten Fremdgenen zur Verwendung als leberzellspezifische Genfähren für die Gentherapie

[0066] Diese rekombinanten und selektionierbaren HCV-Subgenom-Konstrukte werden in trans-komplementierende Helferzelllinien transfiziert, d.h. in Zelllinien, die induzierbar oder konstitutiv die fehlenden Funktionen (beispielsweise die Strukturproteine) exprimieren. Zellklone, die ein funktionelles HCV-Subgenom-Konstrukt enthalten, lassen sich durch entsprechende Selektion etablieren. Die von der Wirtszelle exprimierten Virus-Strukturproteine erlauben die Bildung von Viruspartikeln, in die die RNA der HCV-Subgenom-Konstrukte eingeschleust wird. Das Ergebnis sind also virus-ähnliche Partikel, die ein erfindungsgemäßes HCV-Subgenom-Konstrukt einschließlich des inklonierten Fremdgens enthalten und die dieses mittels Infektion auf andere Zellen übertragen können. Ein Beispiel für ein solches Konstrukt ist in Fig. 8 dargestellt. Es besteht auch die Möglichkeit, das hier beschriebene erfindungsgemäße HCV-Subgenom-Konstrukt mit integriertem Fremdgen direkt als Expressionsvektor einzusetzen. Dabei wird analog dem vorgenannten Verfahren vorgegangen, allerdings mit dem Unterschied, daß Zelllinien transfiziert werden, die keine trans-komplementierenden Faktoren exprimieren. In diesem Fall dient das HCV-Konstrukt also lediglich als Expressionsvektor.

Beispiel 7: Herstellung zellkultur-adaptierter HCV-RNA-Konstrukte

(A) Isolationsverfahren

[0067] Für die Bestimmung adaptiver Mutationen und die Herstellung zellkultur-adaptierter HCV-RNA-Konstrukte wurde wie folgt verfahren: Zellen wurden mit einem HCV-RNA-Konstrukt wie unter den Beispielen 1 und 2 beschrieben transfiziert und G418-resistente Zellklone hergestellt. Zur Bestimmung der Replikationskompetenz (darunter wird in diesem Zusammenhang die Anzahl G418-resistenter Zellklone verstanden, die pro Mikrogramm transfizierter HCV-RNA bzw. HCV-RNA-Konstrukt erhalten wird) wurde exemplarisch die Gesamt-RNA aus einem der Zellklone, genannt 9-13 (Fig. 1B, Spur 11) isoliert und die Menge der darin enthaltenen HCV-RNA mittels Northern-blot wie in Fig. 2 B beschrieben bestimmt. 10 Mikrogramm der Gesamt-RNA, die ca. 10^9 Moleküle HCV-RNA enthielt, wurde anschließend per Elektroporation in naive Huh-7 Zellen eingeschleust (Fig. 9). Parallel dazu wurden 10^9 in vitro Transkripte der analogen *neo*-HCV-RNA, die mit isolierter Gesamt-RNA aus naiven Huh-7 Zellen auf eine Gesamt-RNA-Menge von 10 µg aufgefüllt worden war, in naive Huh-7 Zellen transfiziert. Nach Selektion mit G418 wurde die Anzahl der Zellkolonien, ausgedrückt in 'colony forming units (cfu) pro Mikrogramm RNA' in den beiden Ansätzen bestimmt. Bei einer Konzentration von 500 µg/ml G418 im Selektionsmedium betrug die Zahl der Kolonien, die mit der in der **isolierten** Gesamt-RNA enthaltenen HCV-RNA erhalten wurde, ca. 100.000 cfu pro Mikrogramm HCV-RNA. Dagegen wurden mit derselben Menge in vitro transkribierter HCV-RNA nur 30 - 50 Kolonien erhalten. Dieses Ergebnis belegt, daß die

spezifische Infektiosität der HCV-RNA, die aus den Zellklonen isoliert wurde, ca. 1.000 - 10.000-fach höher ist als die Infektiosität der analogen in vitro Transkripte. Das methodische Vorgehen ist in Fig. 9 dargestellt.

[0068] Mit Hilfe der 'long-distance RT-PCR' wurde die HCV-RNA aus der Gesamt-RNA der 9-13 Zellen amplifiziert, die PCR-Amplifikate kloniert und zahlreiche Klone sequenziert. Ein Vergleich der Sequenzen dieser reklonierten RNAs mit der Sequenz der RNA, die ursprünglich in die naiven Huh-7 Zellen eingeschleust wurde ergab, daß die reklonierten RNAs zahlreiche Aminosäureaustausche besaßen, die über die gesamte HCV-Sequenz verteilt waren (Fig. 10). SfiI-Fragmente dieser reklonierten Mutanten wurden im Austausch gegen das analoge SfiI-Fragment des ursprünglichen Replikonkonstrukts in dieses eingeführt und RNAs der jeweiligen Mutanten wurden in naive Huh-7 Zellen eingeschleust. Nach Selektion mit G418 wurde dann für jede HCV-RNA-Mutante die Zahl der gebildeten Kolonien bestimmt. Während mit der Ausgangs-RNA nur 30 - 50 Kolonien pro Mikrogramm RNA erhalten wurde war die Koloniezahl bei zwei der reklonierten Varianten deutlich höher (Fig. 10). Im Fall der HCV-RNA-Konstrukte 9-13I und 9-13C betrug die spezifische Infektiosität 100 - 1.000 cfu pro Mikrogramm RNA und beim 9-13F Replikon sogar 1.000 - 10.000 cfu pro Mikrogramm RNA. Diese Ergebnisse zeigen, daß die Aminosäureaustausche in dem analysierten NS3-5B-Bereich der Mutanten 9-13I, 9-13C und insbesondere 9-13F zu einer deutlichen Erhöhung der Replikationskompetenz führten. Demgegenüber waren alle anderen HCV-RNA-Konstrukte (9-13 A, B, G, H und K) nicht mehr replikationskompetent, enthielten also letale Mutationen.

[0069] Zwecks Beantwortung der Frage, welche der Aminosäureaustausche im 9-13F-Konstrukt zur Steigerung der Replikation führten, wurden die Austausche einzeln oder in Kombination in das Ausgangs-HCV-RNA-Konstrukt eingeführt und die entsprechenden RNAs in naive Huh-7 Zellen eingeschleust. Das Ergebnis der Transfektionen mit diesen RNAs ist in Tabelle 1 zusammengefaßt. Daraus wird ersichtlich, daß im vorliegenden Beispiel die hohe Replikationskompetenz durch mehrere Mutationen bedingt ist. Den größten Beitrag leisten die Aminosäureaustausche in den HCV-RNA-Abschnitten NS5A und NS4B. Auch die einzelnen Austausche in der NS3-Region leisten einen Beitrag, der möglicherweise auf einem Synergismus dieser Einzelaustausche beruht.

Diese Befunde belegen, daß es durch die G418-Selektion der Zellen, die mit den *neo*-HCV-RNA-Konstrukten transfiziert wurden, zur Anreicherung solcher HCV-RNAs kam, die eine deutlich höhere Replikationskompetenz hatten. Mit dem hier beschriebenen Versuchsansatz lassen sich HCV-RNA-Konstrukte mit sehr unterschiedlicher Replikationseffizienz selektionieren. Je höher die Konzentration des Antibiotikums in dem Selektionsmedium ist, in/auf dem die HCV-RNA-Konstrukt-haltigen Zellen zwecks Selektion kultiviert werden, desto höher muß der Grad an adaptiven Mutationen und damit die Replikationseffizienz in den betreffenden HCV-RNA-Konstrukten sein, damit die Zellen auswachsen können. Werden die Selektionen mit niedrigeren Antibiotikum-Konzentrationen durchgeführt, können auch solche Zellen überleben und sich vermehren, die im Vergleich geringer adaptive Mutationen und eine weniger hohe Replikationseffizienz aufweisen.

Das bisher beschriebene HCV-RNA-Konstrukt 9-13F, das mehrere adaptive Mutationen enthielt, hatte eine erwiesenermaßen höhere Replikationseffizienz als die parentale HCV-RNA. Um HCV-RNAs mit noch höherer Replikation in Zellkultur zu erhalten, wurde die HCV-RNA, die in der Gesamt-RNA eines ausgewählten Zellklons enthalten war, mehrfach in naiven Huh-7 Zellen passagiert. Dieser ausgewählte Zellklon, genannt 5-15, wurde durch Transfektion mit dem HCV-RNA-Konstrukt I₃₈₉/NS3-3' erhalten (Fig. 1). Er entspricht weitgehend dem Zellklon 9-13, der durch Transfektion mit einem HCV-RNA-Konstrukt hergestellt wurde, das eine um 22 Nukleotide kürzere HCV-IRES besaß (I₃₇₇/NS3-3'; Fig. 1). 10 Mikrogramm Gesamt-RNA, isoliert aus dem Zellklon 5-15, wurden mittels Elektroporation in naive Huh-7 Zellen eingeschleust und die Zellen einer Selektion mit 1 mg/ml G418 unterzogen. Aus einem der so erzeugten Zellklone wurde wiederum Gesamt-RNA isoliert, in naive Huh-7 Zellen transfiziert und analog selektioniert. Dieser Vorgang wurde insgesamt viermal wiederholt. Nach der vierten Passage wurde aus einem Zellklon die Gesamt-RNA isoliert und die *neo*-HCV-RNA mit Hilfe der 'long-distance RT-PCR' amplifiziert. Das amplifizierte DNA-Fragment wurde mit dem Restriktionsenzym SfiI verdaut und in das SfiI-restringierte Ausgangskonstrukt I₃₈₉/NS3-3' inseriert. Insgesamt wurden über 100 DNA-Klone erhalten und zunächst mittels Restriktionsverdau analysiert. In vitro transkribierte RNA von ca. 80 dieser Klone wurde jeweils in naive Huh-7 eingeschleust und einer Selektion mit 500mg/ml G418 unterzogen. Von den 80 untersuchten *neo*-HCV-RNA-Varianten erwiesen sich die allermeisten als replikationsdefekt. Bei zwei Mutanten, genannt 5.1 und 19, war die spezifische Infektiosität, ausgedrückt als 'colony forming units' pro Mikrogramm RNA, jedoch sehr deutlich erhöht (Tabelle 2). Durch mehrfache Passage der RNA in Zellkultur lassen sich offensichtlich HCV-RNAs herstellen, deren Replikationseffizienz aufgrund von Mutationen (sog. "adaptiven Mutationen") mehrere Größenordnungen höher ist als die der ursprünglich aus dem Patienten klonierten RNA.

(B) Modifikationsverfahren

[0070] Solche nach (A) erzeugten und identifizierten adaptiven Mutationen können in ein wenig replikationskompetentes HCV-RNA-Konstrukt übertragen werden und führen zu einer massiven Steigerung der Replikation dieses Konstrukts. Diese Steigerung ist so hoch, daß damit nachweislich HCV-RNAs in Zellkultur zur Replikation gebracht werden können, die kein selektierbares Markergen mehr besitzen. Fig. 12 zeigt einen Vergleich der Replikationseffi-

zienz von HCV-RNAs, die entweder der Ausgangssequenz oder den adaptierten Sequenzen 9-13F bzw. 5.1 entsprechen. Zwecks einfacher Messung wurde das *neo*-Gen entfernt und durch das Gen für die Luziferase ersetzt. Als Negativkontrolle diente wiederum ein HCV-RNA-Konstrukt, das auf Grund einer inaktivierenden Mutation der NSSB RNA-Polymerase replikationsdefekt war. Schon 24 Stunden nach der Transfektion erkennt man einen deutlichen Unterschied in der Luziferaseaktivität zwischen der defekten RNA und den 9-13F bzw. 5.1-Konstrukten während zwischen der defekten RNA (318 DN) und dem Ausgangs-RNA-Konstrukt (wt) das keine adaptiven Mutationen besaß, kaum ein Unterschied zu sehen war. Während des gesamten Beobachtungszeitraums wurde die höchste Luziferaseaktivität und damit die höchste Replikation mit der 5.1-RNA erhalten. Diese Befunde belegen nicht nur die hohe Replikationseffizienz dieser RNA, sondern zeigen auch, daß es möglich ist, mit adaptierten HCV-RNA-Konstrukten ein Zellkultursystem aufzubauen, für das die Anwesenheit eines selektierbaren Gens nicht mehr notwendig ist. Eine zusammenfassende Übersicht der Nukleotid- und Aminosäureunterschiede zwischen dem Ausgangskonstrukt und den Mutanten 9-13F, 5.1 und 19 ist in Tabelle 3 gegeben.

Beispiel 8: Herstellung zellkultur-adaptierter HCV-RNA-Vollängengenome

[0071] In den Beispielen 1 bis 7 wurde stets eine subgenomische HCV-RNA verwendet, der die gesamte Strukturproteinregion von Core bis einschließlich p7 bzw. NS2 fehlte. Im vorliegenden Beispiel 8 wird gezeigt, daß es möglich ist, mit Hilfe der adaptierten NS3-5B-Sequenz ein HCV-Vollängengenom in Zellkultur zur Replikation zu bringen. Zu diesem Zweck wurde zunächst das SfiI-Fragment der gemäß Beispiel 7 hergestellten, hoch adaptierten HCV-RNA 5.1 in ein selektionierbares HCV-Vollängengenom transferiert (Fig. 12). Dieses HCV-Genom wurde in naive Huh-7 Zellen transfiziert und einer Selektion mit unterschiedlichen G418-Konzentrationen unterzogen. In Abhängigkeit von der Selektionsstärke (der G418-Konzentration) wurde eine unterschiedlich große Zahl an Zellklonen erhalten (Fig. 12 B). Im Vergleich dazu wurden mit dem unveränderten HCV-Vollängengenom, das keine adaptiven Mutationen enthielt, keine Kolonien erhalten, ebenso mit der Negativkontrolle, die auf Grund einer inaktivierenden Mutation in der NS5B RNA-Polymerase replikationsdefekt war. Zum Nachweis dafür, daß die so entstandenen Zellklone tatsächlich ein autonom replizierendes HCV-Vollängenkonstrukt enthielten, wurde Gesamt-RNA aus mehreren Zellklonen isoliert und mittels Northern-Blot analysiert. In allen Zellklonen war die Vollängen HCV-RNA eindeutig nachweisbar (Fig. 12). Damit ist eindeutig belegt, daß es mit Hilfe der an Zellkulturen adaptierten HCV-Sequenzen möglich ist, ein HCV-Vollängengenom herzustellen, das mit hoher Effizienz und autonom in einer Zelllinie repliziert, d.h. es können mit dem erfindungsgemäßen System auch adaptierte HCV-Vollängengenome hergestellt werden. Da dieser Klon darüber hinaus die vollständige HCV-Sequenz besitzt, also auch die für die Viruspartikelbildung notwendigen Strukturproteine, ist es mit diesem System möglich, große Mengen infektiöser Viruspartikel in Zellkulturen herzustellen. Zum Nachweis dieser Viren werden zellfreie Überstände von Zellen, die ein replizierendes HCV-Vollängengenom tragen, auf naive Huh-7 Zellen gegeben und die so infizierten Zellen einer Selektion mit G418 unterzogen. Jeder Zellklon, der unter diesen Bedingungen auswächst, geht auf eine infizierte Zelle zurück. Die Viren in den Zellkulturüberständen von Zellen, die ein replizierendes HCV-Vollängengenom besitzen, können aber auch mit verschiedenen im Stand der Technik bekannten Verfahren wie Ultrazentrifugation oder Mikrodialyse angereichert und gereinigt werden und dann zur Infektion naiver Zellen verwendet werden. Mit diesem Verfahren ist eindeutig gezeigt, daß mit dem erfindungsgemäßen HCV-Zellkultursystem zellkultur-adaptierte HCV-Vollängengenome hergestellt werden können, die mit hoher Effizienz in Zellen replizieren und infektiöse Viren produzieren. Diese können ebenfalls durch Infektion eines Versuchstiers, vorzugsweise dem Schimpansen, nachgewiesen werden.

Beispiel 9: Herstellung von HCV-Vollängen-Konstrukten und HCV-Subgenom-Konstrukten mit Reportergen.

[0072] Es wird ein HCV-RNA-Konstrukt hergestellt, bei dem anstelle des Antibiotikumresistenzgens ein Reportergen eingefügt wird (Fig. 13). Dabei kann die Replikation anhand der Menge bzw. der Aktivität des Reportergens bzw. Reportergenprodukts bestimmt werden. Das Reportergen ist vorzugsweise ein Gen aus der Gruppe der Luziferasegene, dem CAT-Gen (Chloramphenicol-Acetyl-Transferase-Gen), dem lacZ-Gen (beta-Galaktosidasegen), dem GFP-Gen (green fluorescence protein Gen), dem GUS-Gen (Glukuronidasegen) oder dem SEAP-Gen (sezernierte alkalische Phosphatasegen). Diese Reportergene bzw. deren Produkte, nämlich die entsprechenden Reporterproteine, können z.B. mittels Fluoreszenz, Chemilumineszenz, colorimetrisch oder mit Hilfe immunologischer Methoden (z.B. enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) bestimmt werden. Das Reportergen kann entweder von einer eigenen IRES exprimiert werden oder in Form eines Fusionsproteins, das entweder als solches aktiv ist oder mittels einer proteolytisch spaltbaren Aminosäuresequenz so mit einem HCV-Protein verbunden ist, daß es von einer zellulären oder viralen (HCV-)Protease von diesem abgespalten wird.

Beispiel 10: Herstellung von HCV-Vollängen-Konstrukten mit integrierten Fremdgenen zur Verwendung als leberzellspezifische Genfahre für die Gentherapie oder als Expressionsvektor.

[0073] Das Konstrukt (Fig. 14) wird in Zellen eingeschleust und führt dort zur Bildung von HCV-Viruspartikeln, die zur Infektion weiterer Zellen verwendet werden können. Da die Viruspartikel eine RNA mit einem Fremdgen enkapsidiert haben kann dieses in den so infizierten Zellen zur Produktion des von diesem Fremdgen kodierten Proteins benutzt werden. Zellen, die mit dem Konstrukt transfiziert wurden, exprimieren ebenfalls das Fremdgen.

Beispiel 11: Herstellung von monocistronischen HCV-RNA-Konstrukten, bei denen das Resistenzgenprodukt als Fusionsprotein mit dem HCV-Anteil expriert wird.

[0074] Für bestimmte Untersuchungen ist es von Vorteil, wenn das HCV-RNA-Konstrukt kein heterologes IRES-Element besitzt. Solche Untersuchungen sind beispielsweise die Bestimmung der Interferonresistenz. Wird eine Zelle, die ein HCV-RNA-Konstrukt besitzt, mit Interferon-alpha oder -beta inkubiert, kommt es zu einer Reduktion der Replikation der HCV-RNA. Zur Aufklärung des Wirkungsmechanismus ist es notwendig, daß das HCV-RNA-Konstrukt keine heterologe IRES besitzt, da ansonsten nicht bestimmt werden kann, ob die Interferon-vermittelte Hemmung durch eine Hemmung der HCV-Replikation oder durch eine Hemmung der heterologen IRES vermittelt wird. Deshalb werden Konstrukte hergestellt, bei denen das Resistenzgen mit einem HCV-Protein fusioniert wird (Fig. 15). Entweder das Fusionsprotein ist als solches aktiv, oder das Resistenzgenprodukt wird mittels einer proteolytisch spaltbaren Aminosäuresequenz so mit einem HCV-Protein verbunden ist, daß es von einer zellulären oder viralen (HCV-)Protease von diesem abgespalten wird.

Tabelle 1

Spezifische Infektiositäten (cfu/µg RNA) der HCV-RNA-Konstrukte mit adaptiven Mutationen, die bei der 9-13F Mutante gefunden und in das parentale HCV-RNA-Konstrukt I ₃₈₉ /NS3-3'/wt eingeführt wurden		
Aminosäureaustausch ¹	HCV-Protein	cfu/µg RNA ²
kein		30 - 60
1283 arg -> gly	NS3	200 - 250
1383 glu -> ala	NS3	30 - 60
1577 lys -> arg	NS3	30 - 60
1609 lys -> glu	NS3	160 - 300
(1283 arg -> gly + 1383 glu -> ala + 1577 lys -> arg + 1609 lys -> glu)	NS3	360 - 420
1936 pro -> ser	NS4B	500 - 1000
2163 glu -> gly	NS5A	1000-5000
2330 lys -> glu	NS5A	30 - 60
2442 ile -> val	NS5B	30 - 60
alle zusammen		5000

¹ Aminosäureaustausch im Polyprotein des HCV-Isolats Con-1 (EMBL-Genbank No. AJ238799); die Aminosäuren sind im Dreibuchstabenkode angegeben.

² Colony forming units (Anzahl der Zellklone) bei einer Selektion von 500µg/ml G418.

Tabelle 2

Spezifische Infektiositäten (cfu/µg RNA) des parentalen HCV-RNA-Konstrukts I ₃₈₉ /NS3-3'/wt und der Varianten 9-13C, 9-13I, 9-13F, 5.1 und 19.	
Transfizierte RNA-Variante	cfu/µg RNA ¹
Wildtyp	30 - 50

¹ Colony forming units (Anzahl der Zellklone) bei einer Selektion von 500µg/ml G418.

EP 1 043 399 B9 (W1B1)

Tabelle 2 (fortgesetzt)

Spezifische Infektiositäten (cfu/μg RNA) des parentalen HCV-RNA-Konstrukts I ₃₈₉ /NS3-3'/wt und der Varianten 9-13C, 9-13I, 9-13F, 5.1 und 19.	
Transfizierte RNA-Variante	cfu/μg RNA ¹
9-13 C	100 - 1.000
9-13 I	100 - 1.000
9-13 F	1.000 - 10.000
5.1	50.000 - 100.000
19	50.000 - 100.000

¹ Colony forming units (Anzahl der Zellklone) bei einer Selektion von 500μg/ml G418.

Tabelle 3

Nukleotid- und Aminosäureunterschiede zwischen dem parentalen HCV-RNA-Konstrukt I ₃₈₉ /NS3-3'/wt und den Mutanten 9-13I, 9-13F, 5.1 und 19			
HCV Mutante	Nukleotidposition	Nukleotidaustausch	Aminosäureaustausch
9-13 I	3685	C > T	Pro > Leu
	4933	C > T	Thr > Met
	5249	T > C	-
	8486	C > T	-
	8821	G > A	Trp > stop
	8991	C > G	Arg > Gly
	9203	A > G	-
	9313	T > C	Phe > Ser
	9346	T > C	Val > Ala
9-13 F	3866	C > T	-
	4188	A > G	Arg > Gly
	4489	A > C	Glu > Ala
	4562	G > A	-
	4983	T > C	-
	5071	A > G	Lys > Arg
	5166	A > G	Lys > Glu
	6147	C > T	Pro > Ser
	6829	A > G	Glu > Gly
	7329	A > G	Lys > Glu
NK5.1	7664	A > G	Ile > Val
	8486	C > T	-
	8991	C > G	Arg > Gly
	4180	C > T	Thr > Ile
	4679	C > T	-
	4682	T > C	-

EP 1 043 399 B9 (W1B1)

Tabelle 3 (fortgesetzt)

Nukleotid- und Aminosäureunterschiede zwischen dem parental HCV-RNA-Konstrukt I₃₈₉/NS3-3'/wt und den Mutanten 9-13I, 9-13F, 5.1 und 19

HCV Mutante	Nukleotidposition	Nukleotidaustausch	Aminosäureaustausch
	5610	C > A	Leu > Ile
	6437	A > G	-
	6666	A > G	Asn > Asp
	6842	C > T	-
	6926	C > T	-
	6930	T > C	Ser > Pro
	7320	C > T	Pro > Ser
	7389	A > G	Lys > Glu
NK19	3946	A > G	Glu > Gly
	4078	C > G	Ala > Gly
	4180	C > T	Thr > Ile
	4682	T > C	-
	5610	C > A	Leu > Ile
	5958	A > T	Met > Leu
	6170	T > A	-
	6596	G > A	-
	6598	C > G	Ala > Gly
	6833	C > T	-
	6842	C > T	-
	6930	T > C	Ser > Pro
	7141	A > G	Glu > Gly
	7320	C > T	Pro > Ser
	7389	A > G	Lys > Glu
	7735	G > A	Ser > Asn

[0075] Angegeben sind die Unterschiede der Nukleotid- und Aminosäuresequenzen zwischen der Ausgangs-HCV-RNA-Sequenz Con 1 (EMBL-Genbank No. AJ238799) und denen der zellkulturadaptierten HCV-RNAs. Die Zahlen beziehen sich auf die Nukleotid- und Aminosäurepositionen des HCV-Isolats Con1.

SEQUENCE LISTING

<110> Bartenschlager, Ralf

<120> Hepatitis C Virus cell culture system

<130> ba-1

<140> 199 15 178.4

<141> 1999-04-03

<160> 11

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 11076

<212> DNA

<213> Hepatitis C Virus

<400> 1

```

gccagccccc gattgggggg gacactccac catagatcac tcccctgtga ggaactactg 60
tcttcacgca gaaagcgtct agccatggcg ttagtatgag tgtcgtgcag cctccaggac 120
ccccctccc gggagagcca tagtggctcg cggaaccggg gagtacaccg gaattgccag 180
gacgaccggg tcctttcttg gatcaaccgg ctcaatgcct ggagatttgg gcgtgcccc 240
gcgagactgc tagccgagta gtgttggtgc gcgaaaggcc ttgtggtact gcctgatagg 300
gtgcttgcca gtgccccggg aggtctcgta gaccgtgcac catgagcacg aatcctaacc 360
ctcaaagaaa aaccaaaccg aacaccaacg ggcgcgccat gattgaacaa gatggattgc 420
acgcagggtc tccggccgct tgggtggaga ggctattcgg ctatgactgg gcacaacaga 480
caatcggtcg ctctgatgcc gcogtgttcc ggctgtcagc gcagggggcg cgggttcttt 540
ttgtcaagac cgacctgtcc ggtgccctga atgaactgca ggacgaggca gcgcggctat 600
cgtggctggc cacgacgggc gttccttgcg cagctgtgct cgacgttgct actgaagcgg 660
gaagggactg gctgctattg ggcgaaagtgc cggggcagga tctcctgtca tctcaccttg 720
ctcctgccga gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg gcggctgcat acgcttgatc 780
cggctacctg cccattcgac caccaagcga aacatcgcat cgagcgagca cgtactcgga 840
tggaagccgg tcttgtcgat caggatgatc tggacgaaga gcacagggg ctcgcgccag 900
ccgaactggt cggcaggctc aaggcgcgca tgcccagcg cgaggatctc gtcgtgacct 960
atggcgatgc ctgcttgccg aatatcatgg tggaaaatgg ccgcttttct ggattcatcg 1020
actgtggcgg gctgggtgtg gcggaccgct atcaggacat agcgttggct acccgtgata 1080
ttgtctgaaga gcttggcggc gaatgggctg accgcttctc cgtgctttac ggtatcgccg 1140
ctcccgattc gcagcgcatc gccttctatc gccttcttga cgagttcttc tgagtttaaa 1200
cagaccacaa cggtttccct ctagecggat caattccgcc cctctccctc cccccccct 1260
aacgttactg gccgaagcgg cttggaataa ggccggtgtg cgtttgtcta tatgttattt 1320
tccaccatat tgccgtcttt tggcaatgtg agggcccgga aacctggccc tgtcttcttg 1380
acgagcatte ctagggtctt tccccctctc gccaaaggaa tgcaaggctc gttgaatgtc 1440
gtgaaggagg cagttcctct ggaagcttct tgaagacaaa caacgtctgt agcgaccctt 1500
tgacggcagc ggaaccccc cctggcgac aggtgcctct gcggccaaaa gccacgtgta 1560
taagatacac ctgcaaggcg ggcacaaccc cagtgccacg ttgtgagttg gatagttgtg 1620
gaaagagtca aatggctctc ctcaagcgta ttcaacaagg ggctgaagga tgcccagaag 1680
gtaccccatg gtatgggata tgatctgggg cctcgggtca catgctttac atgtgtttag 1740
tcgaggttaa aaaacgtcta ggcccccgga accacgggga cgtggttttc ctttgaaaaa 1800
cacgataata ccatgggcac gaatcctaaa cctcaaaaga aaaccaaacc taacaccaac 1860
cgccgcccac aggacgtcaa gttcccgggc ggtggtcaga tcgtcgggtg agtttacctg 1920
ttgccgcgca ggggccccag gttgggtgtg cgcgcgacta ggaagacttc cgagcggctg 1980
caacctcggt gaaggcgaca acctatcccc aaggctcgcc agcccagggg tagggcctgg 2040
gctcagcccg ggtacccttg gccctctat ggcaatgagg gcttggggtg ggcaggatgg 2100
tctctgtcac cccgtggtc tcggcctagt tggggcccca cggacccccg gcgtaggctg 2160
cgcaatttgg gtaaggctat cgataccctc acgtgcggct tcgccgatct catggggtac 2220
attccgctcg tcggcgcccc cctagggggc gctgccaggg ccctggcgca tggcgctccg 2280
gttctggagg acggcgtgaa ctatgcaaca gggaatctgc ccggttgcct cttttctatc 2340
ttccttttgg ctttgtgtgc atccttgacc atccagctt ccgcttatga agtgcgcaac 2400
gtatccggag tgtaccatgt cacgaacgac tgctccaacg caagcattgt gtatgaggca 2460
gcggacatga tcatgcatac cccgggtgct gtgccctgct ttcgggagaa caactcctcc 2520
cgctgctggg tagcgctcac tcccacgctc gcggccagga acgctagcgt cccactacg 2580
acgatacgac gccatgtcga tttgctcgtt gggggcgctg ctctctgctc cgctatgtac 2640
gtgggagatc tctgcggatc tgttttctc tcgcccagc tgttcacctt ctgcctcgc 2700

```

	cgccacgaga	cagtacagga	ctgcaattgc	tcaatatatc	ccggccacgt	gacaggtcac	2760
	cgtatggctt	gggatatgat	gatgaactgg	tcacctacag	cagccctagt	ggtatcgag	2820
	ttactcogga	tcccacaagc	tgtcgtggat	atggtggcgg	gggcccattg	gggagtccta	2880
5	gcgggccttg	cctactattc	catgggtggg	aactgggcta	aggttctgat	tgtgatgcta	2940
	ctctttgcog	gcgttgacgg	gggaacctat	gtgacagggg	ggacgatggc	caaaaacacc	3000
	ctcgggatta	cgtccctctt	ttcacccggg	tcataccaga	aaatccagct	tgtaaacacc	3060
	aacggcagct	ggcacatcaa	caggactgcc	ctgaactgca	atgactccct	caacactggg	3120
	ttccttgctg	cgctgttcta	cgtagacaag	ttcaactcat	ctggatgccc	agagcgcatg	3180
10	gccagctgca	gccccatcga	cgcgttcgct	caggggtggg	ggcccatcac	ttacaatgag	3240
	tcacacagct	cggaccagag	gccttattgt	tggcactacg	caccccgccc	gtgcggtatc	3300
	gtaccocgag	cgcaggtgtg	tgggtccagt	tactgcttca	ccccaagccc	tgctcgtggtg	3360
	gggacgaccg	accggttcgg	cgccctacg	tacagttggg	gggagaatga	gacggacgtg	3420
	ctgcttctta	acaacacggg	gccgcgcaa	ggcaactggg	ttggctgtac	atggatgaat	3480
	agcactgggt	tcaccaagac	gtgcgggggc	cccccggtga	acatcggggg	gatcggaat	3540
	aaaaccttga	cctgccccac	ggactgcttc	cggaagcacc	ccgagggcac	ttacaccaag	3600
15	tgtggttcgg	ggccttggtt	gacaccaga	ctcttggtcc	actaccata	caggctttgg	3660
	cactacccct	gcactgtcaa	ctttaccatc	ttcaagggtta	ggatgtacgt	ggggggagtg	3720
	gagcacaggc	tcgaagccgc	atgcaattgg	actcgaggag	agcgttgtaa	cctggaggac	3780
	agggacagat	cagagcttag	cccgtctgtg	ctgtctacaa	cggagtggca	ggtattgccc	3840
	tgttcttcta	ccacctacc	ggctctgtcc	actggtttga	tccatctcca	tcagaacgtc	3900
	gtgtagctac	aatacctgta	cgttataggg	tcggcggttg	tctcctttgc	aatcaaatgg	3960
20	gagtagtctc	tgttctctct	cttctctctg	gcggacgcgc	gcgtctgtgc	ctgcttgggg	4020
	atgatgctgc	tgatagctca	agctgaggcc	gccctagaga	acctgggtgt	cctcaacggg	4080
	gcatccgtgg	ccggggcgca	tggcattctc	tccttctctg	tgcttctctg	tgctgctgtg	4140
	tacatcaagg	gcaggctggt	ccctggggcg	gcatatgccc	tctacggcgt	atggccgcta	4200
	ctcctgctcc	tgtggtcggt	accaccaga	tcatacgcca	tggaccggga	gatggcaga	4260
	tcgtgcggag	gcgcggtttt	cgtaggtctg	atactcttga	ccttgctacc	gcactataag	4320
25	ctgttctctg	ctaggctcat	atggtgggta	caatatctta	tcaccagggc	cgaggcacac	4380
	ttgcaagtgt	ggatccccc	cctcaacggt	cggggggggc	gcgatgccgt	catcctctc	4440
	acgtgcgcga	tcaccaccaga	gctaactctt	accatcacca	aaatcttget	cgccatactc	4500
	gggtccactca	tgtgtctcca	ggctgggtata	accaaagtgc	cgtacttctg	gcgcgcacac	4560
	gggtcatttc	gtgcatgcat	gctggtgcgg	aaggttgctg	ggggtcatta	tgtccaaatg	4620
	gctctcatga	agttggccgc	actgacaggt	acgtacgttt	atgaccatct	cacccactct	4680
30	cgggactggg	cccacgcggg	cctacgagac	cttgcggttg	cagttgagcc	cgctcgtctc	4740
	tctgatattg	agaccaaggt	tatcacctgg	ggggcgagca	ccgcggcggt	tggggacatc	4800
	atcttgggac	tgcccgtctc	cgcccgaggg	gggagggaga	tacatctggg	accggcagac	4860
	agccttgaag	ggcaggggtg	gcgactctc	gcgcctatta	cggcctactc	ccaacagacg	4920
	cgaggccctac	ttggctgcat	catcactagc	ctcacaggcc	gggacaggaa	ccaggtcgag	4980
	ggggaggtcc	aagtgtctc	caccgcaaca	caatctttcc	tggcgacctg	cgtcaatggc	5040
35	gtgtgttggg	ctgtctatca	tgggtgccgg	tcaaagacc	ttgccggccc	aaagggccca	5100
	atcacccaaa	tgtacaccaa	tgtggaccag	gacctcgctg	gctggcaagc	gcccccggg	5160
	gcgcgttctc	tgacaccatg	cacctgcggc	agctcggacc	tttacttggt	cacgaggcat	5220
	gccgatgtca	ttccggtgcg	ccggcggggc	gacagcaggg	ggagcctact	ctccccagg	5280
	ccgctctcct	acttgaaggg	ctcttcgggc	ggtccactgc	tctgcccctc	ggggcacgct	5340
	ctgggcatct	ttcgggctgc	cgtgtgcacc	cgaagggttg	cgaaggcggt	ggactttgta	5400
	ccgtcagagt	ctatgaaac	cactatgcgg	tccccggtct	tcacggacaa	ctcgtcccct	5460
40	ccggccgtac	cgcagacatt	ccagggtggc	catctacacg	cccctactgg	tagcggcaag	5520
	agcactaagg	tgccggctgc	gtatgcagcc	caagggtata	aggtgcttgt	cctgaaccgg	5580
	tcgctcgccg	ccaccctagg	tttcggggcg	tatatgtcta	aggcacatgg	tatcgaccct	5640
	aacatcagaa	ccggggtaag	gaccatcacc	acgggtgccc	ccatcacgta	ctccacctat	5700
	ggcaagtttc	ttgccgacgg	tgggtgctct	ggggcgccct	atgacatcat	aatatgtgat	5760
45	gagtgcact	caactgactc	gaccactatc	ctgggcatcg	gcacagtcct	ggaccaagcg	5820
	gagacggctg	gagcgcgact	cgctcgtgct	gccaccgcta	cgctccggg	atcggtcacc	5880
	gtgccacatc	caaacatcga	ggaggtggct	ctgtccagca	ctggagaaat	ccccttttat	5940
	ggcaaagcca	tccccatcga	gaccatcaag	ggggggaggc	acctcatttt	ctgccattcc	6000
	aagaagaaat	gtgatgagct	cgccgcgaag	ctgtccggcc	tcggactcaa	tgtcgtagca	6060
	tattaccggg	gccttgatgt	atccgtcata	ccaactagcg	gagacgtcat	tgtcgtagca	6120
	acggacgctc	taatgacggg	ctttaccggc	gatttcgact	cagtgtatga	ctgcaatata	6180
50	tgtgtcacc	agacagtcga	cttcagcctg	gacccgacct	tcaccattga	gacgacgacc	6240
	gtgccacaa	acgcgggtgc	acgctcgcag	cggcgaggca	ggactggtag	gggcaggatg	6300
	ggcattttaca	ggtttgtgac	tccaggagaa	cgccctcgcg	gcatgttcga	ttcctcggtt	6360
	ctgtgcgagt	gctatgacgc	gggctgtgct	tggtagagc	tcacgcccgc	cgagacctca	6420
	gttaggttgc	gggcttacct	aaacacacca	gggttgcccg	tctgccagga	ccatctggag	6480
	ttctggggaga	gcgtctttac	aggcctcacc	cacatagacg	cccatttctt	gtcccagact	6540
55	aagcaggcag	gagacaactt	cccctacctg	gtagcatacc	aggctacggg	gtgcgcagg	6600
	gctcaggctc	cacctccatc	gtgggaccaa	atgtggaagt	gtctcatcac	gctaaagcct	6660

	acgctgcacg	ggccaacgcc	cctgctgtat	aggetggggag	ccgttcaaaa	cgaggttact	6720
	accacacacc	ccataaccaa	atacatcatg	gcatgcatgt	cggtgacct	ggaggtcgtc	6780
	acgagcacct	gggtgctggt	aggcggagtc	ctagcagctc	tggccgcgta	ttgcctgaca	6840
5	acaggcagcg	tggtcattgt	gggcaggatc	atcttgtccg	gaaagccggc	catcattccc	6900
	gacagggaag	tcctttaccg	ggagttcgat	gagatggaag	agtgcgcctc	acacctccct	6960
	tacatcgaa	agggaaatgca	gctcgcgcaa	caattcaaac	agaaggcaat	cgggttgctg	7020
	caaacagcca	ccaagcaagc	ggaggtgct	gctcccgtgg	tggaaatccaa	gtggcggacc	7080
	ctcgaagcct	tctgggagaa	gcatatgtgg	aatttcacat	gcgggataca	atatttagca	7140
	ggcttgtcca	ctctgcctgg	caaccccgcg	atagcatcac	tgatggcatt	cacagcctct	7200
10	atcaccagcc	cgctcaccac	ccaacatacc	ctcctgttta	acatcctggg	gggatgggtg	7260
	gccgcccaac	ttgctcctcc	cagcgtgct	tctgctttcg	taggcgcggg	catcgctgga	7320
	gcggtgtgtg	gcagcatagg	ccttgggaa	gtgcttgtgg	atattttggc	aggttatgga	7380
	gcaggggtgg	caggcgcgct	cgtggccttt	aaggtcatga	gcggcgagat	gccctccacc	7440
	gaggacctgg	ttaacctact	ccctgctatc	ctctcccctg	gcgccctagt	cgtcggggtc	7500
	gtgtgcgcag	cgatactgcg	tcggcacgtg	ggcccagggg	agggggctgt	gcagtggatg	7560
15	aaccggctga	tagcgttcgc	ttcgcgggg	aaccacgtct	ccccacgca	ctatgtgcct	7620
	gagagcgacg	ctgcagcacg	tgtcactcag	atcctctcta	gtcttaccat	cactcagctg	7680
	ctgaagaggc	ttcaccagtg	gatcaacgag	gactgctcca	cgccatgctc	cggctcggtg	7740
	ctaagagatg	tttgggattg	gatatgcacg	gtgttgactg	atttcaagac	ctggctccag	7800
	tccaagctcc	tgcccgatt	gccgggagtc	cccttcttct	catgtcaacg	tgggtacaag	7860
	ggagtctggc	ggggcgacgg	catcatgcaa	accacctgcc	catgtggagc	acagatcacc	7920
20	ggacatgtga	aaaacggttc	catgaggatc	gtggggccta	ggacctgtag	taacacgtgg	7980
	catggaacat	ttcccattaa	cggtacacac	acgggcccct	gcacgccttc	cccggcgcca	8040
	aattattcta	gggcgctgtg	gcgggtggct	gctgaggagt	acgtggaggt	tacgcgggtg	8100
	ggggatttcc	actacgtgac	gggcacgtgac	actgacaacg	taaaagtccc	gtgtccagtt	8160
	ccggcccccg	aattcttcac	agaagtggat	gggtgctggg	tgcacaggta	cgctccagcg	8220
	tgcaaacccc	tcctacggga	ggaggtcaca	ttcctggtcg	ggctcaatca	atacctgggt	8280
25	gggtcacagc	ttccatgcga	gcccgaaccg	gacgtagcag	tgtcacttcc	catgctcacc	8340
	gacccctccc	acattacggc	ggagacggct	aagcgtaggc	tggccagggg	atctcccccc	8400
	tccttggcca	gctcatcagc	tagccagctg	tctgcgcctt	ccttgaaggc	aacatgcact	8460
	accctgcatg	actccccgga	cgctgacctc	atcgaggcca	acctcctgtg	gcggcaggag	8520
	atgggcggga	acatcacccg	cgtggagtca	gaaaataagg	tagtaatttt	ggactctttc	8580
	gagccgctcc	aagcggagga	ggatgagagg	gaagtatccg	ttccggcgga	gatcctgcgg	8640
30	aggtccagga	aattccctcg	agcgatgccc	atatgggcac	gcccggatta	caaccctcca	8700
	ctgttagagt	cctggaagga	cccggactac	gtccctccag	tgttacaacg	gtgtccattg	8760
	ccgctgccca	aggccctcc	gataccacct	ccacggagga	agaggacggg	tgtcctgtca	8820
	gaatctaccg	tgtcttctgc	cttggcggag	ctcgccacaa	agaccttcgg	cagctccgaa	8880
	tcgtcggccg	tcgacagcgg	cacggcaacg	gcctctcctg	accagccctc	cgacgacggc	8940
	gacgcgggat	ccgacgttga	gtcgtactcc	tcctatgccc	cccttgaggg	ggagccgggg	9000
35	gatcccgatc	tcagcgacgg	gtcttggctc	accgtaagcg	aggaggctag	tgaggacgtc	9060
	gtctgctgct	cgatgtccta	cacatggaca	ggcgccctga	tcacgcatg	cgctgcggag	9120
	gaaaccaagc	tgccatcaa	tgcactgagc	aactctttgc	tcctgcacca	caacttggtc	9180
	tatgtacaaa	catctcgcat	cgcaagcctg	cggcagaaga	aggtcacctt	tgacagactg	9240
	caggtcctgg	acgaccacta	ccgggacgtg	ctcaaggaga	tgaaggcgaa	ggcgtccaca	9300
	gttaaggcta	aacttctatc	cgtggaggaa	gcctgtaagc	tgacgcccc	acattcgcc	9360
40	agatctaagt	ttggctatgg	ggcaaaggac	gtccggaacc	tatccagcaa	ggccgttaac	9420
	cacatccgct	ccgtgtggaa	ggacttgcgt	gaagacactg	agacaccaat	tgacaccacc	9480
	atcatggcaa	aaaatgaggt	tttctgcgtc	caaccagaga	agggggggcg	caagccagct	9540
	cgcttatcgt	tattcccaga	tttgggggtt	cgtgtgtgcg	agaaaatggc	cctttacgat	9600
	gtggtctcca	ccctccctca	ggccgtgatg	ggctcttcat	acggattcca	atactctcct	9660
	ggacagcggg	tcgagttcct	ggtgaatgcc	tggaaaagcga	agaaatgcc	tatgggcttc	9720
45	gcatatgaca	cccgtgtttt	tgaactcaacg	gtcactgaga	atgacatccg	tgttgaggag	9780
	tcaatctacc	aatgttgtga	cttggccccc	gaagccagac	aggccataag	gtcgctcaca	9840
	gagcggcttt	acatcggggg	ccccctgact	aattctaaag	ggcagaactg	cggctatcgc	9900
	cggtgccgcg	cgagcgggtg	actgacgacc	agctgcggta	ataccctcac	atgttacttg	9960
	aaggccgctg	cggcctgtcg	agctgcgaag	ctccaggact	gcacgatgct	cgtatgcgga	10020
	gacgaccttg	tcgttatctg	tgaaagcgcg	gggacccaag	aggacgaggc	gagcctacgg	10080
50	gccttcacgg	aggctatgac	tagatactct	gccccccctg	gggacccggc	caaaccagaa	10140
	tacgacttgg	agttgataac	atcatgctcc	tccaatgtgt	cagtcgcgca	cgatgcatct	10200
	ggcaaaaggg	tgtactatct	caccogtgac	cccaccaccc	cccttgccgcg	ggctgcgtgg	10260
	gagacagcta	gacacactcc	agtcatttcc	tggctaggca	acatcatcat	gtatgcgccc	10320
	accttgtggg	caaggatgat	cctgatgact	catcttctct	ccatccttct	agctcaggaa	10380
	caacttgaaa	aagccctaga	ttgtcagatc	tacggggcct	gttactccat	tgagccactt	10440
	gacctacctc	agatcattca	acgactccat	ggccttagcg	catttttact	ccatagttag	10500
55	tcctccaggtg	agatcaatag	ggtggcttca	tgcctcagga	aacttggggg	accgcccttg	10560
	cgagtctgga	gacatcgggc	cagaagtgtc	cgcgctaggc	tactgtccca	ggggggggag	10620

EP 1 043 399 B9 (W1B1)

	gctgccactt	gtggcaagta	cctcttcaac	tgggcagtaa	ggaccaagct	caaactcact	10680
	ccaatcccg	ctgcgtccca	gttggattta	tccagctggt	tcgttgctgg	ttacagcggg	10740
5	ggagacatat	atcacagcct	gtctcgtgcc	cgaccccgct	ggttcatgtg	gtgcctactc	10800
	ctactttctg	taggggtagg	catctatcta	ctccccaacc	gatgaacggg	gagctaaaca	10860
	ctccaggcca	ataggccatc	ctgttttttt	cccttttttt	ttttcttttt	tttttttttt	10920
	tttttttttt	tttttttttc	tccttttttt	ttctcttttt	tttccttttc	tttcctctgg	10980
	tggctccatc	ttagccctag	tcacggctag	ctgtgaaagg	tccgtgagcc	gcttgactgc	11040
10	agagagtgct	gatactggcc	tctctgcaga	tcaagt			11076

15

20

25

30

35

40

45

50

55

<210> 2
 <211> 8637
 <212> DNA
 <213> Hepatitis C Virus

<400> 2

```

gccagccccc gattgggggc gacactccac catagatcac tcccctgtga ggaactactg 60
tcttcacgca gaaagcgtct agccatggcg ttagtatgag tgcgtgcag cctccaggac 120
ccccctccc gggagagcca tagtggtctg cggaaccggt gagtacaccg gaattgccag 180
10 gacgaccggg tcctttcttg gatcaaccgc ctcaatgcct ggagatttgg gcgtgcccc 240
gcgagactgc tagccgagta gtgttgggtc gcgaaaggcc ttgtgttact gcctgatagg 300
gtgcttgcca gtgccccggg aggtctcgta gaccgtgcac catgagcacg aatcctaaac 360
ctcaaagaaa aaccaaaggg cgcgccatga ttgaacaaga tggattgcac gcaggttctc 420
cgcccgcttg ggtggagagg ctattcggct atgactgggc acaacagaca atcggctgct 480
ctgatgccgc cgtgttccgg ctgtcagcgc aggggcgccc gggtcttttt gtcaagaccg 540
15 acctgtccgg tgcctgaat gaactgcagg acgaggcagc gcggtatcgc tggctggcca 600
cgacgggctg tccttgcgca gctgtgctcg acgttgtcac tgaagcggga agggactggc 660
tgctatttgg cgaagtgccg gggcaggatc tcctgtcatc tcaccttgc cctgccgaga 720
aagtatccat catggctgat gcaatgcggc ggctgcatac gcttgatccg gctacctgcc 780
cattcgacca ccaagcgaaa catcgcacgc agcagcacg tactcgatg gaagccggtc 840
10 ttgtcgatca ggtgatctg cagcaagagc atcaggggct cgcgccagcc gaactgttcg 900
ccaggctcaa gcgcgcgatg cccgacggcg aggatctcgt cgtgacctat ggcatgcct 960
gcttgccgaa tatcatggtg gaaaatggcc gcttttcttg attcatcgac tgtggccggc 1020
tgggtgtggc ggaccgctat caggacatag cgttggttac ccgtgatatt gctgaagagc 1080
ttggcggcga atgggctgac cgcttcctcg tgctttacgg tatcgccgct ccgattcgc 1140
agcgcacgc ctcttatcgc ctcttgacg agttctctg agtttaaaca gaccacaacg 1200
25 gtttccctct agcgggatca attcgcgcc tcctccctccc ccccccctaa cgttactggc 1260
cgaagccgct tgaataagg ccggtgtgcg tttgtctata tgttattttc caccatattg 1320
ccgtcttttg gcaatgtgag ggcccgaaa cctggccctg tctcttgac gagcattcct 1380
aggggtcttt cccctctcgc caaagggaatg caaggtctgt tgaatgtcgt gaaggaagca 1440
gttccctctg aagcttcttg aagacaaaac acgtctgtag cgaccctttg caggcagcgg 1500
aacccccac ctggcgacag gtgcctctgc ggccaaaagc cacgtgtata agatacacct 1560
30 gcaaaaggcg cacaacccca gtgccacggt gtgagttgga tagttgtgga aagagtcaaa 1620
tggtctcct caagcgtatt caacaagggg ctgaaggatg ccagaagggt accccattgt 1680
atgggatctg atctggggcc tcggtgcaca tgctttacat gtgtttagtc gaggttaaaa 1740
aacgtctagg ccccccgaac cacggggacg tggttttcct ttgaaaaaca cgataatacc 1800
atggaccggg agatggcagc atcgtgcgga ggccgggtt tcgtagggtc gatactcttg 1860
acctgtgcac cgcactataa cgtgttctc tataggctca tatggtggtt acaatatatt 1920
35 atcaccaggg ccgaggcaca cttgcaagtg tggatcccc cctcaacgt tcgggggggc 1980
cgcatgccc tcacctcct cacgtgcgag atccaccag agctaattct taccatcac 2040
aaaatcttgc tcgccatact cggccactc atggtgctcc aggtcggtat aaccaaagt 2100
cgtacttctg tgcgcgcaca cgggtcatt cgtgcatgca tgcgtgtgag gaaggttgct 2160
40 ggggtcatt atgtccaaat ggctctcatg aagtggccg cactgacagg tacgtacggt 2220
tatgaccatc tcacccact gcgggactgg gccacgcgg gcctacgaga ccttgcggtg 2280
gcagttgagc ccgtcgtctt ctctgatag gagaccaagg ttatcacctg gggggcagac 2340
accgcggcgt gtggggacat catcttgggc ctgcccgtct ccgcccgag ggggaggag 2400
atacatctgg gaccggcaga cagcctgaa gggcaggggt ggcgactcct cgcgcctatt 2460
acggcctact cccaacagac gcgaggccta ctggctgca tcatcactag cctcacaggc 2520
cgggacagga accaggtcga gggggaggtc caagtgtct ccaccgcaac acaatctttc 2580
ctggcgacct gcgtcaatgg cgtgtgttgg actgtctatc atggtgccgg ctcaaagacc 2640
45 cttgccggcc caaaggccc aatcacccaa atgtacacca atgtggacca ggacctcgtc 2700
ggctggcaag cgcgcccg ggcggttcc ttgacaccat gcacctgcgg cagctcggac 2760
ctttacttgg tcacgaggca tgccgatgac attcgggtgc gccggcgggg cgacagcagg 2820
ggagccctac tctcccacg gccctctcc tacttgagg gctcttcggg cgttccactg 2880
ctctgccctc cggggcacgc tgtgggcatc tttcgggctg ccgtgtgcac ccgaggggtt 2940
gcgaaggcgg tggactttgt acccgtcgag tctatggaaa ccactatgag gtccccggtc 3000
50 ttcacggaca actcgtcccc tccggccgta ccgcagacat tccagggtgg ccatctacac 3060
gcccctactg gtagcggcaa gagcactaag gtgcggctg cgtatgcagc ccaagggtat 3120
aagtgcttg tcctgaacct gtccgtcgcc gccaccctag gtttcggggc gtatatgtct 3180
aaggcacatg gtatcgacc taacatcaga accggggtaa ggaccatcac cacgggtgcc 3240
cccatcacgt actccaccta tggcaagttt cttgccgacg gtggttgcctc tgggggcgcc 3300
tatgacatca taatatgtga tgagtgcac tcaactgact cgaccactat cctgggcatc 3360
ggcacagtcc tggaccaagc ggagacggct ggagcgcgac tcgtcgtgct cgccaccgct 3420
55 acgctccgg gatcggtcac cgtgccacat ccaaacatcg aggagtggtc tctgtccagc 3480
actggagaaa tcccctttta tggcaaagcc atccccatcg agaccatcaa gggggggagg 3540

```

	cacctcattt	tctgccatto	caagaagaaa	tgtgatgagc	tcgccgcgaa	gctgtccggc	3600
	ctcggactca	atgctgtagc	atattaccgg	ggccttgatg	tatccgtcat	accaactagc	3660
	ggagacgtca	ttgtcgtagc	aacggacgct	ctaatagcgg	gctttaccgg	cgatttcgac	3720
5	tcagtgatcg	actgcaatac	atgtgtcacc	cagacagtcg	acttcagcct	ggaccgcgac	3780
	ttcaccattg	agacgacgac	cgtgccacaa	gacgcggtgt	cacgctcgca	gcggcgaggc	3840
	aggactggta	ggggcaggat	gggcattttac	aggtttgtga	ctccaggaga	acggccctcg	3900
	ggcatgttcg	attcctcggg	tctgtgcgag	tgctatgacg	cgggctgtgc	ttggtacgag	3960
	ctcacgcccg	ccgagacctc	agttagggtg	cgggcttacc	taaacacacc	agggttgccc	4020
	gtctgccagg	accatctgga	gttctgggag	agcgtcttta	caggcctcac	ccacatagac	4080
10	gcccattttct	tgtcccagac	taagcaggca	ggagacaact	tcccctacct	ggtagcatac	4140
	caggctacgg	tgtgcgccag	ggctcaggct	ccacctccat	cgtgggacca	aatgtggaag	4200
	tgtctcatac	ggctaaagcc	tacgctgcac	gggccaacgc	ccctgctgta	taggctggga	4260
	gccgttcaaa	acgaggttac	taccacacac	cccataacca	aatacatcat	ggcatgcatg	4320
	tcggctgacc	tgaggtcgt	cacgagcacc	tggtgtctgg	taggcggagt	cctagcagct	4380
	ctggcccgct	attgcctgac	aacaggcagc	gtggtcattg	tgggcaggat	catcttgtcc	4440
15	ggaaagccgg	ccatcattcc	cgacagggaa	gtcctttacc	gggagttcga	tgagatggaa	4500
	gagtgcgcct	cacacctccc	ttacatcgaa	cagggaatgc	agctcgccga	acaattcaaa	4560
	cagaaggcaa	tcgggttgct	gcaaacagcc	accaagcaag	cggaggctgc	tgctcccgtg	4620
	gtggaatcca	agtggcggac	cctcgaagcc	ttctggcgca	agcatatgtg	gaatttcac	4680
	agcgggatac	aatatttagc	aggcttgtcc	actctgcctg	gcaaccccg	gatagcatca	4740
	ctgatggcat	tcacagcctc	tatcaccagc	ccgctcacca	cccaacatac	cctcctgttt	4800
20	aacatcctgg	ggggatgggt	ggccgcctaa	cttgctcctc	ccagcgtgc	ttctgctttc	4860
	gtaggcgcgg	gcatcgctgg	agcggctgtt	ggcagcatag	gccttgggaa	ggtgcttgtg	4920
	gatattttgg	caggttatgg	agcagggttg	gcaggcgcg	tcgtggcctt	taagggtcatg	4980
	agcggcgaga	tgccctccac	cgaggacctg	gttaacctac	tcctctctat	cctctcccct	5040
	ggcgccctag	tcgtcggggg	cgtgtgcgca	gcgatactgc	gtcggcacgt	gggcccagg	5100
	gagggggctg	tgcatgtgat	gaaccggctg	atagcgttcg	cttcgggggg	taaccacgtc	5160
25	tccccacgc	actatgtgcc	tgagagcgac	gctgcagcac	gtgtcactca	gatcctctct	5220
	agtcttacca	tcactcagct	gctgaagagg	cttcaccagt	ggatcaacga	ggactgctcc	5280
	acgccatgct	ccggctcgtg	gctaagagat	gtttgggatt	ggatatgcac	ggtgttgact	5340
	gatttcaaga	cctggctcca	gtccaagctc	ctgccgcgat	tgccgggagt	cccttctctc	5400
	tcatgtcaac	gtgggtacaa	gggagtctgg	cggggcgacg	gcatcatgca	aaccacctgc	5460
	ccatgtggag	cacagatcac	cggacatgtg	aaaaacgggt	ccatgaggat	cgtggggcct	5520
30	aggacctgta	gtaaacagtg	gcatggaaca	ttccccatta	acgcgtacac	cacggggccc	5580
	tgcacgccct	ccccggcgcc	aaattattct	agggcgctgt	ggcgggtggc	tgctgaggag	5640
	tacgtggagg	ttacgcgggt	gggggatttc	cactacgtga	cgggcatgac	cactgacaac	5700
	gtaaagtgcc	cgtgtcaggt	tccggcccc	gaattcttca	cagaagtggg	tgggggtgcg	5760
	ttgcacaggt	acgctccagc	gtgcaaacc	ctcctacggg	aggaggtcac	attcctggtc	5820
	gggetcaatc	aatacctggt	tgggtcacag	ctcccatgcg	agcccgaaac	ggacgtagca	5880
35	gtgctcactt	ccatgctcac	gcaccctcc	cacattacgg	cggagacggc	taagcgtagg	5940
	ctggccaggg	gatctcccc	ctccttggcc	agctcatcag	ctagccagct	gtctgcgct	6000
	tccttgaagg	caacatgcac	taccgctcat	gactccccgg	acgctgacct	catcgaggcc	6060
	aacctcctgt	ggcggcgagg	gatgggcggg	aacatcaccc	gcgtggagtc	agaaaataag	6120
	gtagtaattt	tggactcttt	cgagccgctc	caagcggagg	aggatgagag	ggaagtatcc	6180
	gttcggcgcg	agatcctgcg	gaggtccagg	aaattccctc	gagcgatgcc	catatgggca	6240
40	cgcccgattt	acaacctccc	actgttagag	tcctggaagg	acccggacta	cgtccctcca	6300
	gtggtacacg	ggtgtccatt	gccgcctgcc	aaggcccttc	cgataccacc	tcacaggagg	6360
	aagaggacgg	ttgtcctgtc	agaatctacc	gtgtcttctg	ccttggcgga	gctcgccaca	6420
	aagaccttcg	gcagctccga	atcgtcggcc	gtcgacagcg	gcacggcaac	ggcctctcct	6480
	gaccagccct	ccgacgacgg	cgacgcggga	tcgacggtg	agtcgtactc	ctccatgcc	6540
	ccccttgagg	gggagccggg	ggatcccgat	ctcagcgacg	ggtcttggtc	taccgtaagc	6600
45	gaggaggcta	gtgaggacgt	cgtctgtctg	tcgatgtcct	acacatggac	aggcgccctg	6660
	atcacgccat	gcgctgcgga	ggaaaccaag	ctgcccatac	atgcaactgag	caactctttg	6720
	ctccgtcacc	acaacttggt	ctatgtctaca	acatctcgca	gcgcaagcct	gcggcagaag	6780
	aaggtcacct	ttgacagact	gcaggtcctg	gacgaccact	accgggacgt	gctcaaggag	6840
	atgaaggcga	aggcgtccac	agttaaggct	aaacttctat	ccgtggagga	agcctgtgag	6900
	ctgacgcccc	cacattcggc	cagatctaaa	tttggctatg	gggcaaagga	cgtccggaac	6960
50	ctatccagca	aggcgtttaa	ccacatccgc	tcogtgtgga	aggacttgct	ggaagacact	7020
	gagacaccaa	ttgacaccac	catcatggca	aaaaatgagg	ttttctcgct	ccaaccagag	7080
	aagggggggc	gcaagccagc	tcgccttatc	gtattcccag	atttgggggt	tcgtgtgtgc	7140
	gagaaaatgg	ccctttacga	tgtggtcttc	accctccctc	aggccgtgat	gggctcttca	7200
	tacggatttc	aatactctcc	tgagacagcg	gtcgagttcc	tggtgaatgc	ctggaaagcg	7260
	aagaaatgcc	ctatgggctt	cgcatatgac	accgcgtgtt	ttgactcaac	ggtcactgag	7320
	aatgacatcc	gtgttgagga	gtcaatctac	caatgttgtg	acttggcccc	cgaagccaga	7380
55	caggccataa	ggtcgctcac	agagcggcct	tacatcgggg	gccccctgac	taattctaaa	7440
	gggcagaact	gcggctatcg	ccggtgccgc	gcgagcgggt	tactgacgac	cagctgcggt	7500

EP 1 043 399 B9 (W1B1)

5 aataccctca catgttactt gaaggccgct gcggcctgtc gagctgcgaa gctccaggac 7560
 tgcacgatgc tcgtatgcgg agacgacott gtctgttatct gtgaaagcgc ggggacccaa 7620
 gaggacgagg cgagcctacg ggccttcacg gaggctatga ctagatactc tgccccccct 7680
 ggggacccgc ccaaaccaga atacgacttg gagttgataa catcatgctc ctccaatgtg 7740
 tcagtcgcgc acgatgcacg tggcaaaagg gtgtactatc tcacccgtga cccaccacc 7800
 ccccttgccg gggctgcgtg ggagacagct agacacactc cagtcaattc ctggctaggc 7860
 aacatcatca tgtatgcgcc caccttgttg gcaaggatga tcctgatgac tcatttcttc 7920
 tccatccttc tagctcagga acaacttgaa aaagccctag attgtcagat ctacggggcc 7980
 10 tgttactcca ttgagccact tgacctacct cagatcattc aacgactcca tggccttagc 8040
 gcattttcac tccatagtta ctctccagggt gagatcaata ggggtggcttc atgcctcagg 8100
 aaacttgggg taccgccctt gcgagtcctgg agacatcggg ccagaagtgt ccgcgctagg 8160
 ctactgtccc aggggggggag ggctgccact tgtggcaagt acctcttcaa ctgggcagta 8220
 aggaccaagc tcaaactcac tccaatcccg gctgcgtccc agttggattt atccagctgg 8280
 15 ttctgttctg gttacagcgg gggagacata tatcacagcc tgtctcgtgc ccgaccccg 8340
 tggttcatgt ggtgcctact cctactttct gtaggggtag gcacttatct actccccaac 8400
 cgatgaacgg ggagctaaac actccaggcc aataggccat cctgtttttt tccctttttt 8460
 tttttctttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt ctcttttttt tttcctcttt 8520
 ttttcctttt ctttcctttg gtggctccat cttagcccta gtcacggcta gctgtgaaag 8580
 20 gtccgtgagc cgcttgactg cagagagtgc tgatactggc ctctctgcag atcaagt 8637

25

30

35

40

45

50

55

<210> 3
 <211> 8001
 <212> DNA
 <213> Hepatitis C Virus

<400> 3

```

gccagccccc gattgggggc gacactccac catagatcac tcccctgtga ggaactactg 60
tcttcacgca gaaagcgtct agccatggcg ttagtatgag tgtcgtgcag cctccaggac 120
ccccctccc gggagagcca tagtggctct cggaaaccgt gactacaccg gaattgccag 180
10 gacgaaccggg tcccttcttg gatcaaccgc ctcaatgcct ggagatttgg gcgtgcccc 240
gcgagactgc tagccgagta gtgttgggtc gcgaaaggcc ttgtggtact gcctgatagg 300
gtgcttgcca gtgccccggg aggtctcgta gaccgtgcac catgagcacg aatcctaaac 360
ctcaaagaaa aaccaaacgt aacaccaacg ggcgcgccat gattgaacaa gatggattgc 420
acgcagggttc tccggccgct tgggtggaga ggctattcgg ctatgactgg gcacaacaga 480
caatcggctg ctctgatgcc gccgtgttcc ggctgtcagc gcaggggcgc ccggttcttt 540
15 ttgtcaagac cgacctgtcc ggtgccctga atgaactgca ggacgaggca gcgcggctat 600
cgtggctggc cacgacgggc gttccttgcg cagctgtgct cgacgttgct actgaagcgg 660
gaagggactg gctgctattg ggcgaagtgc cggggcagga tctcctgtca tctcaccttg 720
ctcctgccga gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg gcggctgcat acgcttgatc 780
cggctacctg cccattcgac caccaagcga aacatcgcat cgagcgagca cgtactcgga 840
tggaaagcgg tcttgtcgat caggatgatc tggacgaaga gcatcagggg ctgcgcccag 900
20 ccgaactgtt cgccaggctc aaggcgcgca tgcccgacgg cgaggatctc gtcgtgaccc 960
atggcgatgc ctgcttgccg aatatcatgg tggaaaatgg ccgcttttct ggattcatcg 1020
actgtggccg gctgggtgtg gcggaccgct atcaggacat agcgttggct acccgatgata 1080
ttgctgaaga gcttggcggc gaatgggctg accgcttctc cgtgctttac ggtatcgccg 1140
ctcccgattc tcttgcgcat gccttctatc gccttcttga cgagttcttc tgagttttaa 1200
cagaccacaa cgytttccct ctagcgggat caattccgcc cctctccctc cccccccct 1260
25 aacgttactg gccgaagccg cttggaataa ggccggtgtg cgtttgtcta tatgttattt 1320
tccaccatat tgccgtcttt tggcaatgtg agggcccgga aacctggccc tgtcttcttg 1380
acgagcattc ctagggtctt tccccctctc gccaaaggaa tgcaaggctc gttgaatgtc 1440
gtgaaggaag cagttcctct ggaagcttct tgaagacaaa caacgtctgt agcgaccctt 1500
tgagggcagg ggaaccccc acctggcgac aggtgcctct gcggccaaaa gccacgtgta 1560
taagatacac ctgcaaaggc ggcacaaccc cagtgcacg ttgtgagttg gatagttgtg 1620
30 gaaagagtca aatggctctc ctcaagcgta ttcaacaagg ggctgaagga tgcccagaag 1680
gtacccatt gtatgggatc tgatctgggg cctcggtgca catgctttac atgtgtttag 1740
tcgaggttaa aaaaagtcta gggccccgga accacgggga cgtggtttct ctttgaaaaa 1800
cacgataata ccatggcgcc tattacggcc tactccaaac agacgcgagg cctacttggc 1860
tgcatcatca ctagcctcac aggcggggac aggaaccagg tcgaggggga ggtccaagtg 1920
gtctccaccg caacacaatc tttcctggcg acctgcgtca atggcggtg ttggactgtc 1980
35 tatcatggtg ccggctcaaa gaccttggc ggcccaagg gccaatcac ccaaatgtac 2040
accaatgtgg accaggacct cgtcggtgg caagcgcccc ccggggcgcg ttccttgaca 2100
ccatgcacct cggcgagctc ggacctttac ttggtcacga ggcatgccga tgtcatctcg 2160
gtgcgcccgc gggcgacag cagggggagc ctactctccc ccaggcccg ttcctacttg 2220
aagggtctct cggcggtcc actgctctgc ccctcggggc acgctgtggg catctttcgg 2280
gctgccgtgt gcacccgagg ggttcgaag gcggtggact ttgtaccgct cgagtctatg 2340
40 gaaaccacta tgcggtcccc ggtcttcacg gacaactcgt cccctccggc cgtaccgacg 2400
acattccagg tggccatct acacgcccct actggtagcg gcaagagcac taaggtgcg 2460
gctgcgtatg cagcccaagg gtataagggt cttgtcctga acccgccgt cgcgccacc 2520
ctaggtttcg gggcgatat gtctaaggca catggtatcg accctaacat cagaaccggg 2580
gtaaggacca tcaccacggg tgccccatc acgtactoca cctatggcaa gtttcttgcc 2640
gacggtggtt gctctggggg cgcctatgac atcataatat gtgatgagtg ccaactcaact 2700
45 gactcgacca ctatcctggg actcggcaca ccctgggacc aagcggagac ggctggagcg 2760
cgactcgctc gctcggccac cgctacgcct ccgggatcgg tcaccgtgcc acatccaaac 2820
atcgaggagg tggctctgtc cagcactgga gaaatcccc tttatggcaa agccatcccc 2880
atcgagacca tcaagggggg gaggcacctc attttctgcc attccaagaa gaaatgtgat 2940
gagctcgccg cgaagctgtc cggcctcgga ctcaatgctg tagcatatta ccggggcctt 3000
gatgtatccg tcataccaac tagcggagac gtcattgtcg tagcaacgga cgctctaata 3060
50 acgggcttta ccggcgattt cgactcagtg atcgactgca atacatgtgt caccagaca 3120
gtcgacttca gcctggaccc gaccttacc attgagacga cgaccgtgcc acaagacgcy 3180
gtgtcacgct cgcagcgcg aggcaggact ggtaggggca ggatgggcat ttacagggtt 3240
gtgactccag gagaacggcc ctcgggcatg ttcgattcct cggttctgtg cgagtgtctat 3300
gacgcggtgt gtgcttggtg cgagctcacg cccgcccaga cctcagttag gttgcgggtc 3360
tacctaagca caccagggtt gcccgctgc caggaccatc tggagttctg ggagagcgct 3420
55 tttacaggcc tcaccacat agacgcccac tttctgtccc agactaagca ggcaggagac 3480
aacttccctt acctggtagc ataccaggct acggtgtgcg ccagggtcga ggctccacct 3540

```

	ccatcgtagg	accaaagtgt	gaagtgtctc	atacggctaa	agcctacgct	gcacggggcca	3600
	acgcccctgc	tgtataggct	gggagccgtt	caaaacgagg	ttactaccac	acaccccata	3660
	accaaataca	tcatggcatg	catgtcggct	gacctggagg	tcgtcacgag	cacctgggtg	3720
5	ctggtagggc	gagtcctagc	agctctggcc	cggtattgct	tgacaacagg	cagcgtgggtc	3780
	attgtgggca	ggatcatctt	gtccggaaaag	cgggccatca	ttcccgacag	ggaagtcctt	3840
	taccgggagt	tcgatgagat	ggaagagtgc	gcctcacacc	tcccttacat	cgaacaggga	3900
	atgcagctcg	ccgaacaatt	caaacagaag	gcaatcgggt	tgctgcaaac	agccaccaag	3960
	caagcggagg	ctgctgctcc	cgtggtggaa	tccaagtggc	ggaccctcga	agccttcttg	4020
	gcgaagcata	tgtggaatth	catcagcggg	atacaatatt	tagcaggctt	gtccactctg	4080
10	cctggcaacc	ccgcgatagc	atcactgatg	gcattcacag	cctctatcac	cagcccgctc	4140
	accacccaac	ataccctcct	gtttaacatc	ctggggggat	gggtggccgc	ccaacttgct	4200
	cctcccagcg	ctgcttctgc	tttcgttaggc	gcggcatcgc	ctggagcggc	tgttggcagc	4260
	ataggccttg	ggaaggtgct	tgtggatatt	ttggcagggt	atggagcagg	ggtggcaggc	4320
	gcgctcgttg	ctttaagggt	catgagcggc	gagatgccct	ccaccgagga	cctgggttaac	4380
	ctactccctg	ctatcctctc	ccctggcgcc	ctagtcgtcg	gggtcgtgtg	cgacgcgata	4440
15	ctgctcggc	acgtgggccc	aggggagggg	gctgtgcagt	ggatgaaccg	gctgatagcg	4500
	ttcgcttcgc	ggggtaacca	cgtctccccc	acgcactatg	tgcttgagag	cgacgctgca	4560
	gcacgtgtca	ctcagatcct	ctctagtctt	accatcactc	agctgctgaa	gaggtctcac	4620
	cagtggatca	acgaggactg	ctccacgcca	tgctccggct	cgtggctaag	agatgttttg	4680
	gattggatat	gcacggtggt	gactgatttc	aagacctggc	tccagtccaa	gctcctgcgc	4740
	cgattgccgg	gagtcctcct	cttctcatgt	caacgtgggt	acaagggagt	ctggcggggc	4800
20	gacggcatca	tgcaaacacc	ctgcccattg	ggagcacaga	tcaccggaca	tgtgaaaaac	4860
	ggttccatga	ggatcgtggg	gcctaggacc	tgtagtaaca	cgtggcatgg	aacattcccc	4920
	attacgcggt	acaccacggg	cccctgcacg	ccctcccggc	cgccaaatta	ttctagggcg	4980
	ctgtggcggt	tggtcgtcga	ggagtaacgt	gaggttacgc	gggtggggga	tttccactac	5040
	gtgacgggca	tgaccactga	caacgtaaag	tgcccgtgtc	agggtccggc	ccccgaattc	5100
	ttcacagaag	tggtatgggt	gcggttgca	aggtacgctc	cagcgtgcaa	acccctccta	5160
25	cgggaggagg	tcacattcct	ggtcgggctc	aatcaatacc	tggttggtgc	acagctccca	5220
	tgcgagcccg	aaccggacgt	agcagtgtct	acttccatgc	tcaccgaccc	ctcccacatt	5280
	acggcggaga	cggttaagcg	taggctggcc	aggggatctc	ccccctcctt	ggccagctca	5340
	tcagctagcc	agctgtctgc	gccttccttg	aaggcaacat	gcactaccgc	tcagtactcc	5400
	ccggacgctg	acctcatcga	ggccaacctc	ctgtggcggc	aggagatggg	cgggaaacatc	5460
	acccgcgtgg	agtcagaaaa	taaggtagta	atthttggact	ctttcgagcc	gctccaagcg	5520
30	gaggaggatg	agagggaagt	atccgttccg	gcggagatcc	tgccgaggtc	caggaaattc	5580
	cctcgagcga	tgcccatatg	ggcacgcccg	gattacaacc	ctccactgtt	agagtccctg	5640
	aaggaccccg	actacgtccc	tccagtggta	cacgggtgtc	cattgcccgc	tgccaaggcc	5700
	cctccgatac	cacctccacg	gaggaaaggg	acggttgttc	tgtcagaatc	taccgtgtct	5760
	tctgccttgg	cggagctcgc	cacaaagacc	ttcggcagct	ccgaatcgct	ggccgtcgac	5820
	agcggcacgg	caacggcctc	tcctgcacag	ccctccgacg	acggcgacgc	gggatccgcac	5880
35	ggtgagtcgt	actcctccat	gccccccctt	gagggggagc	cgggggatcc	cgatctcagc	5940
	gacgggtcct	ggtctaccgt	aagcgaggag	gctagtggag	acgtcgtctg	ctgctcgatg	6000
	tcctacacat	ggacaggcgc	cctgatcagc	ccatgcgctg	cggaggaaac	caagctgccc	6060
	atcaatgcac	tgagcaactc	tttgctccgt	caccacaact	tggtctatgc	tacaacatct	6120
	cgcagcgcaa	gcctgcggca	gaagaaggtc	acctttgaca	gactgcaggt	cctggacgac	6180
	cactaccggg	acgtgctcaa	ggagatgaag	gcgaaggcgt	ccacagttaa	ggctaaactt	6240
40	ctatccgtgg	aggaagcctg	taagctgacg	ccccacattt	cggccagatc	taaatttggtc	6300
	tatggggcaa	aggacgtccg	gaacctatcc	agcaaggccg	ttaaccacat	ccgctccgtg	6360
	tgggaaggact	tgctggaaga	cactgagaca	ccaattgaca	ccaccatcat	ggcaaaaaat	6420
	gaggttttct	gcgtccaacc	agagaagggg	ggccgcaagc	cagctcgcct	tatcgtattc	6480
	ccagattttg	gggttcgtgt	gtgcgagaaa	atggcccttt	acgatgtggt	ctccaccctc	6540
	cctcaggccg	tgatgggctc	ttcatacggg	ttccaatact	ctcctggaca	gcgggctcgag	6600
	ttcctgggtg	atgcctggaa	agcgaagaaa	tgccctatgg	gcttcgcata	tgacaccgcg	6660
45	tgttttgact	caacgggtcac	tgagaatgac	atccgtgttg	aggagtcaat	ctaccaatgt	6720
	tgtgacttgg	cccccgaaagc	cagacaggcc	ataaggctgc	tcacagagcg	gctttacatc	6780
	gggggcccc	tgactaatte	taaagggcag	aactgcggct	atcgccggtg	ccgcgcgagc	6840
	ggtgtactga	cgaccagctg	cggtaatacc	ctcacatgtt	acttgaaggc	cgctgcggcc	6900
	gttcgagctg	cgaagctcca	ggactgcacg	atgctcgtat	gcggagacga	ccttgtcgtt	6960
	atctgtgaaa	gcgcggggac	ccaagaggac	gagggcagcc	tacgggcctt	cacggaggct	7020
50	atgactagat	actctgcccc	ccctggggac	ccgcccaaac	cagaatacga	cttgaggttg	7080
	ataacatcat	gctcctccaa	tgtgtcagtc	gcgcacgatg	catctggcaa	aaggggtgtac	7140
	tatctcacc	gtgacccac	cacccccctt	gcgcgggctg	cgtgggagac	agctagacac	7200
	actccagtc	attcctggct	aggcaacatc	atcatgtatg	cgccacactt	gtgggcaagg	7260
	atgatcctga	tgactcattt	cttctccatc	cttctagctc	aggaacaact	tgaaaaagcc	7320
	ctagattgtc	agatctacgg	ggcctgttac	tccattgagc	cacttgacct	acctcagatc	7380
	attcaacgac	tccatggcct	tagcgcattt	tactccata	gttactctcc	aggtgagatc	7440
55	aatagggtgg	cttcatgcct	caggaaactt	ggggtaaccg	ccttgcgagt	ctggagacat	7500

EP 1 043 399 B9 (W1B1)

	cgggccagaa	gtgtccgcgc	taggctactg	tcccaggggg	ggagggctgc	cacttggtggc	7560
	aagtacctct	tcaactgggc	agtaaggacc	aagctcaaac	tcactccaat	cccggtctgcg	7620
5	tcccagttgg	atztatccag	ctggttcggt	gctggttaca	gcgggggaga	catatatcac	7680
	agcctgtctc	gtgcccagcc	ccgctgggtc	atgtggtgcc	tactcctact	ttctgtaggg	7740
	gtaggcattc	atctactccc	caaccgatga	acggggagct	aaacactcca	ggccaatagg	7800
	ccatcctggt	tttttccctt	tttttttttc	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	7860
	ttttctcctt	tttttttctt	cttttttttc	ttttcttttc	tttggtggct	ccatcttagc	7920
	cctagtcacg	gctagctgtg	aaaggtcctg	gagccgcttg	actgcagaga	gtgctgatac	7980
10	tggcctctct	gcagatcaag	t				8001

15

20

25

30

35

40

45

50

55

<210> 4
 <211> 7989
 <212> DNA
 <213> Hepatitis C Virus

<400> 4

```

gccagcccc gattgggggc gacactccac catagatcac tccccgtgtga ggaactactg 60
tcttcacgca gaaagcgtct agccatggcg ttagtatgag tgtcgtgcag cctccaggac 120
ccccctccc gggagagcca tagtgggtctg cggaaccggg gagtacaccg gaattgccag 180
gacgaccggg tcctttcttg gatcaaccgg ctcaatgcct ggagatttgg gcgtgcccc 240
gcgagactgc tagccgagta gtgttgggtc gcgaaaggcc ttgtgggtact gcctgatagg 300
gtgcttgcca gtgccccggg aggtctcgta gaccgtgcac catgagcacg aatcctaaac 360
ctcaaagaaa aaccaaaggg cgcgccatga ttgaacaaga tggattgcac gcaggttctc 420
cggccgcttg ggtggagagg ctattcggct atgactgggc acaacagaca atcggctgct 480
ctgatgccgc cgtgttccgg ctgtcagcgc aggggcgccc ggttcttttt gtcaagaccg 540
acctgtccgg tgccctgaat gaactgcagg acgaggcagc gcggctatcg tggctggcca 600
cgacggcgct tccttgcgca gctgtgctcg acgttgtcac tgaagcggga agggactggc 660
tgctattggg cgaagtgcgg gggcaggatc tcctgtcatc tcaccttgct cctgccgaga 720
aagtatccat catggctgat gcaatgcggc ggctgcatac gcttgatccg gctacctgcc 780
cattcgacca ccaagcgaag catcgcatcg agcagcacg tactcggatg gaagccggtc 840
ttgtcgatca ggatgatctg gacgaagagc atcagggggt cgcgccagcc gaactgttcg 900
ccaggctcaa ggccgcatg cccgacggcg aggatctcgt cgtgacccat ggcgatgcct 960
gcttgccgaa tatcatggtg gaaaatggcc gctttcttg attcatcgac tgtggccggc 1020
tggtgtggc ggaccgctat caggacatag cgttggctac ccgtgatatt gctgaagagc 1080
ttggcggcga atgggctgac cgttctctcg tgctttacgg tatcgccgct cccgattcgc 1140
agcgcacgc cttctatcgc cttcttgacg agttcttctg agtttaaca gaccacaacg 1200
gtttccctct agcgggatca attccgcccc tctccctccc ccccccctaa cgttactggc 1260
cgaagccgct tggaataagg ccggtgtgcg tttgtctata tgttattttc caccatattg 1320
ccgtcttttg gcaatgtgag ggcccggaaa cctggccctg tcttcttgac gagcattcct 1380
aggggtcttt cccctctcgc caaaggaaatg caaggtctgt tgaatgtcgt gaaggaagca 1440
gttccctctg aagcttcttg aagacaaaca acgtctgtag cgaccctttg caggcagcgg 1500
aacccccac ctggcgacag gtgcctctgc ggccaaaagc cacgtgtata agatacacct 1560
gaaaaggcgg cacaacccca gtgccacgtt gtgagttgga tagttgtgga aagagtcaaa 1620
tggtctctct caagcgtatt caacaagggg ctgaaggatg ccagaagggt accccattgt 1680
atgggatctg atctggggcc tcgggtgcaca tgctttacat gtgttttagt gaggttaaaa 1740
aacgtctagg ccccccgaac cacggggacg tggttttcct ttgaaaaaca cgataatacc 1800
atggcgccca ttacggccta ctcccaacag acgcgaggcc tacttggctg catcacacct 1860
agcctcacag ccggggacag gaaccaggtc gaggggagg tccaagtgtt ctccaccgca 1920
acacaatctt tctggcgac ctgcgtcaat ggcgtgtgtt ggactgtcta tcatggtgcc 1980
ggctcaaaga cccttgccgg cccaaaaggc ccaatcacc aaatgtacac caatgtggac 2040
caggacctcg tcggctggca agcgcctccc ggggcgcgtt ccttgacacc atgcacctgc 2100
ggcagctcgg acctttactt ggtcacgagg catgccgatg tcattccggt gcgcggcg 2160
ggcgacagca gggggagcct actctcccc aggccgtct cctacttgaa gggctcttcg 2220
ggcgttccac tgctctgccc ctccggggcac gctgtgggca tctttcgggc tgccgtgtgc 2280
acccgagggg ttgcgaaggc ggtggacttt gtaccgctcg agtctatgga aaccactatg 2340
cgggtccccg tcttcacgga caactcgtcc cctccggccg taccgcagac attccagggt 2400
gcccattcac acgcccctac tggtagcggc aagagcacta aggtgccggc tgcgtatgca 2460
gcccagggtg ataagggtct tgtcctgaac ccgtccgtcg ccgccaccct aggtttcggg 2520
gcgtatatgt ctaaggcaca tggatcgac cctaacatca gaaccggggt aaggaccatc 2580
accacgggtg ccccatcac gtactccacc tatggcaagt ttcttgccga cgggtggttc 2640
tctgggggcg cctatgacat cataatatgt gatgagtgc actcaactga ctcgaccact 2700
atcctgggca tcggcacagt cctggaccaa cgggagacgg ctggagcgcg actcgtcgtg 2760
ctcgccaccg ctacgcctcc gggatcggtc accgtgccac atccaaacat cgaggagggt 2820
gctctgtcca gcactggaga aatccccctt tatggcaaag ccatcccatc cgagaccatc 2880
aaggggggga ggcacctcat tttctgccat tccaagaaga aatgtgatga gctcgccggc 2940
aagctgtccg gcctcggact caatgctgta gcatattacc ggggccttga tgtatccgtc 3000
ataccaacta gcggagacgt cattgtcgta gcaacggacg ctctaataac gggctttacc 3060
ggcgatttgc actcagtgat cgactgcaat acatgtgtca ccagacagt cgactcagc 3120
ctggacccga ccttcaccat tgagacgacg accgtgccac aagacgcggg gtcacgctcg 3180
cagcggcgag gcaggactgg taggggcagg atgggcattt acaggtttgt gactccagga 3240
gaacggccct cgggcatggt cgattcctcg gttctgtgag agtgctatga cgcgggctgt 3300
gcttggtacg agctcacgcc cgccgagacc tcagttaggt tgccggctta cctaaacaca 3360
ccaggggttg ccgtctgcca ggaccatctg gacttctggg agagcgtctt tacaggcctc 3420
accacatag acgcccattt ttgtccccag actaagcagg caggagacaa cttcccctac 3480
ctggtagcat accaggctac ggtgtgcgcc agggctcagg ctccacctcc atcgtgggac 3540

```

	caaagtgtgga	agtgtctcat	acgggetaaag	cctacgctgc	acggggccaac	gcccctgctg	3600
	tataggctgg	gagccgttca	aaacgaggtt	actaccacac	accccataac	caaatacatc	3660
5	atggcatgca	tgctcgctga	cctggagggtc	gtcacgagca	cctgggtgct	ggtaggcgga	3720
	gtcctagcag	ctctggccgc	gtattgcctg	acaacaggca	gcgtgggtcat	tgtgggcagg	3780
	atcatcttgt	ccggaagcc	ggccatcatt	cccgacagg	aagtccttta	ccgggagttc	3840
	gatgagatgg	aagagtgcgc	ctcacacctc	ccttacatcg	aacagggaat	gcagctcgcc	3900
	gaacaattca	aacagaaggc	aatcggttg	ctgcaaacag	ccaccaagca	agcggaggct	3960
	gctgctcccg	tggtggaatc	caagtggcgg	accctcgaag	ccttctgggc	gaagcatatg	4020
10	tggaatttca	tcagcgggat	acaatatatta	gcaggcttgt	ccactctgcc	tggcaacccc	4080
	gcgatagcat	cactgatggc	attcacagcc	tctatcacca	gcccgtcac	cacccaacat	4140
	accctcctgt	ttaacatcct	gggggatgg	gtggccgcc	aacttgctcc	tcccagcget	4200
	gcttctgctt	tcgtaggcgc	cgccatcgct	ggagcggctg	ttggcagcat	aggccttggg	4260
	aaggtgcttg	tggtatattt	ggcaggttat	ggagcagggg	tggcaggcgc	gctcgtggcc	4320
	tttaaggtca	tgagcggcga	gatgccctcc	accgaggacc	tggttaacct	actccctgct	4380
	atcctctccc	ctggcgccct	agtcgtcggg	gtcgtgtgcg	cagcgatact	gcgtcggcac	4440
15	gtgggcccag	gggagggggc	tggtcagtgg	atgaaccggc	tgatagcgtt	cgcttcgcgg	4500
	ggtaaccacg	tctcccccac	gcactatgtg	cctgagagcg	acgtgcagc	acgtgtcact	4560
	cagatcctct	ctagtcttac	catcactcag	ctgctgaaga	ggcttcacca	gtggatcaac	4620
	gaggactgct	ccacgccatg	ctccggctcg	tggttaagag	atgtttggga	ttggatatgc	4680
	acggtgttga	ctgatttcaa	gacctggctc	cagtcceaagc	tcctgccgcg	attgccggga	4740
20	gtccccttct	tctcatgtca	acgtgggtac	aagggagtct	ggcggggcga	cggcatatg	4800
	caaaccacct	gcccattgtg	agcacagatc	accggacatg	tgaaaaacgg	ttccatgagg	4860
	atcgtggggc	ctaggacctg	tagtaacacg	tggtatggaa	cattcccat	taacgcgtac	4920
	accacggggc	cctgcacgccc	ctcccgccg	ccaaattatt	ctagggcgct	gtggcgggtg	4980
	gctgctgagg	agtacgtgga	ggttacgcgg	gtgggggatt	tccactacgt	gacgggcatg	5040
	accactgaca	acgtaaaagt	cccgtgtcag	gttccggccc	ccgaattctt	cacagaagtg	5100
25	gatgggggtc	ggttgcacag	gtacgctcca	gcgtgcaaac	ccctcctacg	ggaggaggtc	5160
	acattcctgg	tcgggctcaa	tcaatacctg	gttgggtcac	agctcccatg	cgagcccgaa	5220
	ccggacgtag	cagtgtctac	ttccatgctc	accgacccct	cccacattac	ggcggagacg	5280
	gctaagcgta	ggctggccag	gggatctccc	ccctccttgg	ccagctcatc	agctagccag	5340
	ctgtctcgcc	cttccttgaa	ggcaacatgc	actaccgctc	atgactcccc	ggacgtgagc	5400
	ctcatcgagg	ccaacctcct	gtggcgccag	gagatgggcg	ggaacatcac	ccgctgtgag	5460
30	tcagaaaata	aggtagtaat	tttgactctt	ttcgagccgc	tccaagcgga	ggaggatgag	5520
	aggggaagtat	ccgttcgggc	ggagatcctg	cggaggtcca	ggaaattccc	tcgagcgatg	5580
	cccataatggg	cacgcccgga	ttacaacccct	ccactgttag	agtcctggaa	ggacccggac	5640
	tacgtccctc	cagtgttaca	cgggtgtcca	ttgccgcctg	ccaaggcccc	tccgatacca	5700
	cctccacgga	ggaagaggac	ggttgtcctg	tcagaatcta	ccgtgtcttc	tgccctggcg	5760
	gagctcgcca	caaagacctt	cggcagctcc	gaatcgtcgg	ccgtcgacag	cggcacggca	5820
35	acggcctctc	ctgaccagcc	ctccgacgac	ggcgacgcgg	gatccgacgt	tgagtgcgtac	5880
	tcctccatgc	cccccttga	gggggagccg	ggggatcccc	atctcagcga	cgggtcttgg	5940
	tctaccgtaa	gcgaggagcg	tagtgaggac	gtcgtctgct	gctcgatgtc	ctacacatg	6000
	acaggcgccc	tgatcacgcc	atgcgctcgg	gaggaaacca	agctgcccat	caatgcactg	6060
	agcaactctt	tgctccgtca	ccacaacttg	gtctatgcta	caacatctcg	cagcgcaagc	6120
	ctgcggcaga	agaaggtcac	ctttgacaga	ctgcaggctc	tgagcagacca	ctaccgggac	6180
	gtgctcaagg	agatgaaggc	gaaggcgctc	acagttaagg	ctaaacttct	atccgtggag	6240
40	gaagcctgta	agctgacgcc	cccacattcg	gccagatcta	aatttggtta	tggggcaaaag	6300
	gacgtccgga	acctatccag	caaggccggt	aaccacatcc	gctccgtgtg	gaaggacttg	6360
	ctggaagaca	ctgagacacc	aattgacacc	accatcatgg	caaaaaatga	ggttttctgc	6420
	gtccaaccag	agaagggggg	cgcgaagcca	gctcgccctta	tcgtattccc	agatttgggg	6480
	gttcgtgtgt	gcgagaaaat	ggccctttac	gatgtgtgtc	ccaccctccc	tcaggccgtg	6540
	atgggctctt	catacggtt	ccaatactct	cctggacagc	gggtcgagtt	cctggtgaat	6600
45	gcctggaaaag	cgaagaaatg	ccctatgggc	ttcgcatatg	acacccgctg	ttttgactca	6660
	acggctcactg	agaatgacat	ccgtgttgag	gagtcacatc	accaatgttg	tgacttggcc	6720
	cccgaagcca	gacaggccat	aaggtcgctc	acagagcggc	ttacatcgg	gggccccctg	6780
	actaattcta	aagggcagaa	ctgcggctat	cgccggtgcc	gcgcgagcgg	tgtactgacg	6840
	accagctcgg	gtaataccct	cacatgttac	ttgaaggccg	ctgcggcctg	tcgagctcgg	6900
	aagctccagg	actgcacgat	gctcgtatgc	ggagacgacc	ttgtcgttat	ctgtgaaagc	6960
50	gcggggaccc	aagaggacga	ggcgagccta	cgggccttca	cggaggctat	gactagatac	7020
	tctgcccccc	ctgggggaccc	gcccacaa	gaatacgact	tggaagttag	aacatcatgc	7080
	tcttccaatg	tgtcagtcgc	gcacgatgca	tctggcaaaa	gggtgtacta	tctcaccctg	7140
	gaccccaacca	cccccttgc	gcgggctcgg	ttggagacag	ctagacacac	tccagtcaat	7200
	tcttggttag	gcaacatcat	catgtatgcg	cccaccttgt	gggcaaggat	gatcctgatg	7260
	actcatttct	tctccatcct	tctagctcag	gaacaacttg	aaaaagccct	agattgtcag	7320
	atctacgggg	cctgttactc	cattgagcca	cttgacctac	ctcagatcat	tcaacgactc	7380
55	catggcctta	gcgcattttc	actccatagt	tactctccag	gtgagatcaa	taggggtggct	7440
	tcattgcctca	ggaaacttgg	ggtaccgccc	ttgcgagctc	ggagacatcg	ggccagaagt	7500

EP 1 043 399 B9 (W1B1)

	gtccgcgcta	ggctactgtc	ccaggggggg	agggtgccca	cttgtggcaa	gtacctcttc	7560
	aactgggcag	taaggaccaa	gtcctaaactc	actccaatcc	cggctgcgtc	ccagttggat	7620
5	ttatccagct	ggttcgttgc	tggttacagc	gggggagaca	tatatcacag	cctgtctcgt	7680
	gcccgaaccc	gctggttcat	gtggtgccta	ctcctacttt	ctgtaggggt	aggcatctat	7740
	ctactcccca	accgatgaac	ggggagctaa	acactccagg	ccaataggcc	atcctgtttt	7800
	tttccctttt	tttttttctt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	ttctcctttt	7860
	tttttcctct	ttttttcctt	ttcttttcctt	tgggtggctcc	atcttagccc	tagtcacggc	7920
10	tagctgtgaa	aggtcogtga	gccgcttgac	tgcagagagt	gctgatactg	gcctctctgc	7980
	agatcaagt						7989

15

20

25

30

35

40

45

50

55

<210> 5
 <211> 8649
 <212> DNA
 <213> Hepatitis C Virus

<400> 5

	gccagccccc	gattgggggc	gacactccac	catagatcac	tcccctgtga	ggaactactg	60
	tcttcacgca	gaaagcgtct	agccatggcg	ttagtatgag	tgtcgtgcag	cctccaggac	120
	ccccctccc	gggagagcca	tagtgggtctg	cggaaccggg	gagtacaccg	gaattgccag	180
10	gacgaccggg	tcctttcttg	gatcaaccog	ctcaatgcct	ggagatttgg	gcgtgcccc	240
	gcgagactgc	tagccgagta	gtgttgggtc	gcgaaaggcc	ttgtgggtact	gcctgatagg	300
	gtgcttgcca	gtgccccggg	aggtctcgta	gaccgtgcac	catgagcacg	aatcctaaac	360
	ctcaaaagaaa	aaccaaacgt	aacaccaacg	ggcgcgccat	gattgaacaa	gatggattgc	420
	acgcaggttc	tccggccgct	tgggtggaga	ggctattcgg	ctatgactgg	gcacaacaga	480
	caatcggtcg	ctctgatgcc	gccgtgttcc	ggctgtcagc	gcaggggcgc	ccggttcttt	540
15	ttgtcaagac	cgacctgtcc	ggtgcctga	atgaactgca	ggacgaggca	gcgcggctat	600
	cgtggctggc	cacgacgggc	gttccttgcg	cagctgtgct	cgacgttgct	actgaagcgg	660
	gaagggactg	gctgctattg	ggcgaagtgc	cggggcagga	tctcctgtca	tctcaccttg	720
	ctcctgcca	gaaagtatcc	atcatggctg	atgcaatgcg	gcggctgcat	acgcttgatc	780
	cggctacctg	cccattcgac	caccaagcga	aacatcgcat	cgagcgagca	cgtactcgga	840
	tgggaagccg	tcttgtcgat	caggatgatc	tggacgaaga	gcacagggg	ctcgcgccag	900
20	ccgaactgtt	cgccaggctc	aaggcgcgca	tgcccagcgg	cgaggatctc	gtcgtgacct	960
	atggcgactg	ctgcttgccg	aatatcatgg	tggaaaatgg	ccgcttttct	ggattcatcg	1020
	actgtggccg	gctgggtgtg	gcggaccgct	atcaggacat	agcgttggct	acccgtgata	1080
	ttgctgaaga	gcttggcggc	gaatgggctg	accgcttcct	cgtgctttac	ggtatcgccg	1140
	ctccccgatt	gcagcgcatc	gccttctatc	gccttcttga	cgagttcttc	tgagtttaaa	1200
	cagaccacaa	cggtttccct	ctagcgggat	caattccgcc	cctctccctc	ccccccctc	1260
25	aacgttactg	gccgaagccg	ccttgaataa	ggccggtgtg	cgtttgtcta	tatgttattt	1320
	tccaccatat	tgcctgtctt	tggcaatgtg	agggcccgga	aacctggccc	tgtcttcttg	1380
	acgagcatte	ctaggggtct	ttcccctctc	gccaaaggaa	tgcaaggtct	gttgaatgtc	1440
	gtgaagggaag	cagttcctct	ggaagcttct	tgaagacaaa	caacgtctgt	agcgacctt	1500
	tgcaggcagc	ggaaccccc	acctggcgac	aggtgcctct	gcggccaaaa	gccacgtgta	1560
30	taagatacac	ctgcaaaagg	ggcacaacc	cagtgccacg	ttgtgagttg	gatagttgtg	1620
	gaaagagtca	aatggctctc	ctcaagcgta	ttcaacaagg	ggctgaagga	tgcccagaag	1680
	gtaccccat	gtatgggatc	tgatctgggg	cctcggtgca	catgctttac	atgtgtttag	1740
	tgcaggttaa	aaaacgtcta	ggccccccga	accacgggga	cgtggttttc	ctttgaaaaa	1800
	cacgataata	ccatggaccg	ggagatggca	gcacgtgcg	gaggcgcggt	tttcgtaggt	1860
	ctgactgttc	tgacctgtc	accgcactat	aagctgttcc	tcgctaggct	catatggtgg	1920
35	ttacaatat	ttatcacca	ggccgaggca	cacttgcaag	tgtggatccc	ccccctcaac	1980
	gttcgggggg	gccgcgatgc	cgtcatctc	ctcacgtgcg	cgatccaccc	agagctaata	2040
	tttaccatca	coaaaatctt	gctcgccata	ctcgggtcac	tcatggtgct	ccaggctggt	2100
	ataaccaaag	tgcctgactt	cgtgcgcgca	cacgggctca	ttcgtgcatg	catgctggtg	2160
	cggaaggttg	ctgggggtca	ttatgtccaa	atggctctca	tgaagtggc	cgactgaca	2220
	ggtacgtacg	tttatgacca	tctcacccca	ctcgggact	gggccacgc	gggcctacga	2280
	gaccttgccg	tggcagttga	gcccgtcgtc	ttctctgata	tggagaccaa	ggttatcacc	2340
40	tggggggcag	acaccgcggc	gtgtggggac	atcatcttgg	gcctgcccg	ctccgcccgc	2400
	agggggagg	agatacatct	gggaccggca	gacagccttg	aagggcagg	gtggcgactc	2460
	ctcgcgccta	ttacggccta	ctcccaacag	acgcgaggcc	tacttggtcg	catcatcact	2520
	agcctcacag	gccgggacag	gaaccaggtc	gaggggagg	tccaagtgg	ctccaccgca	2580
	acacaatctt	tcctggcgac	ctgcgtcaat	ggcgtgtgtt	ggactgtcta	tcatggtgcc	2640
45	ggctcaaaga	cccttgccgg	cccaaaggcc	ccaatcacc	aaatgtacac	caatgtggac	2700
	caggacctcg	tcggctggca	agcgcccccc	ggggcgcggt	ccttgacacc	atgcacctgc	2760
	ggcagctcgg	acctttactt	ggtcacgagg	catgccgatg	tcattccggt	gcgcggcgcg	2820
	ggcgacagca	gggggagcct	actctcccc	agggccgtct	cctacttgaa	gggctcttcg	2880
	ggcggtccac	tgetctgccc	ctcggggcac	gctgtgggca	tctttcgggc	tgcctgtgca	2940
	acccgagggg	ttgcgaaggc	ggtggacttt	gtacccgtcg	agtctatgga	aaccactatg	3000
	cygtcccccg	tcttcacgga	caactcgctc	cctccggccg	taccgcagac	attccagggtg	3060
50	gcccattctac	acgcccctac	tggtagcgcc	aagagcacta	aggtgccggc	tgcgtatgca	3120
	gcccagggtg	ataaggtgct	tgtcctgaac	cgtccgtcg	cgccaccct	aggtttcggg	3180
	gcgtatatgt	ctaaggcaca	tggatatcgac	cctaacaatca	gaaccggggt	aaggaccatc	3240
	accacgggtg	cccccatcac	gtactccacc	tatggcaagt	ttcttgccga	cgggtggttg	3300
	tctggggggc	cctatgacat	cataatatgt	gatgagtgcc	actcaactga	ctcgaccact	3360
	atcctgggca	tcggcacagt	cctggaccaa	gcggagacgg	ctggagcgcg	actcgtcgtg	3420
55	ctcgcaccgg	ctacgcctcc	gggatcggtc	accgtgccac	atccaaacat	cgaggagggtg	3480
	gctctgtcca	gcactggaga	aatccccctt	tatggcaaa	ccatccccat	cgagaccatc	3540

	aaggggggga	ggcacctcat	tttctgccat	tccaagaaga	aatgtgatga	gctcgccgcg	3600
	aagctgtccg	gcctcggact	caatgctgta	gcataattacc	ggggccttga	tgatatccgtc	3660
	ataccaacta	gcgagagcgt	cattgtcgta	gcaacggacg	ctctaattgac	gggctttacc	3720
5	ggcgatttcg	actcagtgat	cgactgcaat	acatgtgtca	cccagacagt	cgacttcagc	3780
	ctggacccga	ccttcaccat	tgagacgacg	accgtgccac	aagacgcggt	gtcacgctcg	3840
	cagcggcgag	gcaggactgg	taggggcagg	atgggcattt	acaggtttgt	gactccagga	3900
	gaacggccct	cgggcatgtt	cgattcctcg	gttctgtgcg	agtgttatga	cgcgggctgt	3960
	gcttggtacg	agctcacgcc	cgccgagacc	tcagtttaggt	tgcgggctta	cctaaacaca	4020
	ccagggttgc	cogtctgcca	ggaccatctg	gagttctggg	agagcgtctt	tacaggcctc	4080
10	accacatag	acgcccattt	cttgtcccag	actaagcagg	caggagacaa	cttcccctac	4140
	ctggtagcat	accaggctac	ggtgtgcgcc	agggctcagg	ctccacctcc	atcgtgggac	4200
	caaagtgtga	agtgtctcat	acggctaaag	cctacgctgc	acgggccaac	gccctgtctg	4260
	tataggctgg	gagccgttca	aaacgaggtt	actaccacac	accccataac	caaatacatc	4320
	atggcatgca	tgtcggctga	cctggaggtc	gtcacgagca	cctgggtgct	ggtagggcga	4380
	gtcctagcag	ctctggccgc	gtattgcctg	acaacaggca	gcgtggtcat	tgtgggcagg	4440
15	atcatcttgt	ccggaagacc	ggccatcatt	cccagacagg	aagtccttta	ccgggagttc	4500
	gatgagatgg	aagagtgcgc	ctcacacctc	ccttacatcg	aacagggaat	gcagctcgcc	4560
	gaacaattca	aacagaaggc	aatcgggttg	ctgcaaacag	ccaccaagca	agcggagggt	4620
	gctgctcccg	tgggtgaatc	caagtggcgg	accctcgaag	ccttctgggc	gaagcatatg	4680
	tgggaattca	tcagcgggat	acaatattta	gcaggcttgt	ccactctgcc	tggcaacccc	4740
	gcgatagcat	cactgatggc	attcacagcc	tctatcacca	gcccgtcac	cacccaacat	4800
20	acccctctgt	ttaacatcct	gggggatgg	gtggccgccc	aacttgctcc	tcccagcgct	4860
	gcttctgctt	tcgtaggcgc	cggcatcgct	ggagcggctg	ttggcagcat	aggccttggg	4920
	aaggtgcttg	tggatatatt	ggcaggttat	ggagcagggg	tggcagggcg	gctcgtggcc	4980
	tttaagggtca	tgagcggcga	gatgccctcc	accgaggacc	tggttaacct	actccctgct	5040
	atcctctccc	ttggcgccct	agtcgtcggg	gtcgtgtgcg	cagcgatact	gcgtcggcac	5100
	gtgggcccag	gggagggggc	tgtgcagtgg	atgaaccggc	tgatagcgtt	cgcttcgchg	5160
25	ggtaaccacg	tctcccccac	gcactatgtg	cctgagagcg	acgctgcagc	acgtgtcact	5220
	cagatcctct	ctagtcttac	catcactcag	ctgctgaaga	ggcttcacca	gtggatcaac	5280
	gaggactgct	ccagcccatg	ctccggctcg	tggctaagag	atgtttggga	ttggatatgc	5340
	acggtgttga	ctgatttcaa	gacctggctc	gagtcgaagc	tcctgccgcg	attgccggga	5400
	gtccctctct	tctcatgtca	acgtgggtac	aagggagtct	ggcggggcga	cggcatcatg	5460
	caaaccacct	gcccattgtg	agcacagatc	accggacatg	tgaataacgg	ttccatgagg	5520
30	atcgtggggc	ctaggacctg	tagtaacacg	tggcatggaa	cattccccat	taacgcgtac	5580
	accacggggc	cctgcacgcc	ctcccggcg	ccaaattatt	ctaggcgctg	gtggcgggtg	5640
	gctgctgagg	agtacgtgga	ggttacgcgg	gtgggggatt	tccactacgt	gacgggcatg	5700
	accactgaca	acgtaaagtg	cccgtgtcag	gttccggccc	ccgaattctt	cacagaagtg	5760
	gatgggggtg	ggttgacacg	gtacgctcca	gcgtgcaaac	ccctcctacg	ggaggagggt	5820
	acattcctgg	tcgggctcaa	tcaatacctg	gttgggtcac	agctcccatg	cgagcccgaa	5880
35	ccggacgtag	agtgctcac	ttccatgctc	accgaccctc	cccacattac	ggcgagagcg	5940
	gctaagcgta	ggctggccag	gggatctccc	ccctccttgg	ccagctcacc	agctagccag	6000
	ctgtctgcgc	cttccttgaa	ggcaacatgc	actaccctgc	atgactcccc	ggacgctgac	6060
	ctcatcgagg	ccaaacctct	gtggcggcag	gagatggcg	ggaacatcac	ccgcgtggag	6120
	tcagaaaata	aggtagtaat	tttggactct	ctcgagccgc	tccaagcggg	ggaggatgag	6180
	agggaagtat	ccgttcgggc	ggagatcctg	cggaggtcca	ggaaattccc	tcgagcgatg	6240
40	cccatatggg	cacgcccggg	ttacaaccct	ccactgttag	agtctctgga	ggaccgggac	6300
	tacgtccctc	cagtgggtaca	cgggtgtcca	ttgccgcctg	ccaaggcccc	tccgatacca	6360
	cctccacgga	ggaagaggac	ggttgctcctg	tcagaatcta	ccgtgtcttc	tgccttggcg	6420
	gagctcgcca	caaagacctt	cggcagctcc	gaatcgtcgg	ccgtcgacag	cggcacggca	6480
	acggcctctc	ctgaccagcc	ctccgacgac	ggcgacgcgg	gatccgacgt	tgagtctgtac	6540
	tcctccatgc	cccccttga	gggggagccg	ggggatcccg	atctcagcga	cgggtcttgg	6600
	tctaccgtaa	gcgaggaggc	tagtgaggac	gtcgtctgct	gctcgatgtc	ctacacatgg	6660
45	acaggcgccc	tgatcacgcc	atgcgctgcg	gaggaaccca	agctgcccac	caatgcactg	6720
	agcaactctt	tgtccgtcac	ccacaacttg	gtctatgcta	caacatctcg	cagcgcaagc	6780
	ctgcggcaga	agaaggtcac	ctttgacaga	ctgcaggtcc	tggacgacca	ctaccgggac	6840
	gtgctcaagg	agatgaaggc	gaaggcgtcc	acagttaagg	ctaaacttct	atccgtggag	6900
	gaagcctgta	agctgacgcc	cccacattcg	gccagatcta	aattttggcta	tggggcaag	6960
	gacgtccgga	acctatccag	caaggccggt	aaccacatcc	gctccgtgtg	gaaggacttg	7020
50	ctggaagaca	ctgagacacc	aattgacacc	accatcatgg	caaaaaatga	ggttttctgc	7080
	gtccaaccga	agaagggggg	ccgcaagcca	ctgcgcctta	tcgtattccc	agatttgggg	7140
	gttcgtgtgt	gcgagaaaat	ggccctttac	gatgtggtct	ccaccctccc	tcaggccgtg	7200
	atgggctctt	catacggtat	ccaatactct	cctggacagc	gggtcgagtt	cctggtgaat	7260
	gcctggaaag	cgaagaaatg	ccctatgggc	ttcgcatatg	acaccgcgtg	ttttgactca	7320
	acggctcactg	agaatgacat	ccgtgttgag	gagtcaatct	accaatgttg	tgaactggcc	7380
55	cccgaagcca	gacaggccat	aaggtcgctc	acagagcggc	tttacatcgg	gggcccctg	7440
	actaattcta	aagggcagaa	ctgcggctat	cgccggtgcc	gcgcgagcgg	tgtactgacg	7500

	accagctgcg	gtaataccct	cacatgttac	ttgaaggccg	ctgcggcctg	tcgagctgcg	7560
	aagctccagg	actgcacgat	gctcgtatgc	ggagacgacc	ttgtcggttat	ctgtgaaagc	7620
5	gcggggaccc	aagaggacga	ggcgagccta	cgggccttca	cggaggctat	gactagatac	7680
	tctgcccccc	ctggggaccc	gcccaaacca	gaatacgact	tggagttgat	aacatcatgc	7740
	tcctccaatg	tgtcagtcgc	gcacgatgca	tctggcaaaa	gggtgtacta	tctcaccctg	7800
	gaccccaacca	cccccttgc	gcgggctgcy	tgggagacag	ctagacacac	tccagtcaat	7860
	tcctggctag	gcaacatcat	catgtatgcy	cccaccttgt	gggcaaggat	gatcctgatg	7920
10	actcatttct	tctccatcct	tctagctcag	gaacaacttg	aaaaagccct	agattgtcag	7980
	atctacgggg	cctgttactc	cattgagcca	cttgacctac	ctcagatcat	tcaacgactc	8040
	catggcctta	gcgcattttc	actccatagt	tactctccag	gtgagatcaa	taggggtggct	8100
	tcatgcctca	ggaaacttgg	ggtaccgccc	ttgcgagtct	ggagacatcg	ggccagaagt	8160
	gtccgcgcta	ggctactgtc	ccaggggggg	agggctgccca	cttgtggcaa	gtacctcttc	8220
	aactgggcag	taaggaccaa	gctcaaaactc	actccaatcc	cggctgcgtc	ccagttggat	8280
15	ttatccagct	ggttcgttgc	tggttacagc	gggggagaca	tatatcacag	cctgtctcgt	8340
	gcccgaaccc	gctgggttcat	gtggtgccta	ctcctacttt	ctgtaggggt	aggcatctat	8400
	ctactcccca	accgatgaac	ggggagctaa	acactccagg	ccaataggcc	atcctgtttt	8460
	tttccctttt	tttttttctt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	ttctcctttt	8520
	tttttcctct	ttttttcctt	ttcttttcctt	tgggtggctcc	atcttagccc	tagtcacggc	8580
20	tagctgtgaa	aggtccgtga	gccgcttgac	tgcagagagt	gctgatactg	gcctctctgc	8640
	agatcaagt						8649

25

30

35

40

45

50

55

<210> 6
 <211> 8001
 <212> DNA
 <213> Hepatitis C Virus

<400> 6
 gccagccccc gattgggggc gacactccac catagatcac tcccctgtga ggaactactg 60
 tcttcacgca gaaagcgtct agccatggcg ttagtatgag tgtcgtgcag cctccaggac 120
 cccccctccc gggagagcca tagtgggtctg cggaaccggt gagtacaccg gaattgccag 180
 gacgaccggg tcctttcttg gatcaaccgg ctcaatgcct ggagatttgg gcgtgcccc 240
 gcgagactgc tagccgagta gtgttgggtc gcgaaaggcc ttgtgggtact gcctgatagg 300
 gtgcttgcca gtgccccggg aggtctcgtg gaccgtgcac catgagcacg aatcctaaac 360
 ctcaaagaaa aaccaaacgt aacaccaacg ggcgcgccat gattgaacaa gatggattgc 420
 acgcagggtt tccggccgct tgggtggaga ggctattcgg ctatgactgg gcacaacaga 480
 caatcggtcg ctctgatgcc gccgtgttcc ggctgtcagc gcagggggcg cgggttcttt 540
 ttgtcaagac cgacctgtcc ggtgccctga atgaactgca ggacgaggca gcgcggctat 600
 cgtggctggc cagcaggggc gttccttgcg cagctgtgct cgacgttgtc actgaagcgg 660
 gaagggactg gctgctattg ggcgaaagtgc cggggcagga tctcctgtca tctcacctg 720
 ctccctgcga gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg gcggtgcat acgcttgatc 780
 cggctacctg cccattcgac caccaagcga aacatcgcat cgagcgagca cgtactcgga 840
 tggaagccgg tcttgcgat caggatgatc tggacgaaga gcatcagggg ctgcgcagcag 900
 ccgaactgtt cgccaggctc aaggcgcgca tgcgcgacgg cgaggatctc gtcgtgaccc 960
 atggcgatgc ctgcttgccg aatatcatgg tggaaaatgg ccgcttttct ggattcatcg 1020
 actgtggccg gctgggtgtg gcggaccgct atcaggacat agcgttggct acccgatga 1080
 ttgctgaaga gcttggcggc gaatgggctg accgcttctc cgtgctttac ggtatcgccg 1140
 ctcccgatcc gcagcgcatc gccttctatc gccttcttga cgagttcttc tgagtttaaa 1200
 cagaccacaa cgggtttccct ctacgaggat caattccgcc cctctccctc cccccccct 1260
 aacgttatcg gccgaagcgg ctgggaataa ggccggtgtg cgtttgtcta tatgttattt 1320
 tccaccatat tgccgtcttt tggcaatgtg agggcccgga aacctggccc tgtcttcttg 1380
 acgagcatcc ctagggggtc tccccctctc gccaaaggaa tgcaaggctc gttgaatgtc 1440
 gtgaagggaag cagttcctct ggaagcttct tgaagacaaa caacgtctgt agcgaccctt 1500
 tgcaggcagc ggaaccccc acctggcgac aggtgcctct gcggccaaaa gccacgtgta 1560
 taagatacac ctgcaaggcg ggcacaacc cagtgcacg ttgtgagttg gatagttgtg 1620
 gaaagctaca aatggctctc ctcaagcgta ttcaacaagg ggctgaagga tgcccagaag 1680
 gtacccatt gtatgggatc tgatctgggg cctcggtgca catgctttac atgtgtttag 1740
 tcgaggttaa aaaacgtcta ggcccccgga accacgggga cgtggttttc ctttgaaaaa 1800
 cagcataata ccatggcgcc tattacggcc tactcccaac agacgcgagg cctacttggc 1860
 tgcattcatca ctacgtcac aggcgggac aggaaccagg tcgaggggga ggtccaagt 1920
 gtctccaccg caacacaatc tttcctggcg acctgcgtca atggcggtg ttggactgtc 1980
 tatcatggtg ccggctcaaa gaccttgcc ggccaaagg gcccaatcac ccaaattgtac 2040
 accaatgtgg accaggacct cgtcggctgg caagcgcccc ccggggcgcg ttccttgaca 2100
 ccattgcacct gcggcagctc ggacctttac ttggtcacga ggcatgccga tgtcattccg 2160
 gtgcgcccgc gggcgacag cagggggagc ctactctccc ccaggcccg ctccactttg 2220
 aagggtctct cggcggtccc actgctctgc cctcggggc atgctgtggg catctttcgg 2280
 gctgcggtgt gacccgagg ggttgcgaag gcggtggact ttgtaccgt cgagtctatg 2340
 gaaaccacta tgcggtcccc ggtcttcaag gacaactcgt cccctccggc cgtaccgcag 2400
 acattccagg tggcccatct acacgcccct actggtagcg gcaagagcac taaggtgccg 2460
 gctgcgtatg cagcccaagg gtataagggt cttgtcctga acccgctcgt cgccgccacc 2520
 ctagggtttc gggcgatat gtctaaggca catggtatcg accctaaca cagaaccggg 2580
 gtagggacca tcaccacggg tgccccatc acgtactcca cctatggcaa gtttcttgcc 2640
 gacggtggtt gctctgggg cgctatgac atcataatat gtgatgagtg ccaactcaact 2700
 gactcgacca ctatcctggg catcggcaca gtcctggacc aagcggagac ggctggagcg 2760
 cgactcgtcg gctcggccac cgctacgct cgggatcgg tcaccgtgcc acatccaaac 2820
 atcgaggagg tggctctgtc cagcactgga gaaatcccc tttatggcaa agccatcccc 2880
 atcgcgacca tcaagggggg gaggcacctc attttctgcc attccaagaa gaaatgtgat 2940
 gagctcgccg cgaagctatc cggcctcgga ctcaatgctg tagcatatta ccggggcctt 3000
 gatgtatccg tcataccaac tagcggagac gtcattgtcg tagcaacgga cgtctaatg 3060
 acggccttta ccggcgattt cgactcagtg atcgactgca atacatgtgt caccagaca 3120
 gtgcacttca gctgggaccc gaccttcacc attgagacga cgaccgtgcc acaagacgcg 3180
 gtgtcacgct cgcagcggcg aggcaggact ggtaggggca ggatgggcat ttacaggttt 3240
 gtgactccag gagaacggcc ctcgggcatg ttcgattcct cggttctgtg cgagtgtat 3300
 gacgggggct gtgcttggta cgagctcacg ccggccgaga cctcagttag gttgcgggct 3360
 tacctaaaca caccagggct gcccgtctgc caggaccatc tggagttctg ggagagcgct 3420
 tttacaggcc tcaccacat agacgcccct ttcttgtccc agactaggca ggacggagac 3480
 aacttccccct acctggtagc ataccaggct acgggtgtcg ccagggtcga ggctccacct 3540

	ccatcgtggg	accaaagtgt	ggagtgtctc	atacggctaa	agcctacgct	gcacgggcca	3600
	acgcccctgc	tgtataggct	gggagccgtt	caaaacgagg	ttactaccac	acaccccata	3660
	accaaataca	tcatggcatg	catgtcggct	gacctggagg	tcgtcacgag	cacctgggtg	3720
5	ctggtaggcg	gagtcctagc	agctctggcc	gcgtattgcc	tgacaacagg	cagcgtggtc	3780
	attgtgggca	ggatcatctt	gtccggaaa	ccggccatca	ttcccgacag	ggaagtcctt	3840
	taccgggagt	tcgatgagat	ggaagagtgc	gcctcacacc	tcctttacat	cgaacaggga	3900
	atgcagctcg	ccgaacaatt	caaacagaag	gcaatcgggt	tgctgcaaac	agccaccaag	3960
	caagcggagg	ctgctgctcc	cgtgggtgaa	tccaagtggc	ggaccctcga	agccttctgg	4020
	gcgaagcata	tgtggaattt	catcagcggg	atacaatatt	tagcaggcctt	gtccactctg	4080
10	cctggcaacc	ccgcgatagc	atcactgatg	gcattcacag	cctctatcac	cagcccgtct	4140
	accacccaac	ataccctcct	gtttaacatc	ctggggggat	gggtggccgc	ccaacttgct	4200
	cctcccagcg	ctgcttctgc	tttctgtagc	gccggcatcg	ctggagcggc	tgttggcagc	4260
	ataggccttg	ggaaggtgct	tgtggatatt	ttggcagggt	atggagcagg	ggtggcagc	4320
	gcgctcgtgg	cttttaaggt	catgagcggc	gagatgccct	ccaccgagga	cctggttaac	4380
	ctactccctg	ctatcctctc	ccctggcgcc	ctagtctctg	gggtcgtgtg	cgcagcgata	4440
15	ctgcgtcggc	acgtgggccc	aggggagggg	gctgtgcagt	ggatgaaccg	gctgatagcg	4500
	ttcgtctcgc	ggggtaacca	cgtctccccc	acgcactatg	tgtctgagag	cgacgctgca	4560
	gcacgtgtca	ctcagatcct	ctctagtctt	accatcactc	agctgctgaa	gaggcttcac	4620
	cagtggtatca	acaggactg	ctccacgcca	cgctccggct	cgtggctaag	agatgtttgg	4680
	gattggatat	gcacgggtgt	gactgatttc	aagacctggc	tcagtccaa	gctcctgccg	4740
	cgattgccgg	gagtcacctt	cttctcatgt	caacgtgggt	acaagggagt	ctggcggggc	4800
20	gacggcatca	tgcaaacac	ctgcccattg	ggagcacaga	tcaccggaca	tgtgaaaaac	4860
	ggttccatga	ggatcgtggg	gcctaggacc	tgtagtaaca	cgtggcatgg	aacattcccc	4920
	attaacgcgt	acaccacggg	ccctgcacg	ccctcccg	cgccaaatta	ttctaggggc	4980
	ctgtggcggg	tggctgctga	ggagtacgtg	gaggttacgc	gggtggggga	tttccactac	5040
	gtgacgggca	tgaccactga	caacgtaaag	tgcccgtgtc	aggttccggc	ccccgaattc	5100
	ttcacagaag	tggatggggg	gcggttgca	aggtacgctc	cagcgtgcaa	acccctccta	5160
25	cgggaggagg	tcacattcct	ggtcgggctc	aatcaatacc	tggttgggtc	acagctccca	5220
	tgcgggcccg	aaccggacgt	agcagtgtc	acttccatgc	tcaccgacc	ctcccacatt	5280
	acggcggaga	cggctaagcg	taggctggcc	aggggatctc	cccccctctt	ggccagctca	5340
	tcagctagcc	agctgtctgc	gccttccttg	aaggcaacat	gcactaccgc	tcagtactcc	5400
	ccggacgctg	acctcatoga	ggccaacctc	ctgtggcggc	aggagatggg	cggaacatc	5460
	accgcgctgg	agtcaaaaa	taaggtagta	atthtggact	ctttcgagcc	gctccaagcg	5520
30	gaggaggatg	agagggaagt	atccgttccg	gcggagatcc	tgcgagggtc	caggaaattc	5580
	cctcgagcga	tgcccatatg	ggcagcccg	gattacaacc	ctccactgtt	agagtctcgg	5640
	aaggacccgg	actacgtccc	tcagtggtga	cacgggtgtc	cattgcccgc	tgccaaggcc	5700
	cctccgatac	cacctccaag	gaggagagg	acggttgtcc	tgtcagaatc	taccgtgtct	5760
	tctgccttgg	cggagctcgc	cacaaagacc	ttcggcagct	ccgaatcgct	ggccgtcgac	5820
	agcggcacgg	caacggcctc	tcctgaccag	ccctccgacg	acggcgacgc	gggatccgac	5880
35	gttgagtctg	actcctccat	gccccctctt	gagggggagc	cgggggatcc	cgatctcagc	5940
	gacgggtctt	ggtctaccgt	aagcgaggag	gctagtggag	acgtcgtctg	ctgctcgatg	6000
	tcctacacat	ggacaggcgc	cctgatcacg	ccatgcgctg	cggaggaaac	caagctgcc	6060
	gtcaatgcac	tgagcaactc	tttgctccgt	caccacaact	tggcttatgc	tacaacatct	6120
	cgcagcgcaa	gcctgcggca	gaagaagggtc	acctttgaca	gactgcagg	cctggacgac	6180
	cactaccggg	acgtgtctca	ggagatgaag	gcgaaggcgt	ccacagttaa	ggctaaactt	6240
40	ctatccgtgg	aggaagcctg	taagctgacg	ccccacatt	cggccagatc	taaatattggc	6300
	tatggggcaa	aggacgtccg	gaacctatcc	agcaaggccg	ttaaccacat	ccgctccgtg	6360
	tggaaaggact	tgctggaaga	cactgagaca	ccaattgaca	ccaccatcat	ggcaaaaaat	6420
	gaggttttct	gcgtccaacc	agagaagggg	ggccgcaagc	cagctcgctt	tatcgtattc	6480
	ccagatttgg	gggttcgtgt	gtgcgagaaa	atggcccttt	acgatgtgg	ctccaccctc	6540
	cctcaggccg	tgatgggctc	ttcatacggg	ttccaatact	ctcctggaca	gcgggtcgag	6600
45	ttcctggtga	atgcctggaa	agcgaagaaa	tgccttatgg	gcttcgcata	tgacacccgc	6660
	tgttttgact	caacggtcac	tgagaatgac	atccgtgttg	aggagtcaat	ctaccaatgt	6720
	tgtgacttgg	ccccgaagc	cagacaggcc	ataaggtcgc	tcacagagcg	gctttacatc	6780
	gggggcccc	tgactaattc	taaaggcgag	aactgcggct	atcgccggtg	ccgcgcgagc	6840
	ggtgtactga	cgaccagctg	cggtaatacc	ctcacatggt	atthgaaggc	cgtcgccggc	6900
	tgtcgagctg	cgaagctcca	ggactgcacg	atgctcgtat	gcggagacga	ccttgctcgt	6960
50	atctgtgaaa	gcgcggggac	ccaagaggac	gaggcgagcc	tacgggcctt	cacggaggct	7020
	atgactagat	actctgcccc	ccctggggac	ccgcccacac	cagaatacga	cttggagttg	7080
	ataacatcat	gctcctccaa	tgtgtcagtc	gcgcacgatg	catctggcaa	aagggtgtac	7140
	tatctcacc	gtgacccac	caccccctt	gcgcgggctg	cgtgggagac	agctagacac	7200
	actccagtca	attcctggct	aggcaacatc	atcatgtatg	cgcccacctt	gtgggcaagg	7260
	atgatcctga	tgactcattt	cttctccatc	cttctagctc	aggaacaact	tgaaaaagcc	7320
	ctagattgtc	agatctacgg	ggcctgttac	tccattgagc	cacttgacct	acctcagatc	7380
55	attcaacgac	tccatggcct	tagcgcattt	tcaactcata	gttactctcc	aggtgagatc	7440
	aatagggtgg	cttcatgcct	caggaaactt	ggggtaaccg	ccttgcgagt	ctggagacat	7500

EP 1 043 399 B9 (W1B1)

	cgggccagaa	gtgtccgcgc	taggctactg	tcccaggggg	ggagggctgc	cacttggtggc	7560
	aagtacctct	tcaactgggc	agtaaggacc	aagctcaaac	tcactccaat	cccggctgcg	7620
5	tcccagttgg	atztatccag	ctggttcggt	gctggttaca	gcgggggaga	catatatcac	7680
	agcctgtctc	gtgcccgacc	ccgctgggtc	atgtgggtgc	tactcctact	ttctgtaggg	7740
	gtaggcacat	atctactccc	caaccgatga	acggggagct	aaacactcca	ggccaatagg	7800
	ccatcctgtt	tttttccctt	tttttttttc	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	7860
	ttttctcctt	tttttttcct	ctttttttcc	ttttctttcc	tttggtggct	ccatcttagc	7920
10	cctagtcacg	gctagctgtg	aaaggtccgt	gagccgcttg	actgcagaga	gtgctgatac	7980
	tggcctctct	gcagatcaag	t				8001

15

20

25

30

35

40

45

50

55

<210> 7
 <211> 11076
 <212> DNA
 <213> Hepatitis C Virus

<400> 7

```

gccagcccc gattgggggc gacactccac catagatcac tcccctgtga ggaactactg 60
tcttcacgca gaaagcgtct agccatggcg ttagtatgag tgtcgtgcag cctccaggac 120
ccccctccc gggagagcca tagtgggtctg cggaaaccgtt gaggtaacccg gaattgccag 180
gacgaccggg tcctttcttg gatcaacccg ctcaatgcct ggagatttgg gcgtgcccc 240
gcgagactgc tagccgagta gtgttggtgc gcgaaaggcc ttgtgttact gcctgatagg 300
gtgcttgcca gtgccccggg aggtctcgtg gaccgtgcac catgagcacg aatcctaacc 360
ctcaaagaaa aaccaaacgt aacaccaacg ggcgcgccat gattgaacaa gatggattgc 420
acgcagggtc tccggccgct tgggtggaga ggctattcgg ctatgactgg gcacaacaga 480
caatcggtcg ctctgatgcc gccgtgttcc ggctgtcagc gcagggggcg ccggttcttt 540
15 ttgtcaagac cgacctgtcc gttgccctga atgaaetgca ggacgaggca gcgcggctat 600
cgtggctggc cagcaggggc gttccttgcg cagctgtgct cgacgttgc actgaagcgg 660
gaagggactg gctgctattg ggcgaagtgc cggggcagga tctcctgtca tctcaccttg 720
ctcctgccga gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg gcggctgcat acgcttgatc 780
cggctacctg cccattcgac caccaagcga aacatcgcat cgagcgagca cgtactcgga 840
tggaagccgg tcttgtcgat caggatgatc tggacgaaga gcatcagggg ctgcgcgacc 900
20 ccgaactgtt cggcaggctc aaggcgcgca tgcccagcgg cgaggatctc gtcgtgaccc 960
atggcgatgc ctgcttgccg aatatcatgg tggaaaatgg ccgcttttct ggattcatcg 1020
actgtggccg gctgggtgtg gcggaccgct atcaggacat agcgttggct acccgtgata 1080
ttgctgaaga gcttggcggc gaatgggctg accgcttctc cgtgctttac ggtatcgccg 1140
ctcccgatcc gcagcgcacg gccttctatc gccttcttga cgagtcttct tgagtttaa 1200
25 cagaccacaa cggtttccct ctagcgggat caattccgcc cctctccctc cccccccct 1260
aacgttactg gcggaagccg cttggaataa ggccggtgtg cgtttgtcta tatgttattt 1320
tccaccatat tgccgtcttt tggcaatgtg agggcccgga aacctggccc tgtcttcttg 1380
acgagcattc ctagggtctt tccccctctc gccaaaggaa tgcaaggtct gttgaatgtc 1440
gtgaaggaa gagttcctct ggaagcttct tgaagacaaa caacgtctgt agcgaccctt 1500
tgaggcagc ggaaccccc accctggcag aggtgcctct gcggccaaaa gccacgtgta 1560
30 taagatacac ctgcaaaggc ggcacaaccc cagtgccacg ttgtgagttg gatagttgtg 1620
gaaagagtca aatggctctc ctcaagcgta ttcaacaagg ggctgaagga tgcccagaag 1680
gtacccatt gtatgggatc tgatctgggg cctcgggtga catgctttac atgtgttag 1740
tcgaggttaa aaaacgtcta gggccccgga accacgggga cgtggttttc ctttgaaaaa 1800
cagcataata ccatgggcac gaatcctaaa cctcaagaaa aaaccaaacc taacaccaac 1860
cgccgcccac agaacgtcaa gttcccggcg ggtggtcaga tcgtcgggtg agtttacctg 1920
35 ttgcgcgca ggggccccag gttgggtgtg cgcgcgacta ggaagacttc cgagcggctc 1980
caacctcgtg gaaggcgaca acctatcccc aaggctcgcc agcccgaggg tagggcctgg 2040
gctcagcccg ggtacccctg gcccctctat ggcaatgagg gcttgggggtg ggcaggatgg 2100
ctcctgtcac cccgtggctc tgggcctagt tggggcccca cggacccccg gcgtaggctc 2160
cgcaatttgg gtaaggctat cgataccctc acgtgcggct tcgcgatct catggggtac 2220
attccgctcg tcggcgcccc cctagggggc gctgccaggg ccctggcgca tggcgctccg 2280
40 gttctggagg acggcgtgaa ctatgcaaca gggaaatctg ccggttgctc cttttctatc 2340
ttccttttgg ctttgtgtgc ctgtttgacc atcccagctt ccgcttatga agtgcgcaac 2400
gtatccggag tgtaccatgt cacgaacgac tgetccaacg caagcattgt gtatgaggca 2460
cgggacatga tcatgcatac ccccggtgac gtgccctgcg ttcgggagaa caactcctcc 2520
cgctgctggg tagcgctcac tcccacgctc gcggccagga acgctagcgt cccactacg 2580
acgatacgac gccatgtcga tttgctcgtt gggcggtgtg ctctctgctc cgctatgtac 2640
gtgggagatc tctgcggatc tgttttctc gtcgcccagc tgttcacctt ctgcctcgc 2700
45 cggcacgaga cagtacagga ctgcaattgc tcaatatatc ccggccacgt gacaggtcac 2760
cgtatggctt gggatatgat gatgaactgg tcacctacag cagccctagt ggtatcgca 2820
ttactccgga tcccacaagc tgctgtggat atggtggcgg gggccattg gggagtccta 2880
gcgggccttg cctactatcc catggtgggg aactgggcta aggttctgat tgtgatgcta 2940
ctctttgccc gcgttgacgg gggaaacctat gtgacagggg ggacgatggc caaaaacacc 3000
ctcgggatta cgtccctctt ttcacccggg tcatccaga aaatccagct tgtaaacacc 3060
50 aacggcagct ggcacatcaa caggactgcc ctgaactgca atgactccct caacactggg 3120
ttccttgcgt cgctgttcta cgtgcacaag ttcaactcat ctggatgcc agagcgcag 3180
gccagctgca gcccatcgat cgcgttcgct caggggtggg ggcocatcac ttacaatgag 3240
tcacacagct cggaccagag gccttattgt tggcactacg cccccggcc gtgcggtatc 3300
gtacccgcgg cgcaggtgtg tggtcagtg tactgcttca cccaagccc tgtcgtggtg 3360
gggacgaccg accggttcgg cgtccctacg tacagttggg gggagaatga gacggacgtg 3420
55 ctgcttctta acaacacgcg gccgcgcaa ggcaactggg ttggctgtac atggatgaat 3480
agcactgggt tcaccaagac gtgcgggggc ccccggtgta acatcgggg gatcggcaat 3540

```

	aaaaccttga	cctgccccac	ggactgcttc	cggaagcacc	ccgaggccac	ttacaccaag	3600
	tgtgggttcg	ggccttggtt	gacaccaga	tgcttggtcc	actaccata	caggcttttg	3660
	cactacccct	gcactgtcaa	ctttaccatc	ttcaagggtta	ggatgtacgt	ggggggagtg	3720
5	gagcacaggc	tcgaagccgc	atgcaattgg	actcgaggag	agcgttgtaa	cctggaggac	3780
	agggacagat	cagagcttag	cccgtgctg	ctgtctacaa	cggagtggca	ggtattgcc	3840
	tgttccttca	ccaccctacc	ggctctgtcc	actggtttga	tccatctcca	tcagaacgtc	3900
	gtggacgtac	aatacctgta	cggatatagg	tccgcggttg	tctcctttgc	aatcaaatgg	3960
	gagtatgtcc	tggtgctctt	ccttcttctg	gcggacgcgc	gcgtctgtgc	ctgcttgg	4020
	atgatgctgc	tgatagctca	agctgaggcc	gccctagaga	acctgggtgg	cctcaacgcg	4080
10	gcatccgtgg	ccggggcgca	tggcattctc	tccttctctg	tggttctctg	tgctgcctgg	4140
	tacatcaagg	gcaggctggg	ccctggggcg	gcatatgccc	tctacggcgt	atggccgcta	4200
	ctcctgctcc	tgctggcggt	accaccacga	gcatacgcca	tggaccggga	gatggcagca	4260
	tcgtgaggag	gcggggtttt	cgtaggtctg	atactcttga	ccttgtcacc	gcactataag	4320
	ctgttctctg	ctaggctcat	atggtgggtta	caatatttta	tcaccagggc	cgaggcacac	4380
	ttgcaagtgt	ggatccccc	cctcaacgtt	cgggggggcc	gcgatgccgt	catcctcctc	4440
15	acgtgcgca	tccaccaga	gctaactctt	accatcacca	aaatcttgct	cgccatactc	4500
	gggtccactca	tgggtgctcca	ggctggtata	accaaagtgc	cgtacttctg	gcgcgcacac	4560
	gggctcattc	gtgcatgcat	gctggtgctg	aaggttgctg	ggggctatta	tgtccaaatg	4620
	gctctcatga	agttggccgc	actgacaggt	acgtacgttt	atgaccatct	cacccactgc	4680
	cgggactggg	cccacgcggg	cctacgagac	cttgcggtgg	cagttgagcc	cgctgctctc	4740
	tctgatatgg	agaccaaggt	tatcacctgg	ggggcagaca	ccgcggcgtg	tggggacatc	4800
20	atcttggggc	tgcccgctct	cgcccgaggg	gggagggaga	tacatctggg	accggcagac	4860
	agccttgaag	ggcaggggtg	gcgactcctc	gcgcctatta	cggcctactc	ccaacagacg	4920
	cgaggcctac	ttggtgcat	catcactagc	ctcacaggcc	gggacaggaa	ccaggtcgag	4980
	ggggaggtcc	aagtggctct	caccgcaaca	caatctttcc	tggcgacctg	cgtcaatggc	5040
	gtgtgttggg	ctgtctatca	tgggtgccgg	tcaaagacc	ttgccggccc	aaagggccca	5100
	atcacccaaa	tgtacaccaa	tgtggaccag	gacctcgtcg	gctggcaagc	gccccccggg	5160
25	gcgcgttcct	tgcacccatg	cacctgcggc	agctcggacc	tttacttggt	cacgaggcat	5220
	gccgatgtca	ttccgggtgc	ccggcggggc	gacagcaggg	ggagcctact	ctccccagg	5280
	cccgctctct	acttgaagg	ctcttcgggc	gggtccactgc	tctgcccctc	ggggcatgct	5340
	gtgggcatct	ttcgggctgc	cgtgtgcacc	cgagggttg	cgaaggcggg	ggactttgta	5400
	cccgtcgagt	ctatggaac	cactatgcgg	tccccgtct	tcacggacaa	ctcgtcccct	5460
	ccggccgtac	cgagacatt	ccagggtggc	catctacacg	cccctactgg	tagcggcaag	5520
30	agcactaagg	tgccggctgc	gtatgcagcc	caagggtata	aggtgcttgt	cctgaacctg	5580
	tcogtgcgcg	ccaccctagg	tttcggggcg	tatatgtcta	aggcacatgg	tatcgacctc	5640
	aacatcagaa	ccggggtagg	gaccatcacc	acgggtgccc	ccatcacgta	ctccacctat	5700
	ggcaagtttc	ttgcgcagcg	tgggttgctct	gggggcgcct	atgacateat	aatatgtgat	5760
	gagtgcact	caactgactc	gaccactatc	ctgggcatcg	gcacagtcct	ggaccaagcg	5820
	gagacggctg	gagcgcgact	cgctgtgctc	gccaccgcta	cgccctcggg	atcggtcacc	5880
35	gtgccacatc	caaacatcga	ggaggtggct	ctgtccagca	ctggagaaat	ccccttttat	5940
	ggcaaaagcca	tccccatcgc	gaccatcaag	ggggggaggc	acctcatttt	ctgccatttc	6000
	aagaagaaat	gtgatgagct	cgccgcgaag	ctatccggcc	tcggactcaa	tgctgtagca	6060
	tattaccggg	gccttgatgt	atccgtcata	ccaactagcg	gagacgtcat	tgtcgtagca	6120
	acggacgcct	taatgacggg	ctttaccggc	gatttcgact	cagtatcgca	ctgcaatata	6180
	tgtgtcacc	agacagtcga	cttcagcctg	gacccgacct	tcaccattga	gacgacgacc	6240
40	gtgccacaag	acgcggtgtc	acgctcgcag	cggcgaggca	ggactggtag	gggcaggatg	6300
	ggcatttaca	ggtttgtgac	tcaggagaa	cgccctcgg	gcattgtcga	ttcctcgggt	6360
	ctgtgcgagt	gctatgacgc	gggtgtgct	tggtagcagc	tcacgccgcg	cgagacctca	6420
	gttaggttgc	gggcttacct	aaacacacca	gggtgcccgc	tctgccagga	ccatctggag	6480
	ttctgggaga	cgctctttac	aggcctcacc	cacatagacg	cccatttctt	gtcccagact	6540
	aggcaggcag	gagacaactt	cccctacctg	gtagcatacc	aggctacggg	gtgcgccagg	6600
	gctcaggctc	cacctccatc	gtgggaccaa	atgtgggagt	gtctcatacg	gctaaagcct	6660
45	acgctgcacg	ggccaacgcc	cctgctgtat	aggctgggag	ccgttcaaaa	cgaggttact	6720
	accacacacc	ccataaccaa	atacatcatg	gcattgcatgt	cggtgacct	ggaggtcgtc	6780
	acgagcacct	gggtgctggg	aggcggagtc	ctagcagctc	tggccgcgta	ttgcctgaca	6840
	acaggcagcg	tggtcattgt	gggcaggatc	atcttgtccg	gaaagccggc	catcattccc	6900
	gacagggag	tcctttaccg	ggagttcgat	gagatggaag	agtgcgcctc	acacctccct	6960
	tacatcgaac	agggatgca	gctcgccgaa	caattcaaac	agaaggcaat	cgggttgctg	7020
50	caaacagcca	ccaagcaag	ggaggtgct	gctcccgtgg	tggaaatcaa	gtggcggacc	7080
	ctcgaagcct	tctgggcgaa	gcataatgtg	aatctcatca	gcgggatata	atatttagca	7140
	ggcttgtcca	ctctgcctgg	caaccccgcg	atagcatcac	tgatggcatt	cacagcctct	7200
	atcaccagcc	cgctcaccac	ccaacatacc	ctcctgttta	acatcctggg	gggatgggtg	7260
	gcgcgccaac	ttgtcctccc	cagcgtgct	tctgctttcg	taggcgccgg	catcgttgga	7320
	gcggctgttg	gcagcatagg	ccttgggaag	gtgcttgggt	atattttggc	aggttatgga	7380
55	gcagggtggg	caggcgcgct	cgtggccttt	aaggctcatga	gcggcgagat	gccctccacc	7440
	gaggacctgg	ttaacctact	ccctgctatc	ctctcccctg	gcgccttagt	cgctgggggtc	7500

	gtgtgcgcag	cgatactgcg	tccggcacgtg	ggcccagggg	agggggctgt	gcagtggatg	7560
	aaccggctga	tagcgttcgc	ttcgcggggg	aaccacgtct	ccccacgca	ctatgtgtct	7620
5	gagagcgacg	ctgcagcacg	tgtcactcag	atcctctcta	gtcttaccat	cactcagctg	7680
	ctgaagaggc	ttcaccagtg	gatcaacgag	gactgtctca	cgccatgctc	cggctcgtgg	7740
	ctaagagatg	tttgggattg	gatatgcacg	gtgttgactg	atttcaagac	ctggctccag	7800
	tccaagctcc	tgccgcgatt	gccgggagtc	cccttcttct	catgtcaacg	tgggtacaag	7860
	ggagtctggc	ggggcgacgg	catcatgcaa	accacctgcc	catgtggagc	acagatcacc	7920
	ggacatgtga	aaaacggttc	catgaggatc	gtggggccta	ggacctgtag	taacacgtgg	7980
10	catggaacat	tccccattaa	cgcgtacacc	acgggccctc	gcacgccctc	cccgcgcca	8040
	aattattcta	gggcgctgtg	gcgggtggct	gctgaggagt	acgtggaggt	tacgcgggtg	8100
	ggggatttcc	actacgtgac	gggcatgacc	actgacaacg	taaagtggcc	gtgtcagggt	8160
	ccggcccccg	aattcttcac	agaagtggat	gggggtgcgg	tgcacaggta	cgtctccagc	8220
	tgcaaaccct	tcctacggga	ggaggtcaca	ttcctggctg	ggctcaatca	atacctgggt	8280
15	gggtcacagc	tcccatgcgg	gcccgaaacc	gacgtagcag	tgctcacttc	catgtctacc	8340
	gacccctccc	acattacggc	ggagacggct	aagcgtaggc	tggccagggg	atctcccccc	8400
	tccttgGCCA	gctcatcagc	tagccagctg	tctgcgcctt	ccttgaaggc	aacatgcact	8460
	acccgtcatg	actccccgga	cgtgcacctc	atcgaggcca	acctcctgtg	gcggcaggag	8520
	atgggcggga	acatcacccg	cgtggagtca	gaaaataagg	tagtaatttt	ggactctttc	8580
	gagccgctcc	aagcggagga	ggatgagagg	gaagtatccg	ttccggcgga	gacccgtcgg	8640
20	aggtccagga	aattccctcg	agcgtatgcc	atatgggcac	gcccggatta	caaccctcca	8700
	ctgttagagt	cctggaagga	cccggactac	gtccctccag	tggtagacgg	gtgtccattg	8760
	ccgcctGCCA	aggccctccc	gataccacct	ccacggaggg	agaggacggt	tgtcctgtca	8820
	gaatctaccg	tgtcttctgc	cttggcgagg	ctcgccacaa	agacctcgg	cagctccgaa	8880
	tcgtcggccg	tcgacagcgg	cacggcaacg	gcctctcctg	accagccctc	cgcgcagcgc	8940
25	gacgcgggat	ccgacgttga	gtcgtactcc	tccatgcccc	cccttgaggg	ggagccgggg	9000
	gatcccgatc	tcagcgacgg	gtcttggctc	accgtaagcg	aggaggctag	tgaggacgtc	9060
	gtctgtctgt	cgtgtccta	cacatggaca	ggcgccctga	tcacgccatg	cgtgcgggag	9120
	gaaaccaagc	tgcccgtaaa	tgcactgagc	aactctttgc	tcggtcacca	caacttggtc	9180
	tatgtacaaa	catctgcgag	cgcaagcctg	cggcagaaga	aggtcacctt	tgacagactg	9240
	caggtcctgg	acgaccacta	ccgggacgtg	ctcaaggaga	tgaaggcgaa	ggcgtccaca	9300
30	gttaaggcta	aacttctatc	cgtggaggaa	gcctgtaagc	tgacgcccc	acattcggcc	9360
	agatctaaat	ttggctatgg	ggcaaaggac	gtccggaacc	tatccagcaa	ggccgttaac	9420
	cacatccgct	ccgtgtggaa	ggacttgtct	gaagacactg	agacaccaat	tgacaccacc	9480
	atcatggcaa	aaaatgaggt	tttctgcgtc	caaccagaga	agggggggcc	caagccagct	9540
	cgccttatcg	tattcccaga	tttgggggtt	cgtgtgtgcg	agaaaatggc	cctttacgat	9600
35	gtgggtctcca	ccctccctca	ggccgtgatg	ggctcttcat	acggattcca	atactctcct	9660
	ggacagcggg	tcgagttcct	ggtgaatgcc	tggaaagcga	agaaatgcc	tatgggcttc	9720
	gcatatgaca	cccgctgttt	tgactcaacg	gtcactgaga	atgacatccg	tgttgaggag	9780
	tcaatctacc	aatgtttgta	cttggccccc	gaagccagac	aggccataag	gtcgtccaca	9840
	gagcggcttt	acatcggggg	ccccctgact	aattctaaag	ggcagaactg	cggctatcgc	9900
	cgggtcccg	cgagcgggtg	actgacgacc	agctgcggta	ataccctcac	atgttatgtg	9960
40	aaggccgctg	cggcctgtcg	agctgcgaag	ctccaggact	gcacgatgct	cgtatgcgga	10020
	gacgaccttg	tcgttatctg	tgaagcgcg	gggacccaag	aggacgaggc	gagcctacgg	10080
	gccttcacgg	aggctatgac	tagatactct	gccccccctg	gggacccgcc	caaaccagaa	10140
	tacgacttgg	agttgataac	atcatgctcc	tccaatgtgt	cagtcgcgca	cgatgcactc	10200
	ggcaaaagg	tgtactatct	cacccgtgac	cccaccaccc	cccttgccgc	ggctgcgtgg	10260
	gagacagcta	gacacactcc	agtcaattcc	tggttaggca	acatcatcat	gtatgcgccc	10320
45	accttgtggg	caaggatgat	cctgatgact	catttcttct	ccatccttct	agctcaggaa	10380
	caacttga	aagccctaga	ttgtcagatc	tacggggcct	gttactccat	tgagccactt	10440
	gacctacctc	agatcattca	acgactccat	ggccttagcg	catttttact	ccatagtta	10500
	tctccagggtg	agatcaatag	ggtggcttca	tgctcagga	aacttggggg	accgcccttg	10560
	cgagtctgga	gacatcgggc	cagaagtgtc	cgcgctaggc	tactgtccca	gggggggagg	10620
	gctgccactt	gtggcaagta	cctcttcaac	tgggcagtaa	ggaccaagct	caaactcact	10680
50	ccaatcccgg	ctgcgtccca	gttggtatga	tccagctggg	tcgttgctgg	ttacagcggg	10740
	ggagacatat	atcacagcct	gtctcgtgcc	cgaccccgct	ggttcattgt	gtgctacttc	10800
	ctactttctg	taggggttag	catctatcta	ctccccaa	gatgaacggg	gagctaaaca	10860
	ctccaggcca	ataggccatc	ctgttttttt	cccttttttt	ttttcttttt	tttttttttt	10920
	tttttttttt	tttttttttc	tccttttttt	ttctcttttt	tttctttttc	tttcttttgg	10980
55	tggtccatc	ttagccctag	tcacggctag	ctgtgaaagg	tccgtgagcc	gcttgactgc	11040
	agagagtgtc	gatactggcc	tctctgcaga	tcaagt			11076

<210> 8
 <211> 8001
 <212> DNA
 <213> Hepatitis C Virus

<400> 8

	gccagccccc	gattgggggc	gacactccac	catagatcac	tcccctgtga	ggaactactg	60
	tcttcacgca	gaaagcgtct	agccatggcg	ttagtatgag	tgtcgtgcag	cctccaggac	120
10	ccccctccc	gggagagcca	tagtggctcg	cggaaacggg	gagtacaccg	gaattgccag	180
	gacgaccggg	tcccttcttg	gatcaaccgg	ctcaatgcct	ggagatttgg	gcgtgcccc	240
	gcgagactgc	tagccgagta	gtgttgggtc	gcgaaaggcc	ttgtgggtact	gcctgatagg	300
	gtgcttgcca	gtgccccggg	aggtctcgta	gaccgtgcac	catgagcacg	aatcctaaac	360
	ctcaagaaa	aaccaaactg	aacaccaacg	ggcgcccat	gattgaacaa	gatggattgc	420
	acgcagggtc	tccggccgct	tgggtggaga	ggctattcgg	ctatgactgg	gcacaacaga	480
15	caatcggctg	ctctgatgcc	gccgtgttcc	ggctgtcagc	gcaggggcgc	ccggttcttt	540
	ttgtcaagac	cgacctgtcc	ggtgccctga	atgaactgca	ggacgaggca	gcgcggctat	600
	cgtggctggc	cacgacgggc	gttcccttgc	cagctgtgct	cgacgttgtc	actgaagcgg	660
	gaagggactg	gctgctattg	ggcgaagtgc	cggggcagga	tctcctgtca	tctcaccttg	720
	ctcctgccga	gaaagtatcc	atcatggctg	atgcaatgcg	gcggctgcat	acgcttgatc	780
	cggtacacct	cccattcgac	caccaagcga	aacatcgcat	cgagcgagca	cgtactcgga	840
20	tggaagccgg	tcttgtcgat	caggatgac	tggacgaaga	gcacagggg	ctcgcgccag	900
	ccgaactgtt	gcgcaggctc	aaggcgcgca	tgcccagcgg	cgaggatctc	gtcgtgacct	960
	atggcgatgc	ctgcttgcgg	aatatcatgg	tggaaaatgg	ccgcttttct	ggattcatcg	1020
	actgtggccg	gctgggtgtg	gcggaccgct	atcaggacat	agcgttggct	acccgtgata	1080
	ttgctgaaga	gcttggcggc	gaatgggctg	accgcttcc	cgtgctttac	ggtatcgccg	1140
	ctcccgattc	gcagcgcatc	gccttctatc	gccttcttga	cgagttcttc	tgagtttaaa	1200
	cagaccacaa	cggtttccct	ctagcgggat	caattccgcc	cctctccctc	ccccccctc	1260
25	aacgttactg	gccgaagccg	cttggaaata	ggccggtgtg	cgtttgtcta	tatgttattt	1320
	tccaccatat	tgccgtcttt	tggcaatgtg	agggcccgga	aacctggccc	tgtcttcttg	1380
	acgagcattc	ctaggggtct	ttcccctctc	gccaaaggaa	tgcaaggtct	gttgaatgtc	1440
	gtgaaggaag	cagttccctc	ggaagcttct	tgaagacaaa	caacgtctgt	agcgacctt	1500
	tgaggcagc	ggaaccccc	acctggcgac	aggtgcctct	gcggccaaaa	gccacgtgta	1560
30	taagatacac	ctgcaaaggc	ggcacaacc	cagtgccacg	ttgtgagttg	gatagttgtg	1620
	gaaaggtca	aatggctctc	ctcaagcgta	ttcaacaagg	ggctgaagga	tgcccagaag	1680
	gtacccatt	gtatgggatc	tgatctgggg	cctcggtgca	catgctttac	atgtgtttag	1740
	tcgaggttaa	aaaacgtcta	ggccccccga	accacgggga	cgtggttttc	ctttgaaaaa	1800
	cacgataata	ccatggcgcc	tattacggcc	tactcccaac	agacgcgagg	cctacttggc	1860
	tgcatcatca	ctagcctcac	agggccggac	aggaaccagg	tcgaggggga	ggtccaagtg	1920
	gtctccaccg	caacacaatc	tttccctggc	acctgcgtca	atggcggtg	ttggactgtc	1980
35	tatcatggtg	ccggtcctaa	gacccctggc	ggcccaagg	gcccatacac	ccaaatgtac	2040
	accaatgtgg	accaggacct	cgtcggtctg	caagcgcccc	ccggggcgcg	ttccttgaca	2100
	ccatgcacct	gcggcagctc	ggacctttac	ttggtcacga	ggcatgccga	tgtcattccg	2160
	gtgcgcggc	ggggcgacag	cagggggagc	ctactctccc	ccaggcccgt	ctcctacttg	2220
	aagggtctct	cgggcggtcc	actgctctgc	ccctcggggc	acgctgtggg	catctttcgg	2280
	gctgcctgtg	gcacccgagg	ggttgccaag	gcggtggact	ttgtacccgt	cgagtctatg	2340
40	gaaaccacta	tgcgttcccc	ggtcttcacg	gacaactcgt	cccctccggc	cgtaccgcag	2400
	acattccagg	tggcccatct	acacgcccct	actggtagcg	gcaagagcac	taaggtgccg	2460
	gctgcgtatg	cagcccaagg	gtataagggtg	cttgtcctga	accgctccgt	cgccgcacc	2520
	ctaggtttcg	ggcggtatat	gtctaaggca	catggtatcg	accctaaccat	cagaatcggg	2580
	gtaaggacca	tcaccacggg	tgcccccatc	acgtactcca	cctatggcaa	gtttcttgcc	2640
	gacggtggtt	gctctggggg	cgctatgac	atcataatat	gtgatgagtg	ccactcaact	2700
45	gactcgacca	ctatcctggg	catcggcaca	gtcctggacc	aagcggagac	ggctggagcg	2760
	cgactcgtcg	tgctcgccac	cgctacgcct	cgggagtcgg	tcaccgtgcc	acatccaaac	2820
	atcgaggagg	tggctctgtc	cagcaactgga	gaaatcccct	tttatggcaa	agccatcccc	2880
	atcgagacca	tcaagggggg	gaggcacctc	attttctgcc	attccaagaa	gaaatgtgat	2940
	gagctcgccg	cgaagctgtc	cggcctcgga	ctcaatgctg	tagcatatta	ccggggcctt	3000
	gatgtatcgg	tcataccaac	tagcggagac	gtcattgtcg	tagcaacgga	cgctctaata	3060
50	acgggcttta	ccggtgactt	cgactcagtg	atcgactgca	atacatgtgt	caccagaca	3120
	gtcgacttca	gcctggaccc	gaccttcacc	attgagacga	cgaccgtgcc	acaagacggc	3180
	gtgtcacgct	cgcagcggcg	aggcaggact	ggtaggggca	ggatgggcat	ttacagggtt	3240
	gtgactccag	gagaacggcc	ctcgggcagc	ttcgattcct	cggttctgtg	cgagtgttat	3300
	gacgcgggct	gtgcttggtg	cgagctcacg	ccgcgcgaga	cctcagttag	gttgcgggct	3360
	tacctaatac	caccagggtt	gccggtctgc	caggaccatc	tggagtcttg	ggagagcgtc	3420
55	tttacaggcc	tcaccacat	agacgcccac	ttcttgtccc	agactaagca	ggcaggagac	3480
	aacttcccct	acctggttagc	ataccaggct	acggtgtgcg	ccagggtcca	ggctccacct	3540

	ccatcgtggg	accaaagtgt	gaagtgtctc	atacggctaa	agcctacgct	gcacggggcca	3600
	acgcccctgc	tgtataggct	gggagccgtt	caaaacgagg	ttactaccac	acaccccata	3660
5	accaaataca	tcatggcatg	catgtcggct	gacctggagg	tcgtcacgag	cacctgggtg	3720
	ctggtaggcg	gagtcctagc	agctctggcc	gcgtattgcc	tgacaacagg	cagcgtggtc	3780
	attgtgggca	ggatcatctt	gtccggaaag	ccggccatca	ttcccgacag	ggaagtcctt	3840
	taccgggagt	tcgatgagat	ggaagagtgc	gcctcacacc	tcctttacat	cgaacaggga	3900
	atgcagctcg	ccgaacaatt	caaacagaag	gcaatcgggt	tgctgcaaac	agccaccaag	3960
	caagcggagg	ctgctgctcc	cgtggtggaa	tccaagtggc	ggaccatcga	agccttcttg	4020
10	gcgaagcata	tgtggaattt	catcagcggg	atacaatatt	tagcaggcct	gtccactctg	4080
	cctggcaacc	ccgcgatagc	atcactgatg	gcattcacag	cctctatcac	cagcccgctc	4140
	accacccaac	atacctcctt	gtttaacatc	ctggggggat	gggtggccgc	ccaacttgct	4200
	cctcccagcg	ctgcttctgc	tttcgttagc	gccggcatcg	ctggagcggc	tgttggcagc	4260
	ataggccttg	ggaaggtgct	tgtggatatt	ttggcagggt	atggagcagg	ggtggcaggc	4320
	gcgctcgtgg	cctttaaggt	catgagcggc	gagatgccct	ccaccgagga	cctggttaac	4380
	ctactccctg	ctatcctctc	ccctggcgcc	ctagtctcg	gggtcgtgtg	cgcagcgata	4440
15	ctgcgtcggc	acgtggggcc	aggggagggg	cgtgtgcagt	ggatgaaccg	gctgatagcg	4500
	ttcgtcttcg	ggggtaacca	cgtctccccc	acgcactatg	tgcttgagag	cgcagctgca	4560
	gcacgtgtca	ctcagatcct	ctctagtctt	accatcactc	agctgctgaa	gaggcttcac	4620
	cagtggatca	acgaggactg	ctccacgcca	tgctccggct	cgtggctaag	agatgttttg	4680
	gattggatat	gcacggtgtt	gactgatttc	aagacctggc	tccagtccaa	gctcctgccg	4740
20	cgattggcgg	gagtcgccct	cttctcatgt	acaacgtggg	acaaggagg	ctggcggggc	4800
	gacggcatca	tgcaaacacc	ctgcccattg	ggggcacaga	tcaccggaca	tgtgaaaaac	4860
	ggttccatga	ggatcgtggg	gcctaggacc	tgtagttaaca	cgtggcatgg	aacattcccc	4920
	attaacgcgt	acaccacggg	ccctgcacg	ccctccccgg	cgccaaatta	ttctaggggc	4980
	ctgtggcggg	tggtctgctg	ggagtacgtg	gaggttacgc	gggtggggga	tttccactac	5040
	gtgacgggga	tgaccactga	cgacgtaaag	tgcccgtgtc	aggttcgggc	ccccgaattc	5100
25	ttcacagaag	tggtgggggt	gcggttgac	aggtacgctc	cagcgtgcaa	acccctccta	5160
	cgggaggagg	tcacattcct	ggtcgggctc	aatcaatacc	tggttgggtc	acagctccca	5220
	tgcgagcccg	aaccggatgt	agcagtgtc	acttccatgc	tcaccgaccc	ctccacatt	5280
	acggcggaga	cggttaagcg	taggtggcc	aggggatctc	ctccccctt	ggccagctca	5340
	tcagctagcc	actgtctgc	gccttccttg	aaggcaacat	gcactaccog	tcatgactcc	5400
	ccggacgctg	acctcatcga	ggccaacctc	ctgtggcggc	aggagatggg	cgggaacatc	5460
	acccgcgtgg	agtcagaaaa	taaggtagta	atthttgact	ctttcgagcc	gctccaagcg	5520
30	gaggaggatg	agagggaagt	atccgttccg	gcggagatcc	tgccgagggtc	caggaaattc	5580
	cctcgagcga	tgcccatatg	ggcagcccg	gattacaacc	ctccactgtt	agagtccctg	5640
	aaggaccggg	actacgtccc	tccagtggta	caagggtgtc	cattgcccgc	tgccaaaggc	5700
	cctccgatac	caccttcacg	gaggaagagg	acggttgtcc	tgtcagaatc	taccgtgtct	5760
	tctgccttgg	cggagctcgc	cacagagacc	ttcggcagct	ccgaatcgtc	ggccgtcgac	5820
	agcggcacgg	caacggcctc	tcctgaccag	ccctccgacg	acggcgacgc	gggatccgac	5880
35	ggttagtcgt	actcctccat	gccccccctt	gagggggagc	cgggggatcc	cgatctcagc	5940
	gacgggtctt	ggtctaccgt	aagcggagg	ctagttagg	acgtcgtctg	ctgctcgatg	6000
	tcctacacat	ggacaggcgc	cctgatcacg	ccatgcgctg	cggaggaaac	caagctgccc	6060
	atcaatgcac	tgagcaactc	tttgctccgt	caccacaact	tggtctatgc	tacaacatct	6120
	cgcagcgcaa	gcctgcggca	gaagaaggtc	acctttgaca	gactgcagg	cctggacgac	6180
	cactaccggg	acgtgtccta	ggagatgaag	gcgaaggcgt	ccacagttaa	ggctaaactt	6240
40	ctatccgtgg	aggaagcctg	taagctgacg	ccccacatt	cggccagatc	taaatattggc	6300
	tatggggcaa	aggacgtccg	gaacctatcc	agcaaggccg	ttaaccacat	ccgctccgtg	6360
	tggaaggact	tgctggaaga	cactgagaca	ccaattgaca	ccaccatcat	ggcaaaaaat	6420
	gaggttttct	gcgtccaacc	agagaagggg	ggccgcaagc	cagctcgcc	tatcgtatcc	6480
	ccagatttgg	gggttcgtgt	gtgcgagaaa	atggcccttt	acgatgtggt	ctccaccctc	6540
45	cctcaggccg	tgatgggctc	ttcatacgg	ttccaatact	ctcctggaca	gcgggtcgag	6600
	ttcctggtga	atgcctggaa	agcgaagaaa	tgccctatgg	gcttcgcata	tgacacccgc	6660
	tggttttgact	caacggtcac	tgagaatgac	atccgtgttg	aggagtcaat	ctaccaatgt	6720
	tggtgacttg	ccccgaagc	cagacaggcc	ataaggctcg	tcacagagcg	gctttacatc	6780
	gggggcccc	tgactaatcc	taaaaggcag	aactgcggct	atcgccggtg	ccgcgcgagc	6840
	ggactactga	cgaccagctg	cggtaatacc	ctcacatgtt	acttgaaggc	cgctgcggcc	6900
	tgctcagctg	cgaagctcca	ggactgcacg	atgctcgtat	gcggagacga	ccttgctcgt	6960
50	atctgtgaaa	gcgcggggac	ccaagaggac	gagcgagacc	tacgggcctt	cacggaggct	7020
	atgactagat	actctgcccc	ccctggggac	ccgccccaac	cagaatacga	cttgaggttg	7080
	ataacatcat	gctcctccaa	tgtgtcagtc	gcgcagcatg	catctggcaa	aaggtgtgac	7140
	tatctcacc	gtgacccac	caccccccct	gcgcgggctg	cgtgggagac	agctagacac	7200
	actccagtca	attcctggct	aggcaacatc	atcatgtatg	cgccacactt	gtgggcaagg	7260
	atgatcctga	tgactcattt	cttctccatc	cttctagctc	aggaacaact	tgaaaaagcc	7320
	ctagattgtc	agatctacgg	ggcctgttac	tccattgagc	cacttgacct	acctcagatc	7380
55	attcaacgac	tccatggcct	tagcgcattt	tactccata	gttactctcc	aggtgagatc	7440
	aatagggtgg	cttcatgcct	caggaaactt	gggttaccgc	ccttgcgagt	ctggagacat	7500

EP 1 043 399 B9 (W1B1)

	cgggccagaa	gtgtccgcgc	taggctactg	tcccaggggg	ggagggctgc	cacttgtggc	7560
	aagtacctct	tcaactgggc	agtaaggacc	aagctcaaac	tcactccaat	cccggctgcg	7620
5	tcccagtttg	atztatccag	ctggttcggt	gctggttaca	gcgggggaga	catatatcac	7680
	agcctgtctc	gtgcccgaac	ccgctgggtc	atgtgggtgc	tactcctact	ttctgtaggg	7740
	gtaggcattc	atctactccc	caaccgatga	acggggagct	aaacactcca	ggccaatagg	7800
	ccatcctgtt	tttttccctt	tttttttttc	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	7860
	ttttctcctt	tttttttcc	ctttttttcc	ttttctttcc	tttggtggct	ccatcttagc	7920
10	cctagtcacg	gctagctgtg	aaagggtccg	gagccgcttg	actgcagaga	gtgctgatac	7980
	tggcctctct	gcagatcaag	t				8001

15

20

25

30

35

40

45

50

55

<210> 9
 <211> 11076
 <212> DNA
 <213> Hepatitis C Virus

<400> 9

	gccagccccc	gattgggggc	gacactccac	catagatcac	tcccctgtga	ggaactactg	60
	tcttcacgca	gaaagcgtct	agccatggcg	ttagtatgag	tgctcgtgcag	cctccaggac	120
	ccccctccc	gggagagcca	tagtgggtctg	cggaaaccgt	gagtaacccg	gaattgccag	180
10	gacgaccggg	tcctttcttg	gatcaaccgc	ctcaatgcct	ggagatttgg	gcgtgcccc	240
	gcgagactgc	tagccgagta	gtgttgggtc	gcgaaaggcc	ttgtggtact	gcctgatagg	300
	gtgcttgcca	gtgcccggg	aggtctcgta	gaccgtgcac	catgagcacg	aatcctaaac	360
	ctcaagaaaa	aaccaaacgt	aacaccaacg	ggcgcgccat	gattgaacaa	gatggattgc	420
	acgcaggttc	tccggccgct	tgggtggaga	ggctattcgg	ctatgactgg	gcacaacaga	480
	caatcgctg	ctctgatgcc	gcgtgttcc	ggctgtcagc	gcaggggcgc	ccggttcttt	540
15	ttgtcaagac	cgacctgtcc	ggtgccctga	atgaactgca	ggacgaggca	gcgcggctat	600
	cgtggctggc	cacgacgggc	gttccttgcg	cagctgtgct	cgacgttgct	actgaagcgg	660
	gaagggactg	gctgctattg	ggcgaagtgc	cggggcagga	tctcctgtca	tctcaccttg	720
	ctctgccga	gaaagtatcc	atcatggctg	atgcaatgcg	gcggctgcat	acgcttgatc	780
	cggctacctg	ccattcgac	caccaagcga	aacatcgcat	cgagcgagca	cgtactcgga	840
	tggaagccgg	tcttgtcgat	caggatgac	tggacgaaga	gcacagggg	ctcgcgccag	900
20	ccgaactgtt	cgccaggctc	aaggcgcgca	tgcccgacgg	cgaggatctc	gtcgtgaccc	960
	atggcgatgc	ctgcttgccg	aatatcatgg	tggaaaatgg	ccgcttttct	ggattcatcg	1020
	actgtggccg	gctgggtgtg	gcggaaccgt	atcaggacat	agcgttggct	accggtgata	1080
	ttgtgaaga	gcttggcggc	gaatgggctg	accgcttctc	cgtgctttac	ggtatcgccg	1140
	ctcccgattc	gcagcgcatc	gccttctatc	gccttcttga	cgagttcttc	tgagtttaaa	1200
	cagaccacaa	cggtttccct	ctagcgggat	caattccgcc	cctctccctc	ccccccct	1260
25	aacgttactg	gccgaagccg	cttggataaa	ggccggtgtg	cgtttgtcta	tatgttattt	1320
	tccaccatat	tgccgtcttt	tggcaatgtg	agggcccgga	aacctggccc	tgtcttcttg	1380
	acgagcattc	ctaggggtct	ttccctctc	gccaaaggaa	tgcaaggctc	gttgaatgtc	1440
	gtgaaggagc	cagttcctct	ggaagcttct	tgaagacaaa	caacgtctgt	agcgacctt	1500
	tgcaaggcag	ggaacccccc	acctggcgac	agggtcctct	gcggccaaaa	gccacgtgta	1560
	taagatacac	ctgcaaaggc	ggcacaaccc	cagtgccacg	ttgtgagttg	gatagttgtg	1620
30	gaaagagtca	aatggctctc	ctcaagcgta	ttcaacaagg	ggctgaagga	tgcccagaag	1680
	gtaccccat	gtatgggatc	tgatctgggg	cctcgttgca	catgctttac	atgtgtttag	1740
	tcgaggttaa	aaaacgtcta	ggccccccga	accacgggga	cgtggttttc	ctttgaaaaa	1800
	cacgataata	ccatgggcac	gaatccataa	gcctcaagaa	aaaccaaacg	taacacaaa	1860
	cgccgcccac	aggacgtcaa	gttcccgggc	ggtggtcaga	tcgtcggtgg	agtttacctg	1920
	ttgccgcgca	ggggccccag	gttgggtgtg	cgcgcgacta	ggaagacttc	cgagcggtcg	1980
35	caacctcgtg	gaaggcgaca	acctatcccc	aaggctcgcc	agcccgaggg	tagggcctgg	2040
	gctcagcccg	ggtaccctctg	gcccctctat	ggcaatgagg	gcttgggggtg	ggcaggatgg	2100
	ctcctgtcac	cccgtggctc	tcggcctagt	tggggcccca	cggacccccg	gcgtaggctg	2160
	cgcaatttgg	gtaaggctcat	cgataccctc	acgtgcggct	tcgccgatct	catggggtag	2220
	attccgctcg	tcggcgcccc	cctagggggc	gctgccaggg	ccctggcgca	tggcgtccgg	2280
	gttctggagg	acggcgtgaa	ctatgcaaca	gggaatctgc	ccggttgctc	cttttctatc	2340
40	ttccttttgg	ctttgctgtc	ctgtttgacc	atcccagctt	ccgcttatga	agtgcgcaac	2400
	gtatccggag	tgtacctagt	cacgaacgac	tgctccaacg	caagcattgt	gtatgaggca	2460
	gcggacatga	tcatgcatac	ccccgggtgc	gtgccctgcg	ttcgggagaa	caactcctcc	2520
	cgctgctggg	tagcgtcac	tcccacgtc	gcggccagga	acgctagcgt	ccccactacg	2580
	acgatacgac	gccatgtcga	tttgcctgtt	ggggcggtcg	ctctctgctc	cgctatgtac	2640
	gtgggagatc	tctgcggatc	tgttttcctc	gtcgccagc	tgttcacctt	ctcgccctgc	2700
45	gggcacgaga	cagtacagga	ctgcaattgc	tcaatatatc	ccggccacgt	gacaggtcac	2760
	cgtatggcct	gggatatgat	gatgaactgg	tcacctacag	cagccctagt	ggtatcgca	2820
	ttactccgga	tcccacaagc	tgctgtggat	atgggtggcg	gggcccattg	gggagtccta	2880
	gcgggccttg	cctactattc	catggtgggg	aactgggcta	aggttctgat	tgtgatgcta	2940
	ctctttgcgg	gcgttgacgg	gggaacctat	gtgacagggg	ggacgatggc	caaaaacacc	3000
	ctcgggatta	cgctccctctt	ttcacccggg	tcattccaga	aaatccagct	tgtaaacacc	3060
50	aacggcagct	ggcacatcaa	caggactgcc	ctgaactgca	atgactccct	caacactggg	3120
	ttccttgcgt	cgctgttcta	cgtgcacaag	ttcaactcat	ctggatggcc	agagcgcatg	3180
	gccagctgca	gccccatcga	cgcggttcgt	caggggtggg	ggcccatcac	ttacaatgag	3240
	tcacacagct	cggaccagag	gccttattgt	tggcactacg	caccccgcc	gtgcggtatc	3300
	gtacccgcgg	cgcagggtgtg	tggtccagtg	tactgcttca	ccccaaagccc	tgctcgtggg	3360
	gggacgacgg	accggttcgg	cgtccctacg	tacagttggg	gggagaatga	gacggacgtg	3420
55	ctgcttctta	acaacacggc	gcccgcgcaa	ggcaactggg	ttggctgtac	atggatgaat	3480
	agcactgggt	tcaccaagac	gtgcgggggc	ccccggtgta	acatcggggg	gatcggcaat	3540

	aaaaccttga	cctgccccac	ggactgcttc	cggaagcacc	ccgaggccac	ttacaccaag	3600
	tgtggttcgg	ggccttggtt	gacacccaga	tgcttggtcc	actaccata	caggcttttg	3660
	cactacccct	gcactgtcaa	ctttaccatc	ttcaaggtaa	ggatgtacgt	ggggggagtg	3720
5	gagcacaggg	tcgaagccgc	atgcaattgg	actcgaggag	agcgttgtaa	cctggaggac	3780
	agggacagat	cagagcttag	cccgtctgtg	ctgtctacaa	cggagtggca	ggtattgccc	3840
	tgttccctca	ccaccctacc	ggctctgtcc	actggtttga	tccatctcca	tcagaacgtc	3900
	gtggacgtac	aatacctgta	cggatatagg	tcggcggttg	tctcctttgc	aatcaaatgg	3960
	gagtatgtcc	tggtgtctct	ccttcttctg	gcggacgcgc	gcgtctgtgc	ctgcttggtg	4020
	atgatgtctg	tgatagctca	agctgaggcc	gccctagaga	acctgggtgt	cctcaacgcg	4080
10	gcatccgtgg	ccggggcgca	tggcattctc	tccttctctg	tggtcttctg	tgctgcctgg	4140
	tacatcaagg	gcaggtcgtt	ccctggggcg	gcatacgccc	tctacggcgt	atggccgcta	4200
	ctcctgctcc	tgctggcggt	accaccacga	gcatacgcca	tggaccggga	gatggcagca	4260
	tcgtgcggag	gcgcgggttt	cgtaggtctg	atactcttga	ccttgctacc	gcactataag	4320
	ctgttccctg	ctaggctcat	atggtgggta	caatatttta	tcaccagggc	cgaggcacac	4380
	ttgcaagtgt	ggatccccc	cctcaacgtt	cggggggggc	gcgatgccgt	catcctcttc	4440
15	acgtgcgcga	tcacccaga	gctaactctt	accatcacca	aaatcttgct	cgccatactc	4500
	ggtccactca	tggtgtctca	ggctgggtata	accaaagtgc	cgtacttctg	gcgcgcacac	4560
	gggtcatttc	gtgcatgcat	gctgggtcgg	aaggttgctg	ggggtcatta	tgtccaaatg	4620
	gctctcatga	agttggccgc	actgacaggt	acgtacgttt	atgaccatct	cacccactgc	4680
	cgggactggg	cccacgcggg	cctacgagac	cttgcggttg	cagttgagcc	cgctcgtctc	4740
	tctgatattg	agaccaaggt	tatcacctgg	ggggcagaca	ccgcggcgtg	tggggacatc	4800
20	atcttggggc	tgcccgtctc	cgcccgagg	gggagggaga	tacatctggg	accggcagac	4860
	agccttgaag	ggcaggggtg	gcgactcctc	gcgcctatta	cggcctactc	ccaacagacg	4920
	cgaggcctac	ttggctgcat	catcacatag	ctcacaggcc	gggacaggaa	ccaggtcgag	4980
	ggggagggtc	aagtgtcttc	caccgcaaca	caatctttcc	tggcgacctg	cgtcaatggc	5040
	gtgtgttggg	ctgtctatca	tggtgccggc	tcaaagacct	ttgccggccc	aaagggccca	5100
	atcacccaaa	tgtacaccaa	tgtggaccag	gacctcgtcg	gctggcaagc	gccccccggg	5160
25	gcgcgttcc	tgacaccatg	cacctgcggc	agctcggacc	tttacttggt	cacgaggcat	5220
	cccgcgtctc	ttccggtgcg	ccggcggggc	gacagcaggg	ggagcctact	ctccccagg	5280
	cccgctcctc	acttgaagg	ctcttcgggc	ggtccactgc	tctgcccctc	ggggcacgct	5340
	gtgggcatct	ttcgggctgc	cgtgtgcacc	cgaggggttg	cgaaggcggg	ggactttgta	5400
	cccgtcgaag	ctatggaaac	cactatgcgg	tcgccgggtc	tcacggacaa	ctcgtccctc	5460
	ccggccgtac	cgcagacatt	ccaggtggcc	catctacacg	cccctactgg	tagcggcagg	5520
30	agcactaagg	tgccggctgc	gtatgcagcc	caagggtata	aggtgcttgt	cctgaaccgg	5580
	tcgctcgcgc	ccaccctagg	tttcggggcg	tatatgtcta	aggcacatgg	tatcgacctc	5640
	aacatcagaa	tcggggtaag	gaccatcacc	acgggtgccc	ccatcacgta	ctccacctat	5700
	ggcaagtttc	ttgccgacgg	tggttgctct	ggggggcgct	atgacatcat	aatatgtgat	5760
	gagtgccact	caactgactc	gaccactatc	ctgggcatcg	gcacagtcc	ggaccaagcg	5820
	gagacggctg	gagcgcgact	cgtcgtgctc	gccacgccta	cgccctccgg	atcggtcacc	5880
35	gtgccacatc	caaacatcga	ggaggtggct	ctgtccagca	ctggagaaat	ccccctttat	5940
	ggcaaagcca	tcgccatcga	gaccatcaag	ggggggaggc	acctcatttt	ctgccattcc	6000
	aagaagaaat	gtgatgagct	cgccgcgaag	ctgtccggcc	tcggactcaa	tgctgtagca	6060
	tattaccggg	gccttgatgt	atccgtcata	ccaactagcg	gagacgtcat	tgctcgtagca	6120
	acggacgctc	taatgacggg	ctttacgggt	gacttcgact	cagtgatcga	ctgcaataga	6180
	tggtgtcccc	agacagtcca	cttcagcctg	gacccgacct	tcaccattga	gacgacgacc	6240
	gtgccacaag	acgcggtgtc	acgctcgag	cgccgaggca	ggactggtag	gggcaggatg	6300
40	ggcattttaca	ggtttgtgac	tcaggagaga	cgccctcgg	gcattgttca	ttcctcgggt	6360
	ctgtgcgagt	gctatgacgc	gggtgtgtct	tggtacgagc	tcacgcccgc	cgagacctca	6420
	gttaggttgc	gggcttacct	aaacacacca	gggttgccc	tctgccagga	ccatctggag	6480
	ttctggggaga	gcgtctttac	aggcctcacc	cacatagacg	cccatcttct	gtcccagact	6540
	aagcaggcag	gagacaactt	cccctacctg	gtagcatacc	aggctacggg	gtgcgcagg	6600
	gctcaggctc	cacctccatc	gtgggaccaa	atgtggaagt	gtctcatacg	gctaaagcct	6660
45	acgctgcacg	ggccaacgcc	cctgctgtat	aggctgggag	ccgttcaaaa	cgaggttact	6720
	accataccac	ccataaccac	atacatcatg	gcattgcatgt	cggtgacct	ggaggtcgct	6780
	acgagcacct	gggtgctggt	aggcggagtc	ctagcagctc	tggccgcgta	ttgcctgaca	6840
	acaggcagcg	tggtcattgt	gggcaggatc	atcttgctcg	gaaagccggc	catcattccc	6900
	gacagggaag	tcctttaccg	ggagttcgat	gagatggaag	agtgcgcctc	acacctccct	6960
	tacatcgaac	agggaaatga	gctcgcgga	caattcaaac	agaaggcaat	cgggttgctg	7020
50	caaacagcca	ccaagcaagc	ggaggctgct	gctcccgtgg	tggaaatcaa	gtggcgagac	7080
	atcgaagcct	tctgggcaag	gcataatgtg	aatttcatca	gcgggataca	atatttagca	7140
	ggcttgtcca	ctctgcctgg	caaccccgcg	atagcatcac	tgatggcatt	cacagcctct	7200
	atcaccagcc	cgctcaccac	ccaacatacc	ctcctgttta	acatcctggg	gggatgggtg	7260
	gccgcccac	ttgctcctcc	cagcgtgctg	tctgctttcg	taggcgcggg	catcgctgga	7320
	gcggctgttg	gcagcatagg	ccttggaag	cgtcttggtg	atattttggc	aggttatgga	7380
55	gcagggggtg	caggcgcgct	cgtggccttt	aaggtcatga	gcggcgagat	gccctccacc	7440
	gaggacctgg	ttaacctact	ccctgctatc	ctctccctcg	gcgccttagt	cgctcggggtc	7500

	gtgtgcgag	cgatactgag	tgggacgag	ggcccgagg	agggggctgt	gcagtggatg	7560
	aaccggctga	tagcgttcgc	ttcgcggggt	aaccacgtct	ccccacgca	ctatgtgcct	7620
5	gagagcgag	ctgcagcag	tgtaactcag	atcctctcta	gtcttaccat	cactcagctg	7680
	ctgaagaggc	ttcaccagtg	gatcaacgag	gactgctcca	cgccatgctc	cggtcgtgg	7740
	ctaagagatg	tttgggattg	gatatgcacg	gtgttgactg	atttcaagac	ctggctccag	7800
	tccaagctcc	tgccgcgatt	gccgggagtc	cccttcttct	catgtcaacg	tgggtacaag	7860
	ggagtctggc	ggggcgacgg	catcatgcaa	accacctgcc	catgtggggc	acagatcacc	7920
	ggacatgtga	aaaacgggtc	catgaggatc	gtggggccta	ggacctgtag	taacacgtgg	7980
10	catggaacat	tccccattaa	cgcgtacacc	acggggccct	gcacgccctc	cccgcgccca	8040
	aattattcta	gggcgctgtg	gcgggtggct	gctgaggagt	acgtggaggt	tacgcgggtg	8100
	ggggatttcc	actacgtgac	gggcatgacc	actgacgacg	taaagtgtcc	gtgtcagggt	8160
	ccggccccc	aattcttcac	agaagtggat	gggggtcggt	tgcacaggta	cgctccagcg	8220
	tgcaaacccc	tcctacggga	ggaggtcaca	ttcctggctg	ggctcaatca	atacctgggt	8280
	gggtcacagc	tcctatgcga	gcccgaaacc	gatgtagcag	tgctcacttc	catgtcacc	8340
15	gacccctccc	acattacggc	ggagacggct	aagcgtaggc	tggccagggg	atctcctccc	8400
	cccttgccca	gctcatcagc	tagccagctg	tctgcgcctt	ccttgaaggc	aacatgcact	8460
	acccgtcatg	actccccgga	cgtgacctc	atcgaggcca	acctcctgtg	gcgagcagg	8520
	atgggcggga	acatcacccg	cgtggagtca	gaaaataagg	tagtaatttt	ggactctttc	8580
	gagccgctcc	aagcggagga	ggatgagagg	gaagtatccg	ttccggcgga	gatcctgcgg	8640
20	aggtccagga	aattccctcg	agcgtgccc	atatgggcac	gcccggatta	caaccctcca	8700
	ctgttagagt	cctggaagga	cccgactac	gtccctccag	tggtagacgg	gtgtccattg	8760
	ccgcctgcca	aggccctccc	gataccacct	tcacggagga	agaggacggt	tgtcctgtca	8820
	gaatctaccg	tgtcttctgc	cttgccggag	ctcgccacag	agaccttcgg	cagctccgaa	8880
	tcgtcggccg	tcgacagcgg	cacggcaacg	gcctctcctg	accagccctc	cgacgacggc	8940
25	gacgcgggat	ccgacgttga	gtcgtactcc	tccatgcccc	cccttgaggg	ggagccgggg	9000
	gatcccgatc	tcagcgacgg	gtcttgggtc	accgtaagcg	aggaggctag	tgaggacgtc	9060
	gtctgctgct	cgatgtccta	cacatggaca	ggcgccctga	tcacgccatg	cgctgcggag	9120
	gaaaccaagc	tgcccatcaa	tgactgagc	aactctttgc	tccgtcacca	caacttggtc	9180
	tatgctacaa	catctcgcag	cgcaagcctg	cggcagaaga	aggtcacctt	tgacagactg	9240
	caggtcctgg	acgaccacta	ccgggacgtg	ctcaaggaga	tgaaggcgaa	ggcgtccaca	9300
30	gttaaggcta	aacttctatc	cgtggaggaa	gcctgtaagc	tgacgcccc	acattcggcc	9360
	agatctaaat	ttggctatgg	ggcaaaggac	gtccggaacc	tatccagcaa	ggccgttaac	9420
	cacatccgct	ccgtgtggaa	ggacttgctg	gaagacactg	agacaccaat	tgacaccacc	9480
	atcatggcaa	aaaatgaggt	tttctgcgtc	caaccagaga	agggggggccg	caagccagct	9540
	cgccctatcg	tattcccaga	tttgggggtt	cgtgtgtgcg	agaaaatggc	cctttacgat	9600
	gtggtctcca	ccctccctca	ggccgtgatg	ggctcttcat	acggattcca	atactctcct	9660
35	ggacagcggg	tcgagttcct	ggtgaatgcc	tggaaagcga	agaaatgcc	tatgggcttc	9720
	gcatatgaca	ccgcgtgttt	tgactcaacg	gtcactgaga	atgacatccg	tgttgaggag	9780
	tcaatctacc	aatgtttgtg	cttgcccccc	gaagccagac	aggccataag	gtcgtccaca	9840
	gagcggcttt	acatcggggg	ccccctgact	aattctaaag	ggcagaactg	cggtctacgc	9900
	cggtgcggcg	cgagcgggtg	actgacgacc	agctgcggta	ataccctcac	atgttacttg	9960
40	aaggccgctg	cggcctgtcg	agctgcgaag	ctccaggact	gcacgatgct	cgtatgcgga	10020
	gacgaccttg	tcgttatctg	tgaagcgcg	gggaccaag	aggacgaggc	gagcctacgg	10080
	gccttcacgg	aggctatgac	tagatactct	gccccccctg	gggacccgcc	caaaccagaa	10140
	tacgacttgg	agttgataac	atcatgctcc	tccaatgtgt	cagtcgcgca	cgatgcactc	10200
	ggcaaaaagg	tgtactatct	caccctgac	cccaccaccc	cccttgccgcg	ggctgcgtgg	10260
	gagacagcta	gacacactcc	agtcaattcc	tggctaggca	acatcatcat	gtatgcgcc	10320
45	accttgtggg	caaggatgat	cctgatgact	catttcttct	ccatccttct	agctcaggaa	10380
	caacttgaaa	aagccctaga	ttgtcagatc	tacggggcct	gttactccat	tgagccactt	10440
	gacctacctc	agatcattca	acgactccat	ggccttagcg	catttttact	ccatagttag	10500
	tctccagggtg	agatcaatag	ggtggcttca	tgccctagga	aacttggggg	accgcccttg	10560
	cgagtctgga	gacatcgggc	cagaagtgtc	cgcgctaggc	tactgtccca	ggggggggagg	10620
	gctgccactt	gtggcaagta	cctcttcaac	tgggcagtaa	ggaccaagct	caaactcact	10680
50	ccaatcccgg	ctgcgtccca	gttggtttta	tccagctggg	tcgttgcgtg	ttacagcggg	10740
	ggagacatat	atcacagcct	gtctcgtgcc	cgaccccgct	ggttcatgtg	gtgcctactc	10800
	ctactttctg	taggggtagg	catctatcta	ctcccccaac	gatgaacggg	gagctaaaca	10860
	ctccaggcca	ataggccatc	ctgttttttt	cccttttttt	ttttcttttt	tttttttttt	10920
	tttttttttt	tttttttttc	tccttttttt	ttcctctttt	tttccctttt	tttccctttg	10980
	tggctccatc	ttagccctag	tcacggctag	ctgtgaaagg	tccgtgagcc	gcttgactgc	11040
55	agagagtgtc	gatactggcc	tctctgcaga	tcaagt			11076

<210> 10
 <211> 8001
 <212> DNA
 <213> Hepatitis C Virus

<400> 10

```

gccagcccc gattgggggc gacactccac catagatcac tcccctgtga ggaactactg 60
tcttcacgca gaaagcgtct agccatggcg ttagtatgag tgtcgtgcag cctccaggac 120
ccccctccc gggagagcca tagtggtctg cggaaacggg gagtacaccg gaattgccag 180
gacgaccggg tcctttcttg gatcaaccgg ctcaatgcct ggagatttgg gcgtgcccc 240
gcgagactgc tagccgagta gtgttgggtc gcgaaaggcc ttgtgggtact gcctgatagg 300
gtgcttgcca gtgccccggg aggtctcgta gaccgtgcac catgagcacg aatcctaaac 360
ctcaaaagaa aaccaaacgt aacaccaacg ggcgcgccat gattgaacaa gatggattgc 420
acgcaggttc tccggccgct tgggtggaga ggctattcgg ctatgactgg gcacaacaga 480
caatcggtcg ctctgatgcc gccgtgttcc ggctgtcagc gcagggggcg ccggttcttt 540
ttgtcaagac cgacctgtcc ggtgccctga atgaactgca ggacgaggca gcgcggctat 600
cgtggtcggc caccaggggc gttccttgcg agctgtgct cgacgttgtc actgaagcgg 660
gaaggggagc gctgctattg ggcgaagtgc cggggcagga tctcctgtca tctcaccttg 720
ctcctgccga gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg gcggtgcat acgcttgatc 780
cggctacctg cccattcgac caccaagcga aacatcgcat cgagcgagca cgtactcgga 840
tggaagccgg tcttgctgat caggatgatc tggacgaaga gcatcagggg ctcgcgccag 900
ccgaactgtt cgcagggctc aaggcgcgca tgcccagcgg cgaggatctc gtcgtgacct 960
atggcgatgc ctgcttgccg aatatcatgg tggaaaatgg ccgcttttct ggattcatcg 1020
actgtggccg gctgggtgtg gcggaccgct atcaggacat agcgttggct acccgtgata 1080
ttgctgaaga gcttgccggc gaatgggctg accgcttctt cgtgctttac ggtatcgccg 1140
ctcccgtatc gcagcgcatc gccttctatc gccttcttga cgagttcttc tgagtttaaa 1200
cagaccacaa cggtttccct ctacgggat caattccgcc cctctccctc cccccccct 1260
aacgttactg gccgaagcgg cttggaataa ggccggtgtg cgtttgtcta tatgttattt 1320
tccaccatat tgccgtcttt tggcaatgtg agggcccgga aacctggccc tgtcttcttg 1380
acgagcattc ctagggtctt tcccctctc gccaaaggaa tgcaaggtct gttgaatgtc 1440
gtgaagggaag cagttcctct ggaagcttct tgaagacaaa caacgtctgt agcgacctt 1500
tgacggcagc ggaaccccc acctggcgac aggtgcctct gcggccaaaa gccacgtgta 1560
taagatacac ctgcaaaagg gccacaacc cagtgcacg ttgtgagttg gatagttgtg 1620
gaaagagtca aatggctctc ctcaagcgta ttcaacaagg ggctgaagga tgcccagaag 1680
gtacccattt gtatgggatc tgatctgggg ctcggtgca catgctttac atgtgtttag 1740
tcgaggttaa aaaacgtcta ggcccccgga accacgggga cgtggttttc ctttgaaaaa 1800
cacgataata ccatggcgcc tattacggcc tactcccaac agacgcgagg cctacttggc 1860
tgcatcatca ctagcctcac aggcgggac aggaaccagg tcgaggggga ggtccaagtg 1920
gtctccaccg caacacaatc tttcctggcg acctgcgtca atggcggtg ttggactgtc 1980
tatcatggtg ccggtcaaa gaccttgcc ggcccaaagg gccaatcac ccaaagtac 2040
accaatgtgg accaggacct cgtcggctgg caagcgccc ccggggcgcg ttccttgaca 2100
ccatgcacct gcggcagctc ggaccttac ttggtcacga ggcatgccga tgtcattccg 2160
gtgcgcggcg ggggcgacag cagggggagc ctactctcc ccaggcccgt ctcctacttg 2220
aagggtctct cgggcggtcc actgctctgc cctcggggc acgctgtggg catctttcgg 2280
gctgccgtgt gcacccgagg ggttgcgaag gcggtggact ttgtaccctg cgagtctatg 2340
ggaaccacta tgcggtcccc ggtcttcacg gacaactcgt cccctccggc cgtaccgcag 2400
acattccagg tggcccatct acacgccctt actggtagcg gcaagagcac taaggtgccg 2460
gctgcgtatg caggccaagg gtataagggt cttgtcctga acccgctcgt cgccgccacc 2520
ctaggtttcg gggcgatat gtctaaggca catggtatcg accctaakat cagaatcggt 2580
gtaaggacca tcaccacggg tgcccccatc acgtactcca cctatggcaa gtttcttgcc 2640
gacggtggtt gctctggggg cgcctatgac atcataatat gtgatgagtg cactcaact 2700
gactcgacca ctatcctggg catcggcaca gtccctggac aagcggagac ggctggagcg 2760
cgactcgtcg tgctcgccac cgctacgctt ccgggatcgg tcaccgtgcc acatccaaa 2820
atcgaggagg tggctctgtc cagcactgga gaaatccct tttatggcaa agccatccc 2880
atcgagacca tcaagggggg gaggcacctc attttctgcc attccaagaa gaaatgtgat 2940
gagctcgccg cgaagctgtc cggcctcgga ctcaatgctg tagcatatta ccggggcctt 3000
gatgtatccg tcataccaac tagcggagac gtcattgtcg tagcaacgga cgctctaatt 3060
acgggcttta ccggcgactt cgactcagt atcgactgca atacatgtgt caccagaca 3120
gtcgacttca gcctggacct gaccttcacc attgagacga cgaccgtgcc acaagacgcg 3180
gtgtcaccgt cgcagcgcg aggcaggact ggtaggggca ggatgggcat ttacaggttt 3240
gtgactccag gagaacggcc ctcgggcatg ttcgattcct cggttctgtg cgagtgtat 3300
gacgcgggct gtgcttggtg cgagctcacg cccgcggaga cctcagttag gttgcgggct 3360
tacctaaaca caccaggggt gccgctctgc caggaccatc tggagtcttg ggagagcgtc 3420
tttacaggcc tcaccacat agacgcccct tcttgtccc agactaagca ggagagagac 3480
aacttcccct acctggtagc ataccaggct acggtgtgcg ccagggtcga ggctccacct 3540

```

	ccatcgtggg	accaaagtgt	gaagtgtctc	atacggctaa	agcctacgct	gcacggggcca	3600
	acgcccctgc	tgtataggct	gggagccgtt	caaaacgagg	ttactaccac	acaccccata	3660
	accaaataca	tcatggcatg	catgtcggct	gacctggagg	tcgtcacgag	cacctgggtg	3720
5	ctggtaggcg	gagtcctagc	agctctggcc	gcgtattgcc	tgacaacagg	cagcgtggtc	3780
	attgtgggca	ggatcatctt	gtccggaaag	ccggccatca	ttcccagacag	ggaagtcctt	3840
	taccgggagt	tcgatgagat	ggaagagtgc	gcctcacacc	tcccttacat	cgaacaggga	3900
	atgcagctcg	ccgaacaatt	caaacagaag	gcaatcgggt	tgctgcaaac	agccaccaag	3960
	caagcggagg	ctgctgctcc	cgtgggtgaa	tccaagtggc	ggaccatcga	agccttcttg	4020
	gcgaagcata	tgtggaattt	catcagcggg	atacaatatt	tagcaggtct	gtccactctg	4080
10	cctggcaacc	cccgatagc	atcactgatg	gcattcacag	cctctatcac	cagcccgctc	4140
	accacccaac	ataccctcct	gtttaacatc	ctggggggat	gggtggccgc	ccaacttgct	4200
	cctcccagcg	ctgcttctgc	tttcgtaggc	gccggcatcg	ctggagcggc	tgttggcagc	4260
	ataggccttg	ggaaggtgct	tgtggatatt	ttggcaggtt	atggagcagg	ggtggcaggc	4320
	gcgctcgtgg	cctttaaggt	catgagcggc	gagttgccct	ccaccgagga	cctggttaac	4380
	ctactccctg	ctatcctctc	cctggcgcc	ctagtcgtcg	gggtcgtgtg	cgcagcgata	4440
15	ctgctgcggc	acgtggggcc	aggggagggg	gctgtgcagt	ggatgaaccg	gctgatagcg	4500
	ttcgtctcgc	ggggtaaacca	cgtctcccc	acgcactatg	tgcttgagag	cgcagctgca	4560
	gcacgagtca	ctcagatcct	ctctagtctt	accatcactc	agctgctgaa	gaggcttcac	4620
	cagtggatca	acgaggactg	ctccaagcca	tgctccggct	cgtggctaag	agatgttttg	4680
	gattggatat	gcacggtggt	gactgatttc	aagacctggc	tccagtccaa	gctcctggcg	4740
	cgattgcggg	gagtcctcct	cttctcatgt	caacgtgggt	acaaggagg	ctggcggggc	4800
20	gacggcatca	tgcaaacacc	ctgcccattg	ggagcacaga	tcaccggaca	tgtgaaaaac	4860
	ggttccatga	ggatcgtggg	gcctaggacc	tgtagtaaca	cgtggcatgg	aacattcccc	4920
	attaacgcgt	acaccacggg	ccctgcacg	ccctccccgg	cgccaaatta	ttctaggggc	4980
	ctgtggcggg	taggtgctga	ggagtacgtg	gaggttacgc	gggtggggga	tttccactac	5040
	gtgacgggca	tgaccactga	caacgtaaag	tgcccggtgc	aggttccggc	ccccgaattc	5100
	ttcacagaag	tgatgggggt	gcggttgac	aggtacgtc	cagcgtgcaa	acccctccta	5160
25	cgggaggagg	tcacattcct	ggtcgggctc	aatcaatacc	tggttgggtc	acagctccca	5220
	tgcgagcctg	aaccggatgt	agcagtgtc	acttccatgc	tcaccgacct	ctcccacatt	5280
	acggcggaga	cggttaaagc	taggtctggc	aggggatctc	ccccccctt	ggcagctca	5340
	tcagctagcc	agctgtctgc	gccttccctg	aaggcaacat	gcactaccog	tcagtactcc	5400
	cgggacgctg	acctcatcga	ggccaacctc	ctgtggcggc	aggagatggg	cgggaacatc	5460
	acccgcgtgg	agtcagaaaa	taaggtagta	attttggact	ctttcgagcc	gctccaagcg	5520
30	gaggaggatg	agaggggagt	atccgttccg	gcggagatcc	tgccggaggtc	caggaaattc	5580
	cctcgagcga	tgcccatatg	ggcacgccc	gattacaacc	ctccactgtt	agagtcctgg	5640
	aaggaccogg	actacgtccc	tccagtggta	cacgggtgtc	cattgccgcc	tgccaaggcc	5700
	cctccgatac	caccttcacg	gaggaagagg	acggttgtcc	tgtcagaatc	taccgtgtct	5760
	tctgccttgg	cggagctcgc	cacagagacc	ttcggcagct	ccgaatcgtc	ggccgtcgac	5820
	agcggcacgg	caacggcctc	tcctgaccag	ccctccgacg	acggcgacgc	gggatccgac	5880
	ggtgagctga	actcctccat	gccccccctt	gagggggagc	cgggggatcc	cgtctcagc	5940
35	gacgggtcct	ggtctaccgt	aagcgaggag	ctagtggagg	acgtcgtctg	ctgctcgatg	6000
	tcctacacat	ggacaggcgc	cctgatcacg	ccatgcgctg	cggaggaaac	caagctgccc	6060
	atcaatgcac	tgagcaactc	tttgctccgt	caccacaact	tggtctatgc	tacaacatct	6120
	cgcagcgcaa	acctgcggca	gaagaaggtc	acctttgaca	gactgcagg	cctggacgac	6180
	catatccggg	acgtgctcaa	ggagatgaag	gcgaaggcgt	ccacagttaa	ggctaaactt	6240
40	ctatccgtgg	aggaagcctg	taagctgacg	ccccacatt	cggccagatc	taaatttggc	6300
	tatggggcaa	aggacgtccg	gaacctatcc	agcaaggccg	ttaaccacat	ccgctccgtg	6360
	tggaaggact	tgctggaaga	cactgagaca	ccaattgaca	ccaccatcat	ggcaaaaaat	6420
	gaggttttct	gcgtccaacc	agagaagggg	ggccgcaagc	cagctcgcct	tatcgtattc	6480
	ccagatttgg	gggttcgtgt	gtgcgagaaa	atggcccttt	acgatgtggt	ctccaccctc	6540
	cctcaggccg	tgatgggctc	ttcatacggg	ttccaatact	ctcctggaca	gcgggtcgag	6600
	ttcctgggtg	atgcctggaa	agcgaagaaa	tgccctatgg	gcttcgcata	tgacaccgcg	6660
45	tgttttgact	caacgggtcac	tgagaatgac	atccgtgttg	aggagtcaat	ctaccaatgt	6720
	tgtgacttgg	cccccggaagc	cagacaggcc	ataaggctgc	tcacagagcg	gctttacatc	6780
	ggggggcccc	tgactaatc	taaagggcag	aactgcggct	atcgccggtg	ccgcgcgagc	6840
	ggtgtactga	cgaccagctg	cggtaatacc	ctcacatggt	acttgaaggc	cgtcgcggcc	6900
	tgctcagctg	cgaagctcca	ggactgcacg	atgctcgtat	gcggagacga	ccttgtcgtt	6960
	atctgtgaaa	gcgcggggac	ccaagaggac	gaggcgagcc	tacgggcctt	cacggaggct	7020
50	atgactagat	actctgcccc	ccctggggac	ccgcccaaac	cagaatacga	cttggagttg	7080
	ataacatcat	gctcctccaa	tgtgtcagtc	gcgcacgatg	catctggcaa	aaggggtgtac	7140
	tatctcacc	gtgacccac	cacccccctt	gcgcgggctg	cgtgggagac	agctagacac	7200
	actccagtca	attcctggct	aggcaacatc	atcatgtatg	cgccaccctt	gtgggcaagg	7260
	atgatcctga	tgactcattt	cttctccatc	cttctagctc	aggaacaact	tgaaaaagcc	7320
	ctagattgtc	agatctacgg	ggcctgttac	tccattgagc	cacttgacct	acctcagatc	7380
55	attcaacgac	tccatggcct	tagcgcattt	tactccata	gttactctcc	aggtgagatc	7440
	aatagggtgg	cttcatgcct	caggaaactt	ggggtaccgc	ccttgcgagt	ctggagacat	7500

EP 1 043 399 B9 (W1B1)

	cgggccagaa	gtgtccgcgc	taggctactg	tcccaggggg	ggagggctgc	cacttgtggc	7560
	aagtacctct	tcaactgggc	agtaaggacc	aagctcaaac	tcactccaat	cccggctgcg	7620
5	tcccagttgg	atztatccag	ctggttcggt	gctggttaca	gcgggggaga	catatatcac	7680
	agcctgtctc	gtgcccgacc	ccgctggttc	atgtggtgcc	tactcctact	ttctgtaggg	7740
	gtaggcacat	atctactccc	caaccgatga	acggggagct	aaacactcca	ggccaatagg	7800
	ccatcctggt	tttttccctt	tttttttttc	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	7860
	ttttctcctt	tttttttcc	ctttttttcc	ttttctttcc	tttgggtggc	ccatcttagc	7920
10	cctagtcacg	gctagctgtg	aaagggtccgt	gagccgcttg	actgcagaga	gtgctgatac	7980
	tggcctctct	gcagatcaag	t				8001

15

20

25

30

35

40

45

50

55

<210> 11
 <211> 11076
 <212> DNA
 <213> Hepatitis C Virus

<400> 11

```

gccagcccc gattgggggc gacactccac catagatcac tcccctgtga ggaactactg 60
tcttcacgca gaaagcgtct agccatggcg ttagtatgag tgtcgtgcag cctccaggac 120
ccccctccc gggagagcca tagtggctct cggaaccggt gagtacaccg gaattgccag 180
gacgaccggg tcctttcttg gatcaaccog ctcaatgcct ggagatttgg gcgtgcccc 240
gcgagactgc tagccgagta gtgttgggtc gcgaaaggcc ttgtgggtact gcctgatagg 300
gtgcttgcca gtgccccggg aggtctcgta gaccgtgcac catgagcacg aatcctaaac 360
ctcaaagaaa aaccaaactg aacaccaacg ggcgcgccat gattgaacaa gatggattgc 420
acgcagggtc tccggccgct tgggtggaga ggctattcgg ctatgactgg gcacaacaga 480
caatcggtcg ctctgatgcc gccgtgttcc ggctgtcagc gcagggggcg cgggttcttt 540
ttgtcaagac cgacctgtcc ggtgccctga atgaactgca ggacgaggca gcgcggtat 600
cgtggctggc cagcaggggc gttccttgcg cagctgtgct cgacgttgct actgaagcgg 660
gaagggactg gctgctattg ggcaagtgc cggggcagga tctcctgtca tctcaccttg 720
ctcctgccga gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg gcggtgcat acgcttgatc 780
cggctacctg cccattcgac caccaagcga aacatcgcat cgagcgagca cgtactcgga 840
tggaagccgg tcttgctgat caggatgata tggacgaaga gcatcagggg ctgcgcgcca 900
ccgaactgtt cgccaggctc aaggcgcgca tgcccgacgg cgaggatctc gtcgtgacct 960
atggcgtatg ctgcttgccg aatatcatgg tggaaaatgg ccgcttttct ggattcatcg 1020
actgtggccg gctgggtgtg gcggaccgct atcaggacat agcgttggct acccgtgata 1080
ttgctgaaga gcttggcggc gaatgggctg accgcttctc cgtgctttac ggtatcgccg 1140
ctcccgattc gcagcgcatc gccttctatc gccttcttga cgagttcttc tgagtttaaa 1200
cagaccacaa cggtttccct ctagegggat caattccgcc cctctccctc cccccccctc 1260
aacgttactg ccgaagccg cttggaataa ggcgggtgtg cgtttgtcta tatgttattt 1320
tccaccatat tgcgttctt tggcaatgtg agggcccgga aacctggccc tgtcttcttg 1380
acgagcattc ctagggtctt tccccctc gcacaaggaa tgcaaggtct gttgaatgtc 1440
gtgaagggaag cagtctctct ggaagcttct tgaagacaaa caacgtctgt agcgacctt 1500
tgcaggcagc ggaaccccc acctggcgac aggtgcctct gcggccaaaa gccacgtgta 1560
taagatacac ctgcaaaagg gcacaaccc cagtgcacg ttgtgagttg gatagttgtg 1620
gaaagatgca aatggctctc ctcaagcgta ttcaacaagg ggctgaagga tgcccagaag 1680
gtacccatt gtatgggatc tgatctgggg cctcggtgca catgctttac atgtgtttag 1740
tcgaggttaa aaaacgtcta ggcccccgga accacgggga cgtggttttc ctttgaaaaa 1800
cacgataata ccatgggcac gaatcctaaa cctcaaagaa aaaccaaact taacaccaac 1860
cgccgcccac aggagctcaa gttcccgggc ggtggtcaga tcgtcgggtg agtttacctg 1920
ttgcgcgcca ggggccccag gttgggtgtg cgcgcgacta ggaagacttc cgagcggtcg 1980
caacctcgtg gaaggcgaca acctatcccc aaggctcgcc agcccgaggg tagggccttg 2040
gctcagcccg ggtaccctcg gccctctat ggcaatgagg gcttgggggtg ggcaggatgg 2100
ctctgtcac cccgtggctc tcggcctagt tggggcccca cggaaccccg gcgtaggctc 2160
cgcaatttgg gtaaggatc atgacccctc acgtgcggct tcgcccagct catggggatc 2220
attccgctcg tcggcgcccc cctagggggc gctgccaggg ccctggcgca tggcgctcgg 2280
gttctggagg acggcgatg ctatgcaaca gggaatctgc ccggttgctc cttttctatc 2340
ttccttttgg ctttgctgtc ctgttgacc atcccagctt ccgcttatga agtgcgcaac 2400
gtatccggag tgtaccatgt cacgaacgac tgctccaacg caagcattgt gtatgaggca 2460
gcggacatga tcatgcatac ccccggtgct gtgccctgct ttcgggagaa caactcctcc 2520
cgctgctggg tagcgtcac tcccagctc gcggccagga acgctagcgt cccactacg 2580
acgatacgac gccatgtcga tttgctcgtt gggcggtgct ctctctgctc cgctatgtac 2640
gtgggagatc tctgcggatc tgttttctc gtgcggcagc tgttcacctt ctgcctcgc 2700
cggcacgaga cagtacagga ctgcaattgc tcaatatatc ccggccacgt gacaggtcac 2760
cgtatggctt gggatatgat gatgaactgg tcacctacag cagccctagt ggtatcgag 2820
ttactccgga tcccacaagc tgtcgtggat atgtggcgg gggccattg gggagtccta 2880
gcgggccttg cctactatc catgggtggg aactgggcta aggttctgat tgtgatgcta 2940
ctctttgccc gcgttgacgg gggaacctat gtgacagggg ggacgatggc caaaaacacc 3000
ctcgggatta cgtccctctt ttcacccggg tcatcccaga aaatccagct tgtaaacacc 3060
aacggcagct ggcacatcaa caggactgcc ctgaactgca atgactccct caaactggg 3120
ttccttgctg cgctgttcta cgtgcacaag ttcaactcat ctggatgccc agagcgcatg 3180
gccagctgca gcccatcga cgcgttcgct cagggttggg ggcccatcac ttacaatgag 3240
tcacacagct cggaccagag gccttattgt tggcactacg caccggcgcc gtgcggtatc 3300
gtaccccgcg cgcaggtgtg tggccagtg tactgttca cccaagccc tgtcgtgggtg 3360
gggacgaccg accggttcg cgtccctacg tacagttggg gggagaatga gacggacgtg 3420
ctgcttctta acaacacgcg gccgcccga ggcaactgg ttggctgtac atggatgaat 3480
agcactgggt tcaccaagac gtgcgggggc ccccgtgta acatcgggg gatcggcaat 3540

```

	aaaaaccttga	cctgccccac	ggactgcttc	cggaagcacc	ccgaggccac	ttacaccaag	3600
	tgtggttcgg	ggccttggtt	gacacccaga	tgcttggtcc	actaccata	caggcttttg	3660
	cactacccct	gcactgtcaa	ctttaccatc	ttcaagggtta	ggatgtacgt	ggggggagtg	3720
5	gagcacaggg	tcgaagccgc	atgcaattgg	actcgaggag	agcgttgtaa	cctggaggac	3780
	agggacagat	cagagcttag	cccgtctgtg	ctgtctacaa	cggagtggca	ggtattgccc	3840
	tggttcctca	ccaccctacc	ggctctgtcc	actggtttga	tccatctcca	tcagaacgtc	3900
	gtggacgtac	aatacctgta	cggatatagg	tcggcgggtg	tctcctttgc	aatcaaatgg	3960
	gagtatgtcc	tggtgctctt	ccttcttctg	gcggaacgcg	gcgtctgtgc	ctgcttggtg	4020
	atgatgctgc	tgatagctca	agctgaggcc	gccctagaga	acctgggtgt	cctcaacgcg	4080
10	gcatccgtgg	ccggggcgca	tggcattctc	tccttctctg	tggtcttctg	tgctgcctgg	4140
	tacatcaagg	gcaggctggg	ccctggggcg	gcatatgccc	tctacggcgt	atggccgcta	4200
	ctcctgctcc	tgctggcggt	accaccacga	gcatacgcca	tggaccggga	gatggcagca	4260
	tcgtgaggag	gcgcgggttt	cgtaggctctg	atactcttga	ccttgtcacc	gcactataag	4320
	ctgttcctcg	ctaggctcat	atgggtggtta	caatatttta	tcaccagggc	cgaggcacac	4380
	ttgcaagtgt	ggatcccccc	cctcaacggt	cggggggggc	gcgatgccgt	catcctcctc	4440
15	acgtgcgca	tccacccaga	gctaactctt	accatcacca	aaatcttgct	cgccatactc	4500
	ggtccactca	tgggtgctcca	ggctgggtata	accaaagtgc	cgtacttcgt	gcgcgcacac	4560
	gggtcatttc	gtgcatgcat	gctgggtgcg	aaggttgctg	ggggtcatta	tgtccaaatg	4620
	gctctcatga	agttggccgc	actgacaggt	acgtacgttt	atgaccatct	cacccactcg	4680
	cgggactggg	cccacgcggg	cctacgagac	cttgccgtgg	cagttgagcc	cgctcgtctc	4740
	tctgatattg	agaccaaggt	tatcacctgg	ggggcagaca	ccgcggcgtg	tggggacatc	4800
20	atcttggggc	tgcccgctct	cgcccgagag	gggagggaga	tacatctggg	accggcagac	4860
	agccttgaag	ggcagggggtg	gcgactcctc	gcgcctatta	cggcctactc	ccaacagacg	4920
	cgaggcctac	ttggctgcat	catcaactagc	ctcacaggcc	gggacaggaa	ccaggctcag	4980
	ggggagggtcc	aagtgggtctc	caccgcaaca	caatctttcc	tggcgacctg	cgtcaatggc	5040
	gtgtgttggg	ctgtctatca	tgggtgccggc	tcaaagaccc	ttgccggccc	aaagggccca	5100
	atcacccaaa	tgtacaccaa	tgtggaccag	gacctcgtcg	gctggcaagc	gccccccggg	5160
25	gcgcgttcc	tgacaccatg	cacctgcggc	agctcggacc	tttacttggt	cacgaggcat	5220
	gcccagctga	ttccgggtgcg	ccggcggggc	gacagcaggg	ggagcctact	ctccccagg	5280
	cccgtctcct	acttgaaggg	ctcttcgggc	ggtccactgc	tctgcccctc	ggggcacgct	5340
	gtgggcatct	ttcgggctgc	cgtgtgcacc	cgagggggtg	cgaaggcggg	ggactttgta	5400
	cccgtcgagt	ctatgggaac	cactatgcgg	tccccggtct	tcacggacaa	ctcgtcccct	5460
	ccggccgtac	cgcagacatt	ccagggtggc	catctacacg	cccctactgg	tagcggcaag	5520
30	agcactaagg	tgccggctgc	gtatgcaggc	caagggtata	aggtgcttgt	cctgaacccg	5580
	tcctgcgcgg	ccacccatag	tttcggggcg	tatatgtcta	aggcacatgg	tatcgacctt	5640
	aacatcagaa	tcggggtaag	gaccatcacc	acgggtgccc	ccatcacgta	ctccacctat	5700
	ggcaagtttc	ttgcgcagcg	tggttgctct	ggggggcgct	atgacatcat	aatatgtgat	5760
	gagtggcact	caactgactc	gaccactatc	ctgggcatcg	gcacagtcct	ggaccaagcg	5820
	gagacggctg	gacgcgactc	cgtcgtgctc	gccaccgcta	cgcctccggg	atcggtccac	5880
35	gtgccacatc	caaacatcga	ggagggtggc	ctgtccagca	ctggagaaat	ccccttttat	5940
	ggcaaagcca	tcccacatga	gaccatcaag	ggggggaggc	acctcatttt	ctgccatttc	6000
	aagaagaaat	gtgatgagct	cgcgcggaag	ctgtccggcc	tcggactcaa	tgctgttagca	6060
	tattaccggg	gccttgatgt	atccgtcata	ccaactagcg	gagacgtcat	tgctgtagca	6120
	acggagcttc	taatgacggg	ctttaccggc	gacttcgact	cagtgatcga	ctgcaatata	6180
	tgtgtcacc	agacagtcga	cttcagcctg	gacccgacct	tcaccattga	gacgacgacc	6240
	gtgccacaag	acgcggtgtc	acgctcgag	cggcgaggca	ggactggtag	gggcaggatg	6300
40	ggcatttaca	ggtttgtgac	tcaggagaa	cggccctcgg	gcattgttga	ttcctcgggt	6360
	ctgtgcgagt	gctatgacgc	gggctgtgct	tggtacgagc	tcacgcccgc	cgagacctca	6420
	gttaggttgc	gggcttacct	aaacacacca	gggttgcccg	tctgccagga	ccatctggag	6480
	ttctgggaga	gcgtctttac	aggcctcacc	cacatagacg	cccatttctt	gtcccagact	6540
	aagcaggcag	gagacaactt	cccctacctg	gtagcatacc	aggctacggg	gtgcgccagg	6600
	gctcaggctc	cacctccatc	gtgggaccaa	atgtggaagt	gtctcatacg	gctaaagcct	6660
45	acgtctcacg	ggccaacgcc	cctgctgtat	aggctgggag	ccgttcaaaa	cgaggttact	6720
	accacacacc	ccataaccaa	atacatcatg	gcatgcatgt	cggctgacct	ggaggctcgt	6780
	acgagcacct	gggtgctggg	aggcggagtc	ctagcagctc	tggccgcgta	ttgcttgaca	6840
	acaggcagcg	tggtcattgt	gggcaggatc	atcttgctcg	gaaagccggc	catcattccc	6900
	gacagggaag	tcctttaccg	ggagttcgat	gagatggaag	agtgcgcctc	acacctccct	6960
	tacatcgaac	agggaaatgca	gctcgccgaa	caattcaaac	agaaggcaat	cgggttgctg	7020
50	caaacagcca	ccaagcaagc	ggaggctgct	gctcccgtgg	tggaatccaa	gtggcggacc	7080
	atcgaagcct	tctgggcgaa	gcatatgtgg	aatttcatca	gcgggataca	atatttagca	7140
	ggcttgtcca	ctctgcctgg	caaccccgcg	atagcatcac	tgatggcatt	cacagcctct	7200
	atcacagacc	cgctcaccac	ccaacatacc	ctcctgttta	acatcctggg	gggatgggtg	7260
	gccccecaac	ttgctcctcc	cagcgtgctc	tctgctttcg	taggcgcggg	catcgctgga	7320
	cgggctgttg	gcagcatagg	ccttgggaag	gtgcttggtg	atattttggc	aggttatgga	7380
	gcaggggtgg	caggcgcgct	cgtggccttt	aaggctcatga	gcggcgagtt	gccctccacc	7440
55	gaggacctgg	ttaacctact	ccctgctatc	ctctcccctg	gcgccttagt	cgtcgggggtc	7500

	gtgtgcgag	cgatactgcg	tcggcacgtg	ggcccagggg	agggggctgt	gcagtggatg	7560
	aaccggctga	tagcgttcgc	ttcgcgggg	aaccacgtct	ccccacgca	ctatgtgcct	7620
5	gagagcgacg	ctgcagcacg	agtcactcag	atcctctcta	gtcttaccat	cactcagctg	7680
	ctgaagaggc	ttcaccagtg	gatcaacgag	gactgctcca	cgccatgctc	cggtcgtgg	7740
	ctaagagatg	tttgggattg	gatatgcacg	gtgttgactg	atctcaagac	ctggctccag	7800
	tccaagctcc	tgccgcgatt	gccgggagtc	cccttcttct	catgtcaacg	tgggtacaag	7860
	ggagtctggc	ggggcgacgg	catcatgcaa	accacctgcc	catgtggagc	acagatcacc	7920
	ggacatgtga	aaaacggttc	catgaggatc	gtggggcccta	ggacctgtag	taacacgtgg	7980
10	catggaacat	tccccattaa	cgcgtaacac	acggggccct	gcacgccttc	cccggcgcca	8040
	aattattcta	gggcgctgtg	gcgggtaggt	gctgaggagt	acgtggaggt	tacgggggtg	8100
	ggggatttcc	actacgtgac	gggcatgacc	actgacaacg	taaagtgcc	gtgtcaggtt	8160
	ccggcccccg	aattcttcac	agaagtggat	ggggtgcggt	tgcacaggta	cgctccagcg	8220
	tgcaaacccc	tcctacggga	ggaggtcaca	ttcctggtcg	ggctcaatca	atacctggtt	8280
	gggtcacagc	tcccatgcca	gcctgaaccg	gatgtagcag	tgctcacttc	catgctcacc	8340
15	gacccctccc	acattacggc	ggagacggct	aagcgtaggg	tggccagggg	atctcccccc	8400
	cccttgggcca	gctcatcagc	tagccagctg	tctgcgcttc	ccttgaaggc	aacatgcact	8460
	acccgtcatg	actccccgga	cgctgacctc	atcgaggcca	acctcctgtg	gcggcaggag	8520
	atgggcggga	acatcacccg	cgtggagtca	gaaaataagg	tagtaatttt	ggactctttc	8580
	gagccgctcc	aagcggagga	ggatgagagg	ggagtatccg	ttccggcgga	gatcctgcgg	8640
20	aggtccagga	aattccctcg	agcgatgccc	atatgggcac	gcccggatta	caaccctcca	8700
	ctgttagagt	cctggaagga	cccggactac	gtccctccag	tggtagacgg	gtgtccattg	8760
	ccgcctgcca	aggccccctc	gataccacct	tcacggagga	agaggacggg	tgctcctgtc	8820
	gaatctaccg	tgtcttctgc	cttggcggag	ctcgccacag	agaccttcgg	cagctccgaa	8880
	tcgtcggccg	tcgacagcgg	cacggcaacg	gctctcctg	accagccctc	cgacgacggc	8940
25	gacgcgggat	ccgacgttga	gtcgtactcc	tccatgcccc	cccttgaggg	ggagccgggg	9000
	gatcccgatc	tcagcgacgg	gtcttggctc	accgtaagcg	aggaggctag	tgaggacgtc	9060
	gtctgctgct	cgatgtccta	cacatggaca	ggcgccctga	tcacgccatg	cgctgcggag	9120
	gaaaccaagc	tgcccatcaa	tgactgagc	aactctttgc	tcctgcacca	caacttggtc	9180
	tatgctacaa	catctcgag	cgcaaacctg	cggcagaaga	aggtcacctt	tgacagactg	9240
	caggtcctgg	acgaccacta	ccgggacgtg	ctcaaggaga	tgaaggcgaa	ggcgtccaca	9300
30	gttaaggcta	aacttctatc	cgtggaggaa	gcctgtaagc	tgacgcccc	acattcggcc	9360
	agatctaaat	ttggctatgg	ggcaaaggac	gtccggaacc	tatccagcaa	ggcgttaac	9420
	cacatccgct	ccgtgtggaa	ggacttgctg	gaagacactg	agacaccaat	tgacaccacc	9480
	atcatggcaa	aaaatgaggt	tttctgcgtc	caaccagaga	aggggggccc	caagccagct	9540
	cgccttatcg	tattcccgaa	tttgggggtt	cgtgtgtgct	agaaaatggc	cctttacgat	9600
	gtggtctcca	ccctccctca	ggccgtgatg	ggctcttcat	acggattcca	atactctcct	9660
35	ggacagcggg	tcgagttcct	ggtgaatgcc	tggaaagcga	agaaatgccc	tatgggcttc	9720
	gcatatgaca	cccgtgtgtt	tgactcaacg	gtcactgaga	atgacatccg	tggtgaggag	9780
	tcaatctacc	aatgttgtga	cttggccccc	gaagccagac	aggccataag	gtcgtccaca	9840
	gagcggcttt	acatcggggg	ccccctgact	aattctaaag	ggcagaactg	cggctatcgc	9900
	cgggtcccg	cgagcgggtg	actgacgacc	agctgcggta	ataccctcac	atgttacttg	9960
40	aaggccgctg	cggcctgtcg	agctgcgaag	ctccaggact	gcacgatgct	cgatatcgga	10020
	gacgaccttg	tcgttatctg	tgaaagcgcg	gggacccaag	aggacgaggc	gagcctacgg	10080
	gccttcacgg	aggctatgac	tagatactct	gccccccctg	gggacccgcc	caaaccagaa	10140
	tacgacttgg	agttgataac	atcatgctcc	tccaatgtgt	cagtgcgcga	cgatgcatct	10200
	ggcaaaagg	tgtactatct	caccctgtgac	cccaccaccc	cccttgccgc	ggctgcgtgg	10260
	gagacagcta	gacacactcc	agtcaattcc	tggttaggca	acatcatcat	gtatgcgccc	10320
45	accttggtgg	caaggatgat	cctgatgact	catttcttct	ccatccttct	agctcaggaa	10380
	caacttgaaa	aagccctaga	ttgtcagatc	tacggggcct	gttactccat	tgagccactt	10440
	gacctacctc	agatcattca	acgactccat	ggccttagcg	catttttact	ccatagttac	10500
	tctccagggtg	agatcaatag	ggtggcttca	tgcttcagga	aacttggggg	accgcccttg	10560
	cgagtctgga	gacatcgggc	cagaagtgtc	cgcgctaggg	tactgtccca	ggggggggag	10620
	gctgccactt	gtggcaagta	cctcttcaac	tgggcagtaa	ggaccaagct	caaactcact	10680
50	ccaatcccgg	ctgcgtccca	gttggtattta	tccagctggg	tcgttgctgg	ttacagcggg	10740
	ggagacatat	atcacagcct	gtctcgtgcc	cgaccccgc	ggttcatgtg	gtgcctactc	10800
	ctactttctg	taggggtagg	catctatcta	ctccccaac	gatgaacggg	gagctaaaca	10860
	ctccaggcca	ataggccatc	ctgttttttt	cccttttttt	ttttcttttt	tttttttttt	10920
	tttttttttt	tttttttttc	tccttttttt	ttctcttttt	tttctttttc	tttcttttgg	10980
55	tggctccatc	ttagccctag	tcacggctag	ctgtgaaagg	tccgtgagcc	gcttgactgc	11040
	agagagtgtc	gatactggcc	tctctgcaga	tcaagt			11076

Patentansprüche

1. Hepatitis-C-Virus (HCV)-RNA-Konstrukt mit der Fähigkeit zur Replikation in eukaryontischen Zellen, **dadurch gekennzeichnet**,
 5 **daß** es eine Nukleotidsequenz gemäß einem der Sequenzprotokolle SEQ ID NO: 1 bis SEQ ID NO: 11 umfaßt, welche zumindest für die HCV-spezifischen RNA-Abschnitte 5' NTR, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NSSB und 3' NTR und zusätzlich ein selektierbares Markergen (Selektionsgen) kodieren, wobei das selektierbare Markergen das Neomycinphosphotransferasegen ist und wobei anstelle des Neomycinphosphotransferasegens ein anderes Antibiotikaresistenzgen oder sonstiges Resistenzgen enthalten sein kann.
- 10 2. HCV-RNA-Konstrukt nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**,
daß es anstelle des Markergens oder zusätzlich zu dem Markergen ein integriertes Reportergen aufweist.
- 15 3. HCV-RNA-Konstrukt nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**,
daß das Reportergen ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus den Luziferasegenen, dem CAT-Gen (Chloramphenicol-Acetyl-Transferase-Gen), dem lacZ-Gen (beta-Galaktosidase-Gen), den GFP-Genen (green-fluorescence-protein-Genes), dem GUS-Gen (Glukuronidasegen) und dem SEAP-Gen (Sezernierte-Alkalische-Phosphatase-Gen).
- 20 4. HCV-RNA-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, **daß** dessen Replikation die Expression eines (zellulären) Surrogatmarkergens beeinflusst.
- 25 5. HCV-RNA-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, **daß** das Reportergen und das selektierbare Markergen derart räumlich in dem Konstrukt angeordnet sind, daß sie gemeinsam ein Fusionsprotein exprimieren.
- 30 6. HCV-RNA-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, **daß** es ein integriertes Fremdgen aufweist und dazu geeignet ist, dieses Fremdgen in eine Zielzelle einzuschleusen, die zur Expression dieses Fremdgens geeignet ist.
- 35 7. HCV-RNA-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet**, **daß** es Nukleotid- und/oder Aminosäure-Mutationen aufweist, zellkultur-adaptiert ist, mit hoher Effizienz repliziert und dadurch erhältlich ist, daß man ein Zellkultursystem gemäß Anspruch 11, bei dem das eingeschleuste HCV-spezifische Genmaterial ein HCV-RNA-Konstrukt mit Selektionsgen nach einem der Ansprüche 1 bis 6 ist, auf/in dem dem Selektionsgen entsprechenden Selektionsmedium kultiviert, daß man die gewachsenen Zellklone erntet, und daß man aus diesen Zellklonen das HCV-RNA-Konstrukt oder Teile davon isoliert.
- 40 8. HCV-RNA-Konstrukt nach Anspruch 7, **dadurch gekennzeichnet**, **daß** man das aus den Zellklonen isolierte HCV-RNA-Konstrukt oder Teile davon wenigstens einmal erneut passagiert, nämlich in Zellen des Zellkultursystems gemäß Anspruch 11 einschleust und diese Zellen auf/in dem dem Selektionsgen entsprechenden Selektionsmedium kultiviert, daß man die gewachsenen Zellklone erntet, und daß man aus diesen Zellklonen das HCV-RNA-Konstrukt oder Teile davon isoliert.
- 45 9. HCV-RNA-Konstrukt gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8, **dadurch gekennzeichnet**,
daß es einen oder mehrere der nachfolgend aufgeführten Aminosäureaustausche aufweist, nämlich 1283 arg -> gly und/oder 1383 glu -> ala und/oder 1577 lys -> arg und/oder 1609 lys -> glu und/oder 1936 pro -> ser und/oder 2163 glu -> gly und/oder 2330 lys -> glu und/oder 2442 ile -> val aufweist, zellkultur-adaptiert ist und mit hoher Effizienz repliziert.
- 50 10. HCV-RNA-Konstrukt gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9, **dadurch gekennzeichnet**,
daß es einen oder mehrere der in Tabelle 3 aufgeführten Nukleotid- und/oder Aminosäureaustausche aufweist, wobei Tabelle 3 Bestandteil dieses Anspruchs ist.
- 55 11. HCV Zellkultursystem, das im wesentlichen eukaryontische Zellen umfaßt, die eingeschleustes HCV-spezifisches Genmaterial enthalten, **dadurch gekennzeichnet**, **daß** die eukaryontischen Zellen humane Hepatomazellen sind und daß das eingeschleuste HCV-spezifische Genmaterial ein HCV-RNA-Konstrukt gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10 ist.

12. Zellkultursystem nach Anspruch 11, **dadurch gekennzeichnet**,
daß die das HCV-RNA-Konstrukt enthaltenden Zellen bei der DSMZ, Braunschweig, BRD, unter der Hinterle-
gungsnummer DSM ACC2394 (Laborbezeichnung HuBI 9-13) hinterlegt sind.

13. Verwendung eines Zellkultursystems nach einem der Ansprüche 11 oder 12 und/oder eines HCV-RNA-Konstrukts
nach einem der Ansprüche 1 bis 10 zur Herstellung und/oder Evaluierung von Therapeutika und/oder Diagnostika
für HCV-Infektionen.

14. Verwendung eines Zellkultursystems nach einem der Ansprüche 11 oder 12 und/oder eines HCV-RNA-Konstrukts
nach einem der Ansprüche 1 bis 10 zur Herstellung eines Impfstores gegen HCV-Infektionen.

15. Verwendung eines HCV-RNA-Konstrukts nach einem der Ansprüche 1 bis 10 zur Herstellung einer leberzellspe-
zifischen Genfahre für die Gentherapie.

16. Verwendung eines HCV-RNA-Konstrukts nach einem der Ansprüche 1 bis 6 zur Gewinnung von zellkultur-adap-
tierten Mutanten dieses HCV-RNA-Konstrukts, wobei die Mutanten gegenüber dem HCV-RNA-Konstrukt eine er-
höhte Replikationseffizienz aufweisen, **dadurch gekennzeichnet**,
daß man ein Zellkultursystem gemäß Anspruch 11 oder 12, das HCV-RNA-Konstrukte gemäß einem der Ansprü-
che 1 bis 6 enthält, auf/in dem dem Selektionsgen entsprechenden Selektionsmedium kultiviert, daß man die
gewachsenen Zellklone erntet, und daß man aus diesen Zellklonen die HCV-RNA-Konstrukte oder Teile davon
isoliert.

17. Verwendung eines HCV-RNA-Konstrukts nach Anspruch 16, **dadurch gekennzeichnet**,
daß man die isolierten HCV-RNA-Konstrukte wenigstens einmal erneut passagiert, nämlich in Zellen eines Zell-
kultursystems nach Anspruch 11 oder 12 einschleust und diese auf/in dem dem Selektionsgen entsprechenden
Selektionsmedium kultiviert, die gewachsenen Zellklone erntet und aus diesen Zellklonen die HCV-RNA-Konstruk-
te oder Teile davon isoliert.

18. Verwendung eines HCV-RNA-Konstrukts nach einem der Ansprüche 1 bis 6 zur Herstellung von Mutanten eines
HCV-Vollängengenoms oder eines HCV-Teilgenoms oder eines beliebigen HCV- Konstrukts mit im Vergleich zu
dem ursprünglichen HCV-Vollängengenom oder -Teilgenom oder HCV-RNA-Konstrukt erhöhter Replikationseffi-
zienz, **dadurch gekennzeichnet**,

- **daß** man gemäß Anspruch 16 oder Anspruch 17 eine zellkultur-adaptierte Mutante des HCV-RNA-Konstrukts
herstellt,
- **daß** man die Nukleotid- und Aminosäuresequenz dieser Mutante bestimmt und durch Vergleich mit der Nu-
kleotid- und Aminosäuresequenz des ursprünglichen HCV-RNA-Konstrukts die Art, Anzahl und Positionen
der Nukleotid- und Aminosäuremutationen bestimmt,
- und **daß** man diese Mutationen entweder durch gezielte Mutagenese oder durch Austausch von Sequenzab-
schnitten, die die betreffenden Mutationen enthalten, in ein (isoliertes) HCV-Vollängengenom oder ein
HCV-Teilgenom oder ein beliebiges HCV-RNA-Konstrukt einführt.

19. Verwendung eines HCV-RNA-Konstrukts nach einem der Ansprüche 1 bis 10 zur Erzeugung von Hepatitis C Vi-
ruspartikeln oder virus-ähnlichen Partikeln.

Claims

1. Hepatitis-C-virus (HCV) RNA construct with the ability to replicate in eukaryotic cells, **characterized in**
that it comprises a nucleotide sequence in accordance with one of the sequences listed as SEQ ID NO: 1 to SEQ
ID NO: 11, which codes at least for the HCV specific RNA-segments 5'NTR, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B and
3'NTR and additionally for a marker gene for selection (selection gene), whereby the marker gene for selection is
the neomycin phosphotransferase gene and whereby another antibiotic resistance gene or other selection gene
may be contained in place of the neomycin phosphotransferase gene.

2. HCV RNA construct according to claim 1, **characterized in**
that it comprises instead of the marker gene or in addition to the marker gene an integrated reporter gene.

3. HCV RNA construct according to claim 2, **characterized in that** the reporter gene is a gene from the group consisting of the luciferase genes, the CAT-gene (chloramphenicol acetyl transferase gene), the lacZ gene (beta galactosidase gene), the GFP genes (green fluorescence protein genes), the GUS gene (glucuronidase gene) and the SEAP gene (secreted alkaline phosphatase gene).
4. HCV RNA construct according to claims 1 to 3, **characterized in that** its replication influences the expression of a (cellular) surrogate marker gene.
5. HCV RNA construct according to claim 1 to 4, **characterized in that** the reporter gene and the marker gene for selection are spatially arranged in the construct in such a way that they are expressed together as a fusion protein.
6. HCV RNA construct according to claim 1 to 5, **characterized in that** it comprises an integrated foreign gene and can be used to introduce this foreign gene into a target cell which is suited for expressing this foreign gene.
7. HCV RNA construct according to claim 1 to 6, **characterized in that** it comprises nucleotide and/or amino acid mutations, that it is cell culture-adapted, that it replicates with high efficiency and that it is obtained by using a cell culture system according to claim 11, in which the transferred HCV specific gene material is an HCV RNA construct with a selection gene according to one of the claims 1 to 6, by culturing on/in the selection medium that is appropriate for the particular selection gene, by harvesting the grown cell clones, and by isolating the HCV RNA construct or parts thereof from these cell clones.
8. HCV RNA construct according to claim 7, whereby the isolated HCV-RNA-construct or parts thereof are subjected to at least one further passage, i.e. are introduced into cells of a cell culture system according to claim 11, these cells are cultivated on/in the selection medium that is appropriate for the particular selection gene, the grown cell clones are harvested and the HCV RNA construct or parts thereof are isolated from these cell clones.
9. HCV RNA construct according to one of the claims 1 to 8, **characterized in that** it comprises one or several of the following specified amino acid exchanges, namely 1283 arg -> gly and/or 1383 glu -> ala and/or 1577 lys -> arg and/ or 1609 lys - > glu and/or 1936 pro - > ser and/or 2163 glu - > gly and/ or 2330 lys - > glu and/or 2442 ile - > val , that it is cell culture-adapted and that it replicates with high efficiency.
10. HCV RNA construct according to claim 1 to 9, **characterized in that** it comprises one or several of the nucleotide and/or amino acid exchanges specified in table 3, whereby table 3 is constituent of this claim.
11. HCV cell culture system, composed essentially of eukaryotic cells, which contain transferred HCV specific genetic material, **characterized in that** the eukaryotic cells are human hepatoma cells and that the transferred HCV specific genetic material is an HCV RNA construct in accordance with one of the claims 1 to 10.
12. Cell culture system according to claim 11, **characterized in that** the cells containing the HCV RNA construct are deposited at the DSMZ, Braunschweig, FRG, under the deposit number DSM ACC2394 (laboratory name HuBI 9-13).
13. A use of a cell culture system according to claim 11 or 12 and/or a HCV RNA construct according to one of the claims 1 to 10 for the production and/or evaluation of therapeutics and/or diagnostics for HCV infections.
14. A use of a cell culture system according to claim 11 or 12 and/or a HCV RNA construct according to one of the claims 1 to 10 for the production of a vaccine against HCV infections.
15. A use of an HCV RNA construct according to one of the claims 1 to 10 for the production of a liver-cell-specific vector in gene therapy.
16. A use of an HCV RNA construct according to one of the claims 1 to 6 for the production of cell culture-adapted mutants of this HCV RNA construct, whereby the mutants replicate with increased efficiency in comparison with the HCV RNA construct, **characterized in that** one cultivates a cell culture system in accordance with claim 11 or 12, which contains HCV RNA constructs in accordance with one of the claims 1 to 6 on/in the selection medium

that is appropriate for the particular selection gene, that one harvests the grown cell clones, and that one isolates the HCV RNA constructs or parts thereof from these cell clones.

17. A use of an HCV RNA construct according to claim 16, **characterized in**

that one performs at least one further passage with the isolated HCV RNA constructs, i.e. one introduces the isolated HCV RNA constructs into cells of a cell culture system according to claim 11 or 12 and cultivates these cells on/in the selection medium that is appropriate for the particular marker gene, one harvests grown cell clones and isolates the HCV RNA constructs or parts thereof from these cell clones.

18. Use of an HCV RNA construct according to one of the claims 1 to 6 for the production of mutants of an HCV full length genome or an HCV partial genome or any HCV construct having an increased replication efficiency in comparison with the original HCV full length genome or partial genome or HCV RNA construct, **characterized in**

- **that** one creates a cell culture-adapted mutant of the HCV RNA construct in accordance with claim 16 or claim 17,
- **that** one analyzes the nucleotide and amino acid sequence of this mutant and by comparison with the nucleotide and amino acid sequence of the original HCV RNA construct determines the type, number and positions of the nucleotide and amino acid mutations in which the original HCV RNA construct differs from this mutant, and
- **that** one introduces these mutations found in the mutant either by direct mutagenesis or by exchange of fragments of the HCV RNA construct, which contain the mutations concerned into an (isolated) HCV full length genome or an HCV partial genome or any HCV RNA construct.

19. A use of an HCV RNA construct according to one of the claims 1 to 10 for the production of hepatitis C virus particles or virus-like particles.

Revendications

1. Construction d'ARN du virus de l'hépatite C (VHC) avec la capacité de réplication dans des cellules eucaryotes, **caractérisée en ce qu'elle** comprend une séquence de nucléotides selon l'un des protocoles de la séquence SEQ ID N° : 1 à SEQ ID N° : 11, codant pour au moins les sections d'ARN spécifiques du VHC 5' NTR, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B et 3'NTR et en outre, un gène marqueur sélectionnable (gène de sélection), le gène marqueur sélectionnable étant le gène de la néomycine phosphotransférase et un autre gène résistant aux antibiotiques ou un autre gène résistant pouvant être contenu à la place du gène de néomycine-phospho-transférase.

2. Construction d'ARN du VHC selon la revendication 1, **caractérisée en ce qu'elle** présente, à la place du gène marqueur ou en complément du gène marqueur, un gène rapporteur intégré.

3. Construction d'ARN du VHC selon la revendication 2, **caractérisée en ce que** le gène reporter est sélectionné dans le groupe constitué des gènes de la luciférase, du gène CAT (gène de la chloramphénicol acétyltransférase), du gène lacZ (gène bêta-galactosidase), des gènes GFP (gène de la protéine vert fluorescent), du gène GUS (gène de la glucuronidase) et du gène SEAP (gène de la phosphatase alcaline sécrétoire)

4. Construction d'ARN du VHC selon l'une des revendications 1 à 3, **caractérisée en ce que** sa réplication influe sur l'expression d'un gène marqueur substitut (cellulaire).

5. Construction d'ARN du VHC selon l'une des revendications 1 à 4, **caractérisée en ce que** le gène reporter et le gène marqueur sélectionnable sont agencés de telle façon dans l'espace de la construction qu'ils expriment ensemble une protéine de fusion.

6. Construction d'ARN du VHC selon l'une des revendications 1 à 5, **caractérisée en ce qu'elle** présente un gène étranger intégré et est apte à introduire ce gène étranger dans une cellule cible qui est apte à exprimer ce gène étranger.

7. Construction d'ARN du VHC selon l'une des revendications 1 à 6, **caractérisée en ce qu'elle** présente des mutations de nucléotide et / ou d'acides aminés, elle est adaptée à la culture cellulaire, elle se réplique avec une efficacité élevée et elle peut être obtenue en cultivant un système de culture cellulaire selon la revendication 11, dans lequel le matériel génétique spécifique au VHC introduit est une construction d'ARN du VHC avec un gène

de sélection selon l'une des revendications 1 à 6, sur / dans le milieu de sélection correspondant au gène de sélection, en récoltant les clones cellulaires cultivés et en isolant de ces clones cellulaires la construction d'ARN du VHC ou des parties de celle-ci.

- 5 8. Construction d'ARN du VHC selon la revendication 7, **caractérisée en ce que** l'on effectue au moins une fois de nouveau un passage de la construction d'ARN du VHC isolée à partir des clones cellulaires ou des parties de celle-ci, à savoir que l'on introduit ladite construction d'ARN du VHC dans des cellules du système de culture cellulaire selon la revendication 11 et que l'on cultive ces cellules sur / dans le milieu de sélection correspondant au gène de sélection, que l'on récolte les clones cellulaires cultivés et que l'on isole de ces clones cellulaires la construction d'ARN du VHC ou des parties de celle-ci.
10
9. Construction d'ARN du VHC selon l'une des revendications 1 à 8, **caractérisée en ce qu'elle** présente un ou plusieurs échanges des acides aminés suivants, à savoir 1283 arg-> gly et / ou 1383 glu-> ala et / ou 1577 lys-> arg et / ou 1609 lys-> glu et / ou 1936 pro-> ser et / ou 2163 glu-> gly et / ou 2330 lys-> glu et / ou 2442 ile-> val, qu'elle est adaptée à la culture cellulaire et elle se réplique avec une efficacité importante.
15
10. Construction d'ARN du VHC selon l'une des revendications 1 à 9, **caractérisée en ce qu'elle** présente un ou plusieurs échanges de nucléotides et / ou d'acides aminés figurant dans le tableau 3, le tableau 3 faisant partie intégrante de cette revendication.
20
11. Système de culture cellulaire du VHC qui comprend essentiellement des cellules eucaryotes contenant un matériel génétique spécifique au VHC introduit, **caractérisé en ce que** les cellules eucaryotes sont des cellules d'hépatome humain et **en ce que** le matériel génétique spécifique du VHC introduit est une construction d'ARN du VHC selon l'une des revendications 1 à 10.
25
12. Système de culture cellulaire selon la revendication 11, **caractérisé en ce que** les cellules contenant la construction d'ARN du VHC sont enregistrées auprès du DSMZ, Braunschweig, RFA, sous le numéro d'enregistrement DSM ACC2394 (code laboratoire HuBI 9-13).
30
13. Utilisation d'un système de culture cellulaire selon l'une des revendications 11 ou 12 et / ou d'une construction d'ARN du VHC selon l'une des revendications 1 à 10 pour la production et / ou l'évaluation de produits thérapeutiques et / ou diagnostiques pour les infections au VHC.
35
14. Utilisation d'un système de culture cellulaire selon l'une des revendications 11 ou 12 et / ou d'une construction d'ARN du VHC selon l'une des revendications 1 à 10 pour la production d'un vaccin contre les infections au VHC.
40
15. Utilisation d'une construction d'ARN du VHC selon l'une des revendications 1 à 10 pour la production d'un vecteur génétique spécifique des cellules hépatiques pour la thérapie génique.
45
16. Utilisation d'une construction d'ARN du VHC selon l'une des revendications 1 à 6 pour obtenir des mutants de cette construction d'ARN du VHC adaptés à la culture cellulaire, les mutants présentant par rapport à la construction d'ARN du VHC une efficacité de répllication accrue, **caractérisée en ce que** l'on cultive un système de culture cellulaire selon la revendication 11 ou 12 contenant la construction ARN du VHC selon l'une des revendications 1 à 6, sur / dans le milieu de sélection correspondant au gène de sélection, que l'on récolte les clones cellulaires cultivés et que l'on isole de ces clones cellulaires des constructions d'ARN du VHC ou des parties de celles-ci.
50
17. Utilisation d'une construction d'ARN du VHC selon la revendication 16, **caractérisée en ce que** l'on effectue au moins une fois de nouveau un passage de la construction d'ARN du VHC isolée, à savoir que l'on introduit ladite construction d'ARN du VHC dans les cellules d'un système de culture cellulaire selon la revendication 11 ou 12 et que l'on cultive celles-ci sur / dans le milieu de sélection correspondant au gène de sélection, que l'on récolte les clones cellulaires cultivés et que l'on isole de ces clones cellulaires la construction d'ARN du VHC ou des parties de celle-ci.
55
18. Utilisation d'une construction d'ARN du VHC selon l'une des revendications 1 à 6, pour la production de mutants d'un génome entier du VHC ou d'un génome partiel du VHC ou d'une construction quelconque du VHC avec, par rapport au génome entier du VHC ou au génome partiel ou à la construction d'ARN du VHC d'origine, une efficacité de répllication accrue, **caractérisée en ce que**

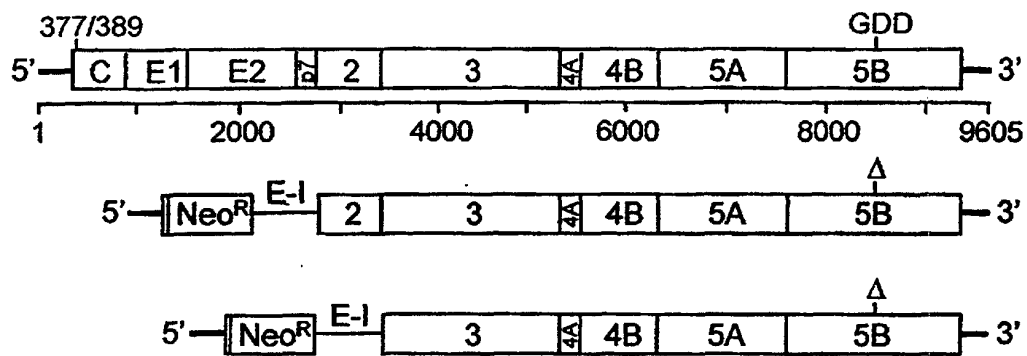
➤ l'on produit selon la revendication 16 ou 17 un mutant adapté à la culture cellulaire de la construction d'ARN du VHC,

➤ que l'on détermine la séquence de nucléotides et d'acides aminés de ce mutant et que l'on détermine, par comparaison avec la séquence de nucléotides et d'acides aminés de la construction d'ARN du VHC d'origine,

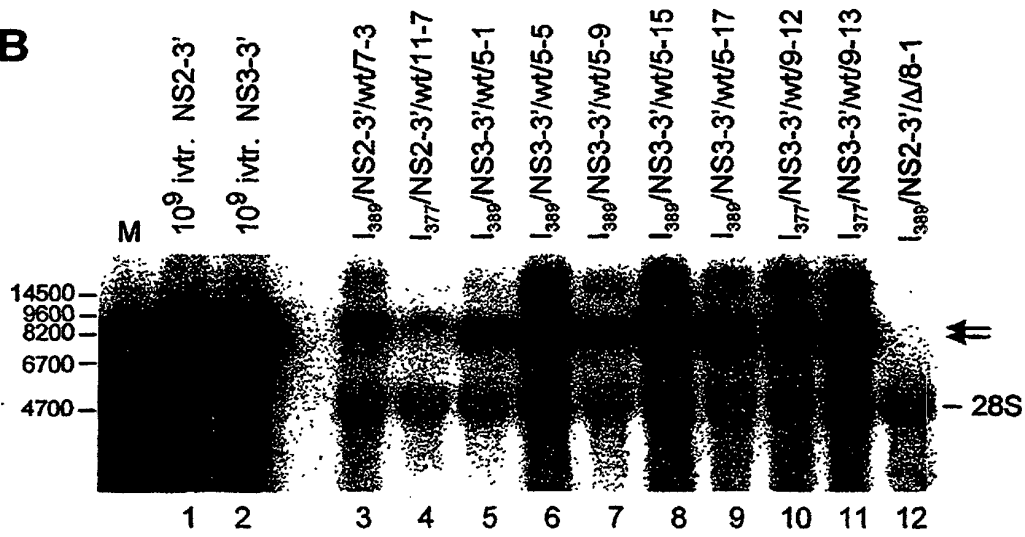
➤ et que l'on introduit ces mutations soit par une mutagenèse ciblée, soit par l'échange de sections de séquences contenant les mutations concernées, dans un génome entier du VHC (isolé) ou un génome partiel du VHC ou une construction d'ARN du VHC quelconque.

19. Utilisation d'une construction d'ARN du VHC selon l'une des revendications 1 à 10 pour la production de particules virales de l'hépatite C ou de particules de type viral.

A



B



C

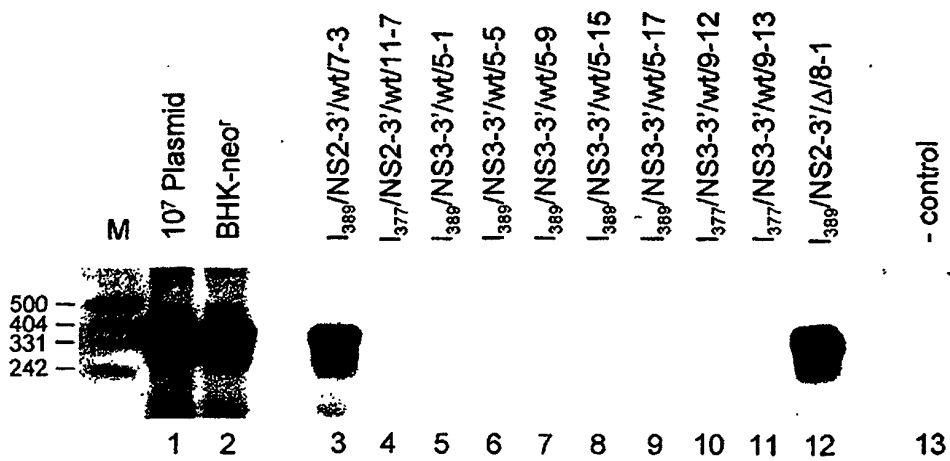


Fig. 1

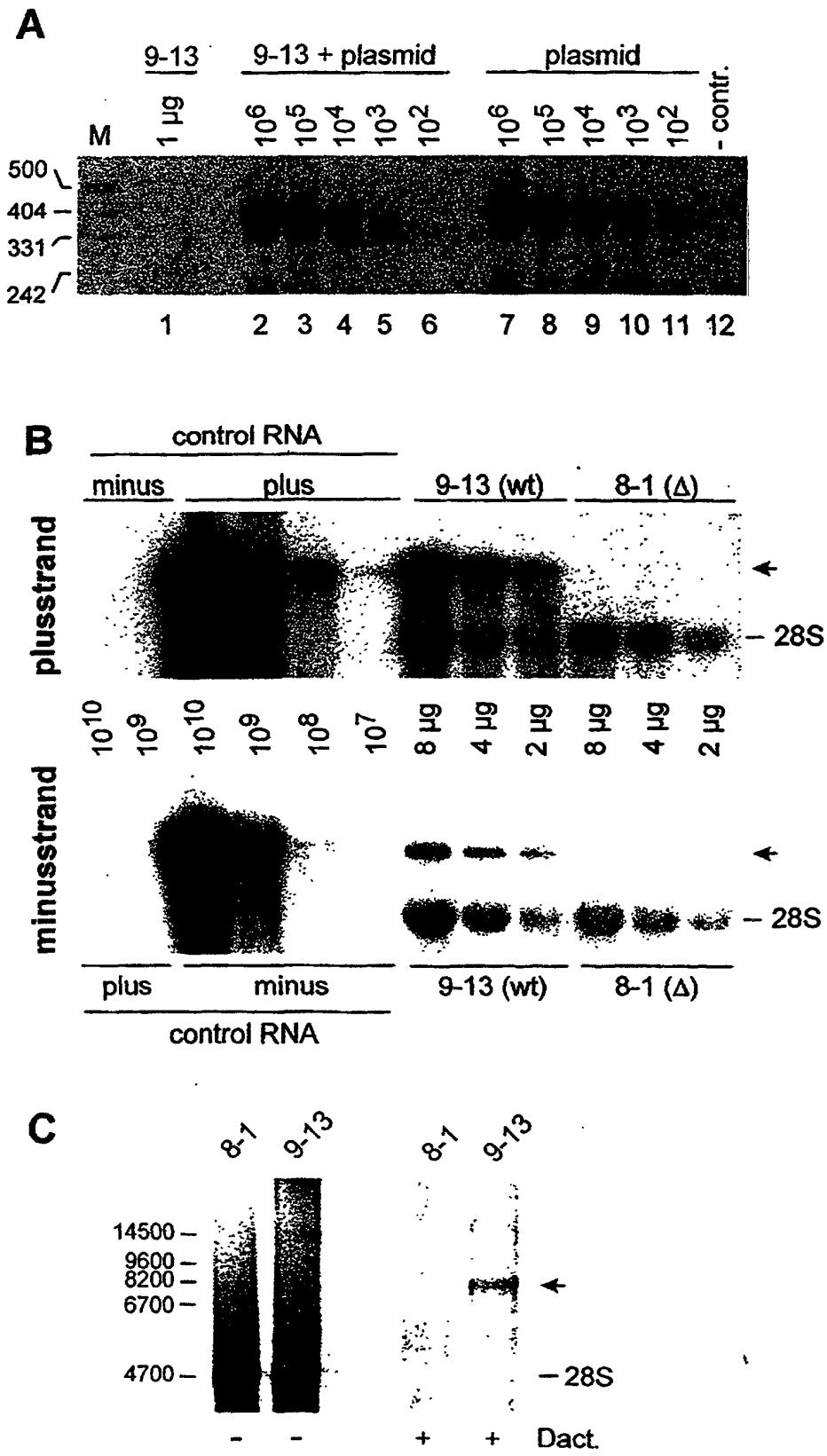


Fig. 2

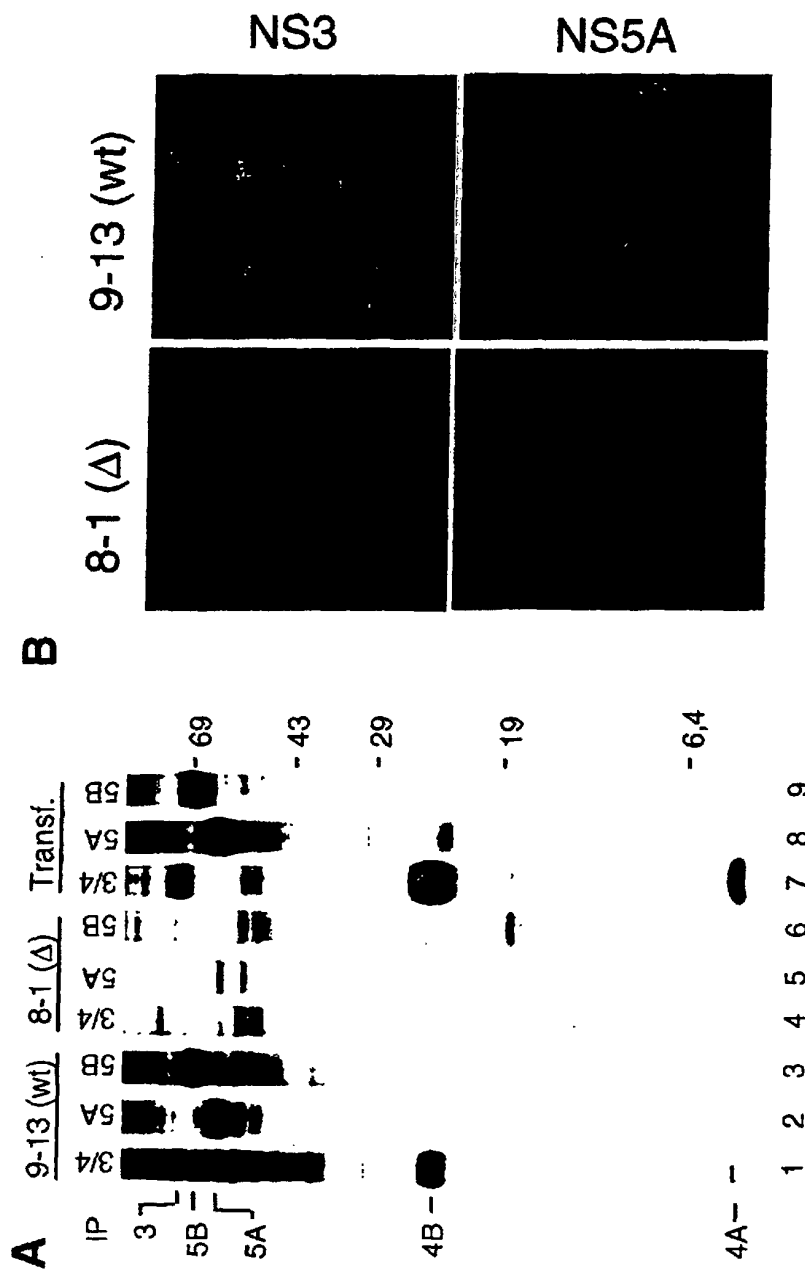


FIG. 3

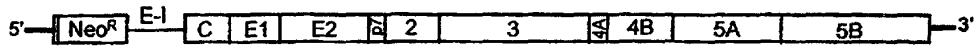


Fig. 4

A



B

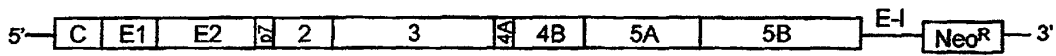
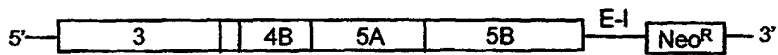


Fig. 5

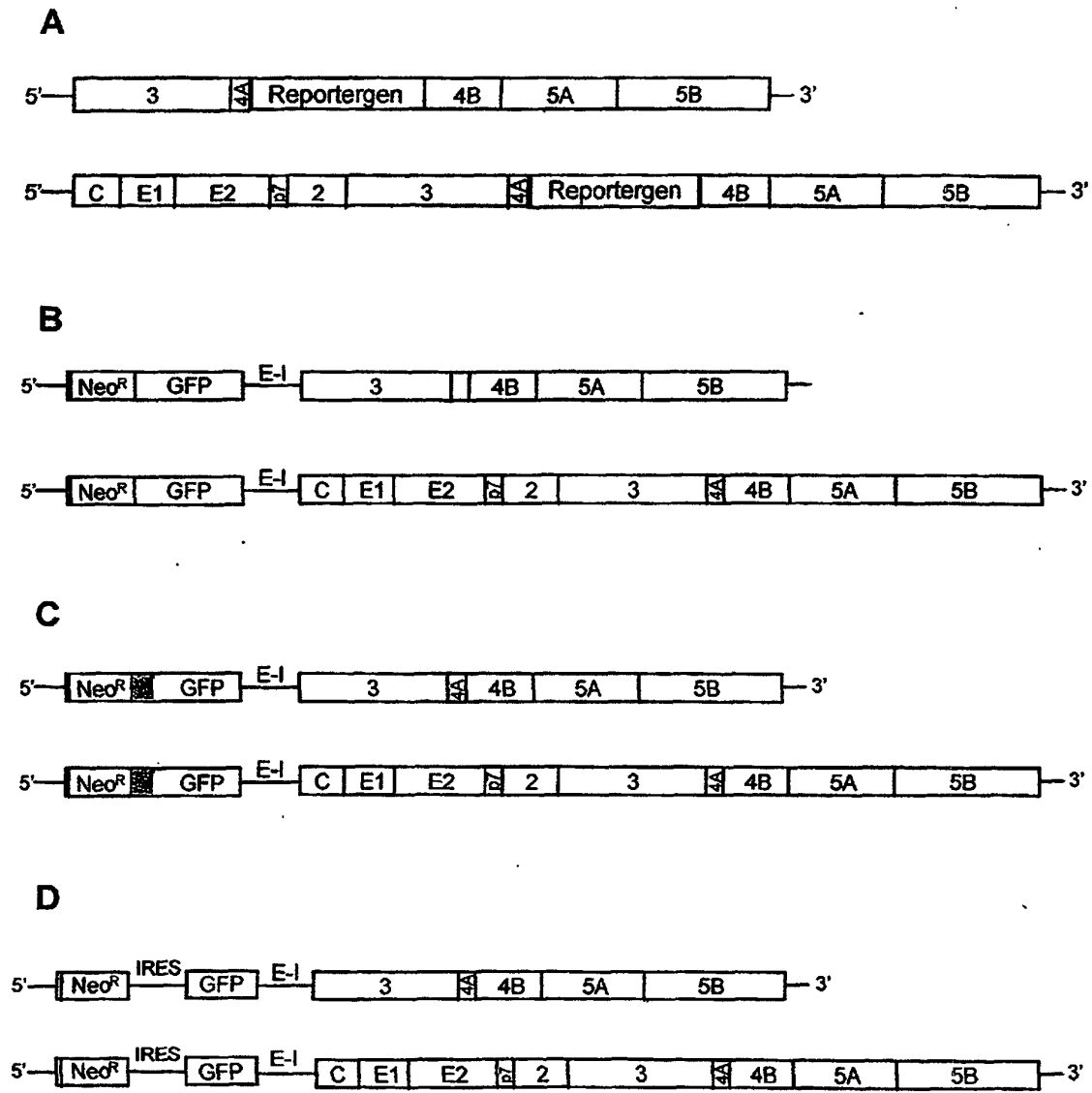


Fig. 6

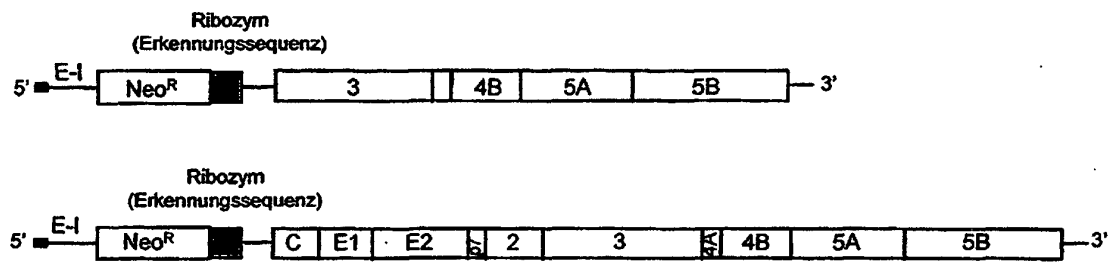


Fig. 7

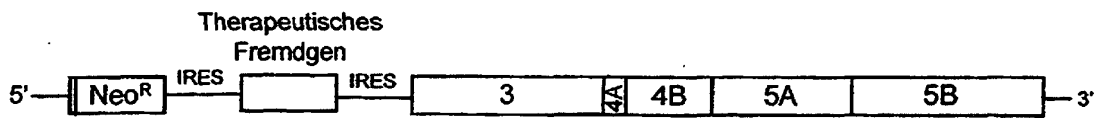


Fig. 8

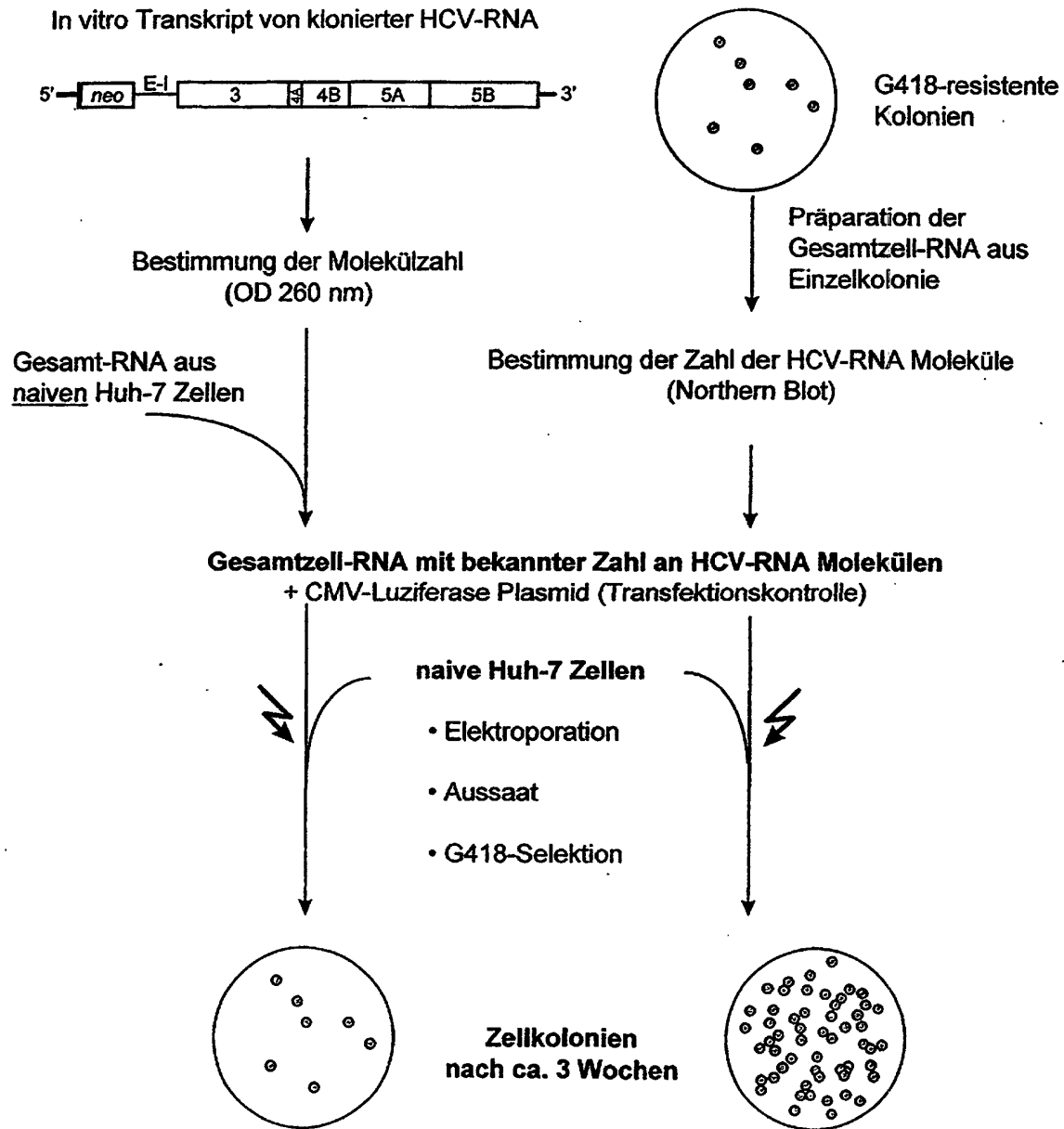


Fig. 9

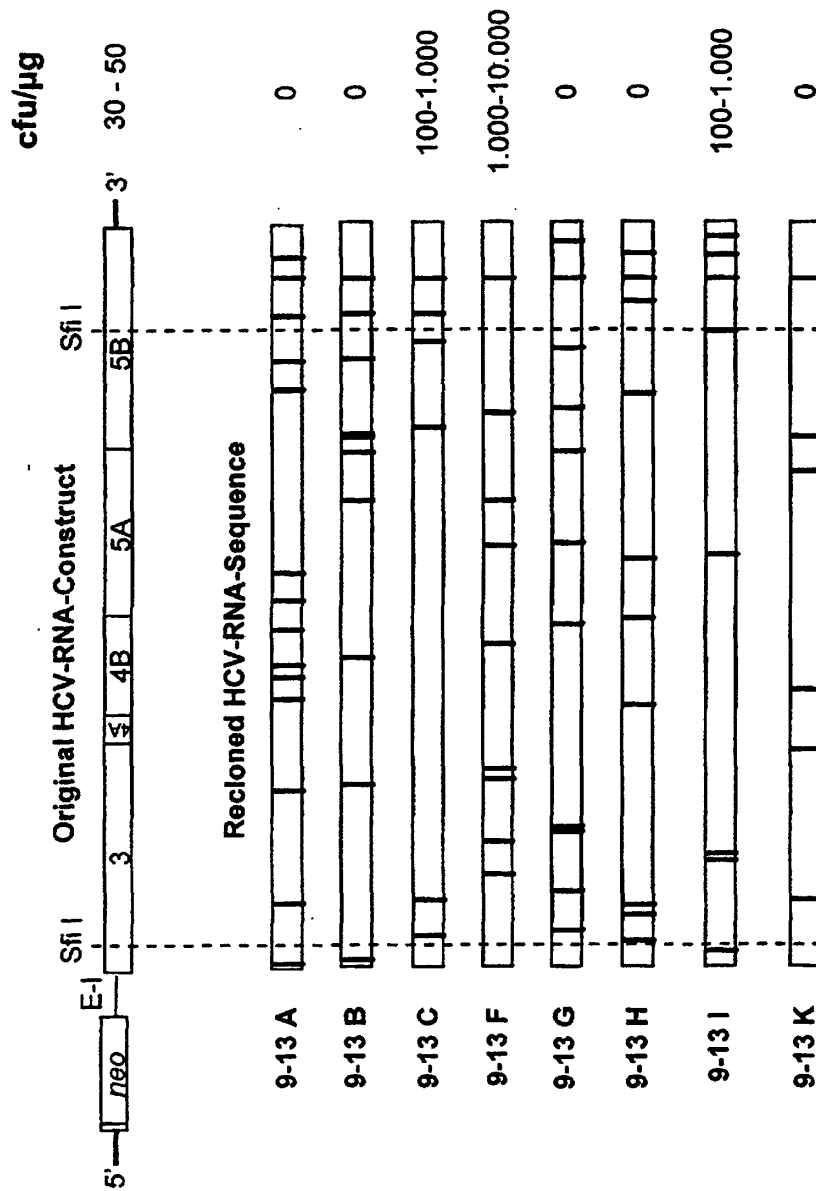


Fig. 10

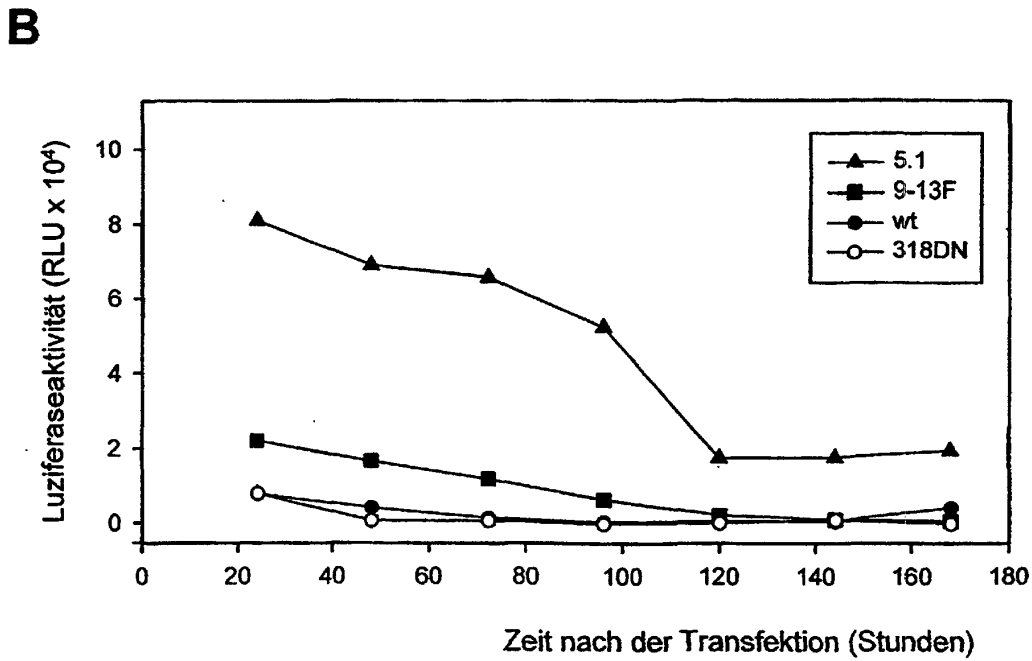
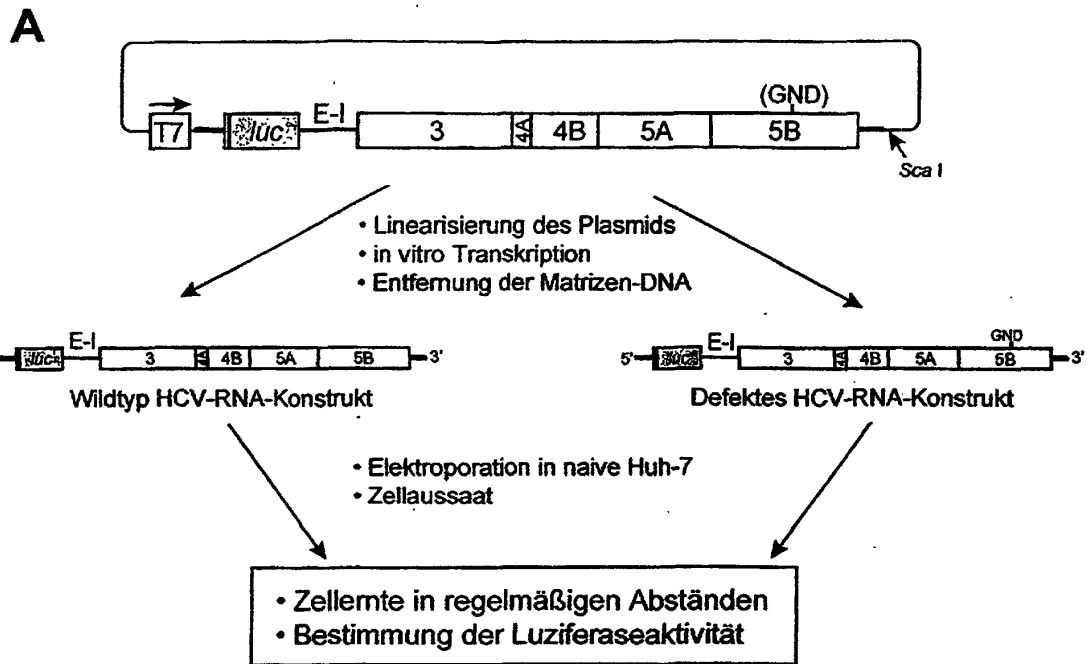
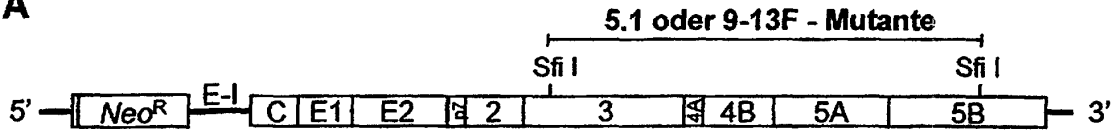


Fig. 11

A



B

G418-Konzentration:	500 µg/ml	250 µg/ml	100 µg/ml
Anzahl erhaltener Kolonien:	1	23	75

C

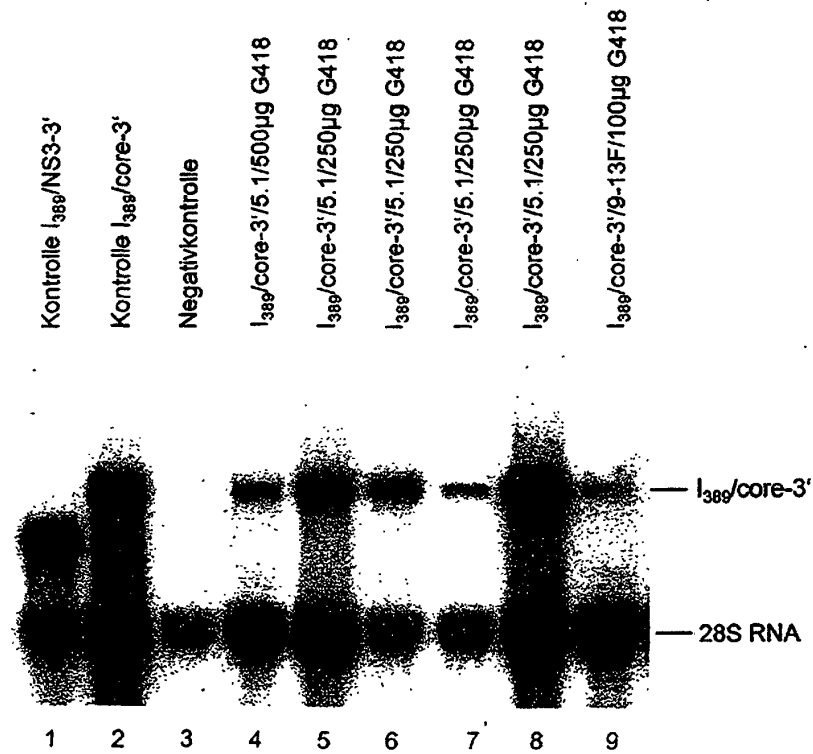


Fig. 12

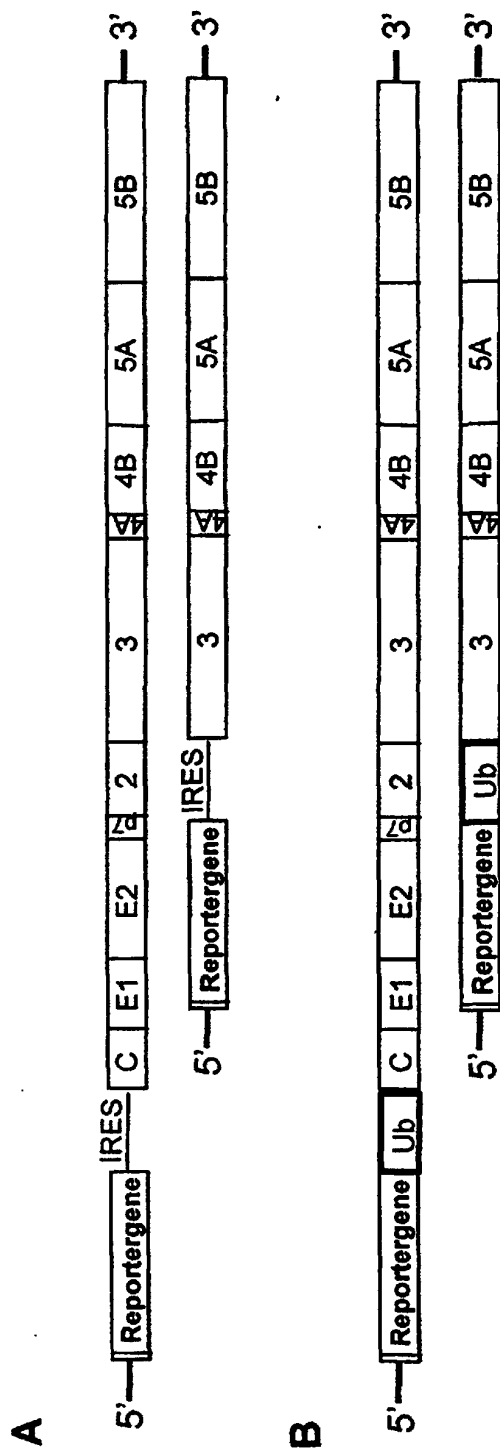


Fig. 13

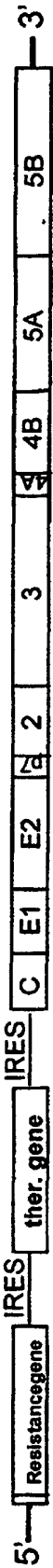


Fig. 14

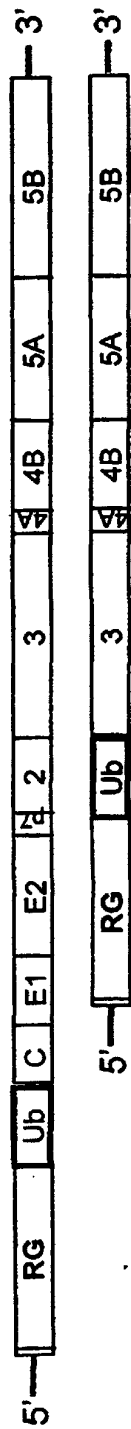


Fig. 15