



(12) **BREVET DE INVENȚIE**

**Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată
în termen de 6 luni de la data publicării**

(21) Nr. cerere: 149205	(61) Perfecționare la brevet: Nr.
(22) Data de depozit: 18.05.1990	(62) Divizată din cererea: Nr.
(30) Prioritate: 18.05.1989 US 355961; 21.12.1989 US 456637; 04.04.1990 US 505435	(86) Cerere internațională PCT: Nr. US 90 / 02853 18.05.1990
(41) Data publicării cererii: BOPI nr.	(87) Publicare internațională: Nr. WO 90/14436 29.11.1990
(42) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 30.03.1998 BOPI nr. 3/1998	(56) Documente din stadiul tehnicii: US 4683202; 4683195; EP -A-0318216
(45) Data eliberării și publicării brevetului: BOPI nr.	

(71) Solicitant: CHIRON CORPORATION, EMERYVILLE 94608, US
(73) Titular: CHIRON CORPORATION, EMERYVILLE 94608, US
(72) Inventatori: HOUGHTON MICHAEL, CALIFORNIA, US; CHOO QUI-LIM, CALIFORNIA, US; KUO GEORGE, CALIFORNIA, US; HAN JANG, CALIFORNIA, US; URDEA MICHAEL S., CALIFORNIA, US; WEINER AMY J., CALIFORNIA, US
(74) Mandatar: ROMINVENT S.A. (AGENȚIE PENTRU BREVETE, DESENE, MĂRCI ȘI TRANSFER TEHNOLOGIE) BUCUREȘTI

**(54) POLINUCLEOTIDĂ CAPABILĂ DE HIBRIDIZARE PE O
SECVENȚĂ HCV, METODĂ PENTRU DETECTAREA UNEI
SECVENȚE HCV ȘI PROCEDEU DE ELIMINARE A HCV DIN
SÂNGE**

(57) Rezumat: Invenția se referă la o polinucleotidă capabilă de hibridizare pe o secvență HCV într-o polinucleotidă de analizat, care cuprinde o secvență de cel puțin 8 nucleotide contigue, prezente într-o regiune conservată a secvenței nucleotidice a HCV sau a complementului acesteia. Un alt obiect al invenției este o metodă pentru detectarea unei secvențe HCV sau a complementului ei într-o probă de analizat, care constă în aceea că se aduce proba de analizat în contact cu o polinucleotidă definită ca mai sus, se incubează proba de analizat împreună cu polinucleotida, în condiții în sine cunoscute, pentru a se forma duplexuri hibride specifice între polinucleotidă și proba de analizat, și se

detectează prezența acestor duplexuri hibride specifice. Invenția prezintă și un procedeu de eliminare a HCV din sânge, care constă în aceea că se obțin acizii nucleici de analizat, dintr-o probă de sânge suspectată de a conține o secvență-țintă HCV, se obține o polinucleotidă definită ca mai sus, se pun în reacție acizii nucleici cu proba, în condiții care permit formarea unui duplex polinucleotidic între acidul nucleic și probă, se detectează duplexul format în faza anterioară, dacă acesta există, și se păstrează sângele în care nu au fost detectați complecși.

Revendicări: 16
Figuri: 47

RO 113059 B1



Prezenta invenție se referă la o polinucleotidă capabilă de hibridizare pe o secvență HCV, la o metodă pentru detectarea unei secvențe HCV și la un procedeu de eliminare a HCV din sânge, destinate utilizării în diagnosticul și detectarea virusului hepatitei de tip C.

Se cunoaște că hepatita non-A, non-B (NANBH) este o boală sau o familie de boli transmisibile, care se crede că este indusă viral și care se distinge de alte forme ale bolilor de ficat asociate virusurilor, inclusiv cele provocate de virusurile de hepatită cunoscute, adică virusul hepatitei A (HAV), virusul hepatitei B (HBV) și virusul hepatitei delta (HDV) precum și hepatita indusă de cytomegalovirus (CMV) sau virusul Epstein-Barr (EBV). NANBH a fost identificată prima oară la indivizi cărora li s-a făcut transfuzie. Transmiterea de la om la cimpanzeu și trecerile în serie la cimpanzei au dovedit că NANBH se datorește unui agent sau unor agenți infecțioși transmisibili.

Punerea în evidență epidemiologic sugerează că pot fi trei tipuri de NANBH: tipul epidemic născut în apă; tipul asociat sângelui sau acului și tipul care apare sporadic (căpătat în comunitate). Însă numărul agenților care pot constitui cauza NANBH este necunoscut.

S-au presupus o serie de NANBV. vezi, de exemplu, trecerile în revistă ale lui Prince (1983) *Annu. Rev. Microbiol.* 37:217, Feinstone și Hofnagle (1984) *New Engl. J. Med.* 311:185 și Overby (1985, 1986, 1987) *Curr. Hepatol.* 5:48, 6:65, 7:35 și articolul lui Iwarson (1976) *British Medical J.* 295:946, însă nu există vreo dovadă că aceste virusuri presupuse reprezintă agentul etiologic al NANBH.

Necesitatea unor metode sensibile, specifice pentru selectarea și identificarea purtătorilor de NANBV și sânge contaminat cu NANBV sau produși de sânge este evidentă. Hepatita după transfuzie (PTH) se produce la aproximativ 10% din pacienții cărora li s-a făcut trasnfuzie și NANBH reprezintă până la 90% din aceste cazuri. Problema principală la această boală este progresarea frecventă a distrugerii cronice a ficatului [25-55%].

Grija pentru pacient precum și prevenirea transmiterii NANBH prin sânge sau produse din sânge sau prin contact personal intim impun selectarea demnă de încredere, diagnosticul și aparatura de prognoză pentru detectarea acizilor nucleici, antigenilor și anticorpilor corelați cu NANBH.

Metodele pentru detectarea polinucleotidelor specifice prin încărcările de hibridizare sunt cunoscute de specialiști. Vezi, de exemplu, Matthews și Kricka (1988), *Analytical Biochemistry* 169:1; Chem. 35:1819; brevetul **US 4868105**, depus la 9 septembrie 1989, și publicația **E.P.O. nr. 225807** (publicată la 16 iunie 1987).

S-a descoperit un nou virus, virusul hepatitei C (HCV), care s-a dovedit a fi agentul etiologic principal al NANBH (BB-NANBH) născută în sânge. Lucrarea inițială a autorilor prezentei invenții, care include o scvență genomică parțială a prototipului HCV izolat CDC/HCV1 (numit de asemenea HCV1) este descrisă în publicația **E.P.O. 318216** (publicată la 31 mai 1989) și publicația **PCT WO 89/04669** (publicată la 1 inie 1989).

Aceste cereri de brevete de invenție arată, printre altele, metodele DNA recombinant de clonare a secvențelor HCV, tehnicile de diagnostic ale probei HCV, anticorpilor anti-HCV și metodele de izolare a noilor secvențe HCV.

Prezenta invenție se bazează pe secvențe HCV descrise în publicația **E.P.O. 318216** și publicația **PCT. WO 89/04669** precum și pe alte secvențe HCV care sunt descrise în această invenție. Metodele pentru izolarea și/sau detectarea polinucleotidelor specifice prin hibridizare nu au putut fi folosite pentru selectarea HCV până la descoperirea de către autorii acestei invenții a HCV.

Ca urmare, unul din obiectele prezentei invenții este o polinucleotidă capabilă de hibridizare pe o secvență HCV într-o polinucleotidă de analizat, care cuprinde o secvență de cel puțin opt nucleotide contigue prezente într-o regiune conservată a secvenței nucleotidice a HCV din fig. 18 sau a complementului acesteia.

Un alt obiect al prezentei invenții este o metodă pentru detectarea unei secvențe HCV sau a complementului ei dintr-o probă de analizat care este suspectată de a conține secvența respectivă, în care se aduce proba de analizat în contact cu o polinucleotidă

definită ca mai sus, se incubează proba de analizat împreună cu polinucleotida în condiții în sine cunoscute pentru a se forma duplexuri hidride specifice între polinucleotidă și proba de analizat și se detectează prezența acestor duplexuri hibride specifice.

Un alt obiect al prezentei invenții este un procedeu de eliminare a HCV din sânge în care se obțin acizii nucleici de analizat dintr-o probă de sânge suspectată de a conține o secvență țintă HCV, se obține o polinucleotidă definită ca mai sus, se pun în reacție acizii nucleici cu proba în condiții care permit formarea unui duplex polinucleotidic între acidul nucleic și probă, se detectează duplexul format în faza anterioară, dacă acesta există și se păstrează sângele în care nu au fost detectați complecși.

Metodele descrise aici prezintă avantajul că permit propagarea, identificarea, detectarea și izolarea diferitelor tulpini sau izolate de HCV.

Prezentarea pe scurt a desenelor din figurile explicative:

-fig. 1, reprezintă secvența cADN HCV în clona 12f, și aminoacizii codificați în ea.

-fig. 2, reprezintă secvența cADN HCV în clona k9-1 și aminoacizii codificați în ea.

Figura 3 reprezintă secvența clonei 15e și aminoacizii codificați în ea.

-fig. 4, reprezintă secvența de nucleotide a cADN HCV în clona 13i, aminoacizii codificați în ea și secvențele care se suprapun cu clona 12f.

-fig. 5, reprezintă secvența de nucleotide a HCV cADN în clona 26j, aminoacizii codificați în ea și secvențele care se suprapun cu clona 13i.

-fig. 6, reprezintă secvența de nucleotide a cADN HCV în clona CA59a, aminoacizii codificați în ea și secvențele care se suprapun cu clonele 26j și K9-1.

-fig. 7, reprezintă secvența de nucleotide a cADN HCV în clona CA84a, aminoacizii codificați în ea și secvențele care se suprapun cu clona CA59a.

-fig. 8, reprezintă secvența de nucleotide a cADN HCV în clona CA156e, aminoacizii codificați în ea și secvențele care se suprapun cu CA84a.

-fig. 9, reprezintă secvența de nucleotide a cADN HCV în clona CA167b, aminoacizii codificați în ea și secvențele care se suprapun cu CA156e.

-fig. 10, reprezintă secvența de nucleotide a cADN HCV în clona CA216a, aminoacizii codificați în ea și suprapunerea cu clona CA167b.

-fig. 11, reprezintă secvența de nucleotide a cADN HCV în clona CA290a, aminoacizii codificați în ea și suprapunerea cu clona CA216a.

-fig. 12, reprezintă secvența de nucleotide a cADN HCV în clona ag30a și suprapunerea cu clona CA290a.

-fig. 13, reprezintă secvența de nucleotide a cADN HCV în clona CA205a, și suprapunerea cu secvența cADN HCV din clona CA290a.

-fig. 14, reprezintă secvența de nucleotide a cADN HCV în clona 18g și suprapunerea cu secvența cADN HCV din clona ag30a.

-Fig. 15, reprezintă secvența de nucleotide a cADN HCV din clona 16jh, aminoacizii codificați în ea și suprapunerea nucleotidelor cu secvența cADN HCV din clona 15e.

-fig. 16, reprezintă secvența de nucleotide a cADN HCV din clona 6k, aminoacizii codificați în ea și suprapunerea nucleotidelor cu secvența de cADN HCV din clona 16jh.

-fig. 17, reprezintă secvența de nucleotide a cADN HCV din clona p131jh, aminoacizii codificați în ea și suprapunerea nucleotidelor cu secvența cADN HCV din clona 6k.

-fig. 18, reprezintă secvența alcătuită de cADN HCV derivată de la clonele descrise aici și din secvența alcătuită de cADN HCV și prezentată în publicația E.P.O. nr. 318216. Clonele din care a fost derivată secvența sunt: 5'-clona 32, bl14a, 18g, ag30a, CA205a, CA290a, CA216a, pi14am CA167b, CA156e, CA84a, CA59a, K9-1 (denumită și 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, 6k și p131jh. În figură, cele trei linii punctate deasupra secvenței, orizontale, indică poziția codonului metioninei ca posibil inițiator. De asemenea în figură este arătată secvența de aminoacizi a posibilei poliproteine codificate de cADN HCV. Heterogenitățile din ADN-urile clonate ale HCV1 sunt indicate

prin aminoacizii prezentați mai sus ca secvența codificată posibilă a ORF mare; parantezele arată că heterogenitatea a fost detectată la sau în apropiere de capătul 5'- sau 3'- al cADN HCV din clonă.

-fig. 19, reprezintă secvențele probelor captură și martor pentru detectarea ARN HCV în probele biologice.

-fig. 20, reprezintă aliniamentul schematic al poliproteinei flavivirale și o posibilă poliproteină HCV codificată în ORF principal al genomului HCV. De asemenea se indică în figură funcțiile posibile ale polipeptidelor flavivirale desprinse din poliproteina flavivirală. În plus, se indică amplasarea relativă a polipeptidelor HCV, NANB₅₋₁₋₁ și C100, în raport cu posibila poliproteină HCV.

-fig. 21, reprezintă secvența de nucleotide cu catenă dublă a insertului de cADN HCV în clona 81 și posibila secvență de aminoacizi a polipeptidei codificate în ea.

-fig. 22, reprezintă secvența cADN HCV din clona 36, segmentul care se suprapune peste cADN NANBV al clonei 81 și secvența de polipeptidă codificată în clona 36.

-fig. 23, reprezintă secvența cADN HCV din clona 37b, segmentul care se suprapune peste clona 35 și polipeptida codificată în el.

-fig. 24 reprezintă autoradiografiile testului cPCR HCV pe ADN derivat din probele de ficat ale cimpanzeilor cu NANBH (-fig. 24A) și pe pacienți italieni cu NANBH (-fig. 24B).

-fig. 25, 26A și 26B, sunt grafice care arată corelația temporală între manifestarea distrugerii ficatului, prezența ARN HCV și prezența anticorpilor anti-HCV pentru doi cimpanzei cu NANBH.

-fig. 27 reprezintă secvența de nucleotidă cADN HCV în clona CA84a, aminoacizii codificați în ea și secvențele care se suprapun cu clona CA59a.

-fig. 28 reprezintă secvența cADN HCV în clona 40b, segmentul care se suprapune peste clona 37b și polipeptida codificată în el.

-fig. 29 este o autoradiografie care arată produșii marcați amplificați de aproximativ 300, 30 și 3 CID de genoame HCV.

-fig. 30 reprezintă secvența de nucleotide a cADN HCV în clona 40a.

-fig. 31 este o autoradiografie care arată produșii amplificați extinși din produși primari derivați de la regiunile conservate ale genomului HCV.

-fig. 32 reprezintă secvența de cADN HCV din clona 35, segmentul care se suprapune peste clona 36 și polipeptida codificată în el.

-fig. 33 este o diagramă care arată corelația dintre probele și produșii primari derivați de la regiunea 5' a ARN HCV, din care dunt derivate cADN-urile HCV în clonele ag30a și k9-1.

-fig. 34 este o autoradiografie a produșilor aplicati extinși din seturile de produși primari derivați de la ag30 a și k9-1.

-fig. 35 reprezintă secvențele de nucleotide aliniate ale izolatelor umane 23 și 27 și ale HCV1. Secvențele omoloage sunt indicate prin simbolul (*). Secvențele neomoloage sunt cu litere mici.

-fig. 36 reprezintă secvențele de aminoacizi aliniate ale izolatelor umane 23 și 27 și ale HCV1. Secvențele omoloage sunt indicate prin simbolul (*). Secvențele neomoloage sunt cu litere mici.

-fig. 37 reprezintă o reproducere cu semi-nuanță a unei autoradiografii a unei pete Northern de ARN izolate din ficatul unui cimpanzeu infectat BB-NANBV, probată cu cADN BB-NANBV din clona 81.

-fig. 38 reprezintă reproducerea cu semi-nuanță a unei autoradiografii de acizi nucleici extrași din particulele NANBV obținute din plasma infectată cu anti-NANB₅₋₁₋₁ și probați cu cADN NANBV marcat cu P³² din clona 81.

-fig. 39 reprezintă reproducerile autoradiografiilor filtrelor care conțin acizi nucleici izolați din NANBV, probați cu probe de ADN cu bandă plus și minus marcate cu P³² derivate de la cADN NANBV din clona 81.

-fig. 40 reprezintă secvența de nucleotide de consens a izolatului uman 23, secvențele variante fiind arătate sub linia secvenței. Aminoacizii codificați în secvența

consens sunt de asemenea arătați.

-fig. 41 reprezintă secvența consens de nucleotide a izolatului uman 27, secvențele variante fiind arătate sub linia secvenței. Aminoacizii codificați în secvența consens sunt de asemenea arătați.

-fig. 42 este un grafic care arată corelația între produșii inițiali (primerii) EnvL și EnvR și poliproteina flavivirus model și poliproteina posibilă HCV. 170

-fig. 43 reprezintă o comparație a secvențelor de nucleotide aliniate compuse ale izolatelor Thorn, EC1, HCT # 18 și HCV1.

-fig. 44 reprezintă o comparație a secvențelor de nucleotidă de EC10 și un compozit al secvenței HCV1; secvența EC10 este pe linia de deasupra punctelor și secvența HCV1 etse pe linia de sub punct. 175

-fig. 45 reprezintă o comparație a secvențelor de aminoacizi 117-308 (referitoare la HCV1) codificate în regiunile "EnvL" ale secvențelor consens ale izolatelor umane HCT # 18, JH23, JH 27, Thorne, EC1 și ale HCV1.

-fig. 46 reprezintă o comparație a secvențelor de aminoacizi 330-360 (referitoare la HCV1) codificate în regiunile "EnvR" ale secvențelor consens ale izolatelor umane HCT # 18, JH23, JH27, Thorne, EC1 și ale HCV1. 180

-fig. 47 reprezintă secvențele de nucleotide ale primerilor individuali în amestecul de primeri 5'-3.

Termenul "virusul hepatitei C" (HCV) a fost rezervat de specialiștii în acest domeniu pentru un agent etiologic al NANBH necunoscut până acum. Izolatul prototip al HCV a fost identificat în U.S.S.N. 122714 (vezi și E.P.O. publicația nr. 318216). Termenul HCV include de asemenea noile izolate ale acelorași specii virale. Ca o extindere a acestei terminologii, boala provocată de HCV, anterior denumită hepatita NANB născută în sânge (BB-NANBH), este denumită hepatita C. Termenii NANBH și hepatită C se pot utiliza în această descriere ca interschimbabili. 185 190

HCV este o specie virală ale cărei tulpini patogenice provoacă BB-NANBH. Pot exista de asemenea tulpini atenuate sau particule imperfecte care interferează derivate de la ele. După cum se va arăta mai jos, genomul HCV are constituit din ARN. Se știe că virusurile care conțin ARN au viteze relativ mari de mutație spontană, adică cele relatate a fi de ordinul a 10^{-3} până la 10^{-4} per nucleotidă încorporată (Fields și Knipe (1986) FUNDAMENTAL VIROLOGY (Raven Press N.V.). De aceea, având în vedere că heterogenitatea și fluiditatea genotipului sunt inerente la virusurile ARN, există multiple tulpini/izolate care pot fi virulente sau avirulente, în specia HCV. 195

S-au identificat câteva tulpini/izolate diferite de HCV (vezi mai jos). Un astfel de izolat sau de tulpină, care este un prototip, este denumit CDC/HCV1 (de asemenea numit HCV1). Informația de la o tulpină sau un izolat, cum este o secvență genomică parțială, este suficientă pentru a permite specialiștilor în acest domeniu să utilizeze tehnicile standard pentru a izola noi tulpini/izolate și pentru a identifica dacă aceste tulpini/izolate sunt HCV. De exemplu, mai jos sunt decsrise câteva tulpini/izolate diferite. Aceste tulpini, care au fost obținute dintr-o serie de seruri umane (și din zone geografice diferite) s-au izolat utilizând informația de la secvența genomică de HCV1. 200 205

Folosind metodele descrise în E.P.O. publicația nr. 318216 și cele de mai jos, au fost deduse structura genomică și secvența de nucleotide a ARN genomic HCV1. Genomul apare ca fiind un ARN ce conține aproximativ 10000 nucleotide. Genomul este răsucit pozitiv și posedă un cadru deschis de citire (ORF) continuu, translațional care codifică o poliproteină cu aproximativ 3000 aminoacizi. În ORF proteina(ele) structurală(e) reiese ca fiind codificată în aproximativ primul sfert al regiunii N terminale, cu majoritatea poliproteinei răspunzătoare de proteinele nestrustructurale. Când se compară cu toate secvențele virale cunoscute, se observă omologii mici dar însemnat coliniare la proteinele nestrustructurale ale familiei flavivirus și la pestivirusuri (care acum sunt considerate ca făcând parte din familia Flavivirus). 210 215

O aliniere schematică a regiunilor posibile ale poliproteinei flavivirale (utilizând virusul febrei galbene ca exemplu), și a poliproteinei posibile codificate în ORF major al genomului HCV este prezentată în fig. 20. În figură, sunt indicate domeniile posibile 220

ale poliproteinei HCV. Poliproteina Flavivirus conține, de la terminatia amino până la terminarea carboxil, proteina nucleocapsidei (C), proteina matrice (M), proteina de înveliș (E) și proteinele nestructurale (NS) 1, 2 (a+b) și 5. Bazat pe posibili aminoacizi codificați în secvența de nucleotide a HCV1, un mic domeniu la extrema cu terminatia N a poliproteinei HCV apare similar atât ca dimensiune cât și în conținutul ridicat de resturi bazice cu proteina nucleocapsidei (C) ce se găsește la terminatia N a poliproteinelor flavivirale. Proteinele nestructurale 2, 3, 4 și 5 (NS 2-5) ale HCV și ale virusului febrei galbene (YFV) reies ca având contrapărți de mărime și hidropaticitate similare, cu toate că există divergență între secvențele de aminoacizi. Însă, regiunea HCV care ar corespunde regiunilor poliproteinei YFV ce conține proteina M, E și NS1 nu diferă numai ca secvență, ci reiese ca fiind foarte diferită atât ca mărime cât și ca hidropaticitate. Astfel, dacă anumite domenii ale genomului HCV pot fi notate aici ca, de exemplu, HS1 sau NS2, trebuie să ne gândim că aceste notații sunt speculative; pot exista diferențe considerabile între familia HCV și flavivirusuri care trebuie totuși să fie luate în considerare.

Este de așteptat ca diferite tulpini, izolate sau subtipuri de HCV să conțină variații la aminoacizi și la acizii nucleici în comparație cu HCV1. Este de așteptat ca multe izolate să prezinte multă omologie (adică, mai mult de aproximativ 40%) în secvența totală de aminoacizi în comparație cu HCV1. Însă, se poate constata de asemenea că există alte izolate mai puțin omoloage cu HCV. Acestea vor fi definite ca HCV conform diferitelor criterii cum ar fi de exemplu un ORF de aproximativ 9000 nucleotide până la aproximativ 12000 nucleotide, care codifică o poliproteină similară ca dimensiune cu cea a HCV1, o poliproteină codificată cu caracter similar hidrofob și/sau antigenic cu cele ale HCV1 și prezența secvențelor de peptidă colineare care se conservă în HCV1. În plus se crede că genomul va fi un ARN răsucit pozitiv.

Toate izolatele HCV codifică cel puțin un epitop care este identificabil imunologic (adică cu reacție secundară imunologică) cu un epitop codificat în ADN-urile HCV descrise aici. De preferință epitopul este conținut într-o secvență de aminoacizi descrisă aici și este unic la HCV când se compară cu patogenii cunoscuți anterior. Unicitatea epitopului poate fi determinată prin reactivitatea sa imunologică cu anticorpii anti-HCV și lipsa reactivității sale imunologice cu anticorpii patogenilor cunoscuți.

Tulpinile și izolatele HCV sunt prezentate în evoluție de aceea, este de așteptat ca omologia generală a genoamelor la nivelul nucleotidelor să fie de aproximativ 40% sau mai mare, probabil să fie de aproximativ 50% sau mai mare, eventual de aproximativ 60% sau mai mare și chiar mai probabil de aproximativ 80% sau mai mare; și în plus este de așteptat să existe secvențe învecinate corespunzătoare de cel puțin aproximativ 13 nucleotide. Trebuie să se rețină, așa cum se arată mai jos, că există regiuni variabile și hipervariabile în genomul HCV; de aceea, omologia în aceste regiuni este de așteptat să fie mult mai mică decât în general în genom. Corespondența între secvența genomică posibilă a tulpinii HCV și, de exemplu, secvența cADN CDC/HCV1 se poate determina prin procedeele cunoscute în acest domeniu. De exemplu, ea se poate determina printr-o comparație directă a informației secvenței polinucleotidice din HCV posibil și secvența(e) cADN HCV descrisă(e) aici. De asemenea se poate determina prin hibridizarea polinucleotidelor în condiții în care se formează duplexuri stabile între regiunile omoloage (de exemplu, acelea care s-ar putea utiliza înainte de digestia S₁), urmată de digestia cu nuclează(e) specifică(e) cu o singură catenă, urmată de determinarea mărimii fragmentelor digerate.

Din cauza corelației evolutive a tulpinilor sau izolatelor HCV, tulpinile sau izolatele posibile HCV sunt identificate prin omologia lor la nivelul polipeptidei. În general, tulpinile sau izolatele HCV este de așteptat să fie cel puțin 40% omoloage, mai mult de aproximativ 50% omoloage, probabil mai mult de aproximativ 70% omoloage și chiar mai probabil să fie mai mult de aproximativ 80% omoloage, iar unele pot fi chiar mai mult de aproximativ 90% omoloage la nivelul polipeptidei. Procedeele pentru determinarea omologiei secvențelor de aminoacizi sunt cunoscute în acest domeniu. De exemplu, secvența de aminoacizi poate fi determinată direct și comparată cu secvențele prezentate aici. Un alt mod este ca secvența de nucleotide a materialului genomic al HCV posibil să se determine (de

obicei trecând prin intermediarul cADN], apoi să se determine secvența de aminoacizi posibilă codificată în aceasta și să se compare regiunile corespunzătoare.

Așa cum se folosește aici, termenul polinucleotidă "derivată de la" o secvență stabilită se referă la o secvență de polinucleotide care conține o secvență de aproximativ cel puțin 6 nucleotide, de preferință cel puțin aproximativ 8 nucleotide, mai preferabil cel puțin aproximativ 10-12 nucleotide și chiar mai preferabil cel puțin aproximativ 15-20 nucleotide care corespund la o regiune a secvenței de nucleotide stabilită. "Corespunzător" înseamnă omolog cu sau complementar la secvența stabilită. De preferință, secvența regiunii din care este derivată polinucleotida este omoloagă cu, sau complementară la o secvență care este unică pentru un genom HCV. Mai preferabil, secvența derivată este omoloagă sau complementară cu o secvență care este unică pentru toate sau pentru majoritatea izolatelor HCV. Faptul că o secvență este sau nu este unică pentru genomul HCV se poate determina prin procedeele cunoscute specialiștilor în acest domeniu. De exemplu, secvența poate fi comparată cu secvențele din băncile de date, de exemplu, Genbank, pentru a determina dacă este prezentă în gazda neinfectată sau în alte organisme neidentificate. Secvența mai poate fi comparată cu secvențele cunoscute ale altor agenți virali, inclusiv ale celor despre care se știe că induc hepatita, ca HAV, HBV și HDV și cu membri ai Flaviviridae. Corespondența sau ne-corespondența secvenței derivate cu alte secvențe se mai poate determina prin hibridizare în condiții de stringență adecvate. Metodele de hibridizare pentru determinarea complementarității secvențelor de acizi nucleici sunt cunoscute de specialiști și sunt discutate mai jos. Vezi de asemenea, de exemplu, Maniatis și alții (1982) MOLECULAR CLONING; A LABORATORY MANUAL. În plus, nepotririile polinucleotidelor duplex formate prin hibridizare se pot determina prin procedee cunoscute, printre care de exemplu digestia cu o nuclează cum este S1 care digeră în mod specific zonele cu o singură catenă din polinucleotidele duplex. Regiunile din care pot fi "derivate" secvențele tipice de ADN includ, dar nu se limitează, de exemplu, la regiunile care codifică epitopii specifici, precum și regiunile ne-transcrise și/sau ne-translatate.

Polinucleotida derivată nu este neapărat necesar să fie derivată fizic de la secvența de nucleotide arătată, ci poate să fie generată în orice mod, inclusiv, de exemplu, prin sinteză chimică sau prin replicarea ADN, sau prin transcripție sau transcripție inversă. În plus, combinații de regiuni care corespund cu cea a secvenței stabilite se pot modifica pe căi cunoscute de specialiști pentru a deveni utile scopului intenționat.

Termenul "polinucleotidă recombinantă", așa cum se folosește aici, înseamnă o polinucleotidă de origină genomică, cADN semisintetică sau sintetică care, în baza originii sale sau a manipulării: (1) nu se asociază cu o polinucleotidă în întregime sau o porțiune a acesteia, cu care în natură se asociază, (2) este legată de o polinucleotidă diferită de cea care este legată în natură, sau (3) nu există în natură.

Termenul "polinucleotidă" așa cum se folosește aici, se referă la forma polimeră a nucleotidelor de orice lungime, fie ribonucleotide, fie deoxiribonucleotide. Acest termen se referă numai la structura primară a moleculei. Astfel, acest termen include ADN și ARN cu o singură catenă și cu catenă dublă. De asemenea, mai include tipurile cunoscute de modificări, de exemplu marcaje care sunt cunoscute în domeniu, metilare, "capace", substituirea uneia sau a mai multor nucleotide existente natural cu un analog, modificări între nucleotide, de exemplu, cele cu legături neocupate (de exemplu metilfosfonați, fosfotriesteri, fosfoamidați, carbamați etc.) și cu legături ocupate (de exemplu fosforotioați, fosforoditioați etc.), cele care conțin radicalii ramificați, cum sunt de exemplu proteinele (incluzând de exemplu nucleazele, toximele, anticorpii, peptidele semnal, poli-L-lizina etc.), cele cu intercalatori (de exemplu acridina, psoralen* etc.), cele ce conțin agenți de chelatare (de exemplu metalele, metalele radioactive, borul, metalele oxidative etc.), cele care conțin agenți de alchilare, cele cu legăturile modificate (de exemplu, acizii nucleici anomeri alfa etc.), precum și formele nemodificate ale polinucleotidei.

Așa cum se folosește aici, termenul "bandă cu sens" a acidului nucleic conține secvența care are omologia de secvență cu cea a mARN. "Banda anti-sens" conține

o secvență care este complementată celei din "banda cu sens".

Așa cum se folosește aici, un "genom răsucit pozitiv" al unui virus este unul în care genomul, ARN sau ADN, este cu o singură bandă și care codifică o polipeptidă virală sau mai multe. Exemple de virusuri ARN răsucite pozitiv sunt Togaviridae, Coronaviridae, Retroviridae care au fost anterior clasificate la Togaviridae [vezi Fields & Knipe (1986)].

Termenul "primer" (produs primar) așa cum este folosit aici se referă la un oligomer care este capabil să acționeze ca punct de inițiere a sintezei unei benzi de polinucleotide când este pus în condiții adecvate. Produsul primar va fi complet sau în cea mai mare parte complementar la o regiune a benzii de polinucleotide ce trebuie copiată.

Astfel, în condiții care conduc la hibridizare, produsul primar se va lega de regiunea complementară a benzii analitice. În timpul adăugării reactanților corespunzători (de exemplu, o polimerază, nucleotidtrifosfați și altele asemenea), produsul primar este mărit de către agentul de polimerizare pentru a forma o copie a benzii analitice. Produsul primar poate fi cu o singură bandă sau poate fi parțial sau în întregime cu bandă dublă.

Termenii "polinucleotidă analitică" și "bandă analitică" se referă la o moleculă de acid nucleic cu o singură bandă sau cu o singură bandă sau cu bandă dublă care se presupune că conține o secvență țintă și care poate fi prezentă în proba biologică.

Așa cum se folosește aici, termenul "oligomer" se referă la produșii primari și la probe. Termenul oligomer nu sugerează mărimea moleculei. Iată, de obicei oligomerii nu sunt mai mari de 1000 nucleotide, mai specific nu sunt mai mari de 500 nucleotide, chiar mai specific nu sunt mai mari de 250 nucleotide; ei pot să fie nu mai mari de 100 nucleotide, de asemenea pot fi nu mai mari de 50 nucleotide în lungime.

Așa cum se folosește aici, termenul "probă" se referă la o structură care conține o polinucleotidă ce formează o structură hibridă cu o secvență țintă, datorită complementarității a cel puțin o secvență din probă cu o secvență din regiunea țintă. Regiunile de polinucleotide ale probelor pot fi compuse din ADN și/sau ARN și/sau analogi sintetici ai nucleotidelor. În probe sunt incluse și "Probele captură" și "probele marcate". De preferință probele nu conțin o secvență complementară la secvența(e) utilizată(e) pentru a amorsa reacția în lanț a polimerazei (PCR).

Așa cum este folosit aici, termenul "regiune țintă" se referă la o regiune de acid nucleic care urmează să fie amplificată și/sau detectată. Termenul "secvență țintă" se referă la o secvență cu care o probă sau un produs primar va forma un hibrid stabil în condițiile dorite.

Termenul "probă captură" așa cum se folosește aici se referă la o polinucleotidă care constă dintr-o polinucleotidă cu o singură bandă cuplată cu un partener liant. Polinucleotida cu o singură bandă este formată dintr-o secvență de polinucleotidă care produce ținta, care este complementară cu o secvență țintă într-o regiune țintă ce trebuie determinată în polinucleotida analitică. Această regiune complementară are o lungime și o complementaritate suficiente pentru secvența țintă pentru a obține un duplex cu stabilitate care este suficient pentru a imobiliza polinucleotida analitică pe o suprafață solidă (cu ajutorul partenerilor de legătură). Partenerul liant este specific pentru un al doilea partener liant; al doilea partener liant se poate lega de suprafața unui suport solid, sau poate fi legat indirect prin intermediul altor structuri sau parteneri lianți de un suport solid.

Termenul "secvență de polinucleotidă ce produce ținta" așa cum se folosește aici, se referă la o secvență de polinucleotidă care constă din nucleotide ce sunt complementare la o secvență de nucleotide țintă; secvența are lungimea și complementaritatea cu secvența țintă suficiente pentru a forma un duplex care are stabilitate suficientă pentru scopul intenționat.

Termenul "partener liant" așa cum se folosește aici, se referă la o moleculă capabilă să lege o moleculă ligant cu specificitate mare, ca de exemplu un antigen și un anticorp specific al său. În general, partenerii specifici de legare trebuie să lege cu suficientă afinitate pentru a imobiliza copia analitică/duplexul cu bandă complementară (în cazul probelor captură) în condiții de izolare. Partenerii lianți specifici sunt cunoscuți în acest

domeniu și sunt, de exemplu, biotin și avidin sau streptavidin, IgA și proteina A, numeroasele cupluri receptor-ligand cunoscute și benzile de polinucleotidă complementare. În cazul partenerilor lianți care sunt de polinucleotidă complementară, partenerii de obicei au cel puțin aproximativ 15 baze în lungime și pot fi de cel puțin 40 baze în lungime; în plus, ei au un conținut de Gs și Cs de cel puțin aproximativ 40% și mergând până la aproximativ 60%. Polinucleotidele pot fi compuse din ADN, ARN, sau nucleotide anologice sintetice.

390

Termenul "cuplat" așa cum se folosește aici, se referă la etanșarea prin legături covalente sau prin interacțiuni puternice necovalente (de exemplu, interacțiunile hidrofobe, legăturile de hidrogen etc.). Legăturile covalente pot fi, de exemplu, legături de ester, eter, fosfoester, amidă, peptidă, imidă, legături sulf-carbon, legături carbon-fosfor și alte.

395

Termenul "suport" se referă la orice suprafață solidă sau semisolidă de care poate fi fixat un partener de legare dorit. Ca suporturi corespunzătoare sunt sticla, materialele plastice, metale, geluri polimer și altele, și pot avea formă de biluțe, corpuri scobite, membrane și altele.

400

Termenul "marcat" așa cum se folosește aici, se referă la orice atom sau radical care se poate utiliza pentru a produce un semnal detectabil (de preferință măsurabil) și care se poate atașa la o polinucleotidă sau o polipeptidă.

Așa cum se folosește aici, termenul "probă marcată" se referă la un oligomer care este format din secvența de polinucleotidă ce produce ținta, care este complementară la secvența țintă ce trebuie detectată în polinucleotida analitică. Această regiune complementară are o lungime și o complementaritate la secvența țintă suficiente pentru a permite obținerea unui duplex ce constă din "proba marcată" și "secvența marcată" ce trebuie detectată de elementul marcator. Oligomerul se cuplează cu marcatorul fie direct, fie indirect prin intermediul unui set de molecule ligand cu specificitate mare unul pentru altul. Seturi de molecule ligand cu specificitate mare au fost descrise mai sus și mai cuprind și multimeri.

405

410

Termenul "multimeri", așa cum este folosit aici, se referă la polimeri liniari sau ramificați cu aceleași unități de polinucleotidă cu o singură bandă. Cel puțin una dintre unități are o secvență, lungime și o compoziție care îi permite să hibridizeze specific pe o primă secvență de nucleotidă cu o singură bandă de interes, de obicei un produs de analizat sau un oligomer (de exemplu o probă marcată) legată de un produs de analizat. În scopul de a obține o astfel de specificitate și stabilitate, această unitate în mod normal va avea cel puțin aproximativ 15 nucleotide în lungime, de obicei nu mai mult de aproximativ 50 nucleotide în lungime și de preferință aproximativ 30 nucleotide în lungime; de asemenea, conținutul de Gs și Cs va fi în mod normal de cel puțin aproximativ 40% și de cele mai multe ori de 60%. Pe lângă asemenea unitate(tăți), în multimer sunt incluse o multitudine de unități care sunt capabile să hibridizeze specific și sunt stabile față de o a doua nucleotidă de interes cu o singură bandă, de obicei o polinucleotidă marcată sau un alt multimer. Aceste unități sunt în general aproximativ de aceeași mărime și compoziție ca și multimerii discutați mai sus. Când un multimer este destinat să fie hibridizat pe un alt multimer, prima și a doua dintre unitățile de oligonucleotidă sunt eterogene (diferite) și nu hibridizează una cu alta în condițiile de încercare alese. Astfel, multimerii pot fi probe marcate sau pot fi liganzi care cuplează marcatorul pe probă.

415

420

425

430

Așa cum se folosește aici, termenul "ARN viral", care include ARN HCV, se referă la ARN din genomul viral, fragmentele acestuia, transcriptiile acestuia și secvențele mutante derivate de la el.

Așa cum se folosește aici, o "probă biologică" se referă la o probă de țesut sau fluid izolat de la un individ, incluzând dar nelimitându-se la acesta, de exemplu, plasmă, ser, fluid din șira spinării, fluid din limfă, secțiunile externe ale pielii, respiratorii, intestinale și ale tractelor genitourinare, lacrimi, salivă, lapte, celule sanguine, tumori, organe, precum și probe ale constituenților culturilor de celule *in vivo* (incluzând, dar nelimitându-se la mediul condiționat rezultat de la creșterea celulelor în mediul de cultură de celule, celulele probabil infectate viral, celulele recombinante și componentele de celule).

435

440

În realizarea invenției se vor întrebuița, dacă nu se indică în alt fel, procedeele cunoscute din chimie, biologie moleculară, microbiologie, ADN recombinant și imunologic, care sunt din stadiul tehnicii. Aceste procedee sunt explicate în întregime în literatura de specialitate. Vezi, de exemplu, Maniatis, Fritsch & Sambrook, *Molecular cloning; A Laboratory manual* (1982); *DNA CLONING, volumele I și II* (D.N. Glover ed. 1985); *Oligonucleotide synthesis* (M.J. Gait ed. 1984); *Nucleic acid hybridization* (editori B.D. Hames & S.J. Jiggins, 1984); seriile *Methods in enzymology* (Academic Press, Inc.), mai ales volumul 154 și volumul 155 (Wu și Grossman, și Wu ca editori respectiv). Toate brevetele de invenție, cererile de brevet de invenție și publicațiile menționate aici mai sus care vor urma fac parte din referințele bibliografice ale invenției de față.

Materialele și procedeele utile pentru prezenta invenție se pot realiza prin identificarea HCV ca agent etiologic al BB-NANBV și prin prevederea unei familii de secvențe de nucleotide izolate din colecțiile de cADN care conțin secvențele cADN HCV. Aceste colecții de cADN sunt derivate de la secvențele de acid nucleic prezente în plasma unui cimpanzeu infectat cu HCV. Construirea uneia din aceste colecții, colecția "c" (ATCC nr. 40394) este descrisă în publicația **E.P.O. 318216**.

Utilizând secvențele cADN HCV descrise mai sus, precum și cele descrise în prezenta invenție, pot fi construiți oligomeri care sunt utili ca reactivi pentru detectarea polinucleotidelor virale în probele biologice. De exemplu, din secvențe este posibil să se sintetizeze oligomeri ADN de aproximativ 8-10 nucleotide, sau mai mari, care sunt utili ca probe de hibridizare pentru detectarea prezenței ARN HCV, de exemplu în sângele donat, fracțiunile de sânge, ser de la subiecți suspecțati că adăpostesc virusul, sau sisteme de culturi de celule în care virusul este replicat. În plus, noii oligomeri descriși aici permit caracterizarea în continuare a genomului HCV.

Probele și primerii de polinucleotide derivați de la aceste secvențe se pot întrebuița pentru a amplifica secvențele prezente în colecțiile cADN și/sau pentru a selecta colecțiile de cADN pentru supraunerea în plus a secvențelor cADN, care, la rândul lor, pot fi utilizate pentru a obține mai multe secvențe de suprapunere. Așa cum se va indica în continuare și cum se arată în publicația E.P.O. nr. 318216, genomul de HCV pare să fie cuprins în ARN în principal cu un cadru de citire deschis (ORF) mare care codifică o poliproteină mare.

În plus față de cele de mai sus, informațiile ce se vor da în continuare permit identificarea altor tulpini și izolate de HCV. Izolarea și caracterizarea acestor noi tulpini și izolate de HCV se pot realiza folosind procedeele cunoscute de cei ce sunt specialiști în acest domeniu, de exemplu, prin izolarea acizilor nucleici din componentele corpului care conțin particulele virale și/sau ARN viral, crearea de colonii de cADN utilizând oligomerii descriși mai jos pentru selectarea coloniilor pentru clonele care conțin secvențele cADN HCV prezentate mai jos, și compararea cADN-urilor HCV din noile izolate cu cADN-urile descrise în publicația E.P.O. nr. 318216 și mai jos. Tulpinile sau izolatele care se potrivesc cu parametrii HCV, care au fost prezentați mai sus la capitolul de definiții, se pot identifica ușor. Alte metode pentru identificarea tulpinilor de HCV sunt evidente pentru specialiștii din acest domeniu, pe baza informațiilor date în prezenta invenție.

Izolarea secvențelor de cADN HCV

Oligomerii din prezenta invenție conțin regiuni care formează structuri duplex hibride cu secvențe marcate în polinucleotidele HCV. Regiunile polinucleotidei HCV care se hibridizează din acești oligomeri pot fi stabilite din secvența(e) de cADN HCV realizată aici și descrise în publicația E.P.O. nr. 318216. Un compozit de cADN HCV din HCV1, un prototipic HCV, este arătat în fig. 18. Secvența compozită se bazează pe informația de secvență derivată de la o serie de clone cADN HCV, care au fost izolate dintr-o serie de colonii cADN HCV, inclusiv colonia "c" prezentă în gt11 lambda (ATCC nr. 40394), și din serul uman. Clonele cADN HCV sau fost izolate prin metode descrise în publicația **E.P.O.318216**. Pe scurt, majoritatea clonelor care au fost izolate conțin secvențe din colonia "c" a cADN HCV care a fost construită utilizând serul adunat de la un cimpanzeu cu infecție cronică HCV și care conține un titru mare de virus, adică cel puțin 10^5 doze infecțioase de cimpanzeu/ml (CID/ml). Serul colectat a fost utilizat pentru a izola

particulele virale; acizii nucleici izolați din aceste particule s-au folosit ca model în construcția coloniilor de cADN pe genomul viral. Clona inițială, 5-1-1 s-a obținut prin separarea coloniei "c" cu serul de la indivizii infectați. După izolarea clonei inițiale, restul de secvență s-a obținut prin selectarea cu probe sintetice de polinucleotide, secvențele cărora au fost derivate de la regiunea 5' și regiunea 3' a secvenței(lor) cADN HCV cunoscută(e).

Descrierea metodelor de recuperare a secvențelor cADN este în cea mai mare parte de interes istoric. Secvențele obținute (și complementele lor) sunt date aici și secvențele, sau orice porțiune a lor, se pot prepara utilizând metodele de sinteză sau printr-o combinație a metodelor de sinteză cu recuperarea secvențelor parțiale folosind metode similare cu cele descrise în publicația **E.P.O. 318216**.

Problele și primerii oligomeri

Folosind ca bază genomul HCV (așa cum este redat în fig. 18), și/sau de preferință regiunile conservate ale genomului HCV, se pot prepara oligomeri de aproximativ 8 nucleotide sau mai mult, care hibridizează cu banda (benzile) pozitivă(e) ARN HCV sau cu complementul său, precum și pe cADN-urile HCV. Acești oligomeri pot servi ca probe pentru detectarea (inclusiv izolarea și/sau marcarea) polinucleotidelor care conțin secvențe de nucleotidă HCV și/sau ca primeri pentru transcripția și/sau replicarea secvențelor HCV însemnate. Oligomerii conțin o secvență de polinucleotidă de însemnare, care este constituită din nucleotide ce sunt completare la o secvență de nucleotidă HCV țintă; secvența are o lungime și o complementaritate suficiente față de secvența HCV pentru a forma un duplex care este de o stabilitate suficientă pentru scopul intenționat. De exemplu, dacă scopul este izolarea, prin imobilizare, a unei probe analitice care conține o secvență HCV țintă, oligomerii vor conține o regiune de polinucleotidă care are o lungime și o complementaritate suficiente față de secvența HCV însemnată pentru a crea o stabilitate suficientă a duplexului la imobilizarea analitului pe o suprafață solidă, prin legarea sa de oligomeri, în condițiile de izolare. De asemenea, de exemplu, dacă oligomerii urmează să fie folosiți ca primeri pentru transcripția și/sau replicarea secvențelor HCV țintă într-o polinucleotidă de lungime și complementaritate suficiente în raport cu secvența HCV însemnată pentru a permite agentului de polimerizare să continue replicarea de la primerii care sunt în formă stabilă de duplex cu secvența țintă, în condițiile de polimerizare. De asemenea, de exemplu, dacă oligomerii urmează să se întrebuinteze ca probe marcate, sau urmează să se lege de multimeri regiunea de polinucleotidă de însemnare va avea lungimea și complementaritatea suficiente pentru a forma structuri duplex hibride stabile cu probe marcate și/sau multimerii și a permite detectarea duplexului. Oligomerii pot conține minimum aproximativ 4 nucleotide învecinate care sunt complementare la secvența HCV însemnată; de obicei oligomerii vor conține un minimum de aproximativ 8 nucleotide învecinate și de preferință vor conține minimum aproximativ 14 nucleotide învecinate care sunt complementare la secvența HCV însemnată.

Secvențele de nucleotide HCV pentru însemnare corespunzătoare pot fi constituite din nucleotide care sunt nucleotide complementare alese dintre următoarele nucleotide cADN HCV, care sunt redată în fig. 18, (nn_x - nn_y reiese din numărul aproximativ de nucleotide x raportat la numărul aproximativ de nucleotide y):

nn_{340} - nn_{330} ; nn_{330} - nn_{320} ; nn_{320} - nn_{310} ;
 nn_{310} - nn_{300} ; nn_{300} - nn_{290} ; nn_{290} - nn_{280} ;
 nn_{280} - nn_{270} ; nn_{270} - nn_{260} ; nn_{260} - nn_{250} ;
 nn_{250} - nn_{240} ; nn_{230} - nn_{230} ; nn_{230} - nn_{220} ;
 nn_{220} - nn_{210} ; nn_{210} - nn_{200} ; nn_{200} - nn_{190} ;
 nn_{190} - nn_{180} ; nn_{180} - nn_{170} ; nn_{170} - nn_{160} ;
 nn_{160} - nn_{150} ; nn_{150} - nn_{140} ; nn_{140} - nn_{130} ;
 nn_{130} - nn_{120} ; nn_{120} - nn_{110} ; nn_{110} - nn_{100} ;
 nn_{100} - nn_{90} ; nn_{90} - nn_{80} ; nn_{80} - nn_{70} ;
 nn_{70} - nn_{60} ; nn_{60} - nn_{50} ; nn_{50} - nn_{40} ;
 nn_{40} - nn_{30} ; nn_{30} - nn_{20} ; nn_{20} - nn_{10} ;
 nn_{10} - nn_1 ; nn_1 - nn_{10} ; nn_{10} - nn_{20} ; nn_{20} - nn_{30} ;
 nn_{30} - nn_{40} ; nn_{40} - nn_{50} ; nn_{50} - nn_{60} ; nn_{60} - nn_{70} ;
 nn_{70} - nn_{80} ; nn_{80} - nn_{90} ; nn_{90} - nn_{100} ; nn_{100} - nn_{100} ;
 nn_{110} - nn_{120} ; nn_{120} - nn_{130} ; nn_{130} - nn_{140} ;
 nn_{140} - nn_{150} ; nn_{150} - nn_{160} ; nn_{160} - nn_{170} ;
 nn_{170} - nn_{180} ; nn_{180} - nn_{190} ; nn_{190} - nn_{200} ;
 nn_{200} - nn_{210} ; nn_{210} - nn_{220} ; nn_{220} - nn_{230} ;

RO 113059 B1

nn230 - nn240; nn240 - nn250; nn250 - nn260;
 560 nn260 - nn270; nn270 - nn280; nn280 - nn290;
 nn290 - nn300; nn300 - nn310; nn310 - nn320;
 nn320 - nn330; nn330 - nn340; nn340 - nn350;
 565 nn350 - nn360; nn360 - nn370; nn370 - nn380;
 nn380 - nn390; nn390 - nn400; nn400 - nn410;
 nn410 - nn420; nn420 - nn430; nn430 - nn440;
 nn440 - nn450; nn450 - nn460; nn460 - nn470;
 570 nn470 - nn480; nn480 - nn490; nn490 - nn500;
 nn500 - nn510; nn510 - nn520; nn520 - nn530;
 nn530 - nn540; nn540 - nn550; nn550 - nn560;
 575 nn560 - nn570; nn570 - nn580; nn580 - nn590;
 nn590 - nn600; nn600 - nn610; nn610 - nn620;
 nn620 - nn630; nn630 - nn640; nn640 - nn650;
 580 nn650 - nn660; nn660 - nn670; nn670 - nn680;
 nn680 - nn690; nn690 - nn700; nn700 - nn710;
 nn710 - nn720; nn720 - nn730; nn730 - nn740;
 585 nn740 - nn750; nn750 - nn760; nn760 - nn770;
 nn770 - nn780; nn780 - nn790; nn790 - nn800;
 nn800 - nn810; nn810 - nn820; nn820 - nn830;
 nn830 - nn840; nn840 - nn850; nn850 - nn860;
 590 nn860 - nn870; nn870 - nn880; nn880 - nn890;
 nn890 - nn900; nn900 - nn910; nn910 - nn920;
 nn920 - nn930; nn930 - nn940; nn940 - nn950;
 595 nn950 - nn960; nn960 - nn970; nn970 - nn980;
 nn980 - nn990; nn990 - nn1000; nn1000 - nn1010;
 nn1010 - nn1020; nn1020 - nn1030; nn1030 - nn1040;
 600 nn1040 - nn1050; nn1050 - nn1060; nn1060 - nn1070;
 nn1070 - nn1080; nn1080 - nn1090; nn1090 - nn1100;
 nn1100 - nn1110; nn1110 - nn1120; nn1120 - nn1130;
 605 nn1130 - nn1140; nn1140 - nn1150; nn1150 - nn1160;
 nn1160 - nn1170; nn1170 - nn1180; nn1180 - nn1190;
 nn1190 - nn1200; nn1200 - nn1210; nn1210 - nn1220;
 610 nn1220 - nn1230; nn1230 - nn1240; nn1240 - nn1250;
 nn1250 - nn1260; nn1260 - nn1270; nn1270 - nn1280;
 nn1280 - nn1290; nn1290 - nn1300; nn1300 - nn1310;

RO 113059 B1

nn1310	-	nn1320;	nn1320	-	nn1330;	nn1330	-	nn1340;	620
nn1340	-	nn1350;	nn1350	-	nn1360;	nn1360	-	nn1370;	
nn1370	-	nn1380;	nn1380	-	nn1390;	nn1390	-	nn1400;	
nn1400	-	nn1410;	nn1410	-	nn1420;	nn1420	-	nn1430;	
nn1430	-	nn1440;	nn1440	-	nn1450;	nn1450	-	nn1460;	625
nn1460	-	nn1470;	nn1470	-	nn1480;	nn1480	-	nn1490;	
nn1490	-	nn1500;	nn1500	-	nn1510;	nn1510	-	nn1520;	
nn1520	-	nn1530;	nn1530	-	nn1540;	nn1540	-	nn1550;	630
nn1550	-	nn1560;	nn1560	-	nn1570;	nn1570	-	nn1580;	
nn1580	-	nn1590;	nn1590	-	nn1600;	nn1600	-	nn1610;	
nn1610	-	nn1620;	nn1620	-	nn1630;	nn1630	-	nn1640;	635
nn1640	-	nn1650;	nn1650	-	nn1660;	nn1660	-	nn1670;	
nn1670	-	nn1680;	nn1680	-	nn1690;	nn1690	-	nn1700;	
nn1700	-	nn1710;	nn1710	-	nn1720;	nn1720	-	nn1730;	640
nn1730	-	nn1740;	nn1740	-	nn1750;	nn1750	-	nn1760;	
nn1760	-	nn1770;	nn1770	-	nn1780;	nn1780	-	nn1790;	
nn1790	-	nn1800;	nn1800	-	nn1810;	nn1810	-	nn1820;	
nn1820	-	nn1830;	nn1830	-	nn1840;	nn1840	-	nn1850;	645
nn1850	-	nn1860;	nn1860	-	nn1870;	nn1870	-	nn1880;	
nn1880	-	nn1890;	nn1890	-	nn1900;	nn1900	-	nn1910;	
nn1910	-	nn1920;	nn1920	-	nn1930;	nn1930	-	nn1940;	650
nn1940	-	nn1950;	nn1950	-	nn1960;	nn1960	-	nn1970;	
nn1970	-	nn1980;	nn1980	-	nn1990;	nn1990	-	nn2000;	
nn2000	-	nn2010;	nn2010	-	nn2020;	nn2020	-	nn2030;	655
nn2030	-	nn2040;	nn2040	-	nn2050;	nn2050	-	nn2060;	
nn2060	-	nn2070;	nn2070	-	nn2080;	nn2080	-	nn2090;	
nn2090	-	nn2100;	nn2100	-	nn2110;	nn2110	-	nn2120;	660
nn2120	-	nn2130;	nn2130	-	nn2140;	nn2140	-	nn2150;	
nn2150	-	nn2160;	nn2160	-	nn2170;	nn2170	-	nn2180;	
nn2180	-	nn2190;	nn2190	-	nn2200;	nn2200	-	nn2210;	
nn2210	-	nn2220;	nn2220	-	nn2230;	nn2230	-	nn2240;	665
nn2240	-	nn2250;	nn2250	-	nn2260;	nn2260	-	nn2270;	
nn2270	-	nn2280;	nn2280	-	nn2290;	nn2290	-	nn2300;	
nn2300	-	nn2310;	nn2310	-	nn2320;	nn2320	-	nn2330;	670
nn2330	-	nn2340;	nn2340	-	nn2350;	nn2350	-	nn2360;	
nn2360	-	nn2370;	nn2370	-	nn2380;	nn2380	-	nn2390;	

RO 113059 B1

680 nn2390 - nn2400; nn2400 - nn2410; nn2410 - nn2420;
 nn2420 - nn2430; nn2430 - nn2440; nn2440 - nn2450;
 nn2450 - nn2460; nn2460 - nn2470; nn2470 - nn2480;
 685 nn2480 - nn2490; nn2490 - nn2500; nn2500 - nn2510;
 nn2510 - nn2520; nn2520 - nn2530; nn2530 - nn2540;
 nn2540 - nn2550; nn2550 - nn2560; nn2560 - nn2570;
 nn2570 - nn2580; nn2580 - nn2590; nn2590 - nn2600;
 690 nn2600 - nn2610; nn2610 - nn2620; nn2620 - nn2630;
 nn2630 - nn2640; nn2640 - nn2650; nn2650 - nn2660;
 nn2660 - nn2670; nn2670 - nn2680; nn2680 - nn2690;
 695 nn2690 - nn2700; nn2700 - nn2710; nn2710 - nn2720;
 nn2720 - nn2730; nn2730 - nn2740; nn2740 - nn2750;
 nn2750 - nn2760; nn2760 - nn2770; nn2770 - nn2780;
 700 nn2780 - nn2790; nn2790 - nn2800; nn2800 - nn2810;
 nn2810 - nn2820; nn2820 - nn2830; nn2830 - nn2840;
 nn2840 - nn2850; nn2850 - nn2860; nn2860 - nn2870;
 nn2870 - nn2880; nn2880 - nn2890; nn2890 - nn2900;
 705 nn2900 - nn2910; nn2910 - nn2920; nn2920 - nn2930;
 nn2930 - nn2940; nn2940 - nn2950; nn2950 - nn2960;
 nn2960 - nn2970; nn2970 - nn2980; nn2980 - nn2990;
 710 nn2990 - nn3000; nn3000 - nn3010; nn3010 - nn3020;
 nn3020 - nn3030; nn3030 - nn3040; nn3040 - nn3050;
 nn3050 - nn3060; nn3060 - nn3070; nn3070 - nn3080;
 715 nn3080 - nn3090; nn3090 - nn3100; nn3100 - nn3110;
 nn3110 - nn3120; nn3120 - nn3130; nn3130 - nn3140;
 nn3140 - nn3150; nn3150 - nn3160; nn3160 - nn3170;
 720 nn3170 - nn3180; nn3180 - nn3190; nn3190 - nn3200;
 nn3200 - nn3210; nn3210 - nn3220; nn3220 - nn3230;
 nn3230 - nn3240; nn3240 - nn3250; nn3250 - nn3260;
 nn3260 - nn3270; nn3270 - nn3280; nn3280 - nn3290;
 725 nn3290 - nn3300; nn3300 - nn3310; nn3310 - nn3320;
 nn3320 - nn3330; nn3330 - nn3340; nn3340 - nn3350;
 nn3350 - nn3360; nn3360 - nn3370; nn3370 - nn3380;
 730 nn3380 - nn3390; nn3390 - nn3400; nn3400 - nn3410;
 nn3410 - nn3420; nn3420 - nn3430; nn3430 - nn3440;
 nn3440 - nn3450; nn3450 - nn3460; nn3460 - nn3470;

735

RO 113059 B1

nn3470	-	nn3480;	nn3480	-	nn3490;	nn3490	-	nn3500;	740
nn3500	-	nn3510;	nn3510	-	nn3520;	nn3520	-	nn3530;	
nn3530	-	nn3540;	nn3540	-	nn3550;	nn3550	-	nn3560;	
nn3560	-	nn3570;	nn3570	-	nn3580;	nn3580	-	nn3590;	745
nn3590	-	nn3600;	nn3600	-	nn3610;	nn3610	-	nn3620;	
nn3620	-	nn3630;	nn3630	-	nn3640;	nn3640	-	nn3650;	
nn3650	-	nn3660;	nn3660	-	nn3670;	nn3670	-	nn3680;	750
nn3680	-	nn3690;	nn3690	-	nn3700;	nn3700	-	nn3710;	
nn3710	-	nn3720;	nn3720	-	nn3730;	nn3730	-	nn3740;	
nn3740	-	nn3750;	nn3750	-	nn3760;	nn3760	-	nn3770;	755
nn3770	-	nn3780;	nn3780	-	nn3790;	nn3790	-	nn3800;	
nn3800	-	nn3810;	nn3810	-	nn3820;	nn3820	-	nn3830;	
nn3830	-	nn3840;	nn3840	-	nn3850;	nn3850	-	nn3860;	
nn3860	-	nn3870;	nn3870	-	nn3880;	nn3880	-	nn3890;	760
nn3890	-	nn3900;	nn3900	-	nn3910;	nn3910	-	nn3920;	
nn3920	-	nn3930;	nn3930	-	nn3940;	nn3940	-	nn3950;	
nn3950	-	nn3960;	nn3960	-	nn3970;	nn3970	-	nn3980;	765
nn3980	-	nn3990;	nn3990	-	nn4000;	nn4000	-	nn4010;	
nn4010	-	nn4020;	nn4020	-	nn4030;	nn4030	-	nn4040;	
nn4040	-	nn4050;	nn4050	-	nn4060;	nn4060	-	nn4070;	770
nn4070	-	nn4080;	nn4080	-	nn4090;	nn4090	-	nn4100;	
nn4100	-	nn4110;	nn4110	-	nn4120;	nn4120	-	nn4130;	
nn4130	-	nn4140;	nn4140	-	nn4150;	nn4150	-	nn4160;	775
nn4160	-	nn4170;	nn4170	-	nn4180;	nn4180	-	nn4190;	
nn4190	-	nn4200;	nn4200	-	nn4210;	nn4210	-	nn4220;	
nn4220	-	nn4230;	nn4230	-	nn4240;	nn4240	-	nn4250;	
nn4250	-	nn4260;	nn4260	-	nn4270;	nn4270	-	nn4280;	780
nn4280	-	nn4290;	nn4290	-	nn4300;	nn4300	-	nn4310;	
nn4310	-	nn4320;	nn4320	-	nn4330;	nn4330	-	nn4340;	
nn4340	-	nn4350;	nn4350	-	nn4360;	nn4360	-	nn4370;	785
nn4370	-	nn4380;	nn4380	-	nn4390;	nn4390	-	nn4400;	
nn4400	-	nn4410;	nn4410	-	nn4420;	nn4420	-	nn4430;	
nn4430	-	nn4440;	nn4440	-	nn4450;	nn4450	-	nn4460;	790
nn4460	-	nn4470;	nn4470	-	nn4480;	nn4480	-	nn4490;	
nn4490	-	nn4500;	nn4500	-	nn4510;	nn4510	-	nn4520;	
nn4520	-	nn4530;	nn4530	-	nn4540;	nn4540	-	nn4550;	795

RO 113059 B1

800

nn4550 - nn4560; nn4560 - nn4570; nn4570 - nn4580;
 nn4580 - nn4590; nn4590 - nn4600; nn4600 - nn4610;
 805 nn4610 - nn4620; nn4620 - nn4630; nn4630 - nn4640;
 nn4640 - nn4650; nn4650 - nn4660; nn4660 - nn4670;
 nn4670 - nn4680; nn4680 - nn4690; nn4690 - nn4700;
 nn4700 - nn4710; nn4710 - nn4720; nn4720 - nn4730;
 810 nn4730 - nn4740; nn4740 - nn4750; nn4750 - nn4760;
 nn4760 - nn4770; nn4770 - nn4780; nn4780 - nn4790;
 nn4790 - nn4800; nn4800 - nn4810; nn4810 - nn4820;
 815 nn4820 - nn4830; nn4830 - nn4840; nn4840 - nn4850;
 nn4850 - nn4860; nn4860 - nn4870; nn4870 - nn4880;
 nn4880 - nn4890; nn4890 - nn4900; nn4900 - nn4910;
 820 nn4910 - nn4920; nn4920 - nn4930; nn4930 - nn4940;
 nn4940 - nn4950; nn4950 - nn4960; nn4960 - nn4970;
 nn4970 - nn4980; nn4980 - nn4990; nn4990 - nn5000;
 nn5000 - nn5010; nn5010 - nn5020; nn5020 - nn5030;
 825 nn5030 - nn5040; nn5040 - nn5050; nn5050 - nn5060;
 nn5060 - nn5070; nn5070 - nn5080; nn5080 - nn5090;
 nn5090 - nn5100; nn5100 - nn5110; nn5110 - nn5120;
 830 nn5120 - nn5130; nn5130 - nn5140; nn5140 - nn5150;
 nn5150 - nn5160; nn5160 - nn5170; nn5170 - nn5180;
 nn5180 - nn5190; nn5190 - nn5200; nn5200 - nn5210;
 835 nn5210 - nn5220; nn5220 - nn5230; nn5230 - nn5240;
 nn5240 - nn5250; nn5250 - nn5260; nn5260 - nn5270;
 nn5270 - nn5280; nn5280 - nn5290; nn5290 - nn5300;
 nn5300 - nn5310; nn5310 - nn5320; nn5320 - nn5330;
 840 nn5330 - nn5340; nn5340 - nn5350; nn5350 - nn5360;
 nn5360 - nn5370; nn5370 - nn5380; nn5380 - nn5390;
 nn5390 - nn5400; nn5400 - nn5410; nn5410 - nn5420;
 845 nn5420 - nn5430; nn5430 - nn5440; nn5440 - nn5450;
 nn5450 - nn5460; nn5460 - nn5470; nn5470 - nn5480;
 nn5480 - nn5490; nn5490 - nn5500; nn5500 - nn5510;
 850 nn5510 - nn5520; nn5520 - nn5530; nn5530 - nn5540;
 nn5540 - nn5550; nn5550 - nn5560; nn5560 - nn5570;
 nn5570 - nn5580; nn5580 - nn5590; nn5590 - nn5600;
 855 nn5600 - nn5610; nn5610 - nn5620; nn5620 - nn5630;

RO 113059 B1

nn5630	-	nn5640;	nn5640	-	nn5650;	nn5650	-	nn5660;	860
nn5660	-	nn5670;	nn5670	-	nn5680;	nn5680	-	nn5690;	
nn5690	-	nn5700;	nn5700	-	nn5710;	nn5710	-	nn5720;	
nn5720	-	nn5730;	nn5730	-	nn5740;	nn5740	-	nn5750;	865
nn5750	-	nn5760;	nn5760	-	nn5770;	nn5770	-	nn5780;	
nn5780	-	nn5790;	nn5790	-	nn5800;	nn5800	-	nn5810;	
nn5810	-	nn5820;	nn5820	-	nn5830;	nn5830	-	nn5840;	870
nn5840	-	nn5850;	nn5850	-	nn5860;	nn5860	-	nn5870;	
nn5870	-	nn5880;	nn5880	-	nn5890;	nn5890	-	nn5900;	
nn5900	-	nn5910;	nn5910	-	nn5920;	nn5920	-	nn5930;	
nn5930	-	nn5940;	nn5940	-	nn5950;	nn5950	-	nn5960;	875
nn5960	-	nn5970;	nn5970	-	nn5980;	nn5980	-	nn5990;	
nn5990	-	nn6000;	nn6000	-	nn6010;	nn6010	-	nn6020;	
nn6020	-	nn6030;	nn6030	-	nn6040;	nn6040	-	nn6050;	880
nn6050	-	nn6060;	nn6060	-	nn6070;	nn6070	-	nn6080;	
nn6080	-	nn6090;	nn6090	-	nn6100;	nn6100	-	nn6110;	
nn6110	-	nn6120;	nn6120	-	nn6130;	nn6130	-	nn6140;	885
nn6140	-	nn6150;	nn6150	-	nn6160;	nn6160	-	nn6170;	
nn6170	-	nn6180;	nn6180	-	nn6190;	nn6190	-	nn6200;	
nn6200	-	nn6210;	nn6210	-	nn6220;	nn6220	-	nn6230;	890
nn6230	-	nn6240;	nn6240	-	nn6250;	nn6250	-	nn6260;	
nn6260	-	nn6270;	nn6270	-	nn6280;	nn6280	-	nn6290;	
nn6290	-	nn6300;	nn6300	-	nn6310;	nn6310	-	nn6320;	
nn6320	-	nn6330;	nn6330	-	nn6340;	nn6340	-	nn6350;	895
nn6350	-	nn6360;	nn6360	-	nn6370;	nn6370	-	nn6380;	
nn6380	-	nn6390;	nn6390	-	nn6400;	nn6400	-	nn6410;	
nn6410	-	nn6420;	nn6420	-	nn6430;	nn6430	-	nn6440;	900
nn6440	-	nn6450;	nn6450	-	nn6460;	nn6460	-	nn6470;	
nn6470	-	nn6480;	nn6480	-	nn6490;	nn6490	-	nn6500;	
nn6500	-	nn6510;	nn6510	-	nn6520;	nn6520	-	nn6530;	905
nn6530	-	nn6540;	nn6540	-	nn6550;	nn6550	-	nn6560;	
nn6560	-	nn6570;	nn6570	-	nn6580;	nn6580	-	nn6590;	
nn6590	-	nn6600;	nn6600	-	nn6610;	nn6610	-	nn6620;	910
nn6620	-	nn6630;	nn6630	-	nn6640;	nn6640	-	nn6650;	
nn6650	-	nn6660;	nn6660	-	nn6670;	nn6670	-	nn6680;	
nn6680	-	nn6690;	nn6690	-	nn6700;	nn6700	-	nn6710;	915

RO 113059 B1

920

nn6710 - nn6720; nn6720 - nn6730; nn6730 - nn6740;
nn6740 - nn6750; nn6750 - nn6760; nn6760 - nn6770;

925

nn6770 - nn6780; nn6780 - nn6790; nn6790 - nn6800;
nn6800 - nn6810; nn6810 - nn6820; nn6820 - nn6830;
nn6830 - nn6840; nn6840 - nn6850; nn6850 - nn6860;
nn6860 - nn6870; nn6870 - nn6880; nn6880 - nn6890;

930

nn6890 - nn6900; nn6900 - nn6910; nn6910 - nn6920;
nn6920 - nn6930; nn6930 - nn6940; nn6940 - nn6950;
nn6950 - nn6960; nn6960 - nn6970; nn6970 - nn6980;

935

nn6980 - nn6990; nn6990 - nn7000; nn7000 - nn7010;
nn7010 - nn7020; nn7020 - nn7030; nn7030 - nn7040;
nn7040 - nn7050; nn7050 - nn7060; nn7060 - nn7070;

940

nn7070 - nn7080; nn7080 - nn7090; nn7090 - nn7100;
nn7100 - nn7110; nn7110 - nn7120; nn7120 - nn7130;
nn7130 - nn7140; nn7140 - nn7150; nn7150 - nn7160;

945

nn7160 - nn7170; nn7170 - nn7180; nn7180 - nn7190;
nn7190 - nn7200; nn7200 - nn7210; nn7210 - nn7220;
nn7220 - nn7230; nn7230 - nn7240; nn7240 - nn7250;

950

nn7250 - nn7260; nn7260 - nn7270; nn7270 - nn7280;
nn7280 - nn7290; nn7290 - nn7300; nn7300 - nn7310;
nn7310 - nn7320; nn7320 - nn7330; nn7330 - nn7340;

955

nn7340 - nn7350; nn7350 - nn7360; nn7360 - nn7370;
nn7370 - nn7380; nn7380 - nn7390; nn7390 - nn7400;
nn7400 - nn7410; nn7410 - nn7420; nn7420 - nn7430;

960

nn7430 - nn7440; nn7440 - nn7450; nn7450 - nn7460;
nn7460 - nn7470; nn7470 - nn7480; nn7480 - nn7490;
nn7490 - nn7500; nn7500 - nn7510; nn7510 - nn7520;

965

nn7520 - nn7530; nn7530 - nn7540; nn7540 - nn7550;
nn7550 - nn7560; nn7560 - nn7570; nn7570 - nn7580;
nn7580 - nn7590; nn7590 - nn7600; nn7600 - nn7610;

970

nn7610 - nn7620; nn7620 - nn7630; nn7630 - nn7640;
nn7640 - nn7650; nn7650 - nn7660; nn7660 - nn7670;
nn7670 - nn7680; nn7680 - nn7690; nn7690 - nn7700;

975

nn7700 - nn7710; nn7710 - nn7720; nn7720 - nn7730;
nn7730 - nn7740; nn7740 - nn7750; nn7750 - nn7760;
nn7760 - nn7770; nn7770 - nn7780; nn7780 - nn7790;

980

RO 113059 B1

nn7790	-	nn7800;	nn7800	-	nn7810;	nn7810	-	nn7820;	
nn7820	-	nn7830;	nn7830	-	nn7840;	nn7840	-	nn7850;	985
nn7850	-	nn7860;	nn7860	-	nn7870;	nn7870	-	nn7880;	
nn7880	-	nn7890;	nn7890	-	nn7900;	nn7900	-	nn7910;	
nn7910	-	nn7920;	nn7920	-	nn7930;	nn7930	-	nn7940;	
nn7940	-	nn7950;	nn7950	-	nn7960;	nn7960	-	nn7970;	990
nn7970	-	nn7980;	nn7980	-	nn7990;	nn7990	-	nn8000;	
nn8000	-	nn8010;	nn8010	-	nn8020;	nn8020	-	nn8030;	
nn8030	-	nn8040;	nn8040	-	nn8050;	nn8050	-	nn8060;	995
nn8060	-	nn8070;	nn8070	-	nn8080;	nn8080	-	nn8090;	
nn8090	-	nn8100;	nn8100	-	nn8110;	nn8110	-	nn8120;	
nn8120	-	nn8130;	nn8130	-	nn8140;	nn8140	-	nn8150;	1000
nn8150	-	nn8160;	nn8160	-	nn8170;	nn8170	-	nn8180;	
nn8180	-	nn8190;	nn8190	-	nn8200;	nn8200	-	nn8210;	
nn8210	-	nn8220;	nn8220	-	nn8230;	nn8230	-	nn8240;	
nn8240	-	nn8250;	nn8250	-	nn8260;	nn8260	-	nn8270;	1005
nn8270	-	nn8280;	nn8280	-	nn8290;	nn8290	-	nn8300;	
nn8300	-	nn8310;	nn8310	-	nn8320;	nn8320	-	nn8330;	
nn8330	-	nn8340;	nn8340	-	nn8350;	nn8350	-	nn8360;	1010
nn8360	-	nn8370;	nn8370	-	nn8380;	nn8380	-	nn8390;	
nn8390	-	nn8400;	nn8400	-	nn8410;	nn8410	-	nn8420;	
nn8420	-	nn8430;	nn8430	-	nn8440;	nn8440	-	nn8450;	1015
nn8450	-	nn8460;	nn8460	-	nn8470;	nn8470	-	nn8480;	
nn8480	-	nn8490;	nn8490	-	nn8500;	nn8500	-	nn8510;	
nn8510	-	nn8520;	nn8520	-	nn8530;	nn8530	-	nn8540;	1020
nn8540	-	nn8550;	nn8550	-	nn8560;	nn8560	-	nn8570;	
nn8570	-	nn8580;	nn8580	-	nn8590;	nn8590	-	nn8600;	
nn8600	-	nn8610;	nn8610	-	nn8620;	nn8620	-	nn8630;	
nn8630	-	nn8640;	nn8640	-	nn8650;	nn8650	-	nn8660;	1025
nn8660	-	nn8670;	nn8670	-	nn8680;	nn8680	-	nn8690;	
nn8690	-	nn8700;	nn8700	-	nn8710;	nn8710	-	nn8720;	
nn8720	-	nn8730;	nn8730	-	nn8740;	nn8740	-	nn8750;	1030
nn8750	-	nn8760;	nn8760	-	nn8770;	nn8770	-	nn8780;	
nn8780	-	nn8790;	nn8790	-	nn8800;	nn8800	-	nn8810;	
nn8810	-	nn8820;	nn8820	-	nn8830;	nn8830	-	nn8840;	1035
nn8840	-	nn8850;	nn8850	-	nn8860;	nn8860	-	nn8870;	

1040 nn₈₈₇₀ - nn₈₈₈₀; nn₈₈₈₀ - nn₈₈₉₀; nn₈₉₀₀ - nn₈₉₀₀; nn₈₉₀₀ - nn₈₉₁₀;
nn₈₉₁₀ - nn₈₉₂₀; nn₈₉₂₀ - nn₈₉₃₀; nn₈₉₃₀ - nn₈₉₄₀; nn₈₉₄₀ - nn₈₉₅₀;
nn₈₉₅₀ - nn₈₉₆₀; nn₈₉₆₀ - nn₈₉₇₀; nn₈₉₇₀ - nn₈₉₈₀; nn₈₉₈₀ - nn₈₉₉₀;
nn₈₉₉₀ - nn₉₀₀₀; nn₉₀₀₀ - nn₉₀₁₀; nn₉₀₁₀ - nn₉₀₂₀; nn₉₀₂₀ - nn₉₀₃₀;
nn₉₀₃₀ - nn₉₀₄₀; nn₉₀₄₀ - nn₉₀₅₀; nn₉₀₅₀ - nn₉₀₆₀.

1045 Oligomerii, însă, nu trebuie să constea numai din secvența care este complementară la secvența HCV însemnată. Ei pot conține în plus secvențe de nucleotide sau alți radicali care sunt corespunzători pentru scopurile în care se utilizează oligomerii. De exemplu, dacă oligomerii se utilizează ca primeri pentru amplificarea secvențelor HCV prin PCR, ei pot conține secvențe care, când sunt în duplex, formează locuri pentru enzima de restricție care ușurează clonarea secvențelor amplificate. De asemenea, de exemplu, dacă oligomerii urmează să se utilizeze ca "proba captură" în încercările de hibridizare (descrise mai jos), ei vor conține în plus un partener de legare care este cuplat la oligomerul ce conține secvența de nucleotidă care este complementară la secvența HCV însemnată. Alte tipuri de radicali sau secvențe care sunt utile și din care pot fi
1050 constituiți oligomerii sau la care se pot cupla sunt cele care sunt cunoscute de specialiști ca fiind corespunzătoare pentru o serie de scopuri, inclusiv marcarea probelor de nucleotide.

Prepararea oligomerilor este desigur cunoscută în domeniu, incluzând, de exemplu, metodele care conțin excizia, transcripția sau sinteza chimică. Secvențele și/sau regiunile
1060 țintă ale genomului care sunt selectate la care polinucleotidele însemnate ale oligomerului care sunt selectate la care polinucleotidele însemnate ale oligomerilor sunt complementare depind de scop. De exemplu, dacă obiectivul este să se selecteze pentru prezența HCV în probele biologice (de exemplu sânge), oligomerii preferați se vor utiliza ca probe și/sau primeri și se vor hibridiza pe regiunile conservate ale genomului HCV. Unele din regiunile conservate ale genomului HCV la care se pot lega oligomerii sunt descrise în prezenta invenție, de exemplu, regiunile care conțin numerele de nucleotidă aproximativ de la capătul 5 până la aproximativ 200, sau de la aproximativ 4000 până la aproximativ 5000, sau de la aproximativ 8000 până la aproximativ 9040 așa cum se arată în fig. 18, sau de preferință nucleotidele -318 până la 175, 4056 până la 4448, și 4378
1070 până la 4902. Alte regiuni ale genomului care sunt conservate sunt ușor de stabilit prin compararea secvențelor nucleotidelor din diferitele izolate de HCV, inclusiv HCV prototip, HCV1. Metodele pentru efectuarea comparațiilor între genotipuri în scopul determinării regiunilor conservate și neconservate sunt cunoscute în acest domeniu și se dau aici exemple din aceste metode.

1075 În încercarea de bază de hibridizare a acizilor nucleici, acidul nucleic de analizat (analit) cu o singură bandă (fie ADN, fie ARN) se hibridizează pe o probă de acid nucleic și sunt detectate duplexurile obținute. Probele pentru polinucleotidele HCV (naturale sau derivate) au o lungime care permite determinarea secvențelor unice virale prin hibridizare. Dacă 6 - 8 nucleotide au o lungime bună pentru lucru, secvențele de 10-12
1080 nucleotide sunt preferate și cele cu circa 20 nucleotide sunt optime. De preferință, aceste secvențe vor fi derivate din regiunile care nu au eterogenitate. Aceste probe se pot prepara folosind metodele obișnuite, inclusiv metodele automate ale nucleotidelor sintetice. Printre probele utile, de exemplu, sunt cele derivate de la clonele noi izolate prezentate în această invenție, precum și diferiții oligomeri utili în probarea coloniilor de cADN, descrisă mai jos. Un complement la orice porțiune unică a genomului HCV este satisfăcător. Pentru utilizarea ca probe, este de dorit o complementaritate totală, deși poate să nu fie strict necesară dacă se mărește lungimea fragmentului.

Pentru utilizarea acestor probe ca agenți de detectare a prezenței polinucleotidei HCV (de exemplu în selectarea sângelui contaminat), proba biologică de analizat, cum

ar fi sângele sau serul, poate fi tratată, dacă se dorește, pentru extragerea acizilor nucleici conținuți în ea. Acidul nucleic obținut din probă poate fi supus la electroforeză în gel sau la alte procedee de separare pe dimensiuni; în alt mod, proba de acid nucleic este împrăștiată în puncte fără separarea pe dimensiuni. În scopul de a forma duplexurile hibride cu secvențele de însemnat ale probei, regiunea însemnată a acidului nucleic analizat trebuie să fie sub formă de o singură bandă. Atunci când secvența este prezentă natural în forma cu o singură bandă, nu va fi necesară o denaturare. Însă, când secvența este prezentă în formă de bandă dublă, ea va trebui supusă denaturării. Denaturarea se poate efectua prin diferite metode cunoscute în specialitate. După denaturare, acidul nucleic analit și proba sunt incubate în condiții care promovează formarea hibridului stabil al secvenței ținută din probă cu secvența probabilă însemnată din analit, și se detectează duplexurile obținute care conțin proba(ele).

Detectarea duplexurilor obținute, dacă există, se efectuează de obicei prin utilizarea probelor marcate; o altă variantă este cu proba nemarcată, dar care se poate detecta prin legarea specifică de un ligand care este marcat, fie direct, fie indirect. Marcatorii corespunzători și metodele pentru marcarea probelor sau a liganzilor sunt cunoscute de specialiști și includ, de exemplu, marcatori radioactivi care se pot îngloba prin metode cunoscute (de exemplu translația prin creștere sau kinază), biotin, grupe fluorescente, grupe chemiluminiscente (ca dioxetanii, în special dioxetanii activați), enzimele, anticorpii și altele.

Regiunile din probele care se utilizează pentru legarea de analit pot fi făcute complet complementare la genomul HCV. De aceea, de obicei sunt de dorit condiții foarte stricte pentru a evita falșii pozitivi. Însă, condițiile foarte stricte vor trebui utilizate numai dacă probele sunt complementare la regiunile genomului viral care nu are eterogenitate. Necesitatea absolută a hibridizării este determinată de o serie de factori în timpul hibridizării și în timpul procedurii de spălare, printre care temperatura, intensitatea ionică, lungimea și timpul și concentrația formamidei. Acești factori sunt scoși în evidență, de exemplu, de Maniatis T. [1982].

Se pot întrebuița și variate ale acestei scheme de bază care sunt cunoscute de specialiști, inclusiv cele care ușurează separarea duplexurilor ce trebuie detectate din materiale străine și/sau care amplifică semnalul de la un radical marcat. O serie de astfel de variante sunt trecute în revistă de exemplu de: Matthews și Kricka (1988), *Analytical Biochemistry* 196:1; Landegren și alții (1988 *Science* 242:229); și Mittlin (1989), *Clinical chem*, 35:1819. Aceste materiale precum și publicațiile următoare ce descriu forma încercărilor sunt incluse în referințele bibliografice ale prezentei invenții.

Probele corespunzătoare pentru detectarea HCV din aceste încercări sunt formate din secvențe care se hibridizează cu secvențele de polinucleotide HCV țintă pentru a forma duplexuri cu bandă analit (de analizat) aceste duplexuri având o stabilitate suficientă pentru detectare în sistemul de încercări specificat.

O variantă adecvată este, de exemplu, una descrisă în brevetul **US 4868105**, depus la 9 septembrie 1989 și în publicația **E.P.O.. 225807** (publicată la 16 iunie 1987). Aceste publicații descriu o încercare de hibridizare de acid nucleic în fază de soluție în care acidul nucleic de analizat este hibridizat pe un set de probă care îl marchează și pe un set de probe capturante. Complexul probă-analit se cuplează prin hibridizare cu o probă captură pe suport solid care este complementară la setul de probe de captură. Aceasta permite ca acidul nucleic analit să fie îndepărtat din soluție ca un complex în fază solidă. Având analitul sub forma unui complex în faza solidă, se ușurează etapele de separare ulterioară din încercare. Setul de probe de marcăre este complementar la o probă marcată care este legată prin hibridizare de complexul analit în fază solidă.

În general, este de așteptat ca secvențele genomului HCV să fie prezente în serul indivizilor infectați în concentrații relativ scăzute, adică la aproximativ 10^2 - 10^3 doze infecioase de cimpanzeu (CID) per ml. Aceste valori pot impune utilizarea procedurilor de amplificare în încercările de hibridizare. Aceste procedee sunt cunoscute de specialiști. De exemplu, Enzo Biochemical Corporation "Bio-Bridge" are un sistem care utilizează deoxinucleotidtransferază terminală pentru a adăuga cozile nemodificate 3'-poli-dT la o probă de ADN. Proba cu cozile poli-dT este hibridizată pe secvența de nucleotide țintă și apoi pe o poli-A modificată cu biotin. Publicația **PCT 84/03520** și publicația brevetului **EP 124221** descriu o încercare de hibridizare a ADN în care: (1) analitul este fixat pe o probă de ADN cu o singură bandă care este complementară la o oligonucleotidă marcată cu enzimă și (2) duplexul cu cozile respective obținut este hibridizat pe o oligonucleotidă marcată cu enzimă. **EPA 204510** descrie o încercare de hibridizare a ADN în care analitul ADN este contactat cu o probă care are o coadă, cum ar fi o coadă (terminație) poli-dT, o bandă amplificatoare care are o secvență ce se hibridizează la coada probei, cum este o secvență poli-A și care este capabilă să lege o mulțime de benzi marcate. Un tip de încercare de hibridizare care este descris în publicația **E.P.O. 317077** (publicată la 24 mai 1989), care trebuie să detecteze secvențele la un nivel de aproximativ 10^5 /ml, utilizează multimeri de acid nucleic care se leagă de acidul nucleic analit cu o singură bandă și care de asemenea se leagă de o multitudine de oligonucleotide marcate cu o singură bandă. Un procedeu deosebit de dorit poate cuprinde amplificarea secvențelor HCV țintă în seruri aproximativ de 10000 ori (adică la aproximativ 10^5 secvențe/ml) ca parte a sistemului de hibridizare. Amplificarea se poate realiza, de exemplu, prin reacțiile în lanț ale polimerazei (PCR), procedeu descris de Saiki și alții (1986) *Nature* 324: 163, de Mullis în brevetul **US 4683195** și de Mullis și alții în brevetul **US 4683202**. Amplificarea se poate face înainte de, dar de preferință după purificarea secvenței țintă HCV. De exemplu, amplificarea poate fi utilizată corelat cu metodele de încercare descrise în brevetul **US 4868105**, sau dacă mai este necesară în continuare amplificare, corelată cu sistemul de hibridizare descris în publicația **E.P.O. 317077**.

Metodele de detectare preferate ale secvențelor HCV într-o bandă de polinucleotidă analit se bazează pe metodele de detectare a hibridizării descrise în brevetul **US 4868105** și publicația **E.P.O. 317077**. Aceste metode sunt încercări de hibridizare sandwich în fază de soluție care utilizează atât probele de capturare cât și cele de marcare, care se hibridizează de secvențele țintă într-un acid nucleic analit. Când se folosesc aceste încercări pentru selectarea probelor biologice pentru HCV, probele utilizate trebuie să se lege de regiunile conservate ale genomului HCV. Probele de capturare și de marcare pot fi răspândite în legarea lor de secvența țintă fiind amestecate între ele. Un mod de lucru preferat este ca probele de capturare și cele de marcare să fie în seturi și probele unui set să nu se răspândească printre probele celuilalt set. În acest ultim mod de lucru, de preferință setul(turile) de probe de capturare multiple se hibridizează în regiunile cele mai conservate ale genomului, în timp ce setul(turile) de probe de marcare multiple se pot hibridiza în regiunile care prezintă mici divergențe. De exemplu, utilizând secvența prototip cADN HCV1 arătată în fig. 18, se pot folosi probe care se hibridizează pe secvențele din regiunea de nucleotide de la aproximativ -318 la aproximativ 174 și/sau nucleotidele din regiunea de la aproximativ 4378 la aproximativ 4902 și/sau nucleotidele din regiunea de la aproximativ 4066 la aproximativ 4448. Probele preferate se vor hibridiza pe secvențele din regiunea 5' a genomului HCV, deoarece, așa cum se arată mai jos, această regiune se dovedește a fi mult conservată. Astfel, probele preferate se pot hibridiza, de exemplu, pe nucleotidele de la aproximativ -318 la aproximativ 174 cum se arată în fig. 18. Se pot utiliza probe care se hibridizează fie pe banda pozitivă

în regiunile conservate și/sau pe complementul său, în funcție de scop, de exemplu pentru a detecta secvențele genomice virale, fie pentru a detecta secvențele cADN HCV obținute prin amplificarea PCR, fie pentru a detecta intermediarii replicativi la banda pozitivă ARN HCV. 1190

Detectarea ARN HCV și a polinucleotidelor derivate din acesta utilizând o metodă HCV/cPCR

O metodă deosebit de utilă pentru detectarea ARN HCV sau a polinucleotidelor derivate de la ARN HCV este metoda HCV/cPCR care constituie unul din obiectele prezentei invenții și care utilizează tehnica reacției în lanț a polimerazei (PCR) descrisă de Saiki și alții (1986), de Mullis în brevetul **US 4683195** și de Mullis și alții în brevetul **US 4683202**. Metoda HCV/cPCR folosește primeri și probe derivate de la informația dată aici referitoare la natura genomului HCV. 1195 1200

În general, în procedeul PCR, se prepară primeri, oligonucleotide scurte care constituie capetele opuse ale unei secvențe dorite. Secvența dintre primeri nu trebuie să fie cunoscută. O probă de polinucleotidă se extrage și se denaturează, de preferință prin încălzire, și se hibridizează cu primerii oligonucleotidei care sunt prezenți în exces molar. Polimerizarea este catalizată de o polimerază dependentă de model și primer în prezența deoxinucleotidtrifosfaților sau a analogilor de nucleotidă (dNTPs). Aceasta conduce la doi "produși lungi" care conțin primerii respectivi la terminațiile lor 5', legați covalent de complementele nou sintetizate ale benzilor originale. ADN replicat este din nou denaturat, hibridizat cu primeri de oligonucleotide, readus în condițiile de polimerizare și se inițiază un nou ciclu de replicare. Prin al doilea ciclu se obțin două benzi originale, cei doi "produși lungi" din ciclul 1 și doi "produși scurți" replicați din produșii lungi. Produșii scurți conțin secvențe (sens sau contrasens) derivate de la secvența țintă, flancate la terminațiile 5' și 3' cu secvențe de primer. La fiecare ciclu în plus, numărul de produși scurți este replicat exponențial. Astfel, acest procedeu provoacă amplificarea secvenței țintă specifice. 1205 1210 1215

În metodă se prevede o probă care este suspectată de a conține ARN HCV, sau un fragment al acestuia. Proba este de obicei luată dintr-un individ suspectat că are NANBH; însă se includ și alte surse ale probei, de exemplu, mediul condiționat sau celulele de la sistemele *in vitro* în care virusul a fost replicat. Proba totuși trebuie să conțină secvența(ele) de acid nucleic țintă. 1220

Proba este apoi supusă condițiilor care permit transcripția inversă a ARN HCV în cADN HCV. Condițiile pentru transcrierea inversă a ARN sunt cunoscute specialiștilor în acest domeniu și sunt descrise, de exemplu, de Maniatis și alții (1982) și în *Methods in Enzymology*. O metodă preferată pentru transcripția inversă utilizează transcripția inversă dintr-o varietate de surse, printre care moleculele recombinante și izolate de exemplu dintr-un retrovirus, de preferință din virusul mieloblastosis avian (AMV) precum și condițiile corespunzătoare pentru transcripție. Produsul cADN HCV al transcripției inverse este într-un hibrid ARN:ADN care se obține din prima rundă a transcripției inverse; după aceea, hibridii ADN:ADN se obțin din două sau mai multe runde de transcripție. 1225

cADN HCV obținut din transcripția inversă este apoi supus la PCR pentru a amplifica secvența țintă. În scopul realizării acestui lucru, cADN HCV se denaturează și benzile separate sunt hibridizate cu primeri care flanchează secvența țintă. 1230

Separarea benzii se poate realiza prin orice metodă de denaturare corespunzătoare, incluzând mijloacele fizice, chimice sau enzimactice, care sunt cunoscute specialiștilor în acest domeniu. O metodă preferată, care este fizică, constă în încălzirea acidului nucleic până când acesta este complet denaturat (>99%). Denaturarea obișnuită prin încălzire necesită temperaturi variind de la aproximativ 80°C până la aproximativ 105°C, timp de la aproximativ 1 la 10 minute. 1235

După hibridizarea cADN HCV cu primerii, secvențele HCV țintă sunt replicate printr-un mijloc de polimerizare care utilizează o oligonucleotidă primer pentru a iniția sinteza lanțului de replicat. Primerii sunt aleși astfel încât ei să fie complementari la secvențele genomului HCV. Primerii oligomeri care sunt complementari la regiuni ale benzilor în sens direct sau contrasens ale cADN HCV pot fi stabiliți din secvențele cADN HCV de la secvența compozită cADN redată în fig. 1B.

Primerii sunt aleși astfel încât pozițiile lor relative de-alungul secvenței duplex să permită ca o extindere a produsului sintetizat dintr-un primer, când acesta este separat din modelul său (complementul), să servească ca model (tipar) pentru extinderea altui primer pentru a se obține o catenă replicată de lungime definită.

Primerul este de preferință cu o singură bandă pentru o eficacitate maximă la amplificare, dar poate să fie și cu bandă dublă. Dacă este cu bandă dublă, primerul este mai întâi tratat pentru a separa benzile sale înainte de a fi utilizat la prepararea de produși extinși. De preferință, primerul este o oligodeoxiribonucleotidă. Primerul trebuie să fie suficient de lung pentru a iniția sinteza produsilor de extensie în prezența agentului pentru polimerizare. Lungimile exacte ale primerilor vor depinde de mulți factori, printre care temperatura și sursa de primer și utilizează metodei. De exemplu, depinzând de complexitatea secvenței țintă, primerul oligonucleotidă conține de obicei circa 15-45 nucleotide, deși ar putea să conțină mai multe sau mai puține nucleotide. Moleculele scurte de primer în general necesită temperaturi mai scăzute pentru a forma complexi hibrid suficient de stabili cu modelul.

Primerii utilizați în prezenta invenție sunt aleși pentru a fi "substanțial" complementari la diferitele benzi ale fiecărei secvențe specifice de amplificat. De aceea, primerii nu trebuie să reflecte secvența exactă a modelului, dar trebuie să fie suficient de complementari pentru a se hibridiza selectiv cu benzile lor respective. De exemplu, un fragment de nucleotide ne-complementar se poate atașa la capătul 5' al primerului, cu restul secvenței primerului care este complementar benzii. În alt mod, baze ne-complementare sau secvențe mai lungi pot fi răspândite în primer, cu condiția ca primerul să aibă complementaritate suficientă cu secvența uneia dintre benzi ce urmează să se amplifice pentru a se hibridiza cu aceasta și pentru a forma astfel o structură duplex care poate fi extinsă cu ajutorul polimerizării. Secvențele de nucleotide ne-complementare ale primerilor pot conține locuri pentru enzima de restricție. Anexarea unui loc pentru enzima de restricție la capătul(ele) secvenței țintă ar fi deosebit de utilă pentru clonarea secvenței țintă.

Se înțelege că "primer", așa cum este folosit aici, se poate referi la mai mult decât un primer, mai ales în cazul când există o anumită ambiguitate în informația privitoare la secvența(e) terminală(e) a regiunii țintă de amplificat. De aceea, un primer înseamnă o colecție de oligonucleotide primer care conțin secvențe reprezentând variațiile posibile în secvență sau include nucleotidele care permit o formare de perechi de baze tipice. Una din oligonucleotidele primer din această colecție va fi omologată cu capătul secvenței țintă. Un caz specific este arătat în exemple, unde seturile de oligomeri de 44-meri și 45-meri se utilizează pentru a amorsa amplificarea unei variante de regiune potențiale a genomului HCV.

Se anticipează că vor exista o mulțime de tulpini sau de izolate ale HCV cu secvențe care deviază de la HCV1, tulpina prototip. De aceea, în scopul de a detecta tulpinile variante este de preferat să se construiască primeri care se hibridizează pe regiunile conservate ale genomului HCV. Regiunile conservate pot fi determinate prin compararea secvențelor de nucleotide sau de aminoacizi ale câtorva tulpini/izolate HCV. Reiese că există cel puțin trei regiuni de aminoacizi conservate în genomul HCV, descrise mai sus, din care pot deriva primerii. Primerii descriși mai jos, în exemple, sunt derivați de la

ceea ce se crede că sunt regiunile conservate ale HCV, bazat pe omologia secvențelor cu cea de la Flavivirusuri.

1290

Primerii oligonucleotide se pot prepara prin orice metode corespunzătoare. Metodele pentru prepararea oligonucleotidelor cu secvență specifică sunt cunoscute de specialiști și includ, de exemplu, clonarea și restricția secvențelor corespunzătoare, precum și sinteza chimică directă. Metodele de sinteză chimică pot cuprinde, de exemplu, metoda cu fosfortriester descrisă de Narang și alții (1979) *Methods in Enzymology* 68:109, metoda cu dietilfosforamidat descrisă de Beuacage și alții (1981) *Tetrahedron Letters* 22:1859 și metoda pe suport solid din brevetul **US 4458066**.

1295

Primerii pot fi marcați, dacă se dorește, prin încorporarea în ei a unui mijloc detectabil pe cale spectroscopică, fotochimică, biochimică, imunochimică sau chimică.

Extinderea dependentă de model a primerului(ilor) oligonucleotidelor este catalizată de un agent de polimerizare în prezența unor cantități adecvate din cei patru deoxiribonucleotidtrifosfați (dATP, dGTP, dCTP și dTTP) sau a analogilor lor, într-un mediu de reacție care este format din sărurile adecvate, cationii metalici și sistemul de tamponare pentru pH. Agenți corespunzători de polimerizare sunt enzimele care se știe că catalizează sinteza ADN dependentă de primer sau de model. Printre polimerazele ADN cunoscute sunt, de exemplu, polimeraza I E.coli ADN sau fragmentul său Klenow, polimeraza T₄ ADN, și polimeraza Taq ADN. Condițiile de reacție pentru a cataliza sinteza ADN cu acetse polimeraze ADN sunt cunoscute de specialiști.

1300

1305

Prođușii de sinteză sunt molecule duplex care constau din benzile modele și benzile de extensie a primerilor, care includ secvența țintă. Acești produși, la rândul lor, servesc ca model pentru o altă rundă de replicare. În a doua rundă de replicare, banda de extensie a primerului din primul ciclu se asociază cu primerul său complementar; prin sinteză se obține un produs "scurt" care este legat la ambele capete 3' și 5' cu secvențele de primer sau cu complementele lor. Ciclurile repetate de denaturare, de fixare a primerului și de extensie conduc la acumularea exponențială a regiunii țintă definite de primeri. Se efectuează un număr suficient de cicluri pentru obținerea cantității dorite de polinucleotidă care conține regiunea țintă de acid nucleic. Cantitatea dorită poate să varieze și este determinată de funcția pe care o va servi polinucleotida produsă.

1310

1315

Metoda PCR se poate realiza într-o serie de secvențe temporale. De exemplu, ea se poate realiza în trepte, când după fiecare treaptă se adaugă noi reactivi, sau într-un mod în care toți reactivii sunt adăugați simultan, sau într-un mod parțial în trepte, când se adaugă reactivi proaspeți după un număr dat de trepte.

1320

Într-o metodă preferată, reacția PCR se efectuează ca un procedeu automat care utilizează o enzimă termostabilă. În acest procedeu, amestecul de reacție este trecut ciclic printr-o regiune de denaturare, o regiune de fixare a primerului și o regiune de reacție. Se poate întrebuița o mașină care este adaptată special pentru utilizarea cu enzima termostabilă, ce folosește ciclizarea temperaturii fără un sistem lichid de manipulare, pentru că enzima nu trebuie să fie adăugată la fiecare ciclu. Acest tip de mașină se găsește în comerț de la Perkin Elmer Cetus Corp.

1325

După amplificarea prin PCR, polinucleotidele țintă se detectează prin hibridizare cu o polinucleotidă probă care formează un hibrid stabil cu cel al secvenței țintă în condiții de hibridizare și spălare stringente până la moderat stringente. Dacă este de așteptat ca probele să fie complet complementare (adică circa 99% sau mai mult), cu secvența țintă, se vor întrebuița condiții stringente. Dacă se așteaptă să fie întrucâtva diferențe, de exemplu dacă tulpinile variante s-ar obține, cu rezultatul că proba nu va fi complet complementară, stringența la hibridizare poate să nu fie totală. Însă, condițiile se aleg așa ca să rezulte o legare nespecifică/întâmplătoare. Condițiile afectează hibridizarea și care fac selecția contra legării nespecifice sunt cunoscute în domeniu și sunt descrise

1330

1335

de exemplu de Maniatis și alții (1982). În general, concentrația mai mică de sare și temperatura mai ridicată măresc stringența legării. De exemplu, se consideră de obicei că condițiile stringente sunt incubarea în soluții care conțin aproximativ $0,1 \times \text{SSC}$, $0,1\%$ SDS la circa 65°C temperatură de incubare/spălare ca, iar condițiile condițiile moderat stringente sunt incubarea în soluții care conțin aproximativ $1-2 \times \text{SSC}$, $0,1\%$ SDS și circa $50^\circ-65^\circ\text{C}$ temperatură de incubare/spălare. Condițiile de stringență redusă sunt $2 \times \text{SSC}$ și circa $30^\circ-50^\circ\text{C}$.

Probele pentru secvențele țintă HCV pot fi derivate de la secvența cADN HCV arătată în fig. 18, sau de la noi izolate HCV. Probele HCV pot avea orice lungime corespunzătoare care cuprind regiunea țintă. Dacă trebuie să se obțină o complementaritate completă, adică dacă tulpina conține o secvență identică cu cea a probei, întrucât duplexul va fi relativ stabil chiar în condiții stringente, probele pot fi scurte, adică în intervalul de aproximativ 10-30 perechi de baze. Dacă ne așteptăm la o oarecare nepotrivire cu proba, adică dacă se presupune că proba se va hibridiza pe o regiune variantă, proba poate avea lungime mai mare, pentru că se pare că lungimea contracarează o parte din efectul nepotrivirii(ilor). Un exemplu de acest fel se găsește în exemplele de aici, în care proba a fost prevăzută să se lege de varietățile posibile ale HCV1. În acest caz, primerii au fost prevăzuți să se lege de cADN HCV derivat de la o regiune ipotetic conservată a genomului HCV și regiunea țintă a fost una care conținea potențial variații (raportat la modelul Flavivirus). Proba utilizată pentru detectarea secvențelor țintă HCV a conținut aproximativ 268 perechi de baze.

Acidul nucleic probă care are o secvență complementară la secvența țintă poate fi sintetizat folosind procedee similare cu cele de mai sus pentru sinteza secvențelor primer. Dacă se dorește, proba poate fi marcată. Marcările adecvate au fost descrise mai sus.

În unele cazuri, poate fi de dorit să se determine lungimea produsului PCR detectat de probă. Aceasta poate fi deosebit de adevărat dacă se presupune că tulpinile variante HCV pot conține deleții (eliminări) în regiunea țintă, sau dacă se dorește să se confirme lungimea produsului PCR. În aceste cazuri este preferabil să se supună produșii analizei mărimii lor precum și hibridizării cu proba. Metodele pentru determinarea mărimii acizilor nucleici sunt cunoscute de specialiști și includ, de exemplu, electroforeza în gel, sedimentarea în gradient și cromatografie în gel cu excludere.

Prezența secvenței țintă într-o probă biologică se detectează prin determinarea faptului că s-a produs sau nu un hibrid între proba de polinucleotidă HCV și acidul nucleic supus amplificării PCR. Metodele pentru detectarea hibridilor formați între o probă și o secvență de acid nucleic sunt cunoscute în acest domeniu. De exemplu, pentru conveniență, o probă nemarcată poate fi transferată pe o matrice solidă de care se leagă și mostra legată se supune condițiilor care permit hibridizarea specifică cu probă marcată; matricea solidă este apoi examinată pentru a vedea prezența probei marcate. Lucrând în alt mod, dacă mostra este marcată, se leagă de matrice o probă nemarcată și, după expunerea la condițiile de hibridizare corespunzătoare, se examinează matricea pentru prezența marcării. Alte încercări de hibridizare adecvată au fost descrise mai sus.

Determinarea secvențelor variante HCV utilizând PCR

În scopul identificării tulpinilor varinate HCV și ca atare al conceperii probelor pentru aceste variante, metoda descrisă mai sus HCV/cPCR se utilizează pentru a amplifica regiunile variante ale genomului HCV, astfel ca secvențele de nucleotide ale acestor variante ale regiunilor marcate să se poată determina. În general, tipurile de variantă ale HCV este de așteptat să existe în locuri geografice diferite de cele în care este predominantă tulpina HCV1, de exemplu, Japonia, Africa etc., sau în specii de

vertebrate diferite care sunt de asemenea infectate cu virusul. Varianta HCV poate să se formeze în timpul trecerii în sistemele de culturi de țesuturi, sau poate fi rezultatul unei mutații spontane sau induse. 1390

În scopul de a amplifica regiunea țintă variantă se concep primeri care să flancheze regiunea suspectă care de preferință sunt complementari la regiunile conservate. Primerii la două regiuni de HCV care sunt probabil conservate, în raport cu modelul Flavivirus, sunt descriși în exemple. Acești primeri și aceste probe pot fi concepuți utilizând informația de secvență pentru tulpina HCV1 redată în fig. 18. 1395

Analiza secvenței de nucleotide a regiunii(ilor) țintă se poate face prin analiza directă a produșilor amplificați PCR. Un procedeu pentru analiza directă a secvenței produșilor amplificați prin PCR este descris de Saiki și alții (1988) *Science* 239:487.

Alt mod de lucru constă în clonarea secvenței(ilor) țintă amplificată(e) înainte de analiza secvenței. O metodă pentru clonarea directă și analiza secvenței segmentelor genomice amplificate pe cale enzimatică a fost descrisă de Scharf (1986) *Science* 233:1076. În metodă, primerii utilizați în procedeul PCR se modifică în apropierea capetelor lor 5' pentru a produce locurile de restricție convenabile pentru clonarea directă, de exemplu, într-un vector de secvențare M13. După amplificare produșii PCR sunt desprinși cu enzimele de restricție corespunzătoare. Fragmentele de restricție sunt legate în vectorul M13 și transformate, de exemplu, în gazda JM 103, transformate în plăci și plăcile obținute se supun selecției prin hibridizare cu o probă de oligonucleotidă marcată. În domeniu se cunosc și alte metode pentru clonarea și analiza secvenței. 1400 1405

Primeri universali pentru Flavivirusuri și HCV

Studiile asupra naturii genomului HCV, utilizând probe derivate de la cADN HCV, precum și informația secvenței conținută în cADN HCV, sugerează că HCV este un virus asemănător cu Flavi. Aceste studii sunt descrise în publicația E.P.O. nr. 318216 aparținând autorilor invenției de față. O comparație a secvenței cADN HCV derivată de la clonele cADN HCV, cu secvențe cunoscute ale unei serii de Flavivirusuri arată că HCV conțin secvențe care sunt omoloage cu secvențele conservate din Flavivirusuri. 1410 1415

Acerste secvențe conservate pot permite crearea primerilor care pot fi universali în aplicarea lor la amplificarea regiunilor ținută ale Flavivirusurilor și ale HCV. Aceste secvențe sunt secvențe cu 16-meri sau mai mici pentru capetele 3' ale primerilor descriși în exemple. Apoi se efectuează identificarea speciilor utilizând o probă specifică pentru specii. Genoamele unei serii de Flavivirusuri sunt cunoscute de specialiști și includ, de exemplu, virusul encefalitei japoneze (Sumiyoshi și alții, 1987), virusul febrei galbene (Rice și alții, 1985), virusul Dengue tip 2 (Hahn și alții 1988), virusul Dengue tip 4 (Mackow, 1987) și virusul Nilului de vest (Castle și alții, 1986). Identificarea ARN HCV se efectuează folosind o probă specifică pentru HCV a cărei secvență poate fi determinată de secvențele cADN HCV conținute în ea. 1420 1425

Lucrând în alt mod, utilizarea setului(rilor) de probe create pentru a răspunde de degenerarea codonului și care deci conțin secvențe comune cu Flavivirusurile și HCV, după cum s-a determinat prin comparația secvențelor de aminoacizi HCV cu secvențele cunoscute ale Flavivirusurilor, permite un sistem de detectare general pentru aceste virusuri. 1430

Construcția secvențelor dorite ADN

Oligonucleotidele sintetice se pot prepara utilizând un sintetizator de oligonucleotide automat ca cel descris de Warner (1984). Dacă se dorește, benzile sintetice pot fi marcate cu P^{32} prin tratare cu polinucleotidkinază în prezența P^{32} -ATP, utilizând condițiile standard de reacție. 1435

Secvențele ADN, incluzând pe cele izolate din băncile de cADN din colecții, pot fi modificate prin procedee cunoscute, incluzând, de exemplu, mutageneza îndreptată

spre un anumit loc, cum a descris Zoller (1982) *Nucleic Acids Res.* 10:6487. Pe scurt, ADN-ul de modificat este conținut într-un fag ca secvență cu o singură bandă și transformat în ADN cu bandă dublă cu ajutorul ADN polimerazei, folosind ca primer o oligonucleotidă sintetică complementară la porțiunea de ADN de modificat și care are modificarea dorită inclusă în propria sa secvență. ADN-ul cu bandă dublă obținut este transformat într-un fag care suportă bacteria gazdă. Culturile de bacterii transformate, care conțin replicările la fiecare bandă de fag, se așează plan în agar pentru a obține plăcile. Teoretic, 50% din noile plăci conțin fagul care are secvența mutată și restul de 50% au secvența originală. Replicile plăcilor sunt hibridizate pe probă sintetică marcată la temperaturi și în condiții care permit hibridizarea cu banda corectă, nu și cu secvența nemodificată. Secvențele care sunt identificate prin hibridizare, sunt recuperate și clonate.

Truse pentru selectarea polinucleotidelor derivate HCV

Oligomerii care sunt probe și/sau primeri pentru amplificarea și/sau selectarea mostrelor pentru HCV pot fi ambalați în truse. Trusele pentru selectarea pentru secvențele HCV conțin ADN-urile probă oligomere. Trusele pentru amplificarea secvențelor HCV pot conține primeri oligomerici utilizați la amplificare. Trusele de obicei conțin probele sau primerii într-o cantitate premăsurată sau predeterminată, precum și alți reactivi ambalați corespunzător și materiale, în containere separate adecvate, necesare pentru modalitățile anumite de hibridizare și/sau amplificare. De exemplu, trusa poate conține materiale standard, agenți tampon, suporturi, enzime, substraturi, probe de marcarea, parteneri de legare și/sau instrucțiunile pentru efectuarea testului.

Se dau în continuare 31 de exemple ale prezentei invenții cu scop ilustrativ.

Exemplul 1 Izolarea și secvența de suprapunere a clonelor cADN HCV 13i, 26j, CA59a, CA84a, CA156e și CA167b

Clonele 13i, 26j, CA59a, CA84a, CA156e și CA167b s-au izolat din colecția lambda-gt11 care conține cADN HCV (ATCC nr. 40394), a cărei preparare este descrisă în publicația E.P.O. nr. 318216 (publicată la 31 mai 1989) și WO 89/04669 (publicată la 1 iunie 1989). Selectarea acestei bănci s-a făcut prin utilizarea probelor descrise mai jos și a metodelor descrise de Huynh (1985) DNA CLONING TECHNIQUES. Frecvențele cu care clonele pozitive au apărut cu probele respective au fost de 1 la 50000.

Izolarea clonei 13i s-a făcut folosind o probă sintetică derivată de la secvența clonei 12f. Secvența probei a fost:

5' GAA GGT TGC GAT CTG GAA GAC AGG GAC ACG 3'

Izolarea clonei 26j s-a făcut folosind o probă derivată de la regiunea 5' a clonei K9-1. Secvența probei a fost:

5' TAT CAG TTA TGC CAA CGG AAG CGG CCC CGA 3'

Procedeele de izolare pentru clona 12f și pentru clona k9-1 (denumită și K9-1) sunt descrise în publicația E.P.O. nr. 318216 și secvențele lor sunt arătate în figurile 1 și respectiv 2. Secvențele cADN HCV ale clonelor 13i și 26j sunt arătate în figurile 4 și respectiv 5. Sunt arătați de asemenea și aminoacizii codificați în ele, precum și suprapunerea clonei 13i cu clona 12f și suprapunerea clonei 26j cu clona 13i. Secvențele pentru aceste clone au confirmat secvența clonei K9-1. Clona K9-1 a fost izolată dintr-o altă bancă de cADN HCV (vezi publicația E.P.O. nr. 318216).

Clona CA59a a fost izolată folosind o probă bazată pe secvența regiunii 5' a clonei 26j. Secvența acestei probe a fost:

5' CTG GTT AGG GCT TTT CTA TCA CCA CAA 3'

O probă derivată de la secvența clonei CA59a a fost utilizată pentru izolarea clonei CA84a. Secvența probei utilizate pentru această izolare a fost:

5' AAG GTC CTG GTA GTG CTG CTG CTA TTT GCC 3'

Clona CA156a a fost izolată utilizând o probă derivată de la secvența clonei CA84a. Secvența probei a fost:

5' ATC GGA CGA CGC AAC GTT GCA ATT GCT CTA 3'

1490

Clona CA156a. Secvența probei a fost:

5' TTC GAC GTC ACA TCG ATC TGC TTG TCG GGA 3'

Secvențele de nucleotide ale cADN-urilor HCV în clonele CA59a, CA84a, CA156a și CA167b sunt prezentate în figurile 6, 7, 8 și respectiv 9. Aminoacizii codificați în ele, precum și suprapunerea cu secvențele clonelor relevante sunt prezentate în aceste figuri.

1495

Exemplul 2 Crearea băncii de cADN-uri HCV "pi"

O bancă de cADN HCV, banca "pi", a fost constituită din aceeași șarjă de plasmă de cimpanzeu infecțioasă folosită și la constituirea băncii cADN HCV lambda-gt11 (ATCC nr. 40394), descrisă în publicația E.P.O. nr. 318216, și utilizând în principal aceeași procedee. Însă la constituirea băncii "pi" s-a utilizat o metodă cu extinderea primerului, în care primerul pentru reverstrascriptaza s-a bazat pe secvența clonei CA59a. Secvența primerului a fost:

1500

5' GGCT GAC GTG GGT TTG 3'

Exemplul 3 Izolarea și secvența clonei pi14a

1505

Selectarea băncii "pi" cADN HCV descrisă mai sus, cu proba utilizată pentru a izola clona CA167b (vezi mai sus) a condus la clona pi14a. Clona conține aproximativ 880 perechi de baze ale cADN care se suprapun clonelor CA167b, CA156a, CA84a și CA59a, ce au fost izolate din banca HCV cADN lambda gt-11 (ATCC nr. 40394). În plus, pi14a mai conține aproximativ 250 perechi de baze de ADN care sunt în partea superioară a cADN HCV în clona CA167b.

1510

Exemplul 4. Izolarea și secvența clonelor CA216a, CA290a și ag30a

Bazat pe secvența clonei CA167b s-a făcut o probă sintetică care are următoarea secvență:

5' GGC TTT ACC ACG TCA CCA ATG ATT GCC CTA 3'

1515

Proba de mai sus s-a întrebuițat pentru selectarea cADN HCV care a produs clona CA216a, ale cărei secvențe HCV sunt arătate în fig. 10.

O altă probă s-a făcut pe baza secvenței clonei CA216a având următoarea secvență:

5' TTT GGG TAA GGT CAT CGA TAC CCT TAC GTG 3'

Selectarea băncii lambda-gt11 (ATCC nr. 40394) cu această probă a produs clona CA190a, ale cărei secvențe HCV sunt prezentate în fig. 11.

1520

Într-o realizare paralelă, o bancă cADN cu extindere a primerului s-a obținut utilizând acid nucleic extras din aceeași plasmă infecțioasă utilizată la banca lambda-gt11 cADN descrisă mai sus. Primerul folosit s-a bazat pe secvența clonelor CA216a CA290a:

5' GAA GCC GCA CGT AAG 3'

1525

Banca cADN a fost făcută utilizând metode similare cu cele descrise anterior pentru băncile utilizate în izolarea clonelor pi14a și k9-1. Proba folosită pentru selectarea acestei bănci s-a bazat pe secvența clonei CA290a:

5' CCG GCG TAG GTC GCG CAA TTT GGG TAA 3'

Clona ag30a s-a izolat din noua bancă cu proba de mai sus și a conținut aproximativ 670 perechi de baze ale secvenței HCV. Vezi fig. 12. Parte din această secvență se suprapune peste secvența HCV a clonelor CA216a și CA290a. Aproximativ 300 perechi bază ale secvenței ag30a se situează însă în partea superioară a secvenței din clona CA290a. Secvența care nu se suprapune prezintă un codon de pornire (*) și codoni de stopare care pot indica începutul ORF HCV. De asemenea, în fig. 12 se indică poizibile mici peptide codificate (#) care pot juca un rol în trasnlația de reglare, precum și posibilul

1535

prim aminoacid al polipeptidei posibile [/] și aminoacizii din partea inferioară codificați în ea.

Exemplul 5 *Izolarea și secvența clonei CA205a*

Clona CA205a s-a izolat din banca originală lambda gt-11 (ATCC nr. 40394), utilizând o probă sintetică derivată de la secvența HCV din clona CA290a (-fig. 11). Secvența probei a fost:

5' TCA GAT CGT TGG TGG AGT TTA CTT GTT GCC 3'

Secvența cADN HCV în CA205a, arătată în fig. 13, se suprapune peste secvențele cADN în ambele clone ag30a și CA290a. Suprapunerea secvenței cu aceea a CA290a este arătată prin linia punctată de deasupra secvenței (-fig. de asemenea arată aminoacizii probabil codificați în acest fragment).

După cum se observă din secvențele cADN HCV din clonele CA205a și ag30a, poliproteina HCV posibilă reiese că începe la codonul de pornire ATG; secvențele HCV în ambele clone conțin 42 nucleotide învecinate, în cadrul, cu codon dublu de oprire (TGATAG) în partea superioară a acestui ATG. Reiese că ORF al HCV începe după acești codoni de oprire și se extinde până la cel puțin 8907 nucleotide (vezi compozitul cADN HCV arătat în fig. 18).

Exemplul 6 *Izolarea și secvența clonei 18g*

Bazat pe secvența clonei ag30a (vezi fig. 12) și a unei clone de suprapunere din banca originală lambda gt-11 (ATCC nr. 40394), CA230a, s-a făcut o probă sintetică care are următoarea secvență:

5' CCA TAG TGC TCT GCG GAA CCG GTG AGT ACA 3'

Selectarea băncii originale lambda-gt11 cADN HCV cu proba a dus la obținerea clonei 18g, a cărei secvență cADN HCV este arătată în fig. 14. De asemenea în figură se arată suprapunerea peste clona ag30a și polipeptidele probabile codificate în cADN HCV.

cADN din clona 18g (C18g sau 18g) se suprapune peste cel din clonele ag30a și CA 205a, descrise mai sus. Secvența de C18g mai conține regiunea de codon dublu de oprire observată la clona ag30a. Regiunea de polinucleotidă din partea superioară acestor codoni de oprire reprezintă probabil o parte a regiunii 5' a genomului HCV, care poate să conțină ORF-uri scurte și care poate fi confirmată prin secvențarea directă a genomului HCV purificat. Aceste peptide mici probabile codificate pot juca un rol de regulator în translație. Regiunea genomului HCV dincolo de aceasta reprezentată de C18g poate fi izolată pentru analizarea secvenței folosind în esență procedeul descris în publicația E.P.O. nr. 318216 pentru izolarea secvențelor cADN dincolo de secvența cADN HCV din clona 12f. În principal, se sintetizează mici primeri de oligonucleotide, sintetici de reverstranscriptază, care se bazează pe secvența C18 și se utilizează pentru a se lega de secvența corespunzătoare din ARN genomic HCV. Secvențele de primer sunt învecinate cu terminația 5' cunoscută a C13g, dar suficient de depărtate în jos pentru a permite formarea secvențelor de probă în partea superioară a secvențelor primerului. Se utilizează metodele standard cunoscute de inițiere și de clonare. Băncile de cADN obținute sunt selectate cu secvențele din partea superioară a locurilor de inițiere (așa cum s-a dedus din secvențele elucidate ale C18g). ARN genomic HCV se obține fie din mostrele de plasmă, fie din cele de ficat de la indivizi cu NANBH. Întrucât HCV se dovedește a fi un virus de tip Flavi, terminația 5' a genomului poate fi modificată cu o structură "capac". Se știe că genomurile Flavivirus conțin structuri "capac" 5' terminale. (Virusul febrei galbene, Rice și alții (1988); virusul Dengue, Hahn și alții (1988); virusul encefalitei japoneze (1987)).

Exemplul 7 Izolarea și secvența clonelor din banca cADN beta-HCV

1585

Clonele care conțin cADN reprezentativ al regiunii 3' terminale a genomului HCV s-au izolat dintr-o bancă cADN constituită din colectarea plasmei de cimpanzeu infectioase care s-a folosit pentru crearea băncii cADN HCV lambda-gt11 (ATCC nr. 40394), descrisă în publicația E.P.O. nr. 318216. În scopul de a crea banca ADN, ARN extras din plasmă a fost "completat la coadă" cu poli rA utilizând poli(rA) polimerază și cADN s-a sintetizat utilizând oligo(dT)₁₂₋₁₈ ca primer pentru reverstranscriptaza. Hibridul ARN:cADN rezultat a fost digerat cu ARN-ază H și convertit în cADN HCV cu bandă dublă. cADN HCV obținut a fost clonat în lambda-gt10, utilizând în principal procedeul descris de Huynh (1985), obținându-se banca beta (sau b) cADN HCV. Procedeele utilizate au fost cele ce urmează.

O parte alicotă (12 ml) de plasmă s-a tratat cu proteinază K și s-a extras cu un volum egal de fenol saturat cu 0,05 M Tris-Cl, pH 7,5, 0,05% în volum/volum beta-mercaptoetanol, 0,1% în greutate/volum hidroxichinolonă, EDTA 1mM. Faza apoasă obținută s-a reextras cu amestecul de fenol, apoi s-a extras de trei ori cu un amestec 1:1 conținând fenol și cloroform:alcool izoamilic (24:1), pe urmă s-a extras de 2 ori cu un amestec de cloroform și alcool izoamilic (1:1). După ce s-a adus faza apoasă la concentrația 200 mM față de NaCl, acizii nucleici din faza apoasă s-au precipitat peste noapte la -20°C cu 2,5 volume de etanol absolut, rece. Precipitatele s-au colectat prin centrifugare la 10000 rpm timp de 40 minute, s-au spălat cu etanol 70% conținând NaCl 20 mM și cu etanol rece 100%, s-au uscat timp de 5 minute într-un exicator și s-au dizolvat în apă.

Acizii nucleici izolați din colectările de plasmă infectioasă de cimpanzeu au fost completate la capăt cu poli rA utilizând polimerază poli rA în prezența inhibitorul ribonucleazei de placenta umană (HPRI) (obținut de la Amersham Corp.), folosind ARN MS2 ca suport. Acizi nucleici izolați echivalenți cu cei din 2 ml plasmă s-au incubat într-o soluție care conține TMN (50 mM Tris-HCl, pH 7,9, MgCl₂ 10 mM, NaCl 250 mM, MnCl₂ 2,5 mM, ditiotritol (DTT) 2mM, alfa/P³²/ATP 40 micromolar, 20 unități HPRI (Amersham Corp.) și aproximativ 9 la 10 unități polimerază poli-A (BRL) lipsită de RNA-ază. Incubarea a durat 10 minute la 37°C și reacțiile au fost oprite cu EDTA (concentrația finală de circa 250 mM). Soluția s-a extras cu un volum egal de fenol-cloroform și cu un volum egal de cloroform, iar acizii nucleici s-au precipitat peste noapte la -20°C cu 2,5 volume etanol în prezența NaCl 200 mM.

Exemplul 8 Izolarea clonei b5a

Banca cADN beta HCV s-a selectat prin hibridizare folosind o probă sintetică care a avut o secvență bazată pe secvența cADN HCV din clona 15e. Izolarea clonei 15e este descrisă în publicația E.P.O. nr. 318216 și secvența ei este arătată în fig. 3. Secvența probei sintezei este:

5' ATT GCG AGA TCT ACG GGG CCT GCT ACT CCA 3'

Prin selectarea băncii s-a obținut clona beta-5a (b5a), care conține o regiune cADN HCV de aproximativ 1000 perechi de baze. Regiunea 5' a acestui cADN se suprapune peste clonele 35f, 19g, 26g, și 15e (aceste clone sunt descrise mai sus). Regiunea dintre terminația 3' a secvenței poli-A și secvența 3' care se suprapune peste clona 15e conține aproximativ 200 perechi de bază. Această clonă permite identificarea unei regiuni a secvenței 3'-terminale a genomului HCV.

Secvența b5a este conținută în secvența cADN HCV din clona 16jh (descrisă mai jos). În plus secvența mai este prezentă în CC34a, izolată din banca originală lambda-gt11 (ATCC nr. 40394) (banda originală lambda-gt11 este denumită aici banca "C").

Exemplul 9 Izolarea și secvența clonelor generate de PCR. Amplificarea regiunii 3' a genomului HCV

Au fost generate multe clone cADN care conțin secvențe de nucleotide derivate de la regiunea 3' a genomului HCV. Acest lucru s-a realizat prin amplificarea unei regiuni însemnate (țintă) a genomului prin procedeul reacției în lanț a polimerazei descris de Saiki și alții (1986) *Nature* 324:163 și Saiki și alții (1988) *Science* 239:487, procedeu modificat așa cum se descrie mai jos. ARN HCV care s-a amplificat s-a obținut din colectările de plasmă infecțioasă originală de la cimpanzeu care s-a folosit pentru crearea băncii cADN HCV lambda-gt11 (ATCC nr. 40394) descrisă în publicația E.P.O. nr. 318216. Izolarea ARN HCV s-a făcut așa cum s-a descris mai sus. La ARN izolat s-a adăugat la capătul 3' ATP cu ajutorul polimerului poli-A *E.coli* așa cum a descris Sippel (1973), cu excepția faptului că acizii nucleici izolați din serul de cimpanzeu au fost înlocuiți cu substratul de acid nucleic. ARN cu acest adaos la capătul 3' a fost apoi transcris invers în cADN cu reverstranscriptază folosind un oligo-dT-primer de adaptare în esență ca cel descris de Han (1987), exceptând faptul că componentele și secvențele primerului-adaptor au fost:

<u>Etansator</u>	<u>Not I</u>	<u>Promotor SP6</u>	<u>Primer</u>
AATTC	GCGGCCGC	CATACGATTTAGGTGACACTATAGAA	T ₁₅

cADN obținut a fost supus amplificării prin PCR utilizând doi primeri:

<u>Primer</u>	<u>Secvență</u>
JH32 (30 meri)	ATAGCGGCGGCCCTCGATTGCGATCTAC
JH11 (20 meri)	AATTCGGGCGGGCCGCCATACCA

Primerul JH32 conține 20 secvențe de nucleotide hibridizabile la capătul 5' al regiunii țintă în cADN, cu o T_m estimată de 66°C. JH11 a fost derivat de la o porțiune a oligo-dT-primerului adaptor; astfel, el este specific capătului 3' al cADN cu o T_m de 64°C. Ambii primeri au fost concepuți să aibă un loc de recunoaștere pentru enzima de restricție, NotI, la capătul 5', pentru utilizarea în clonarea ulterioară a cADN HCV amplificat.

Reacția PCR s-a efectuat prin suspendarea cADN și a primerilor în 100 microlitri de amestec de reacție care conțin cele patru deoxinucleozidtrifosfați, săruri tampon și ioni metalici, precum și o ADN polimerază stabilă la căldură izolată din *Thermus aquaticus* (polimeraza Taq), care se găsesc în trusa Perkin Elmer Cetus PCR (N801-0043 sau N801-0055). Reacția PCR s-a efectuat pe 35 cicluri într-un aparat de ciclizare termică ADN Perkin Elmer Cetus. Fiecare ciclu a constat dintr-o etapă de denaturare de 1,5 minute la 94°C, o etapă de întărire (fixare) la 60°C timp de 2 minute și o etapă de extindere a primerului la 72°C timp de 3 minute. Producții PCR au fost supuși la analiza Southern blot folosind o probă cu 30 nucleotide, JH34, a cărei secvență s-a bazat pe aceea a regiunii 3' terminale a clonei 15e.

Secvența JH34 este:

5' CTT GAT CTA CCT CCA ATC ATT CAA AGA CTC 3'

Producții PCR detectați de proba cADN HCV variază ca mărime de la circa 50 la circa 400 perechi de baze.

În scopul de a clona cADN HCV amplificat, producții PCR au fost desprinși (clivați) cu NotI și selectați pe mărimi prin electroforeza în gel de poliacrilamidă. ADN mai mare de 300 perechi de baze a fost clonat în locul NotI al pUC18S. Vectorul pUC18S este construit prin includerea unui polilant NotI clonat între locurile EcoRI și Sall ale pUC18.

Clonele au fost selectate pentru cADN HCV utilizând proba JH34. S-au obținut o serie de clone pozitive și de secvență pozitive. Secvența de nucleotide a cADN HCV s-a inserat în una din aceste clone, 16jh, și aminoacizii codificați în ea sunt redați în fig. 15. În figură este indicată o eterogenitate a nucleotidei detectată în secvența de cADN HCV din clona 16jh în comparație cu o altă clonă din această regiune. 1685

Exemplul 10 *Izolarea și secvența clonei 6k*

Bazat pe secvența clonei 16jh și a clonei b5a (vezi mai sus) s-a făcut o probă sintetică care are următoarea secvență:

5' TCT TCA ACT GGG CAG TAA GAA CAA AGC TCA 3'

1690

Selectarea băncii originale lambda-gt11 cADN HCV (descrișă în publicația **E.P.O. 318216**) cu această probă a produs clone cu o frecvență de aproximativ 1 în 10^6 ; una dintre acestea s-a denumit 6k (numită și C6k), a cărei secvență cADN HCV este arătată în fig. 16. În figură se mai arată de asemenea suprapunerea cu clona 16jh și polipeptidele posibile codificate în cADN HCV. Informația secvenței asupra cADN HCV în clona 6k s-a obținut numai de la o bandă. Informația asupra depozitului acestei clone este dată mai jos, unde clona este enumerată și notată Lambda gt11 C6k. Confirmarea secvenței C6k ca parte a unui ORF care codifică o polipeptidă HCV1 a fost obținută prin secvențarea altor clone ce se suprapun. 1695

Exemplul 11 *Izolarea și secvența clonei p131jh*

1700

O clonă care conține secvența de la regiunea 3' a genomului HCV, și care conține un codon de stopare în interiorul ei, s-a izolat în esență așa, cum s-a descris mai sus pentru izolarea clonelor generate prin amplificarea PCR a regiunii 3' a genomului, cu excepția faptului că ARN HCV1 a fost transformat în cADN utilizând oligonucleotida:

5' AAT TCG CGG CCG CCA TAC GAT TTA GGT GAC ACT ATA GAA T₁₅ 3'

1705

După aceea cADN a fost amplificat prin reacția PCR utilizând primerii:

5' TTC GCG GCC GCT ACA GCG GGG GAG ACA T 3' și

5' AAT TCG CGG CCG CCA TAC GA 3'

După amplificare, produșii PCR au fost precipitați cu spermină, digerați cu NotI și extrași cu fenol. Produșii purificați s-au clonat în locul NotI al pUC18S și clonele pozitive HCV s-au selectat folosind oligonucleotida: 1710

5' CGA TGA AGC TTG GGG TAA ACA CTC CGG CCT 3'

cADN HCV dintr-o clonă, denumită p131jh, este arătat în fig. 17. Această clonă conține un codon de stopare inclus în ea pentru ORF mare conținut în genomul HCV.

Exemplul 12 *Izolarea și secvența clonei 5'-clonă 32*

1715

O clonă care conține secvența din regiunea 5' a genomului HCV, în partea superioară a secvenței din clona b114a, s-a izolat și secvența de nucleotide s-a determinat printr-o modificare a metodei pentru izolarea și secvența clonelor generate de amplificarea PCR a regiunii 3' a genomului, descrișă în U.S.S.N. 456637. În general, o regiune țintă a genomului s-a amplificat prin procedeul PCR descriș de Saiki și alții (1986) și Saiki și alții (1988). ARN HCV care s-a amplificat s-a obținut prin extracție din serul uman (izolatele clinice ale SUA, HCV27) folosind o metodă la rece cu tiocinat de guanidină descrișă de Han și alții (1987). ARN extras s-a transformat în cADN cu o singură bandă cu reverstrasncriptază, folosind un primer, JH94, care este complementar la nucleotidele -250 până la -223 ale genomului HCV (vezi fig. 18). Secvența JH94 este: 1720

5' CCT GCG GCC GCA CGA CAC TCA TAC TAA 3'

1725

Conversia cADN HCV cu o singură bandă sau cu bandă dublă s-a efectuat atașând la capetele ADN aproximativ 20 până la 50 resturi dA folosind deoxinucleotidiltransferaza terminală (Sambrook și alții (1989), MOLECULAR CLONING), replicarea moleculei cu aceste adaosuri prin folosirea următorului oligo-dT-primer-adaptor, care conține un loc NotI și un promotor sp6: 1730

<u>Ectansator</u>	<u>NotI</u>	<u>Promotor SP6</u>	<u>Primer</u>
AATTC	GCGGCCGC	CATACGATTTAGGTGACACTATAGAA	T ₁₅

1735 cADN obținut a fost supus amplificării prin metoda PCR utilizând doi primeri, JH94 (descriș mai sus) și JH11 care are următoarea secvență:

<u>Primer</u>	<u>Secvență</u>
JH11 (20 meri)	AATTCGGGCGGGCCGCGCCATACGA

1740 Reacția PCR s-a efectuat prin suspendarea cADN și a primerilor în 100 microlitri
de amestec de reacție care conțin cei patru deoxinucleozidtrifosfați, săruri tampon și
ioni metalici, precum și o polimerază ADN termostabilă izolată din *Thermus aquaticus*
(polimeraza Taq), care se găsesc în trusa Perkin Elmer Cetus PCR (N801-0043 sau
1745 N801-0055). Reacția PCR s-a efectuat pe 35 cicluri care constau în etapa de denaturare
de 1,5 minute la 94°C, o etapă de întărire la 60°C timp de 2 minute și o etapă de
extindere a primerului la 72°C timp de 3 minute pentru fiecare ciclu. S-a folosit un aparat
cu ciclu termic Perkin Elmer Cetus pentru ADN.

1750 Producții PCR s-au digerat cu NotI și s-au clonat în pUC185. Clonele conținând secvențele de nucleotidă HCV s-au obținut prin delectarea cu o probă, Alex90, care este derivată de la nucleotidele -312 până la -283 ale genomului HCV1 și care are secvența:

5' ACC ATG AAT CAC TCC GCT GTG AGG AAC TAC 3'

cADN-urile HCV din clonele izolate au fost secvențate prin metoda terminației lanțului dideoxi (Sanger și alții 1977)). Secvența de cADN HCV în una dintre clonele izolate, 5'-clonă 32, acoperă regiunea nucleotidelor -224 până la -341 în fig. 18.

O analiză a secvenței de nucleotide a cADN HCV arată că replicatul ARN HCV conține o secțiune bogată în GC care poate fi capabilă să formeze o structură stabilă ac de păr:

1760 G-T A
A C-C-C-C-C-G C-C-G-5'
T-G-G-G-G-G-C-G-A-C-3'

În această structură liniile punctate indică legăturile posibile de hidrogen întreotidele complementare.

1765 O cercetare făcută în baza de date a calculatorului, Genbank, a scos în evidență că secvențele omoloage lipsesc din secvențele virale cunoscute. Astfel, această secvență poate fi unică pentru terminatia 5' a genomului HCV.

O structură ac de păr poate servi ca semnal de recunoaștere pentru o transcriptază și/sau poate să contribuie la stabilitatea ARN la terminatia 5'.

1770 **Exemplul 13** *Secvențele cADN HCV alcătuite*

O secvență cADN HCV a fost alcătuită dintr-o serie de clone ce se suprapun derivate de la diferite bănci de cADN HCV descrise aici și în publicația E.P.O. nr. 318216. Clonele din care a fost obținută fig. 18 sunt clonele 5'-32, b114a, 18g, ag30a, CA205a, CA290a, CA216a, pi14a, CA167b, CA156a, CA84a, CA59a, K9-1 (denumită și 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, 15e, b5a, 16jh, C6k și p131jh. Metodele pentru izolarea acestor clone precum și secvențele lor sunt discutate aici și în publicația E.P.O. nr. 318216, care este inclusă în referințele bibliografice ale acestei invenții. În fig. 18, cele trei liniuțe de deasupra secvenței indică poziția probabilă a codonului initiator de metionină.

Clona b114a se suprapune cu clonele 18g, ag30a și CA205a exceptând faptul că clona b114a conține în plus două nucleotide în partea superioară a secvenței din clona 18g (adică 5'-CA). Aceste două nucleotide în plus au fost incluse în secvența genomică HCV arătată în fig. 18.

Trebuie să se rețină faptul că, deși câteva din clonele descrise mai sus s-au obținut din bănci diferite de banca originală cADN HCV lambda-gt11 C (ATCC nr. 40394), aceste clone conțin secvențele cADN HCV care se suprapun peste secvențele cADN HCV din banca originală. Astfel, în esență toată secvența HCV este derivabilă din banca originală lambda-gt11 C (ATCC nr. 40394) care s-a utilizat pentru a izola prima clonă cADN HCV (5-1-1). Izolarea clonei 5-1-1 este descrisă în suplicația E.P.O. nr. 318216, inclusă aici ca referință bibliografică.

Secvența probabilă a proteinei majore HCV codificată în compozitul cADN HCV1 este de asemenea arătată. Primul aminoacid din secvență este metionina inițiatore probabilă a ORF mare. Aminoacizii variante, datorită eterogenităților clonate, sunt indicați deasupra secvenței. Întrucât banca lambda-gt11 a fost creată din serul obținut de la un individ (vezi publicația E.P.O. nr. 318216), rezultatele sugerează că secvențe virale variante (atât de nucleotide cât și de aminoacizi sunt prezente în acest individ).

O examinare a compozitului secvență cADN HCV arată că în afară de ORF mare, mai sunt o serie de ORF-uri dincolo de cel care codifică poliproteina și în interiorul secvenței care codifică poliproteina există un mare număr de ORF mai mici în celelalte două cadre translaționale. ORF-urile care sunt dincolo de poliproteina HCV sunt prezentate în tabelul ce urmează.

Tabel

ORF-uri în partea superioară care codifică poliproteina mare HCV

Nucleotida #	Cadrul de translație	Secvența de aminoacizi
-310	1	MNHSPVRNYCLHAESV
-329	3	MGATLHHESLPCEELL SSRRKRLAMALV
-246	2	MSVQPPGPPLPGEP
-127	1	MPGDLGVPPQDC

1805

1810

Cadrul de citire, poziția și dimensiunea ORF-urilor în josul secvenței care codifică MET inițiator posibil al poliproteinei sunt arătate în tabelul de mai jos. Poliproteina principală este cea translatată din cadrul de citire 2.

Tabel

ORF-uri în partea inferioară a secvenței care codifică MET inițiator posibil

Cadrul de citire	Mărime (aa)	Poziția (bp)
1	168	696
1	105	2343
1	119	5616
2	3025	-42
3	160	5
3	111	1667
3	148	6893

1815

1820

Pe lângă cele de mai sus, la examinarea secvenței care este complementară la banda genomică a ARN HCV se constată că mai conține câteva nici ORF-uri. Unul din aceste ORF-uri, care este complementar la nucleotidele -341 până la -837 din secvența ARN HCV, codifică o polipeptidă cu 385 aminoacizi.

Exemplul 14 *Comparația secvențelor regiunilor 5' obținute din izolatele HCV din diferite locuri geografice*

Secvențele de nucleotide din regiunile 5' ale HCV izolate din SUA (HCV18, HCV27), din Italia (HCV11, HCV124), și din Coreea (HCVK1) au fost comparate.

Izolarea secvențelor cADN HCV s-a făcut în esența așa cum s-a descris mai sus, pentru izolarea 5'-clonă32, exceptând cele ce urmează. ARN extras a fost supus transcripției inverse în cADN utilizând ca primeri fie JH51, fie r16, care sunt complementari cu nucleotidele HCV -90 la -73 și 366 la 383 respectiv. Secvențele acestor primeri sunt următoarele:

<u>Primer</u>	<u>Secvență</u>
JH 51	5' CCC AAC ACT ACT CGG CTA 3'
r16	5' CAC GATA AGG GTA TCG ATG 3'

Amplificarea dsADN HCV s-a făcut prin metoda PCR utilizând și JH52 ca primeri 5'- și respectiv 3'-. Secvența HCV din JH93 este derivată de la nucleotidele HCV -317 la -296, cea din JH52 este din nucleotidele -93 la -117; numerele nucleotidelor sunt indicate în paranteze sub secvențe. În JH52 dinucleotida subliniată a fost mutată pentru a crea locul NotI. Secvențele acestor primeri sunt următoarele:

<u>(Primer)</u>	<u>Etansator</u>	<u>NotI</u>	<u>Secvența HCV</u>
(JH 93)	5'	TTC GCGGCCCG	ACTCCATGAATCACTCACTCCCC 3' (-317) (-296)
(JH52)	5'	AGTCTT GCGGCCGC (-93)	ACGCCCAAATC 3' (-117)

După amplificare, produșii PCR se clivează prin NotI și se clonează în pUC18S.cADN-urile HCV se secvențează fie prin secvențarea directă după amplificarea prin PCR, fie cADN-urile clonate HCV se secvențează prin extinderea primerului și metoda dideoxi. Extinderea primerului și metoda dideoxi se efectuează așa cum s-a descris mai sus pentru secvența 5'-clonă32.

În metoda PCR pentru secvențarea directă s-a utilizat Alex90 (vezi mai sus pentru secvență) ca 5'-primer și r25 ca primer 3'. Alex90 este derivat din nucleotidele HCV de la -312 la -283 și r25 este derivat din nucleotidele 365 la 342 (vezi fig. 18). Secvența lui r25 este:

5' ACC TTA CCC AAA TTG CGC GAC CTA 3'

Din compararea secvențelor din regiunea 5' a HCV27, HCVK1, HCV11, HCV124 și HCV18 cu secvența prototipului HCV, HCV1, s-au observat următoarele: Regiunea 5' examinată este mult conservată printre izolatele HCV 5. S-a constatat că secvențele sunt identice cu excepția unei nucleotide care a fost eliminată la poziția -171 în HCV124, și a ambiguității la patru nucleotide în pozițiile -222 până la -219 în izolatul HCVK1.

Gradele ridicate de conservare a secvenței în această regiune pot reflecta rolul acestei regiuni în replicarea virală și/sau în transcripție și/sau translație.

Exemplul 15 *Variațiile secvenței în izolatele HCV de la diferiți indivizi*

Izolatele de HCV care conțin secvențele ce deviază din CDC/HCV1 s-au identificat la indivizi umani, dintre care unele au fost pozitive serologic pentru anticorpii anti-C100-3 (EC10 a fost anticorp negativ). Identificarea acestor noi izolate s-a realizat prin clonarea

Pe lângă cele de mai sus, la examinarea secvenței care este complementară la banda genomică a ARN HCV se constată că mai conține câteva nici ORF-uri. Unul din aceste ORF-uri, care este complementar la nucleotidele -341 până la -837 din secvența ARN HCV, codifică o polipeptidă cu 385 aminoacizi.

Exemplul 14 *Comparația secvențelor regiunilor 5' obținute din izolatele HCV din diferite locuri geografice*

Secvențele de nucleotide din regiunile 5' ale HCV izolate din SUA (HCV18, HCV27), din Italia (HCV11, HCV124), și din Coreea (HCVK1) au fost comparate.

Izolarea secvențelor cADN HCV s-a făcut în esența așa cum s-a descris mai sus, pentru izolarea 5'-clonă32, exceptând cele ce urmează. ARN extras a fost supus transcripției inverse în cADN utilizând ca primeri fie JH51, fie r16, care sunt complementari cu nucleotidele HCV -90 la -73 și 366 la 383 respectiv. Secvențele acestor primeri sunt următoarele:

Primer

JH 51

r16

Secvență

5' CCC AAC ACT ACT CGG CTA 3'

5' CAC GATA AGG GTA TCG ATG 3'

Amplificarea dsADN HCV s-a făcut prin metoda PCR utilizând și JH52 ca primeri 5'- și respectiv 3'-. Secvența HCV din JH93 este derivată de la nucleotidele HCV -317 la -296, cea din JH52 este din nucleotidele -93 la -117; numerele nucleotidelor sunt indicate în paranteze sub secvențe. În JH52 dinucleotida subliniată a fost mutată pentru a crea locul NotI. Secvențele acestor primeri sunt următoarele:

(Primer)	<u>Etansator</u>	<u>NotI</u>	<u>Secvența HCV</u>
(JH 93)	5' TTC	GCGGCCCG	ACTCCATGAATCACTCACTCCCC 3' (-317) (-296)
(JH52)	5' AGTCTT	GCGGCCGC	ACGCCCAAATC 3' (-93) (-117)

După amplificare, produșii PCR se clivează prin NotI și se clonează în pUC18S.cADN-urile HCV se secvențează fie prin secvențarea directă după amplificarea prin PCR, fie cADN-urile clonate HCV se secvențează prin extinderea primerului și metoda dideoxi. Extinderea primerului și metoda dideoxi se efectuează așa cum s-a descris mai sus pentru secvența 5'-clonă32.

În metoda PCR pentru secvențarea directă s-a utilizat Alex90 (vezi mai sus pentru secvență) ca 5'-primer și r25 ca primer 3'. Alex90 este derivat din nucleotidele HCV de la -312 la -283 și r25 este derivat din nucleotidele 365 la 342 (vezi fig. 18). Secvența lui r25 este:

5' ACC TTA CCC AAA TTG CGC GAC CTA 3'

Din compararea secvențelor din regiunea 5' a HCV27, HCVK1, HCV11, HCV124 și HCV18 cu secvența prototipului HCV, HCV1, s-au observat următoarele: Regiunea 5' examinată este mult conservată printre izolatele HCV 5. S-a constatat că secvențele sunt identice cu excepția unei nucleotide care a fost eliminată la poziția -171 în HCV124, și a ambiguității la patru nucleotide în pozițiile -222 până la -219 în izolatul HCVK1.

Gradele ridicate de conservare a secvenței în această regiune pot reflecta rolul acestei regiuni în replicarea virală și/sau în transcripție și/sau translație.

Exemplul 15 *Variațiile secvenței în izolatele HCV de la diferiți indivizi*

Izolatele de HCV care conțin secvențele ce deviază din CDC/HCV1 s-au identificat la indivizi umani, dintre care unele au fost pozitive serologic pentru anticorpii anti-C100-3 (EC10 a fost anticorp negativ). Identificarea acestor noi izolate s-a realizat prin clonarea

și secvențarea secvențelor din genomul HCV care fusese amplificat prin procedeul PCR utilizând secvențele CDC/HCV1. Amplificarea s-a bazat în esență pe aplicarea metodei HCV/cPCR. Metoda utilizează primerii și probele bazate pe secvențele cADN HCV descrise aici. Prima etapă în această metodă este sinteza unui cADN fie din genomul HCV, fie din intermediul său replicativ, folosind reverstranscriptaza. După sinteza cADN HCV și înainte de amplificare, ARN-ul din probă se degradează prin tehnicile cunoscute de specialiști. După aceea se amplifică un segment stabilit din cADN HCV prin folosirea primerilor corespunzători. Secvențele amplificate sunt clonate și clonele care conțin secvențele amplificate sunt detectate cu o probă care este complementară la secvența situată între primari, dar care nu se suprapune peste primeri.

Exemplul 16 *Izolatele HCV izolate din indivizi din US*

Mostre de sânge care au fost utilizate ca sursă de virioni HCV s-au obținut de la Crucea Roșie Americană din Charlotte, Carolina de Nord și de la Centrul Comunitar de Sânge din Kansas, Kansas City, Missouri. Probele au fost alese pentru anticorpii la antigenul HCV C100-3 folosind un test ELISA descris în publicația E.P.O.nr. 318216 și supuse la o analiză suplimentară Western blot utilizând HRP policlonal de capră anti-uman pentru a măsura anticorpii anti-HCV. Două probe, #23 și respectiv #27 de la Crucea Roșie Americană și de la centrul Comunitar al Sângelui din Kansas s-au dovedit a fi pozitive prin aceste teste.

Particulele virale prezente în serul acestor mostre s-au izolat prin ultracentrifugare în condițiile descrise de Bradley și alții (1985). ARN s-a extras din particule prin digestie cu protează K și SDS la o concentrație finală de 10 μg/ml proteinază K și 0,1% SDS; digestia a durat o oră la 37°C. ARN viral a fost apoi purificat prin extracție cu cloroform-fenol așa cum s-a descris în publicația E.P.O. nr. 318216.

ARN HCV din preparatul ARN a fost transcris invers în cADN în esență așa cum s-a descris în publicația E.P.O. nr. 318216, exceptând faptul că oligonucleotida JHC 7, care corespunde la secvențele cADN 1958-1939 și care are secvența următoare s-a utilizat ca primer pentru reacția cu reverstranscriptază.

JHC 7: CCA GCG GTG GCC TGG TAT TG.

După ce s-au sintetizat ambele benzi ale cADN, cADN obținut a fost amplificat prin metoda PCR în esență așa cum s-a descris mai sus pentru izolarea clonelor generate de amplificarea PCR, exceptând faptul că oligonucleotidele primeri utilizate, adică JHC 6 și ALX 80 au fost concepute pentru a amplifica un segment de 1080 nucleotide al genomului HCV din CDC/HCV1 nucleotidele 673 la 1751. S-au conceput în plus primeri pentru a încorpora un loc de restricție NotI la capătul 3' al produsului PCR și un capăt neascuțit la terminația 5'. Secvențele primerilor sunt:

ALX 80: TTT GGG TAA GGT CAT GGA TAC CCT TAC GTG; și

JHC 6: ATA TGC GGC CGC CTT CCG TTG GCA TAA.

ALX 80 corespunde nucleotidele 678-702 ale secvenței CDC/HCV1; JHC 6 corespunde nucleotidelor 1752-1738 ale HCV1 (în plus sunt 12 nucleotide diferite care condică un loc NotI). Indicarea nucleotidelor în JHC 6, de exemplu un număr scăzător, arată amplasarea lor în banda anti-sens.

După amplificarea PCR cu primerii descriși mai sus, capătul neascuțit se transformă într-un loc NotI după cum urmează: O coadă de homopolimer de 15 dGS se atașează la produsul PCR utilizând deoxinucleotidtransferaza terminală și produșii sunt supuși din nou amplificării prin PCR utilizând ca primeri JHC 6 și JHC 13. Cel de al doilea primer, JHC 13, a cărui secvență este dată mai jos, este conceput pentru a conține un loc NotI pe lângă un fag SP6 promotor (promotorul SP6 este descris în GENETIC ENGINEERING J. Setlow Ed. 1988).

JHC 13: AAT TCG CGG CCG CCA TAC GAT TTA GGT GAC
ACT ATA GAA CCC CCC CCC CCC CCC.

În scopul de a clona cADN HCV amplificat, produșii PCR se clivează cu NotI, se precipită cu spermină pentru a îndepărta oligonucleotidele libere [Hoopen și alții (1981) și se clonează în locul NotI al pUC18S. cADN-urile HCV din trei clone derivate de la fiecare izolat HCV s-au suspus analizei secvenței. Analiza s-a efectuat în principal prin metoda descrisă de Chen și Seeburg (1985).

Secvențele în consens ale clonelor derivate din HCV în mostrele 23 și 27 sunt arătate în fig. 40 și respectiv fig. 41. Secvențele variabile sunt de asemenea arătate în aceste figuri, precum și aminoacizii codificați în secvențele în consens.

-fig. 35 și fig. 36 arată comparații ale secvențelor de nucleotide cu bandă pozitiv aliniată [-fig. 35] și secvențele posibile de aminoacizi (-fig. 36) ale mostrelor 23 și 27 și HCV1. Secvența de aminoacizi a HCV1 din fig. 35 reprezintă aminoacizii cu numerele 129-467 ai poliproteinei HCV codificați de ORF mare din ARN genomic HCV. O examinare a figurii 40 și figurii 41 arată că există variații în secvențele celor trei clone izolate. Variația în secvență la nivelul nucleotidei și la nivelul aminoacidului sunt centralizate în tabelul ce urmează. În acest tabel, polipeptidele notate cu S și NS1 reprezintă aminoacizii cu numerele 130 la aproximativ 380 și 380 la aproximativ 470 respectiv. Enumerarea este de la metionina inițitoare probabilă. Terminologia S și NS1 se bazează pe poziționarea secvențelor care codifică polipeptidele folosind modelul Flavivirus. Însă, așa cum s-a discutat mai sus, evidențe recente sugerează că nu există o corelație totală între HCV și Flavivirusuri în ce privește domeniile polipeptidice virale, mai ales în domeniile probabile E/NS1. Într-adevăr, polipeptidele HCV și domeniile lor de codificare pot manifesta o derivație însemnată de la modelul Flavivirus.

Tabel

Omologia secvențelor

	Codificarea nucleotidei			Aminoacidul codificat		
	global %	S %	NS1 %	global %	S %	NS1 %
HCV1/HCV23	93	95	91	92	95	87
HCV1/HCV27	89	93	84	89	95	82
HCV23/HCV27	89	93	85	90	93	84

Deși există variații în noile secvențe HCV izolate, secvențele clonate din mostrele 23 și 27 (denumite HCV23 și HCV27) conțin fiecare 1019 nucleotide, care indică lipsa deleției și a mutantelor de adiție în această regiune în clonele selectate. Secvențele din figurile 35 și 36 mai arată că secvențele izolate nu sunt rearanjate în această regiune.

În tabelul de mai sus se face o comparație a secvențelor în consens pentru HCV1 și pentru celelalte izolate de HCV. Variația secvențelor între izolatul HCV1 de cimpanzeu și HCV-urile izolate din oameni este aproximativ aceeași ca cea constatată între HCV-urile de origine umană.

Prezintă interes faptul că variațiile secvențelor în două dintre domeniile posibile nu este uniformă. Secvența dintr-o regiune posibilă S apare ca fiind relativ constantă și răspândită la întâmplare în întreaga regiune. În contrast, o regiune posibilă NS1 are un grad mai mare de variabilitate decât secvența în întregime și variația apare ca fiind într-un grup foarte variabil de 28 aminoacizi care este amplasat cu aproximativ 70 aminoacizi în jos de la terminația N posibilă a poliproteinei probabile.

Cu toate că se poate argumenta că variațiile constatate au fost introduse în timpul procesului de amplificare, este puțin probabil ca toate aceste variații să fie ca rezultat al acesteia. S-a apreciat că polimeraza Taq introduce erori într-o secvență de aproximativ

o bază per 10 kilobaze de model ADN per ciclu (Saiki și alții, 1988). Pe baza acestei estimări, s-ar fi putut introduce până la 7 erori în timpul amplificării PCR a fragmentului ADN de 1019 pb. Însă, cele trei subclone ale HCV-23 și HCV-27 au produs 29 și respectiv 14 variații. Cele ce urmează sugerează că aceste variații se produc natural. Circa 60% din schimbările bazelor sunt mutații liniștite care nu schimbă secvența de aminoacizi. Variațiile introduse de polimeraza Taq în timpul amplificării PCR ar fi de așteptat să se producă la întâmplare; însă, rezultatele arată că secvențele variante sunt grupate în cel puțin o regiune specifică. Mai mult, o secvență în consens a fost derivată prin secventarea a multe clone diferite derivate de la produșii amplificați PCR.

Exemplul 17 *Izolate HCV din indivizi umani în Italia și în US*

Segmentele de ARN HCV prezente în diferitele izolate s-au amplificat prin metoda HCV/cPCR. Aceste segmente cuprind o regiune de aproximativ 0,6 până la 1,6 kb în josul benzii de la codonul de pornire care codifică metionina al poliproteinei probabil HCV. Izolatele sunt din speciimenele biologice obținute din indivizii infectați cu HCV. Mai corect, izolatul HCT#18 este din plasma umană de la un individ din US. EC1 și EC10 sunt din biopsia ficatului unui pacient italian și Th este din fracția periferică de mononucleotidă din sângele unui pacient american. S-au izolat de la un cimpanzeu segmente comparabile de ARN HCV.

ARN a fost extras din speciimenele de plasmă umană utilizând fenol + CHCl_3 : alcool izoamilic pentru extracție. Fie 0,1 ml, fie 0,01 ml de plasmă a fost diluată până la un volum final de 1,0 ml cu soluție TENB/proteinază K/SDS (0,05 M Tris-HCl, pH 8,0, EDTA 0,001 M, NaCl 0,1 M, 1 mg/ml proteinază K și SDS 0,5%) care conține 10 până la 40 $\mu\text{g/ml}$ acid polidenilic și s-a incubat la 37°C timp de 60 minute. După această digestie cu proteinază K, fracțiunile de plasmă obținute au fost deproteinizate prin extracție cu TE (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM) saturate în fenol la pH 6,5. Faza fenolică a fost separată prin centrifugare și a fost reextrasă cu TENB ce conținea SDS 0,1%. Fazele apoase obținute din fiecare extracție au fost colectate și extrase de două ori cu un volum egal de fenol/cloroform/alcool izoamilic (1:1(99:1)) și apoi de două ori cu un volum egal de amestec 99:1 cloroform/alcool izoamilic. După separarea fazelor prin centrifugare, faza apoasă a fost adusă la o concentrație finală de acetat de sodiu 0,2 M și acizii nucleici s-au precipitat prin adăugarea a două volume de etanol. Acizii nucleici precipitați au fost recuperați prin ultracentrifugare într-un rotor SW41 la 38 K, timp de 60 minute, la 4°C, sau într-o microcentrifugă timp de 10 minute la 10 K, la 4°C.

Fracția de mononucleotidă s-a obținut prin sedimentarea părților alicote individuale de sânge prin Ficoll-Paque® (Pharmacia Corp.), utilizând instrucțiunile fabricantului. ARN total s-a extras din fracție folosind procedeul cu tiocianat de guanidiniu descris în publicația E.P.O. nr. 318216 (vezi și Choo și alții 1989).

Sinteza cADN HCV din mostre a fost realizată utilizând revers transcripază și primerii derivați din clona 156e și din clona K91. Acești primeri, care sunt anti-sens față de ARN genomic, au următoarele secvențe:

156e16B: 5' CGA CAA GAA AGA CAG A 3'

K91/16B: 5' CGT TGG CAT AAC TGA T 3'

După precipitarea cu etanol, ARN sau fracția de acid nucleic precipitată a fost uscată și resuspendată în apă distilată tratată cu DEPC. Structurile secundare din acizii nucleici au fost distruse prin încălzire la 65°C timp de 10 minute și mostrele au fost imediat răcite pe gheață. cADN s-a sintetizat folosind 1 la 3 μg din ARN total din ficat, sau din acizii nucleici (sau ARN) extrași din 10 până la 100 microlitri de plasmă. Sinteza întrebuintează revers transcripază și s-a făcut în 25 microlitri de reacție folosind metodologia indicată de fabricant, BRL. Toate amestecurile de reacție pentru sinteza cADN au conținut 23 unități de inhibitor ARN-ază, RNASIN (Fisher/Promega). După

sinteza cADN, amestecurile de reacție s-au diluat cu apă, s-au fiert 10 minute și s-au răcit repede pe gheață.

2025 Fiecare set de mostre a fost supus la două runde de amplificare PCR. Primerii pentru reacții au fost aleși astfel încât să amplifice regiunile notate cu "EnvL" și "EnvR". Regiunea "EnvL" cuprinde nucleotidele 669-1243 și aminoacizii probabili 117 la 308; regiunea "EnvR" cuprinde nucleotidele 1215-1629 și codifică aminoacizii probabili 300-408 (aminoacizii probabili sunt numărați începând de la codonul probabil de inițiere cu metionină). Corelația dintre aceste regiuni față de poliproteina probabilă codificată în cADN HCV și față de polipeptidele codificate în modelul Flavivirus este arătată în fig. 48.

2030 Primerii pentru prima rundă de reactivi PCR au fost derivați din secvențele cADN HCV din clona ag30a, sau clona 156e sau clona k9-1. Primerii utilizați pentru amplificarea regiunii EnvL au fost 156e16B (arătat mai sus) și ag30a16A pentru banda de sens; amplificarea regiunii EnvR utilizează primerul K91/16B (arătat mai sus) și 156e16a pentru banda de sens. Secvențele primerilor pentru banda de sens sunt următoarele:

2035 pentru EnvL, ag30a16A: 5' CTC TAT GGC AAT GAC G 3' și
2040 pentru EnvR, 156e16A: 5' AGC TTC GAC GTC ACA T 3'

2040 Reacțiile PCR s-au efectuat în principal conform indicațiilor fabricantului (Cetus-Perkin-Elmer), exceptând adăugarea a 1 microgram de ARN-ază A. Reacțiile s-au realizat într-un volum final de 100 μl. PCR s-a efectuat pe 30 cicluri, utilizând un regim de 94°C (1 min.), 37°C (2 min.) și 72°C (3 min) cu o extindere de 7 min. la 72°C pentru ultimul ciclu. Mostrele au fost apoi extrase cu fenol-CHCl₃, precipitate cu etanol de două ori, resuspendate în Tris-HCl 10 ml pH 8,0, concentrate utilizând filtrarea pe Centricon-30 (Amicon). Acest procedeu îndepărtează eficient oligonucleotidele cu o mărime mai mică de 30 nucleotide; astfel primerii din prima rundă de amplificare PCR sunt îndepărtați.

2045 Mostrele concentrate Centricon-30 sunt apoi supuse la a doua rundă de amplificare PCR utilizând probele prevăzute din clonele 202a și 156e pentru regiunea EnvL și din clonele 156e și 59a pentru regiunea EnvR. Primerii pentru amplificarea regiunii EnvL au următoarele secvențe:

2050 202aEnv41a: 5' CTT GAA TTC GCA ATT TGG GTA
AGG TCA TCG ATA CCC TTA CG 3' și
156e38B': 5' CTT GAA TTC GAT AGA GCA ATT
2055 GCA ACC TTG CGT CGT CC 3'.

Primerii pentru amplificarea regiunii EnvR din ARN-urile derivate de la oameni au următoarele secvențe:

156e38A': 5' CTT GAA TTC GGA CGA CGC AAG
GTT GCA ATT GCT CTA TC 3' și
2060 59aEnv39C: 5' CTT GAA TTC CAG CCG GTG TTG
AGC CTA TCA TTG CAG TTC 3'

2065 Amplificarea prin PCR s-a făcut pe 35 cicluri utilizând un regim de 94°C (1 min.), 60°C (1 min.) și 72°C (2 min.), cu extinderea la 7 min. la 72°C în ultimul ciclu. Mostrele au fost extrase apoi cu fenol: CHCl₃, precipitate de două ori și digerate cu EcoRI. Producții reacției PCR s-au analizat prin separarea produsilor prin electroforeză pe geluri 6% poliacrilamide. ADN-ul cu mărimea aproximativă estimată a produsului PCR presupus a fost electroeluat din geluri și subclonat fie într-un vector plasmidă pGEM-4, fie în lambda-gt11. Mărimile produsilor la care s-a așteptat să se ajungă pentru EnvL și EnvR după prima rundă de amplificare sunt 615 pb (perechi de bază) și respectiv 683 pb; după a doua rundă de amplificare, mărimile produsilor așteptați pentru EnvL și EnvR sunt de 414 pb și respectiv 575 pb. Plasmidele care conțin produșii amplificați s-au folosit pentru a transforma celulele gazdă; plasmida pGEM-4 s-a folosit pentru a transforma DH-5-alfa și lambda-gt11 s-a folosit pentru a transforma C600 delta-HFL. Clonele celulelor

transformate fie se hibridizează pe probele HCV corespunzătoare (descrise mai jos), fie se selectează acele care au inserturi de mărime corespunzătoare. După aceea inserturile se clonează în M13 și se secvențează.

Probele pentru toți produșii HCV/cPCR constau în secțiuni marcate cu P³² de cADN HCV care au fost în prealabil preparate prin amplificarea PCR a unei regiuni de clonă 216 (utilizând CA216a16A și 216a16B ca primeri) și de clonă 84 (utilizând CA84a16A și CA84a16B sau CA84a16C ca primeri); P³² a fost introdus în produșii PCR prin translație cu creștere. Probele pentru prima și a doua rundă de amplificare EnvL au fost de la clona 216. Cele pentru prima rundă de amplificare EnvR au fost de la clona 84 (adică CA84a16A și CA84a16B) și pentru a doua rundă de amplificare EnvR au fost CA84a16A și CA84a16C. Aceste probe nu s-au suprapus peste primerii utilizați în reacțiile HCV/cPCR. Secvența de primeri pentru amplificarea PCR a probelor este în tabelul următor.

Tabel

Primer	Clonă	Secvență
CA216a16A	216	5' TGA ACT ATG CAA CAG G 3'
CA216a16B	216	5' GGA GTG TGC AGG ATG G 3'
CA84a16A	84	5' AAG GTT GCA ATT GCT C 3'
CA84a16B	84	5' ACT AAC AGG ACC TTC G 3'
CA84a16C	84	5' TAA CGG GTC ACC GCA T 3'

Informația secvenței pentru variantele din regiunea EnvL s-a obținut de la trei clone din HCT # 18, două clone din TH, 3 clone din ECI și de la clonele HCV1 descrise în publicația E.P.O. nr. 318216, precum și mai sus. În fig. 43 este arătată o comparație între secvența compozită de nucleotide a fiecărui izolat derivat de la aceste clone. În figură, fiecare secvență este redată de la 5' până la 3' pentru banda de sens pentru regiunea EnvL și secvențele au fost alinate. Linile verticale și literele mari indică omologia secvențelor, absența unei linii și a unei litere netransformată în literă mare indică lipsa de omologie. Secvențele arătate în linii sunt după cum urmează: linia 1, Thorn; linia 2, ECI; linia 3, HCT # 18; linia 4, HCV1.

Informația secvenței pe variantele din regiunea EnvR s-a obținut din 2 clone de EC10 și din clonele HCV1 descrise în publicația E.P.O. nr. 318216 și mai sus. Cele două clone EC10 diferă numai printr-o nucleotide. În fig. 44 se arată o comparație între secvențele de nucleotide ale EC10 (clona 2) și un compozit al secvențelor HCV1; fiecare secvență este arătată de la 5' până la 3' pentru banda de sens a regiunii EnvR și secvențele au fost alinate. Punctele duble dintre secvențe indică omologia de secvență.

În fig. 45 și respectiv în fig. 46 se arată o comparație între secvențele de aminoacizi codificate în regiunea EnvL (aminoacizii # 117-308) și EnvR (aminoacizii # 300-439) pentru fiecare din izolate. În figuri sunt incluse secvențele pentru izolatele JH23 și JH27, descrise mai sus. De asemenea sunt indicate secvențele pentru izolatul japonez. În figuri, secvența de aminoacizi pentru regiune este dată în întregime pentru HCV1 și se indică aminoacizii neomologi din diferitele izolate.

Așa cum se arată în fig. 45, în regiunea EnvL există în total aproximativ 93% omologie între HCV1 și celelalte izolate. HCT18, Th și EC1 au aproximativ 97% omologie cu HCV1; JH23 și JH27 au aproximativ 96% și respectiv 95% omologie cu HCV1. fig. 46 arată că omologiile în regiunea EnvR sunt cu mult mai mici decât în regiunea EnvL; mai mult, o subregiune apare ca fiind hipervariabilă (adică de la aminoacizii 383-405). Aceste date sunt prezentate în tabelul imediat următor.

Omologia regiunii EnvR

Izolatul	Procent de omologie cu HCV1	
	AA330-AA438	AA383-AA405
JH23 (SUA)	83	57
JH27 (SUA)	80	39
Japonez	73	48
EC10 (Italia)	84	48

Exemplu 18 Detectarea benzii pozitive și negative 5' ARN-HCV în ser

ARN din HCV27, izolat din ser, a fost analizat pentru prezența benzilor pozitivă și negativă folosind metoda PCR. Metoda PCR s-a efectuat în principal așa cum s-a descris mai sus, cu excepția următoarelor. ARN HCV27 extras a fost transcris invers în cADN cu o singură bandă utilizând ca primer fie Alex90, fie JH52 (descriși mai sus). Secvența Alex 90 corespunde cu cea din nucleotidele -312 la -283 ale benzii pozitive a ARN HCV, în timp ce JH52 corespunde cu cea din nucleotidele -117 la -93 ale benzii negative. cADN-urile HCV cu o singură bandă obținute se amplifică fiecare separat prin PCR utilizând Alex90 și JH52. Detectarea produsilor amplificați se face prin metoda Southern blotting utilizând Alex89 ca probă. Alex89 se potrivește cu nucleotidele cu numerele -203 la -175 din ARN HCV. Secvența Alex89 este:

5' CCA TAG TGG TCT GCG GAA CCG GTG AGT ACA 3'

Analiza arată că, prin această metodă, semnalele produsilor amplificați ale ambelor benzi ARN sunt de intensitate egală. Aceste rezultate sugerează că ARN HCV din regiunea 5' poate exista ca ARN cu bandă dublă.

Exemplul 19 Probele pentru hibridizarea sandwich pentru HCV

Acest exemplu arată seturile de probe de marcare și de captură utile pentru detectarea ARN HCV în mostrele biologice, utilizând în principal experimentul descris în brevetul US nr. 4868105. Metoda este o încercare de hibridizare sandwich în fază de soluție care folosește atât probele de marcare cât și probele de capturare ce se hibridizează pe secvențele țintă într-un acid nucleic de analizat. În selectarea mostrelor biologice pentru HCV, probele utilizate se leagă de regiunile conservate ale genomului HCV și regiunile de legare HCV sunt selectate pentru unicitatea lor în raport cu genomul HCV. Regiunile care se leagă de partenerul de legare ale probei captură, sau probei de marcare care se leagă de radicalul ce se marchează (sau de un multimer ce se amplifică dacă se folosește metoda descrisă în publicația E.P.O. nr. 317077), sunt selectate astfel încât ele nu se leagă de nici una din secvențele cunoscute din banca de date sau din HCV și care au conținutul corespunzător de Gs și Cs pentru a permite să se forme duplexul stabil cu complementele lor în condițiile de selecție. Probele de captură și de marcare sunt în seturi și probele unui set nu se amestecă cu probele din alt set. Aceste probe sunt constituite din secvențe care sunt complementare la următoarele secvențe de nucleotide din banda ce se codifică a secvenței prototip cADN HCV arătată în fig. 18.

RO 113059 B1

Setul 1

Tipul de probă	Numărul probei	Complement la nucleotidele cu numelere	2165
Captură	42.XT1.1	-318 la -289	
Captură	42.XT1.2	-285 la -256	
Captură	42.XT1.3	-252 la -223	
Captură	42.XT1.4	-219 la -190	
Marcare	42.LLA2C.5	-186 la -157	2170
Marcare	42.LLA2C.6	-153 la -124	
Marcare	42.LLA2C.7	-120 la -91	
Marcare	42.LLA2C.8	-87 la -58	
Marcare	42.LLA2C.9	-54 la -25	
Marcare	42.LLA2C.10	-21 la 9	2175
Marcare	42.LLA2C.11	13 la 42	
Marcare	42.LLA2C.12	46 la 75	
Marcare	42.LLA2C.13	79 la 108	
Marcare	42.LLA2C.14	112 la 141	
Marcare	42.LLA2C.15	145 la 174	2180

Setul 2

Titul de probă	Numărul probei	Complement la nucleotidele cu numere	
Captură	42.16.XT1	4378 la 4407	
Captură	42.17.XT1	441 la 4440	2185
Captură	42.18.XT1	4444 la 4473	
Captură	42.19.XT1	4477 la 4505	
Captură	42.20.XT1	4510 la 4539	
Marcare	42.21.LLA2C	4543 la 4572	
Marcare	42.22.LLA2C	4576 la 4605	2190
Marcare	42.23.LLA2C	4609 la 4638	
Marcare	42.24.LLA2C	4652 la 4571	
Marcare	42.25.LLA2C	4675 la 4704	
Marcare	42.26.LLA2C	4708 la 4737	
Marcare	42.27.LLA2C	4771 la 4770	2195
Marcare	42.28.LLA2C	4774 la 4803	
Marcare	42.29.LLA2C	4807 la 4838	
Marcare	42.30.LLA2C	4840 la 4869	
Marcare	42.31.LLA2C	4873 la 4902	

2200

Setul 3

2205

2210

Tipul probei	Numărul probei	Complement la nucleotidele cu numere
Captură	42.32.XT1	4056 la 4085
Captură	42.33.XT1	4089 la 4085
Captură	42.34.XT1	4122 la 4151
Captură	42.35.XT1	4155 la 4184
Marcare	42.36.LLA2C	4188 la 4217
Marcare	42.37.LLA2C	4221 la 4250
Marcare	42.38.LLA2C	4254 la 4283
Marcare	42.39.LLA2C	4287 la 4316
Marcare	42.40.LLA2C	4230 la 4349
Marcare	42.41.LLA2C	4353 la 4382
Marcare	42.42.LLA2C	4386 la 4415
Marcare	42.43.LLA2C	4419 la 4448

2215

În seturile de mai sus fiecare probă captură conține, pe lângă secvențele complementare cu secvențele HCV, următoarea secvență în partea inferioară secvenței HCV (adică la capătul 3'):

5' CTT CTT TGG AGA AAG TGG TG 3'

2220

Secvența comună fiecărei probe captură este complementară cu o secvență din partenerul(ii) de legare, astfel încât, după hibridizare, duplexul poate să fie capturat prin fixarea pe o fază solidă.

De asemenea, în fiecare set, fiecare probă de marcăre conține, pe lângă secvențele complementare la secvențele HCV, următoarea secvență în partea inferioară secvenței HCV:

2225

5' TTA GGC ATA CCC GTG TC 3'

Dacă se utilizează metoda descrisă în publicația E.P.O. nr. 317077, secvența comună la fiecare probă de marcăre este complementară la o secvență dintr-un multimer, pentru a permite formarea hibridului duplex cu acest multimer.

Secvențele probelor din seturile de mai sus sunt arătate în fig. 19.

2230

Exemplul 20 Detectarea secvențelor polinucleotidei HCV, utilizând amplificarea PCR

2235

În metoda generalizată pentru amplificarea ARN HCV prin cPCR s-a prevăzut ca banda de ARN să fie un virion sau o bandă mARN, care este banda de "sens". Însă, este de asemenea posibil ca formele intermediare replicative să se determine și să fie "anti-sens" în acest caz primerul este considerat "sens". Banda de sens ARN care conține regiunea țintă este hibridizată cu un primer anti-sens care inițiază sinteza benzii replicate ce conține ținta. cADN față de modelul ARN este sintetizat cu o reverstrasncriptază dependentă de primer și de model. cADN-ul din hibridul ARN:cADN obținut este scos prin denaturare și tratament cu ARN-ază.

Primerii sunt fixați pe cADN și se extind cu o polimerază ADN dependentă de primer și de model. Producții sunt denaturați, se refixează primeri pe ei și se efectuează o a doua rundă de sinteză. Se realizează o serie de cicluri până când produsul amplificat care conține regiunea țintă este adus la mărimea dorită, care este cel puțin un nivel detectabil. 2240

Exemplul 21 *Detectarea secvențelor de acizi nucleici HCV amplificați derivați din secvențele de acizi nucleici HCV din speciimenele de ficat și plasmă de la cimpanzei cu NANBH* 2245

Acizii nucleici HCV prezenți în ficatul și în plasma cimpanzeilor cu NANBH și nu în cimpanzeii supuși controlului și constituind martori, se amplifică folosind în principal reacția în laț a polimerazei (PCR), procedeu descris de Saiki și alții (1986). Oligonucleotidele primer sunt derivate de la secvențele cADN HCV în clona 81 (-fig. 21), sau clonele 36 (-fig. 22) și 37b (-fig. 23). Secvențele amplificate sunt identificate prin electroforeza în gel și printr-o metodă modificată Southern blotting, utilizând ca probe oligomerul cADN corespunzător sau secvența cADN translatată prin tăiere cu o secvență din regiunea dintre cei doi primeri, dar care nu îi include. 2250 2255

Mostrele de ARN care conțin secvențele de HCV de examinat prin sistemul de amplificare, au fost izolate din biopsiile de ficat a trei cimpanzei cu NANBH și de la doi cimpanzei martor. Izolarea fracției poli A⁺ ARN s-a făcut prin procedeu cu tiocianat de guanidiniu descris de Maniatis și alții (1982). 2260

Mostrele de ARN care au trebuit să fie examinate prin sistemul de amplificare au fost de asemenea izolate din plasmale a doi cimpanzei cu NANBH și de la un cimpanzeu martor, precum și dintr-o colectare de plasmă de la cimpanzeii martor. Un cimpanzeu infectat a avut un titru egal sau mai mare de cât 10⁶ CID/ml și celălalt cimpanzeu infectat a avut un titru egal sau mai mare decât 10⁵ CID/ml. 2265

Acizii nucleici s-au extras din plasmă după cum urmează. 0,1 ml sau 0,01 ml de plasmă s-a diluat până la un volum final de 1,0 ml cu soluție TENB/proteinază K/SDS (Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0, EDTA 0,001 M, NaCl 0,1 M proteinază K 1 mg/ml și 0,5% SDS) care conține 10 micrograme/ml acid poliadenilic și s-a incubat la 37°C, timp de 60 minute. După această digestie cu proteinaza K, fracțiunile de plasmă rezultate s-au deproteinizat prin extracție cu fenol saturat cu TE (Tris-HCl 10,0 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM). Faza în fenol s-a separat prin centrifugare și s-a extras cu TENB care conține 0,1% SDS. Fazele apoase obținute din fiecare extracție s-au colectat și s-au extras de două ori cu un volum egal de fenol/cloroform/alcool izoamilic [1:1(99:1)] și apoi de două ori cu un volum egal de amestec 99:1 cloroform/alcool izoamilic. După separarea fazelor prin centrifugare, faza apoasă s-a adus până la o concentrație finală de acetat de sodiu 0,2 M și acizii nucleici s-au precipitat prin adăugarea a două volume de etanol. Acizii nucleici precipitați s-au recuperat prin ultracentrifugare într-un rotor SW 41 la 38 K, timp de 60 min. la 4°C. 2270 2275 2280

În plus față de cele de mai sus, plasma de cimpanzeu cu titru mare și plasma martor din colectări s-au supus extracției cu 50 μg de suport poli A prin procedeu lui Chomoyzski și Sacchi (1987). Acest procedeu întrebuintează o extracție acidă cu tiocianat de guanidiniu. ARN s-a recuperat prin centrifugare 2285

la 10000 rpm timp de 10 minute, la 4°C într-o microcentrifugă Eppendorf.

În două cazuri, înainte de sinteza cADN prin reacția PCR, acizii nucleici extrași din plasmă prin metoda proteinază K/SDS/ fenol au fost în continuare purificați prin legare pe și eluare din coloane S și S Elutip-R. S-a lucrat conform instrucțiunilor fabricantului.

cADN întrebuințat ca model pentru reacția PCR a fost derivat din acizii nucleici (acizii nucleici în total sau ARN) preparați cum s-a descris mai sus. După precipitarea cu etanol, acizii nucleici precipitați s-au uscat și s-au resuspendat în apă distilată tratată DEPC. Structurile secundare din acizii nucleici au fost distruse prin încălzire la 65°C, timp de 10 min. și mostrele au fost imediat răcite pe gheață. cADN s-a sintetizat utilizând 1 la 3 μg de ARN total din ficat de cimpanzeu, sau din acizii nucleici (sau ARN) extrași din 10 la 100 μl de plasmă. În sinteză s-a folosit reverstrascriptaza și s-a făcut în 25 μl de reacție utilizând procedeul specificat de fabricant, BRL. Primerii pentru sinteza cADN au fost cei utilizați și în reacția PCR descriși mai jos. Toate amestecurile de reacție pentru sinteza cADN au conținut 23 unități de inhibitor ARN-ază, RNASIN (Fisher/Promega). După sinteza cADN, amestecurile de reacție au fost diluate cu apă, fierte timp de 10 minute și răcite repede pe gheață.

Reacțiile PCR s-au efectuat în principal conform indicațiilor fabricantului (Cetus-Perkin-Elmer), cu excepția adăugării a 1 μg de ARN-ază A. Reacțiile s-au realizat într-un volum final de 100 μl. PCR s-a efectuat pe 35 cicluri, utilizând un regim de 37°C (2 min.), 72°C (3 min.) și 94°C (1 min.).

Primerii pentru sinteza cADN și pentru reacțiile PCR au fost derivați din secvențele cADN HCV în clona 81, clona 36 sau clona 37b. (Secvențele cADN HCV ale clonelor 81, 36 și 37b sunt arătate în fig. 21, 22 și respectiv 23). Secvențele celor doi primeri 16-meri derivate din clona 81 sunt:

5' CAA TCA TAC CTG ACA G 3' și

5' GAT AAC CTC TGC CTG A 3'.

Secvența primerului din clona 36 este:

5' GCA TGT CAT GAT GTA T 3'.

Secvența primerului din clona 37b este:

5' ACA ATA CGT GTC TCA C 3'.

În reacțiile PCR, perechile de primeri constau fie din cei doi 16-meri derivați de la clona 81, fie 16-merul de la clona 36, și 16-merul de la clona 37b.

Produșii reacției PCR s-au analizat prin separarea produșilor prin electroforeză în gel alcalin, urmată de Southern blotting, și detectarea secvențelor amplificate cADN HCV cu o probă de oligonucleotidă internă marcată cu P³² derivată din regiunea cADN HCV care nu se suprapune cu primerii. Amestecurile reacției PCR au fost extrase cu fenol/cloroform și acizii nucleici s-au precipitat din faza apoasă cu sare și etanol. Acizii nucleici precipitați s-au colectat prin centrifugare și s-au dizolvat în apă distilată. Părți alicote din mostre au fost supuse electroforezei pe geluri de agaroză alcalină 1,8%. ADN-uri cu o singură bandă cu lungimile de 60, 108 și 161 nucleotide au fost co-electroforezați pe geluri ca marcheri de greutate moleculară. După electroforeză, ADN-urile din gel au fost transferate pe hârtie "Biorad Zeta Probe". Condițiile de prehibridizare și hibridizare și cele de spălare au fost cele specificate de fabricant (Biorad).

Probele utilizate pentru hibridizarea - detecția cADN HCV amplificat au fost următoarele: Când perechea de primeri PCR a derivat din clona 81, proba a fost un 108-mer cu o secvență corespunzătoare cu cea care se află în regiunea 2335 dintre secvențele celor doi primeri. Când perechea de primeri PCR a derivat din clonele 36 și 37b, proba a fost un insert cADN HCV translatat prin creștere derivat din clona 35 a cărui secvență de nucleotide este arătată în fig. 32. Primerii sunt derivați din nucleotidele 155-170 ale insertului clonei 37b și 206-268 ale insertului clonei 36. Capătul 3' al insertului cADN HCV din clona 35 se suprapune 2340 peste nucleotidele 1-186 din insertul clonei 36; iar capătul 5' al insertului clonei 35 se suprapune peste nucleotidele 207-269 ale insertului din clona 37b (se compară figurile 22, 32 și 23). Astfel, insertul cADN din clona 35 acoperă o parte din regiunea dintre secvențele primerilor derivați din clonele 36 și 37b și este utilă ca probă pentru secvențele de amplificare care includ acești primeri. 2345

Analiza ARN din mostrele de ficat s-a făcut conform cu procedeul de mai sus utilizând seturile de primeri și de probe. ARN din ficatul celor trei cimpanzei cu NANBH a dat rezultate pozitive la hibridizare pentru secvențele amplificate de mărimea așteptată (161 și 586 nucleotide pentru 81 și respectiv 36 și 37b), în timp ce cimpanzeii martori au dat rezultate la hibridizare negative. Aceleași 2350 rezultate s-au obținut prin repetarea de trei ori a analizei.

Analiza acizilor nucleici și a ARN din plasmă s-a făcut tot conform procedurii de mai sus utilizând primerii și proba din clona 81. Plasmele au fost de la doi cimpanzei cu NANBH și plasmele colectate de la cimpanzeii martor. Ambele plasme NANBH au conținut acizi nucleici/ARN care au dat rezultate pozitive 2355 în încercarea de amplificare PCR. Aceste rezultate s-au obținut de câteva ori.

Se cunoaște faptul că virusurile defective există în virusurile ARN. Prin folosirea tehnologiei PCR este posibil să se constituie primeri care să amplifice secvențele genomului HCV. Prin analiza produsilor amplificați este de așteptat să se poată identifica atât versiunile defective ale genomului viral cât și speciile 2360 virale de tip sălbatic. Ca atare, utilizând doi primeri bazați pe secvența cunoscută HCV, se poate prevedea cu precizie mărimea așteptată a produsului PCR. Orice specii mai mari observate prin electroforeza în gel și analiza hibridizării ar putea să reprezinte genoame variante potențial. În alt mod spus, orice specii mai mici constatate în acest mod ar putea să reprezinte agenți defectivi. Analizele acestor 2365 tipuri pot fi utile la confirmarea originii exacte a secvenței cunoscute HCV, adică dacă este într-adevăr o secvență virală de tip sălbatic sau un genom defectiv.

Tehnicile și metodele pentru aceste analize sunt bine cunoscute de specialiști și au fost descrise anterior. Această metodologie va permite unui specialist în domeniu să obțină forme corelate (tip sălbatic sau defective) ale genomului viral. 2370

Exemplul 22 *Detectarea secvențelor în particolele capturate care, când se amplifică prin PCR, se hibridizează pe cADN HCV derivat de la clona 81*

ARN în particole capturate s-a obținut așa cum se va descrie mai jos. Analiza secvențelor care hibridizează pe cADN HCV derivat din clona 81 s-a efectuat 2375 folosind procedeul de amplificare PCR descris mai sus, cu diferența că proba de hibridizare a fost o oligonucleotidă kinazată derivată din secvența cADN din clona 81. Rezultatele au arătat că secvențele amplificate se hibridizează cu proba cADN HCV.

2380 Particulele au fost capturate din plasma de cimpanzeu infectat HCV utilizând biluțe mici de polistiren acoperite cu un anticorp imunopurificat îndepărtat înăpotriva polipeptidei codificate în clona 5-1-1. Procedul pentru producerea preparatului de anticorp imunopurificat este descris în publicația E.P.O. nr. 318216, aparținând autorilor acestei invenții. Pe scurt, polipeptida HCV codificată

2385 în clona 5-1-1 a fost exprimată ca o polipeptidă fuzionată cu superoxid dismutază (SOD). Aceasta s-a realizat prin subclonarea insertului cADN al clonei 5-1-1 în vectorul de expresie pSODcf1 (Steimer și alții (1986). ADN izolat din pSODcf1 a fost tratat cu BamHI și EcoRI, și următorul liant s-a legat în ADN luntar creat de enzimele de restricție:

2390 5' GAT CCT GGA ATT CTG ATA AGA
CCT TAA GAC TAT TTT AA 3'

După clonare, a fost izolată plasmida care conține insertul. Plasmida care conține insertul a fost supusă restricției cu EcoRI. Insertul cADN HCV din clona 5-1-1 a fost extirpat cu EcoRI și legat în această plasmidă ADN linearizată EcoRI.

2395 Amestecul de ADN s-a întrebuințat pentru a transforma tulpina E. Coli D1210 (Sedler și alții (1980)). Recombinatele cu cADN 5-1-1 cu orientarea corectă pentru expresia ORF s-au identificat prin întocmirea hărții de restricție și secvențarea nucleotidului. Bacteriile recombinante din una din probe au fost induse pentru a exprima polipeptida SOD-NANB₅₋₁₋₁ prin creșterea bacteriilor în prezența IPTG. Polipeptida fuzionată a fost purificată din E.coli recombinant prin extracția diferențială a extractelor de celule cu uree, urmată de cromatografia pe coloane cu schimbători de anioni și de cationi. Polipeptida purificată SOD-NANB₅₋₁₋₁ s-a atașat la o membrană de nitroceluloză. Anticorpul din mostrele de ser infectat HCV a fost absorbit de polipeptida legată de matrice. După spălarea pentru îndepărtarea materialelor nespecifice și a materialelor nelegate, anticorpul legat

2400 a fost scos din polipeptida de legătură.

2405

Exemplul 23 *Metoda cPCR pentru detectarea ARN HCV în ficat și în ser de la indivizi cu NANBH*

2410 Siguranța și utilizarea formei modificate a încercării PCR, adică, a încercării cPCR, pentru detectarea infecției cu HCV s-au determinat prin efectuarea încercării pe ARN total de ficat și pe serul de la indivizi infectați. În încercarea cPCR, ARN viral posibil din mostră este transcris invers în cADN cu reverstrascriptază. Un segment din cADN obținut este apoi amplificat utilizând o versiune modificată a tehnicii PCR descrise de Saiki și alții (1986). Primerii pentru tehnica cPCR

2415 sunt derivați din ARN HCV care poate fi identificat prin familia de ADN-uri HCV prezentată aici. Produsul amplificat corespunzător la ARN HCV este detectat utilizând o probă din familia de cADN-uri HCV prezentată aici.

Încercarea cPCR/HCV folosită în aceste studii s-a realizat utilizând următoarele metode pentru prepararea ARN, transcrierea inversă a ARN în cADN, amplificarea segmentelor specifice ale cADN prin PCR și analiza produșilor PCR.

2420

ARN s-a extras din ficat utilizând metoda cu izotiocianat de guanidiniu pentru prepararea ARN total descrisă de Maniatis și alții (1982).

În scopul de a izola ARN total din plasmă, plasma a fost diluată de cinci

2425 până la de zece ori cu TENB (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 0,1 M, EDTA 1 mM) și s-a incubat într-o soluție de proteinază K/SDS (0,5% SDS, 1mg/ml

proteinază K, 20 micrograme/ml suport Poly A] timp de 60 la 90 min., la 37°C. Mostrele au fost extrase odată cu fenol (pH 6,5), faza organică obținută a fost reextrasă odată cu TENB care conține 0,1% SDS și fazele apoase ale ambelor extracții au fost colectate și extrase de două ori cu un volum egal de fenol/cloroform/alcool izoamilic/1:1(99:1)/. Fazele apoase obținute au fost extrase cu un volum egal de cloroform/alcool izoamilic (99:1) de două ori și precipitate cu etanol utilizând acetat de sodiu 0,2M, pH 6,5, și 2,5 volume etanol 100%; precipitarea a avut loc peste noapte la -20°C.

cADN utilizat ca model pentru reacția PCR s-a preparat folosind mostrele prevăzute pentru prepararea cADN-urilor corespunzătoare. Fiecare mostră ARN (conținând fie 2 μg de ARN total de ficat de cimpanzeu denaturat încălzit, fie ARN din 2 μl de plasmă, fie 10% din ARN extras din biopsiile cilindrice din ficat uman de 10 mm x 4 mm) s-a incubat într-o reacție de 25 μl conținând 1 micromol din fiecare primer, 1 milimol din fiecare deoxiribonucleotid-trifosfat (dNTP), 50 mmoli Tris-HCl, pH 8,3, 5 milimoli MgCl₂, 5 milimoli ditiotritol (DTT), 73 milimoli KCl, 40 unități inhibitor ARN-ază (RNASIN) și 5 unități reverstranscriptază AMV. Incubarea s-a făcut 60 minute la 37°C. După sinteza cADN, amestecurile de reacție s-au diluat cu 50 microlitri apă deionizată (DIW), s-au fiert 10 minute și s-au răcit pe gheață.

Amplificarea segmentului cADN HCV s-a efectuat folosind doi oligonucleotizi sintetici primeri 16-meri ale căror secvențe au fost derivate din clonele 36 (anti-sens) și 37b (sens) ale cADN HCV. Secvența primerului din clona 36 a fost:

5' GCA TGT CAT GAT GTA T 3'

Secvența primerului din clona 37b a fost:

5' ACA ATA CGT GTG TCA C 3'

Primerii s-au folosit la o concentrație finală 1 micromolară fiecare. În scopul de a amplifica segmentul de cADN HCV care este flancat de primeri, mostrele de cADN s-au incubat cu 0,1 micrograme ARN-ază A și cu reactanții PCR ai trusei Perkin-Elmer-Cetus (N801-0043 sau N801-0055) conform instrucțiunilor fabricantului. Reacția PCR s-a efectuat fie pe 30 cicluri, fie pe 60 cicluri într-un aparat cu ciclu termic Perkin Elmer Cetus. Fiecare ciclu a constatat din etapa de denaturare 1 minut la 94°C, o etapă de fixare de 2 minute la 37°C și o etapă de extindere de 3 minute la 72°C. Însă etapa de extindere din ciclul final (30 sau 60) a fost de 7 minute în loc de 3 minute. După amplificare mostrele au fost supuse extracției cu un volum egal de fenol:cloroform (1:1), apoi extracției cu un volum egal de cloroform și pe urmă mostrele s-au precipitat cu etanol conținând acetat de sodiu 0,2 M.

Prođușii cPCR s-au analizat după cum urmează. Prođușii s-au supus electroforezei pe geluri de agaroză alcaline 1,8% conform cu Murakawa și alții (1988) și s-au transferat pe o hârtie Zeta Probe BioRad Corp. cu geluri sugative peste noapte în NaOH 0,4 M. Materialele absorbite au fost neutralizate în 2x SSC (1 x SSC conține NaCl 0,15 M, citrat de sodiu 0,015 M), prehibridizare în NaCl 0,3 M, tampon fosfat de sodiu 15 mM, pH 6,8, EDTA 15 mM, 1,0% SDS, 0,5% lapte degresat (Carnation Co.) și 0,5 mg/ml ADN de spermă de somon denaturat sonicat. Petele absorbite în care se analizează fragmente cADN HCV s-au hibridizat pe o probă marcată cu P³² obținută prin translația cu crestare a insertului cADN HCV în clona 35, descrisă de publicația E.P.O. nr. 318216.

După hibridizare, petele s-au spălat în 1 × SSC (1 × SSC conține NaCl 0,15 M, citrat de sodiu 0,01 M) la 65°C s-au uscat și s-au autoradiografiat. Mărimea presupusă a produsului a fost de 586 nucleotide în lungime; produșii care au hibridizat cu proba și au migrat în geluri în acest interval de mărime au fost numărați ca pozitivi pentru ARN viral.

Ca martor, s-au realizat primeri cPCR pentru a amplifica alfa-1 mARN anti-tripsină pentru a verifica prezența ARN în fiecare mostră analizată. Regiunea de codificare a genei alfa-1 anti-tripsină este descrisă de Rosenberg și alții (1984). Primerii sintetici oligomeri 16-meri destinați să amplifice un fragment de 365 nucleotide din regiunea de codificare a genei alfa-1 anti-tripsină s-au derivat din nucleotidele 22-37 (sens) și nucleotidele 372-387 (antisens). Produșii PCR s-au detectat folosind o probă de translație cu crestare P^{32} care se situează între, și nu include, secvențele primer cADN/PCR.

Din cauza sensibilității extreme a reacției PCR, toate mostrele au fost probate minimum de trei ori. Toate semnalele fals pozitive au fost eliminate când s-au luat următoarele măsuri de precauție: 1) eliminarea aerosolilor prin folosirea tuburilor cu capac înșurubat cu garnituri inelare O de cauciuc; 2) pipetarea cu pipete de dislocuire pozitivă Ranin Microman prevăzute cu pistoane/capilare și 3) alegerea secvențelor de oligonucleotide pentru cADN și primerii PCR din două clone cADN neînvecinate.

Exemplul 24 *Detectarea ARN HCV în mostrele de ficat prin metoda cPCR*

Încercarea cPCR s-a efectuat pe ARN total izolat din ficiții de la trei cimpanzei infectați experimental cu agent NANBH și din biopsiile de ficat de la pacienții italieni diagnosticați ca având NANBH cronică.

În fig. 24A se arată rezultatele încercării cPCR utilizând 1 μg din fiecare preparat de ARN de ficat total. ARN s-a izolat din mostrele de ficat de cimpanzei în faza cronică a NANBH (910) (linia 1), mostrele de la doi cimpanzei în faza acută de infectare (1028 și 508) (liniile 2 și respectiv 3). PCR s-a efectuat pe mostrele din liniile 1-3 pe 30 cicluri și autoradiografia petei care conține cele trei linii s-a expus 5 ore. cADN dintr-un microgram de ARN total din animalul infectat acut 1028 (linia 4) și din trei cimpanzei neinfecțati (liniile 5-7), s-au amplificat pe 60 cicluri și autoradiogramele conținând aceste linii s-au expus 7 zile. ADN pBR322 marcat cu P^{32} și digerat cu MspI a servit ca marker la toate autoradiogramele. Se poate vedea că rezultatele arată că cADN corespunzător la ARN HCV apare numai în probele de la cimpanzeii cu NANBH, atât la faza acută cât și la cea cronică (liniile 1, 3 și 4). Produșii cPCR din aceste linii au migrat între fragmentele de markeri de 527 și 622 nucleotide (nereprezentati).

În fig. 24B se arată rezultatele încercării cPCR utilizând 10% din ARN extras din cilindri de biopsie de ficat, de lemn 10 mm x 4 mm de la 15 pacienți cu NANBH cronică (liniile 1-15), un pacient cu boală de ficat criptogenică (linia 16) și o probă martor și o probă martor de la un pacient cu hepatită B cronică (linia 17). Amplificarea prin PCR s-a făcut pe 30 cicluri și autoradiogramele pentru petele respective s-au expus 4 zile, în afară de linia 1 care s-a expus 15 ore. După cum se vede din rezultate, 9/15 (60%) din mostrele umane au fost pozitive pentru ARN HCV (liniile 1, 2, 4, 6, 7, 10-13). La încercarea cPCR un pacient

diagnosticat cu boală de ficat criptogenică (linia 16) și un pacient cu o infecție cronică HCV (linia 17) au fost repetat negativi.

Exemplul 25 *Comparație între încercarea HCV/cPCR pe biopsiile de ficat uman și RIA de ser utilizând polipeptidă HCV C100-3*

2525

Polipeptida SOD/HCV C100-3 (denumită și C100) este o polipeptidă de fuziune recombinantă care conține 363 aminoacizi virali. Polipeptida este utilă pentru detectarea anticorpilor la HCV (vezi Kuo și alții (1989) Science 244:362. Metoda pentru prepararea C100 este descrisă în publicația E.P.O. nr. 318216.

Încercarea radioimună utilizând C100 s-a efectuat pe seruri colectate de la aceiași 17 pacienți umani ale căror probe de ficat au fost supuse încercării HCV/cPCR așa cum s-a descris mai sus. Serurile au fost colectate în aceeași zi cu biopsiile de ficat. Încercarea s-a efectuat în esență așa cum se descrie în publicația E.P.O. nr. 318216, care aparține autorilor invenției. Pe scurt, plăci de microtitrare Microtiter (Immulon 2, Removeawell benzi) au fost acoperite cu 0,1 μg de C100 purificat. Plăcile acoperite s-au incubat timp de o oră la 37°C cu mostrele de ser (100 microlitri de diluție 1:100) sau cu martorii corespunzători. După incubare, materialul nelegat s-a îndepărtat, plăcile s-au spălat și complexii anticorp uman-C100 s-au detectat prin incubarea cu imunoglobulină antiumană de oaie, marcată cu I¹²⁵. Anticorpul marcat nelegat s-a îndepărtat prin aspirație și plăcile s-au spălat. S-a determinat radioactivitatea în cavități individuale.

Rezultatele RIA arată că 67% din aceste mostre au fost pozitive pentru anticorpul anti-C100. Serul de la pacientul diagnosticat cu boala de ficat criptogenică a fost pozitiv pentru anticorpul anti-C100 deși nivelele de ARN viral au fost nedetectabile în ficatul pacientului din această mostră. Gradul de corelație între prezența anticorpilor anti-C100 și ARN HCV a fost de 70%; doi pacienți care au fost negativi la anticorpi prin RIA au avut cantități însemnate de ARN HCV în ficiții lor (date nereprezentate).

Rezultatele au arătat că virusul este prezent frecvent în ficatul pacienților cu anticorpul anti-C100 care circulă și confirmă revendicările că prezența anticorpilor anti-C100 reflectă cu precizie expunerea la HCV. Mai mult, luate împreună, aceste rezultate arată că HCV de acest tip provoacă NANBH în cel puțin 75% din pacienții luați în studiu și că tulpina predominantă de HCV din Italia reiese că este strâns corelată cu tulpina de HCV prevalentă în Statele Unite.

Exemplul 26 *Încercarea HCV/cPCR a serului: Detectarea ARN viral în infecția în fază acută la cimpanzei*

2535

Corelația în timp dintre evoluția distrugerii ficatului prezența ARN HCV și prezența anticorpilor anti-HCV a fost urmărită în serul de la doi cimpanzei infectați experimental cu NANBH (nr.771 și 910). Distrugerea ficatului s-a determinat prin nivelele de alaninaminotransferază (ALT); prezența ARN HCV s-a determinat prin încercarea HCV cPCR descrisă mai sus; anticorpul anti-HCV au fost detectați folosind RIA C100.

Analiza HCV/cPCR s-a făcut pe ARN extras din 1 μl plamă de cimpanzeu. Serul s-a luat de la cimpanzeul 771 în zilele 25, 32, 70 și 88 după infectare; cPCR s-a efectuat pe 30 cicluri și autoradiograma a fost expusă 18 zile. S-a luat ser de la cimpanzeul 910 în zilele 11, 28 și 67 după infectare; cPCR s-a efectuat pe 60 cicluri și autoradiograma a fost expusă 5 zile.

Rezultatele încercărilor sunt arătate în fig. 25 pentru cimpanzeul 771 și fig. 26A pentru cimpanzeul 910. Din compararea figurilor 25 și 26A reiese că un maxim timpuriu, bine definit al valorilor ALT în timpul hepatitei acute se corelează cu prezența ARN viral în indivizii infecției.

Datele arată de asemenea că prezența ARN HCV, care este un indiciu al unui stadiu de viremie, precede prezența anticorpilor anti-HCV. Cimpanzeul 771 (-fig. 25) manifestă o etapă acută clar definită a post-transfuziei NANBH la 28 zile caracterizată printr-un maxim inițial al valorilor ALT. ARN HCV s-a detectat în serul colectat în ziua a 25-a și în ziua a 32-a. Însă, în timpul acestei faze acute anticorpii anti-HCV au fost absenți. Prin contrast, în ziua a 70-a ARN HCV a fost sub nivelul experimental de detectare și au crescut anticorpii anti-HCV. În ziua a 88-a, ARN HCV a rămas nedetectabil, în timp ce anticorpii anti-HCV au crescut mult față de nivelul lor din ziua a 70-a.

Rezultatele obținute din serul cimpanzeului 910 au fost întrucâtva similare ca tip, deși timpul anticorpilor HCV induși de infecție nu au fost detectați în perioada fazei acute a bolii, care s-a extins la cel puțin ziua a 67-a; anticorpii anti-HCV detectați prin RIA în ziua a 11-a s-au datorat imunizării pasive a animalului 910 cu anticorpi din plasma în serul cimpanzeului 910 în cursul fazei ulterioare, cronice a infecției (date nereprezentate).

Trebuie să se rețină faptul că valorile scăzute ALT în plasma din indivizii cu NANBH cronică nu se corelează neapărat cu producerea slabă de virus. S-a analizat plasma colectată din 17 mostre diferite de plasmă luată de la cimpanzeul 910 pe o perioadă de 2 până la 3,5 ani după inoculare pentru măsurarea nivelelor ALT și a ARN HCV. Valorile ALT ale mostrelor nu au depășit 45 mU/ml; cu toate acestea studiile de titrare au indicat titruri mari de HCV (3×10^5 CID/ml). cPCR s-a efectuat pe 30 cicluri și autoradiograma s-a expus 15 ore; analiza cPCR a arătat clar prezența ARN cPCR a arătat clar prezența ARN viral (date nereprezentate).

Exemplul 27 *Încercarea HCV/cPCR a serului: Detectarea ARN viral în faza acută a infecției la oameni*

Plasma de la un pacient uman de la chirurgie colectată în timpul fazei acute a NANBH s-a examinat pentru ARN HCV și pentru anticorpii anti-HCV, utilizând încercarea HCV/cPCR și respectiv RIA C100. Încercarea HCV/cPCR s-a făcut utilizând 1 μ l de plasmă de la un pacient și de la patru oameni martor cu genealogie cunoscută; cPCR s-a efectuat pe 30 cicluri și, după hibridizare și spălare, autoradiograma s-a expus 8 ore.

Rezultatele au arătat că serul colectat de la pacientul de la chirurgie în timpul fazei acute a infecției a conținut doze mari de ARN viral și că anticorpii anti-HCV nu au fost detectabili prin RIA C100 (date nereprezentate). (Se știa că plasma în fază acută a pacientului de la chirurgie are un titru mare de agent infecțios NANBH, $10^{6.5}$ CID/ml, determinat de Feinstone și alții [1981] J. Inf. Dis. 144:588; Feinstone și alții [1983] Infection and Immunology 41:816). Trebuie remarcat, însă, că acest pacient a făcut sero-apărare la anticorpii anti-HCV prin RIA-C100 aproximativ 9 luni după infecție. Serul de la omul cu genealogie cunoscută a avut plasmăle martor negative la încercarea HCV/cPCR și RIA-C100.

Exemplul 28 *Sensibilitatea încercării HCV/cPCR*

Sensibilitatea încercării HCV/cPCR a fost determinată prin analizarea unor diluții în serie de 10 ori a plasmei colectate cu titru cunoscut. Plasma de cimpanzeu a avut un titru de circa 3×10^5 CID/ml și ARN s-a extras din diluțiile de zece ori ale unui microlitru de plasmă. cPCR s-a efectuat pe 30 cicluri, iar după hibridizare și spălare, autoradiograma s-a expus 15 ore. Producții cPCR obținute prin amplificarea a circa 300, circa 30 și circa 3 CID de genomuri HCV sunt arătați în liniile 1 - 3 respectiv ale figurii 29. Mostrele din liniile 1 și 2 au fost detectabile pe autoradiogramele expuse 2 ore. Întrucât titrul mediu al HCV în indivizii infectați se consideră a fi între aproximativ 100 și 10000 CID/ml de plasmă, aceste date sugerează că încercarea HCV/cPCR poate fi utilă clinic.

Exemplul 29 *Încercarea HCV/cPCR pentru tulpinile variantă HCV*

Primerii, constituiți dintr-un set de oligomeri 44-meri și un set de oligomer 45-meri, au fost concepuți pentru a amplifica tulpinile de HCV care sunt similare sau identice cu izolatul HCV din care este derivată secvența cADN din fig. 18. Premiza care stă la baza conceperii acestor primeri este descoperirea autorilor că HCV este un virus de tip Flavi. Membrii familiei Flaviviridae, când se compară cu HCV, au două seturi principale conservate de secvențe de aminoacizi, TATPPG și QRRGR, în regiunea posibilă NS3 a acestor virusuri. Se pot vedea și alte câteva seturi mai mici, de exemplu, GDD în regiunea probabilă NS5. Alte seturi se pot determina prin comparare cu secvențele de aminoacizi cunoscute cu cele ale HCV. Această informație a fost dedusă din secvențele câtorva membri ai familiei Flaviviride care au fost descriși anterior, printre care virusul encefalitei japoneze (Sumiyoshi și alții (1987)), virusul febrei galbene (Rice și alții (1985)), virusul Dengue tip 2 (Hahn și alții (1988)) și virusul Nilului de vest (Castle și alții (1986)). Secvențele conservate de aminoacizi și codonul utilizate sunt în tabelul ce urmează.

*Secvențele de aminoacizi conservate (A.A.)
între Flavivirusuri și HCV*

Virusul	# din primul A.A.	Aminoacid					
		T	A	T	P	P	G
HCV	1348	5'	ACC	GCC	ACC	CCT	CCG GCC
FEBRA GALBENĂ	1805		ACA	GCC	ACA	CCG	CCT GGG
al Nilului de V	1818		ACG	GCA	ACG	CCA	CCC GGG
Denhue 4	1788		ACC	GCA	ACC	CCT	CCC GGA
JEV	1957		ACA	GCG	ACC	CCG	CCT GGA

Primerul de sens HCV (44mer)= 5' ACC GCC ACC CCX CC 3'
(X = A, T, C sau G)

Virusul	# din primul A.A.	Aminoacid				
		T	R	R	G	R
HCV	1486	5'	CAA	CGT	CGG	GGC AGG 3'
FEBRA GALBENĂ	1946		CAA	AGG	AGG	GGG CGC
al Nilului de V	1959		CAG	CGG	AGA	GGA CGC
Dengue-4	1929		CAG	AGA	AGA	GGG CGA
JEV	1820		CAA	CGG	AGG	GGC AGA

Primerul antisens HCV (45 mer) = 3' GTX GCA GCC CCG TCC 5'
(X = T sau C)

Notă: secvența de primer a fost aleasă astfel încât să reducă la minimum numărul de degenerări ale nucleotidelor la capătul 3' al secvenței de primer și să aducă la maximum numărul de nucleotide la capătul 3' al fiecărui primer care se potrivesc exact cu oricare din secvențele de nucleotidă posibile, sau cu complementul acestora, codificând aminoacizii conservați indicați mai sus.

Primerii oligomer 44-mer și 45-mer au fost concepuți astfel încât secvențele care codifică acești aminoacizi s-au încorporat în primer. Mai mult, ei conțin degenerări la capătul 3' al fiecărui primer și sunt derivați din două regiuni diferite ale genomului HCV care sunt prezente în clona 4Ob (vezi fig. 28) și care sunt derivate din regiunea ce codifică NS3 și HCV probabil. Formulele pentru primerii oligonucleotidă din seturi sunt:

5' GAC TGC GGG GGC GAG ACT GGT TGT GCT CGC
ACC GCC ACC CCX CC 3'

În care X este A, T, G sau C; și

5' TCT GTA GAT GCC TGG CTT CCC CCT GCC AGT
CCT GCC GGG ACT YTG 3'

În care Y este T sau C.

Încercarea HCV/cPCR s-a efectuat utilizând acești primeri pentru a amplifica ARN HCV în plasma cimpanzeului 910. Metoda de încercare a fost în esență cea descrisă în secțiunea de mai sus exceptând faptul că în locul primerilor clonei 36 și clonei 37b s-au folosit seturile de primeri oligomeri 44-mer și 45-mer. În plus, detectarea cADN HCV amplificat s-a făcut prin hibridizare cu o probă derivată de la clona 40a, a cărei secvență este arătată în fig. 30.

Proba s-a preparat prin amplificarea unui segment al clonei 40a utilizând metoda PCR descrisă mai sus și primerii 18-mer care conțin următoarele secvențe:

5' GAG ACA TCT CAT CTT CTG 3' și
5' GAG CGT GAT TGT CTC AAT 3'

După amplificare, preparatul de probă a fost marcat cu P^{32} prin translație cu creștere.

În fig. 31 se arată o autoradiografie a Southern blots probate cu secvențe din clona 40a. $MspI$ marcat cu P^{32} a digerat fragmentele ADN pBR322 care au servit ca markeri (linia 1). Dimensiunea prevăzută a produsului PCR rezultat din amplificare utilizând acești primeri este de 490 nucleotide (nt). În liniile 2 și 3 se arată reacțiile duplicate.

Exemplul 30 Analiza variantelor regiunii 5' a HCV

Bazat pe modelul Flavivirus, regiunea 5' a cADN HCV care este flancată de regiunile reprezentate în clonele ag30a și k9-1 codifică un segment de înveliș posibil și/sau proteina(e) matrice (E/M). Serul obținut de la cimpanzeul de la care s-a construit banca "c" a cADN HCV s-a analizat prin HCV/cPCR pentru a determina dacă variantele din această regiune țintă sunt prezente.

Încercarea HCV/cPCR s-a efectuat în principal așa cum s-a descris mai sus, pentru izolarea clonei 5'-32, cu excepția primerilor și a probelor utilizate. În fig. 33 se arată corelația dintre primerii și probele (și clonele de la care au fost derivate) respective și regiunea țintă a cADN HCV. Un set de primeri PCR, ag30a16A și K91Env16B, s-au derivat din clonele ag30a și k9-1, care sunt în partea superioară și respectiv inferioară a secvenței țintă. Mărimea presupusă a produsului cPCR inițial de ag30a16A și K91Env16B este de 1,145 kb raportat la secvența confirmată a cADN HCV. Două alte seturi de primeri PCR care acoperă regiunea amplificată utilizând ag30a16A și K91Env16B și care se suprapun una peste alta au fost utilizate de asemenea pentru amplificarea PCR a ARN HCV în ser. Astfel, în acest caz reacțiile PCR au decurs folosind ca un prim set de primeri ag30a16A și CA156e16B și ca un al doilea set de primeri CA156e16A și k91Env16B. Mărimile produsului PCR așteptate pentru aceste perechi au fost de 615 nucleotide (NT) și respectiv 683 NT. Tabelul ce urmează prezintă primerii, clona din care au fost derivații și secvența primerului.

Tabel

Primer	Clona	Secvența
ag30a16A	ag30a	5' CTC TAT GGC AAT GAG G 3'
K91Env16B	k9-1	5' CGT TGG CAT AAC TGA T 3'
CA156e16B	156	5' CGA CAA GAA AGA CAG A 3'
CA156e16A	156	5' AGC TTC GAC GTC ACA T 3'
CA216a16A	216	5' TGA ACT ATG CAA CAG G 3'
CA216a16B	216	5' GGA GTG TGC AGG ATG G 3'
CA84a16A	84	5' AAG GTT GCA ATT GCT C 3'
CA84a16B	84	5' ACT AAC AGG ACC TTC G 3'

2735 Probele pentru toți produșii HCV/cPCR au constat în secțiuni marcate cu P^{32} ale cADN HCV care fuseseră preparate prin amplificare PCR a regiunii din clona 216 (utilizând ca primeri CA216a16A și 216a16B) și din clona 84 (utilizând ca primeri CA84a16A și CA84a16B); P^{32} s-a introdus în produșii PCR prin translație cu creștere. Aceste probe nu s-au suprapus peste primerii folosiți în
2740 reacțiile HCV/cPCR.

-fig. 34 arată o autoradiografie a petei Southern blot în care produșii HCV/cPCR s-au hibridizat cu probe marcate cu P^{32} . Produsul HCV/cPCR se extinde de la primării ag30a16A și K91Env16B (linia 1) fiind de aproximativ 1,1 Kb; în timp de 15 ore de expunere nu s-au mai observat alți produși. Produșii
2745 HCV care se extind din seturile de primări ag30a15A/CA156e16B (linia 2) și CA156e16A/K91Env16B (linia 3) au fost de aproximativ 625 NT și respectiv de aproximativ 700 NT. Mărimea produșilor PCR s-a determinat prin comparare cu migrațiile fragmentelor rezultate din digestia pBR322 cu MspI și a PhiX 174 digerat cu HaeIII (linia 5).

2750 Prin studiul de mai sus se vor detecta inserții sau deleții mici de aproximativ 20 NT până la 50 NT și rearanjamente ADN care schimbă mărimea ADN țintă. Rezultatele din fig. 34 confirmă că există numai o specie principală de cADN derivată din regiunea E/M a HCV din serul de cimpanzeu.

Exemplul 31 *Amplificarea pentru clonarea secvențelor cADN HCV utilizând PCR și primerii derivați din regiunile conservate ale secvențelor genomice Flavivirus*

2755 Descoperirea că HCV este un virus de tip Flavi a autorilor acestei invenții permite o strategie pentru clonarea secvențelor cADN HCV necaracterizate utilizând tehnica PCR și primerii derivați din regiunile care codifică secvențele de aminoacizi conservate în flavivirusuri. În general, unul dintre primeri este derivat dintr-o
2760 secvență genomică HCV definită și celălalt primer care flanchează o regiune de polinucleotidă HCV nesevențată este derivat dintr-o regiune consecventă a genomului flavivirus. Se știe că genomurile flavivirus conțin secvențe conservate în NS1 și polipeptidele E, care sunt codificate în regiunea 5' a genomului flavivirus.
2765 Astfel, pentru a izola secvențele cADN derivat din regiunile probabile ale genomului HCV, sunt concepuți primeri în partea superioară care sunt derivați din secvențele conservate din aceste polipeptide flavivirus. Primerii din partea inferioară sunt derivați dintr-un capăt de sus al porțiunii cunoscute a cADN HCV.

2770 Din cauza degenerării codului, este probabil că vor apare nepotriviri între probele flavivirus și secvența genomică HCV corespunzătoare. De aceea se folosește o strategie asemănătoare cu cea descrisă de Lee (1988). Procedul lui Lee constă în utilizarea primerilor oligonucleotidă amestecați complementari la produșii translației inverse ai secvenței de aminoacizi; secvențele din primerii în amestec țin cont de fiecare degenerare de codon pentru secvența de aminoacizi
2775 conservată.

2780 Se produc trei seturi de amestecuri de primeri bazate pe omologiile aminoacizilor găsiți în câteva flavivirusuri, printre care Dengue-2,4 (D-2,4), virusul encefalitei japoneze (JEV), febrei galbene (YF) și virusul Nilului de vest (WNV). Amestecul de primeri derivat din majoritatea secvenței conservate superioare (5'-1) se bazează pe secvența de aminoacizi gly-trp-gly, care este o parte a secvenței conservate asp-arg-gly-trp-gly-aspN găsită în proteina E a D-2, JEV, YF și WNV.

Următorul amestec de primeri (5'-2) se bazează pe o regiune conservată în partea inferioară în proteina E, phe-asp-gly-asp-ser-tyr-ileu-phe-gly-asp-ser-tyr-ileu și este derivată din phe-gly-asp; secvența conservată este prezentă în D-2, JEV, Yf și WN. Al treilea amestec de primeri (5'-3) se bazează pe secvența de aminoacizi arg-ser-cys, care este o parte a secvenței conservate cys-cys-arg-ser-cys din proteina NA1 a D-2, D-4 JEV, YF și WN. Primerii individuali care formează amestecul în 5'-3 sunt arătați în fig. 47. Pe lângă secvențele variate derivate de la regiunea conservată, fiecare primer din fiecare amestec mai conține o regiune constantă la capătul 5' care conține o secvență ce codifică locuri pentru enzimele de restricție, HindIII, Mbol și EcoRI.

Primerul din partea inferioară, ssc5h20A, este derivat dintr-o secvență de nucleotide din clona 5h, care conține cADN HCV cu secvențe ce se suprapun celor din clonele 14i și 11b. Secvența ssc5h20A este:

5' GTA ATA TGG TGA CAG AGT CA 3'

Se poate întrebuița și un alt primer, ssc5h34A. Acest primer este derivat dintr-o secvență din clona 5h și în plus conține nucleotide la capătul 5' care crează un loc enzimei de restricție, astfel ușurând clonarea. Secvența ssc5h34A este:

5' GAT CTC TAG AGA AAT CAA TAT GGT GAC AGA CTC A 3'

Reacția PCR, care a fost descrisă inițial de Saiki și alții (1986), se efectuează în principal așa cum au descris Lee și alții (1988) dar modelul pentru cADN este ARN izolat din ficatul de cimpanzeu infectat cu HCV, sau din particulele virale izolate din serul de cimpanzeu infectat cu HCV. În plus, condițiile de întărire sunt mai puțin stringente în prima rundă a amplificării (NaCl 0,6 M și 25°C), pentru că partea din primer care se va fixa de secvența HCV este de numai 9 nucleotide și s-ar produce nepotriviri. Mai mult, dacă se utilizează ssc5h34A, secvențele adiționale nederivate din genomul HCV tind să destabilizeze hibridul primer-model. După prima rundă de amplificare, condițiile de fixare (întărire) pot fi mai stringente [NaCl 0,066 M și 32°C-37°C], pentru că secvențele amplificate acum conțin regiuni care sunt complementare la, sau duplicate din primeri. În plus, primele 10 cicluri de amplificare se efectuează cu enzima I Klenow în condiții PCR corespunzătoare pentru această enzimă. După terminarea acestor cicluri, mostrele sunt extrase și tratate cu polimerază Taq conform instrucțiunilor trusei date de Cetus-Perkin-Elmer.

După amplificare, secvențele cADN HCV amplificate sunt detectate prin hibridizare folosind o probă derivată din clona 5h. Această probă este derivată din secvențele din partea superioară celor folosite pentru a deriva primerul și nu se suprapun cu secvențele primerilor derivați din clona 5h. Secvența probei este:

5' CCC AGC GGC GTA CGC GCT GGA CAC GGA GGT GGC CGC GTC
GTG TGG CGG TGT TGT TCT CGT CGC GTT GAT GGC GC 3'.

Metodele descrise în prezenta invenție, precum și oligomerii, probele și primerii, derivate din cADN HCV și trusele care le conțin, sunt folosite pentru determinarea precisă, relativ simplă și economică a prezenței HCV în mostrele biologice, mai precis în sângele care poate fi utilizat la transfuzii și la indivizii suspectați că au o infecție cu HCV. De asemenea aceste metode și oligomerii se pot utiliza pentru detectarea unei faze incipiente a infecției cu HCV mai bine decât încercările imunologice bazate pe polipeptide HCV recombinante. Tot astfel,

o încercare de hibridizare a unei polinucleotide amplificate detectează ARN HCV în mostrele ocazionale care sunt negative la anticorpii anti-HCV. Probele și primerii descriși în prezenta invenție se pot utiliza în încercările de hibridizare amplificată, în corelație cu o încercare imunologică bazată pe o polipeptidă HCV pentru a se identifica mai complet infecțiile datorate HCV și speciemenle biologice infectate cu HCV, inclusiv sângele.

Informațiile din prezenta invenție permit conceperea de primeri și/sau probe care sunt derivate din regiunile conservate ale genomului HCV. Realizarea acestor primeri și probe permit să se folosească o metodă generală prin care se vor detecta tulpinile variantă HCV și care va fi utilă în alegerea sângelui și a produselor din sânge.

Dacă primerii utilizați în această metodă sunt derivați din regiunile conservate ale genomului HCV, metoda trebuie să ajute la detectarea și/sau identificarea tulpinilor variantă ale HCV. Aceasta, la rândul său, va conduce la elaborarea de reactivi imunologici suplimentari pentru detectarea și diagnosticarea HCV, precum și la elaborarea de reactivi polinucleotide suplimentari pentru detectarea și/sau tratamentul HCV.

În plus, seturile de primeri și de probe concepute din secvențele conservate de aminoacizi ale Flavivirusurilor și HCV permit conceperea unei metode universale de detectare a acestor agenți infecțioși.

Materialele enumerate mai jos sunt depuse în baza Tratatului de la Budapesta în the American Type Culture Collection (ATCC), 12301 Parklawn Dr., Rockville, Maryland 20852 și au primit următoarele numere de acces ale colecției menționate.

Lambda-gt11	Nr. ATCC	Data depozitului
banca cADN HCV	40394	1 decembrie 1987
clona 81	40388	17 noiembrie 1987
clona 91	40389	17 noiembrie 1987
clona 1-2	40390	17 noiembrie 1987
clona 5-1-1	40391	18 noiembrie 1987
clona 12f	40514	10 noiembrie 1988
clona 55f	40511	10 noiembrie 1988
clona 15e	40513	10 noiembrie 1988
clona K9-1	40512	10 noiembrie 1988
JSC 308	20897	5 mai 1988
pS356	67683	29 aprilie 1988

RO 113059 B1

Pe lângă aceasta, s-au mai făcut la 11 mai 1989 următoarele depozite:

Tulpina	Lianții	ATCC nr.
D1210 (Cf1/5-1-1)	EF	67967
D1210 (Cf1/81)	EF	67968
D1210 (Cf1/CA74a)	EF	67969
D1210 /Cf1/35f)	AB	67970
D1210 (Cf1/279a)	EF	67971
D1210 (Cf1/C36)	CD	67972
D1210 (Cf1/13i)	AB	67973
D1210 (Cf1/C33b)	EF	67974
D1210 (Cf1/CA290a)	AB	67975
HB101 (AB24/C100 # 3R)		67976

2870

2875

2880

Următorii derivați ai tulpinii D1210 au fost depuși la 3 mai 1989:

Derivat de tulpină	Nr. ATCC
pCF1CS/C8f	67956
pCF1AB/C12f	67952
pCF1EF/14c	67949
pCF1EF/15c	67954
pCF1AB/C25c	67958
pCF1EF/C33c	67953
pCF1EF/C33f	67050
pCF1CD/33g	67951
pCF1CD/39c	67955
pCF1EF/C40b	67957
pCF1EF/CA167b	67959

2895

2890

Următoarele tulpini au fost depuse la 12 mai 1989.

2895

Tulpina	Nr. ATCC
Lambda gt11 (C35)	40603
Lambda gt10 (beta-5a)	40602
D1210 (C40b)	67980
D1210 (M16)	67981

2900

Următorul material biologic a fost depozitat la 23 martie 1990.

Material	Nr. ATCC
5'-clonă 32 (în pUC18S)	68276

2905

Revendicări

2910

1. Polinucleotidă capabilă de hibridizare pe o secvență HCV într-o polinucleotidă de analizat, **caracterizată prin aceea că** ea cuprinde o secvență de cel puțin 8 nucleotide contigue prezente într-o regiune conservată a secvenței nucleotidice a HCV din fig. 18 sau a complementului acesteia.

2915

2. Polinucleotidă conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** polinucleotida cuprinde cel puțin 10 nucleotide contigue într-o regiune conservată a genomului HCV sau a complementului acesteia.

3. Polinucleotidă conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** polinucleotida cuprinde cel puțin 12 nucleotide contigue dintr-o regiune conservată a genomului HCV sau a complementului acestuia.

2920

4. Polinucleotidă conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** polinucleotida cuprinde cel puțin 15 nucleotide contigue dintr-o regiune conservată a genomului HCV sau a complementului acestuia.

5. Polinucleotidă conform oricăreia dintre revendicările 1-4, **caracterizată prin aceea că** regiunea conservată se află în interiorul proteinei 3 non-structurale, înveliș sau miezul codificând regiunile genomului HCV.

2925

6. Polinucleotidă conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** polinucleotida conține (i) o secvență nucleotidică care codifică secvența de polipeptide Thr-Ala-Thr-Pro-Pro-Gly sau Gln-Arg-Arg-Gly-Arg sau (ii) un complement al secvenței nucleotidice (i).

2930

7. Polinucleotidă conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** polinucleotida cuprinde o secvență

5' ACC GCC ACC CCX CC 3'

unde X este orice nucleotidă sau

5' CCT GCC CCG ACG XTG 3'

unde X este T sau C.

2935

8. Polinucleotidă conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** polinucleotida cuprinde (i) o secvență nucleotidică care codifică secvența polipeptidică Gly-Trp-Gly, Phe-Gly-Asp sau Arg-Ser-Cys sau (ii) un complement al secvenței nucleotidice (i).

2940

9. Polinucleotidă conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** face parte dintr-un amestec de primeri de oligonucleotide cuprinzând secvențele individuale arătate în fig. 53.

10. Polinucleotidă conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** polinucleotida cuprinde o secvență selectată din grupul constând din:

5' CTC TAT GGC AAT GAG G 3'
 5' CGT TGG CAT AAC TGA T 3'
 5' CGA CAA GAA AGA GAG A 3'
 5' AGC TTC GAC GTC ACA T 3'
 5' TGA ACT ATG CAA CAG G 3'
 5' GGA GTG TGC AGG ATG G 3'
 5' AAG GTT GCA ATT GCT C 3' și
 5' ACT AAC AGG ACC TTC G 3'

2945

2950

11. Polinucleotidă conform oricăreia dintre revendicările 1 - 10, **caracterizată prin aceea că** se află într-o trusă folosită în detectarea secvențelor nucleotidice HCV, trusă în care polinucleotida este ambalată într-un container adecvat cu instrucțiuni pentru folosirea sa.

2955

12. Metodă pentru detectarea unei secvențe HCV sau a complementului ei într-o probă de analizat, care este suspectată de a conține secvența respectivă, **caracterizată prin aceea că** se aduce proba de analizat în contact cu o polinucleotidă definită ca în revendicările 1 - 11, se incubează proba de analizat împreună cu polinucleotida în condiții în sine cunoscute pentru a se forma duplexuri hibride specifice între polinucleotidă și proba de analizat și se detectează prezența acestor duplexuri hibride specifice.

2960

13. Metodă conform revendicării 12, **caracterizată prin aceea că** polinucleotida este una din setul de primeri corespunzător conducerii reacției în lanț polimerazice (PCR) și flanchează o regiune țintă ce urmează a fi amplificată și în care datorită formațiunii hibride regiunea țintă este amplificată.

2965

14. Metodă conform revendicării 12 sau 13, **caracterizată prin aceea că** proba de analizat este prezentă în sânge sau un produs de sânge și în care sângele sau produsul de sânge care nu formează un hibrid cu polinucleotida este păstrat eliminând astfel infectarea potențială cu HCV dintr-un stoc de sânge sau produse de sânge.

2970

15. Metodă conform oricăreia dintre revendicările 12 - 14, **caracterizată prin aceea că** polinucleotida este fie o probă de captură, fie o probă de marcă.

16. Procedeu de eliminare a HCV din sânge, **caracterizată prin aceea că** se obțin acizii nucleici de analizat dintr-o probă de sânge suspectată de a conține o secvență țintă HCV, se obține o polinucleotidă definită ca în revendicările 1 - 11, se pun în reacție acizii nucleici cu proba în condiții care permit formarea unui duplex polinucleotidic între acidul nucleic și probă, se detectează duplexul format în faza anterioară, dacă acesta există și se păstrează sângele în care nu au fost detectați complecși.

2980

Președintele comisiei de examinare: **farm. Pentelescu Elena**
 Examinator: **biochim. Crețu Adina**

Translation DNA 12f

IlePheLysIleArgMetTyrValGlyGlyValGluHisArgLeuGluAlaAlaCysAsn
 1 CCATATTTAAATCAGGATGTACGTGGAGGGTGGAAACACAGCTGGAAGCTGCCTGCA
 GGTATAAATTTTAGTCCTACATGCACCTCCGCCAGCTGTGTCCGACCTTCGACGGACGT

TrpThrArgGlyGluArgCysAspLeuGluAspArgAspArgSerGluLeuSerProLeu
 61 ACTGGACGGGGCGGAACGTTGCGATCTGGAAGACAGGACAGGTCGAGCTCAGCCCGT
 TGACCTGGGCCCCCGCTTGCAACGCTAGACCTTCTGTCCCTGTCCAGGCTCGAGTCGGGCA

LeuLeuThrThrThrGlnTrpGlnValLeuProCysSerPheThrThrLeuProAlaLeu
 121 TACTGCTGACCACTACACAGTGGCAGGTCTCCCGTGTCTTCCACAACCCCTACAGCCT
 ATGACGACTGGTGATGTGTACCGCTCCAGGAGGGCACAAAGAGTGTGGGATGGTCGGA

SerThrGlyLeuIleHisLeuHisGlnAsnIleValAspValGlnTyrLeuTyrGlyVal
 181 TGTCCACCGGCTCATCCACCTCCACAGAACATGTGGACGTGCAGTACTGTACGGGG
 ACAGTGGCGGGAGTAGGTGGAGGTGGTCTTGTAACACCTGCACGTCAATGAACATGCCCC

GlySerSerIleAlaSerTrpAlaIleLysTrpGluTyrValValLeuLeuPheLeuLeu
 241 TGGGGTCAAGCATCGCGTCTTGGCCATTAAAGTGGGAGTACGTCTCTCTGTTCCTTC
 ACCCCAGTTCGTAGCGCAGGACCCGGTAATTACCCCTCATGCAGCAAGAGGACAAGGAAG

LeuAlaAspAlaArgValCysSerCysLeuTrpMetMetLeuLeuIleSerGlnAlaGlu
 301 TGCTTGCAGACGGCGGTCTCTCTGTGTGGATGATGCTACTCATATCCCAAGCGG
 ACGAACGTCTGCGCGGCAGACGAGGACGGAACACCTACTACGATGAGTATAGGGTTCCGCC

AlaAlaLeuGluAsnLeuValIleLeuAsnAlaAlaSerLeuAlaGlyThrHisGlyLeu
 361 AGCGGGCTTTGGAGAACCTCGTAATACTTAATGCAGCATCCCTGGCCGGACGACCGTC
 TCCGCCGAACCTCTTGGAGCATTAATGAAATTACGTCTGTAGGACCGGGCCCTCGGTGCCAG

Val
 421 TTGTATC
 AACATAG

Fig. 1

Translatija DNA k9-1

GlyCysProGluArgLeuAlaSerCysArgProLeuThrAspPheAspGlnGlyTrpGly
 1 CAGGCTGTCTGAGAGGCTAGCCAGCTGCCGACCCCTTACCGATTTTGACCAGGGCTGGG
 GTCCGACAGGACTCTCCGATCGGTCGACGGCTGGGAATGGCTAAAACTGGTCCCGACCC

ProIleSerTyrAlaAsnGlySerGlyProAspGlnArgProTyrCysTrpHisTyrPro
 61 GCCCTATCAGTTATGCCAACGGAAGCGGCCCGACACGAGCCCTACTGCTGGCACTACC
 CGGGATAGTCAATACGGTTGCCCTCGCCGGGGCTGGTCGGGGGATGACGACCGTGATGG

ProLysProCysGlyIleValProAlaLysSerValCysGlyProValTyrCysPheThr
 121 CCCCAAAACCTTGCGGTATTGTGCCCGCGAAGAGTGTGTGTGTCCTCGGTATATTGCTTCA
 GGGTTTTTGGAAACGCCATAAACACGGCGCTTCTCACACACACAGGCCATATAACGAAGT

ProSerProValValGlyThrThrAspArgSerGlyAlaProThrTyrSerTrpGly
 181 CTCCCAGCCCCGTGGTGGTGGAAACGACAGGTCTGGGCGGCCCCACCTACAGCTGGG
 GAGGTCGGGGCCACCACCCCTTGCTGGCTGTCCAGCCCCGCGGGTGGATGTCGACCC

GluAsnAspThrAspValPheValLeuAsnAsnThrArgProProLeuGlyAsnTrpPhe
 241 GTCAAAATGATACGGACGCTCTTCGTCCTTAACAATACCAGGCCACCGCTGGCAATTGGT
 CACTTTTACTATGCCCTGCAGAGCAGGAATTGTATGGTCCGGTGGCGACCCCGTTAACCA

GlyCysThrTrpMetAsnSerThrGlyPheThrLysValCysGlyAlaProProCysVal
 301 TCGGTTGTACCTGGATGAACCTCAACTGGATTCAACAAAGTGTGCGGAGCGCTCCTTGTG
 AGCCAAACATGGACCTACTTGAGTTGACCTAAGTGGTTTTCACACAGCCCTCGCGGAGGAACAC

Fig. 2-1

° ° ° ° °
 IleGlyGlyAlaGlyAsnAsnThrLeuHisCysProThrAspCysPheArgLysHisPro
 361 TCATCGGAGGGGGGCAACACACCTGCACCTGCCCTGATGCTTCCGCAAGCATC
 AGTAGCCTCCCCCGCGTGTGTGGACGCTGACGGGTGACTAACGAAGGCGTTCTGTAG
 AspAlaThrTyrSerArgCysGlySerGlyProTyrIleThrProArgCysLeuValAsp
 421 CGGACGCCACATACTCTCGGTGCGGCTCCGTCCTGGATCACACCCAGGTGCTGGTCCG
 GCCTGGGTGTATGAGAGCCACGCCGAGGCCAGGACCTAGTGTGGTCCACGGACCAAGC

 TyrProTyrArgLeuTyrHisTyrProCysThrIleAsnTyrThrIlePheLysIleArg
 481 ACTACCCGTATAGGCTTTGGCATTTATCCTGTGACCATCACTACATATATTTAAATCA
 TGATGGGCATATCCGAAACCGTAATAGGAACATGGTAGTTGATGTGATATAAATTTTAGT

 MetTyrValGlyGlyValGluHisArgLeuGluAlaCysAsnTyrThrArgGlyGlu
 541 GGATGTACGTGGAGGGTCCAGCACAGGCTGGAGCTGCCCTGCAACTGGACGCGGGCG
 CCTACATGCACCCCTCCCCAGCTCGTGTCCGACCTTCGACGGACGTTGACCTGCGCCCCGC

 ArgCysAspLeuGluAspArgAspArgSerGluLeuSerProLeuLeuThrThrThr
 601 AACGTTGCGATCTGGAAGATAGGGACAGGTCCAGCTCAGCCCGTTACTGCTGACCACTA
 TTGCCAACGCTAGACCTTCTATCCCTGTCCAGGCTCGAGTCGGGCAATGACGACTGGTGAT

 GlnTyrGlnValLeuProCysSerPheThrThrLeuProAlaLeuSerThrGlyLeuIle
 661 CACAGTGGCAGGTCTCCGTGTTCTTCCACACCCCTGCCAGCCTTGTCCACCGGCTCA
 GTGTCACCGTCCAGGAGGCCACAAGGAAGTGTGGGACGGTCCGAAACAGGTGGCCGGAGT

Fig. 2-2

Suprapunerea cu combinatul ORF al DNA-unilor 12f prin 15e-----
 HisLeuHisGlnAsnIleValAspValGlnTyrLeuTyrGlyValGlySerSerIleAla
 721 TCCACCTCCACGACATGTGTGGAGTACGTGACGACTGTACGGGTGGGTCAAGCATCG
 AGGTGGAGGTGGTCTTGTAACACCTGCACGTCATGAACATGCCCCACCCCCAGTTCGTAGC

 SerTrpAlaIleLysTrpGluTyrValValLeuLeuPheLeuLeuAlaAspAlaArg
 781 CGTCCTGGGCCATTAAGTGGAGTACGTGCTCCTCCTGTTCTTCTGCTTGACAGACGCGC
 GCAGGACCCGGTAATTCAACCTCATGCAGCAGGAGGACAAAGGAGACGACGTCCTGCGCG

 ValCysSerCysLeuTrpMetMetLeuLeuIleSerGlnAlaGluAlaLeuGluAsn
 841 GCGTCTGCTCCTGCTGTGGATGATGCTACTCATATCCCAAGCGGAGCGGCTTTGGAGA
 CGCAGACGAGGACGAACACCTACTACGATGAGTATAGGGTTCGCCCTTCGCCGAAACCTCT

 LeuValIleLeuAsnAlaAlaSerLeuAlaGlyThrHisGlyLeuValSerPheLeuVal
 901 ACCTCGTAATACCTTAATGCAGCATCCCTGGCCGGGACGACGCTCTGTATCCTTCCTCG
 TGGAGCATTAATGAATTACGTCGTAGGACCGGCCCTGCGTGCCAGAACATAGGAAGGAGC

 PhePheCysPheAlaTrpTyrLeuLysGlyLysTrpValProGlyAlaValTyrThrPhe
 961 TGTTCCTCTGCTTTGCATGGTATCTGAAGGGTAAGTGGGTGCCCGGAGCGGTCTACACCT
 ACAAGAAGACGAAACGTACCATAGACTTCCCATTCACCCACGGGCTCGCCAGATGTGGA

Fig. 2-3

LeuLeuLeuAlaValPheGlyProLeuTrpIleLeuGlnAla
11321 AATTGCTGCTGGCCGCTTCGGACCCCTTTGGATTCTTCAAGCCAG
TTAACGACGACCGGCAGAGCCTGGGGAAACCTAAGAAGTTTCGGTC

Fig. 2-4

Translația DNA 15e

```

-----
1  GlyAlaGlyLysArgValTyrTyrLeuThrArgAspProThrThrProLeuAlaArgAla
   CGGCGCTGGAAAGAGGGTCTACTACCTCACCCGTGACCTACAAACCCCTCGCGGAGAGC
   GCCGCGACCTTTTCTCCAGATGATGGAGTGGGCACCTGGGATGTGTGGGGGAGCGCTCTCG
-----
61  ----- 26g -----
   AlaTrpGluThrAlaArgHisThrProValAsnSerTrpLeuGlyAsnIleIleMetPhe
   TGGGTGGGAGACAGCAAGACACACTCCAGTCAATTCTCGCTAGGCAACATAATCATGTT
   ACGCACCCCTCTGTCTGTTCTGTGTGAGGTCAGTTAAGGACCGATCCGTTGTATTAGTACAA
-----
121  -----
   AlaProThrLeuTrpAlaArgMetIleLeuMetThrHisPhePheSerValLeuIleAla
   TGCCCCCACACTGTGGGCCGAGGATGATAGTACATGACCCCATTTCTTTAGCGTCCCTATAGC
   ACGGGGTGTGACACCCGCTCTCTACTATGACTACTGCTGGTAAAGAAATCGCAGGAATATCG
-----
181  ArgAspGlnLeuGluGlnAlaLeuAspCysGluIleTyrGlyAlaCysTyrSerIleGlu
   CAGGGACCCAGCTTGAACAGGCCCTCGATTCGAGATCTACGGGGCCTGCTACTCCATAGA
   GTCCCTGGTCGAACTTGTCCGGGAGCTAACGCTCTAGATGCCCCGGACGATGAGGTATCT
-----
241  ProLeuAspLeuProProIleIleGlnArgLeu
   ACCACTTGATCTACCTCCAATCATTCAAAGACTC
   TGGTGAACACTAGATGGAGGTTAGTAAGTTTCTGAG

```

Fig. 3

Translatja DNA 131

ProSerProValValGlyThrThrAspArgSerGlyAlaProThrTyrSerTrpGly
 1 CTCCAGCCCGTGGTGGAAACGACGACAGGTGCGGGCGCCTACCTACAGCTGGG
 GAGGTGCGGGCACCCACCCCTTGCTGGCTGTCCAGCCCGCGGATGATGTCGACCC

GluAsnAspThrAspValPheValLeuAsnAsnThrArgProProLeuGlyAsnTrpPhe
 61 GTGAAATGATACGGACGTCTCGTCTTAACAATAACAGGCCACCGCTGGGCAATTGGT
 CACTTTTACTATGCTCGAGAGCAGGAATTGTATGGTCCGTGGGACCCGTTAAACCA

GlyCysThrTrpMetAsnSerThrGlyPheThrLysValCysGlyAlaProProCysVal
 121 TCGGTTGACCTGGATGAACCTCAACTGGATTCAACAAGTGTGGAGCGCCTCCTGTG
 AGCCAACATGGACCTACTTGAGTTGACCTAAGTGGTTTCACACGCCCTCGGGAGGAACAC

IleGlyGlyAlaGlyAsnAsnThrLeuHisCysProThrAspCysPheArgLysHisPro
 181 TCATCGGAGGGCGGGCAACAACACCTGCACCTGCCACTGATGCTTCGCAAGCATC
 AGTAGCCTCCCGCCGTTGTGGGACGTGACGGGTGACTAACGAAGCGTTCGTAG

AspAlaThrTyrSerArgCysGlySerGlyProThrLeuThrProArgCysLeuValAsp
 241 CGGACGCCACATACCTCGGTGCGGCTCCGGTCCCTGGCTCACACCCAGGTGCTGTGCG
 GCCTGCGGTGTATGAGAGCCACGCCGAGGCCAGGACCGAGTGTGGTCCACGGACCAGC

TyrProTyrArgLeuTrpHisTyrProCysThrIleAsnTyrThrIlePheLysIleArg
 301 ACTACCCGTATAGGCTTTGGCATATATCCTTGTAACCATCAACTACCATATTTAAATCA
 TGATGGGCATATCCGAAACCGTAATAGGAACATGGTAGTTGATGGTATAAAATTTAGT

MetTyrValGlyGlyValGluHisArgLeuGluAlaCysAsnTrpThrArgGlyGlu
 361 GGATGTACGTGGAGGGTCGAGCACAGGCTGGAAGCTGCCTGCAACTGGACGGGGCG
 CCTACATGCACCCCTCCAGCTCGTGTCCGACCTTCGACGGACGTTGACCTGCGCCCCGC

12f-----
 ArgCysAspLeuGluAspArgAspArgSerGluLeuSerProLeuLeuThrThrThr
 421 AACGTTGCGATCTGGAAGACAGGACAGGTCCGAGCTCAGCCCGTTACTGCTGACCACTA
 TTGCAACGCTAGACCTTCTGTCCCTGTCCAGGCTCGAGTCGGGCAATGACGACTGGTGAT

GlnTrpGlnValLeuProCysSerPheThrThrLeuProAlaLeuSerThrGlyLeu
 481 CACAGTGGCAGGTCCTCCCGTGTCTTCAACAACCTGCCAGCCTTGTCCACCGGCCCTCA
 GTGTCACCCGTCAGGAGGGCACAGGAAGTGTGGGACGGTCCGGAACAGGTGGCCGGAGT

Fig. 4

Translation DNA 26 j

```

LeuPheTyrHisHisLysPheAsnSerSerGlyCysProGluArgLeuAlaSerCysArg
1 GCTTTTCTATCACCACAAGTTCAACTCTTCAGGCTGTCTGAGAGGCTAGCCAGCTGCCCG
CGAAAGATAGTGGTGTTCAGTTGAGAAGTCCGACAGGACTCTCCGATCGGTCGACGGC
ProLeuThrAspPheAspGlnGlyTrpGlyProIleSerTyrAlaAsnGlySerGlyPro
61 ACCCTTACCGATTTTGACCAAGGCTGGGCCCTATCAGTTATGCCAACGGAAGCGGCC
TGGGGAATGGCTAAACTGGTCCGACCCCGGATAGTCAATACGGTTGCCCTTCGCCGGG
AspGlnArgProTyrCysTrpHisTyrProProLysProCysGlyIleValProAlaLys
121 CGACCAAGCGCCCTACTGTGGCACTACCCCCCAAAACCTTGCGGTATGTGCCCGCGAA
GCTGGTCGCGGGGATGACGACCGGTGATGGGGGTTTGTGGAACGCCCATAAACACGGGCGCTT
---
131---
SerValCysGlyProValTyrCysPheThrProSerProValValVal
181 GAGTGTGTGGTCCGGTATATTGCTTCACCTCCAGCCCCCGTGGTGGTGG
CTCACACACACACAGGCCATATAACGAAGTGAGGTGCGGGGCACCAACCC

```

Fig. 5

Traducerea DNA CA59a

LeuValMetAlaGlnLeuLeuArgIleProGlnAlaIleLeuAspMetIleAlaGlyAla
 1 TTGGTAATGGCTCAGCTGCTCCGGATCCACAAGCCATCTTGGACATGATCGCTGGTGCT
 AACCATTAACGAGTCGACGAGGCCCTAGGGTGTTCGGTAGAACCTGTACTAGCGACCCACGA
 HisTrpGlyValLeuAlaGlyIleAlaTyrPheSerMetValGlyAsnTrpAlaLysVal
 61 CACTGGGGAGTCCTGGCGGGCATAGCGTATTCTCCATGGTGGGAACCTGGCGGAAGGTC
 GTGACCCCTCAGGACCGCCCGTATCGCATAAAGAGGTACCAACCCCTTGACCCGCTTCCAG
 LeuValValLeuLeuLeuPheAlaGlyValAspAlaGluThrHisValThrGlyGlySer
 121 CTGGTAGTGTCTGTCTATTGCGGGCGTCGACGGGAACCCACGTCACCGGGGAAGT
 GACCATCACGACGACGATAAACGCGCCGACGTGCGCTTTGGGTGCAGTGGCCCCCTTCA
 AlaGlyHisThrValSerGlyPheValSerLeuLeuAlaProGlyAlaLysGlnAsnVal
 181 GCCGGCCACACTGTGTCTGGATTGTAGCCTCCTCGCACCGCGCCCAAGCAGAACGTC
 CGGCCGCTGTGACACAGACCTAAACAATCGGAGGAGCGTGGTCCGCGGTTCGTCTTGCAG
 GlnLeuIleAsnThrAsnGlySerTrpHisLeuAsnSerThrAlaLeuAsnCysAsnAsp
 241 CAGCTGATCAACACCAACGGCAGTTGGCACCTCAATAGCACCGCCCTGAACGCAATGAT
 GTCGACTAGTTGTGGTTGCCGTCAACCGTGGAGTTATCGTGGCGGACTTGACGTTACTA
 SerLeuAsnThrGlyTrpLeuAlaGlyLeuPheTyrHisHisLysPheAsnSerSerGly
 301 AGCCTCAACACCGGCTGTTGGCAGGGCTTTTCTATCACCACAAAGTTCAACTCTTCAGGC
 TCGGAGTTGTGGCCCGACCAACCGTCCCGAAAGATAGTGGTGTTCAAAGTTGAGAAAGTCCG
 26j-----
 ----- Suprapunerea cu K9-1 -----
 CysProGluArgLeuAlaSerCysArgPro
 361 TGTCTGTGAGAGGCTAGCCAGCTGCCGACCCC
 ACAGGACTCTCCGATCGGTCGACGGCTGGG

Fig. 6

Translația DNA CA84a

GlnGlyCysAsnCysSerIleTyrProGlyHisIleThrGlyHisArgMetAlaTrpAsp
 1 CGCAAGGTTGCAATTGCTCTATCTATCCCGCCATATAACGGGTACCCGATGGCATGGG
 GCGTTCCACGTTAACGAGATAGATAGGGCCGGTATATTGCCACGTGGCGTACCGTACCC

 MetMetMetAsnTrpSerProThrAlaLeuValMetAlaGlnLeuLeuArgIlePro
 61 ATATGATGATGAACCTGGTCCCTACGACGGCGTTGGTAATGGCTCAGCTGCTCCGGATCC
 TATACTACTTGTGACCAAGGGATGCTGCCGCAACCATTACCGAGTCGACGAGCCCTAGG

 GlnAlaIleLeuAspMetIleAlaGlyAlaHisTrpGlyValLeuAlaGlyIleAlaTyr
 121 CACAAGCCATCTTGGACATGATCGCTGGTGCTCACTGGGAGTCTCTGGCGGCATAGCGT
 GTGTTCCGTAGAACCTGTACTAGCGACCAAGTAGTACCCCTCAGGACCGCCCGTATCGCA

----- CA59a -----
 PheSerMetValGlyAsnTrpAlaLysValLeuValValLeuLeuPheAlaGlyVal
 181 ATTTCTCCATGGTGGGAACCTGGCGGAAGGTCTTGGTAGTGTGCTGTCTATTGCCGGCG
 TAAAGAGGTACCAACCCCTTGACCCCGCTCCAGGACCATCACGACGATAAACGGCCGC

 AspAlaGluThrHisValThrGly
 241 TCGACGCGGAAACCCACGTACCCGGGG
 AGCTGCGCCCTTGGGTGCAGTGGCCCC

Fig. 7

Translation DNA CA156e

```

CysTrpValAlaMetThrProThrValAlaThrArgAspGlyLysLeuProAlaThrGln
1 GTGTTGGTGGCGATGACCCCTACGGTGGCCACAGGATGGCAAACTCCCCCGGACGCA
CACAAACCCACCGCTACTGGGGATGCCACCGGTGCTCCCTACCGTTGAGGGGGCGTGGCT
LeuArgArgHisIleAspLeuLeuValGlySerAlaThrLeuCysSerAlaLeuTyrVal
61 GCTTCGACGTCAATCGATCTGCTTGTCTGCGGGAGCGCCACCTCTGTTGCGCCCTCTACGT
CGAAGCTGCAGTGTAGCTAGACGAACAGCCCTCGCGGTGGGAGACAAAGCCGGGAGATGCA
GlyAspLeuCysGlySerValPheLeuValGlyGlnLeuPheThrPheSerProArgArg
121 GGGGGACCTATGCGGGTCTGCTTCTTGTCTGCGGCCAACTGTTACCTTCTCTCCAGGCG
CCCCCTGGATACGCCCCAGACAGAAAGAACAGCCGGTTGACAAGTGGAGAGAGGGTCCGC
-----
HisTrpThrThrGlnGlyCysAsnCysSerIleTyrProGlyHisIleThrGlyHisArg
181 CCACTGGACGACGCAAGGTGCAATTGCTCTATCTATCCGGCCATATAACGGGTCACCCG
GGTGACCTGCTGCTGCCAACGTTAACGAGATAGATAGGGCGGGTATATTGCCAGTGCGC
-----
MetAlaTrpAspMetMetMetAsnTrpSerProThrThrAlaLeuValValAlaGlnLeu
241 CATGGCATGGGATATGATGATGAACCTGGTCCCTACGACGGCGTTGGTAGTGGCTCAGCT
GTACCGTACCCCTATACTACTACTGACCAAGGGGATGCTGCCGCAACCATCACCCGAGTCCA
-----
LeuArgIleProGlnAla
301 GCTCCGGATCCCCACAAGCC
CGAGGCCCTAGGTGTTCCG

```

Fig. 8

Translația DNA CA167b

SerThrGlyLeuTyrHisValThrAsnAspCysProAsnSerSerIleValTyrGluAla
 1 CTCCACGGGGCTTTACCAAGTCAACCAATGATTGCCCTAAGTTCGAGTATTGTGTACGAGGC
 GAGGTGCCCCCGAAATGGTGCAGTGGTTACTAACGGGATTGAGCTCATAACACATGCTCCG

AlaAspAlaIleLeuHisThrProGlyCysValProCysValArgGluGlyAsnAlaSer
 61 GGCCGATGCCATCCTGCACACTCCGGGGTGCCTCCCTTGCCTGCTGAGGGCAACGCCCTC
 CCGGCTACGGTAGGACGTGTGAGGCCCCCAGCGAGGAACGCAAGCACTCCCGTTGCGGAG

 ArgCysTrpValAlaMetThrProThrValAlaAlaThrArgAspGlyLysLeuProAlaThr
 121 GAGGTGTTGGTGGCGATGACCCCTACGGTGGCCACCAGGGATGGCAAACTCCCCCGGAC
 CTCCACAACCCACCGCTACTGGGGATGCCACCGGTGGTCCCTACCGTTGAGGGGGCGCTG

----- CA156e -----
 GlnLeuArgArgHisIleAspLeuLeuValGlySerAlaThrLeuCysSerAlaLeuTyr
 181 GCAGCTTCGACGTCACATCGATCTGCTGTGGGAGCGCTACCTCTGTTCGGCCCCCTCTA
 CGTCGAAGCTGCAGTGTAGCTAGACGAACAGCCCTCGCGATGGGAGACAAAGCCGGGAGAT

 ValGlyAspLeuCysGlySerValPheLeu
 241 CGTGGGGGACTTGTGGGGTCTGTCTTTCTTG
 GCACCCCTGAACACGCCCCAGACAGAAAGAAC

Fig. 9

Translation DNA ssCA216a

```

1      ArgArgArgSerArgAsnLeuGlyLysValIleAspThrLeuThrCysGlyPheAlaAsp
      CCGGGCGTAGGTGCGCCAAATTGGGTAAAGTTCATCGATACCTTACGTGCGGCTTCGCCG
      GGGCCGATCCAGCGCGTTAAACCCATTCCAGTAGCTATGGATGACACGCCCGAAGCGGC

61     LeuMetGlyTyrIleProLeuValGlyAlaProLeuGlyGlyAlaAlaArgAlaLeuAla
      ACCTCATGGGGTACATACCGTCTGTCGGCGCCCTCTTTGGAGCGCTGCCAGGGCCCTGG
      TGGAGTACCCCATGTATGGCGAGCAGCGCGGGGAGAACCTCCGCGAOCGTCCCGGGACC

121    HisGlyValArgValLeuGluAspGlyValAsnTyrAlaThrGlyAsnLeuProGlyCys
      CGCATGGCGTCCGGGTTCTGGAAGACGGGTGAACATATGCAACAGGGAACCTTCCTGGTT
      GCGTACCGCAGGCCCAAGACCTTCTGCCGCACCTTGATACGTTGTCTTGGAAAGGACCAA

181    SerPheSerIlePheLeuLeuAlaLeuLeuSerCysLeuThrValProAlaSerAlaTyr
      GCTCTTCTCTATCTTCTTCTGCCCCCTGCTCTCTGTGCTGACTGTGCCGCTTCGGCCT
      CGAGAAAGAGATAGAGGAAGACCGGGACGAGAGAACGAACCTGACACGGGCGAAGCCGGA

-----
      GlnValArgAsnSerThrGlyLeuTyrHisValThrAsnAspCysProAsnSerSerIle
241    ACCAAGTGGCAACTCCACGGGGCTTTACCACGTCACCAATGATGCCCTAACTCGAGTA
      TGGTTCACGCGTTGAGGTGCCCCCGAAATGGTGCAGTGTACTTAACGGGATGAGCTCAT

-----
      ValTyrGluAlaAlaAspAlaIleLeuHisThrProGlyCysValProCysValArgGlu
301    TTGTGTACGAAGCGGCCGATGCCATCCTGCACACTCCGGGGTGCCTCCCTTGGTTGCTG
      AACACATGCTTCGCCCGGCTACGGTAGGACGTGTGAGGCCCCCACGCGAGGAACGCAAGCAC

-----
      GlyAsnAlaSerArgCysTrpValAlaMetThrProThrValAla
361    AGGGCAACGCCCTCGAGGTGTGGTGGCGATGACCCCTACGGTGGCC
      TCCCGTTGGGAGCTCCACAACCCACCGCTACGGGGGATGCCACCGG

```

Fig. 10

Translation DNA ssCA290a

1 LysLysAsnLysArgAsnThrAsnArgArgProGlnAspValLysPheProGlyGlyGly
 AAAAAAACAACGTAAACCAACCGTCGCCACAGCAGCTCAAGTTCCCGGTGGCG
 TTTTTTTTGTGTCATGTGGTGGCAGCGGTCTCTCAGTTCAAGGGCCCAACCGC

61 GlnIleValGlyGlyValTyrLeuLeuProArgArgGlyProArgLeuGlyValArgAla
 GTCAGATCGTTGGTGGATTACTTGTTCGCCGCGGGGCCCTAGATTGGTGTGGCG
 CAGTCTAGCAACCACTCAATGAACAACGCGCGCTCCCGGATCTAACCCACACGCGC

121 ThrArgLysThrSerGluArgSerGlnProArgGlyArgArgGlnProIleProLysAla
 CGACGAAAGACTTCGAGCGGTGCAACCTCGAGGTAGACGCCAGCCTATCCCCAAGG
 GCTGCTCTTCTGAAGCTCGCCAGCGTTGGAGCTCCATCTCGGTGGATAGGGTTCC

181 ArgArgProGluGlyArgThrTrpAlaGlnProGlyTyrProIleProLeuTyrGlyAsn
 CTGTCGGCCCGAGGCAGGACCTGGCTCAGCCCGGTACCTTGGCCCTCTATGGCA
 GAGCAGCCGGGTCCCGTCTCGACCGAGTCGGGCCCATGGGAACCGGGAGATACCGT

241 GluGlyCysGlyTrpAlaGlyTrpLeuLeuSerProArgGlySerArgProSerTrpGly
 ATGAGGGCTGGGGTGGCGGATGGCTGCTGCTCCCGTGGCTCTCGGCCCTAGCTGGG
 TACTCCGACGCCCCACCGCCCTACCGAGACAGAGGGCCACCGAGAGCCGGATCGACCC

301 ProThrAspProArgArgSerArgAsnLeuGlyLysValIleAspThrLeuThrCys
 GCCCCACAGACCCCGCGGTAGTTCGGCAATTGGGTAAAGTCAATCATACCTTACGT
 CGGGGTGCTTGGGGGCCGTCATCCAGCGGTAAACCCATTCCAGTAGCTATGGGAATGCA

361 GlyPheAlaAspLeuMetGlyTyrIleProLeuValGlyAlaProLeuGlyGlyAlaAla
 GCGGCTTCGCCGACCTCATGGGTACATACCGCTCGTGGCGCCCTCTTGGAGCGCTG
 CGCCGAGCGGCTGGAGTACCCCATGTATGGCAGCAGCGCGGGGGAGAACCTCCGGAC

421 ArgAlaLeuAlaHisGlyValArgValLeuGluAspGlyValAsnTyrAlaThrGlyAsn
 CCAGGGCCCTGGCGCATGGCTCCGGTCTCGGAAGACGCGGTGAACATATGCAACAGGA
 GGTCCCCGGACCGGTACCGCAGGCCCAAGACCTTCTGCGCAGTGTATACGTTGTTCCT

481 LeuProGlyCysSerPheSerThrPhe
 ACCTTCCTGTGTCTCTTCTTCTACCTTC
 TGGAAGGACCAACGAGAAAGATGGAG

Fig. 11

Translația DNA ag30a

#MetSerValValGlnProProGlyProProLeu

#MetAlaLeuValOP

1 CCGAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTGTCGAGCCTCCAGGACCCCCCC
GGTCTTTTCGCAGATCGGTACCGCAATCATCTACAGCACGTCGGAGGTCCTGGGGGGG

ProGlyGluProAM

61 TCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCCAGGACGAC
AGGGCCCTCTCGGTATCACAGAGCGCCTTGGCCACTCATGTGGCCCTTAACGGTCCCTGCTG

#MetProGlyAspLeuGlyValProProGlnAsp

121 CGGGTCTTTTCTTGGAACAACCGCTCAATGCCCTGGAGATTGGGGCGTCCCCCGCAAGA
GCCAGGAAAGAACCTAGTTGGGCGAGTTACGGACCTCTAAACCCGCACGGGGCGTTCT

CysAM

OP AM GlyAlaCys
*

181 CTGCTAGCCGAGTAGTGTGGTTCGGAAAGGCCCTTGTGGTACTGCTGTGATAGGGTGCTT
GACGATCGGCTCATCAACAACCCAGCGCTTCCGGAAACACCATGACGGACTATCCCACGAA

GluCysProGlyArgSerArgArgProCysThrMetSerThrAsnProLysProGlnLys

Fig. 12-1

241 GCGAGTCCCCGGGAGGTCCTCGTAGACCGTGACCATGAGCACGAATCCTAAACCTCAAA
 CGCTCACGGGGCCCTCCAGAGCATCTGGCACGTGGTACTCGTGTAGGATTGGAGTTT
 LysAsnLysArgAsnThrAsnArgArgProGlnAspValLysPheProGlyGlyGlyGln

 301 AAAAAACAACGTAACACCAACCGTCGCCACAGGACGTCAAGTTCCTGGGTGGCGGTC
 TTTTTTTGTTGCATTGTGGTTGGCAGCGGGGTGCTCCTGCAGTTCAAGGGCCACCGCCAG
 IleValGlyGlyValTyrLeuLeuProArgArgGlyProArgLeuGlyValArgAlaThr

 361 AGATCGTTGGTGGAGTTTACTTGTCCGGCAGGGGCCCTAGATTGGGTGTCGGCGGA
 TCTAGCAACCACTCAATGAACAACGGCGGTCCCCGGGATCTAACCCACACGGCGGCT
 ArgLysThrSerGluArgSerGlnProArgGlyArgArgGlnProIleProLysAlaArg

 421 CGAGAAAGACTTCCGAGCGGTCCGAACCTCGAGGTAGACGTCAGCCTATCCCCAAGGCTC
 GCTCTTTCTGAAGGCTCGCCAGCGTTGGAGCTCCATCTGCAGTCGGATAGGGTTCCGAG
 ArgProGluGlyArgThrTrpAlaGlnProGlyTyrProTrpProLeuTyrGlyAsnGlu

Fig. 12-2

-----suprapunerea cu CA290a-----
 481 GTCGGCCCGAGGCGAGGACCTGGGCTCAGCCCGGTACCCCTGGCCCCCTCTATGGCAATG
 CAGCCGGGCTCCCGTCCCTGGACCCCGAGTCGGGCCCATGGGAACCGGGGAGATACCGTTAC
 GlyCysGlyTrpAlaGlyTrpLeuLeuSerProArgGlySerArgProSerTrpGlyPro

 541 AGGGCTGCGGGTGGCGGGATGGCTCCCTGTCTCCCCGTGGCTCTCGGCCCTAGCTGGGGCC
 TCCCGACGCCQACCCGCCCTACCGAGGACAGAGGGGCACCGAGAGCCGGATCGACCCCGG
 ThrAspProArgArgSerArgAsnLeuGlyLysValIleAspThrLeuThrCysGly
 601 CCACAGACCCCCCGGTAGGTCCGCGCAATTGGGTAAGTTCATCGATACCCCTTACGTGCG
 GGTGTCTGGGGGCCGCATCCAGCGCGTTAAACCCATTCCAGTAGCTATGGGAATGCACGC
 Phe

 661 GCTTC
 CGAAG

* = Start al ORF lung al HCV
 | = Primul aminoacid al poliproteinei mari a HCV
 # = Peptide putative mici codificate (aceasta poate
 juca un rol de reglare a translației)

Fig. 12-3

Translatia DNA CA205a

1 ValLeuGlyArgGluArgProCysGlyThrAlaOP AM GlyAlaCysGluCysProGly
 GTCTTGGGTGCGAAAGGCCCTTGTTGTAAGTCTGCTGATAGGTGCTTGCAGTCCCCGGG
 CAGAACCCAGCGCTTTCGGAACACCATGACGGACTATCCACGAAACGCTCACGGGGCCC
 *
 61 ArgSerArgArgProCysThrMetSerThrAsnProLysProGlnArgLysThrLysArg
 AGGTCTCGTAGACCGTGCAACCATGAGCACGAATCCTAAACCTCAAAGAAACCAACACGT
 TCCAGAGCATCTGGCACGTTGGTACTCGTGTAGGATTGGAGTTCTTTTGGTTGCA

 121 AsnThrAsnArgArgProGlnAspValLysPheProGlyGlyGlnIleValGlyGly
 AACACCAACCGTCGCCACAGGACGTCAAGTTCCGGGTGGCGGTCAATCGTTGGTGA
 TTGTGGTTGGCAGCGGGGTCTCTGCAGTTCAAGGCCACCGCCAGTCTAGCAACCACT

 181 ValTyrLeuLeuProArgArgGlyProArgLeuGlyValArgAlaThrArgLysThrSer
 GTTTACTTGTGGCCGCGAGGGCCCTAGATTGGGTGTGCGCGACGAGAAAGACTTCC
 CAAATGAACAACGGCGGTCCCCGGGATCTAACCCACACGCGCTGCTCTTTCTGAAG

 241 CA290a
 GluArgSerGlnProArgGlyArgArgGlnProIleProLysAlaArgArgProGluGly
 GAGCGGTGCAACCTCGAGGTAGACGTACGCTATCCCCAAGGCTCGTGGGCCGAGGGC
 CTCGCCAGCGTTGGAGCTCCATCTGCAGTCGGATAGGGTTCCGAGCAGCCGGGCTCCCG

 301 ArgThrTrpAlaGlnProGlyTyrProTrpProLeuTyrGlyAsnGluGlyCys
 AGGACCTGGGCTCAGCCCGGTACCTTGGCCCCCTCTATGGCAATGAGGCTGCG
 TCCTGGACCCGAGTCGGGCCCATGGGAACCGGGGAGATACCGTTACTTCCCGACGC
 *

Fig. 13

Translația DNA 189	
1	#ProProOP #SerThrMetAsnHisSerProValArgAsnTyrCysLeuHisAlaGluSerValAM Pro #LeuHisGluSerLeuProCysGluGluLeuLeuSerSerArgLysArgLeuAla CTCCACCAATGAATCACTCCCTGTGAGGAACACTGCTCTCACGCAGAAAGCGTCTAGCC GAGGTGGTACTTAGTCAGGGGACACTCCTTGATGACAGAAGTGGTCTTTCCGAGATCGG
61	#MetSerValValGlnProProGlyProProLeuProGlyGluProAM MetAlaLeuValOP ATGGCGTTAGTATGAGTGTGTCAGCCCTCCAGGACCCCTCCCGGAGAGCCATAGT TACCGCAATCATACTCACAGCACGTCGGAGGTCTGGGGGAGGGCCCTCTCGGTATCA
121	GGTCTGGGGAACCGGTGAGTACACCGGAATGGCCAGGACGACCGGGTCTTTCTTGGATC CCAGACGCCCTTGGCCACTCATGTGGCCCTTAACGGTCTCTGCTGGCCCCAGAAAGAACCTAG ag30a
181	#MetProGlyAspLeuGlyValProProGlnAspCysAM AACCCGCTCAATGCCCTGGAGATTGGCGGTGCCCCCGCAAGACTGCTAGCCGAGTAGTGT TTGGGCGAGTTACGGACCTCTAAACCCGCAACGGGGCGTTCTGACGATCGGCTCATCACA
241	OP AM GlyAlaCysGluCysProGlyArgSer TGGGTCCGGAAGGCCCTTGTGGTACTGCCCTGATAGGCTGCTTGCAGTGCCTCCGGGAGGT ACCCAGGCGCTTCCGGAACACCATGACGACTATCCACGAACGCTCACGGGGCCCTCCA
301	ArgArg CTCGTAGA GAGCATCT

* - Start al ORF lung al HCV
- Peptide putative mici codificate (aceasta poate
juca un rol de reglare a translației)

Fig. 14

Translatia DNA 16jh

```

-----
15e -----
GlyAlaCysTyrSerIleGluProLeuAspLeuProProIleIleGlnArgLeuHisGly
1 GGGGCTGCTACTCCATAGAACCACTGGATCTACCTCCAATCATTCAAAGACTCCATGGC
CCCCGGACGATGAGGTATCTTGGTGACCTAGATGGAGGTTAGTAAGTTTCTGAGGTACCG

LeuSerAlaPheSerLeuHisSerTyrSerProGlyGluIleAsnArgValAlaAlaCys
61 CTCAGCGCATTTTCACTCCACAGTTACTCTCCAGGTGAATAATATAGGGTGGCCCATGC
GAGTCGCGTAAAGTGAGGTGTCAATGAGAGGTCCACTTTAATTATCCACCCGGCGTACG

Gly*
G
LeuArgLysLeuGlyValProProLeuArgAlaTrpArgHisArgAlaArgSerValArg
121 CTCAGAAAACCTGGGGTACCGCCCTTGGAGCTTGGAGACACCGGGCCCGGAGCGTCCGC
GAGTCTTTTGAAACCCCATGGGGGAACGCTCGAACTCTGTGGCCCGGCCCTCGCAGGCG

AlaArgLeuLeuAlaArgGlyGlyArgAlaAlaIleCysGlyLysTyrLeuPheAsnTrp
181 GCTAGGCTTCTGCGCCAGAGGAGGAGGCTGCCATATGTGGCAAGTACCTCTTCAACTGG
CGATCCGAAGACCGGTCTCCTCCGTCCTCCGACGGTATACACCGTTTCATGGAGAAGTTGACC

AlaValArgThrLysLeuLys
241 GCAGTAAGAACAAAGCTCAAC
CGTCATTCCTGTTTCGAGTTTG

```

* = heterogenitatea nucleotidului

Fig. 15

Translația DNA 6k

```

-----
16jh-----
GlyArgAlaAlaIleCysGlyLysTyrLeuPheAsnTrpAlaValArgThrLysLeuLys
1  GGCAGGGCTGCCATATGTGGCAAGTACCTCTTCAACTGGGCAGTAAGAACAAAGCTCAAA
   CCGTCCCCACGGTATACACCGTTTCATGGAGAACTTGACCCCGTCATTCTTGTTCGAGTTT
-
LeuThrProIleAlaAlaAlaGlyGlnLeuAspLeuSerGlyTyrPheThrAlaGlyTyr
61 CTCACTCCAATAGCGCGCGCTGGCCAGCTGGACTTGTCCGGCTGGTTACGGCTGGCTAC
   GAGTGAGGTTATCGCCGGCGACCGGTGACCTGAACAGGCGGACCAAGTGCCGACCGATG
SerGlyGlyAspIleTyrHisSerValSerHisAlaArgProArgTrpIleTrpPheCys
121 AGCGGGCGAGACATTTATCACAGCGCTGTCTCATGCCGCGCGCGCTGGATCTGGTTTTC
   TCGCCCCCTCTGTAAATAGTGTCCACAGAGTACGGGCGGGGGCGGACCTAGACCAAAACG

181 CC
   GG

```

Fig. 16

Translația DNA p131jh

----- 6k-----
 TyrHisSerValSerHisAlaArgProArgTrpIleTrpPheCysLeuLeuLeuAla
 1 TTATCACAGGCGTCTCATGCCCGCCCGCTGGATCTGGTTTGGCTACTCCTGCTGC
 AATAGTGTGGCACAGAGTACGGGCGGGCGGACCTAGACCAAAACGGATGAGGACGAAACG
 AlaGlyValGlyIleTyrLeuLeuProAsnArgOP
 61 TGCAGGGGTAGGCATCTACCTCTCCCAACCGATGAAGTTGGGGTAAACACTCCGGCC
 ACGTCCCCATCCGTAGATGGAGAGGGGTGGCTACTTCCCAACCCCATTTGTGAGGCCCGG
 121 T
 A

Fig. 17

-341 GCCAGCCCCCTGATGGGGCGA
 CGGTGGGGGACTACCCCGCT

-319 CACTCCACCATGAATCACTCCCTGTGAGGAATACTGTCTTTCACGCAGAAAGCGTCTAG
 GTGAGGTGGTACTTAGTGAGGGGACACTCCTTGATGACAGAAGTGGCTCTTTCGCAGATC

-259 CCATGGCGTTAGTATGAGTGTCTGTCAGCCCTCCAGGACCCCCCTCCCGGGAGAGCCATA
 GGTACCGCAATCATACTACAGCACGTGGAGGTCTGGGGGAGGGCCCTCTCGGTAT

-199 GTGGTCTGCGGAACCGGTAGTACACCGGAATTGCCAGGACGCCGGTCTTCTTGGGA
 CACCAGACGCCCTTGGCCACTCATGTGGCTTAACGGTCTGTGGCCAGGAAGAACCT

-139 TCAACCCGCTCAATGCCTGGAGATTGGGCGTGCCCCCGCAAGACTGCTAGCCGAGTAGT
 AGTTGGGGGAGTTACGGACCTCTAAACCGCACGGGGCGTTCTGACGATCGGCTCATCA

- 79 GTTGGGTGCGGAAGGCCCTTGTGGTACTGCCCTGATAGGTGCTTGGAGTGCCCCGGGAG
 CAACCCAGCGCTTTCGGGAACACCATGACGGACTATCCCACGAACGCTCACGGGGCCCTC

- 19 GTCTCGTAGACCGTGCACC
 CAGAGCATCTGGCACGTGG

1 MetSerThrAsnProLysProGlnLysLysAsnLysArgAsnThrAsnArgArgProGln
 ATGAGCACGAATCCTAAACCTCAAAAAAACAACGTAACACCAACCGTGGCCCCACAG
 TACTCGTGCTTAGGATTGGAGTTTTTTTTTTTGTGTCATTTGGTTGGCAGCGGGTGTCTC

61 AspValLysPheProGlyGlyGlyGlnIleValGlyGlyValTyrLeuLeuProArgArg
 GACGTCAAGTTCCTGGGTGGCGGTGAGATCGTTGGTGGAGTTTACTTGTTCGCGGCAGG
 CTGCAGTTCAAGGGCCCCACCGCCAGTCTAGCAACCCCTCAAAATGAACAACGGCGGTCC

Fig. 18-1

121	GlyProArgLeuGlyValArgAlaThrArgLysThrSerGluArgSerGlnProArgGly GGCCCTAGATTGGGTGTGGCGCGACGAGAAAGACTTCGAGCGGTCCGAACCTCGAGGT CCGGATCTAAACCCACACACGCGCGCTGCTCTTCTGAAGGCTCGCCAGCGTTGGAGCTCCA
181	ArgArgGlnProIleProLysAlaArgArgProGluGlyArgThrTrpAlaGlnProGly AGACGTCAGCCTATCCCCAAGGCTCGTCGGCCCGAGGCGAGACCTGGGCTCAGCCCGGG TCTGCAGTCGGATAGGGGTTCCGAGCAGCCGGGCTCCCGTCTCTGGACCCCGAGTCGGGCCC
241	TyrProTrpProLeuTyrGlyAsnGluGlyCysGlyTrpAlaGlyTrpLeuLeuSerPro TACCTTGGCCCTCTATGGCAATGAGGCTCGGGTGGCGGGATGGCTCCTGTCTCTCCC ATGGGAACCGGGAGATACCGTTACTCCCGACGCCACCCGCCCTACCGAGGACAGAGGG
301	ArgGlySerArgProSerTrpGlyProThrAspProArgArgArgSerArgAsnLeuGly CGTGGCTCTCGGCCCTAGCTGGGGCCCCACAGACCCCCCGGTAGGTCCGCAATTGGGT GCACCGAGAGCCGGATCGACCCCGGGGTGTCTGGGGCCGCGATCCAGCGCGTTAAACCCA
361	LysValIleAspThrLeuThrCysGlyPheAlaAspLeuMetGlyTyrIleProLeuVal AAGGTCATCGATACCCCTTACGTGGGCTTCGCCGACCTCATGGGGTACATACCGCTCGTC TTCCAGTAGCTATGGGAATGCACGCCGGAAGCGGCTGGAGTACCCCATGTATGGCGAGCAG
421	GlyAlaProLeuGlyGlyAlaAlaArgAlaLeuAlaHisGlyValArgValLeuGluAsp GGCGCCCCCTCTTGGAGCGCTGCCAGGCCCTGGCGCATGGCTCCGGGTTCTGGAGAGAC CCGCGGGGAGAACCTCCGCGACGGTCCGGGACCGCGTACCGCAGGCCCAAGACCTTCTG

Fig. 18-2

Thr
 GlyValAsnTyrAlaThrGlyAsnLeuProGlyCysSerPheSerIlePheLeuLeuAla
 481 GGCGTGAACATAAGCAACAGGAACTTCCCTGGTGGCTCTTCTCTATCTTCTTCTGGCC
 CCGCACTTGATACGTTGTTCCCTTGGAAAGGACCAACGAGAAAGAGATAGAAAGAACCCG
 LeuLeuSerCysLeuThrValProAlaSerAlaTyrGlnValArgAsnSerThrGlyLeu
 541 CTGCTCTCTTGTGACTGTGCCCGCTTCGGCTACCAAGTGGCAACTCCACGGGGCTT
 GACGAGAGAACGAACCTGACACGGGGGAGCCGGATGGTTACCGCTTGAGGTGCCCCCGAA
 TyrHisValThrAsnAspCysProAsnSerSerIleValTyrGluAlaAlaAspAlaIle
 601 TACCACGTCACCAATGATGTCCTAACTCGAGTATTGTGTACGAGCGCGCGGATGCCATC
 ATGGTGCAGTGGTTACTAACGGGATGAGCTCATACACATGCTCCCGCGCTACGGTAG
 LeuHisThrProGlyCysValProCysValArgGluGlyAsnAlaSerArgCysTrpVal
 661 CTGCACACTCCGGGGTGGTCCCTTGGTTCGTTGAGGGCAACGCCCTCGAGGTGTTGGGTG
 GACGTGTGAGGCCCCACGCAGGGAACGCAACTCCCGTTGCGGAGCTCCACAACCCAC
 AlaMetThrProThrValAlaThrArgAspGlyLysLeuProAlaThrGlnLeuArgArg
 721 GCGATGACCCCTACGGTGGCCACCAGGGATGGCAAACTCCCGCGACGCGAGCTTCGACGT
 CGCTACTGGGGATGCCACCGGTGGTCCCTACCGTTTGTAGGGGGCTGCGTCTGAAGCTGCA
 HisIleAspLeuLeuValGlySerAlaThrLeuCysSerAlaLeuTyrValGlyAspLeu
 781 CACATCGATCTGCTTGTGGGAGCGCCACCCTCTGTTCGGCCCTCTACGTGGGGACCTA
 GTGTAGCTAGACGAACAGCCCTCGCGGTGGGAGACAAGCCGGGAGATGACCCCCCTGGAT
 CysGlySerValPheLeuValGlyGlnLeuPheThrPheSerProArgArgHisTrpThr
 841 TGCGGGTCTGTCTTCTTGTGGCCAACTGTTACCTTCTCTCCAGGGCGCCACTGGACG
 ACGCCAGACAGAAAGACAGCCGTTGACAAAGTGAAGAGAGAGGGTCCGCGGTGACCTGC

Fig. 18-3

901	ThrGlnGlyCysAsnCysSerIleTyrProGlyHisIleThrGlyHisArgMetAlaTrp ACGCAAGTTGCAATTGCTCTATCTATCCCGCCATATAACGGTCCACGCATGGCATGG TGCGTTCCAAACGTTAACGAGATAGATAGGGCCGGTATATTGCCAGTGGGTACCGTACC
961	Val AspMetMetMetAsnTrpSerProThrThrAlaLeuValMetAlaGlnLeuLeuArgIle GATATGATGATGAACCTGGTCCCTACGACGGCGTTGGTAATGGCTCAGCTGCTCCGGATC CTATACTACTACTTGACCCAGGGGATGCTGCCCGCAACCATATTACCGAGTCGACGAGGCCCTAG
1021	ProGlnAlaIleLeuAspMetIleAlaGlyAlaHisTrpGlyValLeuAlaGlyIleAla CCACAAGCCATCTTGGACATGATCGCTGGTGCTCACTGGGGAGTCCCTGGCGGCATAGCG GGTGTTCGGTAGAAACCTGTACTAGCGACCAACGAGTACCCCTCAGGACCGCCCGTATCGC
1081	TyrPheSerMetValGlyAsnTrpAlaLysValLeuValValLeuLeuPheAlaGly TATTTCCTCCATGGTGGGAACCTGGCGAAGTCTCTGGTAGTGTCTGTCTATTGCGCGC ATAAAGAGGTACCACCCCTTGACCCGCTTCCAGGACCATCAGGACGACGATAAACGGCCG
1141	ValAspAlaGluThrHisValThrGlyGlySerAlaGlyHisThrValSerGlyPheVal GTCGACGGGAAACCCACGTCACCGGGGAAGTCCGGCCACACTGTGTCTGGATTGTT CAGCTGGCCCTTTGGGTGCAGTGGCCCCCTTCACGGCCCGGTGTGACACAGACCTAAACAA
1201	SerLeuLeuAlaProGlyAlaLysGlnAsnValGlnLeuIleAsnThrAsnGlySerTrp AGCCTCCTCGCACCCAGGCGCCAAAGCAGAACGTCCAGCTGATCAACACCAACGGCAGTTGG TCGGAGGAGCGGTCCGCGGTTCGTCTTGCGAGTGCAGTAGTGTGTGGTTGCCGTCAACC

Fig. 18-4

1261 HisLeuAsnSerThrAlaLeuAsnCysAsnAspSerLeuAsnThrGlyTrpLeuAlaGly
 CACCTCAATAGCACGGCCCTGAACCTGCAATGATAGCCTCAACACCGGCTGGTTGGCAGGG
 GTGGAGTTATCGTGCCGGGACTTGACGTTACTATCGGAGTTGTGGCCGACCAACCGTCCC

 1321 LeuPheTyrHisHisLysPheAsnSerSerGlyCysProGluArgLeuAlaSerCysArg
 CTTTTCATATCACCAACAAGTTCAACTCTTCAGGCTGTCCCTGAGAGGCTAGCCAGCTGCCGA
 GAAAGATAGTGGTGTTCAGTTGAGAAAGTCCGACAGGACTCTCCGATCCGGTCGACGGCT

 1381 ProLeuThrAspPheAspGlnGlyTrpGlyProIleSerTyrAlaAsnGlySerGlyPro
 CCCCTTACCGATTGACACGAGGCTGGGCCCTATCAGTTATGCCAACGGAAGCGCCCC
 GGGGAATGGCTAAACTGGTCCCGACCCCGGGATAGTCAATACGGTTGCCCTTCGCCCGGGG

 1441 AspGlnArgProTyrCysTrpHisTyrProProLysProCysGlyIleValProAlaLys
 GACCAGCGCCCTACTGCTGGCACTACCCCCAAACCTTGGGTATTGTGCCCGCGGAAG
 CTGGTCGGGGGATGACGACCGTGATGGGGGTTTGGAAACGCCATAACACGGGGCGCTTC

 1501 SerValCysGlyProValTyrCysPheThrProSerProValValValGlyThrThrAsp
 AGTGTGTGTGGTCCGGTATATGCTTCACTCCAGCCCGGTGGTGGTGGAAACGACCGAC
 TCACACACACACAGGCCATATAACGAAGTGAGGGTGGGGCACCAACCCCTTGCTGGCTG

 1561 ArgSerGlyAlaProThrTyrSerTrpGlyGluAsnAspThrAspValPheValIleuAsn
 AGGTGGGGCGGCCACCTACAGCTGGGGTGAATAATGATACGGACGCTCTTCGTCCCTTAAC
 TCCAGCCCGCGGGTGGATGTCGACCCCACTTTTACTATGCTGCAGAACGAGGAATTG

 AsnThrArgProProLeuGlyAsnTrpPheGlyCysThrTrpMetAsnSerThrGlyPhe

Fig. 18-5

1621 AATACCAAGGCCACCGCTGGGCAATTGGTTCCGTTGTACCTGGATGAACCTCAACTGGATTCT
 TTATGGTCCGGTGGCGACCCCGTTAAACCAAGCCAAACATGGACCTACTTGAGTTGACCTAAG

 1681 ThrLysValCysGlyAlaProProCysValIleGlyGlyAlaGlyAsnAsnThrLeuHis
 ACCAAAGTGTGCGAGCGCCTCTTGTGTCAATCGGAGGGCGGGCAACAACACCTGCAC
 TGGTTTCACACGCTCCGCGGAGGAACACAGTAGCCTCCCGCCCGTTGTGTGGGACGTG

 1741 CysProThrAspCysPheArgLysHisProAspAlaThrTyrSerArgCysGlySerGly
 TGCCCCACTGATTGCTTCCGCAAGCATCCGGACGCCACATACTCTCGGTCCGGCTCCGGT
 ACGGGGTGACTAACGAAGCGCTCGTAGGCCTGCGGTGTATGAGAGCCACGCCGAGGCCA

 Ile
 1801 ProTrpLeuThrProArgCysLeuValAspTyrProTyrArgLeuTrpHisTyrProCys
 CCTGGATCACACCCAGGTGCTTGGTCGACTACCCGTATAGGCTTTGGCATTTATCCTTGT
 GGGACCTAGTGTGGGTCCACGGACCCAGCTGATGGGCATATCCGAAACCGTAATAGGAACA

 1861 ThrIleAsnTyrThrIlePheLysIleArgMetTyrValGlyGlyValGluHisArgLeu
 ACCATCAACTACACCATATTAAATCAGGATGTACGTGGAGGGGTGAAACACACAGGCTG
 TGGTAGTTGATGTGGTATAAATTTAGTCTCTACATGCACCTCCCGAGCTTGTGTCCGAC

 1921 GluAlaAlaCysAsnTrpThrArgGlyGluArgCysAspLeuGluAspArgAspArgSer
 GAAGCTGCCCTGCCAACTGGACCGCGGGCGAACGTTGCGATCTGGAAGACAGGGACAGGTCC
 CTTCGACGGACGTTGACCTGGCGCCCCCGCTTGCAACGCTAGACCTTCTGTCCCTGTCCAGG

 1981 GluLeuSerProLeuLeuLeuThrThrThrGlnTrpGlnValLeuProCysSerPheThr
 GAGCTCAGCCCGTTACTGCTGACCCACTACACAGTGGCAGGTCTCCCGTGTCTCTTCACA
 CTCGAGTCGGGGCAATGACGACTGGTGATGTGTACCGCTCCAGGAGGGCACAGGAAGTGT

Fig. 18-6

2041	ThrLeuProAlaLeuSerThrGlyLeuIleHisLeuHisGlnAsnIleValAspValGln ACCTACCAGCCTTGTCACACGGCCTCATCCACCTCCACAGAACATTTGGACGTGCAG TGGGATGGTCGGAAACAGGTGGCCGGAGTAGGTGGAGGTGGTCTTGTAACACCTGCACGTC
2101	TyrLeuTyrGlyValGlySerSerIleAlaSerTrpAlaIleLysTrpGluTyrValVal TACTTGACGGGGTGGGTCAAGCATCGCGTCCTGGGCCATTAAGTGGAGTACGTCGTT ATGAACATGCCCCACCCAGTTCGTAGCGCAGGACCCGGTAATTCACCCCTCATGCAGCAA
2161	LeuLeuPheLeuLeuAlaAspAlaArgValCysSerCysLeuTrpMetMetLeuLeu CTCCTGTTCTCTGCTTGACAGACGGCGCGTCTGCTCTGCTGTGGATGATGCTACTC GAGGACAAGGAAGACGAAACCTCTGCGCGCGCAGACGAGGACGAACACCTACTACGATGAG
2221	IleSerGlnAlaGluAlaAlaLeuGluAsnLeuValIleLeuAsnAlaAlaSerLeuAla ATATCCCAAGCGGAGCGGCTTTGGAGAACCTCGTAATACTTAATGCAGCATCCCTGGCC TATAGGGTTCCGCTCCGCCGAAACCTCTTGGAGCATTAATGAATTACGTCGTAGGGACCGG
2281	GlyThrHisGlyLeuValSerPheLeuValPhePheCysPheAlaTrpTyrLeuLysGly GGGACGCACGGTCTTGATCCTTCCTCGTGTCTCTGCTTTCATGGTATTTGAAGGGT CCCTGCGTGCCAGAACATAGGAAGGAGCACACAAGACGAAACGTACCATATAAATTCCCA
2341	LysTrpValProGlyAlaValTyrThrPheTyrGlyMetTrpProLeuLeuLeuLeu AAGTGGGTGCCCGGAGCGGTCTACACCTTCTACGGGATGTGGCCTCTCCTCCTGCTCCTG TTCACCCACGGGCTCGCCAGATGTGGAAGATGCCCTACACCGGAGAGGAGGACGAGGAC

Fig. 18-7

2401 LeuAlaLeuProGlnArgAlaTyrAlaAlaLeuAspThrGluValAlaAlaSerCysGlyGly
 TTGGCGTTGCCCGAGCGGGCTACGCGCTGGACACGGAGGTGGCGCGTCTGTGTGGCGGT
 AACCGCAACGGGGTCGCCCGCATGCGCGACCTGTGCCCTCCACCGGCGCAGCACACCGCCA

 2461 ValValLeuValGlyLeuMetAlaLeuThrLeuSerProTyrTyrLysArgTyrIleSer
 GTTGTCTCTCGTCGGGTTGATGGCGCTGACTCTGTCAACATATTAAGAAGCGCTATATCAGC
 CAACAAGAGCAGCCCAACTACCGCGACTGAGACAGTGGTATAATGTTCGGCATATAGTCG

 2521 TrpCysLeuTrpTrpLeuGlnTyrPheLeuThrArgValGluAlaGlnLeuHisValTrp
 (Asn)
 TGGTGCTTGTGGTGGCTTCAGTATTTTCTGACCAGAGTGAAGCGCAACTGCACGTTGTGG
 ACCACGAACACACCCGAAGTCATAAAGACTGCTTCACCTTCGCGTTGAOGTGCACACC

 IleProProLeuAsnValArgGlyGlyArgAspAlaValIleLeuLeuMetCysAlaVal
 2581 ATTCCCCCCTCAACGTCCGAGGGGGCGCGACCGCTCATCTTACTCATGTGTGCTGTGA
 TAAGGGGGGAGTTGCAGGCTCCCCCGCGCTGCGGCGAGTAGAATGATACACACGACAT

 2641 HisProThrLeuValPheAspIleThrLysLeuLeuAlaValPheGlyProLeuTrp
 CACCCGACTCTGGTATTGACATCACCAAAATTGCTGCTGGCCGCTCTTCGGACCCCTTTGG
 GTGGGCTGAGACCATAAACTGTAGTGGTTTAACGACGACCGGCAGAACCTGGGGAACCC

 2701 IleLeuGlnAlaSerLeuLeuLysValProTyrPheValArgValGlnGlyLeuLeuArg
 ATTCTTCAAGCCAGTTTGCTTAAAGTACCTACTTTGTGGCGCTCCAGSCCTTCTCCGG
 TAAGAAGTTCGGTCAAAACGAATTTCATGGGATGAACACGCGCAGGTTCCGGGAAGAGGCC

Fig. 18-8

2761 PheCysAlaLeuAlaArgLysMetIleGlyGlyHisTyrValGlnMetValIleIleLys
 TTCTGCGGTTAGCGGGAAGATGATCGGAGGCCATTACGTGCAAAATGGTCATCATTAAG
 AAGACGGCAATCGCGCCTTCTACTAGCCTCCGGTAATGCACGTTTACCAGTAGTAATTC

 2821 LeuGlyAlaLeuThrGlyThrTyrValTyrAsnHisLeuThrProLeuArgAspTrpAla
 TTAGGGGCGCTTACTGGCACCTATGTTTATAACCATCTCACTCCTCTTCGGGACTGGCGG
 AATCCCCGGAATGACCGTGGATACAAATATTTGGTAGAGTAGGAGAGCCCTGACCCGC

 2881 HisAsnGlyLeuArgAspLeuAlaValAlaValGluProValValPheSerGlnMetGlu
 CACAACGGCTTGGAGATCTGGCCGTGGCTGTAGAGCCAGTCGTCTTCTCCCAAATGGAG
 GTGTTGCCGAACGCTCTAGACCGGCACCGACATCTCGGTGAGCAGAGAGGGTTTACCTC

 2941 ThrLysLeuIleThrTrpGlyAlaAspThrAlaAlaCysGlyAspIleIleAsnGlyLeu
 ACCAAGCTCATCACGTGGGGGCGAGATACCGCCGCGGTGCGGTGACATCATCAACGGCTTG
 TGGTTCGAGTAGTGACCCCCCGTCTATGGCGGCGCACGCCACTGTAGTAGTGTGCCGAAC

 3001 ProValSerAlaArgArgGlyArgGluIleLeuLeuGlyProAlaAspGlyMetValSer
 CCTGTTCGCGCCGCGAGGGCGGGAGATACGTCTCGGGCCAGCCGATGGAATGGTCTCC
 GGACAAAGGCGGGGTCCCCCGGCCCTCTATGACGAGCCCGGTCCGCTACCTTACCAGAGG

 3061 LysGlyTrpArgLeuLeuAlaProIleThrAlaTyrAlaGlnGlnThrArgGlyLeuLeu
 AAGGGGTGGAGGTGCTGGCGCCCATCACGGCGTACGCCCCAGCAGACAAAGGGCCTCCTA
 TTCCCCACCTCCAAACGACCGCGGTAGTGCCGCATGCGGGTCGTCTGTTCCTCCGGAGGAT

 3121 GlyCysIleIleThrSerLeuThrGlyArgAspLysAsnGlnValGluGlyGluValGln
 GGGTGCATAATCACCAAGCCTAACTGGCCGGGACAAACCAAGTGGAGGTGAGGTCCAG
 CCCACGTATTAGTGGTGGATTGACCGGCCCTGTTTGTGGTTTCACCTCCCACTCCAGGTC

Fig. 18-9

3181 IleValSerThrAlaAlaGlnThrPheLeuAlaThrCysIleAsnGlyValCysTrpThr
 ATTGTGTCAACTGCTGCCCAAACCTTCCTGGCAACGTGCATCAATGGGGTGTGCTGGACT
 TAACACAGTTGACGACGGGTTTGGAAGGACCGTTGACGTACGTAGTTACCCACACGACCTGA

 3241 ValTyrHisGlyAlaGlyThrArgThrIleAlaSerProLysGlyProValIleGlnMet
 GTCTACCAACGGGGCCGGAACGAGGACCATCGCGTCACCCAAAGGTCCTGTCTCATCCAGATG
 CAGATGGTGCCCGCCCTTGCTCCTGGTAGCGCAGTGGGTCCAGGACAGTAGGTCTTAC

 3301 TyrThrAsnValAspGlnAspLeuValGlyTyrProAlaProGlnGlySerArgSerLeu
 TATACCAATGTAGACCAAGACCTTGTGGCTGGCCCGCTCCGCAAGGTAGCCGCTCATTTG
 ATATGGTTACATCTGGTTCTGGAACACCCGACCGGGCGAGGCGTTCCATCGGGGAGTAAC

 3361 ThrProCysThrCysGlySerSerAspLeuTyrLeuValThrArgHisAlaAspValIle
 ACACCCCTGCACCTGCGGCTCCTCGGACCTTTACCTGGTCACGAGGCACGCCGATGTCTATT
 TGTGGGACGTGAACGCCGAGGAGCCCTGGAAATGGACCACTGCTCCGTGCGGCTACAGTAA

 3421 ProValArgArgGlyAspSerArgGlySerLeuLeuSerProArgProIleSerTyr
 CCCGTGCGCCGGGGGTGATAGCAGGGGCAGCCCTGCTGTGCCCCGCCCATTTCCCTAC
 GGGCACGGCGCGCCCCCACTATCGTCCCCGTGCGGACGACAGCGGGGCCGGTAAAGGATG

 3481 LeuLysGlySerSerGlyGlyProLeuLeuCysProAlaGlyHisAlaValGlyIlePhe
 TTGAAAGGCTCCTCGGGGGTCCGCTGTGTGCCCCCGGGGGCACGCCGTGGGCATATTT
 AACTTCCGAGGAGCCCCCAGGCGGACAAACAGGGGGCCCCCGTGGGCACCCCGTATAAA

 3541 ArgAlaAlaValCysThrArgGlyValAlaLysAlaValAspPheIleProValGluAsn
 AGGGCCCGGGTGTGCACCCGTGGAGTGGCTAAGGCGGTGACCTTTATCCCTGTGGAGAAC

Fig. 18-10

TCCCGGGCCACACGTGGGCACCTCACCGATTCCGCCACCTGAATAAGGACACCTCTTG
 LeuGluThrThrMetArgSerProValPheThrAspAsnSerSerProProValValPro
 CTAGAGACAACCATGAGGTCCCGGTGTTCAAGGATAACTCCTCTCCACCATAGTACCC
 GATCTCTGTTGGTACTCCAGGGGCCACAAGTGCCTATTGAGGAGAGGTGGTCAATCACGGG
 3601
 GlnSerPheGlnValAlaHisLeuHisAlaProThrGlySerGlyLysSerThrLysVal
 CAGAGCTTCCAGGTGGCTCACCTCCATGCTCCACAGGCAGCGGCAAAAGCACCAAGGTC
 GTCTCGAAGGTCCACCGAGTGGAGTACGAGGGTGTCGTCGCCGTTTTCGTGTTCCAG
 3661
 ProAlaAlaTyrAlaAlaGlnGlyTyrLysValLeuValLeuAsnProSerValAlaAla
 CCGGCTGCATATGCAGCTCAGGGCTATAAGGTGCTAGTACTCAACCCCTCTGTGCTGCA
 GGCCGACGTATACGTCGAGTCCCGATATCCACGATCATGAGTTGGGGAGACAAACGACGT
 3721
 ThrLeuGlyPheGlyAlaTyrMetSerLysAlaHisGlyIleAspProAsnIleArgThr
 ACACGTGGCTTTGGTGCTTACATGTCCAAGGCTCATGGGATCGATCCTAACATCAGGACC
 TGTGACCCGAAACCAACGAATGTACAGGTTCCGAGTACCCCTAGCTAGGATTGTAGTCTCTGG
 3781
 GlyValArgThrIleThrThrGlySerProIleThrTyrSerThrTyrGlyLysPheLeu
 GGGGTGAGAACAAATTACCACCTGGCAGCCCCCATCACGTACTCCACCTACGGCAAGTTCCTT
 CCCCACTCTTGTTAATGGTGACCGTCGGGGTAGTGCAATGAGGTGGATGCCGTTCAAGGAA
 3841
 AlaAspGlyGlyCysSerGlyGlyAlaTyrAspIleIleIleCysAspGluCysHisSer
 GCCGACGGCGGTGCTCGGGGGCGCTTATGACATAATAATTGTGACGAGTGCCACTCC
 CGGCTGCCGCCACGAGCCCCCGCGGAATACTGTATTATTAAACACTGCTCACGGTGAGG
 3901

Fig. 18-11

(Val)

3961	ThrAspAlaThrSerIleLeuGlyIleGlyThrValLeuAspGlnAlaGluThrAlaGly ACGGATGCCACATCCATCTTGGGCATCGGCACCTGCTTGCACCAAGCAGACACTGCGGG TGCCCTACGGTGTAGTAGAACCCGTAGCCGTGACAGGAACCTGGTTTCGTCTCTGACGCCCC
4021	AlaArgLeuValValLeuAlaThrAlaThrProProGlySerValThrValProHisPro GCGAGACTGGTTGTGCTCGCCACCGCCACCCCTCCGGCTCCGTCACTGTGCCCCCATCCC CGCTCTGACCAACACGAGCGGTGGCGGTGGGAGGCCCGAGGCAGTGACACACGGGGTAGGG
4081	AsnIleGluGluValAlaLeuSerThrThrGlyGluIleProPheTyrglyLysAlaIle AACATCGAGGAGGTGCTCTGTCTCCACCACCGGAGAGATCCCTTTTACGGCAAGGCTATC TTGTAGCTCCTCCAACGAGACAGGTGGTGGCCTCTCTAGGGAAAAATGCCGTTCGGATAG
4141	ProLeuGluValIleLysGlyGlyArgHisLeuIlePheCysHisSerLysLysLysCys CCCCTCGAAGTAATCAAGGGGGGAGACATCTCATCTTCTGTCAATCAAGAAGAAGTGC GGGGAGCTTCATTAGTTCCCCCCTCTCTGTAGAGTAGAAGACAGTAAGTTCTTCTTCACG
4201	AspGluLeuAlaAlaLysLeuValAlaLeuGlyIleAsnAlaValAlaTyrTyrArgGly GACGAACCTGCCCGCAAAGCTGGTCGCATTTGGCATCAATGCCGTGGCTACTACCGCGGT CTGCTTGAGCGCGGTTTCGACCAAGCGTAACCCGTAGTTACGGCACCCGGATGATGGCGCCA
4261	LeuAspValSerValIleProThrSerGlyAspValValValAlaThrAspAlaLeu CTTGACGTGTCCGTCAATCCGACCAAGCGCGGATGTTGTGTCGTGGCAACCGATGCCCTC GAACTGCACAGGCAGTAGGGCTGGTGGCCGCTACAAACAGCAGCACCGTTGGCTACGGGAG

Fig. 18-12

		Tyr
4321	MetThrGlyTyrThrGlyAspPheAspSerValIleAspCysAsnThrCysValThrGln ATGACCGGCTATACCGGCACTTCGACTCGGTGATAGACTGCAATACGTGTGTACCCAG TACTGGCCGATATGGCCGCTGAAGCTGAGCCACTATCTGACGTTATGCACACAGTGGGTC	
4381	ThrValAspPheSerLeuAspProThrPheThrIleGluThrIleThrLeuProGlnAsp ACAGTCGATTTCAGCCCTTGACCCCTACCTTCACCATTGAGACAAATCACGCTCCCCAGGAT TGTCAAGCTAAAGTCGGAACTGGGATGGAAGTGTAACTCTGTAGTGGAGGGGTCCCTA	(Ser)
4441	AlaValSerArgThrGlnArgGlyArgThrGlyArgGlyLysProGlyIleTyrArg GCTGTCTCCCGCACTCAACGTCGGGGCAGGACTGGCAGGGGGAAGCCAGGCATCTACAGA CGACAGAGGGCGTGAGTTGCAGCCCCGTCCTGACCGTCCCCCTTCGGTCCGTAGATGTCT	
4501	PheValAlaProGlyGluArgProSerGlyMetPheAspSerSerValLeuCysGluCys TTTGTGGCACCGGGGAGCGCCCTCCGGCATGTTCGACTCGTCCGTCTCTGTGAGTGC AAACACCGTGGCCCCCTCGCGGGGAGCGGTACAAGCTGAGCAGGAGGAGACACTCACG	
4561	TyrAspAlaGlyCysAlaTrpTyrGluLeuThrProAlaGluThrThrValArgLeuArg TATGACGCAGGCTGTGCTTGGTATGAGCTCACGCCCGCGAGACTACAGTTAGGCTACGA ATACTGCGTCCGACACGAACCATACTCGAGTGGGGGCTCTGTATGTCAATCCGATGCT	
4621	AlaTyrMetAsnThrProGlyLeuProValCysGlnAspHisLeuGluPheTrpGluGly GCGTACATGAACACACCCCGGGGCTTCCCGTGTGCCAGGACCATCTTGAATTTTGGGAGGGC CGCATGTACTTGTGGGGCCCCGAAGGGCACACGGTCTCTGTGTAGAACTTAAACCCCTCCCG	
4681	ValPheThrGlyLeuThrHisIleAspAlaHisPheLeuSerGlnThrLysGlnSerGly GTCCTTTACAGGCCCTCACTCATATAGATGCCCACTTCTATCCCCAGACAAAGCAGAGTGGG CAGAAATGTCCGGAGTGAGTATATCTACGGGTGAAGAATAGGGTCTGTTCGTCTCACCC	

Fig. 18-13

4741	GluAsnLeuProTyrLeuValAlaTyrGlnAlaThrValCysAlaArgAlaGlnAlaPro GAGAACCTTCCTTACCTGGTAGCGTACCAAGCCACCGTGTGCGCTAGGGCTCAAGCCCT CTCTTGGAAGGAATGGACCATCGCATGGTTCCGTGGCACACGCGATCCCGAGTTCCGGGA
4801	ProProSerTrpAspGlnMetTrpLysCysLeuIleArgLeuLysProThrLeuHisGly CCCCCATCGTGGGACCAGATGTGGAAGTGTGATTGCTCGCTCAAGCCACCTCCATGGG GGGGTAGCACCCCTGGTCTACACCTTCAAACTAAGCGGAGTTCGGGTGGGAGGTACCC
4861	ProThrProLeuLeuTyrArgLeuGlyAlaValGlnAsnGluIleThrLeuThrHisPro CCAAACACCCCTGCTATACAGACTGGCGCTGTTTCAAGATGAATCACCTGACGCCACCA GGTTGTGGGACGATATGTCGTGACCCCGGACAAAGTCTTACTTTAGTGGGACTGCCGTGGT
4921	ValThrLysTyrIleMetThrCysMetSerAlaAspLeuGluValThrSerThrTrp GTCACCAATAATACATCATGACATGTCGCGGACCTGGAGGTCTCAGAGCACCTGG CAGTGGTTTATGTAGTACTGTACGTACAGCCGCGCTGGACCTCCAGCAGTGTCTCGTGACC
4981	ValLeuValGlyGlyValLeuAlaAlaLeuAlaAlaTyrCysLeuSerThrGlyCysVal GTGCTCGTTGGCGGCGTCTGCTGGCTGCTTTGGCCGCGTATGCTCTCAACAGGCTCGTG CACGAGCAACCGCCGACGACCGACGAAACCGGCGCATAACGGACAGTTGTCCGACGCAC
5041	ValIleValGlyArgValValLeuSerGlyLysProAlaIleIleProAspArgGluVal GTATAGTGGGACGGTCTCTTGTCCGGGAAGCCGGCAATCATACCTGACAGGGAAGTC CAGTATCACCCGTCCAGCAGAACAGGCCCTTCGGCCGTTAGTATGGACTGTCCCTTCAG
5101	LeuTyrArgGluPheAspGluMetGluGluCysSerGlnHisLeuProTyrIleGluGln CTCTACCGAGAGTTCGATGAGATGGAAGAGTCTCTCAGCACTTACCGTACATCGAGCAA GAGATGGCTCTCAAGCTACTCTACTCTCTCAGCAGAGTCTGTAATGGCATGTAGCTCGTT

Fig. 18-14

5161 GlyMetMetLeuAlaGluGlnPheLysGlnLysAlaLeuGlyLeuLeuGlnThrAlaSer
GGGATGATGCTCGCCGAGCAGTTCAAGCAGAGAGCCCTCGSCCTCCTGCAGACCCGGCTCC
CCCTACTACGAGCGGCTCGTCAAGTTCGTCCTCCGGGAGCCGGAGGACGTCTGGCGCAGG

5221 ArgGlnAlaGluValIleAlaProAlaValGlnThrAsnTrpGlnLysLeuGluThrPhe
CGTCAGGCAGAGGTTATCGCCCTGCTGTCAGACCAACTGGCAAAACTCGAGACCTTC
GCAGTCCGTCTCCAAATAGCGGGGACGACAGGTCGTGGTTGACCGTTTTTGAGCTCTGGAAG

5281 TrpAlaLysHisMetTrpAsnPheIleSerGlyIleGlnTyrLeuAlaGlyLeuSerThr
TGGCGGAAGCATATGTGGAACCTTCATTCATGATGGCTTTACAGCTGCTGTCAACGCAACG
ACCGCTTCGTATACACCTTGAAGTAGTCACCCCTATGTATGAACCGCCCGAACAGTTGC

5341 LeuProGlyAsnProAlaIleAlaSerLeuMetAlaPheThrAlaAlaValThrSerPro
CTGCCTGGTAACCCCGCCATTCCTTCATTCATGATGGCTTTACAGCTGCTGTCAACGCCCA
GACGGACCATTGGGGGGTAACGAAGTAACCTACCGAAATGTTCGACGACAGTGGTGGGT

5401 LeuThrThrSerGlnThrLeuLeuPheAsnIleLeuGlyGlyTrpValAlaAlaGlnLeu
CTAACCACTAGCCAAACCCCTCCTCTTCAACATATTGGGGGGTGGTGGCTGCCAGCTC
GATTGGTGATCGGTTTGGGAGGAGAAGTTGTATAACCCCCCAACCCACCGGTCGAG

5461 AlaAlaProGlyAlaAlaThrAlaPheValGlyAlaGlyLeuAlaGlyAlaAlaIleGly
GCCGCCCCCGGTGCCGTACTGCTTTGTGGGCGCTGGCTTAGCTGGGCGCCGCTCGGC
CGCGGGGGCCACGGCGATGACGGAAACACCCCGGACCCGAATCGACCCGCGGTAGCCG

Fig. 18-15

5521 SerValGlyLeuGlyLysValLeuIleAspIleLeuAlaGlyTyrGlyAlaGlyValAla
 AGTGTGGACTGGGAAGTCTCTCATAGACATCCTTGCAGGGTATGGCGCGCGGTGGCG
 TCACAACTGACCCCTCCAGGAGTATCTGTAGGAACGTCCCATACCGCGCCCGCACCGC

 5581 GlyAlaLeuValAlaPheLysIleMetSerGlyGluValProSerThrGluAspLeuVal
 GGAGCTCTTGTGGCATTCAAGATCATGAGCGGTGAGGTCCCTCCACGGAGGACCTGGTC
 CCTCGAGAACACCGTAAGTTCTAGTACTCGCCACTCCAGGGGAGGTGCCCTCCTGGACCCAG
 (Gly)

 5641 AsnLeuLeuProAlaIleLeuSerProGlyAlaLeuValvalGlyValValCysAlaAla
 AATCTACTGCCCCCATCTCTCGCCCGGAGCCCTCGTAGTCGGCGTGTGTGCAGCA
 TTAGATGACGGCGGTAGGAGAGCGGCCCTCGGGAGCATCAGCCGCCACAGACACGTCTGT

 5701 IleLeuArgArgHisValGlyProGlyGluGlyAlaValGlnTrpMetAsnArgLeuIle
 ATACTGCGCCGGCACGTTGGCCCGGGGAGGGGAGTGCAGTGGATGAACCGGCTGATA
 TATGACGCGGCCGTGCAACCGGCCCGCTCCCGCTCACGTCACTACTTGGCCCGACTAT

 5761 AlaPheAlaSerArgGlyAsnHisValSerProThrHisTyrValProGluSerAspAla
 GCCTTCCGCTCCCGGGGAACCATGTTTCCCGCCACGCACTACGTGCCGGAGAGCGATGCA
 CGGAAGCGGAGGGCCCCCTTGGTACAAAGGGGGTGGTGATGCCACGGCCCTCTCGCTACGT
 (HisCys)

 5821 AlaAlaArgValThrAlaIleLeuSerSerLeuThrValThrGlnLeuLeuArgArgLeu
 GCTGCCCGCGTCACTGCCATATCAGCAGCCTCACTGTAAACCCAGCTCCTGAGGCGACTG
 CGACGGGCGCAGTGACGGTATGATCGTCCGGAGTGACATTGGGTCCGAGGACTCCGCTGAC

Fig. 18-16

5881 HisGlnTrpIleSerSerGluCysThrThrProCysSerGlySerTrpLeuArgAspIle
 CACCACTGGATAAGCTCGGAGTGTACCACTCCATGCTCCGGTTCCTGGCTAAGGGACATC
 GTGGTCACCTATTTCGAGCCTCACATGGTGAGTACGAGGCCCAAGGACCGATTCCTGTAG

 5941 TrpAspTrpIleCysGluValLeuSerAspPheLysThrTrpLeuLysAlaLysLeuMet
 TGGGACTGGATATGCGAGGTGTGAGCGACTTTAAGACCTGGCTAAAGCTAAGCTCATG
 ACCCTGACCTATACGCTCCACAACTCGCTGAAATTCGGACCGATTTTCGATTTCGAGTAC

 6001 ProGlnLeuProGlyIleProPheValSerCysGlnArgGlyTyrLysGlyValTrpArg
 CCACAGCTGCCCTGGGATCCCCTTTGTGTCTCTGCCAGCGCGGTATAGGGGGTCTGGCGA
 GGTGTGACGACCGACCCCTAGGGGAAACACAGGACGGTCCGCCCATATATCCCCCAGACCGCT
 (Val)
 6061 GlyAspGlyIleMetHisThrArgCysHisCysGlyAlaGluIleThrGlyHisValLys
 GTGGACGGCATCATGCACACTCGCTGCCACTGTGGAGCTGAGATCACTGGACATGTCAAA
 CACCTGCCGTAGTACGTGTGAGCGACGGTGACACCTCGACTCTAGTACCTGTACAGTTT

 6121 AsnGlyThrMetArgIleValGlyProArgThrCysArgAsnMetTrpSerGlyThrPhe
 AACGGGACGATGAGGATCGTCGGTCCCTAGGACCTGCAGGAACATGTGGAGTGGACCTTC
 TTGCCCTGCTACTCCTAGCAGCCAGGATCCTGGACGTCCTTGTACACCTCACCCCTGGAAG

 6181 ProIleAsnAlaTyrThrThrGlyProCysThrProLeuProAlaProAsnTyrThrPhe
 CCCATTATGCCTACACCACGGGCCCCCTGTACCCCCCTTCTGCGCCGAACTACACGTTTC
 GGGTAATTACGGATGTGGTCCCCCGGGGACATGGGGGGAAGGACGCGGCTTGATGTGCAAG

Fig. 18-17

6241 AlaLeuTrpArgValSerAlaGluGluTyrValGluIleArgGlnValGlyAspPheHis
 GCGCTATGGAGGGTGTCTGCAGAGGAATATGTGGAGATAAGGAGGTGGGGACTTCCAC
 CGGATACCTCCACAGACGTCTCTTATACACCTCTATTCCGTCCACCCCTGAAGGTG
 6301 TyrValThrGlyMetThrThrAspAsnLeuLysCysProCysGlnValProSerProGlu
 TACGTGACGGGTATGACTACTGACAAATCTCAATGCCGTGCCAGGTCCCATCGCCCGAA
 ATGCACCTGCCCATACTGATGACTGTAGAGTTTACGGGCACGGTCCAGGGTAGCGGGCTT
 6361 PhePheThrGluLeuAspGlyValArgLeuHisArgPheAlaProProCysLysProLeu
 TTTTTCACAGAAATTGGACGGGTGCGCCTACATAGGTTTGGCCCCCTGCAAGCCCTTG
 AAAAGTGTCTTAA CCTGCCCCACGGCGATGTATCCAAACGGGGGGACGTTTCGGGAAC
 6421 LeuArgGluGluValSerPheArgValGlyLeuHisGluTyrProValGlySerGlnLeu
 CTGCGGGAGGAGGTATCATTCAGAGTAGGACTCCACGAATACCCGGTAGGGTCGCAATT
 GACGCCCTCTCCATAGTAAGTCTCATCTGAGGTGCTTATGGCCCATCCCAGCGTTAAT
 6481 ProCysGluProGluProAspValAlaValLeuThrSerMetLeuThrAspProSerHis
 CCTTGGAGCCCCGAACCGGACGTGGCCGTGTGACGTCCATGCTCACTGATCCCTCCCAT
 GGAAACGCTCGGGCTTGGCCCTGCACCGGCACAACTGCAGGTACGAGTACTAGGGAGGTA
 6541 IleThrAlaGluAlaAlaGlyArgArgLeuAlaArgGlySerProProSerValAlaSer
 ATAAACAGCAGAGGCGCGCGGCGAAGGTGGCGAGGGGATCACCCCCCTCTGTGGCCAGC
 TATTGTCTCTCCGCGCGCCCGCTTCCAAACCGCTCCCCCTAGTGGGGGAGACACCGGTG

Fig. 18-18

6601 SerSerAlaSerGlnLeuSerAlaProSerLeuLysAlaThrCysThrAlaAsnHisAsp
 TCCTCGGCTAGCCAGCTATCCGCTCCATCTCTCAAGCAACTGCAACCGCTAACCATGAC
 AGGAGCCGATCGGTCGATAGCGGAGGTAGAGAGTTCCGTTGAAACGTGGCGATTGGTACTG

 6661 SerProAspAlaGluLeuIleGluAlaAsnLeuTrpArgGlnGluMetGlyGlyAsn
 TCCCCGTGATGCTGAGCTCATAGAGGCCAACCTCCTATGGAGGCAGGAGATGGGCGGCAAC
 AGGGGACTACGACTCGAGTATCTCCGGTTGGAGGATACCTCCGTCTCTACCCGCCGTG

 6721 IleThrArgValGluSerGluAsnLysValValIleLeuAspSerPheAspProLeuVal
 ATCACCCAGGGTTGAGTCAGAAACAAAGTGTGATCTCTGGACTCCTTCGATCCGCTTGTG
 TAGTGGTCCCAACTCAGTCTTTTGTTCACCACTAAGACCTGAGGAAGCTAGGCGCAACAC

 6781 AlaGluGluAspGluArgGluIleSerValProAlaGluIleLeuArgLysSerArgArg
 GCGGAGGAGGACGAGCGGGAGATCTCCGTACCCCGCAGAAATCCTGCGGAAGTCTCGGAGA
 CGCCTCCTCTGCTGCTGCCCTCTAGAGGCATGGGCGTCTTTAGGACGCCCTTCAGAGCCCTCT

 6841 PheAlaGlnAlaLeuProValTrpAlaArgProAspTyrAsnProProLeuValGluThr
 TTCGCCCAGGCCCTGCCGTTTGGCGCGGCCGCGACTATAACCCCGCTAGTGGAGACG
 AAGCGGTCCGGGACGGGCAACCCCGCGCCCTGATATGGGGGCGGATCACCTCTGC

 6901 TrpLysLysProAspTyrGluProProValValHisGlyCysProLeuProProProLys
 TGGAAAAAGCCCGACTACGAACCACTGTGTGTCCTATGGCTGTCCGCTTCCACCTCCAAAG
 ACCTTTTCGGGCTGATGCTTGGTGGACACCAAGTACCGACAGGCGAAGGTGGAGTTTC

 6961 SerProProValProProArgLysLysArgThrValValLeuThrGluSerThrLeu
 TCCCCCTCCTGTGCTCCGCCCTCGGAAGAAGCGGACGGTGGTCTCTCAGTGAATCAACCCCTA
 AGGGGAGGACACGAGGCGGAGCCCTCTTCGCCCTGCCACCAAGGAGTGACTTAGTTGGGAT

Fig. 18-19

7021 SerThrAlaLeuAlaGluLeuAlaThrArgSerPheGlySerSerSerThrSerGlyIle
 TCTACTGCTTGGCCGAGCTGCCACCAAGCTTTGGCAGCTCCTCAACTTCGGCATT
 AGATGACGGAAACCGCTCGAGCGGTGCTTCGAAACCGTCGAGGAGTTGAAGGCCGTAA
 (Ser)
 7081 ThrGlyAspAsnThrThrSerSerGluProAlaProSerGlyCysProProAspSer
 ACGGCGACAAATACGACAAATCTCTGAGCCCGCCCTCTGGCTGCCCGGACTCC
 TGCCCGCTGTTATGCTGTGTAGGAGACTCGGGGGGGAAGACCGACGGGGGGCTGAGG
 (PheAla)
 7141 AspAlaGluSerTyrSerSerMetProProLeuGluGlyGluProGlyAspProAspLeu
 GACGCTGAGTCCCTATTCCTCCATGCCCCCTCTGGAGGGGAGCCCTGGGATCCGGATCTT
 CTGCGACTCAGGATAAGGAGGTACGGGGGGGACCTCCCCCTCGGACCCCTAGGCCCTAGAA
 SerAspGlySerTrpSerThrValSerSerGluAlaAsnAlaGluAspValValCysCys
 AGCGACGGGTCAATGGTCAACGGTCAGTAGTAGGCCAACCGCGGAGGATGTCGTGTGCTGC
 TCGCTGCCCAGTACCAGTTGCCAGTCACTCCGGTTGCGCTTCTACAGCACACGACG
 SerMetSerTyrSerTrpThrGlyAlaLeuValThrProCysAlaAlaGluGluGlnLys
 TCAATGCTTACTCTTGGACAGGGCGCACTCGTCACTCCCGTGGCCCGGGAAGAACAGAAA
 AGTTACAGAAATGAGAACCTGTCCGGGTGAGCAGTGGGGCACCGCGGCCCTTCTGTCTTT
 7261 LeuProIleAsnAlaLeuSerAsnSerLeuLeuArgHisHisAsnLeuValTyrSerThr
 CTGCCCCATCAATGCACATAAGCAACTCGTTGCTACGTACCAACAATTTGGTGTATTCACCC
 GACGGGTAGTTACGTGATTCTGTGAGCAACGATGCAGTGGTGTAAACCAACATAAGGTGG
 7321 ThrSerArgSerAlaCysGlnArgGlnLysLysValThrPheAspArgLeuGlnValLeu

Fig. 18-20

7381 ACCTCAGCAGTGCTTGCCAAAGGCGAGAAAGTCACATTGACAGACTGCAAGTTCTG
 TGGAGTGGTCAACGAACGGTTTCCGTCTTCTTTCAGTGTAAACTGTCTGACGTTCAAGAC

 7441 AspSerHisTyrGlnAspValLeuLysGluValLysAlaAlaSerLysValLysAla
 GACAGCCATTACAGGACGTACTCAAGGAGGTTAAAGCAGCGCGTCAAAAGTGAAGGCT
 CTGTCGGTAATGGTCCCTGCATGAGTTCTCTCCAAATTTCGTGCGCCGACGTTTTCACCTCCGA

 (Phe)
 7501 AsnLeuLeuSerValGluAlaCysSerLeuThrProProHisSerAlaLysSerLys
 AACTTGCTATCCGTAGAGGAAGCTTGCAGCCTGACGCCCCACACTCAGCCAAATCCAAG
 TTGAACGATAGGCATCTCCTTCGAACGTCGGACTGCGGGGTGTGAGTCGGTTTAGGTTTC

 7561 PheGlyTyrGlyAlaLysAspValArgCysHisAlaArgLysAlaValThrHisIleAsn
 TTTGGTTATGGGGCAAAAGACGTCCGTTGCCATGCCAGAAAGCCGTAAACCCACATCAAC
 AAACCAATACCCCGTTTCTCTGCAGGCAACGGTACGGTCTTTCCGGCATTGGGTGTAGTTG

 7621 SerValTrpLysAspLeuLeuGluAspAsnValThrProIleAspThrThrIleMetAla
 TCCGTGTGGAAAGACCTTCTGGAGACAAATGTAACACCAATAGACACTACCATCATGGCT
 AGGCACACCTTTCTGGAAAGACCTTCTGTGTACATTGTGGTTATCTGTGATGGTAGTACCGA

 7681 LysAsnGluValPheCysValGlnProGluLysGlyArgLysProAlaArgLeuIle
 AAGAACGAGGTTTCTGCGTTACGCCCTGAGAGGGGGTCTGTAAGCCAGCTCGTCTCATC
 TTCTTGCTCCAAAGACGCAAGTCGGACTCTTCCCCCAGCATTCCGGTCGAGCAGAGTAG

 7741 ValPheProAspLeuGlyValArgValCysGluLysMetAlaLeuTyrAspValValThr
 GTGTTCCCCGATCTGGGCGTGGCGTGTGCGAAAGATGGCTTTGTACGACGTGGTTACA
 CACAAGGGGCTAGACCCCGCACGGCGCACACGCTTTTCTACCGAAACATGCTGCCACCAATGT

Fig. 18-21

7801	LysLeuProLeuAlaValMetGlySerSerTyrGlyPheGlnTyrSerProGlyGlnArg AAGCTCCCTTGGCCGTGATGGGAAGCTCCTACGGATTCCAATACTACACGAGACAGCGG TTCCAGGGGAACCGGCACCTACCCCTTCGAGGATGCCCTAAGTTATGAGTGGTCTCTGTGCGCC
7861	ValGluPheLeuValGlnAlaTrpLysSerLysLysThrProMetGlyPheSerTyrAsp GTTGAATTCTCTCGTGCAAGCGTGGAAGTCCAAGAAACCCCAATGGGGTTCTCGTATGAT CAACTAAGGAGCACGTTCCGACCTTCAGGTTCCTTTGGGGTTACCCCAAGAGCATACTA
7921	ThrArgCysPheAspSerThrValThrGluSerAspIleArgThrGluAlaIleTyr ACCCGCTGCTTTGACTCCACAGTCACTGAGAGCGACATCCGTACGGAGGAGGCAATCTAC TGGGCGACGAAACTGAGGTGTCAGTGACTCTCGCTGTAGGCATGCCCTCCTCCGTTAGATG
7981	GlnCysCysAspLeuAspProGlnAlaArgValAlaIleLysSerLeuThrGluArgLeu CAATGTTGTGACCTCGACCCCCCAAGCCCGGTGGCCATCAAGTCCCTCACCGAGAGGCTT GTTACAACACTGGAGCTGGGGGTTCGGGGCGCACCGGTTAGTTTCAGGGAGTGGCTCTCCGAA
8041	TyrValGlyGlyProLeuThrAsnSerArgGlyGluAsnCysGlyTyrArgArgCysArg TATGTTGGGGCCCTCTTACCAATTCAAGGGGGAGAACTCGCGCTATCGCAGGTGCCGC ATACAACCCCGGGAGAAATGGTTAAGTTCCCCCTCTTTGACGCCGATAGCGTCCACGGCG
8101	AlaSerGlyValLeuThrThrSerCysGlyAsnThrLeuThrCysTyrIleLysAlaArg GCGAGCGCGTACTGACAACATAGCTGTGGTAACACCCCTCACTTGTACATCAAGGCCCGG CGCTCGCCGCATGACTGTTGATCGACACCATTTGTGGGAGTGAACGATGTAGTTCCGGGGCC

Fig. 18-22

8161 AlaAlaCysArgAlaAlaGlyLeuGlnAspCysThrMetLeuValCysGlyAspAspLeu
 GCAGCCTGTCGAGCCGCAGGGCTCCAGGACTGCACCATGCTCCTGTGTGGCGACGACTTA
 CGTCGGACAGCTCGGCGTCCCGAGGTCTGACGTGTAACGACACACACCGCTGCTGAAT

 8221 ValValIleCysGluSerAlaGlyValGlnGluAspAlaAlaSerLeuArgAlaPheThr
 GTCGTTATCTGTGAAAGCGGGGTCCAGGAGGACGCGGCGAGCCTGAGAGCCTTTCACG
 CAGCAATAGACACTTTCGGGCCCCCGAGGTCTCTCTGGCCGCTCGGACTCTCTCGGAAGTGC

 8281 GluAlaMetThrArgTyrSerAlaProProGlyAspProProGlnProGluTyrAspLeu
 GAGGCTATGACCAAGTACTCCGCCCCCTGGGGACCCCCACACACAGAAATACGACTTG
 CTCCGATACTGGTCCATGAGGCGGGGGGACCCCTGGGGGTGTGTGCTTATGCTGAAC

 GluLeuIleThrSerCysSerSerAsnValSerValAlaHisAspGlyAlaGlyLysArg

 8341 GAGCTCATAACATCATGCTCCTCCAACGTGTCTAGTCCGCCACGACGGCGTGGAAAGAGG
 CTCGAGTATTGTAGTACGAGGAGGTGACAGTACAGCGGGGTGTGCGGACCTTCTCTCC

 8401 ValTyrTyrLeuThrArgAspProThrThrProLeuAlaArgAlaAlaTrpGluThrAla
 GTCTACTACCTCACCCGTGACCCCTACAAACCCCTCGGAGAGCTGCGTGGGAGACAGCA
 CAGATGATGGAGTGGGCACTGGGATGTTGGGGGAGCGCTCTCGACGCACCCCTCTGTCTGT

 8461 ArgHisThrProValAsnSerTrpLeuGlyAsnIleIleMetPheAlaProThrLeuTrp
 AGACACACTCCAGTCAATTCTGGCTAGGCAACATAATCATGTTGCCCCACACACTGTGG
 TCTGTGTGAGGTCAGTTAAGGACCGATCCGTTGTATTAGTACAAACGGGGGTGTGACACC

Fig. 18-23

8521 AlaArgMetIleLeuMetThrHisPhePheSerValLeuIleAlaArgAspGlnLeuGlu
 GCGAGGATGATAGTACCCCAATTCCTTAGCGTCCTTATAGCCAGGACCAGCTTGAA
 CGCTCCTACTATGACTACTGGGTAAAGAAATCGCAGGAATATCGGTCCCTGGTCGAACCT

 8581 GlnAlaLeuAspCysGluIleTyrGlyAlaCysTyrSerIleGluProLeuAspLeuPro
 CAGGCCCTCGATTGCGAGATCTACGGGCCCTGCTACTCCATAGAACCACTTGATCTACCT
 GTCCGGGAGCTAACGCTCTAGATGCCCCCGGACGATGAGGTATCTTGGTGAACCTAGATGGA

 8641 ProIleIleGlnArgLeuHisGlyLeuSerAlaPheSerLeuHisSerTyrSerProGly
 CCAATCATTTCAAAGACTCCATGGCCTCAGCGCATTTTCACTCCACAGTTACTCTCCAGGT
 GGTTAGTAAGTTTCTGAGGTACCGGAGTCGCGTAAAGTCAAGGTGTCAATGAGAGGTCCA

 8701 GluIleAsnArgValAlaAlaCysLeuArgLysLeuGlyValProProLeuArgAlaTrp
 GAAATTAAATAGGGTGGCCGCGCATGCCCTCAGAAAACTTGGGGTACCGCCCTTCCGAGCTTGG
 CTTTAATTATCCCAACCGGCGTACGGAGTCTTTTGAACCCCATGGCGGGAAACGCTCGAACC

 Gly
 8761 ArgHisArgAlaArgSerValArgAlaArgLeuLeuAlaArgGlyGlyArgAlaAlaIle
 AGACACCGGGCCCCGAGCGTCCGCGCTAGGCTTCTGGCCAGAGGAGGCGAGGGCTGCCATA
 TCTGTGGCCCCGGGCTCGCAGGCGCGGATCCGGAAGACCGGTCTCCTCCGTCGACGGTAT

 8821 CysGlyLysTyrLeuPheAsnTrpAlaValArgThrLysLeuLysLeuThrProIleAla
 TGTGGCAAGTACCTCTTCAACTGGGCAGTAAGAACAAAGCTCAAACTCACTCCAATAGCG
 ACACCGTTTCATGGAGAAAGTTGACCCGTCATTTCTTGTTCGAGTTTGAGTGAGGTTATCGC

Fig. 18-24

8881 AlaAlaGlyGlnLeuAspLeuSerGlyTrpPheThrAlaGlyTyrSerGlyGlyAspIle
GCCGCTGGCCAGCTGGACTGTCCGGCTGGTTACGGCTGGCTACAGCGGGGAGACATT
CGGCGACCGGTGACCTGAACAGACAGGCCGACCAAGTGCACCGATGTGCCCCCTCTGTAA

8941 TyrHisSerValSerHisAlaArgProArgTrpIleTrpPheCysLeuLeuLeuAla
(Pro)
TATCACAGCGTGTCTCATGCCCCGGCCCCGCTGGATCTGGTTTGGCTACTCCTGCTTGCT
ATAGTGTCCACACAGAGTACGGGCGGGGGGACCTAGACCAAAACGGATGAGGACGAACGA

9001 AlaGlyValGlyIleTyrLeuLeuProAsnArgOP
GCAGGGGTAGGCATCTACCTCTCCCCAACCGATGAAGGTGGGGTAAACACTCCGGCCT
CGTCCCCCATCCGTAGATGGAGGAGGGGTGGCTACTTCCAAACCCCATTTGTGAGGCCGGA

Fig. 18-25

:42.16.XT1
GGTAGGGTCAAGGCTGAAATCGACTGTCTGCTTCTTTGGAGAAAGTGGTG

:42.17.XT1
ATCCTGGGGGAGCGTGATTGTCTCAATGGTCTTCTTTGGAGAAAGTGGTG

:42.18.XT1
AGTCTGCCCCGACGTTGAGTGCGGGAGACCTTCTTTGGAGAAAGTGGTG

:42.19.XT1
CACAAATCTGTAGATGCCTGGCTTCCCCCTCTTCTTTGGAGAAAGTGGTG

:42.20.XT1
GTCGAACATGCCGGAGGGGCGCTCCCCGGGCTTCTTTGGAGAAAGTGGTG

:42.21.LLA2C
GCCTGCGTCATAGCACTCACAGAGGACGGATTAGGCATAGGACCCGTGTC

:42.22.LLA2C
AGTCTCGGGGGCGTGAGCTCATACCAAGCTTAGGCATAGGACCCGTGTC

:42.23.LLA2C
CGGGGTGTTTCATGTAAGCTCGTAGCCTAACTTAGGCATAGGACCCGTGTC

:42.24.LLA2C
AAATTCAGATGGTCTCTGGCACACGGGAAGTTAGGCATAGGACCCGTGTC

:42.25.LLA2C
TATATGAGTGAGGCCTGTAAAGACGCCCTCTTAGGCATAGGACCCGTGTC

:42.26.LLA2C
ACTCTGCTTTGTCTGGGATAGAAAGTGGGCTTAGGCATAGGACCCGTGTC

:42.27.LLA2C
TTGGTACGCTACCAGGTAAGGAAGGTTCTCTTAGGCATAGGACCCGTGTC

:42.28.LLA2C
GGGAGGGGCTTGAGCCCTAGCGCACACGGTTTAGGCATAGGACCCGTGTC

:42.29.LLA2C
AATCAAACACTTCCACATCTGGTCCCAAGATTAGGCATAGGACCCGTGTC

:42.30.LLA2C
GGGTGTTGGCCCATGGAGGGTGGGCTTGAGTTAGGCATAGGACCCGTGTC

:42.31.LLA2C
TTCATTCTGAACAGCGCCAGTCTGTATAGTTAGGCATAGGACCCGTGTC

Fig. 19-1

:42.XT1.1
 TCCTCACAGGGGAGTGATTCATGGTGGAGTCTTCTTTGGAGAAAGTGGTG
 :42.XT1.2
 ATGGCTAGACGCTTTCTGCGTGAAGACAGTCTTCTTTGGAGAAAGTGGTG
 :42.XT1.3
 TCCTGGAGGCTGCACGACACTCATACTAACCTTCTTTGGAGAAAGTGGTG
 :42.XT1.4
 CGCAGACCACTATGGCTCTCCCGGGAGGGGCTTCTTTGGAGAAAGTGGTG
 :42.XT1.5
 TCGTCTGGCAATTCCGGTGTA CTACCGGCTTCTTTGGAGAAAGTGGTG
 :42.LLA2C.6
 GCATTGAGCGGGTTGATCCAAGAAAGGACCTTAGGCATAGGACCCGTGTC
 :42.LLA2C.7
 AGCAGTCTTGCGGGGGCACGCCCAAATCTCTTAGGCATAGGACCCGTGTC
 :42.LLA2C.8
 ACAAGGCCCTTCGCGACCCAACACTACTCGTTAGGCATAGGACCCGTGTC
 :42.LLA2C.9
 GGGGCACTCGCAAGCACCCCTATCAGGCAGTTTAGGCATAGGACCCGTGTC
 :42.LLA2.10
 CGTGCTCATGGTGACGGTCTACGAGACCTTAGGCATAGGACCCGTGTC
 :42.LLA2C.11
 GTTACGTTTGTFTTTTFTTTGAGGTTTAGGTTAGGCATAGGACCCGTGTC
 :42.LLA2C.12
 CGGGAACTTGACGTCTCTGTGGGCGACGGTTTAGGCATAGGACCCGTGTC
 :42.LLA2C.13
 CAAGTAACTCCACCAACGATCTGACCGCCTTAGGCATAGGACCCGTGTC
 :42.LLA2C.14
 GCGCACACCCAATCTAGGGCCCCCTGCGCGTTAGGCATAGGACCCGTGTC
 :42.LLA2C.15
 AGGTTGCGACCGCTCGGAAGTCTTTCTCGTTTAGGCATAGGACCCGTGTC

Fig. 19-2

:42.32.XT1
ATGTTGGGATGGGGCACAGTGACGGAGCCCCCTTCTTTGGAGAAAGTGGTG

:42.33.XT1
ATCTCTCCGGTGGTGGACAGAGCAACCTCCTTCTTTGGAGAAAGTGGTG

:42.34.XT1
ACTTCGAGGGGGATAGCCTTGCCGTAAAACTTCTTTGGAGAAAGTGGTG

:42.35.XT1
TGACAGAAGATGAGATGTCTCCCCCCTTGCTTCTTTGGAGAAAGTGGTG

:42.36.LLA2C
TTTGCGGGAGTTCTGCGCACTTCTTCTTTTAGGCATAGGACCCGTGTC

:42.37.LLA2C
TAGGCCACGGCATTGATGCCCAATGCGACCTTAGGCATAGGACCCGTGTC

:42.38.LLA2C
GTCGGGATGAOGGACACGTCAAGACCGCGTTAGGCATAGGACCCGTGTC

:42.39.LLA2C
GCATCGGTTGCCACGACGACAACATCGCCGTTAGGCATAGGACCCGTGTC

:42.40.LLA2C
GAGTCGAAGTCGCCGCTATAGCCGTCATGTTAGGCATAGGACCCGTGTC

:42.41.LLA2C
GTCTGGGTGACACACGTATTGCAGTCTATCTTAGGCATAGGACCCGTGTC

:42.42.LLA2C
ATGGTGAAGGTAGGGTCAAGGCTGAAATCGTTAGGCATAGGACCCGTGTC

:42.43.LLA2C
GAGACAGCATCCTGGGGGAGCGTGATTGTCTTAGGCATAGGACCCGTGTC

Fig. 19-3

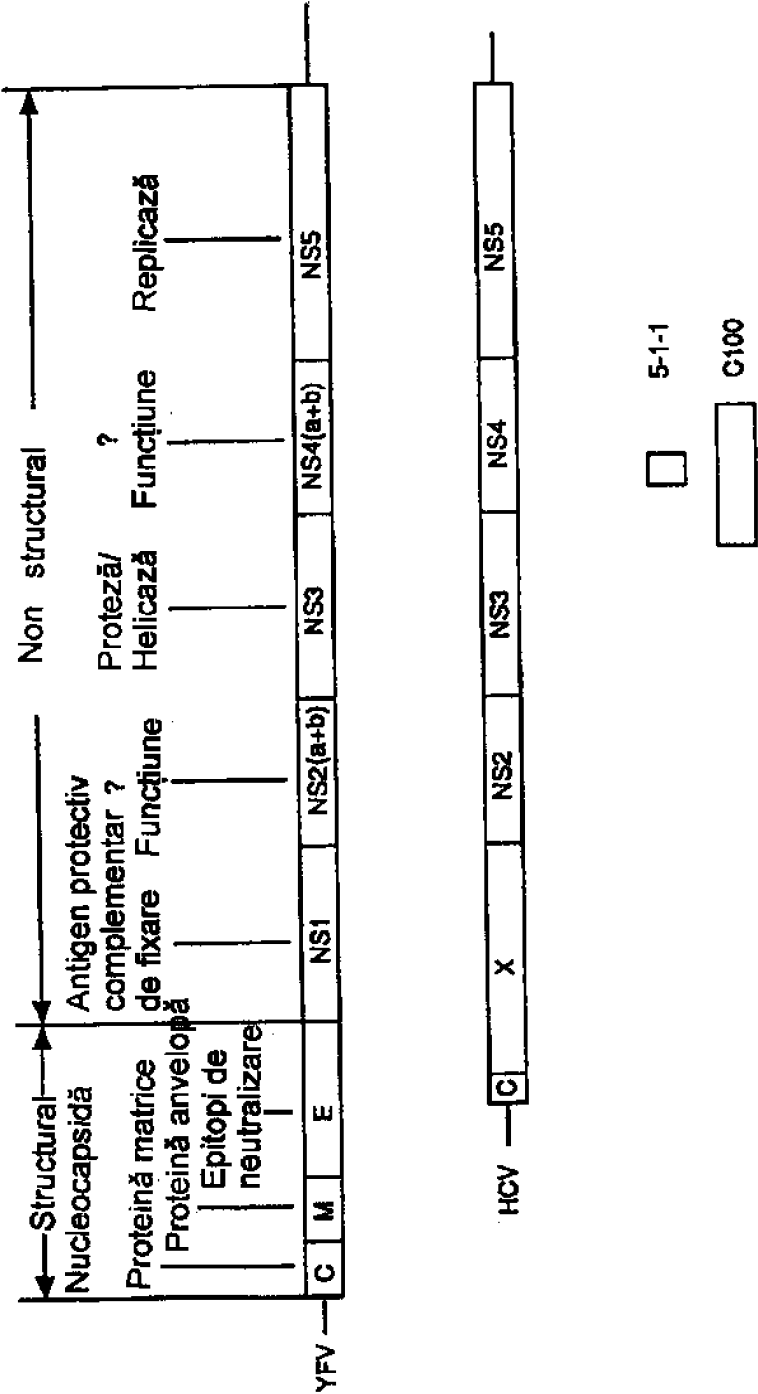


Fig. 20

Translația DNA 81

SerGlyLysProAlaIleIleProAspArgGluValLeuTyrArgGluPheAspGluMet
 1 GTCCGGGAAGCCGGAATCATACCTCAGCAGGGAAGTCTCTACCGAGAGTTCGATGAGAT
 CAGGCCCTTCGGCCGTTAGTATGGACTGTCCCTTCAGGAGATGGCTCTCAAGCTACTCTA

 GluGluCysSerGlnHisLeuProTyrIleGluGlnGlyMetMetLeuAlaGluGlnPhe
 61 GGAAGAGTGTCTCTCAGCACATTACCGTACATCGAGCAAGGATGATGCTCGCCGAGCAGTT
 CCTTCTCAGGAGAGTCGTGAATGGCATGTAGTCTCGTTCCCTACTACGAGCGGCTCGTCAA

 LysGlnLysAlaLeuGlyLeuLeuGlnThrAlaSerArgGlnAlaGluValIleAlaPro
 121 CAAGCAGAAGGCCCTCGGCCCTCCTGCAGACCGCGTCCCGTCAGGCAGAGGTTATCGCCCC
 GTTCGTCTTCCGGGAGCCGGAGGACGCTCTGGCGCAGGSCAGTCCGTCTCCAATAGCGGGG

 AlaValGlnThrAsnTrpGlnLysLeuGluThrPheTrpAlaLysHisMetTrpAsnPhe
 181 TGCTGTCAGACCAACTGGCAAAACTCGAGACCTTCTGGCCGAAGCATATGTGGAACCTT
 ACGACAGGTCCTGGTTGACCGTTTGTGAGCTCTGGGAAGACCCGCTTCGTATACACCTTGAA

 IleSerGlyIleGlnTyrLeuAlaGlyLeuSerThrLeuProGlyAsnProAlaIleAla
 241 CATCAGTGGGATACAATACTTGGCGGGCTTGTCAACGCTGCCTGGTAACCCCGCCATTGC
 GTAGTCACCCCTATGTTATGAACCGCCCGAACAGTTGCGACGGACCATTGGGSGGGTAACG

 SerLeuMetAlaPheThrAlaAlaValThrSerProLeuThrThrSerGln
 301 TTCATTGATGGCTTTTACAGCTGTGTCTACCGCCCACTAACCACTAGCCAAA
 AAGTAACTACCGAAAATGTCTGACGACAGTGGTGGGTGATTGGTGATCGGTTT

Fig. 21

Translația DNA 36

AspAlaHisPheLeuSerGlnThrLysGlnSerGlyGluAsnLeuProTyrLeuValAla
 1 GATGCCACACTTCTATCCAGACAAGCAGAGTGGGAGAACCTTCTTACCTGGTAGCG
 CTACGGGTGAAGATAGGTCTGTTTCGTCTACCCCTCTTGAAGGAATGGACCATCGC
 TyrGlnAlaThrValCysAlaArgAlaGlnAlaProProProSerTrpAspGlnMetTrp
 61 TACCAAGCCACCGTGTGCGCTAGGGCTCAAGCCCTCCCCATCGTGGGACCAGATGTGG
 ATGGTTCGGTGGCACACGGATCCCGAGTTCGGGAGGGGTAGCACCTGCTGTACACC
 LysCysLeuIleArgLeuLysProThrLeuHisGlyProThrProLeuLeuTyrArgLeu
 121 AAGTGTTTGATTGCGCTCAAGCCACCTCCATGGGCCAACACCCCTGCTATACAGACTG
 TTCACAAACTAAGCGGAGTTCGGGTGGGAGGTACCCGGTTGTGGGACGATATGCTGAC
 GlyAlaValGlnAsnGluIleThrLeuThrHisProValThrLysTyrIleMetThrCys
 181 GCGCTGTTTCAGAAATGAATCACCTGACGCACCCAGTCACCAATACATCATGACATGC
 CCGCGACAAAGTCTTACTTTAGTGGGACTGCGTGGTCAAGTGGTTATGTAGTACTGTACG
 MetSerAlaAspLeuGluValValThrSerThrTrpValLeuValGlyGlyValLeuAla
 241 ATGTCGGCGGACCTGGAGGTGCTCACGAGCACCTGGGTGCTCGTTGGCGGCTCTGGCT
 TACAGCCGGCTGGACCTCCAGCAGTGTCTGTGGACCCACGAGCAACCGCCGAGGCCGA
 AlaLeuAlaAlaTyrCysLeuSerThrGlyCysValValIleValGlyArgValValLeu
 301 GCTTTGGCCGCGTATTGCTGTCAACAGGCTGCGTGTCTATAGTGGCAGGGTCTCTTG
 CGAAACCGCGGCATACGGACAGTGTGTCCGACGCCACCATCATCCCGTCCCAGCAGAAC
 ----- *Suprapunarea cu 81* -----
 SerGlyLysProAlaIleIleProAspArgGluValLeuTyrArg
 361 TCCGGGAAGCCGGCAATCATACCTGACAGGGAAGTCTCTACCGAG
 AGGCCCTTCGGCCGTTAGTATGGACTGTCCCTTCAGGAGATGGCTC

Fig. 22

Translația DNA 37b

LeuAlaAlaLysLeuValAlaLeuGlyIleAsnAlaValAlaTyrTyrArgGlyLeuAsp
 1 CTCGCCGCAAGCTGGTCATTTGGCATCAATGCCGTGGCTACTACCGGTCCTTGAC
 GAGCGCGTTTCGACCCAGCGTAACCCGTAGTTACGGCACCGGATGATGGCCAGAACTG

ValSerValIleProThrSerGlyAspValValValAlaThrAspAlaLeuMetThr
 61 GTGTCGTCATCCCGACCGACGCGGCGATGTTGTCGTCGTGGCAACCGATGCCCTCATGACC
 CACAGGCAGTAGGGCTGGTCGCCGCTACAACAGCAGCACCGTTGGCTACGGGAGTACTGG

GlyTyrThrGlyAspPheAspSerValIleAspTyrAsnThrCysValThrGlnThrVal
 121 GGCTATACCGGCGACTTCGACTCGGTGATAGACTACAATACGTGTGTACCCAGACAGTC
 CCGATATGGCCGCTGAAGCTGAGCCACTATCTGATGTTATGCACACAGTGGGTCTGTCTAG

AspPheSerLeuAspProThrPheThrIleGluThrIleThrLeuProGlnAspAlaVal
 181 GATTTCAGCCTTGACCCCTACCTTCACCATTGAGACAATCACGCTCCCCAGGATGCTGTC
 CTAAAGTCGGAACTGGGATGGAAAGTGGTAACTCTGTTAGTGGAGGGGTCTCTACGACAG

clona 35-----
 SerArgThrGlnArgArgGlyArgThr
 241 TCCCGCACTCAACGTCGGGGCAGGACTG
 AGGCGGTGAGTGCAGCCCCCGTCCTGAC

Fig. 23

1 2 3 4 5 6 7



Fig. 24A

+ + - + + + + + - + - + - - +
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17

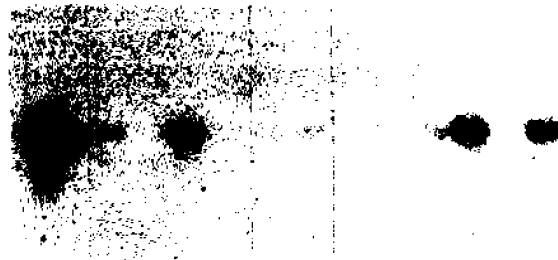


Fig. 24B

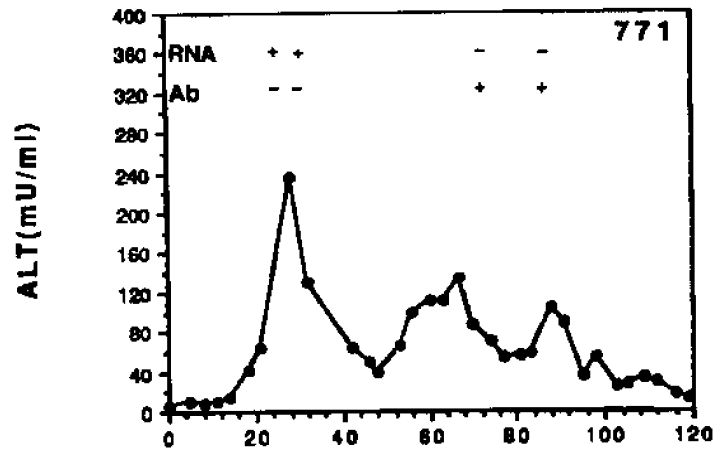


Fig. 25

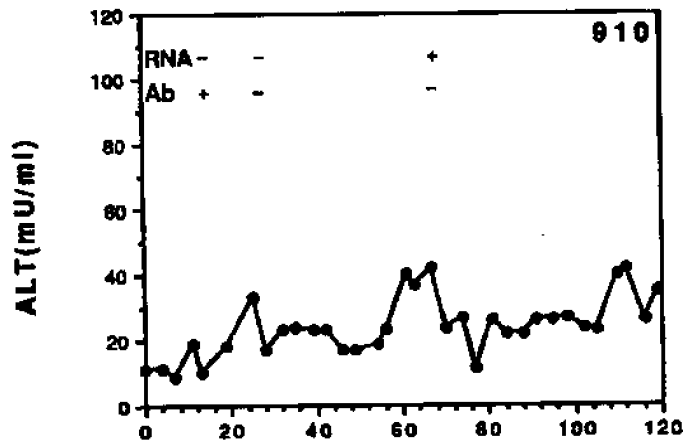


Fig. 26A



Fig. 26B

Translația DNA CA84a

GlnGlyCysAsnCysSerIleTyrProGlyHisIleThrGlyHisArgMetAlaTrpAsp
 CGCAAGGTGCAATGCTCTATCTATCCCGGCATATAACGGTCAACCGCATGGCATGGG
 GCGTCCAAACGTTAACGAGATAGATAGGGCCGGTATATTGCCAGTGGCGTACCGTACCC

1

MetMetMetAsnTrpSerProThrThrAlaLeuValMetAlaGlnLeuLeuArgIlePro
 ATATGATGATGAACGTGGTCCCTACGACGGCGTTGGTAATGGCTCAGCTGCTCCGGATCC
 TATACTACTACTGTACCGAGGGGATGCTGCCGCAACCATTACCGAGTCGACGAGGCCCTAGG

61

GlnAlaIleLeuAspMetIleAlaGlyAlaHisTrpGlyValLeuAlaGlyIleAlaTyr
 CACAAGCCATCTTGGACATGATCGCTGGTGTCTACTGGGAGTCTTGGCGGCATAGCGT
 GTGTTGGTAGAACCTGTACTAGCGACACGAGTGACCCCTCAGGACCGCCCGTATCGCA

121

-----suprapunerea cuCA59a-----
 PheSerMetValGlyAsnTrpAlaLysValLeuValValLeuLeuLeuPheAlaGlyVal
 ATTTCTCCATGGTGGGAACTGGGCGAAGGTCTGTGTAGTGTCTGTCTATTGCGGGCG
 TAAAGAGGTACCAACCCCTTGACCCGCTTCCAGGACCATCACGACGATAAACGGCCCGC

181

AspAlaGluThrHisValThrGly
 TCGACGCGGAAACCCACGTACCGGGG
 AGCTGCGCCCTTGGGTGCAGTGGCCCC

241

Fig. 27

| | |
|-----|---|
| 1 | AlaTyrMetSerLysAlaHisGlyIleAspProAsnIleArgThrGlyValArgThrIle
GGCTTACATGTCAAAGGCTCATGGGATCGATCCTAACATCAGGACCGGGTGAGAAACAAT
CCGAATGTACAGGTTCCGAGTACCCCTAGCTAGGATGTAGTCTCTGGCCCCACTCTTGTTTA |
| 61 | ThrThrGlySerProIleThrTyrSerThrTyrGlyLysPheLeuAlaAspGlyGlyCys
TACCACATGGCAGCCCCATCAGCTACTCCACTACGGCAAGTTCCTTGCCGACGGCGGGTG
ATGGTGACCGTCGGGGTAGTGCATGAGGTGGATGCCGTTCAAGGAACGGCTGCCGCCAC |
| 121 | SerGlyGlyAlaTyrAspIleIleCysAspGluCysHisSerThrAspAlaThrSer
CTCGGGGGCGCTTATGACATAATAATTGTGACGAGTGCACCTCCACGGATGCCACATC
GAGCCCCCGCGAATACTGTATTATTATAAACACTGCTCACGGTGAGGTGCCCTACGGTGTAG |
| 181 | IleLeuGlyIleGlyThrValLeuAspGlnAlaGluThrAlaGlyAlaArgLeuValVal
CATCTTGGGCATCGGCACGTCTCTTGACCAAGCAGAGACTCGGGGGCGAGACTGGTTGT
GTAGAACCCGTAGCCGTGACAGGAACGTGTTCTCTCTGACGCCGCCCTCTGACCAACA |
| 241 | LeuAlaThrAlaThrProGlySerValThrValProHisProAsnIleGluGluVal
GCTCGCCACCGCCACCCCTCCGGCTCCGTCACTGTGCCCCATCCCAACATCGAGGAGGT
CGAGCGGTGGCGGTGGGAGGCCCGAGGCAGTGACACGGGGTAGGGTTGTAGCTCTCCCA |
| 301 | AlaLeuSerThrThrGlyGluIleProPheTyrGlyLysAlaIleProLeuGluValIle
TGCTCTGTCCACCACCGGAGAGATCCCTTTTACGGCAAGGCTATCCCTCGAAGTAAT
ACGAGACAGGTGGTGGCTCTCTAGGGAATAATGCCGTTCCGATAGGGGGAGCTTCATTATTA |
| 361 | LysGlyGlyArgHisLeuIlePheCysHisSerLysLysLysCysAspGluLeuAlaAla
CAAGGGGGGAGACATCTCATCTTCTGTCTATTCAAAGAAGAAGTCCGACGAACTCGCCGC
GTTCCCCCCTCTGTAGAGTAGAAGACAGTAAGTTTCTTCTTCACGCTGCTTGAGCGGG |
| 421 | LysLeuValAlaLeuGlyIleAsnAlaValAlaTyrTyrArgGlyLeuAspValSerVal
AAAGCTGGTGGCATTTGGGCATCAATGCCGTGGCTACTACCGGGTCTTTGACGCTGCCGT
TTTTCGACACGCGTAACCCGTTAGTTACGGCACCGGATGATGGCGGCCAGAACTGCACAGGCA |
| 481 | IleProThr
CATCCCCGACCAG
GTAGGGCTGGTC |

Translation DNA 40b

Fig. 28

1 2 3



Fig. 29

HCV-cDNA a/ clonei 40a

GluPheGlyAlaIleProLeuGluValIleIleLysGlyGlyArgHisLeuIlePheCysHis
 1 GAATTCGGGGCTATCCCCCTCGAAGTAATCAAGGGGGGAGACATCTCATCTTCTGTGCAT
 CTTAAGCCCCGATAGGGGAGCTTCAATTAGTTCCCCCTCTGTAGAGTAGAAGACAGTA
 61 TCAAAGAAGAAGTGCAGCGAACTCGCCGCGCAAGCTGGTCGCATTGGGGCATCAATGCCGTG
 AGTTTCTTCTTCACGCTGCTTGAGCGGCGTTTCGACCAAGCGTAACCCGTAGTTACGGCAC
 121 GCCTACTACCGCGGTCTTGACGTGTCCGTTCATCCCGACACAGCGGTGATGTTGTCTCGTGTG
 CGGATGATGGCGCCAGAACTGACAGCGCAGTAGGGCTGGTCCGACACTACAAACAGCAGCAC
 181 GCAACCGATGCCCTCATGACCGGCTATACCGGGCGACTTCGACTCGGTGATAGACTGCAAT
 CGTTGGCTACGGGAGTACTGGCCGATATGGCCGCTGAAGCTGAGCCACTATCTGACGTTA
 241 ACGTGTGTACCCAGACAGTCGATTTCAGCCCTTGACCCCTACCTTCACCTATTGAGACAATC
 TGCACACAGTGGGTCTGTCTCAGCTAAAGTCGGAACTGGGATGGAAGTGATAACTCTGTTAG
 301 ACGCTCCCCCAAGATGCTCCGAATTC
 TCCGAGGGGTCTACGAGGCTTAAG

Fig. 30

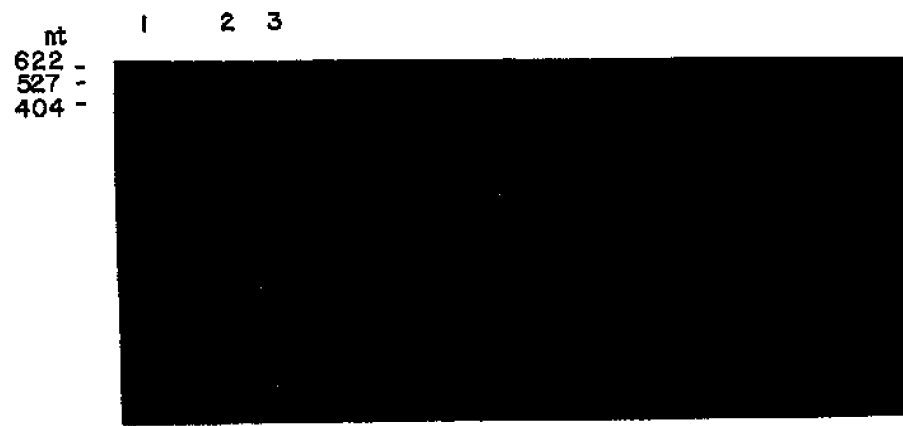


Fig. 31

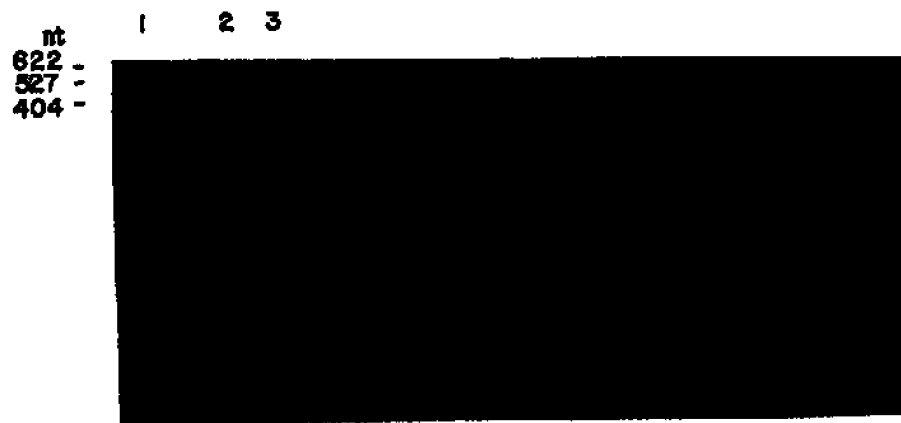


Fig. 31

Translația DNA 35

SerIleGluThrIleThrLeuProGlnAspAlaValSerArgThrGlnArgArgGlyArg
 1 TCCATTGAGACAATCAGCTCCCCCAGGATGCTCTCCCGCACTCAACGTGGGGCAGG
 AGGTAACTCTGTAGTGCAGGGGGTCTACGACAGAGGGCGTGAGTTGCAGCCCCCGTCC

 ThrGlyArgGlyLysProGlyIleTyrArgPheValAlaProGlyGluArgProSerGly
 61 ACTGGCAGGGGAAGCCAGGCATCTACAGATTGTGGCACCGGGGAGCGCCCTCCGGC
 TGACCGTCCCCCTTCGGTCCGTAGATGTCTAAACACCGTGGCCCCCTCGCGGGGAGGCCG

 MetPheAspSerSerValLeuCysGluCysTyrAspAlaGlyCysAlaTrpTyrGluLeu
 121 ATGTTGACTCGTCCGTCTCTGTGAGTGTCTATGACGCAGGCTGTGCTTGGTATGAGCTC
 TACAAGCTGAGCAGGCAGGAGACACTCACGATACGTCCGTCCGACACGAACCATACTCGAG

 ThrProAlaGluThrThrValArgLeuArgAlaTyrMetAsnThrProGlyLeuProVal
 181 ACGCCCGCGAGACTACAGTTAGGCTACGAGCGGTACATGAACACCCGGGGCTTCCCCTG
 TCGGGGGGGCTCTGATGTCAATCCGATGCTCGCATGTACTTGTGGGGCCCCCGAAGGGCAC

Fig. 32-1

 CysGlnAspHisLeuGluPheTrpGluGlyValPheThrGlyLeuThrHisIleAspAla
 241 TGCCAGGACCATCTTGAATTTTGGGAGGGCGTCTTTACAGGCCCTCACTCATATAGATGCC
 ACGGTCCCTGGTAGAACTTAAACCCCTCCCGCAGAAATGTCCGGAGTGAGTATATCTACGG

 HisPheLeuSerGlnThrLysGlnSerGlyGluAsnLeuProTyrLeuValAlaTyrGln
 301 CACTTTCATCCAGACAAAGCAGAGTGGGGAGAACCTTCCTTACCTGGTAGCGTACCAA
 GTGAAAGATAGGGTCGTTCGTCTCACCCCTCTTGGAAGGAATGGACCATCGCATGGTT

-----Suprapunerea cu 36-----
 AlaThrValCysAlaArgAlaGlnAlaProProProSerTrpAspGlnMetTrpLysCys
 361 GCCACCGTGTGGCTAGGGCTCAAGCCCTCCCCCATCGTGGACCCAGATGTGGAAGTGT
 CGGTGGCACACGGCATCCCGAGTTCGGGGAGGGGGTAGCACCCCTGGTCTACACCTTCACA

 LeuIleArgLeuLysProThrLeuHisGlyProThrProLeuLeuTyrArgLeuGlyAla
 421 TTGATTGGCTCAAGCCACCCCTCCATGGGCCCAACACCCCTGCTATACAGACTGGGGCGCT
 AACTAAGCGGAGTTCGGGTGGGAGGTACCCGGTTGTGGGGACGATATGTCTGACCCCGCGA

Fig. 32-2

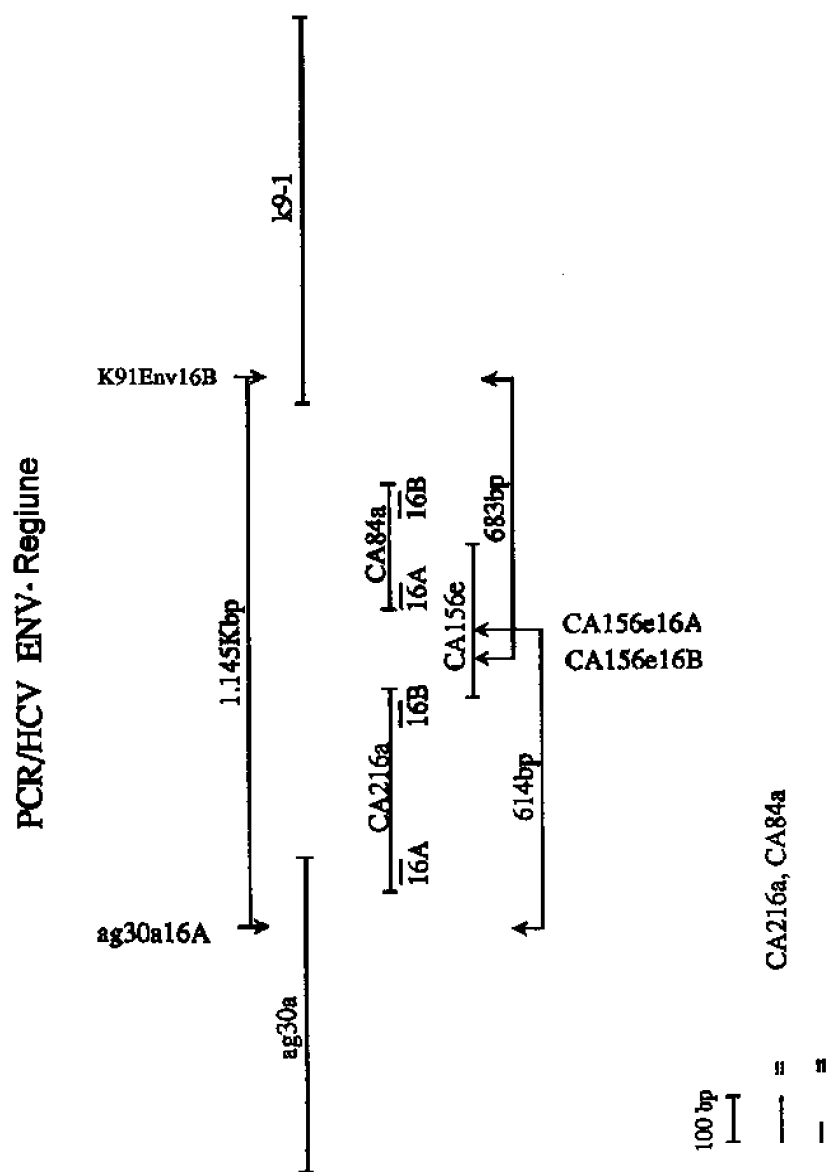


Fig. 33

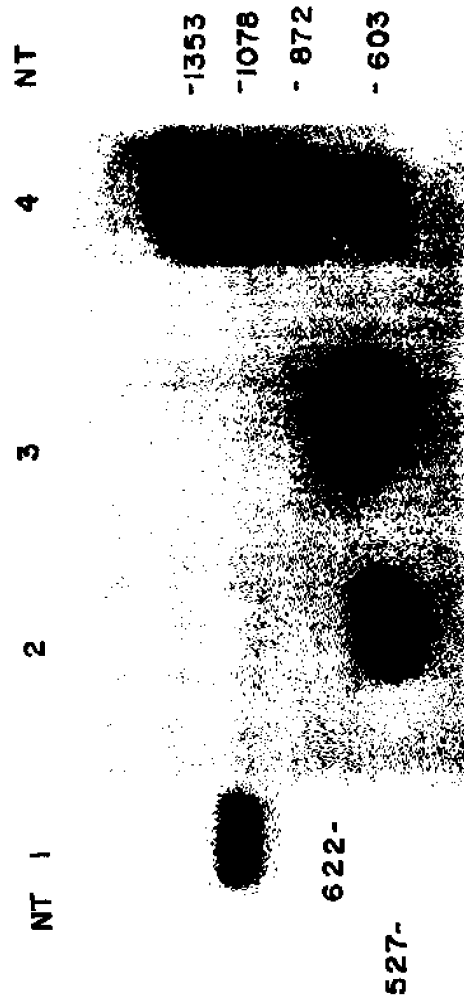


Fig. 34

1. uman 27 2. HCV 1 3. uman 23

1 CGGCTTCGCGACCTCATGGGTACATCCGCTCGTCGGCGCTCCTCTTGgGGCGTCCAGGGCCCTGGC

 1 CGGCTTCGCGACCTCATGGGTACATACGGCTCGTCGGCGCCCTCTTGAGGGCGCTGCCAGGGCCCTGGC

 1 CGGCTTCGCGACCTCATGGGTACATACCGCTCGTCGGCGCCCTCTTGAGGSCgTGCAGGGCCCTGGC

 73 GCATGGCGTCCGGGTTCTGGAAGACGGGTGAACATATGCAACAGGGAACCTTCCTCTGGTGTCTCTTCTCTAT

 73 GCATGGCGTCCGGGTTCTGGAAGACGGGTGAACATATGCAACAGGGAACCTTCCTCTGGTGTCTCTTCTCTAT

 73 GCAAGGCGTCCGGGTTCTGGAAGACGGGTGAACATATGCAACAGGGAACCTTCCTCTGGTGTCTCTTCTCTAT

 145 CTTCTCTCTGGCTCTGTGCTCTCTTGCCGTGACCGTGCCCGCaTCGGCCCTACCAAGTaCGCAACTCCctCGGGCaT

 145 CTTCTCTCTGGCCCTGCTCTCTGTGCTGTGACGTGTCGGCTTACCAAGTGCAGCAACTCCACGGGGCT

 145 CTTCTCTCTGGCCCTaCTCTCTGTGCTGTGACCGTGCCCGCTCaGCCCTACCAAGTGCAGCAACTCTaCGGGGGCT

 217 TTACCAcGTCAcCAATGATTGCCCTAAcTCGAGTATTGTACGAGaCGGCCGAcCaCCATCCTaCACTcCTCC

 217 TTACCAcGTCAcCAATGATTGCCCTAAcTCGAGTATTGTACGAGCGGGCCGATGCCATCTCTGCACaCTCC

 217 TTACCAcGTCAcCAATGATTGCCCTAAcTCGAGTATTGTACGAGCGGGCCGATGCCATCTCTGCACgCTCC

 289 GGGGTGcGTCCCTTGCGTTCCGGAGGGTaACGCCCTCGAaaTGTTGGGTcCGgTagCCCCcCaCaGTGGCCAC

 289 GGGGTGcGTCCCTTGCGTTCCGTcGTGAGGGcAACGCCCTCGAGgTGTTGGGTGGCGaTGACCCCTaCGGTGGCCAC

 289 GGGGTGcGTCCCTTGCGTTCCGGAGGATaACGcCTCGAGaTGTTGGGTGGCGgTGACCCCCcCaCGGTGGCCAC

Fig. 35-1

[illegible]

Fig. 35-2

```

793 tGcCaggACcaccGcagGgcTcaccAGttTttTCagccCAGGGCCaAGCAGgAtaTCCAGCTGATCAACAC
   * * * * *
793 CGgCCaCAcTgtGtCTGGAtTTGtTAGcCTCcTcGcACCAGGGCCaAGCAGaACgTCCAGCTGATCAACAC
   * * * * *
793 CGcCCgCAgcaacGgCTGGAgTTGcTAGtCTcTcCaCACcCAGGGCctAgGCAGaACaTCCAGCTGATCAACAC

865 CAACGGCAGTTGGCAcATCAATcGCACGGCCcTTGAACtGTaATGcgAGCCtCgACAcTGGCTGGgTaGCgGG
   * * * * *
865 CAACGGCAGTTGGCAcCTCAATAGCACGGCCcTGAACtGTCAATGAtAGCCtCAACaCCGGCTGGTTgGCaGG
   * * * * *
865 CAACGGCAGTTGGCAcATCAATAGtACGGCCcTGAACtGTCAATGAcAGCCcTAcCACCGGCTGGTTaGCgGG

937 GCTcTTCTATtACCACAAaTTCAACTCTTCAGGCTGcCCcGAGAGGaTgGCCAGCTGtaGgCCCCTTgCCGA
   * * * * *
937 GCTTTTCTATCACCACAAgTTCAACTCTTCAGGCTGTCCtGAGAGGctAgCCAGCTGCCGACCCCTTACCGA
   * * * * *
937 GCTTTTCTATCACCAtAAaTTCAACTCTTCAGGCTGTCCcGAGAGGtTgGCCAGCTGCCGACCCCTcACCGA

1009 TTTGgACCAGG
   * * * * *
1009 TTTTGACCAGG
   * * * * *
1009 TTTTGcCCAGG

```

Fig. 35-3

```

1 GFADLMGYIPLVGAPLGGAARALAHGVKRVLEEDGVNYATGNLPGCSFSIFLLALLSCLTVPASAYQVRNSSGI
*****
1 GFADLMGYIPLVGAPLGGAARALAHGVKRVLEEDGVNYATGNLPGCSFSIFLLALLSCLTVPASAYQVRNSTGL
*****
1 GFADLMGYIPLVGAPLGGAARALAHGVKRVLEEDGVNYATGNLPGCSFSIFLLALLSCLTVPASAYQVRNSTGL
*****
73 YHVTNDCPNSSIVYEADtILHsPGCVPCVREGNASRCWpvaPTVATRDNLPATQLRHHIDLLVGSATLC
*****
73 YHVTNDCPNSSIVYEADAILHtPGCVPCVREGNASRCWAMTPTVATRDNLPATQLRHHIDLLVGSATLC
*****
73 YHVTNDCPNSSIVYEADAILHsPGCVPCVREDNVSRWCWAVTPTVATKDGKLPtTQLRHHIDLLVGSATLC
*****
145 SALYVGDLGGSVFLVGQLFTFSRRHWTTQdCNCsIYPGHITGHRMAWDMMNWSPTaALVMAQLLRIPQAI
*****
145 SALYVGDLGGSVFLVGQLFTFSRRHWTTQdCNCsIYPGHITGHRMAWDMMNWSPTaALVMAQLLRIPQAI
*****
145 SALYVGDLGGSiFLVGQLFTFSRRHWTTQdCNCsIYPGHITGHRMAWDMMNWSPTaALVVAQLLRIPQAI
*****
217 LDMIAGAHWGLAGIAYFSMVGWNAKVLVLLIFAGVDAItYtTGGNaarTtqaltSffsPGAKQdIOLINT
*****
217 LDMIAGAHWGLAGIAYFSMVGWNAKVLVLLIFAGVDAETHVtGSSAgHtVsgfVSLlaPGAKONVOLINT
*****
217 LDMIAGAHWGLAGmAYFSMVGWNAKVLVLLIFAGVDAETHtTGGSAarstaGvaSLftPGARQNIQLINT
*****
289 NGSWHINtTALNCNaSLdTGWVAGLFYyHKFNSSGCPERmASCRPLaDFDQ
*****
289 NGSWHINtTALNCNDsLdTGWLAGLFYyHKFNSSGCPERLASCRPLTDfDQ
*****
289 NGSWHINtTALNCNDsLdTGWLAGLFYyHKFNSSGCPERLASCRPLTDfAQ
*****

```

1. uman 27
2. HCV 1
3. uman 23

Fig. 36

1 2 3 4

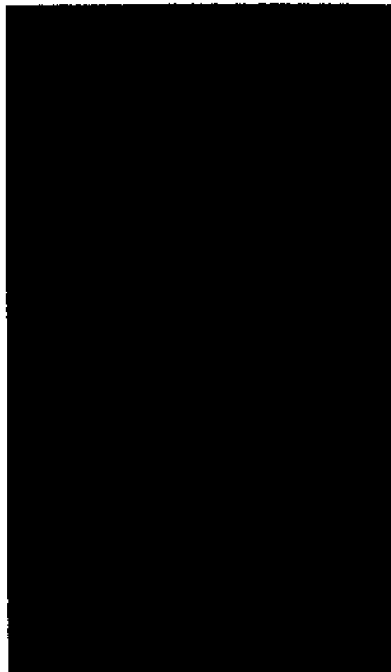


Fig. 37

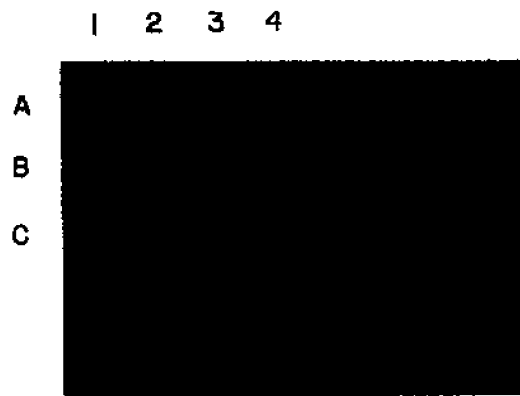


Fig. 38

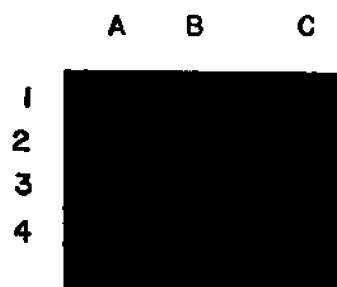


Fig. 39A

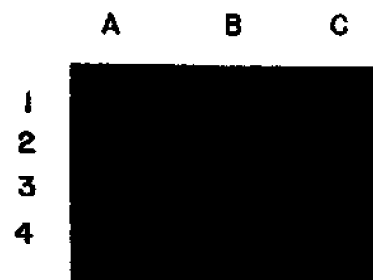


Fig. 39B

uman 23

1 GlyPheAlaAspLeuMetGlyTyrIleProLeuValGlyAlaProLeuGlyGlyArgAla
GGCTTCGCCGACCTCATGGGTACATACCGCTCGTCGGCGCCCTCTTGAGGCGGTGCC
61 ArgAlaLeuAlaHisGlyValArgValLeuGluAspGlyValAsnTyrAlaThrGlyAsn
AGGGCCCTGGCGCACGGCGTCCGGGTTCGGAAGACGGCGTGAACATATGCAACAGGGAAC
CG A
LeuProGlyCysSerPheSerIlePheLeuLeuAlaLeuLeuSerCysLeuThrValPro
CTTCCTGGTTGCTCCCTTTTCTATCTTCCTTCTGGCCCTACTCTCTTGCTGACCGTGCCTC
T T
GA
121 AlaSerAlaTyrGlnValArgAsnSerThrGlyLeuTyrHisValThrAsnAspCysPro
GCTTCAGCCTACCAAGTGGCAACTCTACGGGGCTTTACCATGTCAACCAATGATGCCCT
181 AsnSerSerIleValTyrGluAlaAlaAspAlaIleLeuHisAlaProGlyCysValPro
AACTCGAGTATTGTACGAGGCGGCCGATGCCATCTCTGCACGCTCCGGGGTGTGTCCCT
T C
CysValArgGluAspAsnValSerArgCysTyrPValAlaValThrProThrValAlaThr
TGCGTTCCGGAGGATAACGTTCTCGAGATGTTGGGTGGGTGACCCACCGGTGGCCACC
T T
G
301 LysAspGlyLysLeuProThrThrGlnLeuArgArgHisIleAspLeuLeuValGlySer
AAGGACGGCAAACTCCCCACAACGCAGCTTCGACGTCACATCGATCTGCTTGTCTGGGAGC
A C
361 AlaThrLeuCysSerAlaLeuTyrValGlyAspLeuCysGlySerIlePheLeuValGly
GCCACCTCTGCTCGGCCCTCTACGTGGGGACCTTTGCGGGTCCATCTTTCTTGTCTGGT
T
421 GlnLeuPheThrPheSerProArgArgHisTyrPThrThrGlnAspCysAsnCysSerIle
CAACTGTTTACCTTCTCTCCAGGCGCCACTGGACGACGAGGACTGCAACTGTTCTATC
C
481

Fig. 40-1

TyrProGlyHisIleThrGlyHisArgMetAlaTrpAspMetMetMetAsnTrpSerPro
 541 TATCCCGCCATATAACGGTCACCGCATGGCATGGATATGATGATGAAC^GTGTCCTCCCT
 ThrAlaAlaLeuValValAlaGlnLeuLeuArgIleProGlnAlaIleLeuAspMetIle
 601 ACGCGGCATTTGGTAGTAGCTCAGCTGCTCCGGATCCCAAGCCATCTTGGACATGATC
^G AG
 AlaGlyAlaHisTrpGlyValLeuAlaGlyMetAlaTyrPheSerMetValGlyAsnTrp
 661 GCTGGTGCTCACTGGGAGTCCTGGCGGCATGGCGTATTTCTCCATGGTGGGAAC^GTGG
 AlaLysValIleuValValLeuLeuLeuPheAlaGlyValAspAlaGluThrHisArgThr
 721 GCGAAGGTCTGGTAGTAGTGCTTCTATTGCGGGCGTGGAGCGGAAACCCACCGTACC
^G
 GlyGlySerAlaAlaArgSerThrAlaGlyValAlaSerLeuPheThrProGlyAlaArg
 781 GGGGAAAGTCCCGCCCGCAGCACGGCTGGAGTTGCTAGTCTCTTCACAC^CAGCGCTAGG
^T A
 GlnAsnIleGlnLeuIleAsnThrAsnGlySerTrpHisIleAsnSerThrAlaLeuAsn
 841 CAGAACATCCAGCTGATCAACACCAACGGCAGTTGGCACATCAATAGTACGGCCTTGAAC
^{AT}
 CysAsnAspSerLeuThrThrGlyTrpLeuAlaGlyLeuPheTyrHisHisLysPheAsn
 901 TGCAATGACAGCCCTACCACCGGCTGGTTAGCGGGCTTTTCTATCACCATAAATTCAAC
^A
 SerSerGlyCysProGluArgLeuAlaSerCysArgProLeuThrAspPheAlaGln
 961 TCTTCAGGCTGTCCCGAGAGGTGGCCAGCTGCCGACCCCTCACCAGATTGTC^GCCAGG
^G A

Fig. 40-2

uman 27

1 GlyPheAlaAspLeuMetGlyTyrIleProLeuValGlyAlaProLeuGlyGlyAlaAla
 GGCTTCGCCGACCTCATGGGTACATTCCGTCGTCGGCGTCCTCTTGGGGCGCTGCC
 61 ArgAlaLeuAlaHisGlyValArgValLeuGluAspGlyValAsnTyrAlaThrGlyAsn
 AGGGCCCTGGCGCATGGCGTCGGGTCTCTGGAAGACGGCGTGAACTATGCCAACAGGGAAC
 121 LeuProGlyCysSerPheSerIlePheLeuLeuAlaLeuLeuSerCysLeuThrValPro
 CTTCCCTGGTGTCTCTTCTCTATCTTCTCTCTGGCTCTGCTCTCTTGCCTGACCCGTGCCCC
 181 AlaSerAlaTyrGlnValArgAsnSerSerGlyIleTyrHisValThrAsnAspCysPro
 GCATCGGCCTACCAAGTACGCACTCTCTCGGCAATTACCATGTCTACCAATGATTGCCCT
 241 AsnSerSerIleValTyrGluThrAlaAspThrIleLeuHisSerProGlyCysValPro
 AATTCGAGTATTGTGTACGACGCGCCGACACCATCTCTACACTCTCGGGTGTCTCCCT
 301 CysValArgGluGlyAsnAlaSerLysCysTyrValProValAlaProThrValAlaThr
 TCGGTTCGGAGGGTAACGCTCGAAATGTGGTGCCGCTAGCCCCACACAGTGGCCACC
 361 ArgAspGlyAsnLeuProAlaThrGlnLeuArgArgHisIleAspLeuLeuValGlySer
 AGGGACGGCAACCTCCCCGCAACGCAGCTTCGACGTCACATCGATCTGCTTGTCTGGGAGT
 AlaThrLeuCysSerAlaLeuTyrValGlyAspLeuCysGlySerValPheLeuValGly
 421 GCCACCCCTTTGCTCGGCCCTCTATGTGGGGACTTGTGGGGTCTGTCTTCTTCTGTCTGGT
 GlnLeuPheThrPheSerProArgArgHisTyrThrThrGlnAspCysAsnCysSerIle
 481 CAACTGTTCACTTCTCTCCCCCAGGCGCCACTGGACACGCAAGATTGCAACTGCTCTATC

Fig. 41-1

```

541 TyrProGlyHisIleThrGlyHisArgMetAlaTrpAspMetMetMetAsnTrpSerPro
    TACCCCGGCCATATAACGGACACCGCATGGCATGGATATGATGATGAACCTGGTCCCT
    G
601 ThrAlaAlaLeuValMetAlaGlnLeuLeuArgIleProGlnAlaIleLeuAspMetIle
    ACAGCAGCGCTGGTAATGGCTCAGCTGCTCAGGATCCCGCAGCCATCTTGGACATGATC
    G
661 AlaGlyAlaHisTrpGlyValLeuAlaGlyIleAlaTyrPheSerMetValGlyAsnTrp
    GCTGGTGCTCACTGGGAGTCTCTAGCGGGCATAGCGTATTTCTCCATGGTGGGAACCTGG
    G
721 AlaLysValLeuValValLeuLeuLeuPheAlaGlyValAspAlaThrThrTyrThrThr
    GCGAAGGTCCTGGTGGTGCTGTGTGCTGTTTGGCGGTCGATGCGACAACCTATACCACC
    G
781 GlyGlyAsnAlaAlaArgThrThrGlnAlaLeuThrSerPheSerProGlyAlaLys
    GGGGGGAATGCTGCCAGGACCAACGAGCGCTCACCAGTTTTCAGCCCCAGGCGCCCAAG
    G
841 GlnAspIleGlnLeuIleAsnThrAsnGlySerTrpHisIleAsnArgThrAlaLeuAsn
    CAGGATATCCAGCTGATCAACACCAACGCGCAGTTGGCACATCAATCGCACGGCCCTTGAAC
    G
901 CysAsnAlaSerLeuAspThrGlyTrpValAlaGlyLeuPheTyrTyrHisLysPheAsn
    TGTAAATGCGAGCCTCGACACTGGCTGGGTAGCGGGGCTCTTCTATTACCAACAATTCAAC
    T
961 SerSerGlyCysProGluArgMetAlaSerCysArgProLeuAlaAspPheAspGln
    TCTTCAGGCTGCCCGAGAGGATGGCCAGCTGTAGCCCCCTTGGCATTTTCGACCAGG
    C

```

Fig. 41-2

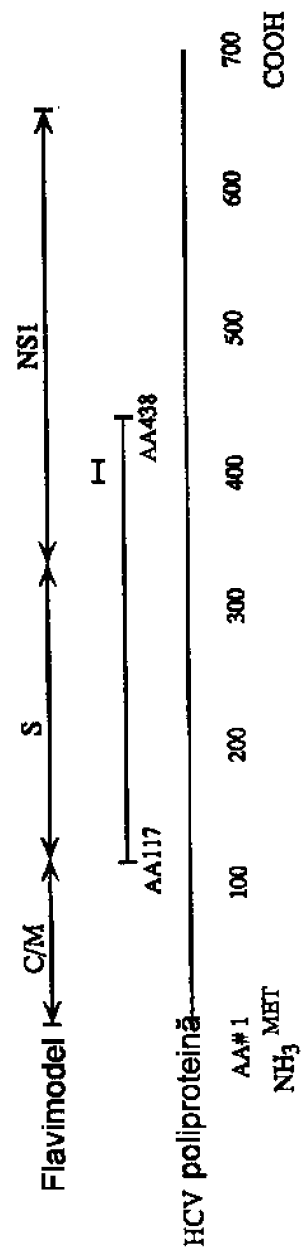


Fig. 42

```

147 TATGCAACAGGGAACCTTCCTGGTTGCTCTTTCTCTcTCTTCCCTTCGCCCCcTGCTCTCTTTGtcTGACCGTG
147 TATGCAACAGGGAACCTTCCTGGTTGCTCTTTCTCTcTCTTCCCTTCGCCCCcTGCTCTCTTTGtcTGACCTGTG
147 TATGC CAGGGAACCTTCCTGGTTGCTCTTTCTCTATCTTCCCTTCGCCCCcTGCTCTCTTTGtcTGACCTGTG
505 TATGCAACAGGGAACCTTCCTGGTTGCTCTTTCTCTATCTTCCCTTCGCCCCcTGCTCTCTTTGtcTGACCTGTG
219 CCGCTTCAGCCTACCAAGTGGCAACTCCaCGGGCTTTACATGTCAcCAaCGATTGCCcCAACTCGAGt
219 CCGCTTCAGCCTACCAAGTGGCAACTCCcCGGGCTTTACATGTCAcCAaTGAATTGCCcCAACTCGAGc
219 CCGCTTCAGCCTACCAAGTGGCAACTCCaCGGGCTTTACATGTCAcCAaTGAATTGCCcCAACTCGAGt
577 CCGCTTCGcCtLACCAAGTGGCAACTCCaCGGGCTTTACCAcGTCAcCAaTGAATTGCCcCAACTCGAGt
291 ATTGTGTACGAGGCGGCCGATGcTcATCCTGCACgCTCGGGGTGtGTCCCTTGCGTTcGCGAGGtLAAGCc
291 ATTGTGTACGAGGCGGCCGATGCCATCCTGCACACTCCGGGGTGTGTCCCTTGCGTTcACGAGGGCAACGTc
291 ATTGTaTACGAaGCGGCCGAcGCCATCCTGCACACTCCGGGGTGTGTCCCTTGCGTTcACGAGGGCAACGTc
649 ATTGTgTACGAgCGGCCGATGCCATCCTGCACACTCCGGGGTGTGTCCCTTGCGTTcgtLgAGGGCAACGcc
363 TCGAGGTGTGGGTGGCGATGACCCcCAcGGTGGCCgCCAGGGaCGGCagACTCCcCAcAaCGCAGCTgCGA
363 TCGAGGTGTGGGTGGCGATGACCCcCAcGGTGGCCaCCAGGGgCGGCAaACTCCcCAcAaCGCAGCTTcGA
363 TCGAGGTGTGGGTGGCGgTGACCCcCAcGGTGGCCaCCAGGGATGGCAaACTCCcCAcAaCGCAGCTTcGA
721 TCGAGGTGTGGGTGGCGaTGACCCcCtACGGTGGCCaCCAGGGATGGCAaACTCCcCgCgACGAGCTTcGA

```

Fig. 43-2

435 CGTCACATCGATCTGCTTGTTCGGGAGCGCACCCTCTGCTCGGCCCTCTACGTGGGGGACCTGTGCGGGTCC
435 CGTCACATCGATCTGCTTGTTCGGGAGCGCACCCTCTGCTCGGCCCTCTACGTGGGGGACCTGTGCGGGTCT
435 CGTCACATCGATCTGCTTGTTCGGGAGCGCACCTCTGCTCGGCCCTCTATGTGGGGGACCTGTGCGGGTCT
793 CGTCACATCGATCTGCTTGTTCGGGAGCGCACCTCTGTTCGGGCCCTCTACGTGGGGGACCTGTGCGGGTCT
507 ATCTTTCTTGTTCGGTCAACATGTTACCTTCTCTCCAGGCGCCACTGGACGACGCAAGGTTGCAATTGCTCT
507 GTCTTCTTGTTCGGTCAACATGTTTACCTTCTCTCCAGGCGCCACTGGACGACGCAAGGTTGCAATTGCTCT
507 GTCTTCTTGTTCGGCCAACTGTTTACCTTCTCTCCAGGCGCCACTGGACGACGCAAGGTTGCAATTGCTCT
865 GTCTTCTTGTTCGGCCAACTGTTTACCTTCTCTCCAGGCGCCACTGGACGACGCAAGGTTGCAATTGCTCT
579 ATCGAATTC
579 ATCGAATTC
579 ATCGAATTC
937 ATCTAtccc

Fig. 43-3

```

EC10      10      20      30      40
          GAATTGGGACGACGCAAGGTTGCAATTGCTCTATCTATCCCGGCCATAT
          X: ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
HCV1      550      560      570      580      590      600
          CTCTCCAGGCGCCACTGGACGACGCAAGGTTGCAATTGCTCTATCTATCCCGGCCATAT

50      60      70      80      90      100
AACAGGTCACCGCATGGCATGGGATATGATGATGAAGTGGTCCCTACGACGGCGTTAGT
:: :::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::: ::
AACGGGTCACCGCATGGCATGGGATATGATGATGAAGTGGTCCCTACGACGGCGTTGGT
610      620      630      640      650      660

110      120      130      140      150      160
GGTAGCTCAGCTGCTCCGGATCCCACAAGCCATCTTGGACATGATCGCTGGTGCTCACTG
:: :::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::: ::
AATGGCTCAGCTGCTCCGGATCCCACAAGCCATCTTGGACATGATCGCTGGTGCTCACTG
670      680      690      700      710      720

170      180      190      200      210      220
GGGAGTCCTGGCGGGCATAGCGTATTTCTCCATGGTGGGGAAGTGGGCGAAGGTCTTGGC
:: :::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::: ::
GGGAGTCCTGGCGGGCATAGCGTATTTCTCCATGGTGGGGAAGTGGGCGAAGGTCTTGGT
730      740      750      760      770      780

230      240      250      260      270      280
AGTGCCTGCTGCTATTTGCGGGCGTGGACGCGGAACCCACGTCAGTGGGGGGATCGCCGC
:: :::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::: ::
AGTGCCTGCTGCTATTTGCGGGCGTGGACGCGGAACCCACGTCACCGGGGGAAGTGCCGG
790      800      810      820      830      840

290      300      310      320      330      340
CAAACTACGGCTAGCCTTACTGGTCTCTTCAATTAGGTGCCAAGCAGAACATCCAGCT
:: :::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::: ::
CCACACTGTGTCTGGAATTGTAGCCTCCTCGCACCAGGCGCAAGCAGAACCTCCAGCT
850      860      870      880      890      900

350      360      370      380      390      400
GATCAACACCAACGGCAGTTGGCACATCAACAGGACGGCCTTGAACTGCAATGATAGCCT
:: :::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::: ::
GATCAACACCAACGGCAGTTGGCACCTCAATAGCACGGCCTTGAACTGCAATGATAGCCT
910      920      930      940      950      960

410      420
CAACACCGGCTGGAATTC
:: ::::::::::::::X
CAACACCGGCTGTTGGCAGGGCTTTTCTATCACCACAAGTTCAACTCTTCAGGCTGTCC
970      980      990      1000      1010      1020

```

Fig. 44-1

```

EC10          10      20      30      40
              GAATTGGGACGACGCAAGGTTGCAATTGCTCTATCTATCCCGGCCATAT
              X: ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
HCV1          CTCTCCCGAGCGCGCACTGGACGACGCAAGGTTGCAATTGCTCTATCTATCCCGGCCATAT
              550      560      570      580      590      600

100          50      60      70      80      90      100
              AACAGGTCACCGCATGGCATGGGATATGATGATGAAGTGGTCCCCCTACGACGGCGTTAGT
              :: ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
              AACGGGTCACCGCATGGCATGGGATATGATGATGAAGTGGTCCCCCTACGACGGCGTGGT
              610      620      630      640      650      660

110          120      130      140      150      160
              GGTAGCTCAGCTGCTCGCGGATCCCAAGCCATCTTGGACATGATCGCTGGTGCTCACTG
              | ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
              AATGGCTCAGCTGCTCGCGGATCCCAAGCCATCTTGGACATGATCGCTGGTGCTCACTG
              670      680      690      700      710      720

170          180      190      200      210      220
              GGGAGTCCCTGGCGGGCATAGCGTATTTCTCCATGGTGGGGAACTGGGCGAAGGTCCTTGGC
              ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
              GGGAGTCCCTGGCGGGCATAGCGTATTTCTCCATGGTGGGGAACTGGGCGAAGGTCCTTGGT
              730      740      750      760      770      780

230          240      250      260      270      280
              AGTGCTGCTGCTATTATTGCGGGCGTTCGACGCGGAAACCCACGTCACGGGGGGATCGCCGC
              | ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
              AGTGCTGCTGCTATTATTGCGGGCGTTCGACGCGGAAACCCACGTCACGGGGGAAGTGCCCG
              790      800      810      820      830      840

290          300      310      320      330      340
              CAAACTACGGCTAGCCTTACTGGTCTCTTCAATTAGGTGGCAAGCAGAACATCCAGCT
              | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
              CCACACTGTGTCTGGATTGTGTTAGCCTCTCGCACCAGCGCGCAAGCAGAACGTCACGCT
              850      860      870      880      890      900

350          360      370      380      390      400
              GATCAACACCAACGGCGAGTTGGGCACATCAACAGGACGGCCCTTGAAGTGCATGATAGCCT
              | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
              GATCAACACCAACGGCGAGTTGGCACCTCAATAGCACGGCCCTGAAGTGCATGATAGCCT
              910      920      930      940      950      960

410          420
              CAACACGGCTGGAATTC
              ::::::::::::::X
              CAACACGGCTGGTGGCAGGGCTTTTCTATACCACAAGTTCAACTCTTCAGGCTGTCC
              970      980      990      1000      1010      1020

```

Fig. 44-2

AA #117-308 (regiunea putativă de înveliș)

- | | |
|----------------------|--------------------|
| 1) HCT #18 (USA) | 3 clone secvențate |
| 2) JH23 (USA) | ? |
| 3) JH 27 (USA) | ? |
| 4) PBL-Th (USA) | 2 clone secvențate |
| 5) EC1 (Italy) | 3 clone secvențate |
| 6) HCV-1 (cimpanzeu) | multiple |

C/M ← T → S

1) (P)

2)

3)

4)

5)

6) **RNLGKVIDTLTCGFADLMGYIFLVGAPLGGAARALAHGVRVLEDGVNYATGNL**

1) H

2)

3) S T T

4) L

5) (F) S

6) **PGCSFSIFLLALLSCLTVPASAYQVRNSTGLYHVTNDPCPNSSIVYEADAILH**

1) (H) V V T

2) A D V V K T

3) S PVA N

4) A A R T

5) H V T

6) **TPGCVPCVREGNASRCWVAMTPTVATRDGKLPATQLRRHIDLLVGSATLCS**

1)

2) I D

3) D

4)

5) I

6) **ALYVGDLGSGVFLVGQLFTFSRRHWTTQGCNCSI**

SUMAR "s" AA117-308 (93%)

HCT#18, PBL-Th, EC1(Italy) au 97% homologie cu HCV-1

JH23 și JH 27 au 96% și 95% homologie cu HCV-1

Fig. 45

Alinierea regiunii cu perechi adunate în identificare (fără translație)

GA
||
GA
|

1. ssThorn#8.r (1-587)
2. sSECl#2.r (1-587)
3. ssHCTl8#7.r (1-587)
4. envl.hcv (1-1657)

1
1
1

289 ggggtggcgggatggtctcotgtctccocgttggtatcggcctagctggggccccacagacccccggcgtagg

3 ATTCCCAATTGGGTAAGGTTCATCGATAACCTTACGTGCCGCITTCGCCGACCCTCATGGSGTACATACCGCTC
3 ATTCCCAATTGGGTAAGGTTCATCGATAACCTTACGTGCCGCITTCGCCGACCCTCATGGSGTACATACCGCTC
3 ATTCCCAATTGGGTAAGGTTCATCGATAACCTTACGTGCCGCITTCGCCGACCCTCATGGSGTAAATACCGCTC
361 tcgcccaatttgggtaagggtcatcgataacccttacgtggsgcintgccgacctcatggsgttacatatccgctc

75 GTCGGCGCCCCCTCTTTGGGGGGCGCTGCCAGGGCCCCTGGCGCATGGCGTCCGGGTCTCTGGAAGACGGCGTGAAAC
75 GTCGGCGCCCCCTCTTTGGAGGCGCTGCCAGGGCCCCTGGCGCATGGCGTCCGGGTCTCTGGAAGACGGCGTGAAAC
75 GTCGGCGCCCCCTCTTTGGAGGCGCTGCCAGGGCCCCTGGCGCATGGCGTCCGGGTCTCTGGAAGACGGCGTGAAAC
433 GTCGGCGCCCCCTCTTTGGAGGCGCTGCCAGGGCCCCTGGCGCATGGCGTCCGGGTCTCTGGAAGACGGCGTGAAAC

Fig. 45-1

AA#300-438 (regiunea c-terminală a regiunii putative de înveliș și amino ~1/3 a NSI)

- 1) JH23 ?
 2) JH27 ?
 3) Japanese (T. Miyamura) ?
 4) EC10 (Italy) 2

5) HCV-1

S ← → NSI

1) D A V

2) D A

3)

V S V M V

4)

5) TTQGCNCSTYPGHITGHRMAWDMMMNWSPTTALVMAQLLRIPQAILDMIAGA

1) M R A R S T A V A

2) T Y T N A R T O A L T F

3) L Y I M G H R V O V T T L T

4) A I A K T A S L T A

5) HWGVLAGIAYFSMVGNWAKVLVLLLFAGVDAETHVTGGSAGHTVSGFVSL

1) F S R I I T V

2) F T D I I R A D

3) F R S K I V I R Q F

4) F N L I I R N

5) L A P G A K Q N V Q L I N T N G S W H L N S T A L N C N D S L N T G W L

SUMAR: NS 1 AA 330-660

| | (AA330-438) | (AA383-405) |
|--------------|-------------|-------------|
| izolat | %Homologie | %Homologie |
| JH23 | 83 | 57 |
| JH27 | 80 | 39 |
| Japanese | 73 | 48 |
| EC10 (Italy) | 84 | 48 |

Fig. 46

| Nume | Secvența comună | Secvența variabilă |
|---------|------------------|--------------------|
| 5' -3-1 | AAGCTTGATCGAATTC | CGATCCTTGC |
| -2 | | CGATCCTGTC |
| -3 | | CGATCATGTC |
| -4 | | CGATCGTGTC |
| -5 | | CGAAGTTGTC |
| -6 | | CGAAGCTGTC |
| -7 | | AGATCCTTGC |
| -8 | | AGATCCTGTC |
| -9 | | AGATCATGTC |
| -10 | | AGATCGTGTC |
| -11 | | AGAAGTTGTC |
| -12 | | AGAAGCTGTC |
| -13 | | CGATCCTTGT |
| -14 | | CGATCCTGT |
| -15 | | CGATCATGT |
| -16 | | CGATCGTGT |
| -17 | | CGAAGTTGT |
| -18 | | CGAAGCTGT |
| -19 | | AGATCCTTGT |
| -20 | | AGATCCTGT |
| -21 | | AGATCATGT |
| -22 | | AGATCGTGT |
| -23 | | AGAAGTTGT |
| -24 | | AGAAGCTGT |
| -25 | | CGCTCCTTGC |
| -26 | | CGCTCCTGTC |
| -27 | | CGCTCATGTC |
| -28 | | CGCTCGTGTC |
| -29 | | CGCAGTTGTC |
| -30 | | CGCAGCTGTC |
| -31 | | CGCTCCTTGT |
| -32 | | CGCTCCTGT |
| -33 | | CGCTCATGT |
| -34 | | CGCTCGTGT |
| -35 | | CGCAGTTGT |
| -36 | | CGCAGCTGT |

Fig. 47

