

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 95.093

REQUERENTE: CHIRON CORPORATION

**EPÍGRAFE: "METODOS PARA A CULTURAÇÃO DE HCV EM CELULAS
EUCARIOTICAS"**

INVENTORES: Amy J. Weiner e Kathelyn S. Steimer, ambos
cientistas, norte-americanos, residentes res-
pectivamente em 1766 Indian Way, Oakland, California 94611,
E.U.A., e 649 West "I" Street, Benicia, California 94510,
E.U.A.

**Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4.º da Convenção de Paris
de 20 de Março de 1883.**

**25 de Agosto de 1989, nos Estados Unidos da América, sob o
Nº. 398.667**

Titular: CHIRON CORPORATION

Epigrafe: "MÉTODÓ PARA A CULTURAÇÃO DE HCV EM CELULAS
EUCARIOTICAS"

M E M O R I A D E S C R I T I V A

Campo Técnico

A invenção refere-se a sistemas celulares in vitro para replicação de um vírus; especificamente refere-se a linhas celulares nas quais um agente etiológico de hepatite não-A não-B (NANBH), vírus da hepatite C (HCV) replicará.

Referências Citadas no Pedido

ATCC CATALOG OF CELL LINES & HYBRIDOMAS, 6ª edição, 1988 (American Type Culture Collection, Rockville, Md.).

BASIC & CLINICAL IMMUNOLOGY, 6ª edição (Stites, Stobo and Wells, eds., Appleon and Lange, Norwalk Conn/los Altos, Ca, 1987).

Boggs and Winkelstein, WHITE CELL MANUAL, 4ª edição (F.A. Davis Co., Phila., 1983).

Choo et al. (1989), Science 244:359

Diggs, Sturm and Bell (1985), THE MORPHOLOGY OF HUMAN BLOOD CELLS (Abbott Laboratories, Abbott Park, Il.).

DNA CLONING, VOLUMES I AND II (D.N Glover ed. 1985).

Freshney (1987), CULTURE OF ANIMAL CELLS: A MANUAL OF A



BASIC TECNIQUE (Alan R. Liss, Inc., N.Y.).

GENE TRANSFER VECTORS FOR MAMMALIAN CELLS (J.H. Miller and M.P. Calos eds. 1987, Cold Spring Harbor Laboratory).

Houghton et al., U.S. Patent Appl. Ser. No. 355.002 (depositado em 18 de Maio de 1989), assim como cada aplicação cuja prioridade é reivindicada.

Houghton et al., European Patent Office Publication No. 0 318 216 (31 de Maio de 1989).

HANDBOOK OF EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY, VOLUMES I-IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell eds. 1986).

Hellings et al., J. Virol. Meth. (1985), 10:321-326.

Hunt (1987), in LYMPHOCYTES: A PRACTICAL APPROACH (Klaus, ed., IRL Press Ltd., Washington D.C.), pp. 1-32.

IMMOBILIZED CELLS AND ENZYMES (IRL Press, 1986).

Kuo et al. (1989), Science 244:362.

Laemmli (1970), Nature 227:680.

LYMPHOCYTES: A PRACTICAL APPROACH (Klaus, ed., 1987, IRL Press, Ltd., Washington, D.C.)

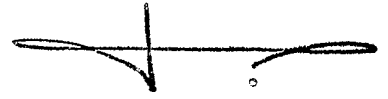
LYMPHOKINES AND INTERFERONS: A PRACTICAL APPROACH (Clemens, Morris, and Gearing, eds., 1987, IRL Press, Ltd. Washington D.C.).

Maniatis, Fitch & Sambrook, MOLECULAR CLONING; A LABORATORY MANUAL (1982).

Mayer and Walker, eds. (1987), IMMUNOCHEMICAL METHODS IN CELL AND MOLECULAR BIOLOGY (Academic Press, London).

McKeehan et al. (1978), Biochem. Biophys. Res. Comm. 80:1013.

METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.); também,



Methods in Enzymology Vol. 154 and Vol. 155 (Wu and Grossman, and Wu, eds., respectivamente).

NUCLEIC ACID HYBRIDIZATION (B.D. Hames & S.J. Higgins eds. 1984).

OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS (M.J. Gait ed., 1984).

Perbal, A PRACTICAL GUIDE TO MOLECULAR CLONING (1984).

Saiki et al. (1986), Nature 324:163.

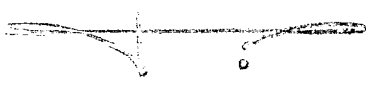
Seto et al., National Technical Information Service Report No. PAT-APPL-7-234 641 (198_).

Scopes, (1987), PROTEIN PURIFICATION: PRINCIPLES AND PRACTICE, Segunda Edição (Springer-Verlag, N.Y.).

VIROLOGY: A PRACTICAL APPROACH (Mahy, ed., 1985, IRL Press, Ltd., Washington, D.C.).

Antecedentes

A hepatite não-A, não-B (NANBH) é uma doença, ou família de doenças, transmissíveis, que se crê induzidas por meio de vírus, e que são distintas de outras formas de doenças do fígado associadas a vírus, incluindo as causadas pelas conhecidas hepatites virais, i.e., vírus da hepatite A (HAV), vírus da hepatite B (HBV), e vírus da hepatite delta (HDV), assim como as hepatites induzidas por citomegalovírus (CMV) ou o vírus Epstein-Barr (EBV). O NANBH foi primeiramente identificado em indivíduos sujeitos a transfusões. A transmissão do homem para o chimpanzé e a passagem serial dentro da família dos chimpanzés forneceu a evidência que a NANBH é devida a agentes infecto-contagiosos ou agentes transmissíveis. Um agente viral, HCV, tem sido identificado como um agente etiológico da NANBH.



A necessidade de métodos específicos e sensíveis para visualização e identificação dos transportadores do NANBV e sangue ou produtos sanguíneos contaminados por NANBV é significativa. A hepatite de pós-transfusão (PTH) ocorre em cerca de 10% dos pacientes sujeitos a transfusão, e a NANBH ocorre em até cerca de 90% destes casos. O maior problema nesta doença é a progressão frequente até danos hepáticos crônicos (25-55%).

O cuidado do paciente, bem como a prevenção da transmissão da NANBH pelo sangue e por produtos sanguíneos, ou por contacto pessoal íntimo, requerem um diagnóstico de confiança e material de prognóstico para a detecção de ácidos nucleicos, antígenos e anticorpos relacionados com a NANBH. Para além disto, há também a necessidade de vacinas eficazes e agentes de terapia imunoterapêutica para a prevenção e/ou tratamento da doença.

Células de tecidos em cultura, infectadas com um agente etiológico que cause a NANBH, forneceria uma fonte de polipeptídeos virais que poderiam ser usados para imunoensaios ou vacinas. Para além disto, poderiam ser úteis nos programas de screening de fármacos no desenvolvimento de agentes anti-virais para o tratamento da doença.

Linhas de células de primatas, humanos ou não, imortalizadas, que são provenientes do fígado, e são propositadamente infectadas com um agente etiológico causador da NANBH foram apresentadas em WO/87/05930, depositada em 1 de Abril de 1987, e publicada a 8 de Outubro de 1987. Estas linhas de células são, como informado, não-linfocíticas na natureza. Para além disto, não foi provado que o agente que replica nestas células seja causador da doença.



Foi também referido que uma preparação de leucócitos mononucleares, que eram sobretudo linfócitos, isolados de um paciente com NANBH, causaram NANB, quando administrados num chimpanzé susceptível. Hellings et al.(1985). No entanto, a prova de infecção de NANBH foi indirecta, já que se baseou , principalmente, em alterações morfológicas e histológicas nos chimpanzés significativamente infectados. Além do mais, apenas um dos dois chimpanzés que receberam as células de sangue foi significativamente infectado.

Revelação da Invenção

A presente invenção destina-se a células que possam ser usadas para propagar o HCV em meio de cultura. A presente invenção destina-se também a antígenos virais produzidos por tais culturas, e o uso de tais antígenos por exemplo em diagnósticos.

Consequentemente, um dos aspectos da invenção é uma linha de células infectada com HCV.

Outro aspecto da invenção é uma composição para a detecção de anticorpos anti-HCV contendo um antígeno de uma célula infectada in vitro com HCV, na qual o antígeno é afixado num substrato sólido, no qual o antígeno é imunologicamente reactivo com o dito anticorpo anti-HCV.

Ainda um outro aspecto da invenção é um imunoensaio para a detecção de anticorpos dirigidos contra o antígeno HCV compreendendo:

(a) incubação de uma amostra que se suspeita conter anticorpos anti-HCV com um antígeno HCV produzido por uma linha de células in vitro, sob condições que permitam a formação de um

complexo anticorpo-antigene; e

(b) detecção do complexo anticorpo-antigene contendo o antigene de HCV.

Outro aspecto da invenção é um método para o "screening" de um agente que iniba o HCV.

Ainda um outro aspecto da invenção é um método para a proliferação do virus compreendendo o crescimento em meio de cultura de células infectadas com HCV.

Breve Descrição dos Desenhos

A Figura 1 mostra a sequência da composição do cDNA do HCV com uma cadeia de sentido, derivada da estirpe HCV1 do HCV.

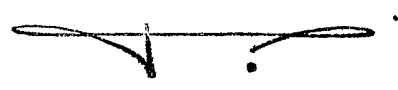
A Figura 2 mostra uma sequência de nucleotídeos do cDNA do clone 35 de HCV, e os aminoácidos aí codificados.

Formas de Realização da Invenção

I. Definições

O termo "virus da hepatite C" tem sido reservado pelos trabalhadores da área para um agente etiológico até aqui desconhecido da NANBH. De acordo com isto, como aqui usado, "virus da hepatite C" (HCV) refere um agente causador da NANBH, o qual era anteriormente referido por NANBV e/ou BB-NANBV. Os termos HCV, NANBV e BB-NANBV são aqui usados interpermutavelmente. Como uma extensão nesta terminologia, a doença causada pelo HCV, anteriormente designada hepatite NANB (NANBH), é chamada hepatite C. Os termos NANBH e hepatite C podem ser aqui usados interpermutavelmente.

O termo "HCV", como aqui usado, designa uma espécie



viral da qual estirpes patogénicas causam NANBH e estirpes atenuadas ou partículas interferentes defeituosas derivadas das mesmas. O genoma do HCV é constituído de RNA. É sabido que o RNA contendo vírus tem velocidades relativamente altas de mutação espontânea, i.e., reportadas a velocidades da ordem de 10^{-3} a 10^{-4} por nucleotídeo incorporado (Fields & Knipe (1986)). Assim, podem existir múltiplas estirpes, as quais podem ser virulentas ou avirulentas, dentro das espécies de HCV. Crê-se que o HCV é um vírus tipo Flavi. A morfologia e composição das partículas de Flavivírus são conhecidas e são discutidas em Brinton (1986). Geralmente, no que diz respeito à morfologia, os Flavivírus contêm uma nucleocápside central rodeada de uma bicamada lipídica. Os viriões são esféricos e possuem um diâmetro de cerca de 40-50 nm. Os seus "cores" possuem cerca de 25-30 nm de diâmetro. Ao longo da superfície exterior do invólucro do virião encontram-se projecções que possuem cerca de 5-10 nm de comprimento, com protuberâncias terminais de cerca de 2 nm de diâmetro.

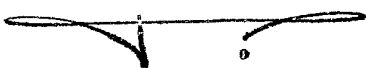
Os cDNA's para o genoma de uma estirpe de HCV, designada como HCV1, são descritas na Patente Norte Americana com o No. de Série 355.002 (Attorney Docket No. 2300-0063.28), depositado em 18 de Maio de 1989, que é comumente possuída pela presente cessionária aqui referenciado, e a qual é aqui incorporada para referência na sua totalidade. Veja-se também a Publicação EPO No. 0 318 216 e a PCT App. No. US88/04125, as quais são também aqui incorporadas para referência. Uma sequência da composição da cadeia de sentido do cDNA do HCV é mostrada na Figura 1. Espera-se que diferentes estirpes de HCV ou isolados do



HCV contenham variações nos níveis de aminoácidos ou ácidos nucleicos, quando comparados com o HCV1. Espera-se que muitos isolados tenham muita homologia (i.e., mais de 40%) na sequência total de aminoácidos comparada com o HCV1. No entanto, pode também ser determinado que outros isolados menos homólogos do HCV seriam definidos como estirpes de HCV de acordo com vários critérios, tais como, uma códificação ORF de uma poliproteína similar em dimensões à do HCV1, uma poliproteína codificada de carácter hidrofóbico e antigénico similar à do HCV1, e a presença de sequências peptídicas colineares que são conservadas com o HCV1.

O HCV codifica pelo menos um epitopo que é imunologicamente identificável com um epitopo codificado no genoma do HCV1. O epitopo é único no HCV, quando comparado com outros Flavivirus conhecidos. A singularidade do epitopo pode ser determinada pela sua reactividade imunológica com anticorpos anti-HCV, e a falta de reactividade imunológica com anticorpos de outras espécies de Flavivirus. Métodos para determinar a reactividade imunológica são conhecidos na arte, por exemplo, por radioimunoensaios, pelo ensaio ELISA e por hemaglutinação. Exemplos das técnicas apropriadas para determinação da reactividade imunológica dos epitopos de HCV são descritos na Patente Norte Americana com o No. de Série 07/341.334, a qual é commumente possuída pela presente cessionária, em Choo et al. (1989) e em Kuo et al. (1989).

Para além do que foi referido acima, são aplicáveis os parâmetros seguintes de homologia de ácidos nucleicos e homologia de aminoácidos, quer separadas, quer em combinação, para a



identificação de uma estirpe ou isolado, como o HCV. Dado que as estirpes e isolados de HCV estão evolucionariamente relacionadas, espera-se que a homologia global dos genomas ao nível dos nucleotídeos seja de cerca de 40% ou maior, provavelmente 60% ou maior, e ainda mais provavelmente 80% ou maior; e, para além disto, haverá sequências contíguas correspondentes de pelo menos 13 nucleotídeos. A correspondência entre a sequência genómica de uma estirpe de HCV putativa e a sequência do cDNA do HCV1 pode ser determinada por técnicas conhecidas na arte. Por exemplo, podem ser determinadas por comparação directa da sequência de informação do polinucleotídeo do HCV putativo e a(s) sequência(s) de cDNA de HCV aqui descrita(s). Ainda, por exemplo, podem ser determinadas por hibridização do polinucleotídeo, sob condições nas quais se formam duplexes estáveis entre regiões homólogas (por exemplo, aquelas que seriam usadas antes da digestão S_1), seguida de digestão com nuclease(s) específica(s) de cadeia simples, seguida de determinação das dimensões dos fragmentos digeridos.

Devido à relação evolucionária das estirpes e isolados de HCV, estirpes ou isolados de HCV putativo são identificáveis pela sua homologia ao nível polipeptídico. Geralmente, estirpes ou isolados de HCV são esperados como sendo cerca de 40% homólogos, provavelmente mais de cerca 70% homólogos e ainda mais provavelmente mais de cerca de 80% homólogos, e alguns podem ser mesmo mais de cerca de 90% homólogos ao nível polipeptídico. As técnicas de determinação da homologia de sequências de aminoácidos são conhecidas na arte. Por exemplo, a sequência de aminoácidos pode ser determinada por comparação directa com as



sequências aqui descritas. Alternativamente, a sequência de nucleotídeos do material genómico do HCV putativo pode ser determinada (usualmente via um intermediário de cDNA), a sequência de aminoácidos aí codificada pode ser determinada e as regiões correspondentes comparadas.

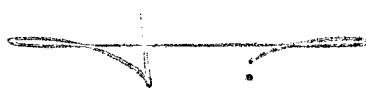
Como aqui usado, um polinucleotídeo "derivado de" uma sequência designada de um polinucleotídeo refere-se a uma sequência polinucleotídica que é constituída de uma sequência de, aproximadamente, 6 nucleotídeos, preferencialmente, pelo menos cerca de 8 nucleotídeos e ainda mais preferencialmente de pelo menos cerca de 10-12 nucleotídeos, e ainda mais preferencialmente cerca de 15-20 nucleotídeos correspondendo a uma região da sequência de nucleotídeos designada. "Correspondente" refere-se a uma sequência homóloga ou complementar à sequência designada. Preferencialmente, a sequência da região a partir da qual o polinucleotídeo é derivado, é homóloga ou complementar à sequência que é exclusiva de um genoma de HCV. Quer uma sequência seja ou não exclusiva do genoma do HCV, pode ser determinada por técnicas conhecidas daqueles peritos na arte. Por exemplo a sequência pode ser comparada a sequências existentes em bancos de dados, e.g., Genbank, para determinar se está presente no hospedeiro não infectado ou noutros organismos. A sequência pode também ser comparada a sequências conhecidas de outros agentes virais, incluindo aqueles que são conhecidos por induzir hepatite, e.g., HAV, HBV e HDV, e a outros elementos dos Flaviviridae. A correspondência ou não correspondência da sequência derivada, com outras sequências, pode também ser determinada por hibridização, sob condições apropriadas de



rigidez. Técnicas de hibridação para a determinação da complementaridade de sequências de ácidos nucleicos são conhecidas na arte e discutidas infra. Veja-se também, por exemplo, Maniatis et al. (1982). Para além disto, o emparelhamento deficiente de polinucleotídeos duplexes, formados por hibridização, pode ser determinado por técnicas conhecidas, incluindo por exemplo, digestão com uma nuclease, tal como a S₁, que digere especificamente regiões de cadeia simples em polinucleotídeos duplexes. Regiões a partir das quais as sequências típicas de DNA podem ser "derivadas" incluem, mas não são limitadas a, por exemplo, regiões que codificam epitopos específicos, bem como regiões não transcritas ou não traduzidas.

O polinucleotídeo derivado não é necessariamente fisicamente derivado da sequência de nucleotídeos mostrada, podendo ser gerada de qualquer forma, incluindo por exemplo, síntese química ou replicação de DNA ou transcrição reversa ou transcrição. Para além disto, combinações de regiões correspondendo à da sequência designada, podem ser modificadas de formas conhecidas no ramo, para serem consistentes com um uso pretendido.

O termo "polinucleotídeo", como aqui é usado, refere-se a uma forma polimérica de nucleotídeos de qualquer comprimento, quer ribonucleotídeos quer desoxiribonucleotídeos. Este termo refere-se apenas à estrutura primária da molécula. Assim, este termo inclui DNA de cadeia simples e dupla, bem como RNA de cadeia simples e dupla. Inclui também modificações, por exemplo, metilações de protecção, e/ou outras modificações conhecidas na arte, incluindo a substituição de um análogo por uma ou mais



bases nucleotídicas existentes na natureza, bem como formas não modificadas do polinucleotídeo.

O termo " polinucleotídeo viral purificado" refere-se a um genoma viral ou fragmento do mesmo, o qual é essencialmente livre, i.e., contém menos de cerca de 50%, preferencialmente menos de cerca de 70%, e ainda preferencialmente menos de cerca de 90% de polipeptídeos com os quais o polinucleotídeo viral está naturalmente associado. Técnicas para purificar polinucleotídeos virais a partir de partículas virais são conhecidas na arte, e incluem por exemplo, disruptura da partícula com um agente caotrópico, extracção diferencial e separação de polinucleotídeo(s) e polipeptídeos por cromatografia de permuta iónica, cromatografia de afinidade e sedimentação, consoante a densidade.

Um "molde de leitura aberto" (ORF) é a região de uma sequência de polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo; esta região pode representar uma porção de uma sequência codificadora ou uma sequência codificadora completa.

Uma "sequência codificadora" é uma sequência polinucleotídica que é transcrita para um mRNA, e/ou traduzida para um polipeptídeo, quando colocada sob o controle das sequências reguladoras apropriadas. As ligações da sequência codificadora são determinadas por um codão de início da tradução numa extremidade 5', e um codão de terminação da tradução numa extremidade 3'. Uma sequência codificadora pode incluir, mas não está limitada a, mRNA, cDNA, e sequências de polinucleotídeo recombinante.

"Imunologicamente identificável com/como" refere-se à

presença de epitopo(s) e polipeptideo(s) que estão também presentes no(s) polipeptideo(s) designado(s), usualmente proteínas do HCV. A identidade imunológica pode ser determinada por ligação de anticorpos e/ou competição na ligação; estas técnicas são conhecidas daqueles com aptidão média na arte, e são também descritos infra.

Como aqui usado, "epitopo" refere-se a um determinante antigénico de um polipeptideo; um epitopo poderia conter 3 ou mais aminoácidos numa conformação espacial que é única do epitopo. Geralmente um epitopo consiste de pelo menos 5 de tais aminoácidos e, mais usualmente, consiste de 8-10 de tais aminoácidos. Métodos para determinar a conformação espacial de aminoácidos são conhecidos na arte, e incluem por exemplo, cristalografia de raio X e ressonância magnética nuclear a duas dimensões.

Um polipeptideo é "imunologicamente reactivo" com um anticorpo quando se liga a um anticorpo devido a reconhecimento do anticorpo de um epitopo específico contido no polipeptideo. A reactividade imunológica pode ser determinada pela ligação do anticorpo, e mais particularmente pela cinética de ligação do anticorpo, e/ou por competição na ligação usando como competidor(es) um polipeptideo conhecido(s) contendo um epitopo contra o qual o anticorpo é dirigido. As técnicas para determinar se um polipeptideo é imunologicamente reactivo com um anticorpo são conhecidas na arte.

Como aqui usado, o termo "polipeptideo imunogénico" refere-se a um polipeptideo que permite uma resposta celular e/ou humoral, quer só ou quando ligada a um transportador na presença



ou ausência de um adjuvante.

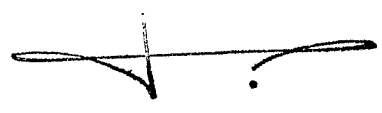
O termo "polipeptídeo" refere-se a um polímero de aminoácidos e não se refere a um tamanho específico do produto; assim, peptídeos, oligopeptídeos e proteínas estão incluídos na definição de polipeptídeos. Este termo não se refere também ou exclui modificações de pós-expressão do polipeptídeo, por exemplo, glicosilações, acetilações, fosforilações e similares.

Um "indivíduo", como aqui usado, refere-se a vertebrados, particularmente membros de espécies de mamíferos e inclui, mas não é limitada a, animais domésticos, animais de desporto e primatas, incluindo humanos.

Como aqui usado, a "cadeia de sentido" ou "cadeia mais" de ácido nucleico contém uma sequência que tem uma homologia de sequência com a do mRNA. A "cadeia do anti-sentido" ou "cadeia menos" contém uma sequência que é complementar à da "cadeia do sentido" ou "cadeia mais".

Como aqui usado, um "genoma de cadeia positiva" de um vírus, é aquele na qual o genoma, quer RNA ou DNA, é de cadeia simples e codifica polipeptídeo(s) viral. Exemplos de vírus da RNA de cadeia positiva incluem Togaviridae, Coronaviridae, Retroviridae, Picornaviridae e Calciviridae. Incluídos ainda, estão os Flaviviridae que foram anteriormente classificados como Togaviridae. Veja-se Fields & Knipe (1986).

Como aqui usado, um "intermediário replicativo" de um genoma de HCV refere-se a uma cadeia de RNA ou fragmento da mesma que é complementar ao genoma viral e que é sintetizado durante o decurso da replicação viral; o intermediário replicativo funciona como um padrão para a síntese de cadeias de RNA positivas.



Como aqui usado, "HCV purificado" refere-se a uma preparação de HCV a qual foi isolada a partir dos constituintes celulares com os quais o vírus normalmente está associado, e a partir de outros tipos de vírus os quais podem estar presentes no tecido infectado. As técnicas para isolamento de vírus são conhecidas por os peritos no ramo, e incluem, por exemplo, centrifugação e cromatografia de afinidade; um método de preparação HCV purificado é discutido infra.

Como aqui usado, uma "amostra biológica" refere-se a uma amostra de tecido ou fluido isolado de um indivíduo, incluindo, mas não limitado a, por exemplo, plasma, sero, fluido espinal, fluido linfático, secções externas da pele, tractos respiratório, intestinal e genito-urinário, lágrimas, saliva, leite, células sanguíneas, tumores, órgãos, e também amostras de constituintes de culturas de células in vitro (incluindo mas não limitado ao meio condicionado, resultando do crescimento de células no meio de cultura celular, células infectadas putativa e viralmente, células recombinantes e componentes celulares).

O termo "oligonucleotídeo", como aqui usado, refere-se a primers, sondas, fragmentos oligoméricos a ser detectados, controles oligoméricos e oligómeros bloqueadores não caracterizados, e é definido como uma molécula contendo três ou mais desoxiribonucleotídeos ou ribonucleotídeos, tipicamente contendo mais de quatro, e tipicamente um máximo de cerca de 100 nucleotídeos. O seu tamanho exacto vai depender de muitos factores, os quais, por sua vez, dependem da função terminal ou uso do oligonucleotídeo.

O termo "primer" como aqui usado, refere-se a



oligonucleotídeo que é capaz de actuar como um ponto de iniciação da síntese de polinucleotídeos, ao longo de uma cadeia complementar, quando colocado sob condições nas quais a síntese de um produto de extensão do primer, que é complementar a um polinucleotídeo é catalisado. Tais condições incluem a presença de quatro nucleotídeos trifosfato diferentes ou análogos nucleosídicos e um agente para polimerização, como a DNA polimerase ou transcriptase reversa num tampão apropriado ("tampão" inclui substituintes que são cofactores ou que afectam o pH, força iónica, etc.), e a uma temperatura conveniente.

Como aqui usado, o termo "região alvo" refere-se a uma região do ácido nucleico a qual vai ser ampliada e/ou detectada.

Como aqui usado, o termo "sonda" refere-se a um polinucleotídeo ou oligonucleotídeo que forma uma estrutura híbrida com a sequência, numa região alvo, devido à complementariedade de, pelo menos uma sequência na sonda, com uma sequência na região alvo. Preferencialmente, no entanto, a sonda não contém uma sequência complementar à(s) sequência(s) usada(s) para começar a reacção em cadeia da polimerase.

Como aqui usado, o termo "polimerase nucleotídica termoestável" refere-se a uma enzima que é relativamente estável ao aquecimento, quando comparada com as polimerases nucleotídicas da *E. coli*, e a qual catalisa a polimerização dos nucleotídeos. Geralmente, a enzima inicia a síntese na extremidade 3' da sequência alvo, utilizando o primer, e prossegue na direcção 5' ao longo do padrão, até terminar a síntese. Uma enzima termoestável representativa isolada de *Thermus aquaticus* (Taq), e método para a sua utilização é descrito em Saiki et al. (1988).



Como aqui usado, o termo "RNA viral" o qual inclui o RNA do HCV refere-se ao RNA do genoma viral, fragmentos do mesmo, transcrições do mesmo e sequências mutantes daí derivadas.

Como aqui usado, "linhas de células" refere-se a uma cultura propagada de células após a primeira subcultura, havendo, assim, vários aperfeiçoamentos incluindo, mas não limitados a, células individuais, células repicadas, e culturas contendo células desde que estas sejam derivadas de células da linha de células a que se referem. Por "derivado" pretende referir a progeriação ou produto. Além de mais, sabe-se na arte que alterações espontâneas ou induzidas no cari6tipo podem ocorrer durante o armazenamento ou transfer6ncia. Por isso, células derivadas da linha de células referida podem não ser precisamente idênticas às células ou culturas ancestrais, e a linha de células referida inclui tais varia66es. O termo "linhas de células" inclui células imortalizadas. Preferencialmente, as linhas de células excluem células que são derivadas pela hibrida66o de três tipos de células, por exemplo, um trioma.

Como aqui usado, um sistema celular "in vitro" refere-se a células que replicaram in vitro, pelo que o termo inclui culturas e linhas de células primárias.

Como aqui usado, o termo "célula sanguínea" refere-se a células encontradas circulando quer no sangue, no tecido ou na medula óssea e inclui células das séries mielocíticas, das séries monocíticas, das séries megacariocíticas, das séries eritrocíticas, das séries linfocíticas e das plasmocíticas. A morfologia pela qual estas células podem ser distinguidas é discutida em THE MORPHOLOGY OF HUMAN BLOOD CELLS (1985).

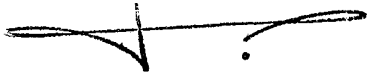
Como aqui usado, o termo "célula sanguínea periférica" refere-se a uma célula encontrada em circulação no sangue e refere-se geralmente a eosinófilos, neutrófilos (quer de banda, quer segmentados), basófilos, monócitos, trombócitos, eritrócitos, linfócitos e plasmócitos.

Como aqui usado, o termo "leucócito", refere-se a um grupo heterogéneo de tipos de células sanguíneas que inclui tudo excepto eritrócitos e plaquetas.

Como aqui usado, o termo "linfócito" refere-se a uma célula esférica, de 6-12 μ m de diâmetro, envolvida em respostas imunes, com um núcleo largo, redondo, e profundamente corado, e muito pouco citoplasma. Os linfócitos incluem os linfócitos B e os linfócitos T.

Como aqui usado, "linfócitos B" são células sanguíneas brancas de vertebrados, as quais, quando maduras, estão envolvidas na produção de anticorpos. Linfócitos B virgens e maduros (i.e., aqueles que ainda não encontraram o antígeno) são caracterizados pela presença dos seguintes receptores superficiais: receptores IgM monoméricos para o antígeno, receptores Fc para o IgG, e receptores para a forma activada do componente C3b do complemento.

Os linfócitos B percursores carecem de produtos da imunoglobulina, mas podem expressar outras moléculas características que podem ser identificadas por anticorpos monoclonais específicos. Estas células dividem-se e sofrem uma transição rápida, para se tornarem grandes linfoblastos com cadeias pesadas u citoplasmáticas, mas nenhuma cadeia leve. O fenótipo da célula pré-B (cadeia u citoplasmática ⁺, cadeia leve



, superfície Ig⁻) pode primeiro ser demonstrado em linfoblastos activamente envolvidos na síntese do DNA. As células humanas pré-B expressam moléculas HLA-DR na sua superfície e podem também expressar receptores para o fragmento complementar C3b. No entanto, faltam-lhes receptores Fc para o IgG e tem muito poucos receptores C3d/EBV. Os linfócitos B percursores podem também ser reconhecidos pela sua capacidade para ligar aglutinina de amendoim.

Linfócitos B maduros podem estar quer activados ou em repouso. As células B activadas exprimem vários tipos de moléculas que não são detectadas nas células B em repouso. Estas moléculas marcadoras são conhecidas pelos peritos no ramo, e incluem, por exemplo, receptores de interleucina-2 (IL-2), receptores de transferrina (os últimos são expressos por todas as células em divisão). A activação de células B provoca a perda da membrana IgD e ambos os receptores, Fc_T e C3b, são diminuídos nas membranas externas, enquanto que aqueles para o Virus C3d/Epstein Barr (EB)V não são significativamente afectados.

Após a estimulação antigénica ou mitogénica, os linfócitos B podem seguir ao longo de dois ramos de vias de uma diferenciação. Podem diferenciar-se em células de plasma ou podem dividir-se e retornar a um estado de repouso como células B de memória. As células B memória tiveram uma perda de IgD durante a activação; esta molécula não é re-sintetizada por células entrando no "pool" de células-memória.

"Células de plasma" são linfócitos B terminalmente diferenciados. Estas células têm forma ovoide, com um núcleo de espiral excêntrica e citoplasma intensamente basofílico. Quando



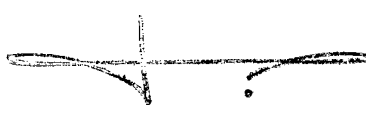
misturados com anticorpos corados com fluorocromo, para determinantes de imunoglobulina, as células de plasma imobilizadas apresentam fluorescência intensa através do seu citoplasma. Imunoglobulina ligada à membrana e moléculas DR são raras e os receptores de Fc_γ , C3b, C3d ou EBV são geralmente indetectáveis.

Um "plasmoblasto" é quer morfológicamente, quer funcionalmente, um intermédio entre um linfócito activado (também designado linfoblasto B) e os estágios de células de plasma. As células são grandes, com uma maior razão nuclear:citoplasmática que as células do plasma. As imunoglobinas ligadas à membrana e os receptores Fc_γ estão geralmente presentes.

Como aqui usado, um "linfócito T" é uma célula derivada do timo, que pode participar numa variedade de respostas imunitárias mediadas por células. Existe uma variedade de tipos de linfócitos T, que são distinguíveis pela sua função e pelos seus marcadores de superfície celular. Métodos para a distinção entre as classes de linfócitos T que incluem os do "auxiliar" T e do "supressor" T são conhecidos na técnica. Por exemplo, anticorpos monoclonais podem ser utilizados para detectar antígenos da superfície celular, incluindo antígenos CD (diferenciadores de aglomerados). Os tipos de células T marcados com antígenos CD e anticorpos monoclonais, que detectam os antígenos específicos, são apresentados na Tabela 1.

TABELA 1

Tipo de Células Marcadas	Designação CD	Designação do Anticorpo	Comentários
timócitos corticais	CD1	Leu 6 OKT 6	Antígenos de células T jovens também presentes em células Langerhans, associadas com beta ₂ - microglobulina, não presentes em células T periféricas
Células formadoras de envólucro E	CD2	Leu 5 OKT 11 T11	Antigene SRBC de células Pan-T receptor em células T
Células T maduras	CD3	Leu 4	Também presentes em células T ALL e células T cutâneas do linfoma
Células T indutoras/ auxiliares	CD4	Leu 3 OKT 4 T4	Podem ainda ser divididas em sub- -conjuntos auxiliar e indutor
Sub-população de Células Pan-T e -B	CD5	Leu 1 T1 T101 OKT1	Célula B CLL Células B seguindo transplante de medula
Sub-população de Células T e B maduras	CD6	T12	Células T malignas
Células Pan-T, Timócitos	CD7	Leu 9 3A1	Células T leucémicas
Células T Supressoras/citotóxicas	CD8	Leu 2 OHT 8 T8	Podem ainda ser divididas em sub- conjuntos citotóxicos e supressores



Como aqui usado, "grande linfócito granular" (LGL), também designado células assassinas naturais (NK), são outro tipo de linfócito. Estas células compreendem uma população discreta de grandes linfócitos que podem ser distinguidas por características morfológicas, por exemplo, grânulos de características azurofilicas no seu citoplasma. Adicionalmente, os LGL podem ser identificados por métodos que utilizam anticorpos monoclonais específicos. Existem vários anticorpos monoclonais disponíveis para detectar quer receptores Fc (Leu 11) , quer antígenos de diferenciação específica (Leu 7, HNK-1, NKH-1, NKH-2), presentes nestas células. Algumas células LGL exprimem também antígenos da família de células CD2 T. Métodos para testes funcionais são também conhecidos na arte, e são baseados na capacidade destas células não imunes para matar células alvo especiais, por exemplo, a linha de células eritroleucemia K562. Métodos para medição da citotoxicidade são conhecidos na arte, e incluem por exemplo, o ensaio de descarga de ^{51}Cr .

Como aqui usado, "monócitos" diz respeito a grandes células sanguíneas de agranulócitos leucocíticos que são fagocíticas. Nos humanos, estas células têm aproximadamente 10-12 μm de diâmetro, com um núcleo oval. Os monócitos que estão em tecidos são conhecidos por macrófagos. Os monócitos/macrófagos podem ser identificados pela sua morfologia. São maiores que os granulócitos e a maior parte dos linfócitos. Têm um núcleo redondo ou em forma de rim, com grânulos finos e levemente manchados. Podem ser detectados com coloração para a sua esterase não-específica, ou esterase alfa-natólica. Anticorpos monoclonais dirigidos a antígenos de diferenciação específica encontram-se

também disponíveis e incluem por exemplo, Leu M3 e OKT M1. O termo "monócitos" inclui monoblastos e promonócitos. As células do sistema de fagócitos mononucleares, e a sua localização é apresentada na Tabela 2; métodos para distinguir tipos celulares são discutidos em BASIC & CLINICAL IMMUNOLOGY, 6a edição.

Tabela 2

Células do Sistema de Fagócitos Mononucleares*

Células	Localização
Stem Cells (envolvidas)	Medula óssea
Monoblastos	Medula óssea
Promonócitos	Medula óssea
Monócitos	Medula óssea
Macrófagos	Tecidos
Histócitos livres, estado normal	Tecidos conjuntivos
Macrófagos alveolares	Pulmões
Macrófagos pleurais e peritoneais	Cavidades serosas
Células de Kupffer imobilizadas, estado normal	Fígado
Osteoclastos	Osso
Células microgliais	Sistema nervoso
Células sinoviais do tipo A	Articulações
Macrófagos de tecido imobilizado	Baço, nódulos linfáticos, medula óssea e outros tecidos
Inflamação	
Macrófagos de exsudato	Qualquer tecido
Macrófagos activados	Qualquer tecido
Macrófagos deduzidos	Qualquer tecido
Células epiteloides	Qualquer tecido
Células gigantes multinucleadas (tipos Langerhans e tipo corpo estranho)	Qualquer tecido

* Adaptado de Van Furth R (editor): Mononuclear Phagocytes: Functional Aspects, Martinus Nijhoff, 1980.

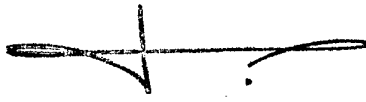


Como aqui usado , o termo "granulócito" refere-se a um leucócito polimorfonuclear que contém muitos granulos citoplasmáticos e um núcleo de múltiplos lóbulos. Os granulócitos incluem neutrófilos, eosinófilos e. Os neutrófilos são ameboides na forma, fagocíticos, e coram com corantes, quer ácidos, quer básicos. Os eosinófilos e os basófilos contém grânulos citoplasmáticos que coram com corantes ácidos e com corantes básicos, rsepectivamente.

As "células da medula óssea" incluem quer o tecido de medula óssea primário, quer as linhas de células de medula óssea dos mamíferos, tais como primatas e humanos. Métodos para se fazer culturas de células de medula óssea primária in vitro são conhecidos, bem como linhas de células da medula óssea, como por exemplo IM-9, KG-1 e KG-1a. Veja-se, e.g., ATCC CATALOG, supra na página 361. As células de medula óssea primárias incluem, para além dos leucócitos e linfócitos descritos noutra local desta patente, células progenitoras tais como stem cells. Veja-se, e.g., Patente Norte Americana No. 4.714.680, de Civin.

II. Descrição da Invenção

A invenção aqui descrita permite a replicação de HCV em linhas de células. Num método da invenção, células sanguíneas periféricas que estão infectadas com viriões replicativos são detectadas. Preferencialmente, a detecção é conseguida por identificação de intermediários replicativos do genoma viral em preparações contendo células infectadas com HCV. Alternativamente, os viriões podem ser detectados por uso de imunoensaios para detectar a população de células infectadas com



HCV. As linhas de células infectadas com HCV são preparadas; estas linhas de células são normalmente derivadas de células sanguíneas ou dos seus precursores, mais usualmente são derivadas de células mononucleares ou dos seus precursores. A preparação da linha de células infectadas pode ser conseguida por uma variedade de métodos, incluindo os seguintes. Uma opção é cultivar células susceptíveis com fluidos de cultura concentrados, colhidos de culturas primárias de células de curta duração que estão a replicar o vírus. Outra opção é infectar directamente células susceptíveis com partículas isoladas de HCV. Ainda uma outra opção é fazer crescer células susceptíveis em contacto com células infectadas com HCV. As células susceptíveis podem ser de uma linha de células estabelecida ou podem ser culturas primárias. Alternativamente, células infectadas de um indivíduo com HCV podem ser fundidas com células estabelecidas de uma linha de células para produzir uma linha de células permanente. Ainda alternativamente, células sanguíneas infectadas com HCV isoladas de um indivíduo podem ser imortalizadas. Os viriões produzidos nas linhas de células infectadas com HCV são úteis em imunoensaios para a detecção de anticorpos anti-HCV, e como substracto para a produção de vacinas para o tratamento de HCV.

A prática da presente invenção irá empregar, excepto quando de outro modo indicado, técnicas convencionais de biologia molecular, microbiologia, hematologia, cultura de órgãos e células, DNA recombinante, e imunologia, que estão dentro do âmbito desta técnica. Tais técnicas são explicadas inteiramente na literatura. Veja-se, e.g., ATCC CATALOG OF CELL LINES & HIBRIDOMAS, 6ª edição 1988 (American Type Culture Collection,



Rockville, Md.), BASIC & CLINICAL IMMUNOLOGY, 6ª edição (Stites, Stobo e Wells, eds., Appleton e Lange, Norwalk Conn/Los Altos, Ca, 1987); Boggs e Winkelstein, WHITE CELL MANUAL, edição 4 (F.A. Davies Co., Phila., 1983); Diggs, Sturm e Bell (1985), THE MORPHOLOGY OF HUMAN BLOOD CELLS (Abbott Laboratories, Abbott Parque, Il.); Freshney (1987), CULTURE OF ANIMAL CELLS: A MANUAL OF BASIC TECHNIQUE (Alan R. Liss, Inc., N.Y.); Maniatis, Fitch & Sambrook, MOLECULAR CLONING; A LABORATORY MANUAL (1982); DNA CLONING, VOLUMES I E II (D.N. Glover ed. 1985); LYMPHOKINES AND INTERFERONS: A PRACTICAL APPROACH (Clemens, Morris e Gearing, eds., 1987); LYMPHOCYTES: A PRACTICAL APPROACH (Klaus, ed., 1987); VIROLOGY: A PRACTICAL APPROACH (Mahy, ed., 1985); OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS (M.J. Hames & S.J. Higgins, eds., 1984); NUCLEIC ACID HYBRIDIZATION (B. D. Hames & S.J. Higgins Eds, 1984); IMMOBILIZED CELLS AND ENZYMES (IRL Press, 1986); B. Perbal, A PRACTICAL GUIDE TO MOLECULAR CLONING (1984); as séries, METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.); GENE TRANSFER VECTORS FOR MAMMALIAN CELLS (J.H. Miller e M.P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory), Methods in Enzymology Vol.154 e Vol.155 (Wu e Grossman, e Wu, eds., respectivamente), Mayer e Walker, eds., (1987), IMMUNOCHEMICAL METHODS IN CELL AND MOLECULAR BIOLOGY (Academic Press, London), Scopes (1987), PROTEIN PURIFICATION: PRINCIPLES AND PRACTICE, Segunda Edição (Springer-Verlag, N.Y.) e HANDBOOK OF EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY, VOLUMES I-IV (D.M. Weir e C.C. Blackwell eds., 1986). Todas as patentes, Pedidos das patentes e publicações aqui mencionados, tanto supra, como infra, estão aqui incorporadas por referência.

II.A. Detecção e Isolamento de Células Infectadas com

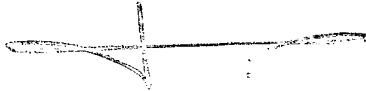


HCV de um Indivíduo

Células infectadas com HCV em amostras biológicas são monitorizadas para a presença de polipeptídeos de HCV ou polinucleotídeos de HCV. Usualmente, as amostras biológicas são amostras de sangue, a partir das quais as células infectadas com HCV e/ou HCV em replicação são isoladas e parcialmente purificadas utilizando técnicas conhecidas na arte, por exemplo, por sedimentação através de soluções Ficoll-Paque (Pharmacia Corp.).

A técnica de monitorização usada para detectar material viral deve ser suficientemente sensível para detectar quantidades muito reduzidas. Por exemplo, a presença de vírus pode ser detectada por imunoensaios, usando anticorpos dirigidos contra um polipeptídeo do vírus. Um anticorpo apropriado é descrito na Patente Norte Americana No. de Série 355.002 (Attorney Docket No. 2300-0063.28) depositada em 18 de Maio de 1989. Métodos para os imunoensaios, bem como métodos para o incremento do sinal são conhecidos na arte.

O material genómico do HCV e intermediários replicativos do mesmo podem também ser detectados por hibridização dos ácidos nucleicos. Usualmente o sistema envolverá técnicas de amplificação no ensaio de hibridização. Tais técnicas são conhecidas na arte. Por exemplo, o sistema "Bio-Bridge" da Enzo Biochemical Corporation usa a desoxinucleotídeo transferase terminal, para adicionar caudas 3'-poli-dT não modificadas a uma sonda de DNA. A sonda de caudas poli-dT é hibridizada para a sequência de nucleotídeos alvo e, em seguida, a uma poli-A de biotina modificada. O Pedido PCT 85/03520 e a EPA 124221



descrevem o ensaio de hibridização do DNA, no qual: (1) o analito é emparelhado para uma sonda de DNA de cadeia simples que é complementar a um oligonucleotideo marcado por enzima, e (2) o duplex de cauda resultante é hibridizado a um oligonucleotideo marcado por enzima. A EPA 204510 decreve um ensaio de hibridização de DNA, no qual o analito de DNA é contactado por uma sonda que tem uma cauda, como uma cauda poli-dT, uma cadeia amplificadora que tem uma sequência que hibridiza a cauda da sonda, como uma sequência poli-A, a qual é capaz de se ligar a uma pluralidade cadeias marcadas. Uma técnica particularmente desejável, pode envolver primeiro a amplificação das sequências HCV alvo em soros até que as sequências amplificadas estejam a um nível detectável. Isto pode ser conseguido, por exemplo, pelas reacções da cadeia de polimerase (PCR), técnica descrita por Saiki et al. (1986), por Mullis, Patente Norte Americana No. 4.683.195 e por Mullis et al., Patente Norte Americana No. 4.683.202. A(s) sequência(s) amplificada(s) pode(m) então ser detectadas usando um ensaio de hibridização, o qual é descrito nas Patentes co-pendentes dos Estados Unidos, No. de série 109.282 (Attorney Docket No. 2300-0171) depositado a 15 de Outubro 1987, No. de série 185.201 (depositada em 22 de Abril de 1988), e No. de série No. 252.638 (depositado em 30 de Setembro de 1988), que são propriedade da presente cessionária e incorporadas para referência. Estes ensaios de hibridização, os quais deveriam detectar sequências a um nível de 10^6 /ml, utilizam multimeros de ácidos nucleicos que se ligam a um analito de ácido nucleico de cadeia simples, e que se ligam também a uma multiplicidade de oligonucleotideos de cadeia simples marcados. Um ensaio de sandwich da fase de solução

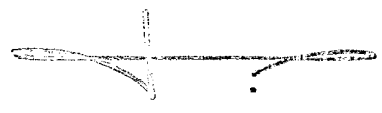


apropriado , que pode ser usado com sondas de polinucleotídeos marcados, e os métodos para a preparação das sondas é descrito na EPO 225.807, publicada a 16 de Junho de 1987, a qual é transferida para a presente cessionária e que é aqui incorporada para referência.

Um método preferido para a detecção de sequências genómicas de HCV é descrito nos Exemplos. Este método é baseado num método HCV/cPCR descrito na Patente Norte Americana (Attorney Docket 2300-0063.27), depositada em 18 de Maio de 1989, que é comumente possuída pela presente cessionária e que é aqui incorporada para referência. O método utiliza primers e sondas baseados numa família de réplicas de cDNA de porções do genoma do HCV; uma sequência composta de cDNA de cadeia mais, derivada desta família de cDNA's é apresentada na Figura 1. O primeiro passo no método é a síntese de um cDNA, quer para o genoma do HCV, ou do seu intermediário replicativo, usando uma transcriptase reversa. Se o intermediário replicativo for detectado, o primer é complementar apenas com a cadeia negativa do RNA do HCV (i.e., a cadeia que é o intermediário replicativo). Após a síntese do cDNA do HCV, e antes da amplificação, o RNA na amostra é degradado por técnicas conhecidas na arte, por exemplo, por desnaturação alcalina, ou por tratamento com uma RNase específica do RNA.

Prevê-se que diferentes estirpes cadeias de HCV estarão presentes nas células infectadas de vários indivíduos. Por isso, os métodos de detecção deverão ser dirigidos epitopos ou sequências genómicas do HCV constantes.

Utilizando o método HCV/cPCR para monitorizar fracções



de células sanguíneas separadas por Ficoll-Paque, intermediários replicativos do genoma de HCV foram detectados numa composição parcialmente purificada de células derivadas do sangue periférico (veja-se infra nos Exemplos).

Esta composição é compreendida por linfócitos, monócitos/macrófagos, plaquetas, e pequenas quantidades de outros tipos de células sanguíneas brancas. A sedimentação através de Ficoll-Paque fracciona estas células, que se ligam à interface de eritrócitos e granulócitos, que são de maior densidade.

A posterior identificação dos tipos de células infectadas, pode ser conseguida por utilização de técnicas conhecidas na arte, por exemplo, por imunoensaios, que se destinam a distinguir os vários tipos de células sanguíneas. Anticorpos monoclonais que se dirigem a epitopos de superfície em vários linfócitos e monócitos/macrófagos são conhecidos na arte. Assim, células infectadas com HCV podem ser isoladas e identificadas por ligações imunológicas a antígenos de superfície específicos da célula.

II.B. Preparação de Sistemas Celulares Infectados in vitro

Uma variedade de métodos pode ser usada para preparar células in vitro, incluindo linhas de células infectadas com HCV. Células candidatas para a propagação e infecção in vitro podem ser de qualquer um dos tipos de células acima mencionados, tais como linfócitos ou células da medula óssea. A descoberta de que intermediários replicativos do genoma do HCV estão presentes nos leucócitos do sangue periférico de humanos infectados, é indicativo do tipo celular que pode suportar a replicação viral



in vitro, i.e., em pelo menos um dos tipos celulares da população de leucócitos, cuja banda na interface de uma suspensão de leucócitos, é sedimentada através de Ficoll-Paque, i.e., mononucleócitos (este procedimento geralmente remove os eritrócitos e granulócitos normais das amostras de sangue periféricos). Posteriores procedimentos de fraccionamento podem ser usados para separar os diferentes tipos de mononucleócitos, para determinar a presença de intermediários replicativos de HCV e/ou antígenos de HCV associados a este tipo de células. Procedimentos para separação dos diferentes tipos de monócitos, e.g., linfócitos e macrófagos, são conhecidos na arte. Veja-se, e.g., LYMPHOCYTES: A PRACTICAL APPROACH (Klaus, ed.). Estes procedimentos podem utilizar anticorpos monoclonais dirigidos a tipos celulares específicos; os anticorpos monoclonais podem ser afixados a substratos sólidos, e.g., placas com poços ou leitos magnéticos. Alternativamente, técnicas de selecção, que dependem de instrumentos de selecção de células, podem ser usadas. A selecção pode ser quer positiva, quer negativa, para enriquecer e/ou seleccionar as células desejadas na população de mononucleócitos. Com base nos estudos de fraccionamento que isolaram linfócitos e macrófagos da população de monócitos, sugere-se que o tipo celular preferido para a replicação sejam os linfócitos, e/ou macrófagos/monócitos.

Dado que a replicação do HCV ocorre dentro dos mononucleócitos in vivo, espera-se que linhas de células infectadas possam ser derivadas das conhecidas linhas celulares estabelecidas destes tipos, muitas das quais estão disponíveis na American Type Culture Collection, e as quais podem incluir, por



exemplo, linhas de células B (e.g., linhas derivadas de células B transformadas em EBV, tais como B95-8, DAIKIKI, LTR228, Mo-B, SC-1, WIL2-NS; linhas de células B tais como Ia2, BL-3, UC 729-6, Namalwa, U-937, Ramos (RA-1), BCL₁ clone do 5B₁b, MC/CAR, IA2, YB2/0, CA3-F4, SHM-D33, CW13.20-3B3, BC9-E%, WN-115, WN 266-4, WEHI-231, WEHI-279, NFS-1.0 C-1); linhas de monócitos (e.g., THP-1, WEHI-274.1), linhas de linfoma de ratos (e.g., 2.pq-3), linfoblastos pro-B (e.g., NFS-70 C-10), linfoblastos pré-B (e.g., NFS-25 C-3), linhas derivadas de células T (e.g., CTLL-2, HuT 102, D10.G4.1, o clone LBRN-33 de 4A2, HuT78, Cl.Ly1⁺2⁻, UCD-MLA-144, 6T-CEM 20, 6T-CEM, CCRF-CEM, H9/HTLV-III_B, CCRF-SB, CCRF-HSB-2, CEM-CM3, Mo, MOLT-3, MOLT-4, BW5147.3, BW5147.G.1.4, C1498, RAW8.1, CTLL-2 e BW5147.G.1.4.OUA^R.1). Linhas de células humanas leucémicas adicionais de interesse incluem K562 e ARH-77. Condições para a cultura *in vitro* destas células são descritas em ATCC CATALOG OF CELL LINES AND HIBRIDOMAS, 6ª Edição, 1988.

Outro tipo de sistema celular no qual o HCV pode replicar *in vitro*, encontra-se em culturas primárias dos tipos celulares de células que são infectadas com HCV *in vivo*. Culturas primárias, como aqui usado, refere-se a uma cultura de células que é directamente derivada das células ou tecidos de um indivíduo, bem como, a células derivadas pela passagem destas células, mas não a células imortalizadas. Métodos para preparar culturas primárias, particularmente de mononucleócitos, e as condições para o seu crescimento *in vitro* são conhecidos na arte (veja-se, por exemplo, LYMPHOCYTES: A PRACTICAL APPROACH (Klaus, ed.), particularmente Hunt (1987) e Freshney (1987)). Geralmente, macrofagos maduros normais não proliferam; no entanto células



replicativas precursoras de macrofagos podem ser cultivadas por técnicas conhecidas na arte. Veja-se por exemplo, Freshney (1987), pp. 284-287.

Ainda um outro tipo de sistema celular no qual o HCV pode ser replicado encontra-se em linhas de células imortalizadas derivadas de culturas primárias de mononucleócitos. Métodos para obter linhas de células imortalizadas de tipos de mononucleócitos são conhecidos na arte. Por exemplo, métodos para crescimento e imortalização de células B, células T e macrófagos em cultura são descritos em LYMPHOCYTES: A PRACTICAL APPROACH (Klaus, ed.); LYMPHOKINES AND INTERFERONS (Clemens, Morris e Gearing, eds.) e Freshney (1987). Por exemplo, linhas de células B são normalmente imortalizadas por infecção com o vírus de Epstein-Barr (EBV). Isto pode ser conseguido pela incubação de mononucleócitos de células infectadas com o sobrenadante de uma linha de células infectada com EBV, que é um derramador crónico de EBV, por exemplo, células ATCC CRL 1612 (B95-8).

O crescimento de mononucleócitos em cultura requer frequentemente a presença de factores proteicos estimuladores (também chamados citoquinas) no meio de cultura; estes factores são normalmente produzidos por outro tipo de células. Um fornecimento de citoquinas pode ser proporcionado em meio condicionado, i.e., sobrenadantes de culturas celulares de células que produzem os factores desejados, ou pode também ser fornecido por células de alimentação. O suprimento pode também ser conseguido por provisão das citoquinas purificadas. As citoquinas incluem, por exemplo, as seguintes: interleuquina 1-- alfa e beta (também chamados factores de activação dos

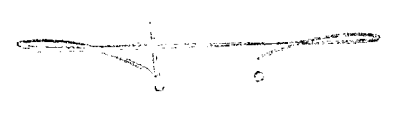


linfócitos, factores de activação de timócitos derivados de células epidérmicas e hemapoiéticas H1); estas linfoquinas são derivadas de tipos celulares múltiplos, incluindo monócitos, linfócitos e queratinócitos. A Interleuquina 1-alfa e beta têm acções múltiplas, incluindo estimulação da produção da interleuquina 2 e da actividade hematopoiética. A interleuquina 2 (também conhecida por factor de crescimento das células T), derivada dos linfócitos T, e que estimula a diferenciação e proliferação das células B e T, activação de macrófagos, e activação de células assassinas naturais. A interleuquina 3 (também conhecida por Multi-CSF), a qual é derivada dos linfócitos T, e que tem um efeito pluripotente no crescimento e diferenciação, e estimula o crescimento de mastócitos. A interleuquina 4 (também chamada factor I de crescimento de células B), a qual é derivada dos linfócitos T, e estimula a proliferação e diferenciação de células B e T. A interleuquina 5 (também chamada factor II de crescimento de células B), a qual é derivada dos linfócitos T e que estimula a diferenciação de eosinófilos (e a qual, nos sistemas dos ratos actua como factor de crescimento de células B). O factor de crescimento de células B de baixo peso molecular, o qual é derivado dos linfócitos T e que estimula a proliferação das células B. O factor 2 de estimulação das células B (também chamado Beta-2 interferão), e o qual é derivado dos linfócitos-T, e que estimula a diferenciação de células B. O interferão- τ (também conhecido por interferão da imunidade), o qual é produzido pelos linfócitos T e que activa macrófagos. O factor de estimulação de colónias de granulócitos o qual é derivado de vários tipos celulares e que estimula o

crescimento e diferenciação dos granulócitos. O factor de estimulação de colónias de macrófagos (CSF 1), o qual é derivado de vários tipos celulares e que estimula o crescimento e diferenciação de monócitos/macrófagos. Factor de estimulação de colónias de granulócitos macrófagos, o qual é derivado de vários tipos celulares e que estimula o crescimento e diferenciação de monócitos/granulócitos.

A infecção de linhas de células susceptíveis com o HCV, pode ser conseguida por qualquer uma das várias técnicas usadas na arte para infectar células com vírus, particularmente com um vírus de RNA e mais particularmente com um Flavivirus. Geralmente, partículas de vírus absorvem células cultivadas a temperaturas fisiológicas. O vírus penetra, descapsula, replica o seu ácido nucleico no núcleo ou citoplasma, e, após transcrição e tradução, prepara viriões da progénie, os quais egressam ou por lise da célula ou por rebentamento. O número de partículas de vírus da progénie libertados de uma célula é referido como dimensão do irrompimento. O vírus é titulado por diluições décuplas de absorção serial para células, e contando as placas resultantes após incubação apropriada a temperatura permissiva.

A infecção viral de células susceptíveis pode ser conseguida por co-cultivo das células susceptíveis e de células infectadas com HCV. As células infectadas com HCV podem ser de uma cultura primária. Usualmente, as células infectadas com HCV e as células primárias são incubadas conjuntamente em números aproximadamente iguais, em meios de cultura apropriados. O meio pode conter Polibreno ou uma substância funcionalmente similar na concentração apropriada. A incubação é de tempo suficiente e a



temperatura apropriada para permitir que os virus replicados de fresco, das células infectadas com HCV, permitam a união e levantamento por células susceptíveis.

A infecção de células susceptíveis pode também ser conseguida usando sobrenadantes livres de células contendo virus de células infectadas com HCV. Geralmente as células susceptíveis são pré-tratadas com uma concentração apropriada de Polibreno (ou uma substância funcionalmente similar), e então expostas a fluidos de cultura concentrados colhidos de culturas primárias de curta duração de células infectadas com HCV derivadas de indivíduos infectados.

As células susceptíveis podem também ser infectadas com virus isolados de amostras biológicas contendo HCV. Métodos apropriados para o isolamento de virus, particularmente virus contendo RNA, e mais particularmente Togavirus e Flavivirus são conhecidos na arte, veja-se por exemplo, VIROLOGY: A PRACTICAL APPROACH (Mahy, ed.). Também são aí descritas células que podem ser apropriadas para infecção e condições de crescimento destas células.

Outro método de preparar células infectadas com HCV in vitro pode ser por fusão de células mononucleares infectadas com HCV com células susceptíveis. Métodos para a fusão de células somáticas são conhecidas na arte, como são os métodos para a selecção de células fundidas. Por exemplo, a fusão pode ser catalizada pela presença de virus, e.g., virus EBV, virus de Sendai e similares, ou pela presença de produtos químicos, e.g., polietilenoglicol que induzem a fusão. A célula susceptível pode transportar um marcador que evita o seu crescimento no meio



selecção, e.g., as células podem ser fenotipicamente negativas para a quinase da timidina. A selecção é então feita num meio que requer a quinase da timidina, e.g., meio HAT. Este método é particularmente apropriado se as células mononucleares infectadas com HCV isoladas do indivíduo infectado não replicarem in vitro. Um método apropriado para a preparação de células fundidas, que podem replicar o HCV, é descrito na WO 87/05930, exceptuando o facto de a célula específica de tecido (reportadamente um hepatócito), que é usado para formar o trioma, é substituído por um monócito infectado com HCV.

Ainda um outro método de preparar uma linha de células infectadas com HCV, é através da imortalização de células infectadas, isoladas de um indivíduo infectado com HCV. Geralmente, células mononucleares são isoladas do sangue periférico. Se desejado, a população de células mononucleares pode ser posteriormente fraccionada. As células são então desenvolvidas em cultura primária. A imortalização pode ser conseguida por crescimento e passagem das células através de períodos de crise celular, nos quais a maioria das células morre; as células resultantes são imortais. Métodos alternativos para a produção de células T, células B e macrófagos imortais, estão descritos supra.

A replicação de HCV em linhas de células infectadas com HCV, preparadas como descrito supra, pode ser detectada por uma variedade de ensaios. Por exemplo, ensaios virais podem depender das características citopáticas ou de transformação do vírus. Vírus citopáticos podem ser analisados pelos seus efeitos antimetabólicos nas placas de microtitulação, ou pela formação de

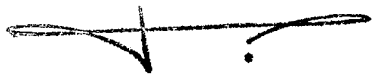


placas características em monocamadas da célula hospedeira susceptível apropriada. Uma suspensão viral é diluída serialmente e adicionada às placas de cultura em monocamada. O número de placas que se formam na diluição limite é tomado como equivalente ao número de partículas infecciosas no meio sobrenadante, permitindo que a concentração de vírus na amostra inicial seja calculada. A caracterização do vírus pode ser feita com antisoros específicos, medindo o efeito citopático do vírus, por imunoensaio ou pelo ensaio cPCR/HCV, para o RNA de HCV descrito supra.

Os vírus em transformação podem ser analisados, por exemplo, pelo crescimento selectivo de clones transformados em suspensão ou por procura de focos de transformação nas culturas em monocamada.

No caso do vírus de interesse não exibir nem um efeito citopático detectável, nem um efeito de transformação, pode ser detectado na preparação de células infectadas ou no lisado de células infectadas, por uma quantidade de técnicas que incluem, por exemplo, imunoensaio usando um anticorpo(s) marcado(s) que seja específico do vírus, imunoensaio de polipeptídeos marcados durante a replicação usando anticorpos anti-HCV, e detecção de ácidos nucleicos virais, por exemplo, uma população enriquecida de cadeias negativas complementares às cadeias virais positivas, ou de ácidos nucleicos virais marcados durante o período de síntese viral in vitro.

II.C. Imunoensaios Utilizando Antígenos de HCV de Células



Infectadas

Os antígenos de HCV de células infectadas, as quais reagem imunologicamente com soro contendo anticorpos HCV, são úteis em imunoensaios para detectar a presença de anticorpos de HCV em amostras biológicas. Os antígenos de HCV podem tomar a forma inter alia, partículas virais ou polipeptídeos virais purificados ou parcialmente purificados, fragmentos de vírus, ou células infectadas ou lisados celulares daí provenientes. A produção de várias formas de antígenos virais a partir de fontes de culturas de tecidos é bem conhecida na arte. A projecção de imunoensaios está sujeita a uma grande variação, variação essa que é conhecida na arte. Por exemplo, um imunoensaio pode usar uma combinação de epitópos virais derivados de um mesmo ou de polipeptídeos virais diferentes. Pode ser usado, por exemplo, um ou mais antígenos virais isolados das células infectadas com HCV ou de HCV isolado. Alternativamente, células imobilizadas directamente da cultura podem ser usadas se os epitópos virais são expressos interna ou externamente, ou alternativamente, lisados celulares podem ser usados. Podem também usar-se, por exemplo, viriões completamente eclodidos. Métodos gerais para a preparação de viriões eclodidos são conhecidos na arte.

Os protocolos de imunoensaio podem variar. Os protocolos podem ser baseados, por exemplo, em competição ou reacção directa, ou ensaios do tipo sandwich . Os protocolos podem também, por exemplo, usar suportes sólidos ou podem ser por imuno precipitação. A maior parte dos ensaios envolve o uso de anticorpos ou polipeptídeos marcados; as marcações podem ser, por exemplo, fluorescentes, quimiluminiscentes, radioactivas ou

moléculas corantes. Ensaaios que amplificam os sinais da sonda são também conhecidos; exemplos dos mesmos são ensaios que usam biotina e avidina, e enzimas marcadas imunoensaaios mediados, tais como os ensaios ELISA.

Um imunoensaio apropriado pode utilizar viriões eclodidos num formato ELISA. O método de ensaios de imunoabsorventes de enzima ligada (ELISA), depende da conjugação de uma enzima quer a um antigene quer a um anticorpo, e usa a actividade da enzima ligada como uma marca quantitativa. Para a medição do anticorpo, o antigene conhecido é fixado numa fase sólida, (e.g., uma microplaca ou copo plástico), incubado com uma anti-imunoglobina marcada com a enzima e lavada de novo. Enzimas apropriadas para a marcação são conhecidas na arte e incluem, por exemplo, peroxidase de rábano selvagem. A ligação da actividade enzimática a uma fase sólida é medida adicionando um substrato específico e determinando a formação do produto ou substrato, por utilização colorimétrica. A ligação na actividade enzimática é uma função directa da quantidade de ligações do anticorpo.

Para medir antigenes, um anticorpo específico conhecido é fixado à fase sólida, o material do teste contendo antigene é adicionado, após uma incubação da fase sólida ser lavada e um segundo anticorpo marcado por enzima é adicionado. Após a lavagem, o substrato é adicionado e a actividade enzimática é estimada colorimetricamente e relacionada com a concentração de antigene.

Assim, por exemplo, para detectar anticorpos anti-HCV usando um formato ELISA, o HCV isolado, solubilizado, e.g., com detergente, pode ser usado para revestir placas microtituladoras

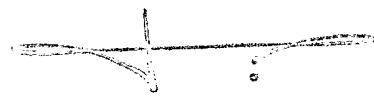
apropriadas. Após os antígenos virais estarem ligados, outra proteína é também usada para revestir as placas, para prevenir ligações não específicas de anticorpos. A amostra biológica a ser testada para anticorpos anti-HCV é adicionada às placas e a formação de complexos de anticorpos HCV-antígenos HCV é detectada.

Outro imunoensaio apropriado pode usar electroforese em gel de lisados de HCV, seguidos pela Western blotting com a amostra biológica a ser testada para anticorpos HCV. A formação de complexos de anticorpos HCV-antígenos HCV é detectada usando técnicas conhecidas na arte.

Kits adequados para imunodiagnósticos e contendo os reagentes marcados apropriados são construídos por empacotamento dos materiais apropriados, incluindo os antígenos derivados das células infectadas com HCV em recipientes apropriados, juntamente com os reagentes restantes e materiais necessários para a condução do ensaio, bem como um conjunto apropriado de instruções de ensaio.

II.D. O uso de Células Infectáveis na Monitorização de Agentes Antivirais

As células aqui descritas que são capazes de replicar o HCV, podem ser usadas para monitorizar agentes antivirais que inibem a replicação do HCV, e particularmente para aqueles agentes que permitem o crescimento e multiplicação celular enquanto inibem a replicação viral. Os métodos de monitorização que podem ser usados são aqueles que examinam a inibição da replicação do vírus, em presença de agentes antivirais putativos.



Geralmente, os agentes antivirais são testados a uma variedade de concentrações, quanto ao seu efeito na prevenção da replicação viral, num sistema de cultura de células que suporta a replicação viral, e quanto a uma inibição da infectividade ou patogenicidade viral (e um baixo nível de toxicidade), num sistema de modelo animal.

Incluídos nos agentes antivirais estão os anticorpos que bloqueiam a infecção viral (anticorpos neutralizantes). A capacidade de anticorpos anti-HCV impedirem a infecção de células in vitro pode ser determinada usando os ensaios aqui descritos para determinar se a replicação viral é inibida pela presença de anticorpos anti-HCV putativos. Também, por exemplo, vírus produzidos em células infectadas podem ser usados como uma fonte de antígenos para determinar se os anticorpos são específicos do HCV.

III. Exemplos

III.A. Deteção de RNA de HCV em Células Mononucleares de Indivíduos com NANBH

A deteção de RNA de HCV em células mononucleares de sangue de indivíduos com NANBH crónica foi conseguida usando essencialmente o ensaio cPCR/HCV descrito na Patente Norte Americana No de Série 07/355.961.

Sangue obtido de 5 indivíduos com NANBH crónica e de teste positivo para anticorpos anti-HCV, usando um imunoensaio de antígeno HCV-C100, e a partir de 5 indivíduos de controlo (reportadamente livres de NANBH o qual foi negativo no

imunoensaio) foi examinado quanto à presença de RNA de HCV na fracção mononuclear. Uma fracção de mononucleóscito das amostras foi obtida por sedimentação através de Ficoll-Paque (farmácia) seguindo as instruções do fabricante.

Os ensaios de cPCR/HCV usados nestes estudos foram efectuados usando os métodos seguintes para a preparação de RNA, a transcrição reversa do RNA a cDNA, a amplificação de segmentos específicos de cDNA por PCR, e a análise dos produtos de PCR.

O RNA total foi isolado da fracção de mononucleócito. O cDNA usado como padrão, para a reacção PCR, foi preparado usando as amostras designadas para a preparação dos cDNAs correspondentes. Cada amostra de RNA (correspondendo às células em 10 microlitros de sangue) foi incubada numa reacção de 25 microlitros contendo 1 micromolar de cada primer, 1 milimolar de cada desoxiribonucleótido trifosfato (dNTP), 50 milimolar de Tris-HCl, pH 8.3, 5 milimolar de MgCl₂, 5 milimolar de ditiotreitól (DTT), 73 milimolar de KCl, 40 unidades de inibidor RNase (RNASIN) e 5 unidades de transcriptase reversa AMV. A incubação foi 60 minutos a 37 °C. Seguidamente à síntese do cDNA, as reacções foram diluídas com 50 microlitros de água desionizada (DIW), fervidas durante 10 minutos e arrefecidas sobre gelo.

A amplificação de um segmento do cDNA do HCV foi efectuado usando 2 primers sintéticos de oligonucleotídeos de 16-meros cujas sequências foram derivadas do cDNA dos clones 36 do HCV (sentido anti) e 37b (sentido pró). A sequência do primer do clone 36 foi:

5' GCA TGT CAT GAT GTA T 3'.

A sequência do primer do clone 37b foi:

5' ACA ATA CGT GTG TCA C 3'.

Os primers foram usados a uma concentração final de um micromolar cada. Por forma a amplificar o segmento de cDNA de HCV que é rodeado pelos primers, as amostras de cDNA foram incubadas com 0,1 micrograma de RNase A e os reagentes PCR do kit Perkin Elmer Cetus (N801-0043 ou N801-0055), de acordo com as instruções do fabricante. A reacção PCR foi levada a cabo para 30 ou 60 ciclos, num ciclizador térmico Perkin Elmer Cetus de DNA. Cada ciclo consistiu de 1 minuto no passo de desnaturação a 94°C, um passo de emparelhamento de 2 minutos, a 37°C, e um passo de extensão de 3 minutos a 72 °C. No entanto, o passo de extensão no ciclo final (30 ou 60) foi 7 minutos em vez de 3 minutos. Após amplificação, as amostras foram extraídas com um volume igual de fenol: clorofórmio (1:1), seguido pela extracção de um volume igual de clorofórmio, sendo então as amostras precipitadas com etanol contendo 0,2 M de acetato de sódio.

Os produtos cPCR foram analisados como se segue: os produtos foram sujeitos a electroforese em gel de agarose alcalina 1,8%, de acordo com Muracawa et al. (1988) e transferido para um papel Zeta Probe (BioRad Corp.) por blotting dos geles durante a noite em NaOH 0,4 M. As manchas foram neutralizadas em 2 x SSC (1 x SSC contém 0,15 M de NaCl e 0,015 M de citrato de sódio), pré-hibridizadas em 0,3 M de HCl, 15 mM de tampão de fosfato de sódio, pH 6,8, 15 mM de EDTA, 1,0% de SDS, 0,5% de leite magro (Carnation Co.), e 0,5 mg/ml de DNA do esperma salmão desnaturado e sonificado. As manchas a ser analisadas para fragmentos de cDNA de HCV foram hibridizadas a uma sonda marcada de ³²P, gerada por tradução por corte da sequência inserida do

cDNA do HCV do clone 35, representado na Figura 2. Após hibridização, as manchas foram lavadas em 0,1 x SSC (1 x SSC contém 0,15 M de NaCl e 0,01M de citrato de sódio) a 65°C, secas e autoradiografadas. O tamanho esperado do produto é de 586 nucleótidos em comprimento; produtos que hibridizaram com a sonda e migraram no gel nesta gama de dimensões foram apontados como positivas para o RNA viral.

Como um controle, os primers cPCR escolhidos para amplificar o mRNA α 1-antitripsina foram utilizados para verificar a presença de RNA em cada amostra analisada. A região de codificação do gene α 1-antitripsina é descrita em Rosenberg et al. (1984). Primeros sintéticos de oligonucleotídeos de 16-mer, concebidos para amplificar um fragmento de 365 nucleótidos de uma região de codificação do gene α 1-antitripsina, foram derivados dos nucleótidos 22-37 (sentido pró) e dos nucleótidos 372-387 (sentido anti). Os produtos PCR foram detectados usando uma sonda traduzida por corte de ^{32}P que fica entre, e não inclui, as sequências de cDNA/PCR.

Devido à extrema sensibilidade da reacção PCR, todas as amostras foram experimentadas num mínimo de três vezes. Todos os sinais positivos falsos foram eliminados quando as precauções seguintes foram tomadas: 1) eliminação de aerossóis com tubos de tampa em rosca com selos de O-ring de borracha; 2) pipetagem com pipetadores de deslocamento positivo Ranin Microman com pistons/capilares substituíveis; e 3) selecção das sequências de oligonucleotídeos do cDNA e primers PCR dos dois clones de cDNA não contíguo.

Os resultados mostraram que mononucleócitos de 5 das



amostras positivas do anticorpo anti HCV-C100 foram positivas para o RNA de HCV, num ensaio de cPCR de HCV. Todos os controles foram negativos no mesmo ensaio.

III.B. Detecção de Cadeias RNA Minus de HCV em Mononucleócitos de Indivíduos Infectados com HCV

A detecção de cadeias minus em monócitos de sangue periférico foi conseguida usando um ensaio cPCR/HCV, essencialmente como descrito na Secção III.A., exceptuando o facto de o cDNA ter sido sintetizado usando o primer de 16-meros do clone 36 (i.e., primer 36/16A), descrito na Secção III.A. para começar a cadeia mais de RNA do HCV, ou complemento do primer de 16-meros (i.e., primer 36/16B), para começar a cadeia negativa. De forma a levar a cabo a reacção PCR subsequente, a mistura reaccional de cDNA foi fervida e tratada com RNase antes da adição do segundo primer.

Os resultados do ensaio cPCR/HCV mostraram que 5 das amostras dos anticorpos HCV anti-C100 foram positivas para cadeias negativas de HCV. Destas 5 amostras, 2 mostraram níveis elevados de cadeias negativas de RNA do HCV. Todas estas 5 amostras foram quase igualmente positivas para as cadeias mais de RNA de HCV. Das 5 amostras de controle todas foram negativas para ambas as cadeias mais e menos do RNA do HCV.

Como um controle adicional, amostras de plasma de três indivíduos positivos em HCV, foram também analisadas. O sinal obtido das cadeias positivas foi pelo menos 5 a 10 vezes mais forte que o sinal para as cadeias negativas. Assim, as amostras de plasma foram fortemente positivas para as cadeias mais e



apenas fracamente positivas a negativas para as cadeias menos.

No HCV, o qual é do tipo Flavi o genoma viral é de RNA de cadeia positiva. A descoberta do grande enriquecimento das cadeias negativas do RNA de HCV em monócitos relativamente às do plasma, sugere que intermediários replicativos do genoma viral estão presentes nestas células.

IV. Utilidade Comercial

Sistemas de células infectadas com HCV, as quais são infectadas e/ou replicadas in vitro, incluindo linhas de células infectadas com HCV, servem como uma fonte de antígenos virais os quais são úteis para a detecção de anticorpos de HCV, e por isso no diagnóstico e monitorização de materiais biológicos (incluindo sangue) para o HCV. Estes antígenos, podem também ter uso na preparação de vacinas (profiláticas e/ou terapêuticas), para o tratamento de infecções virais. Adicionalmente, estes sistemas celulares são úteis na monitorização de agentes antivirais destinados à prevenção da replicação de HCV, incluindo anticorpos que podem neutralizar a infecção ou mediar a citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC).

Enquanto a invenção foi descrita acima por via da ilustração, a presente invenção não está limitada à mesma e o seu âmbito deve ser definido pelas reivindicações anexas e pelos equivalentes das mesmas. Todas as referências citadas acima são aqui incorporadas por referência.



REIVINDICAÇÕES

1. Uma linha celular infectada com HCV.
2. Uma linha celular conforme reivindicado na reivindicação 1, na qual as células na linha celular são células mononucleares.
3. Uma linha celular conforme reivindicado na reivindicação 2, na qual as células mononucleares são linfócitos.
4. Uma linha celular conforme reivindicado na reivindicação 3, na qual os linfócitos são linfócitos B.
5. Uma linha celular conforme reivindicado na reivindicação 3, na qual os linfócitos são linfócitos T.
6. Uma linha celular conforme reivindicado na reivindicação 2, na qual as células mononucleares são células precursoras de macrófagos.
7. Uma linha celular conforme reivindicado na reivindicação 1, na qual as células são células mononucleares contendo um antígeno seleccionado do grupo de antígenos CD1, CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD7 e CD8.
8. Uma linha celular conforme reivindicado na reivindicação 1, na qual as células são células mononucleares seleccionadas do grupo que consiste de células do tronco derivadas da medula óssea, monoblastos, promonócitos, monócitos e macrófagos.
9. Uma linha celular conforme reivindicado na reivindicação 8, na qual os macrófagos são seleccionados do grupo que consiste de histócitos, macrófagos alveolares, macrófagos pleurais, macrófagos peritoneais, células de Kupffer,



osteoclastos, células sinoviais tipo A, macrófagos de tecido fixo, macrófagos de exsudatos, macrófagos activados, macrófagos elicitados, células epiteloideas e células precursoras a partir de que estas células são derivadas.

10. Uma linha celular conforme reivindicado na reivindicação 1, na qual as células são derivadas por infecção, de uma célula seleccionada do grupo de linhas celulares B95-8, DAKIKI, LTR228, Mo-B, SC1-1, WIL2-NSIa2, BL-3, UC 729-6, Namalwa, U-937, Ramos(RA-1), BCL₁ clone 5B₁b, MC/CAR, IA2, YB2/0, CA3-F4, SHM-D33, CW13.20-3B3, BC9-E%, WM-115, WM 266-4, WEHI-231, WEHI-279, NFS-1.0 C-1, THP-1, WEHI-274, 12pk-3, NFS-70 C-10, NFS-25 C-3, CTLL-2, HuT 102, D10.G4.1, LBRM-33 clone 4A2, HuT78, Cl.Ly1⁺2⁻/9, UCD-MLA-144, 6T-CEM 20, 6T-CEM, CCRF-CEM, H9/HTLV-IIIIB, CCRF-CEM, CCRF-HSB-2, CEM-CM3, Mo, MOLT-3, MOLT-4, BW5147.3, BW5147.G.1.4, C1498, RAW8.1, CTLL-2 e BW5147.G.1.4.OUA^R.1.

11. Uma composição para a detecção de um anticorpo anti-HCV contendo um antígeno HCV a partir de uma célula infectada com HCV in vitro, na qual o antígeno é fixado num substrato sólido, e no qual o antígeno é imunologicamente reactivo com o dito anticorpo anti-HCV.

12. Uma composição conforme reivindicado na reivindicação 11, na qual a composição é composta de lisado de células da linha celular da reivindicação 1.

13. Uma composição conforme reivindicado na reivindicação 11, na qual a composição é composta de lisado de HCV da linha celular da reivindicação 2.

14. Uma composição conforme reivindicado na reivindicação 11, na qual a composição é composta de lisado de

HCV de células seleccionadas das células da reivindicação 7, reivindicação 8, reivindicação 9 e reivindicação 10.

15. Uma composição conforme reivindicado na reivindicação 11, na qual a composição é composta de uma célula da reivindicação 1 fixa num substrato sólido.

16. Uma composição conforme reivindicado na reivindicação 11, na qual a composição é composta de uma célula da reivindicação 2 fixa num substrato sólido.

17. Um método para pesquisa de um agente que iniba a replicação do HCV compreendendo:

(a) proporcionando uma composição em que se inclui um agente antiviral putativo;

(b) proporcionando uma linha celular capaz de replicar o HCV;

(c) proporcionando uma composição em que se inclui o infectivo HCV;

(d) incubando as composições de (a) e (c) com a linha celular de (b) sob condições que poderiam na ausência de (a) permitir a infecção e replicação de HCV na linha celular; e

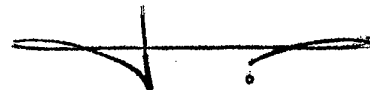
(e) detectando uma inibição da replicação viral após a incubação em (d).

Lisboa, 24 de Agosto de 1990

PELO AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

O ADJUNTO





SEQUENCIA DO SENTIDO DA CADEIA DO HCV cDNA

 (COMO DEDUZIDA DOS CLONES QUE SE SOBREPOEM b114a/18g/
 ag30a/CA205a/CA290a/CA216a/pi14a/CA167b/CA156e/
 CA84a/CA59a/K9-1/26j/13i/12f/14i/11b/7f/7e/8h/
 33c/40b/37b/35/36/81/32/33b/25c/14c/8f/33f/33g/
 39c/35f/19g/26g/15e/b5a/16jh)

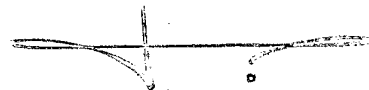
CACTCCACCATGAATCACTCCCCTGTGAGGAACTACTGTCTTCACGCAGAA
 AGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTCTGTCAGCCTCCAGGACCCCC
 CCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATT
 GCCAGGACGACCGGGTCCTTTCTTGGATCAACCCGCTCAATGCCTGGAGAT
 TTGGGCGTGCCCCCGCAAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGTGCGGAAAG
 GCCTTGTGGTACTGCCTGATAGGGTGCTTGCGAGTGCCCCGGGAG-300

(CODAO PUTATIVO DE INICIAÇÃO DA METIONINA)

|

GTCTCGTAGACCGTGCACCATGAGCACGAATCCTAAACCTCAAAAAAAAAA
 CAAACGTAAACCAACCGTCGCCCACAGGACGTCAAGTTCCTCGGGTGGCGG
 TCAGATCGTTGGTGGAGTTTACTTGTTCGCGCGCAGGGGCCCTAGATTGGG
 TGTGCGCGCGACGAGAAAGACTTCCGAGCGGTGCGAACCTCGAGGTAGACG
 TCAGCCTATCCCCAAGGCTCGTTCGGCCCCGAGGGCAGGACCTGGGCTCAGCC
 CGGGTACCCTTGGCCCCCTCTATGGCAATGAGGGCTGCGGGTGGGC-600
 GGGATGGCTCCTGTCTCCCCGTGGCTCTCGGCCTAGCTGGGGCCCCACAGA
 CCCCCGGCGTAGGTGCGCAATTTGGGTAAGGTCATCGATAACCCTTACGTG
 CGGCTTCGCCGACCTCATGGGGTACATAACCGCTCGTTCGGCGCCCCCTCTTG
 AGGCGCTGCCAGGGCCCTGGCGCATGGCGTCCGGGTCTTGGAAGACGGCGT
 GAACTATGCAACAGGGAACCTTCCTGGTTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTCT
 GGCCCTGCTCTCTTGCTTGACTGTGCCCGCTTCGGCCTACCAAGT-900
 GCGCAACTCCACGGGGCTTTACCACGTACCAATGATTGCCCTAACTCGAG
 TATTGTGTACGAGGCGGCCGATGCCATCCTGCACACTCCGGGGTGGGTCCC
 TTGCGTTCGTGAGGGCAACGCCTCGAGGTGTTGGGTGGCGATGACCCCTAC
 GGTGGCCACCAGGGATGGCAAACCTCCCCGCGACGCAGCTTCGACGTACAT
 CGATCTGCTTGTTCGGGAGCGCCACCCTCTGTTTCGGCCCTCTACGTGGGGGA
 CCTATGCGGGTCTGTCTTTCTTGTTCGGCCAACTGTTACCTTCTC-1200
 TCCCAGGCGCCACTGGACGACGCAAGGTTGCAATTGCTCTATCTATCCCGG
 CCATATAACGGGTCACCGCATGGCATGGGATATGATGATGAACTGGTCCCC
 TACGACGGCGTTGGTAATGGCTCAGCTGCTCCGGATCCCACAAGCCATCTT
 GGACATGATCGCTGGTGCTCACTGGGGAGTCCTGGCGGGCATAGCGTATTT
 CTCCATGGTGGGGAACCTGGGCGAAGGTCTGGTAGTGCTGCTGCTATTTGC
 CGGCGTCGACGCGGAAACCCACGTCACCGGGGGAAGTGCCGGCCA-1500
 CACTGTGTCTGGATTTGTTAGCCTCCTCGCACCCAGGCGCCAAGCAGAACGT
 CCAGCTGATCAACACCAACGGCAGTTGGCACCTCAATAGCACGGCCCTGAA
 CTGCAATGATAGCCTCAACACCGGCTGGTTGGCAGGGCTTTTCTATACCA
 CAAGTTCAACTCTTCAGGCTGTCCTGAGAGGCTAGCCAGCTGCCGACCCCT
 TACCGATTTTGACCAGGGCTGGGGCCCTATCAGTTATGCCAACGGAAGCGG
 CCCCACCAGCGCCCCCTACTGCTGGCACTACCCCCCAAACCTTG-1800

FIG. 1-1



CGGTATTGTGCCCCGCGAAGAGTGTGTGTGGTCCGGTATATTGCTTCACTCC
 CAGCCCCGTGGTGGTGGGAACGACCGACAGGTCGGGCGCGCCACCTACAG
 CTGGGGTGAAAATGATACGGACGTCTTCGTCTTAACAATAACCAGGCCACC
 GCTGGGCAATTGGTTCCGTTGTACCTGGATGAACTCAACTGGATTACACAA
 AGTGTGCGGAGCGCCTCCTTGTGTTCATCGGAGGGGCGGGCAACAACACCT
 GCACTGCCCCACTGATTGCTTCCGCAAGCATCCGGACGCCACATA-2100
 CTCTCGGTGCGGCTCCGGTCCCTGGATCACACCCAGGTGCCTGGTCTGACTA
 CCCGTATAGGCTTTGGCATTATCCTTGTACCATCAACTACACCATATTTAA
 AATCAGGATGTACGTGGGAGGGGTGGAACACAGGCTGGAAGCTGCCTGCAA
 CTGGACGCGGGGCGAACGTTGCGATCTGGAAGACAGGGACAGGTCCGAGCT
 CAGCCCGTTACTGCTGACCACTACACAGTGGCAGGTCTCCCGTGTTCCTT
 CACAACCCTACCAGCCTTGTCCACCGGCCTCATCCACCTCCACCA-2400
 GAACATTGTGGACGTGCAGTACTTGTACGGGGTGGGGTCAAGCATCGCGTC
 CTGGGCCATTAAAGTGGGAGTACGTCTTCTCCTGTTCTTCTGCTTGCAGA
 CGCGCGCTCTGCTCCTGCTTGTGGATGATGCTACTCATATCCCAAGCGGA
 GGCGGCTTTGGAGAACCTCGTAATACTTAATGCAGCATCCCTGGCCGGGAC
 GCACGGTCTTGTATCCTTCCTCGTGTCTTCTGCTTTGCATGGTATTTGAA
 GGGTAAGTGGGTGCCCCGAGCGGTCTACACCTTCTACGGGATGTG-2700
 GCCTCTCCTCCTGCTCCTGTTGGCGTTGCCCCAGCGGGCGTACGCGCTGGA
 CACGGAGGTGGCCGCGTCTGTGTGGCGGTGTTGTTCTCGTCGGGTTGATGGC
 GCTGACTCTGTACCATATTACAAGCGCTATATCAGCTGGTGTGTTGTTG
 GCTTCAGTATTTTCTGACCAGAGTGAAGCGCAACTGCACGTGTGGATTCC
 CCCCCTCAACGTCCGAGGGGGGCGCGACGCGCTCATCTTACTCATGTGTGC
 TGTACACCCGACTCTGGTATTTGACATCACCAAATTGCTGCTGGC-3000
 CGTCTTCGGACCCCTTTGGATTCTTCAAGCCAGTTTGCTTAAAGTACCCTA
 CTTTGTGCGCGTCCAAGGCCTTCTCCGGTTCTGCGCGTTAGCGCGGAAGAT
 GATCGGAGGCCATTACGTGCAAATGGTCATCATTAAGTTAGGGGCGCTTAC
 TGGCACCTATGTTTATAACCATCTCACTCCTCTTCGGGACTGGGCGCACAA
 CGGCTTGCGAGATCTGGCCGTGGCTGTAGAGCCAGTCGTCTTCTCCCAAAT
 GGAGACCAAGCTCATCACGTGGGGGGCAGATACCGCCGCGTGCGG-3300
 TGACATCATCAACGGCTTGCCTGTTTCCGCCCCGAGGGGCGGGAGATACT
 GCTCGGGCCAGCCGATGGAATGGTCTCCAAGGGGTGGAGGTTGCTGGCGCC
 CATCACGGCGTACGCCCAGCAGACAAGGGGCTCCTAGGGTGCCATAATCAC
 CAGCCTAACTGGCCGGGACAAAAACCAAGTGGAGGGTGAGGTCCAGATTGT
 GTCAACTGCTGCCCAAACCTTCTTGGCAACGTGCATCAATGGGGTGTGCTG
 GACTGTCTACCACGGGGCCGGAACGAGGACCATCGCGTCACCCAA-3600
 GGGTCCTGTATCCAGATGTATACCAATGTAGACCAAGACCTTGTGGGCTG
 GCGCGCTCCGCAAGGTAGCCGCTCATTTGACACCCTGCACTTGGCGCTCCTC
 GGACCTTTACCTGGTCACGAGGCACGCCGATGTCATTCCCGTGCGCCGGCG
 GGGTGATAGCAGGGGCGAGCCTGCTGTGCCCCCGGCCCATTTCTACTTGAA
 AGGCTCCTCGGGGGGTCCGCTGTTGTGCCCCGCGGGGCACGCCGTGGGCAT
 ATTTAGGGCCGCGGTGTGCACCCGTGGAGTGGCTAAGGCGGTGGA-3900
 CTTTATCCCTGTGGAGAACCTAGAGACAACCATGAGGTCCCCGGTGTTCAC
 GGATAACTCCTCTCCACCAGTAGTGCCCCAGAGCTTCCAGGTGGCTCACCT
 CCATGCTCCACAGGCAGCGGCAAAAGCACCAAGGTCCCGGTGCATATGC
 AGCTCAGGGCTATAAGGTGCTAGTACTCAACCCCTCTGTTGCTGCAACACT
 GGGCTTTGGTGCTTACATGTCCAAGGCTCATGGGATCGATCCTAACATCAG
 GACCGGGGTGAGAACAAATTACCACTGGCAGCCCCATCACGTAATC-4200

FIG. 1-2



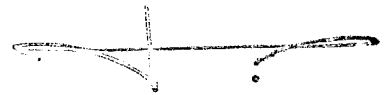
CACCTACGGCAAGTTCCTTGCCGACGGCGGGTGCTCGGGGGGCGCTTATGA
 CATAATAATTTGTGACGAGTGCCACTCCACGGATGCCACATCCATCTTGGG
 CATCGGCACTGTCTTGACCAAGCAGAGACTGCGGGGGCGAGACTGGTTGT
 GCTCGCCACCGCCACCCCTCCGGGCTCCGTCACTGTGCCCCATCCCAACAT
 CGAGGAGGTTGCTCTGTCCACCACCGGAGAGATCCCTTTTTTACGGCAAGGC
 TATCCCCCTCGAAGTAATCAAGGGGGGGAGACATCTCATCTTCTG-4500
 TCATTCAAAGAAGAAGTGCGACGAACTCGCCGCAAAGCTGGTCGCATTGGG
 CATCAATGCCGTGGCCTACTACCGCGGTCTTGACGTGTCCGTATCCCGAC
 CAGCGGCGATGTTGTGTCGTGGCAACCGATGCCCTCATGACCGGCTATAC
 CGGCGACTTCGACTCGGTGATAGACTGCAATACGTGTGTACCCAGACAGT
 CGATTTACGCCTTGACCCTACCTTCACCATTGAGACAATCACGCTCCCCCA
 GGATGCTGTCTCCCGCACTCAACGTGCGGGCAGGACTGGCAGGGG-4800
 GAAGCCAGGCATCTACAGATTTGTGGCACCGGGGGAGCGCCCCCTCCGGCAT
 GTTCGACTCGTCCGTCTCTGTGAGTGCTATGACGCAGGCTGTGCTTGGA
 TGAGCTCACGCCCCGCGAGACTACAGTTAGGCTACGAGCGTACATGAACAC
 CCGGGGCTTCCCGTGTGCCAGGACCATCTTGAATTTTGGGAGGGCGTCTT
 TACAGGCCTCACTCATATAGATGCCCACTTTCTATCCCAGACAAAGCAGAG
 TGGGGAGAACCTTCCTTACCTGGTAGCGTACCAAGCCACCGTGTG-5100
 CGCTAGGGCTCAAGCCCCCTCCCCATCGTGGGACCAGATGTGGAAGTGTTT
 GATTCGCCTCAAGCCCACCCCTCCATGGGCCAACACCCCTGCTATACAGACT
 GGGCGCTGTTTCAAGATGAAATCACCCCTGACGCACCCAGTCACCAAATACAT
 CATGACATGCATGTGCGCCGACCTGGAGGTGCTCACGAGCACCTGGGTGCT
 CGTTGGCGGCGTCTGGCTGCTTTGGCCGCGTATTGCCTGTCAACAGGCTG
 CGTGGTCATAGTGGGCAGGGTTCGTCTTGTCCGGGAAGCCGGCAAT-5400
 CATACTGACAGGGAAGTCCTCTACCGAGAGTTCGATGAGATGGAAGAGTG
 CTCTCAGCACTTACCGTACATCGAGCAAGGGATGATGCTCGCCGAGCAGTT
 CAAGCAGAAGGCCCTCGGCCTCCTGCAGACCGCGTCCCGTCAGGCAGAGGT
 TATCGCCCCCTGCTGTCCAGACCAACTGGCAAAAACCTCGAGACCTTCTGGGC
 GAAGCATATGTGGAACCTTCATCAGTGGGATACAATACTTGGCGGGCTTGTC
 AACGCTGCCTGGTAACCCCGCCATTGCTTCATTGATGGCTTTTAC-5700
 AGCTGCTGTCAACAGCCCACTAACCCTAGCCAAACCCCTCCTCTTCAACAT
 ATTGGGGGGGTGGGTGGCTGCCCAGCTCGCCGCCCCCGGTGCCGCTACTGC
 CTTTGTGGGCGCTGGCTTAGCTGGCGCCGCCATCGGCAGTGTGGAAGTGGG
 GAAGGTCTCATAGACATCCTTGCAGGGTATGGCGCGGGCGTGGCGGGAGC
 TCTTGTGGCATTCAAGATCATGAGCGGTGAGGTCCCCTCCACGGAGGACCT
 GGTCAATCTACTGCCCCGCCATCCTCTCGCCCGGAGCCCTCGTAGT-6000
 CGGCGTGGTCTGTGCAGCAATACTGCGCCGGCACGTTGGCCCGGGCGAGGG
 GGCAGTGCAGTGGATGAACCGGCTGATAGCCTTCGCCTCCCGGGGGAACCA
 TGTTTCCCCCACGCACTACGTGCCGGAGAGCGATGCAGCTGCCCGCGTCAC
 TGCCATACTCAGCAGCCTCACTGTAACCCAGCTCCTGAGGCGACTGCACCA
 GTGGATAAGCTCGGAGTGTACCACTCCATGCTCCGGTTCCTGGCTAAGGGA
 CATCTGGGACTGGATATGCGAGGTGTTGAGCGACTTTAAGACCTG-6300
 GCTAAAAGCTAAGCTCATGCCACAGCTGCCTGGGATCCCCTTTGTGTCCTG
 CCAGCGCGGGTATAAGGGGGTCTGGCGAGTGGACGGCATCATGCACACTCG
 CTGCCACTGTGGAGCTGAGATCACTGGACATGTCAAAAACGGGACGATGAG
 GATCGTCGGTCTTAGGACCTGCAGGAACATGTGGAGTGGGACCTTCCCCAT
 TAATGCCTACACCACGGGCCCCCTGTACCCCCCTTCTGCGCCGAACCTACAC
 GTTCGCGCTATGGAGGGTGTCTGCAGAGGAATATGTGGAGATAAG-6600

FIG. 1-3



GCAGGTGGGGGACTTCCACTACGTGACGGGTATGACTACTGACAATCTCAA
 ATGCCCCTGCCAGGTCCCATCGCCCGAATTTTTCACAGAATTGGACGGGGT
 GCGCCTACATAGGTTTGCGCCCCCTGCAAGCCCTTGCTGCGGGAGGAGGT
 ATCATTTCAGAGTAGGACTCCACGAATACCCGGTAGGGTCGCAATTACCTTG
 CGAGCCCGAACC GGACGTGGCCGTGTTGACGTCCATGCTCACTGATCCCTC
 CCATATAACAGCAGAGGCGGCCGGCGGAAGGTTGGCGAGGGGATC-6900
 ACCCCCCTCTGTGGCCAGCTCCTCGGCTAGCCAGCTATCCGCTCCATCTCT
 CAAGGCAACTTGCACCGCTAACCATGACTCCCCTGATGCTGAGCTCATAGA
 GGCCAACCTCCTATGGAGGCAGGAGATGGGCGGCAACATCACCAGGGTTGA
 GTCAGAAAACAAAGTGGTGATTCTGGACTCCTTCGATCCGCTTGTGGCGGA
 GGAGGACGAGCGGGAGATCTCCGTACCCGCAGAAATCCTGCGGAAGTCTCG
 GAGATTGCCCCAGGCCCTGCCCGTTTGGGCGCGGCCGGA CTATAA-7200
 CCCCCCGCTAGTGGAGACGTGGAAAAAGCCCGACTACGAACCACCTGTGGT
 CCATGGCTGTCCGCTTCCACCTCCAAAGTCCCCTCCTGTGCCTCCGCCTCG
 GAAGAAGCGGACGGTGGTCTCACTGAATCAACCCTATCTACTGCCTTGGC
 CGAGCTCGCCACCAGAAGCTTTGGCAGCTCCTCAACTTCCGGCATTACGGG
 CGACAATACGACAACATCCTCTGAGCCCGCCCCTTCTGGCTGCCCCCCCCGA
 CTCCGACGCTGAGTCTATTCTCCATGCCCCCCTGGAGGGGGA-7500
 GCCTGGGGATCCGGATCTTAGCGACGGGT CATGGTCAACGGTCAGTAGTGA
 GGCCAACGCGGAGGATGTCGTGTGCTGCTCAATGTCTTACTCTTGGACAGG
 CGCACTCGTCACCCCGTGCGCCGCGGAAGAACAGAACTGCCCATCAATGC
 ACTAAGCAACTCGTTGCTACGTCAACCAATTTGGTGTATTCCACCACCTC
 ACGCAGTGCTTGCCAAAGGCAGAAGAAAGTCACATTTGACAGACTGCAAGT
 TCTGGACAGCCATTACCAGGACGTACTCAAGGAGGTTAAAGCAGC-7800
 GGCGTCAAAAGTGAAGGCTAACTTGCTATCCGTAGAGGAAGCTTGCAGCCT
 GACGCCCCCACACTCAGCCAAATCCAAGTTTGGTTATGGGGCAAAAGACGT
 CCGTTGCCATGCCAGAAAGGCCGTAACCCACATCAACTCCGTGTGGAAAGA
 CCTTCTGGAAGACAATGTAACACCAATAGACACTACCATCATGGCTAAGAA
 CGAGGTTTTCTGCGTTCAGCCTGAGAAGGGGGT CGTAAGCCAGCTCGTCT
 CATCGTGTTCCCCGATCTGGGCGTGC GCGTGTGCGAAAAGATGGC-8100
 TTTGTACGACGTGGTTACAAAGCTCCCCTTGGCCGTGATGGGAAGCTCCTA
 CGGATTCCAATACTCACCAGGACAGCGGGTGAATTCCTCGTGCAAGCGTG
 GAAGTCCAAGAAAACCCCAATGGGGTTCTCGTATGATACCCGCTGCTTTGA
 CTCCACAGTCACTGAGAGCGACATCCGTACGGAGGAGGCAATCTACCAATG
 TTGTGACCTCGACCCCCAAGCCCGCGTGGCCATCAAGTCCCTCACCGAGAG
 GCTTTATGTTGGGGGCCCTCTTACCAATTCAAGGGGGGAGAACTG-8400
 CGGCTATCGCAGGTGCCGCGCGAGCGGCGTACTGACAACTAGCTGTGGTAA
 CACCCTCACTTGCTACATCAAGGCCCGGGCAGCCTGTCGAGCCGCAGGGCT
 CCAGGACTGCACCATGCTCGTGTGTGGCGACGACTTAGTCGTTATCTGTGA
 AAGCGCGGGGGTCCAGGAGGACGCGGCGAGCCTGAGAGCCTTACGGAGGC
 TATGACCAGGTACTCCGCCCCCCTGGGGACCCCCACAACCAGAATACGA
 CTTGGAGCTCATAACATCATGCTCCTCCAACGTGTCAGTCGCCCCA-8700
 CGACGGCGCTGGAAAGAGGGTCTACTACCTCACCCGTGACCCTACAACCCC
 CCTCGCGAGAGCTGCGTGGGAGACAGCAAGACACACTCCAGTCAATTCCTG
 GCTAGGCAACATAATCATGTTTGGCCCCACACTGTGGGCGAGGATGATACT
 GATGACCCATTTCTTTAGCGTCCTTATAGCCAGGGACCAGCTTGAACAGGC
 CCTCGATTGCGAGATCTACGGGGCCTGCTACTCCATAGAACC ACTTGATCT
 ACCTCCAATCATTC AAAGACTCCATGGCCTCAGCGCATTTTCACT-9000

FIG. 1-4



CCACAGTTACTCTCCAGGTGAAATTAATAGGGTGGCCGCATGCCTCAGAAA
ACTTGGGGTACCGCCCTTGCGAGCTTGGAGACACCGGGCCCGAGCGTCCG
CGCTAGGCTTCTGGCCAGAGGAGGCAGGGCTGCCATATGTGGCAAGTACCT
CTTCAACTGGGCAGTAAGAACAAAGCTCAAAC

FIG. 1-5

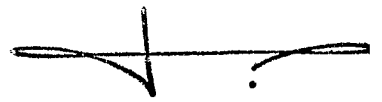


FIG. 2

TRADUÇÃO DO DNA 35

SerIleGluThrIleThrLeuProGlnAspAlaValSerArgThrGlnArgArgGlyArg
 1 TCCATTGAGACAATCACGCTCCCCCAGGATGCTGTCTCCCGCACTCAACGTCGGGGCAGG
 AGGTAACCTCTGTTAGTGCGAGGGGGTCTACGACAGAGGGCGTGAGTTGCAGCCCCGTCC
 ThrGlyArgGlyLysProGlyIleTyrArgPheValAlaProGlyGluArgProSerGly
 61 ACTGGCAGGGGAAGCCAGGCATCTACAGATTTGTGGCACCGGGGAGCGCCCTCCGGC
 TGACCGTCCCCCTTCGGTCCGTAGATGTCTAAACACCGTGGCCCCCTCGCGGGGAGGCCG
 MetPheAspSerSerValLeuCysGluCysTyrAspAlaGlyCysAlaTrpTyrGluLeu
 121 ATGTTGACTCGTCCGTCCTCTGTGAGTGCTATGACGCAGGCTGTGCTTGGTATGAGCTC
 TACAAGCTGAGCAGGCAGGAGACACTCACGATACTGCGTCCGACACGAACCATACTCGAG
 ThrProAlaGluThrThrValArgLeuArgAlaTyrMetAsnThrProGlyLeuProVal
 181 ACGCCCGCCGAGACTACAGTTAGGCTACGAGCGTACATGAACACCCCGGGGCTCCCGTG
 TGCGGGCGGCTCTGATGTCAATCCGATGCTCGCATGTACTTGTGGGGCCCCGAAGGGCAC
 CysGlnAspHisLeuGluPheTrpGluGlyValPheThrGlyLeuThrHisIleAspAla
 241 TGCCAGGACCATCTTGAATTTTGGGAGGGCGTCTTTACAGGCCTCACTCATATAGATGCC
 ACGGTCCTGGTAGAACTTAAACCCCTCCCGCAGAAATGTCCGGAGTGAGTATATCTACGG
 HisPheLeuSerGlnThrLysGlnSerGlyGluAsnLeuProTyrLeuValAlaTyrGln
 301 CACTTTCTATCCCAGACAAAGCAGAGTGGGGAGAACCTTCCTTACCTGGTAGCGTACCAA
 GTGAAAGATAGGGTCTGTTTCGTCTCACCCCTCTTGGAAGGAATGGACCATCGCATGGTT
 AlaThrValCysAlaArgAlaGlnAlaProProProSerTrpAspGlnMetTrpLysCys
 361 GCCACCGTGTGCGCTAGGGCTCAAGCCCCCTCCCCATCGTGGGACCAGATGTGGAAGTGT
 CGGTGGCACACGCGATCCCGAGTTCGGGGAGGGGGTAGCACCCCTGGTCTACACCTTACA
 LeuIleArgLeuLysProThrLeuHisGlyProThrProLeuLeuTyrArgLeuGlyAla
 421 TTGATTCGCCTCAAGCCCACCCTCCATGGGCCAACACCCCTGCTATACAGACTGGGCGCT
 AACTAAGCGGAGTTCGGGTGGGAGGTACCCGGTTGTGGGGACGATATGTCTGACCCGCGA