

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 95.329

REQUERENTE: Dr. AKIRA OYA e CHIRON CORPORATION

EPÍGRAFE: "NOVOS ISOLADOS DE HCV"

INVENTORES: Tatsuo Miyamura, japonês; Izumu Saito, japonês; Michael Houghton, britânico; Amy J. Weiner, norte americana; Jang Han, coreano; Janice A. Kolberg, norte americana; Tai-an Cha, Chinês; Bruce Duncan Irvine, norte americano.

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4º da Convenção de Paris de 20 de Março de 1883.
15 de Setembro de 1989 e 21 de Dezembro de 1989, nos Estados Unidos da América, sob os N.ºs. 408.045 e 456.142.



Titular: Dr. AKIRA OYA e CHIRON CORPORATION

Epigrafe: "NOVOS ISOLADOS DE HCV"

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

Campo Técnico

A presente invenção refere-se aos novos isolados da classe viral da hepatite C, polipéptidos, polinucleótidos e anticorpos deles derivados, bem como ao uso de tais polipéptidos, polinucleótidos e anticorpos em testes (e.g., imunotestes, testes de hibridação de ácidos nucleicos, etc.) e na produção de polipéptidos virais.

Antecedentes

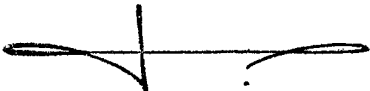
A Hepatite não-A, não-B (NANBH) é uma doença transmissível ou família de doenças que se pensa serem induzidas por virus, e que se distinguem de outras formas de doenças de fígado associadas a virus, incluindo as causadas pelos virus da hepatite conhecidos, i.e., virus da hepatite A (HAV), virus da hepatite B (HVB), virus da hepatite delta (HVD), bem como as hepatites induzidas pelo citomegalovirus (CMV) ou virus de Epstein-Barr (EBV). A NANBH foi primeiramente identificada em individuos que sofreram transfusões. A transmissão do homem para o chimpanzé e as passagens em série nos chimpanzés mostraram que

a NANBH é devida a um agente ou agentes de infecção transmissível. A evidência epidemiológica sugere que pode haver três tipos de NANBH : o tipo epidémico transportado pela água; o tipo associado a agulhas ou sangue; e o tipo que ocorre esporadicamente (contraído comunitariamente). Contudo, nenhum agente transmissível responsável pela NANBH tinha sido identificado até à data.

Inicialmente, foram conseguidos diagnóstico clínico e identificação da NANBH , pela exclusão de outros marcadores virais. Alguns dos métodos usados para detectar supostos anticorpos e antigénios da NANBH são a difusão em agar-gel, contraimuno-electroforese, microscopia de imunofluorescência, microscopia de electrão imune, radio imunoteste, e teste de ligação imunoabsorvente ao enzima. Contudo, nenhum destes testes provou ser suficientemente sensível, específico, e reproduzível para ser usado como teste de diagnóstico para a NANBH.

Até muito recentemente não havia nem clareza nem acordo quanto à identidade ou especificidade dos sistemas antígeno anticorpo associados com os agentes da NANBH. É possível que a NANBH seja causada por mais de um agente infeccioso e mascarar o que os testes serológicos detectam no soro dos pacientes com NANBH.

No passado considerou-se a existência de um grande número de candidatos a agentes da NANBH. Ver, e.g., Prince (1983) Ann. Rev. Microbiol. 37:217; Feinstone & Hoofnagle (1984) New Eng. J. Med. 311:185; Overby (1985) Curr. Hepatol. 5:49; Overby (1986) Curr. Hepatol. 6:65; Overby (1987) Curr. Hepatol. 7:35; e

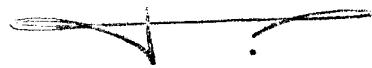


Iwarson (1987) British Med. J. 295:946. Contudo, não há qualquer prova de que qualquer destes candidatos represente o agente etiológico da NANBH.

Em 1987, Houghton et al. clonaram o primeiro vírus definitivamente ligado à NANBH. Ver, e.g., EPO pub. No 318.216; Houghton et al., Science 244:359 (1989). Houghton et al. descreveram aí a clonagem de um isolado de uma nova classe viral, vírus da hepatite C (HCV), o protótipo do isolado aí descrito foi denominado "HCV1". O HCV é um vírus do tipo Flavi, com um genoma de RNA. Houghton et al. descreveram a produção de proteínas recombinantes a partir das sequências do HCV que são úteis como reagentes de diagnóstico, bem como os polinucleótidos úteis nos testes de hibridação de diagnóstico e na clonagem de isolados do HCV adicionais.

A procura de métodos específicos e sensíveis para a pesquisa e identificação de portadores da NANBH e de sangue ou produtos sanguíneos contaminados com NANBH é significativa. As hepatites após-transusão (PTH) ocorrem em aproximadamente 10% dos doentes que sofrem transfusões, e a NANBH contribui para mais de 90% destes casos. Existe uma progressão frequente (25-55%) de danos crónicos do fígado.

O tratamento de doentes, bem como a prevenção da transmissão da NANBH pelo sangue e produtos sanguíneos, ou por contacto pessoal íntimo, requer diagnóstico de confiança e meios de prognóstico para detectar ácidos nucleicos, antigénios e anticorpos relacionados com a NANBH. Em adição, também há a necessidade de vacinas eficazes e agentes imunoterapêuticos para



a prevenção e/ou tratamento da doença.

Enquanto pelo menos um isolado do HCV foi identificado, o que é útil para as necessidades acima referidas, isolados adicionais, particularmente aqueles com divergências no genoma, podem provar ter aplicações únicas.

Sumário da Invenção

Os novos isolados do HCV foram caracterizados a partir de sangue de doadores Japoneses que foram implicados como portadores da NANBH. Esses isolados exibem heterogeneidade de sequência de aminoácidos e nucleótidos em relação ao protótipo do isolado, HCV1, em vários domínios virais. Pensa-se que estas sequências distintas são de grande importância, particularmente nos testes de diagnóstico e desenvolvimento de vacinas.

Numa concretização, a presente invenção fornece uma molécula de DNA compreendendo uma sequência de nucleótidos de pelo menos, 15 pb, de um isolado do HCV substancialmente homólogo a um isolado seleccionado a partir do grupo J1 ou J7, em que a referida sequência de nucleótidos difere da sequência de nucleótidos do isolado HCV1 do HCV.

Numa outra concretização, a presente invenção fornece uma molécula de DNA compreendendo uma sequência de nucleótidos de, pelo menos, 15 pb que codificam uma sequência de aminoácidos a partir do isolado J1 ou J7 do HCV, em que a sequência de aminoácidos J1 ou J7 é diferente da sequência de aminoácidos do isolado HCV1 do HCV.

Uma outra concretização da presente invenção fornece um



polipéptido purificado compreendendo uma sequência de aminoácidos, a partir do isolado do HCV, substancialmente homóloga do isolado seleccionado a partir do grupo J1 ou J7, em que a referida sequência de aminoácidos difere da sequência do polipéptido codificada pelo isolado HCV1 do HCV.

Ainda outra concretização da presente invenção fornece um polipéptido compreendendo uma sequência de aminoácidos de um isolado J1 ou J7 do HCV em que a sequência de aminoácidos J1 ou J7 é diferente da sequência de aminoácidos do isolado HCV1 do HCV e o polipéptido está imobilizado num suporte sólido.

Ainda noutra concretização da presente invenção, um imunoteste para detectar a presença de anticorpos anti-HCV numa amostra-teste é fornecido compreendendo: (a) incubação da amostra teste em condições que permitem a formação dos complexos antigénio-anticorpo com um polipéptido imunogénico compreendendo uma sequência de aminoácidos de um isolado do HCV substancialmente homólogo a um isolado seleccionado a partir do grupo J1 ou J7, em que a sequência de aminoácidos é diferente da sequência de aminoácidos do isolado HCV1 do HCV; e (b) detecção do complexo antigénio-anticorpo compreendendo o polipéptido imunogénico.

A presente invenção também fornece uma composição, compreendendo anticorpos anti-HCV, que se liga a um epitopo do HCV substancialmente livre de anticorpos que não se ligam ao epitopo do HCV, em que: (a) o epitopo do HCV compreende uma sequência de aminoácidos de um isolado do HCV, substancialmente homóloga a um isolado seleccionado do grupo J1 ou J7, em que a



sequência de aminoácidos é diferente da sequência de aminoácidos do isolado HCV1 do HCV; e (b) a sequência de aminoácidos do J1 ou J7 não é imunologicamente de reacção cruzada com o HCV1.

Uma outra concretização da presente invenção fornece um imunoteste para detectar a presença de um polipéptido do HCV numa amostra-teste compreendendo: (a) incubação da amostra teste em condições que permitam a formação de complexos antígeno-anticorpo, com anticorpos anti-HCV que se ligam ao epitopo do HCV, em que: (i) o epitopo do HCV compreende uma sequência de aminoácidos do isolado J1 ou J7 do HCV; (ii) a sequência de aminoácidos J1 ou J7 é diferente da sequência de aminoácidos do isolado HCV1 do HCV; e (iii) a sequência de aminoácidos J1 o J7 não é imunologicamente de reacção cruzada com o HCV1; e (b) detecção de um complexo antígeno-anticorpo compreendendo os anticorpos anti-HCV.

Também é fornecido, pela presente invenção, um método para a produção de anticorpos anti-HCV compreendendo a administração a um mamífero, de um polipéptido compreendendo uma sequência de aminoácidos do isolado J1 ou J7 do HCV, em que a sequência de aminoácidos J1 ou J7 é diferente da sequência de aminoácidos do isolado HCV1 do HCV, pelo que o mamífero produz anticorpos anti-HCV.

Uma outra concretização da presente invenção fornece um método para detectar polinucleótidos HCV numa amostra-teste compreendendo: (a) fornecimento de uma sonda compreendendo a molécula de DNA da reivindicação 1; (b) contacto da amostra teste



e sonda em condições que permitam a formação de um duplex de polinucleótidos entre a sonda e o seu complemento, na ausência da formação substancial de duplex de polinucleótidos entre a sonda e as sequências de polinucleótidos não-HCV presentes na amostra-teste; e (c) detecção de qualquer duplex de polinucleótidos compreendendo a sonda.

Ainda outra concretização da presente invenção fornece um método para a produção de um polipeptido recombinante compreendendo uma sequência de aminoácidos do HCV, compreendendo o método : (a) fornecimento de células hospedeiras transformadas por uma estrutura de DNA, compreendendo sequências controlo para a operabilidade da célula hospedeira ligada a uma sequência de código que codifica uma sequência de aminoácidos do isolado J1 ou J7 do HCV, em que a sequência de aminoácidos J1 ou J7 é diferente da sequência de aminoácidos do isolado HCV1 do HCV; (b) cultura das células hospedeiras em condições pelas quais a sequência de código é transcrita e traduzida para o polipeptido recombinante; e (c) recuperação do polipeptido recombinante.

Estas e outras concretizações da presente invenção serão evidentes para os especialistas na área em vista das seguintes descrições.

Breve Descrição das Figuras

A Figura 1 mostra a sequência consensual da cadeia que codifica um fragmento do domínio J7 C/E com as heterogeneidades.

A Figura 2 mostra a sequência consensual da cadeia que codifica um fragmento do domínio J1 E com as heterogeneidades.

A Figura 3 mostra a sequência consensual da cadeia que



codifica um fragmento do domínio J1 E/NS1 com as heterogeneidades.

A Figura 4 mostra a sequência consensual da cadeia que codifica um fragmento do domínio J1 NS3 com as heterogeneidades.

A Figura 5 mostra a sequência consensual da cadeia que codifica um fragmento do domínio J1 NS5 com as heterogeneidades.

A Figura 6 mostra a homologia da sequência consensual do J7 C/E com a sequência de nucleótidos do mesmo domínio do HCV1.

A Figura 7 mostra a homologia da sequência consensual do J1 E com a sequência de nucleótidos do mesmo domínio do HCV1.

A Figura 8 mostra a homologia da sequência consensual do J1 E/NS1 com a sequência de nucleótidos do mesmo domínio do HCV1.

A Figura 9 mostra a homologia da sequência consensual do J1 NS3 com a sequência de nucleótidos do mesmo domínio do HCV1.

A Figura 10 mostra a homologia da sequência consensual do J1 NS5 com a sequência de nucleótidos do mesmo domínio do HCV1.

A Figura 11 mostra a suposta organização genômica do genoma do HCV1.

A Figura 12 mostra a sequência de nucleótidos da ORF do HCV1. Na figura o nucleótido com o número 1 é o primeiro A de uma suposta metionina de iniciação da extensa ORF; os nucleótidos a montante deste nucleótido são indicados com números negativos.

A Figura 13 mostra a sequência consensual de uma



sequência de código de um fragmento do domínio J1 NS1 (J1 1519) com a sequência de nucleótidos do mesmo domínio do HCV1. Mostra também os aminoácidos aí codificados.

A Figura 14 mostra um composto da sequência consensual do centro até ao domínio NS1 do J1, com a sequência de nucleótidos do mesmo domínio do HCV1. Mostra também a sequência dos aminoácidos aí codificados.

A Figura 15 mostra uma sequência consensual da cadeia de código do domínio NS1 do J1, como foi determinada no Exemplo IV. Também mostra a sequência de nucleótidos do mesmo domínio do HCV1, e os aminoácidos codificados nas sequências do HCV1 e J1.

A Figura 16 mostra uma sequência consensual de uma cadeia de código da região C200 do domínio NS3-NS4 do J1. Mostra também a sequência de nucleótidos do mesmo domínio do HCV1. Também estão representados os aminoácidos codificados nas sequências.

A Figura 17 mostra uma sequência consensual da cadeia de código do domínio NS1 do J1, como foi determinada no exemplo V. Mostra também a sequência de nucleótidos do mesmo domínio do HCV1, e os aminoácidos codificados nas sequências.

A Figura 18 mostra uma sequência consensual da cadeia de código dos domínios da parte central e não traduzidos do J1. Mostra também a sequência de nucleótidos do mesmo domínio do HCV1, e os aminoácidos codificados nas sequências.

Descrição Detalhada da Invenção

A execução da presente invenção utilizará, a menos que indicado de outro modo, técnicas convencionais de biologia

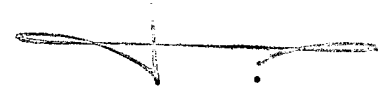
—

molecular, microbiologia, técnicas de DNA recombinante, e imunologia, que estão dentro da especialidade. Tais técnicas são explicadas integralmente na literatura. Ver e.g., Maniatis, Fitch & Sambrook, MOLECULAR CLONING; A LABORATORY MANUAL (1982); DNA CLONING, VOLUMES I AND II (D.N Glover ed. 1985); OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS (M.J. Gait ed, 1984); NUCLEIC ACID HYBRIDIZATION (B.D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); TRANSCRIPTION AND TRANSLATION (B.D. Hames & S.J. Higgins eds. 1984); ANIMAL CELL CULTURE (R.I. Freshney ed. 1986); IMMOBILIZED CELLS AND ENZYMES (IRL Press, 1986); B. Perbal, A PRACTICAL GUIDE TO MOLECULAR CLONING (1984); as series, METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.); GENE TRANSFER VECTORS FOR MAMMALIAN CELLS (J.H. Miller and M.P. Calos eds. 1987, Cold Spring Harbor Laboratory), Methods in Enzimology Vol. 154 e Vol. 155 (Wu e Grossman, e Wu, eds., respectivamente), Mayer e Walker, eds. (1987), IMMUNOCHEMICAL METHODS IN CELL AND MOLECULAR BIOLOGY (Academic Press, Londres), Scopes, (1987), PROTEIN PURIFICATION: PRINCIPLES AND PRACTICE, segunda edição (Springer-Verlag, N.Y.), e HANDBOOK OF EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY, VOLUMES I-IV (D.M. Weir e C.C. Blackwell eds. 1986). Todas as patentes, Pedidos de patentes, e outras publicações aqui mencionadas, quer supra quer infra, são por este meio aqui incorporadas como referência.

O termo "virus da hepatite C" foi destinado, pelos que trabalham nesta área, a um agente etiológico da NANBH, até agora desconhecido. Portanto, como usado aqui, "virus da hepatite C" (HCV) refere-se a um agente causador da NANBH, que foi anteriormente referido como NANBV e/ou BB-NANBV da classe do

prototipo do isolado HCV1 descrito por Houghton et al. Ver, por exemplo, a Publicação da EPO No. 318. 216, e a Patente norte americana com o No. de Série 355.002, depositada a 19 de Maio de 1989 (disponível em publicações não americanas que reivindicam prioridade a partir desta), cujas divulgações se encontram aqui incorporadas para referência. A figura 6 mostra a sequência de nucleótidos e a suposta sequência de aminoácidos do HCV1. Os termos HCV, NANBV e BB-NANBV são aqui usados permutavelmente. Como extensão desta terminologia, a doença causada pelo HCV, anteriormente chamada hepatite NANB (NANBH), é designada por hepatite C. Os termos NANBH e hepatite C podem ser aqui usados interpermutavelmente. O termo "HCV", como aqui usado, indica uma espécie de vírus cujas estirpes patogênicas causam NANBH, bem como as estirpes atenuadas ou as partículas incompletas intervenientes, suas derivadas.

O HCV é um vírus do tipo Flavi. A morfologia e constituição das partículas dos Flavivirus é conhecida e discutida por Brinton (1986) THE VIRUSES: THE TOGAVIRIDAE AND FLAVIVIRIDAE (Series eds. Fraenkel-Conrat e Wagner, vol. eds. Schlesinger e Schlesinger, Plenum Press), p.327-374. Geralmente, no que respeita à morfologia, os flavivirus contêm um nucleocapsídeo central envolvido por uma bicamada lipídica. Os viriões são esféricos e têm um diâmetro de cerca de 40-50 nm. A sua parte central tem cerca de 25-30 nm de diâmetro. Ao longo da superfície exterior do envólucro do virião existem projecções que tem cerca de 5-10 nm de comprimento com protuberâncias terminais com cerca de 2nm de diâmetro.

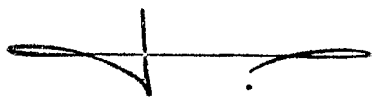


O genoma do HCV é composto por RNA. Sabe-se que os virus contendo RNA têm taxas de mutação espontânea relativamente altas i.e., na ordem de 10^{-3} a 10^{-4} por nucleótido incorporado. Por isso, existem múltiplas estirpes que podem ser virulentas ou não virulentas dentro da classe HCV ou da espécie.

Pensa-se que o genoma do isolado do HCV é composto por uma simples ORF de aproximadamente 9.000 nucleótidos a aproximadamente 12.000 nucleótidos, que codificam uma poliproteína semelhante em tamanho à do HCV1, uma poliproteína codificada com características antigénicas e hidrofóbicas semelhantes à do HCV1, e a presença de sequências de péptidos colineares que são conservados com o HCV1. Em adição, pensa-se que o genoma é uma cadeia de RNA positiva.

Os isolados do HCV compreendem epitopos que são imunologicamente de reacção cruzada com os epitopos do genoma do HCV1. Pelo menos alguns destes epitopos são únicos para o HCV quando comparados com outros flavivirus conhecidos. A especificidade do epitopo pode ser determinada pela sua reactividade imunológica com anticorpos anti-HCV, e pela falta de reactividade imunologica com anticorpos de outras espécies de Flavivirus. Métodos para determinar a reactividade imunológica são conhecidos na área, por exemplo por radioimunotestes, testes ELISA, por hemaglutinação, e vários exemplos de técnicas adequadas para os testes são aqui fornecidos.

Também se espera que a homologia total dos isolados do HCV e dos genomas do HCV1, a nível dos nucleótidos, seja provavelmente cerca de 40% ou superior, provavelmente cerca de



60% ou superior e ainda mais provavelmente cerca de 80% a 90% ou superior. Em adição, existem muitas sequências contíguas correspondentes de pelo menos cerca de 13 nucleótidos que são totalmente homólogas. A correspondência entre a sequência de um novo isolado e a sequência do HCV1 pode ser determinada por técnicas conhecidas na área. Por exemplo, pode-se detectar por comparação directa da informação da sequência do polinucleótido do novo isolado e sequências do HCV1. Alternativamente, a homologia pode ser detectada por hibridação dos polinucleótidos, sob certas condições em que se formam duplexes estáveis entre as regiões homólogas (por exemplo, aquelas que são usadas antes da digestão S1), seguida pela digestão com nucleases específicas para cadeias simples, seguida pela determinação do tamanho dos fragmentos digeridos.

Devido à relação evolucionária das estirpes ou isolados do HCV, supostas estirpes ou isolados de HCV são identificados pela sua homologia ao nível do polipéptido. Assim, espera-se que os novos isolados do HCV sejam mais do que cerca de 40% homólogos, provavelmente mais de cerca de 70% e , ainda mais provavelmente mais de 80% homólogos, e possivelmente ainda mais de cerca de 90% homólogos, ao nível do polipéptido. As técnicas para determinar a homologia da sequência de aminoácidos são conhecidas na área. Por exemplo, a sequência de aminoácidos pode ser determinada directamente e comparada com as sequências aqui fornecidas. Alternativamente a sequência de nucleótidos do material genómico do suposto HCV pode ser determinada, e a sequência de aminoácidos nele codificada pode ser determinada, e

as regiões correspondentes comparadas.

A ORF do HCV1 é mostrada na Figura 12. Os domínios do envelope e parte central, não estrutural, da poliproteína foram previstos para o HCV1 (Fig. 5). O "C" ou parte central, polipeptídeo, pensa-se ser codificado pelo terminal 5' até cerca do nucleótido 345 do HCV1. O suposto "E", ou envelope, do domínio do HCV1, pensa-se ser codificado a partir de cerca do nucleótido 346 até cerca do nucleótido 1050. O suposto domínio não-estrutural, NS1, pensa-se ser codificado a partir de cerca do nucleótido 1051 até cerca do nucleótido 1953. Para os domínios restantes, o suposto NS2 pensa-se ser codificado de cerca do nucleótido 1954 a cerca do nucleótido 3018, o suposto NS3 de cerca do nucleótido 3019 a cerca do nucleótido 4950, o suposto NS4 de cerca do nucleótido 4951 a cerca do nucleótido 6279, e o suposto NS5 de cerca do nucleótido 6298 até ao terminal 3' respectivamente. Os limites acima indicados são aproximações baseadas na análise da ORF. Os limites exactos podem ser determinados pelos especialistas na área, com vista nesta divulgação.

"HCV/J1" ou "J1" e "HCV/J7" ou "J7" referem-se aos novos isolados do HCV caracterizados pela sequência de nucleótidos aqui divulgada, bem como aos isolados relacionados que lhes são substancialmente homólogos, i.e., pelo menos cerca de 90% ou cerca de 95% ao nível de nucleótidos. Crê-se que as sequências aqui reveladas caracterizam uma subclasse do HCV que é predominante no Japão e noutros países da orla Asiática e/ou Pacífica. Isolados J1 e J7 adicionais podem ser obtidos em vista



desta divulgação e da Publicação EPO No. 318.216. Em particular, a sequência de nucleótidos J1 e J7, aqui divulgada, bem como as sequências do HCV1 da Figura 12 podem ser usadas como "primers" ou sondas, para clonar domínios J1, J7 adicionais, ou isolados adicionais.

A sequência de nucleótidos " de" uma sequência designada ou fonte, aqui usada, refere-se a uma sequência de nucleótidos que é homóloga a (i.e., idêntica) ou complementar da sequência designada ou fonte, ou sua porção. As sequências J1, aqui fornecidas, tem, no mínimo, cerca de 6 nucleótidos, preferencialmente cerca de 8 nucleótidos, preferencialmente cerca de 15 nucleótidos, e mais preferencialmente 20 nucleótidos ou mais. O comprimento máximo é o genoma viral completo.

Nalguns casos da invenção, a sequência da região da qual o polinucleótido é derivado é preferencialmente homóloga a ou complementar de uma sequência que é única para um genoma do HCV ou J1 e J7. Se a sequência é ou não única para o genoma pode ser determinado por técnicas conhecidas pelos especialistas na área. Por exemplo, a sequência pode ser comparada com sequências de bancos de dados, e.g., banco de genes, para determinar se está ou não presente no hospedeiro não infectado ou noutros organismos. A sequência também pode ser comparada com as sequências conhecidas de outros agentes virais incluindo aqueles que se sabe induzirem a hepatite, e.g., HAV, HBV e HVD, e de outros membros da Flaviviridae. A correspondência ou não da sequência derivada com outras sequências pode ser determinada também por hibridação em condições de adstringência apropriada.



Técnicas de hibridação para determinar a complementaridade das sequências de ácidos nucleicos são conhecidas na área. Ver também, por exemplo, Maniatis et al. (1982) MOLECULAR CLONING; A LABORATORY MANUAL (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y.). Em adição, incompatibilidades dos duplexes de polinucleótidos formados por hibridação podem ser determinadas por técnicas conhecidas, incluindo por exemplo, digestão com uma nuclease como a S1 que digere especificamente áreas de cadeia simples nos polinucleótidos duplexes. Regiões a partir das quais sequências de DNA típicas podem derivar incluem, mas não estão limitadas a, regiões que codificam epitopos específicos, bem como regiões não-transcritas e/ou não traduzidas.

O polinucleótido de J1 a J7 não é necessariamente derivado fisicamente da sequência de nucleótidos mostrada, mas pode ser gerado de qualquer modo, incluindo, por exemplo, síntese química ou replicação de DNA ou transcrição inversa ou transcrição. Em adição, combinações de regiões correspondentes às da sequência designada podem ser modificadas de várias maneiras de acordo com o uso pretendido. Os polinucleótidos também podem incluir um ou mais marcadores, que são conhecidos dos especialistas na área.

Uma sequência de aminoácidos "de" um polipeptídeo designado ou fonte de polipeptídeo, quer dizer que a sequência de aminoácidos é homóloga (i.e., idêntica) à sequência do polipeptídeo designado, ou sua porção. Uma sequência de aminoácidos "de" uma sequência de ácidos nucleicos designada refere-se a um polipeptídeo tendo uma sequência de aminoácidos

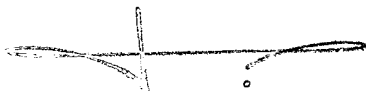


idêntica à de um polipéptido codificado na sequência, ou sua porção. As sequências de aminoácidos J1 ou J7 nos polipéptidos da presente invenção têm pelo menos cerca de 5 aminoácidos de comprimento, preferencialmente pelo menos cerca de 10 aminoácidos, mais preferencialmente pelo menos cerca de 15 aminoácidos, e mais preferencialmente pelo menos cerca de 20 aminoácidos.

Os polipéptidos da presente invenção não são necessariamente traduzidos a partir de uma sequência de ácidos nucleicos designada; os polipéptidos podem ser formados de qualquer modo, incluindo por exemplo, síntese química, ou expressão de um sistema de expressão recombinante, ou isolamento do vírus. Os polipéptidos podem incluir um ou mais análogos de aminoácidos ou aminoácidos não naturais. Os métodos de inserção de análogos de aminoácidos numa sequência são conhecidos na área. Os polipéptidos podem também incluir um ou mais marcadores, que são conhecidos dos especialistas na área.

O termo "polinucleótido recombinante", como aqui usado, pressupõe um polinucleótido de origem genômica, cDNA, semi-sintética ou sintética que, devido à sua origem ou manipulação (1) está ligado a um outro polinucleótido em vez daquele a que está ligado na natureza, ou (2) não ocorre na natureza.

O termo "polinucleótido", como aqui usado refere-se a uma forma polimérica de nucleótidos de qualquer tamanho, quer ribonucleótidos quer desoxiribonucleótidos. Este termo refere-se apenas à estrutura primária da molécula. Assim, este termo inclui DNA simples e duplo e RNA. Inclui também tipos conhecidos de



modificações, por exemplo, marcadores que são conhecidos na área, metilação, "caps", substituição de um ou mais dos nucleótidos que ocorrem naturalmente, por um análogo, modificações internucleótidos tais como, por exemplo, aqueles com ligações não carregadas (e.g., fosfonatos metil, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) e com ligações carregadas (e.g., fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), aqueles contendo porções pendentes, tais como por exemplo proteínas(incluindo e.g., nucleases, toxinas, anticorpos, péptidos sinalizadores, poli-L-lisina, etc.), os com intercaladores (e.g., acridina, psoralen, etc.), e os que contêm agentes quelantes (e.g., metais, metais radioactivos, boro, metais oxidativos, etc.), os que contêm alquiladores, aqueles com ligações modificadas (e.g., ácidos nucleicos anoméricos alfa, etc.), bem como as formas não modificadas do polinucleótido.

"Polinucleótido purificado" refere-se a uma composição compreendendo um polinucleótido especificado que é substancialmente livre de outros componentes, composição tal compreendendo tipicamente pelo menos cerca de 70% do polinucleótido especificado, mais tipicamente pelo menos cerca de 80%, 90% ou mesmo 95% a 99% do polinucleótido especificado.

"Polipéptido purificado" refere-se a uma composição compreendendo um polipéptido especificado que é substancialmente livre de outros componentes, composição tal compreendendo tipicamente pelo menos cerca de 70% do polipéptido especificado, mais tipicamente pelo menos cerca de 80%, 90% ou mesmo 95% a 99% do polipéptido especificado.



"Células hospedeiras recombinantes", "células hospedeiras", "células", "linhas celulares", "cultura de células", e outros termos tais, indicam microorganismos ou linhas celulares eucariotas superiores, cultivadas como entidades unicelulares, que podem ser ou foram usadas como recipientes para vectores recombinantes ou outro DNA de transferência, e incluem a progénie da célula original que foi transformada. Fica entendido que a progénie de uma célula parental simples pode não ser necessariamente completamente idêntica na morfologia ou no complemento do DNA total ou genómico, ao progenitor original, devido a mutações naturais, acidentais ou deliberadas.

Um "replicação" é qualquer elemento genético, e.g., um plasmídeo, um cromossoma, um vírus, um cosmídeo, etc., que se comporta como uma unidade autónoma de replicação do polinucleótido dentro da célula, i.e., capaz de se replicar sob o seu próprio controlo.

Um "vector de clonagem" é um replicação que pode transformar uma célula hospedeira seleccionada, e à qual está agarrado outro segmento polinucleotídico, de modo que provoca a replicação e/ou expressão do segmento agarrado. Tipicamente, vectores de clonagem incluem plasmídeos, vírus (e.g., vectores bacteriofágicos) e cosmídeos.

Um "vector de integração" é um vector que não se comporta como um replicação numa célula hospedeira seleccionada, mas tem a capacidade de se integrar num replicação(tipicamente um cromossoma) residente num hospedeiro seleccionado para transformar de forma estável o hospedeiro.



Um "vector de expressão" é uma construção que pode transformar uma célula hospedeira seleccionada e fornecer a expressão de uma sequência de código heteróloga no hospedeiro seleccionado. Vectores de expressão podem ser, quer um vector de clonagem quer um vector de integração.

Uma "sequência de código" é uma sequência de polinucleótidos que é transcrita no RNAm e/ou traduzida num polipéptido quando colocada sob controlo de sequências reguladoras apropriadas. Os limites da sequência de código são determinados por um codão de iniciação da tradução no terminal 5' e por um codão de terminação da tradução no terminal 3'. Uma sequência de código pode incluir, mas não está limitada a um RNAm, cDNA, e sequências de polinucleótidos recombinantes.

A "sequência de controlo" refere-se a sequências reguladoras de polinucleótidos que são necessários para a expressão das sequências de código às quais estão ligadas. A natureza de tais sequências de controlo difere dependendo do organismo hospedeiro. Nos procariotas, as sequências de controlo geralmente incluem o promotor, sitio de ligação ribossomal e os terminadores. Nos eucariotas, as sequências de controlo geralmente incluem, promotores, terminadores e nalguns casos activadores. O termo "sequências de controlo" pretende incluir, no mínimo, todos os componentes cuja presença é necessária para a expressão, e pode também incluir componentes vantajosos adicionais.

"Ligado operativamente a" refere-se a uma justaposição em que os componentes assim descritos estão numa relação



permitindo-lhes funcionar do modo pretendido. Uma sequência de controlo "ligada operativamente a" uma sequência de código está ligada de tal modo que a expressão da sequência de código é conseguida em condições compatíveis com as da sequência de controlo.

Uma "estrutura de leitura aberta" ou ORF é uma região de uma sequência de polinucleótidos que codifica um polipeptido; esta região pode compreender uma porção de uma sequência de código ou uma sequência de código total.

"Imunologicamente de reacção cruzada" refere-se a dois ou mais epitopos ou polipeptidos que estão ligados pelo mesmo anticorpo. A reactividade cruzada pode ser determinada por qualquer uma das numerosas técnicas de imunotestes, tal como o teste de competição.

O termo "anticorpo", como aqui usado refere-se a um polipeptido ou grupo de polipeptidos que compreendem pelo menos um epitopo. Um "sítio de ligação ao antígeno" é formada a partir do enrolamento dos domínios variáveis de uma molécula(s) do anticorpo para formar sítios de ligação tridimensionais com a forma da superfície interna e distribuição de cargas, complementar das características de um epitopo de um antígeno, que permite a ligação específica para formar um complexo antígeno-anticorpo. Um sítio de ligação ao antígeno pode ser formado a partir de um domínio da cadeia pesada e/ou leve (VH e VL, respectivamente), que forma ansas hipervariáveis que contribuem para a ligação ao antígeno. O termo "anticorpo" inclui sem limitações, anticorpos quiméricos, anticorpos

alterados, anticorpos univalentes, proteínas Fab e anticorpos de domínio simples. Em muitos casos, o fenómeno de ligação de anticorpos a antígenos é correspondente a outras ligações ligandos/não ligandos.

Um " anticorpo de domínio simples" (dAb) aqui usado, é um anticorpo que compreende um domínio HL que se liga especificamente a um antígeno designado. Um dAb não contém um domínio VL, mas pode conter outros domínios de ligação ao antígeno, que se sabe existirem no anticorpo, por exemplo, os domínios Kappa e lambda. Métodos para preparar DAbs são conhecidos na área. Ver, por exemplo, Ward et al., Nature 341:544(1989).

Os anticorpos também podem compreender domínios VH e VL, bem como outros domínios de ligação ao antígeno conhecidos. Exemplos destes tipos de anticorpo e métodos para a sua preparação são conhecidos na área (Ver, por exemplo a Patente Norte Americana No. 4.816.467, aqui incorporados para referência), e inclui o seguinte. Por exemplo "anticorpos de vertebrados" referem-se a anticorpos que são tetrâmeros ou seus agregados, compreendendo cadeias leves e pesadas que são geralmente agregadas numa configuração em "Y", e que pode ou não ter ligações covalentes entre as cadeias. Nos anticorpos dos vertebrados, as sequências de aminoácidos das cadeias são homólogas das sequências encontradas nos anticorpos produzidos em vertebrados, quer in situ quer in vitro (por exemplo, em hibridomas). Anticorpos de vertebrados incluem, por exemplo, anticorpos monoclonais e anticorpos policlonais purificados.



Métodos para a preparação destes são descritos infra.

"Anticorpos híbridos " são anticorpos em que as cadeias são homólogas separadamente com referência às cadeias de anticorpos de mamíferos e representam suas novas combinações, de modo que dois antígenos diferentes são precipitados pelo tetrâmero ou agregado. Nos anticorpos híbridos, um par de cadeias pesada e leve são homólogas das encontradas num anticorpo produzido contra um primeiro antígeno, enquanto um segundo par de cadeias são homólogas das encontradas num segundo anticorpo produzido contra um segundo antígeno. Isto resulta na propriedade da "bivalência", i.e., a capacidade de ligar dois antígenos simultaneamente. Tais híbridos podem ser também formados usando cadeias quiméricas como indicado abaixo.

"Anticorpos quiméricos" referem-se a anticorpos nos quais as cadeias pesada e /ou leve são proteínas de fusão. Tipicamente, uma porção das sequências de aminoácidos da cadeia é homóloga das sequências correspondentes num anticorpo derivado de uma espécie particular ou classe particular, enquanto o segmento restante da cadeia é homólogo das sequências derivadas de outra espécie e/ou classe. Usualmente, a região variável de ambas as cadeias leve e pesada é uma cópia das regiões variáveis ou dos anticorpos de uma espécie de vertebrados, enquanto as porções constantes são homólogas das sequências nos anticorpos derivados de uma outra espécie de vertebrados. Contudo, a definição não é limitada a este exemplo particular. Também é incluído qualquer anticorpo no qual qualquer uma ou ambas as cadeias pesada e leve, são compostas de combinações de sequências copiando as sequências

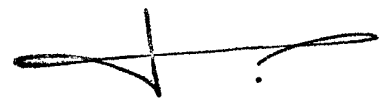
nos anticorpos de diferentes origens, quer essas fontes sejam de classes divergentes ou espécies diferentes de origem, e quer ou não o ponto de fusão se encontre na ligação variável/constante. Assim, é possível produzir anticorpos nos quais nem a região constante nem a variável sejam cópias de sequências de anticorpos conhecidos. Torna-se assim possível, por exemplo, construir um anticorpo cuja região variável tenha uma afinidade específica superior para um antígeno particular, ou cuja região constante possa melhorar a fixação do complemento, ou fazer outros melhoramentos das propriedades possuídas por uma região constante particular.

Outro exemplo consiste nos "anticorpos alterados" que se refere a anticorpos nos quais a sequência de aminoácidos que ocorre naturalmente num anticorpo de vertebrados foi variada. Utilizando técnicas de DNA recombinante, o anticorpo pode ser redelineado para obter as características desejadas. As variações possíveis são muitas e o alcance das mudanças pode ir de um ou mais aminoácidos até à re-concepção completa de uma região, por exemplo, região constante. Alterações na região constante, em geral, para obter as características dos processos celulares desejados, e.g., alterações na fixação do complemento, interação com membranas e outras funções efectoras. Alterações na região variável podem ser feitas para alterar as características da ligação ao antígeno. O anticorpo pode também ser concebido para ajudar a libertação específica de uma molécula ou substância para uma célula específica ou tecido localizado. As alterações desejadas podem ser feitas por técnicas conhecidas na biologia

molescular e.g., técnicas de recombinação, mutagénese localmente dirigida, etc.

Ainda outro exemplo são "anticorpos univalentes", que são agregados compostos por um dímero de cadeia-pesada/ cadeia-leve ligado à região Fc (i.e., tronco) de uma segunda cadeia pesada. Este tipo de anticorpos evita a modulação antigénica. Ver, e.g., Glennie et al. Nature 295:712(1982). Introduzidos dentro da definição de anticorpo, estão os fragmentos de anticorpo "Fab". A região "Fab" refere-se às porções das cadeias leve e pesada que são aproximadamente equivalentes, ou análogas, das sequências que compõem a porção do ramo das cadeias leve e pesada, e que mostraram exibir ligações imunológicas para um antígeno específico, mas a que falta a porção efectora Fc. "Fab" inclui agregados de uma cadeia leve e uma cadeia pesada (usualmente conhecidas como Fab'), bem como os tetrameros contendo as cadeias 2H e 2L (referidas como F(ab)₂), que são capazes de reagir selectivamente com um antígeno designado ou família de antígenos. Anticorpos Fab podem ser divididos em sub-grupos análogos dos descritos acima, i.e., "Fab de vertebrados", "Fab híbridos", "Fab quiméricos", e "Fab alterados". Métodos de produção de fragmentos Fab de anticorpos são conhecidos na área e incluem, por exemplo, proteólise, e síntese por técnicas de recombinação.

"Epitopo" refere-se a um sítio de ligação ao anticorpo usualmente definido por um polipeptido, mas também por haptenos não aminoacídicos. Um epitopo pode compreender três aminoácidos numa conformação espacial que é única para o epitopo, sendo



geralmente um epitopo composto por, pelo menos, 5 de tais aminoácidos, e mais usualmente consiste em pelo menos 8-10 de tais aminoácidos.

"Complexo anticorpo-antigénio" refere-se a um complexo formado por um anticorpo que se liga especificamente a um epitopo num antigénio.

"Polipéptido imunogénico" refere-se a um polipéptido que produz uma resposta imune celular e/ou humoral num mamífero, quer só, quer ligado a um transportador, na presença ou ausência de adjuvante.

"Polipéptido" refere-se a um polímero de aminoácidos e não refere um comprimento específico da molécula. Assim, péptidos, oligopéptidos, e proteínas estão incluídos dentro da definição de polipéptido. Este termo também não se refere ou exclui a expressão posterior de modificações dos polipéptidos, por exemplo, glicosilação, acetilação, fosforilação e semelhantes. Estão incluídos dentro da definição, por exemplo, polipéptidos contendo um ou mais análogos de um aminoácido (incluindo por exemplo, aminoácidos não naturais, etc.), polipéptidos com ligações substituídas, bem como outras modificações conhecidas na área, quer ocorrendo naturalmente quer ocorrendo não naturalmente.

"Transformação" como usado aqui, refere-se à inserção de um polinucleótido exógeno numa célula hospedeira, independentemente do método usado para a inserção, por exemplo, retirada, transdução, combinação-f ou electroporação. O polinucleótido exógeno pode ser mantido como um vector não-



integrado, por exemplo, um plasmideo, ou alternativamente pode ser integrado no genoma do hospedeiro.

Uma célula hospedeira "transformada" refere-se quer à célula directa que sofreu a transformação quer à sua progenia que mantém o polinucleótido exógeno original.

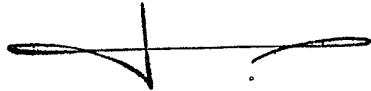
"Tratamento", como aqui usado, refere-se à profilaxia e/ou terapia.

"Indivíduo" refere-se a vertebrados, particularmente membros de espécies de mamíferos e inclui mas não está limitado a, animais domésticos, animais para desportos, e primatas incluindo o homem.

O "sentido da cadeia" refere-se à cadeia da molécula de DNA de cadeia dupla que é homóloga de um RNAm transcrita a partir dela. O "sentido anti-sentido" contém a sequência que é complementar da do "sentido da cadeia".

"Componente do corpo contendo o anticorpo" refere-se a um componente do corpo de um indivíduo que é origem dos anticorpos com interesse. Componentes do corpo contendo o anticorpo são conhecidos na área, e incluem mas não estão limitados a, sangue completo e seus componentes, plasma, soro, fluido medular, fluido linfático, seções externas do tracto genito-urinário, intestinal e respiratório, lágrimas, saliva, leite, glóbulos brancos e mielomas.

Isolados do "HCV purificados" referem-se a uma preparação de partículas do HCV que foram isoladas dos constituintes celulares com que o vírus é normalmente associado, e a partir de outros tipos de vírus que se podem encontrar nos



tecidos infectados. As técnicas de isolamento de vírus são conhecidas dos especialistas da área e incluem, por exemplo, centrifugação, e cromatografia de afinidade.

Uma "partícula" do HCV é um virião inteiro, bem como as partículas que são intermediárias na formação do virião. As partículas do HCV geralmente têm uma ou mais proteínas do HCV associadas ao ácido nucleico do HCV.

"Sonda" refere-se a um polinucleótido que forma uma estrutura híbrida com uma sequência num alvo polinucleotídico, devido à complementaridade de, pelo menos, uma região na sonda com a região no alvo.

"Amostra biológica" refere-se à amostra de tecido ou fluido, isolado a partir de um indivíduo, incluindo mas não limitado a, por exemplo, sangue completo, e seus componentes, plasma, soro, fluido medular, fluido linfático, e secções externas do tracto genito-urinário, intestinal, respiratório, lágrimas, saliva, leite, células sanguíneas, tumores, e também amostras de constituintes de culturas de células in vitro (incluindo, mas não estando limitado a, meio condicionado resultante do crescimento das células no meio de cultura celular, supostamente de células infectadas pelo vírus, células recombinantes e componentes celulares).

A invenção refere-se ao isolamento e caracterização de um isolado do HCV recentemente descoberto, J1 e J7, suas sequências nucleotídicas, sua sequência de proteínas e polinucleótidos resultantes, polipéptidos e anticorpos seus derivados. Os isolados J1 e J7 são novos nas suas sequências de



aminoácidos e nucleótidos, e pensa-se que são característicos dos isolados do HCV do Japão e outros países asiáticos.

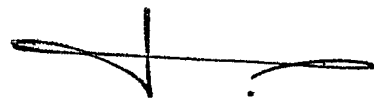
As sequências de nucleótidos derivadas do HCV/J1 e HCV/J7 são úteis como sondas para diagnosticar a presença do vírus nas amostras, e para isolar outras variantes de vírus que ocorrem naturalmente. Estas sequências de nucleótidos também tornam disponíveis sequências polipeptídicas dos antígenos de HCV, codificadas dentro do genoma J1 e J7, e permite a produção de polipéptidos que são úteis como padrões ou reagentes nos testes de diagnóstico e/ou como componentes de vacinas. Anticorpos, quer policlonais quer monoclonais, dirigidos contra os epítopos do HCV, contidos dentro destas sequências polipeptídicas, são também úteis para testes de diagnóstico, como agentes terapêuticos, para pesquisa de agentes antivirais, e para o isolamento do vírus da NANBH. Em adição, utilizando sondas derivadas das sequências aqui divulgadas, é possível isolar e sequenciar outras porções do genoma J1 e J7, aumentando assim as sondas adicionais e polipéptidos úteis no diagnóstico e /ou tratamento, quer profilático quer terapêutico da NANBH.

A disponibilidade das sequências de nucleótidos do HCV/J1 e HCV/J7 permite a construção de sondas de polinucleótidos e polipéptidos úteis no diagnóstico da NANBH devido à infecção por HCV e na pesquisa na infecção nos dadores de sangue, bem como no sangue doado e nos produtos sanguíneos. Por exemplo, a partir das sequências é possível sintetizar oligómeros de DNA com cerca de 8-10 nucleótidos, ou maiores, que são úteis como sondas de hibridação para detectar a presença de RNA do HCV em, por

exemplo, soro de sujeitos que se suspeita albergarem o vírus, ou para pesquisar o sangue doado quanto à presença do vírus. As sequências HCV/J1 e HCV/J7 também permitem a concepção e produção de polipéptidos específicos do HCV que são úteis como reagentes de diagnóstico quanto à presença de anticorpos formados durante a NANBH. Também podem ser usados anticorpos para os polipéptidos purificados derivados das sequências HCV/J1 e HCV/J7, para detectar antígenos virais nos indivíduos e sangue infectados.

O conhecimento destas sequências do HCV/J1 e HCV/J7 também permite a concepção e produção de polipéptidos que possam ser usados como vacinas contra o HCV e também para a produção dos anticorpos, que por sua vez possam ser usados para protecção contra a doença, e /ou para terapia dos indivíduos infectados com HCV. Mais ainda, as sequências do HCV/J1 e HCV/J7 divulgadas permitem uma caracterização adicional do genoma do HCV. Sondas de polinucleótidos derivadas dessas sequências, bem como do genoma do HCV, podem ser usadas para pesquisar o partrimónio do cDNA para as sequências do cDNA viral adicional, que por sua vez pode ser usado para obter sequências sobrepostas adicionais. Ver, e.g., Pub. EPO No. 318.216.

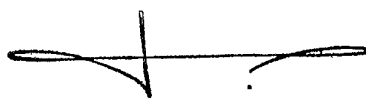
As sequências de polinucleótidos do HCV/J1 e HCV/J7, os polipéptidos daí derivados, e os anticorpos dirigidos contra esses polipéptidos, são úteis no isolamento e identificação do(s) agente(s) BB-NANBV. Por exemplo, anticorpos dirigidos contra os epitopos do HCV, contidos nos polipéptidos derivados das sequências do HCV/J1, podem ser usados em processos baseados na afinidade cromatográfica para isolar o vírus. Alternativamente,



os anticorpos podem ser usados para identificar partículas virais isoladas por outras técnicas. Os antígenos virais e o material genómico dentro das partículas virais isoladas pode ser posteriormente caracterizado.

A informação obtida da sequenciação posterior do genoma do HCV/J1 e HCV/J7, bem como da caracterização adicional dos antígenos do HCV/J1 e HCV/J7 e a caracterização dos genomas, permite a concepção e síntese de sondas adicionais e polipéptidos e anticorpos que podem ser usados para diagnóstico, para prevenção, e para terapia da NANBH induzida pelo HCV, e para pesquisa de produtos relacionados com o sangue e de sangue infectado.

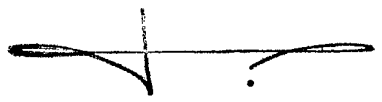
O conhecimento das sequências do cDNA do HCV/J1 e HCV/J7 permite a construção de vectores de expressão que codificam regiões antigenicamente activas do polipéptido codificado em qualquer uma das cadeias. Estas regiões antigenicamente activas podem ser derivadas do revestimento ou dos antígenos do envelope ou dos antígenos da parte central, ou dos antígenos que são não estruturais incluindo, por exemplo, proteínas ligadas a polinucleótidos, polimerase(s) polinucleotídicas, e outras proteínas virais necessárias para a replicação e/ou montagem da partícula do vírus. Os fragmentos que codificam os polipéptidos desejados são derivados dos clones de cDNA usando a digestão de restrição convencional ou por métodos sintéticos, e são ligados a vectores que podem, por exemplo, conter porções das sequências de fusão como beta-galactosidase ou superóxido dismutase (SOD). Métodos e vectores que são úteis



para a produção dos polipéptidos que contêm sequências de fusão do SOD são descritas na Pub. EPO No 196.056. Os vectores que codificam os polipéptidos de fusão do SOD e polipéptidos do HCV são descritos na EPO Pub. No 318.216. Qualquer porção desejada do cDNA do HCV contendo uma estrutura de leitura aberta, em qualquer sentido das cadeias, pode ser obtida como um polipéptido recombinante, tal como uma proteína madura ou de fusão. Alternativamente, um polipéptido codificado no cDNA pode ser fornecido por síntese química.

O DNA que codifica o polipéptido desejado, quer na forma madura quer fundido, e quer contendo ou não a sequência sinal para permitir a secreção, pode ser ligado a vectores de expressão adequados para qualquer hospedeiro conveniente. Ambos os sistemas hospedeiros eucarióticos e procarióticos são presentemente usados na formação de polipéptidos recombinantes, e um sumário de alguns dos sistemas de controlo e células hospedeiras mais comuns é indicado a seguir. O polipéptido produzido em tais células hospedeiras é a seguir isolado das células lisadas ou do meio de cultura, e purificado até à dimensão necessária para o uso pretendido. A purificação pode ser através de técnicas conhecidas na área, por exemplo, extracção diferencial, fraccionamento salino, cromatografia em resina de troca iónica, cromatografia de afinidade, centrifugação e semelhantes. Ver, por exemplo, Methods in Enzimology para uma variedade de métodos de purificação de proteínas.

Tais polipéptidos do HCV sintéticos ou recombinantes podem ser usados como diagnóstico, ou aqueles que dão origem a

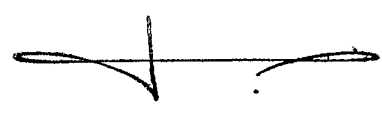


anticorpos neutralizantes podem ser formulados em vacinas. Anticorpos criados contra tais polipéptidos podem também ser usados como diagnóstico ou para imunoterapia passiva. Em adição, anticorpos para tais polipéptidos são úteis no isolamento e identificação das partículas do HCV.

Os antígenos HCV podem também ser isolados dos viriões do HCV. Os viriões podem crescer em células infectadas com HCV em cultura de tecidos, ou num hospedeiro infectado.

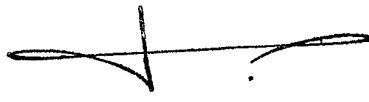
Enquanto os polipéptidos da presente invenção podem compreender um domínio viral substancialmente completo em muitas aplicações, o que é necessário é que o polipéptido compreenda uma região antigénica ou imunogénica do vírus. Uma região antigénica de um polipéptido é geralmente pequena -- tipicamente de 8 a 10 aminoácidos ou menos de comprimento. Fragmentos de poucos como 5 aminoácidos podem caracterizar uma região antigénica. Estes segmentos podem corresponder a regiões dos epitopos HCV/J1 ou HCV/J7. Portanto, usando os cDNA dos HCV/J1 e HCV/J7 como base, os DNA que codificam os pequenos segmentos dos polipéptidos dos HCV/J1 e HCV/J7 podem ser expressos recombinadamente, quer como proteínas de fusão, quer como polipéptidos isolados. Em adição, curtas sequências de aminoácidos podem ser convenientemente obtidas por síntese química.

Nos casos em que o polipéptido sintetizado tem a configuração correcta para fornecer o epitopo correcto, mas é pequeno demais para ser imunogénico, o polipéptido pode ser ligado a um transportador adequado. Conhece-se na área, um grande número de técnicas para obtenção de tais ligações, incluindo a



formação de ligações disulfeto usando N-succinidil-3-(2-piridil-tio)propionato (SPDP) e succinimidil-4-(N-maleimido-metil)ciclohexano-1-carboxilato (SMCC) obtido da Pierce Company, Rockford, Illinois, (se falta ao péptido um grupo sulfidril, este pode ser fornecido por adição de resíduos de cisteína). Estes reagentes criam uma ligação disulfeto entre eles próprios, e os resíduos de cisteína do péptido de uma proteína e uma ligação amida através do epsilon-amino numa lisina, ou outro grupo amino livre . Conhece-se uma grande variedade de tais agentes de formação -amida/dissulfeto. Ver, por exemplo, Immun. Rev. (1982) 62:185. Outros agentes de ligação bifuncional formam uma ligação tioeter em vez de uma dissulfeto. Muitos destes agentes de formação tio-eter são comercialmente disponíveis e incluem ésteres reactivos de ácido 6-maleimidocaproico, ácido 2-bromoacético; ácido 2-iodoacético, ácido 4-(N-maleimido-metil)ciclo hexano-1-carboxílico, e semelhantes. Os grupos carboxil podem ser activados combinando-os com succinimeto ou ácido 1-hidroxil-2-ditro-4-sulfónico, sal de sódio. Métodos adicionais de emparelhar os antígenos utilizam o sistema rotavírus/"péptidos de ligação" descrito em Pub EPO No 259.149, cuja divulgação é aqui incorporada para referência. A lista seguinte não pretende ser exaustiva, e as modificações dos compostos referidos podem ser facilmente usadas.

Qualquer transportador pode ser usado desde que não induza a produção de anticorpos prejudiciais ao hospedeiro. Transportadores adequados são tipicamente grandes, macromoléculas lentamente metabolizadas como proteínas, polisacáridos como



sefaroze funcionalizada em latex, agarose, celulose, contas de celulose e semelhantes; aminoácidos poliméricos como ácido poliglutâmico, polilisina, e semelhantes, copolímeros de aminoácidos, e partículas de virus inactivos. Especialmente, substratos proteicos úteis são a albumina do soro, hemacianina de lapas, moléculas de imunoglobulinas, tiroglobulinas, ovalbumina, toxoide de tetano, e outras proteínas bem conhecidas dos especialistas na área.

Em adição às proteínas virais completas, polipéptidos compreendendo as sequências de aminoácidos do HCV truncado, codificando, pelo menos, um epitopo viral são reagentes imunologicamente úteis. Por exemplo, polipéptidos compreendendo tais sequências truncadas podem ser usados como reagentes num imunoteste. Estes polipéptidos são também antígenos de subunidades candidatas em composições para produzir antisoro ou vacinas. Enquanto que estas sequências truncadas podem ser produzidas por vários tratamentos conhecidos da proteína viral nativa, é geralmente preferível conceber polipéptidos sintéticos ou recombinantes compreendendo uma sequência do HCV. Polipéptidos compreendendo estas sequências truncadas do HCV podem ser feitas inteiramente a partir das sequências do HCV (um ou mais epitopos, quer sequências contíguas quer não-contíguas), ou sequências do HCV e sequências heterólogas numa proteína de fusão. Sequências heterólogas úteis incluem as sequências que fornecem a secreção de um hospedeiro recombinante, aumentando a reactividade imunológica do(s) epitopo(s) do HCV, ou facilitando o emparelhamento do polipéptido a um suporte do imunoteste ou



transportador da vacina. Ver, e.g., Pub. EPO No. 116.201; Patente Norte-Americana No. 4.722.840; Pub EPO No. 259.149; Patente Norte-Americana No. 4.629.783, que são aqui incorporadas para referência.

O tamanho do polipeptídeo compreendendo as sequências do HCV truncadas, pode variar grandemente, sendo o tamanho mínimo uma sequência de tamanho suficiente para fornecer um epitopo do HCV, enquanto o tamanho máximo não é crítico. Nalguns casos, o tamanho máximo usualmente não é substancialmente maior que o necessário para fornecer os epitopos do HCV desejados e a(s) função(ões) da sequência heterologa, se existir. Tipicamente, a sequência de aminoácidos truncada do HCV terá cerca de 5 a cerca de 100 aminoácidos de comprimento. Mais tipicamente, contudo, a sequência do HCV terá um máximo de cerca de 50 aminoácidos de comprimento, preferencialmente um máximo de cerca de 30 aminoácidos. Usualmente é desejável seleccionar sequências do HCV de, pelo menos, cerca de 10, 12 ou 15 aminoácidos até um máximo de cerca de 20 ou 25 aminoácidos.

Sequências de aminoácidos do HCV truncadas compreendendo os epitopos podem ser identificadas de vários modos. Por exemplo, a sequência da proteína viral completa pode ser pesquisada, preparando uma série de pequenos péptidos que juntos abrangem a sequência inteira da proteína. Começando com, por exemplo, polipeptídeos de 100-mero, seria rotina testar cada polipeptídeo quanto à presença do epitopo(s), mostrando a reactividade desejada, e depois testando progressivamente fragmentos mais pequenos e sobrepostos a partir de um 100-mero

identificado para mapear o epitopo com interesse. A pesquisa de tais péptidos num imunoteste está dentro da especialidade. Também é conhecida a análise por computador de uma sequência da proteína para identificar os epitopos potenciais, e depois preparar os oligopéptidos compreendendo as regiões identificadas para pesquisa. Sabe-se, pelos especialistas na área, que tal análise por computador da antigenicidade nem sempre identifica um epitopo que existe realmente, e pode também identificar incorrectamente uma região da proteína como contendo um epitopo.

A relação observada das supostas poliproteínas do HCV e dos Flavivirus permite prever os domínios supostos das proteínas "não estruturais" (NS) do HCV. A localização das proteínas individuais NS, na suposta poliproteína precursora dos Flavivirus, é bastante bem conhecida. Mais ainda, isto também coincide com as flutuações maciças observadas no perfil de hidrofobicidade da poliproteína. Ficou estabelecido que a NS5 dos Flavivirus codifica a polimerase do virião, e que NS1 corresponde a um antigénio de fixação ao complemento que mostrou ser eficaz em vacinas nos animais. Recentemente, mostrou-se que a função protease dos Flavivirus reside no NS3. Devido às semelhanças observadas entre o HCV e o Flavivirus, são possíveis as deduções respeitantes à localização aproximada dos domínios das proteínas correspondentes e funções na poliproteína do HCV. A Figura 11 é um esquema do suposto domínio da poliproteína do HCV. A expressão dos polipéptidos contendo estes domínios numa grande variedade de hospedeiros recombinantes, incluindo, por exemplo, bactérias, leveduras, células de vertebrados e insectos, deve produzir



reagentes imunológicos importantes que podem ser usados para diagnóstico, detecção e vacinas.

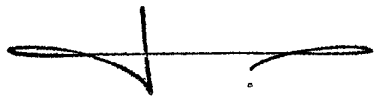
Apesar da região da proteína não estrutural das supostas poliproteínas do isolado do HCV aqui descrito e do Flavivirus, parecer ser geralmente semelhante, existem menos semelhanças entre as supostas regiões estruturais na direcção do terminal-N. Nesta região, há uma grande divergência na sequência, e em adição, o perfil hidrofóbico das duas regiões mostra menos semelhanças. Esta "divergência" começa na região do terminal-N do suposto domínio NS1 do HCV, e estende-se até à presumível terminação-N. Mesmo assim, ainda é possível prever a localização aproximada dos domínios do suposto nucleocapsídeo (domínio básico do terminal-N) e do E (geralmente hidrofóbico) dentro da poliproteína do HCV. Destas previsões é possível identificar regiões aproximadas da poliproteína do HCV, que podem corresponder a reagentes imunológicos úteis. Por exemplo, sabe-se que as proteínas E e NS1 dos Flavivirus são eficazes como vacinas protectoras. Estas regiões, bem como algumas que mostraram ser antigénicas no HCV1, por exemplo, as dentro das supostas NS3, C, e NS5, etc, devem também fornecer reagentes de diagnóstico.

A imunogenicidade das sequências do HCV pode ser aumentada, preparando as sequências fundidas, ou reunidas com proteínas formadoras de partículas como, por exemplo, antígenos de superfície da hepatite B ou antígenos VP6 do rotavirus. Construções em que o epitopo do HCV está ligado directamente à sequência que codifica as proteínas formadoras de partículas, produzem híbridos que são imunogénicos no que diz respeito ao



epitopo do HCV. Em adição, todos os vectores preparados incluem epitopos específicos para o HBV, possuindo vários graus de imunogenicidade, tal como por exemplo, o péptido pre-S. Assim, as partículas construídas a partir de proteínas formadoras de partículas, que incluem sequências do HCV são imunogénicas no que respeita ao HCV e a proteína formadora de partículas. Ver, por exemplo, a Patente Norte-Americana No. 4.722.840; a Pub EPO No. 175.261; a Pub EPO No. 259.149; Michelle et al. (1984) Int. Symposium on Viral Hepatitis.

As vacinas podem ser preparadas a partir de um ou mais polipéptidos imunogénicos derivados do HCV/J1 ou HCV/J7. A homologia observada entre o HCV e os Flavivirus, fornece a informação respeitante aos polipéptidos que parecem ser os mais eficazes como vacinas, bem como as regiões do genoma nos quais estão codificados. A estrutura geral do genoma dos Flavivirus é discutida em Rice et al. (1986) em THE VIRUSES; THE TOGA VIRIDAE AND FLAVIVIRIDAE (Series eds Fraenkel-Conrat e Wagner, Vol eds Schlesinger and Schlesinger, Plenum Press). Pensa-se que o RNA genómico dos Flavivirus é a única espécie de RNAm específico de vírus, e que é traduzido nas três proteínas estruturais virais, i.e., C, M, e E, bem como nas duas grandes proteínas não estruturais, NV4 e NV5, e num conjunto complexo de pequenas proteínas não estruturais. Sabe-se que os epitopos neutralizadores maiores para os Flavivirus se encontram na proteína E (envelope). Roehrig (1986) em THE VIRUSES: THE TOGA VIRIDAE AND FLAVIVIRIDAE (Series eds Fraenkel-Conrat e Wagner, Vol eds Schlesinger and Schlesinger, Plenum Press). O



gene do HCV E correspondente e a região que codifica o polipéptido pode ser previsto, baseando-se na homologia dos Flavivirus. Assim, as vacinas podem ser compostas por polipéptidos recombinantes contendo os epitopos do HCVE. Estes polipéptidos podem ser expressados em bactérias, leveduras, ou células de mamíferos, ou, alternativamente, podem ser isolados de preparações virais. Prevê-se, também, que outras proteínas estruturais possam conter epitopos que produzam anticorpos anti-HCV protectores. Assim, os polipéptidos contendo os epitopos do E, C, e M podem também ser usados, quer isoladamente quer em combinações nas vacinas do HCV.

Em adição ao indicado acima, mostrou-se que a imunização com NS1 (proteína não estrutural 1) resulta na protecção contra a febre amarela. Schlesinger et al. (1986) J. Virol 60:1153. Isto é verdade embora a imunização não produza anticorpos neutralizantes. Assim, particularmente uma vez que estas proteínas parecem ser grandemente conservadas entre os Flavivirus, é provável que a NS1 do HCV também seja protectora contra infecções por HCV. Mais ainda, também mostra que as proteínas não estruturais podem fornecer protecção contra patogenicidades virais, mesmo que não provoquem a produção de anticorpos neutralizantes.

Em vista do acima descrito, vacinas multivalentes contra o HCV podem compreender um ou mais epitopos de uma ou mais proteínas estruturais, e/ou um ou mais epitopos de uma ou mais proteínas não estruturais. Estas vacinas podem compreender, por exemplo, polipéptidos do HCV recombinantes e/ou polipéptidos

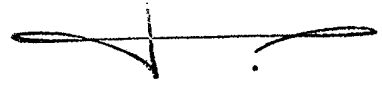


isolados de viriões. Em particular, as vacinas pretendem ser compostas por uma ou mais das seguintes proteínas do HCV, ou subunidades de antígenos seus derivados: E, NS1, C, NS2, NS3, NS4, e NS5. Particularmente, são preferidas as vacinas compreendendo a E e/ou NS1, ou suas sub-unidades. Em adição, é possível usar o HCV inativado em vacinas, podendo a inactivação ser por preparação de lisados virais ou por outros meios conhecidos na área, de modo a causar a inactivação dos Flavivirus, por exemplo, tratamento com solventes orgânicos ou detergentes, ou tratamento com formalina. Mais ainda, as vacinas podem ser preparadas a partir de estirpes do HCV atenuadas ou vírus híbridos como vectores de varíola, conhecidos na área [Brown et al. Nature 319:549-550(1986)].

A preparação de vacinas que contêm polipéptido(s) imunogénico(s) como ingredientes activos é conhecida dos especialistas na área. Tipicamente, tais vacinas são preparadas quer como injectáveis, quer como soluções líquidas ou suspensões; também podem ser preparadas formas sólidas adequadas à solução em, ou suspensão em, líquidos anteriormente à injeção. A preparação pode ser emulsionada, ou a proteína encapsulada em lipossomas. Os ingredientes imunogénicos activos são frequentemente misturados com excipientes que são farmacêuticamente aceitáveis e compatíveis com o ingrediente activo. Excipientes adequados são, por exemplo, água, solução salina, dextrose, glicerol, etanol ou semelhantes e suas combinações. Em adição, se desejável, as vacinas podem conter quantidades menores de substâncias auxiliares como agentes

humidificantes ou emulsionantes, agentes tamponantes do pH, e/ou adjuvantes que aumentam a eficácia da vacina. Exemplos de adjuvantes que podem ser eficazes incluem, mas não estão limitados a : hidróxido de alumínio, N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-nor-muramil-L-alanil-D-isoglutamina (CGP 11637, referido como nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicerol-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina (CGP 19835A, referido como MTP-PE), e RIBI, que contem três componentes extraídos de bactérias, lipido A monofosforil, dimicolato trealose e esqueleto da parede celular (MPL+TDM+CWS) numa emulsão de squalene/Tween 80 a 2% . A eficácia de um adjuvante pode ser determinada pela medição da quantidade de anticorpos dirigidos contra um polipeptido imunogénico contendo uma sequência antigénica do HCV, resultante da administração deste polipeptido em vacinas que também são compostas por vários adjuvantes.

As vacinas são convencionalmente administradas por via parental, ou por injeção, normalmente quer subcutânea quer intramuscularmente. Formulações adicionais que são adequadas a outros modos de administração incluem supositórios e, nalguns casos, formulações orais. Para os supositórios, ligantes tradicionais e transportadores podem incluir, por exemplo, polialquilenos glicóis ou triglicéridos; tais supositórios podem ser formados a partir de misturas contendo os ingredientes activos na ordem de 0.5% a 10%, preferencialmente 1%-2% . Formulações orais incluem excipientes normalmente empregues como, por exemplo, gradientes farmacêuticos de manitol, lactose,



amido, estearato de magnésio, sacarina sódica, celulose, carbonato de magnésio e semelhantes. Estas composições tomam a forma de soluções, suspensões, comprimidos, pilulas, cápsulas, formulações de libertação constante ou pós, e contêm 10%-95% do ingrediente activo, preferencialmente 25%-70%.

As proteínas podem ser formuladas em vacinas, como formas salinas ou neutras. Sais farmacêuticamente aceitáveis incluem os sais de adição ácida (formados com grupos amino livres do péptido) e que são formados por ácidos inorgânicos como, por exemplo, ácido fosfórico ou clorídrico, ou ácidos orgânicos como o acético, oxálico, tartárico, maleico, e semelhantes. Os sais formados com os grupos carboxil livres podem ser também derivados de bases inorgânicas como, por exemplo, sódio, potássio, amónia, cálcio ou hidróxidos férricos, e bases orgânicas como isopropilamina, trimetilamina, etanol 2-etilamino, histidina, procaina e semelhantes.

As vacinas são administradas de forma compatível com a formulação da dose, e numa tal quantidade que será profilaticamente e/ou terapêuticamente eficaz. A quantidade a ser administrada, que é geralmente na ordem de 5 microgramas a 250 microgramas de antigénio por dose, depende do sujeito do tratamento, capacidade do sistema imune do sujeito para a síntese de anticorpos e grau de protecção desejado. As quantidades precisas do ingrediente activo necessário para a administração podem depender da decisão do clínico e serem características de cada sujeito.

A vacina pode ser dada num programa de dose única, ou,



preferencialmente, de dose múltipla. Um programa de dose múltipla é aquele em que uma série principal de vacinação pode ser formada por 1-10 doses separadas, seguida de outras doses dadas em intervalos de tempo subsequentes, necessários para manter ou reforçar a resposta imune, por exemplo, de 1-4 meses para uma segunda dose, e, se necessário, dose(s) subsequentes após vários meses. O regime de dosagem também será, pelo menos em parte, determinado pela necessidade do individuo e estará dependente da decisão do clinico.

Em adição, a vacina contendo o(s) antigénio(s) do HCV imunogénico(s) pode ser administrada em conjunto com outros agentes imunoreguladores, por exemplo, imunoglobulinas.

Os polipéptidos imunogénicos, preparados como foi descrito acima, são usados para produzir anticorpos quer policlonais quer monoclonais. Se se desejar anticorpos policlonais, um mamifero seleccionado (e.g., rato, coelho, cabra, cavalo, etc.) é imunizado com um polipéptido imunogénico transportando o(s) epitopo(s) do HCV. O soro dos animais imunizados é recolhido e tratado de acordo com os processos conhecidos. Se o soro que contém os anticorpos policlonais para o epitopo do HCV, contém anticorpos para outros antigénios, os anticorpos policlonais podem ser purificados por cromatografia de imunoafinidade. Técnicas para a produção e processamento de antisoro policlonal são conhecidas na área, ver por exemplo, Mayer e Walker, eds. (1987) IMMUNOCHEMICAL METHODS IN CELL AND MOLECULAR BIOLOGY (Academic Press, London).

Os anticorpos monoclonais dirigidos contra epitopos do



HCV podem ser prontamente produzidos pelos especialistas na área. A metodologia geral, para produzir anticorpos monoclonais por hibridoma é bem conhecida. Linhas celulares produtoras de anticorpos imortais podem ser criadas por fusão celular, e também por outras técnicas como transformação directa de linfócitos B com DNA oncogénico, ou transfecção com vírus Epstein-Barr. Ver, e.g., M. Schreier et al.(1980) HYBRIDOMA TECHNIQUES; Hammerling et al.(1981), MONOCLONAL ANTIBODIES AND T-CELL HYBRIDOMAS; Kennett et al. (1980) MONOCLONAL ANTIBODIES; ver também, Patente Norte Americana No. 4.341.761; 4.399.121; 4.427.783; 4.444.887; 4.466.917; 4.472.500; 4.491.632; e 4.493.890. Paineis de anticorpos monoclonais, produzidos contra epitopos do HCV podem ser pesquisados quanto a várias propriedades, i.e., para isotipos, afinidade de epitopos, etc.

Anticorpos quer monoclonais quer policlonais, que são dirigidos contra epitopos do HCV, são particularmente úteis no diagnóstico, e os que são neutralizadores são úteis em imunoterapia passiva. Anticorpos monoclonais, em particular, podem ser usados para aumentar os anticorpos anti-idiotipo.

Anticorpos anti-idiotipos são imunoglobulinas que possuem uma "imagem interna" do antígeno do agente infeccioso contra o qual se deseja a protecção. As técnicas para aumentar anticorpos anti-idiotipo são conhecidas no ramo. Ver, por exemplo, Grzych (1985), Nature 316:74; MacNamara et al. (1984), Science 224:1325, Ytdehaag et al (1985), J. Immunol. 134:1225. Estes anticorpos anti-idiotipos podem também ser úteis no tratamento e/ou diagnóstico da NANBH, bem como no esclarecimento

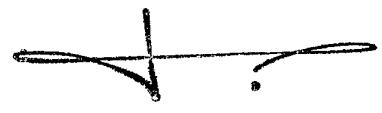
das regiões imunogénicas dos antígenos do HCV.

Usando as sequências dos polinucleótidos do HCV/J1 ou HCV/J7 como uma base, oligómeros de aproximadamente 8 ou mais nucleótidos podem ser preparados, quer por excisão, quer sinteticamente, que hibridam com o genoma do HCV e são úteis na identificação do(s) agente(s) virais, caracterização posterior do(s) genoma(s) virais, bem como na detecção dos virus em individuos doentes. As sondas para os polinucleótidos do HCV (naturais ou derivados) são de um comprimento que permite a detecção de sequências virais únicas por hibridação. Enquanto 6-8 nucleótidos podem constituir um comprimento operável, são preferíveis sequências de cerca de 10-12 nucleótidos, e cerca de 20 nucleótidos parecem ser óptimas. Estas sondas podem ser preparadas usando métodos de rotina, incluindo métodos sintéticos de oligonucleótidos automatizados. Entre as sondas úteis, encontram-se, por exemplo, os clones aqui descritos, bem como os vários oligómeros úteis na sondagem do património do c-DNA, como a seguir se indica. Um complemento para qualquer porção única do genoma do HCV será satisfatório. Para usar como sondas, é desejável uma complementaridade completa, embora possa ser desnecessária à medida que o comprimento do fragmento aumenta.

Para usar tais sondas como diagnóstico, a amostra biológica a analisar, como sangue ou soro, pode ser tratada, se for desejado, para extrair os ácidos nucleicos aí contidos. O ácido nucleico resultante de uma amostra pode ser sujeito a electroforese em gel ou outras técnicas de separação pelo tamanho; alternativamente, a amostra de ácido nucleico pode ser

marcada sem separação pelo tamanho. As sondas são então marcadas. Marcadores adequados, e métodos para marcar as sondas, são conhecidos na área e incluem, por exemplo, marcadores radioactivos incorporados por tradução ou activação, biotina, sondas fluorescentes e sondas quimioluminescentes. Os ácidos nucleicos extraídos da amostra são depois tratados com a sonda marcada em condições de hibridação de adstringência adequadas. Usualmente são desejáveis condições de adstringência elevada, para evitar positivos falsos. A adstringência da hibridação é determinada por vários factores durante a hibridação e durante o processo de lavagem, incluindo a temperatura, força iónica, intervalo de tempo e concentração de formamida. Estes factores são indicados em, por exemplo, Maniatis, T. (1982) MOLECULAR CLONING; A LABORATORY MANUAL (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y.).

Geralmente, espera-se que as sequências do genoma do HCV estejam presentes no soro de indivíduos infectados a níveis relativamente baixos, i.e., de, aproximadamente, 10^2 - 10^3 das doses de chimpanzé infectado (CID) por ml. Este nível pode requerer que as técnicas de amplificação sejam usadas em testes de hibridação. Tais técnicas de amplificação são bem conhecidas na área. Por exemplo, o sistema Enzo Biochemical Corporation "BIO-Bridge" usa transferases desoxinucleotídicas terminais para adicionar caudas-3'-poli-dT não modificadas a uma sonda de DNA. A sonda com a cauda poli-dT é hibridada com a sequência de nucleótidos alvo e depois com uma poli-A biotina modificada. O Pedido PCT No. 84/03520 e Pub EPO No. 124.221



descrevem um teste de hibridação de DNA em que: (1) o objecto da análise é emparelhado com uma sonda de DNA de cadeia simples que é complementar de um oligonucleótido marcado com um enzima; e (2) o duplex com cauda resultante é hibridado com um oligonucleótido marcado com enzimas. A Pub EPO No. 204.501, descreve um teste de hibridação de DNA, em que o DNA da análise contacta com uma sonda que tem uma cauda, como uma cauda poli-dT, uma cadeia amplificadora que tem uma sequência que hibrida com a cauda da sonda, tal como uma sequência poli-A, e que é capaz de ligar uma pluridade de cadeias marcadas.

Uma técnica particularmente desejável pode primeiro envolver a amplificação da sequência do HCV alvo em soros, de, aproximadamente, 10.000 vezes, i.e., a, aproximadamente, 10^6 sequências/ml. Isto pode ser conseguido, por exemplo, pela técnica de polimerase de reacção em cadeia (PCR), descrita por Saiki et al. (1986) Nature 324:163, Mullis, Patente Norte Americana No. 4.683.195, e Mullis et al. Patente Norte Americana No. 4.683.202. A(s) sequência(s) amplificada(s) podem ser depois detectadas usando um teste de hibridação que é descrito na Publicação Europeia co-pendente No. 3157-077 e na Aplicação Japonesa No. 63-260347, que são aqui referidas, e aqui incorporadas para referência. Estes testes de hibridação, que devem detectar sequências ao nível de 10^6 /ml, utilizam multímeros de ácido nucleico que se ligam ao ácido nucleico da análise de cadeia simples, e que também se ligam a uma multiplicidade de oligonucleótidos marcados de cadeia simples. Um teste sandwich de fase solução adequado que pode ser usado com as sondas



polinucleotídicas marcadas, e os métodos para a preparação das sondas é descrito na Pub EPO No. 225.807 aqui incorporado para referência.

As sondas podem ser embaladas em kits de diagnóstico. Os kits de diagnóstico incluem a sonda de DNA, que pode ser marcada; alternativamente, a sonda de DNA pode ser não marcada e os ingredientes para a marcação serem incluídos no kit em recipientes separados. O kit pode também conter outros reagentes embalados e materiais necessários para o protocolo de hibridação particular, por exemplo, padrões, tampões de lavagem, bem como instruções para a realização do teste.

Quer os polipeptídeos do HCV/J1 quer do HCV/J7, que reagem imunologicamente com o soro contendo anticorpos HCV e os anticorpos produzidos contra os epítopos específicos do HCV nesses polipeptídeos são úteis em imunotestes, para detectar a presença de anticorpos HCV, ou a presença do vírus e/ou antígenos virais, em amostras biológicas. A concepção do imunoteste está sujeita a uma grande dose de variação, e a variedade deste é conhecida na área. Um imunoteste para anticorpos anti-HCV pode utilizar um epítopo viral ou vários epítopos virais. Quando são usados múltiplos epítopos, os epítopos podem ser derivados do mesmo ou de diferentes polipeptídeos virais e podem estar separados em polipeptídeos naturais ou recombinantes, ou juntos nos mesmos polipeptídeos recombinantes.

Um imunoteste para o antígeno viral pode usar, por exemplo, um anticorpo monoclonal dirigido para um epítopo viral,



uma combinação de anticorpos monoclonais dirigidos para epitopos de um polipéptido viral, anticorpos monoclonais dirigidos contra epitopos de diferentes polipéptidos virais, anticorpos policlonais dirigidos contra o mesmo antígeno viral, anticorpos policlonais dirigidos contra antígenos virais diferentes ou uma combinação de anticorpos monoclonais e policlonais.

Os protocolos de imunotestes podem ser baseados, por exemplo, em competição, ou reacção directa, ou testes tipo "sandwich". Protocolos podem também, por exemplo, usar suportes sólidos, ou podem ser realizados através de imunoprecipitação. A maioria dos testes envolve o uso de anticorpos marcados ou polipéptidos. Os marcadores podem ser, por exemplo, fluorescentes, quimioluminescentes, radioactivos, ou moléculas coradas. Testes que amplificam os sinais da sonda são também conhecidos. Exemplos destes são os testes que utilizam biotina e avidina, e imunotestes com enzimas marcados e mediados, tais como o teste ELISA. Tipicamente, um imunoteste para anticorpos anti-HCV envolve a selecção e preparação da amostra-teste, tal como uma amostra biológica, e depois incubação com um polipéptido do HCV antigénico (i.e., contendo-epitopo), sob condições que permitem a formação de complexos antígeno-anticorpo. Tais condições são bem conhecidas na área. Num formato heterogéneo, o polipéptido é ligado a um suporte sólido para facilitar a separação da amostra do polipéptido após a incubação. Exemplos de suportes sólidos que podem ser usados são nitrocelulose, em membranas, ou sob a forma de poços de microtitulação, polivinilcloreto, em folhas ou poços de microtitulação, latex de

poliestireno, em contas ou placas de microtitulação, fluoreto de polivinilidina, conhecido como ImmobulonTM, papel diazotizado, membranas de nylon, contas activadas, e contas de proteína A. Mais preferencialmente, são usados, no formato heterogéneo, o Dynatech, uma placa de microtitulação ImmulonTM ou as contas de poliestireno de 0,25-polegada, cujo Spec termina por Precision Plastic Ball. O suporte sólido é tipicamente lavado após ser separado da amostra-teste. Num formato homogéneo, a amostra-teste é incubada com o antígeno em solução, em condições que farão precipitar qualquer complexo antígeno-anticorpo que se tenha formado, como é sabido na área. Os complexos precipitados são depois separados da amostra-teste, por exemplo, por centrifugação. Os complexos formados, compreendendo o anticorpo anti-HCV, são depois detectados por qualquer uma das numerosas técnicas. Dependendo do formato, os complexos podem ser detectados com imunoglobulinas anti-xenogeneicas marcadas, ou se for usado um formato competitivo, por medição da quantidade do anticorpo competitivo marcado de ligação.

Em imunotestes em que os polipeptidos do HCV são os objectos de análise, a amostra-teste, tipicamente uma amostra biológica, é incubada com anticorpos anti-HCV, outra vez sob condições que permitam a formação de complexos antígeno-anticorpo. Podem ser utilizados vários formatos, tal como um teste sandwich, em que o anticorpo ligado a um suporte sólido é incubado com a amostra-teste; lavado; incubado com um segundo anticorpo marcado para o objecto da análise; e o suporte é novamente lavado. O objecto da análise é detectado,

determinando-se se o segundo anticorpo está ligado ao suporte. Num formato competitivo, que pode ser quer heterogéneo ou homogéneo, uma amostra-teste é usualmente incubada com um anticorpo e um antígeno competitivo marcado, quer sequencial quer simultaneamente. Estes e outros formatos são bem conhecidos na área.

O modelo do Flavivirus para o HCV permite previsões quanto à localização provável dos epitopos de diagnóstico para as proteínas estruturais do virião. Os domínios C, pré-M, M e E, provavelmente contêm os epitopos de potencial significativo para detectar antígenos virais, e, particularmente, para diagnóstico. Similarmente, espera-se que os domínios das proteínas não estruturais contenham epitopos de diagnóstico importantes (e.g., NS5 que codifica uma suposta polimerase; e NS1 que codifica um suposto antígeno de ligação ao complemento). Polipéptidos recombinantes, ou polipéptidos virais, que incluem epitopos deste domínio específico podem ser úteis na detecção de anticorpos virais, na infecção através do sangue de dadores e pacientes infectados. Em adição, anticorpos dirigidos contra as proteínas E e/ou M podem ser usados em imunotestes para a detecção de antígenos virais em pacientes com NANBH causada por HCV, e em dadores de sangue infectado. Mais ainda, estes anticorpos podem ser extremamente úteis na detecção em dadores e pacientes em fase-aguda.

Regiões antigénicas da suposta poliproteína podem ser mapeadas e identificadas por pesquisa de antigenicidade dos produtos de expressão bacteriana do cDNA do HCV que codificam



porções da poliproteína. Outras regiões antigénicas do HCV podem ser detectadas por expressão das porções do cDNA do HCV noutros sistemas de expressão incluindo sistemas de leveduras, e sistemas celulares derivados de insectos e vertebrados. Em adição, estudos que deram origem a um index de antigenicidade e a um perfil de hidrofobicidade/hidrofilicidade forneceram informação respeitante à probabilidade de uma região de antigenicidade. Sistemas de detecção eficientes podem incluir o uso de painéis de epitopos. Os epitopos do painel podem ser construídos num ou em múltiplos polipéptidos.

Kits adequados ao imunodiagnóstico e contendo os reagentes apropriados marcados são construídos embalando os materiais apropriados, incluindo os polipéptidos da invenção, contendo os epitopos do HCV ou anticorpos dirigidos contra os epitopos do HCV em recipientes adequados, juntamente com os restantes reagentes e materiais necessários para a realização do teste (e.g., tampão de lavagem, meios de detecção como imunoglobulinas anti-humanas marcadas, antígeno de HCV marcado), bem como um conjunto adequado de instruções do teste.

A informação da sequência de nucleótidos do HCV/J1 e HCV/J7 descrita aqui, pode ser usada para adquirir mais informação sobre a sequência dos genomas do HCV, e para identificar e isolar isolados do HCV adicionais relacionados com o J1 ou J7. Esta informação por sua vez, pode levar a sondas de polinucleótidos adicionais, polipéptidos derivados do genoma do HCV, e anticorpos dirigidos contra os epitopos do HCV que seriam úteis para o diagnóstico e/ou tratamento da NANBH causada pelo

HCV.

A informação da sequência de nucleótidos do HCV/J1 e HCV/J7 é útil para a concepção de sondas para o isolamento de sequências adicionais que são derivadas de regiões ainda não definidas do genoma do HCV das quais são derivados as sequências J1 e J7. Por exemplo, sondas marcadas contendo uma sequência de aproximadamente 8 ou mais nucleótidos, e preferencialmente 20 ou mais nucleótidos que são derivados da região próxima do terminal 5' ou 3', da família de sequências de cDNA do HCV, divulgadas nos exemplos, podem ser usadas para isolar sobreposições das sequências do cDNA, proveniente do patrimônio do cDNA do HCV. Estas sequências, em que há sobreposição dos cDNA nos clones acima mencionados, mas que também contêm sequências derivadas de regiões do genoma do qual o cDNA dos clones acima mencionados não é derivado, podem ser depois usadas para sintetizar sondas para identificação de outros fragmentos sobrepostos que não sobreponham necessariamente os cDNA descritos a seguir. Métodos para construir o patrimônio de cDNA são conhecidos na área. Ver e.g., Pub EPO No. 318.216. E particularmente preferível preparar patrimônios a partir do soro de pacientes japoneses ou outros asiáticos, diagnosticados como tendo NANBH demonstrando anticorpos para antígenos do HCV1 ;pensa-se que estes são os candidatos mais prováveis como portadores de HCV/J1, HCV/J7 ou isolados relacionados.

As partículas do HCV podem ser isoladas a partir do soro de um indivíduo com NANBH ou da cultura de células por qualquer dos métodos conhecidos na área, incluindo por exemplo,,

técnicas baseadas na discriminação de tamanho , como métodos de exclusão ou sedimentação, ou técnicas baseadas em densidade como ultracentrifugação em gradiente de densidade, ou precipitação com agentes como o glicol polietileno, ou cromatografia de uma variedade de materiais como materiais de troca aniónica ou catiónica, e materiais que se ligam devido a hidrofobicidade.

Um método preferível de isolamento de partículas do HCV ou antigénios , é por colunas de imunoafinidade. Técnicas para cromatografia de imunoafinidade são conhecidas na área, incluindo técnicas de fixação de anticorpos a suportes sólidos, de modo a reter a sua actividade imunoselectiva. As técnicas podem ser aquelas nas quais os anticorpos são adsorvidos ao suporte (ver, por exemplo, Kurstak em ENZIME IMMUNODIAGNOSIS, pag 31-37), bem como as em que os anticorpos são ligados covalentemente ao suporte. Geralmente, as técnicas são semelhantes às usadas para a ligação covalente dos antigénios a um suporte sólido, descrito acima. Contudo, grupos separadores podem ser incluídos nos agentes emparelhadores bifuncionais, de modo a que o sitio de ligação ao antigénio, do anticorpo fique acessível. Os anticorpos podem ser monoclonais ou policlonais, e é desejável purificar os anticorpos antes do seu uso em imunotestes.

As técnicas gerais usadas na extracção do genoma de um vírus, preparação e sondagem de um património de cDNA, sequenciação de clones, construção de vectores de expressão, transformação de células, realização de testes imunológicos, tais como radioimunotestes e testes ELISA, para o crescimento de células em cultura, e semelhantes, são conhecidas na área e estão



disponíveis manuais de laboratório descrevendo essas técnicas. Contudo, como guia geral, as seguintes informações fornecem algumas fontes correntemente disponíveis para tais procedimentos, e para materiais úteis na sua realização.

Quer células hospedeiras procarióticas, quer eucarióticas, podem ser usadas para a expressão das sequências de código desejadas quando se usam as sequências controle apropriadas, as quais são compatíveis com o hospedeiro designado. Entre os hospedeiros procariotas, o E. coli é o mais frequentemente usado. As sequências de controle da expressão para os procariotas incluem promotores, facultativamente contendo porções operadoras, e sítios de ligação a ribossomas. Vectores de transferência compatíveis com os hospedeiros procariotas são normalmente derivados de, por exemplo, pBR322, um plasmídeo contendo operões que conferem resistência à ampicilina e tetraciclina, e os vários vectores pUC que também contêm sequências conferindo aos marcadores resistência aos antibióticos. Estes marcadores podem ser usados para obter transformantes bem sucedidos, por selecção. As sequências controle procarióticas, normalmente usadas, incluem Beta-lactamase (penicilinase) e sistemas promotores da lactose (Chang et al. (1977), Nature 198:1056, sistema promotor do triptofano (trp) (Goeddel et al. (1980) Nucleic Acid Res. 8:4057), e o promotor lambda-derivado PL e o gene N do sítio de ligação ao ribossoma (Shimatake et al. (1981) Nature 292:128) e o promotor tac híbrido (De Boer et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci USA 292:128) derivados das sequências dos promotores trp e lac UV5.

Os sistemas seguintes são particularmente compatíveis com a E.coli; se desejável, podem ser usados outros hospedeiros procariotas como estirpes de *Bacillus* ou *Pseudomonas*, com as correspondentes sequências de controlo.

Hospedeiros eucariotas incluem leveduras e células de mamíferos em sistemas de cultura. Sacchromyces cerevisiae, Saccharomyces carlsbergensis, Klebsiella lactis e Pichia pastoris são os hospedeiros de levedura mais geralmente usados, e são hospedeiros fúngicos convenientes. Vectores compatíveis de leveduras transportam marcadores que permitem a selecção de transformantes bem sucedidos, conferindo prototrofia a mutantes auxotróficos ou resistência a metais pesados em estirpes selvagens. Vectores compatíveis de levedura podem empregar a origem de 2 micra de replicação (Broach et al. (1983) *Math Enz.* 101:307), a combinação de CNE3 e ARS1 ou outros meios de assegurar a replicação, como as sequências que resultam na incorporação de um fragmento apropriado no genoma da célula hospedeira. As sequências de controlo para os vectores de leveduras são conhecidas na área e incluem promotores para a síntese de enzimas glicolíticos (Hess et al. (1986) *J. Adv. Enzyme Eng.* 7:149; Holland et al. (1978), *J. Biol. Chem.* 256:1385), incluindo o promotor para a cinase 3 fosfoglicerato (Hitzen (1980), *J. Biol. Chem.* 255:2073). Os terminadores podem ser também incluídos, como os derivados do gene enolase (Holland (1981), *J. Biol. Chem.* 256:1385). Sistemas de controlo particularmente úteis são aqueles que compreendem o promotor desidrogenase fosfato 3 gliceraldeído (GAPDH) ou o promotor



regulador desidrogenase álcool (ADH), os terminadores derivados também do GAPDH, e se a secreção for desejada, sequências principais do factor alfa da levedura. Em adição, a região reguladora da transcrição e região de iniciação da transcrição que estão ligadas operacionalmente podem ser tais que não estão naturalmente associadas no organismo do tipo selvagem. Estes sistemas são descritos em detalhe na Pub. EPO No. 120.551; Pub.EPO No. 116,201; e Pub EPO No. 164.556, todas aqui incorporadas para referência.

Linhas celulares de mamíferos, disponíveis como hospedeiros para expressão, são conhecidas na área e incluem muitas linhas celulares imortalizadas, disponíveis a partir da American Type Culture Collection (ATCC), incluindo células HeLa, células de ovários de hamster chineses (CHO), células de rins de hamster bebés (BHK), e um grande número de outras linhas celulares. Promotores adequados para células de mamíferos são também conhecidos na área e incluem promotores virais como o do vírus Simios 40 (SV40) (Fiers (1978), Nature 273:113), vírus do sarcoma Rous (RSV), adenovírus (ADV), e vírus do papiloma bovino (BPV). As células de mamíferos também necessitam de sequências terminadoras e sequências de adição poli A; sequências aumentadoras que aumentam a expressão podem ser incluídas, e sequências que provocam a amplificação do gene podem também ser desejáveis. Estas sequências são conhecidas na área. Vectores adequados para a replicação nas células de mamíferos podem incluir replicões virais, ou sequências que assegurem a integração de sequências apropriadas que codificam os epítopos da



NANBV no genoma do hospedeiro.

O sistema do vírus da varíola pode também ser usado para expressar o DNA estranho na célula do mamífero. Para expressar genes heterólogos, o DNA estranho é geralmente inserido no gene activador da timidina quinase do vírus da varíola, e as células infectadas podem ser escolhidas. Este método é conhecido na área e pode-se encontrar mais informação nestas referências [Mackett et al. J. Virol. 49: 857-864 (1984) e Capítulo 7 do DNA Cloning, Vol. 2, IRL Press].

Em adição, os antígenos virais podem ser expressos em células de insectos, pelo sistema Baculovirus. Um guia geral para a expressão do baculovirus é de Summer e Smith A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures (Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No 1555). Para incorporar o gene heterólogo no genoma do baculovirus, o gene é primeiramente clonado num vector de transferência contendo algumas sequências do baculovirus. Este vector de transferência quando é co-transferido com o vírus tipo selvagem em células de insectos, recombinará com o vírus do tipo selvagem. Usualmente, o vector de transferência será construído de modo a que o gene heterólogo irá destruir o gene poliédrico do baculovirus do tipo selvagem. Esta destruição permite uma selecção fácil do vírus recombinante uma vez que as células infectadas com o vírus recombinante serão fenotipicamente diferentes das células infectadas com o vírus tipo selvagem. O vírus recombinante purificado pode ser usado para infectar células para expressar o gene heterólogo. A proteína estranha



pode ser segregada para o meio se um péptido de sinalização for ligado à estrutura do gene heterólogo; de outra forma, a proteína será ligada ao lisado celular. Para mais informação, ver Smith et al. Mol. & Cell. Biol. 3:2156-2165 (1983), ou Luckow e Summers em Virology 17: 31-39 (1989).

A transformação pode ocorrer por qualquer dos métodos conhecidos para introduzir polinucleótidos numa célula hospedeira, incluindo por exemplo, a retirada directa do polinucleótido do vírus e transdução de uma célula hospedeira com o vírus, e por retirada directa do polinucleótido. O processo de transformação depende do hospedeiro a ser transformado. A transformação bacteriana por retirada directa geralmente utiliza tratamento com cloreto de rubídio ou cálcio (Cohen (1972), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69:2110; Maniatis et al. (1982), MOLECULAR CLONING; A LABORATORY MANUAL (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y.). A transformação de leveduras por retirada directa pode ser levada a cabo usando o método de Hinnen et al. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:1929. A transformação de mamíferos por retirada directa pode ser conduzida usando o método de Graham e Van der Eb de precipitação por fosfato de cálcio (1978), Virology 52:546 ou várias modificações do mesmo.

A construção de vectores utiliza técnicas que são conhecidas na área. A clivagem do DNA em sítios específicos é realizada por tratamento com os enzimas de restrição adequados, em condições que são geralmente especificadas pelos fabricantes destes enzimas comercialmente disponíveis. Os fragmentos clivados podem ser separados usando técnicas de electroforese em gel de



agarose ou poliacrilamida, de acordo com o procedimento geral encontrado em *Methods of Enzymology* (1980) 65:499-560. As terminações aderentes dos fragmentos de clivagem podem ser transformadas em terminações cegas usando DNA polimerase I de E. coli (Klenow), na presença dos trifosfatos desoxinucleótidos apropriados (dNTPs) presentes na mistura. O tratamento com nucleases S1 também pode ser usado resultando na hidrólise de qualquer porção de DNA de cadeia simples.

As ligações foram executadas usando um tampão e condições de temperatura padrão, usando ligases T4 DNA e ATP; as ligações com extremidades aderentes requerem menos ATP e menos ligases que as ligações com extremidades cegas. Quando os fragmentos do vector são usados como parte da mistura de ligação, o fragmento do vector é frequentemente tratado com fosfatase alcalina bacteriana (BAP) ou fosfatase alcalina intestinal de vitela, para remover o fosfato-5' e assim evitar re-ligação do vector; alternativamente, digestão com enzimas de restrição, de fragmentos não desejados, pode ser usada para evitar a ligação. Misturas de ligação são transformadas em hospedeiros de clonagem adequados tais como E. coli, e os transformantes bem sucedidos seleccionados, por exemplo, por resistência a antibióticos, e pesquisados quanto à construção correcta.

Os oligonucleóticos sintéticos podem ser preparados usando um sintetizador automatizado de oligonucleótidos como descrito por Warner (1984), DNA 3:401. Se fôr desejável, as cadeias sintéticas podem ser marcadas com ^{32}P , por tratamento com cinases polinucleotídicas, na presença de ^{32}P -ATP, sob condições



padrão para a reacção. As sequências de DNA, incluindo as isoladas do património do cDNA, podem ser modificadas por técnicas conhecidas, incluindo por exemplo, mutagénese dirigida para o local, como foi descrito por Zoller (1982), Nucleic Acids Res. 10:6487.

Patrimónios de DNA podem ser utilizados como sondas usando o método de Grunstein e Hogness (1975), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73:3961. Resumidamente, neste método o DNA a ser sondado é imobilizado em filtros de nitrocelulose, desnaturado, e pré-hibridado com um tampão. A percentagem de formamida no tampão, bem como as condições de tempo e temperatura da pré-hibridação e etapas de hibridação subsequente, dependem da adstringência requerida. Sondas oligoméricas que requerem condições de baixa adstringência são geralmente usadas com baixas percentagens de formamida, baixas temperaturas, e períodos de hibridação longos. Sondas contendo mais de 30 ou 40 nucleótidos, como as derivadas do cDNA ou sequências genómicas, geralmente utilizam temperatura mais elevada, por exemplo, cerca de 40-42°C, e uma alta percentagem, e.g., 50% de formamida. A seguir à pré-hibridação, a sonda de oligonucleótidos 5'-³²P-marcados é adicionada ao tampão, e os filtros incubados nesta mistura em condições de hibridação. Após a lavagem, os filtros tratados são sujeitos a autoradiografia para revelar a localização da sonda híbrida; o DNA das localizações correspondentes nas placas de agar originais é usado como fonte do DNA desejado.

Um teste imunoabsorvente de ligação ao enzima (ELISA) pode ser usado para medir quer a concentração do antigénio quer



do anticorpo. Este método depende da conjugação do enzima quer a um antígeno quer a um anticorpo, e usa a actividade do enzima ligado como marcador quantitativo. Para quantificar o anticorpo, o antígeno conhecido é fixado a uma fase sólida (e.g., uma microplaca ou taça de plástico), e incubado com as diluições do soro a testar, lavado, incubado com anti-imunoglobulina marcada com um enzima e lavado novamente. Enzimas adequados para a marcação são conhecidos na área, e incluem, por exemplo, peroxidases de rábano. A actividade do enzima ligado à fase sólida é medida, adicionando o substrato específico, e determinando a formação do produto ou a utilização do substrato colorimetricamente. A actividade do enzima ligado é uma função directa da quantidade de anticorpo ligado.

Para quantificar o antígeno, um anticorpo específico conhecido é fixado à fase sólida, o material teste contendo o antígeno é adicionado, após uma incubação a fase sólida é lavada, e um segundo anticorpo marcado com um enzima é adicionado. Após lavagem, o substrato é adicionado, e a actividade do enzima é calculada colorimetricamente, e está relacionada com a concentração do antígeno.

Exemplos

I

Este exemplo descreve a clonagem das sequências dos nucleótidos do HCV/J1 e HCV/J7.

Ambas as amostras de sangue que foram usadas como fonte



de viriões HCV foram positivas nos testes de anticorpos anti-HCV. Os isolados do HCV destas amostras foram denominados HCV/J1 e HCV/J7. A infectividade da amostra de sangue contendo o isolado J1 foi confirmada por um estudo de prospecção dos receptores de transfusão de sangue. O dr Tohru Katayama, do Departamento de Cirurgia Torácica do Hospital Nacional de Tóquio, recolheu sangue de pacientes que contraíram hepatite não A, não B pós-transfusão. Ele também recolheu amostras de sangue dos respectivos doadores de sangue desses doentes. A seguir, estas amostras foram testadas quanto aos anticorpos para o antígeno C100-3 do HCV1 (Pub. EPO No. 318.216), e o sangue de um dos doadores era positivo.

O isolamento do RNA das amostras de sangue começa pela deposição dos viriões, na amostra de sangue, por ultracentrifugação [Bradley, D.W., McCaustland, K.A., Cook E.H., Schable, C.A., Ebert, J.W. e Maynard, J.E. (1985) *Gastroenterology* 88, 773-779]. O RNA foi depois extraído do pellet pelo método do cloreto de cézio/guanidínio [Maniatis T., Fritsch, E.F., e Sambrook J. (1982) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor], e posteriormente purificado pela extração em clorofórmio/fenol na presença de ureia, [Berk, A.J. Lee, F., Harrison, T., Williams, J. e Sharp, P. A. (1979) *Cell* 17, 935-944].

Foram concebidos cinco pares de "primers" oligonucleótidos sintéticos a partir da sequência de nucleótidos dos domínios C/E, E, E/NS1, NS3, e NS5 do HCV1 para isolar fragmentos do genoma J1 e J7. O primeiro conjunto de "primers"

serviu para isolar a sequência do domínio da parte central e parte do envelope. O segundo conjunto de "primers" serviu para isolar as sequências do domínio do envelope. O terceiro conjunto de "primers" serviu para isolar um fragmento que sobreponha os domínios do suposto envelope e domínio um não estrutural NS1. O quarto e quinto conjuntos de "primers" para isolar fragmentos dos domínios não estruturais três e cinco, NS3 e NS5. A sequência para os vários "primers" são indicadas em baixo:

A sequência do "primer" para a região C/E era:

21S	5'	CGTGCCCCCGCAAGACTGCT	3'
J80A	5'	CCGTCCTCCAGAACCCGGAC	3'

A sequência dos "primers" para a região E era:

71S	5'	GCCGACCTCATGGGGTACAT	3'
J132A	5'	AACTGCGACACCACTAAGGC	3'

A sequência dos "primers" para a região E/NS1 era:

127S	5'	TGGCATGGGATATGATGATG	3'
166A	5'	TTGAACTTGTGGTGATAGAA	3'

A sequência dos "primers" para a região NS3 era:

464S	5'	GGCTATACCGGCGACTTCGA	3'
526A	5'	GACATGCATGTCATGATGTA	3'

A sequência dos "primers" para a região NS5 era:

870S	5'	GCTGGAAAGAGGGTCTACTA	3'
917A	5'	GTTCTTACTGCCCAGTTGAA	3'

Foi adicionado 1 µg dos "primers" anti-sentido, 166A, 526A, ou 917A, a 10 unidades de transcriptase inversa (Biorad), para sintetizar fragmentos cDNA a partir dos RNA isolado como padrão. Os fragmentos de cDNA foram depois amplificados por uma polimerase típica de reacção em cadeia [Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn G.T., Erlich, H.A., e Arnheim, N. (1985) Science 230, 1350-1354], após ter-se adicionado 1 µg do "primer" de sentido apropriado, 21S, 71S, 127S, 464S ou 870S.



Os fragmentos de cDNA, amplificados pelo método PCR, foram isolados em gel e clonados por ligação de terminação cega no sítio SmaI do pUC119 [Vieira, J. e Messing, J. (1987) Methods in Enzymology 153, 3-11] ou no sítio SnaBI do caromideo SB, um derivado do vector de clonagem caromideo 9-42 [Saito, I. e Stark, G. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 8664-8668]. Foram contruídos com sucesso os clones contendo os fragmentos dos cinco domínios virais.

II

A partir de reacção PCR dos isolados japoneses J1 e J7, três clones independentes de cada região C/E, E, E/NS1, NS3, e NS5 , foram sequenciados pelo método de terminação de cadeia dideoxi.

Sequências de todas as regiões excepto da C/E foram isoladas do isolado J1. Apenas sequências da região C/E foram isoladas a partir do isolado J7. Surpreendentemente, fragmentos isolados de ambos os isolados não são maiores ou menores que o previsto a partir do genoma do HCV1. Contudo, há heterogeneidade entre os clones contendo sequências da mesma região. Consequentemente, uma sequência consensual foi construída para cada um dos domínios, C/E, E, E/NS1, NS3 e NS5 como é mostrado respectivamente nas Figuras de 1 a 5. Estas diferenças podem ser explicadas como artefactos que ocorrem ao acaso durante a amplificação PCR [Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., e Arnheim, N. (1985) Science 230,



1350-1354]. Outra explicação é que está presente, no plasma de um único portador saudável, mais do que um genoma do vírus, e que esses genomas são heterogêneos ao nível dos nucleótidos.

Para clarificar este ponto, foi determinado quantas destas diferenças de nucleótidos levavam a alterações nos aminoácidos, usando a sequência do domínio NS3 do isolado J1 como um exemplo. Das cinco diferenças de nucleótidos, três falham na terceira posição do codão do aminoácido, e não alteram a sequência dos aminoácidos. Ambas as duas alterações dos nucleótidos restantes, falham a primeira posição do codão do aminoácido e provocam alteração do aminoácido de treonina para alanina, e de prolina para alanina, os quais são pequenos resíduos de aminoácidos neutros. Similarmente, quando se analisa as diferenças de nucleótidos noutros domínios, encontram-se muitas mutações silenciosas e conservadas. Estes resultados sugerem que as sequências de nucleótidos do genoma do HCV no plasma de um único dador saudável, são heterogêneas ao nível dos nucleótidos.

Além disso, uma vez que as sequências consensuais para cada um dos fragmentos foi compilada, cada sequência foi comparada com o isolado HCV1 nas figuras de 6 até 10. Na figura 6, o fragmento da região C/E do isolado J7 mostra uma homologia de aminoácidos 150/154 , 97,4% e de nucleótidos 512/552, 92,8% com o isolado HCV1. O fragmento do domínio E do J1 mostra uma homologia de nucleótidos e aminoácidos ligeiramente mais baixa com o HCV1 da Figura 7 de 76,2% e 82,9%, respectivamente. O fragmento do isolado J1 que se sobrepõe aos domínios um, não



estrutural e do envelope, mostra a homologia mais baixa com o HCV1, como se vê na figura 8, em que o isolado J1 tem uma homologia de nucleótidos de 71,5% e uma homologia de aminoácidos de 73,5% com o HCV1. A Figura 9 mostra uma comparação do fragmento do domínio NS3 do J1 com o HCV1. A homologia entre as sequências de nucleótidos é de 79,8%, enquanto a homologia dos aminoácidos entre os isolados é bastante alta, de 92,2% ou 179/194 aminoácidos. A Figura 10 mostra a homologia entre as sequências NS5 do J1 e HCV1. As sequências têm uma homologia de nucleótidos de 84,3% e de aminoácidos de 88,7%.

Os vectores descritos no exemplo acima foram depositados no Patent Microorganism Depository, Instituto de Fermentação, Agência de Tecnologia e Ciência Industrial, 1-3, Higashi 1-choma Tsukuba-chi, Ibaragiken 305, japão, e serão mantidas ao abrigo do Tratado de Budapeste. Os números de acesso e datas de depósito são listados a seguir, na página 68.

III

Um clone HCV/J1, J1-1519, foi isolado usando as técnicas essenciais descritas seguir. Contudo, os "primers" usados no isolamento foram J159S e 199A. As sequências dos "primers" oligoméricos J159S e 199A, que se seguem, foram baseados no J1-1216 e no HCV1.

J159S	5' ACT GCC CTG AAC TGC AAT GA 3'
199A	5' AAT CCA GTT GAG TTC ATC CA 3'

O clone J1-1519 é composto por uma sequência de cDNA do HCV, de 367 nucleótidos, que englobam a maior parte da metade 5'



da região NS1 e que sobrepõe a região E do clone, J1-1216, por 31 nucleótidos. Três clones independentes englobando esta região foram sequenciados; as sequências nesta região, obtidas a partir dos três clones, eram idênticas. A sequência do cDNA do HCV no J1-1216 (mostrado na figura como J1), e os aminoácidos aí codificados, (mostrados por cima da sequência de nucleótidos) são mostrados na Figura 13. A Figura 13 também mostra as diferenças das sequências entre J1-1216 na região comparável, do protótipo do cDNA do HCV1 (indicado na figura como PT), e as alterações resultantes nos aminoácidos codificados. A homologia entre o J1-1216 e o cDNA do HCV1 é aproximadamente 70% ao nível de nucleótidos, e cerca de 75% ao nível de aminoácidos.

Uma composição das sequências, da suposta parte central até à região NS1 do isolado J1, é mostrado na figura 14; também mostra os aminoácidos codificados na sequência J1. A variação da sequência do protótipo do HCV1 é indicada pela linha por baixo da sequência de nucleótidos do J1; a linha a tracejado indica sequências homólogas. Os aminoácidos não homólogos codificados na sequência do protótipo do HCV1 são mostrados por baixo da sequência de nucleótidos do HCV1.

O material clonado contendo o cDNA do HCV J1/1519 (pS1-1519) foi conservado em DH5 α , e depositado com a Patent Microorganism Depository.

IV

Várias regiões do isolado J1, incluindo a região C200-C100 da suposta região NS3-NS4 (que inclui a região que codifica

o polipéptido 5-1-1 no HSV1 (ver Pub EPO No 318.216), e a suposta região NS1-E, foram amplificadas usando o método PCR. A região C200-C100 inclui os nucleótidos de 3799 a 5321 do protótipo do HCV1. O RNA foi extraído como se descreve abaixo, exceptuando a extracção que foi com tiocianato de guanidina na presença de proteinase K e dodecilsulfato de sódio (SDS) (Maniatis (1982), supra). O RNA foi transcrito para o cDNA do HCV, por incubação numa reacção de 25 µl, composta por 1 µM de cada "primer", 40 unidades de inibidor de RNAase (RNASIN), 5 unidades de transcriptase inversa AMV, e sais e tampão necessários para a reacção. A amplificação de um segmento do cDNA do HCV a partir de uma região designada, foi realizada utilizando pares de "primers" 16-meros de oligómeros sintéticos. A amplificação PCR foi conseguida em três etapas (PCR I, PCR II, e PCR III). A segunda e terceira etapas da amplificação PCR (PCR II), utilizaram diferentes conjuntos de "primers" PCR; a primeira reacção PCR foi diluída 10 vezes, e múltiplas fases de amplificação PCR foram levadas a cabo com os novos "primers", de modo que, por último, para cima de 50% do produto da primeira reacção PCR (PCR I) foram re-amplificados. Os "primers" usados para a amplificação das regiões foram os seguintes. Estes iniciadores , com excepção do J1C200-3 que foi derivado da sequência isolada do J1, foram derivados da sequência do protótipo do HCV1.

"Primers" para amplificação da região "5-1-1" do NS3-NS4

PCR I

511/16A (sentido, derivado dos nucleótidos começando no número 1528 do HCV1)

5' AAC AGG CTG CGT GGT C 3'

511/16B (anti-sentido, derivado do nucleótido terminando no 5260 do HCV1)

5' AGT TGG TCT GGA CAG C 3'

PCR II

511/35A (sentido, derivado da porção do HCV dos nucleótidos começando no número 5057 do HSV1; o sítio de enzima de restrição está sublinhado)

5' CTTGAATTC TCG TCT TGT CCG GGA AGC CGG CAA TC 3'

511/35B (anti-sentido, derivado da porção do HCV dos nucleótidos terminando no número 5233 do HSV1; o sítio de enzima de restrição está sublinhado)

5' CTTGAATTC CCT CTG CCT GAC GGG ACG CGG TCT GC 3'

PCR III

511/35A (ver supra)

VSNrc7 (anti-sentido, derivado dos nucleótidos terminando no número 5804 do HSV1)

5' GTA GTG CGT GGG GGA AAC AT 3'

"Primers" para amplificação da região "NS1/E"

PCR I

J1(E2)3 (sentido, derivado da porção do HCV dos nucleótidos começando no número 953 do HSV1, está sublinhado o

sítio do enzima de restrição)

5' CTTAGAATTC TGG CAT GGG ATA TGA TGA TG 3'

Jl(E)4 (sentido, derivado da porção do HCV dos nucleótidos começando no número 1087 do HSV1, o sítio do enzima de restrição está sublinhado)

5' CTTAGAATTC TCC ATG GTG GGG AAC TGG GC 3'

Jlrc12 (anti-sentido, derivado da porção do HCV dos nucleótidos terminando no número 1995 do HSV1, o sítio do enzima de restrição está sublinhado)

5' CTTGAATTC TAA CGG GCT GAG CTC GGA 3'

Jlrc13 (anti-sentido, derivado da porção do HCV dos nucleótidos terminando no número 1941 do HSV1, o sítio do enzima de restrição está sublinhado)

5' CTTAGAATTC CGT CCA GTT GCA GGC AGC TTC 3'

PCR II

Jlrc13(ver supra)

JlIZ-1 (sentido, a porção do HCV é derivada dos nucleótidos começando no número 1641 do HCV1, o sítio do enzima de restrição está sublinhado)

5' CTTGAATTC CAA CTG GTT CGG CTG TAC A 3'

JlIZ-2 (sentido, a porção do HCV é derivada dos nucleótidos começando no número 1596 do HCV1, o sítio do enzima de restrição está sublinhado)

5' TGA GAC GGA CGT GCT GCT CCT 3'

Iniciadores para a região C200-C100 da região "NS3-NS4"

PCR I



J1C200-1 (sentido, derivado dos nucleótidos começando no número 3478 do HCV1)

5' TCC TAC TTG AAA GGC TC 3'

J1C200-3 (anti-sentido, derivado dos nucleótidos terminando no número 4402 do HCV1)

5' GGA TCC AAG CTG AAA TCG AC 3'

Jlrc52 (anti-sentido, a porção do HCV derivada dos nucleótidos terminando no número 5853 do HCV1, o sítio do enzima de restrição está sublinhado)

5' CTTAGAATTC GAG GCT GCT GAG ATA GGC AGT 3'

511/16A (Ver acima).

PCR II

J1C200-2 (sentido, a porção do HCV derivada dos nucleótidos começando no número 3557 do HCV1, o sítio do enzima de restrição está sublinhado)

5' CTTGAATTC CCC GTG GAG TGG CTA AGG CGG TGG ACT 3'

J1C200-4 (anti-sentido, a porção do HCV derivada dos nucleótidos terminando no número 4346 do HCV1, o sítio do enzima de restrição está sublinhado)

5' CTTGAATTC TCG AAG TCG CCG GTA TAG CCG GTC ATG 3'

511/35A (ver acima)

Jlrc51 (anti-sentido, a porção do HCV derivada dos nucleótidos terminando no número 5826 do HCV1, o sítio do enzima de restrição está sublinhado)

5' CTTAGAATTC GGC AGC TGC ATC GCT CTC CGG CAC 3'

Os cDNAs do HCV amplificados foram, quer sequenciados

directamente sem clonagem, quer e/ou clonados. A sequenciação foi conseguida usando uma técnica PCR assimétrica, essencialmente como foi descrita em Shyamala e Ames, J. Bacteriology 171:1602 (1989). Nesta técnica, a amplificação do cDNA é realizada sem uma concentração limitante de um dos iniciadores (usualmente numa razão de cerca de 1:50), de modo a obter amplificação preferencial de uma cadeia. A cadeia amplificada é, preferencialmente, depois sequenciada pelo método de terminação de cadeias dideoxi.

Os iniciadores usados para a sequenciação assimétrica pelo método PCR foram os seguintes. Para a região NS1: J11Z-1 e J1rc13 (sequenciado com ambos); J11Z-2, J1rc13 (confirmado em ambas as cadeias). Para a região NS3-NS4 que inclui a região N-terminal C200-C100, região C-terminal C200-C100, e a região 5-1-1: J1C200-2 e J1C200-7 (para a região N-terminal do C200-C100), e J1C200-4 e J1C200-6 (para a região C-terminal do C200-C100); e 511/35A e hep 4 (para a região 5-1-1). As sequências para o J1C200-2, J1C200-4, e 511/35A são mostradas supra; as sequências do hep 4, J1C200-6, e J1C200-7 são as seguintes.

hep 4 (derivado dos nucleótidos começando no número 5415 do HCV1)

5' TT GGC TAG TGG TTA GTG GGC TGG TGA CAG 3'

J1C200-6 (porção do HCV derivada dos nucleótidos começando no número 3875 do HCV1, o sítio do enzima de restrição está sublinhado)

5' CTTGAATTC CGT ACT CCA CCT ACG GCA AGT TCC TT 3'

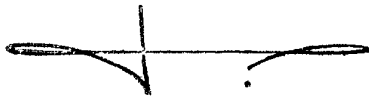
J1C200-7 (a porção do HCV derivada dos nucleótidos

começando no número 3946 do HCV1, o sítio do enzima de restrição está sublinhado)

5' CTTGAATTC GTG GCA TCC GTG GAG TGG CAC TCG TC 3'

As sequências obtidas pela sequenciação assimétrica da região "NS1", a região C200-C100, e a região 5-1-1 são mostradas na Figura 15 e Figura 16, respectivamente. Nas figuras, os aminoácidos codificados na sequência do J1 são mostrados por cima da sequência de nucleótidos do J1. As diferenças entre a sequência do J1 e a sequência de nucleótidos do prototipo do HCV1 é mostrada por baixo da sequência do J1 (os traços indicam nucleótidos homólogos em ambas as sequências). Os aminoácidos codificados, que são diferentes na sequência do protótipo do HCV1, são indicados por baixo da sequência de nucleótidos do HCV1.

Os cDNAs do HCV da região NS1, a região C200-C100, e da região 5-1-1 foram clonados. Um fragmento com 230 pb e um com 300 pb da suposta região NS1, foram clonados num derivado do vector disponível comercialmente, pGEM-3z, no hospedeiro HB101, e depositados na ATCC como AW-300pb. Os vectores derivados conservam o poli-ligante pGEM-3z original, um gene Amp^r intacto, e os genes necessários para a replicação em E. coli. Os fragmentos do cDNA do HCV podem ser removidos com SacI e XbaI. Os cDNAs do HCV, contendo fragmentos N-terminal de 770 pb do C200, foram clonados no pM1E no HB101, foram separados 12 clones e depositados na ATCC como AW-770pb-N; o cDNA do HCV pode ser removido do vector com HaeII. O fragmento HaeII resultante vai conter o DNA do vector de 300 pb e 250 pb nas extremidades 5' e



3', respectivamente. Os cDNAs do HCV contendo os fragmentos C-terminal de 700 pb do C200 (AW-700 pb-C) foram clonados no M13mp10 e conservados no DH5 α -F' hospedeiro; a clonagem foi efectuada no sítio de poliligação do vector. Os fagos resultantes foram fraccionados, e depositados na ATCC em 11 de Setembro de 1990, como AW-700pb-N ou AW-700pb-C. O cDNA do HCV do equivalente do J1 para a região 5-1-1 do HCV1 foi clonado no sítio mp19 R1, e conservado no DH5 α -F'. Vários sobrenadantes dos fagos m13 desta clonagem foram separados e depositados na ATCC como J1 5-1-1, em 11 de Setembro de 1990. Os cDNAs do HCV podem ser obtidos destes fagos por tratamento com EcoRI. Números de acesso para J1 5-1-1 e AW-700pb-N ou AW-700pb-C podem ser obtidos telefonando para ATCC para o (301) 881-2600.

O material clonado acima descrito foi depositado na American Type Culture Collection (ATCC).

V

Um património de cDNA do HCV contendo sequências da suposta região "NS1" do isolado J1 foi criado por clonagem direcciona no λ -gt22. A região "NS1" estende-se de cerca do nucleótido 1460 a cerca do nucleótido 2730, usando o sistema de numeração da sequência do ácido nucleico do prototipo do HCV1, em que o nucleótido 1 é o primeiro nucleótido de um codão de uma metionina de iniciação para a suposta poliproteína. A clonagem foi conseguida usando essencialmente o método descrito por Han e Rutter em GENETIC ENGINEERING, Vol 10 (J.K. Setlow, Ed., Plenum Publishing Co., 1988), com excepção dos iniciadores para a



síntese da primeira e segunda cadeias do cDNA do HCV que foram JHC67 e JHC68, respectivamente, e que a fonte de RNA foi o plasma J1. Neste método, o RNA é extraído com tiocianato de guanidina a baixa temperatura. O RNA é depois convertido num cDNA com o comprimento total, que é clonado numa orientação definida relativa ao promotor lacZ no λ -fago. Usando este método, os cDNA do HCV do RNA do J1 foram inseridos no sítio NotI do λ -gt22. A presença de sequências "NS1" no património foi detectada usando, como sonda, Alx54.

A sequência de uma região "NS1", a jusante da região mostrada na figura 14, mas que se sobrepõe à região por cerca de 20 nucleótidos, foi determinada usando a técnica de sequenciação assimétrica descrita acima, mas substituindo como iniciadores para a amplificação PCR, Alx 61 e Alx 62. A sequência resultante é mostrada na Figura 17. (Deve-se notar que a amplificação PCR era de uma região de cerca do nucleótido 1930 a cerca do nucleótido 2340; esta região é também abrangida pela sequência mostrada na Figura 15). As sequências dos iniciadores e sondas usadas para obter o património cDNA do HCV no λ -gt22, e para sequenciar a porção da região da "NS1" foram as seguintes.

JHC 67

5' GACGC GGCCG CCTCC GTGTC CAGCG CGT 3'

JHC 68

5' CGTGC GGCCG CAAGA CTGCT AGCCG AGGT 3'

ALX 61

5' ACCTG CCACT GTGTA GTGGT CAGCA GTAAC 3'

ALX 62

5' ACGGA CGTCT TCGTC CTTAACAATA CCAGG 3'

ALX 54

5' GAACT TTGCG ATCTG GAAGACAGGG ACAGG 3'

Um fragmento de 400 pb do cDNA do HCV J1 derivado da região sequenciada foi clonado no pGEM3z e conservado no HB101; o cDNA do HCV pode ser removido do vector com SacI e XbaI. As células hospedeiras transformadas com o vector (JH-400pb) têm sido depositadas na ATCC.

Um património cDNA fraccionado foi criado a partir do soro J1; o património fraccionado abrange o genoma J1 e é identificado como HCV-J1 λ gt22. O património do cDNA fraccionado foi criado por fraccionamento de aliquotas de 11 patrimónios de cDNA individuais, que tinham sido preparados usando a técnica de clonagem direccional descrita acima, com excepção dos patrimónios que foram criados a partir de "primers" que foram concebidos para a produção de cDNA do HCV que abrangem o genoma. Os "primers" eram derivados da sequência do HCV1, e incluíam JH 67 e JH 68. Os cDNAs do HCV foram inseridos no sítio NotI do λ -gt22. O património de cDNA fraccionado, HCV-J1 λ gt22, foi depositado na ATCC.

VI

Foi determinada a sequência de uma região de polinucleótidos a montante da representada na Figura 14. Esta região começa no nucleótido -267, em relação ao HCV-1 (ver figura 12) e estende-se por 560 nucleótidos. A sequenciação foi conseguida preparando o cDNA do HCV a partir do RNA extraído do soro J1, e amplificando o cDNA do HCV usando o método PCR .

O RNA foi extraído de 100 μ l de soro, seguido de tratamento com proteinase K e dodecilsulfato de sódio (SDS). As amostras foram extraídas com fenol-clorofórmio, o RNA precipitado

com etanol.

O cDNA do HCV do isolado J1 foi preparado desnaturando o RNA precipitado com MeHgOH 0,01M; após 10 minutos à temperatura ambiente, foi adicionado 2-mercaptoetanol para isolar os iões mercúrio. Imediatamente a mistura para a primeira cadeia de sínteses de cDNA foi adicionada, e a incubação continuou durante uma hora a 37°C. As condições para a síntese da cadeia anti-sentido foram as seguintes: Tris HCl 50 mM, pH 8,3, KCl 75 mM, MgCl₂ 3 mM, ditiotreitól 10 mM, trifosfato desoxinucleótido 500 µM cada, "primers" r25 de cDNA anti-sentido específico 250 pmol, 250 unidades de transcriptase inversa MMLV. Para sintetizar a segunda cadeia (sentido), os componentes da reacção de síntese foram adicionados, e incubados durante uma hora a 14°C. Os componentes para a segunda reacção de cadeia de síntese eram os seguintes: Tris HCL 14 mM, pH 8,3 , KCL 68 mM, sulfato de amónia 7,5 mM, MgCl₂ 3,5 mM, ditiotreitól 2,8 mM, polimerase I de DNA 25 unidades, e uma unidade de RNase H. As reacções foram terminadas pelo aquecimento das amostras a 95°C durante 10 minutos, seguido de arrefecimento no gelo.

O cDNA do HCV foi amplificado em duas etapas de PCR. A primeira etapa foi conseguida usando 20 µl da mistura do cDNA. As condições para a reacção PCR foram as que se seguem: Tris HCl 10 mM, pH 8,3 , KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, 0,002% de agente gelificante, trifosfatos desoxinucleótidos 200 mM de cada, e 2,5 unidades Amplitaq. O ciclo termal do PCR foi como se segue: um minuto a 94°C, um minuto a 50°C, um minuto a 72°C, repetido 40 vezes, seguido de sete minutos a 72°C. A segunda etapa do PCR foi

conseguida usando "primers" colocados (i.e. iniciadores que se ligam a uma região interna do produto amplificado na primeira etapa do PCR), para aumentar a especificidade dos produtos do PCR. Uma percentagem da primeira reacção do PCR foi amplificada essencialmente como na primeira etapa, com excepção dos "primers" que foram substituídos, e que a segunda etapa de reacção do PCR foi à temperatura de 60°C em vez de 50°C. Os "primers" usados para a primeira etapa foram ALX90 e r14. Os "primers" usados para a segunda etapa do PCR foram r14 e p14.

As sequências dos "primers" para a síntese do cDNA do HCV e para o método PCR foram os seguintes.

r25

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

ALX90

5' CCA TGA ATC ACT CCC CTG TGA GGA ACT A 3'

r14

5' GGG CCC CCAG CTA GGC CGA GA 3'

p14

5' AAC TAC TGT CTT CAC GCA GAA AGC 3'

Os produtos do PCR foram purificados em gel, o material que migrou como tendo cerca de 615 pb foi isolado, e sequenciado por uma modificação do método de terminação de cadeia dideoxi de Sanger, usando ³²P-ATP, como marcador. No método modificado, a replicação da sequência foi iniciada usando P32 e R31 como "primers"; o DNA de cadeia dupla foi fundido durante 3 minutos a 95°C antes da replicação, e a síntese de polinucleótidos com terminação dideoxi marcada foi catalizada pela polimerase Bst (



obtida da BioRad Corp.), de acordo com as indicações do laboratório. A sequenciação foi realizada usando de 500 ng a 1 µg do produto do PCR por reação de sequenciação.

Os "primers" P32 (sentido) e R31 (anti-sentido) eram derivados dos nucleótidos de -137 a -115 e dos nucleótidos 192 a 173, respectivamente, da sequência do HCV1. As sequências dos iniciadores eram as seguintes.

"primer" P32

5' AAC CCG CTC AAT GCC TGG AGA TT 3'

"primer" R31

5' GGC CGX CGA GCC TTG GGG AT 3'

em que X = A ou G

A sequência da região no isolado do J1 que abrange a região não traduzida-5', bem como uma parte da região da suposta "parte central" é mostrada na Figura 18. Na figura, os aminoácidos codificados na sequência do J1 são mostrados por cima da sequência de nucleótidos. A sequência do protótipo do HCV1 é mostrada por baixo da sequência do J1; os traços indicam homologia de sequências com o J1. Os aminoácidos diferentes, codificados na sequência do HCV1, são mostrados por baixo da sequência do HCV1.

Um fragmento do cDNA do HCV que é um representante da sequência J1 de 600 pb descrita acima (TC 600pb) foi clonado no pGEM3Z e conservada no HB101 hospedeiro; o fragmento do cDNA do HCV pode ser removido com SacI e XbaI. Este material está depositado na ATCC.

Depósito de Patentes de Microorganismos-depositados



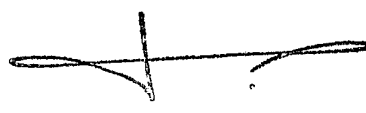
sob os termos do Tratado de Budapeste.

<u>Materiais Depositados</u>	<u>Número de Acesso</u>	<u>Data do Depósito</u>
<u>E. coli</u> DH5/pS1-879a	BP-2593	15/9/1989
(Este clone contém 427 pb do domínio HS5 do J1)		
<u>E. coli</u> HB101/pU1-1216c	BP-2594	15/9/1989
(Este clone contém 351 pb do domínio E/NS1 do J1)		
<u>E. coli</u> HB101/pU1-4652d	BP-2595	15/9/1989
(Este clone contém 583 pb do domínio NS3 do J1)		
<u>E. coli</u> DH5a/pS1-713c	BP-2637	1/11/1989
(Este clone contém 580 pb do domínio E do J1)		
<u>E. coli</u> DH5a/pS7-28c	BP-2638	1/11/1989
(Este clone contém 552 pb do domínio C/E do J1)		
<u>E. coli</u> DH5a/pS1-1519	BP3081	30/8/1990

Os vectores seguintes descritos nos Exemplos foram depositados na American Type Culture Collection (ATCC), 12301 Dr. Parklawn , Rockville, Maryland 20852, e foram atribuídos os seguintes Números de Acesso. Os depósitos foram feitos nos termos do Tratado de Budapeste.

<u>Materiais Depositados</u>	<u>Número de Acesso</u>	<u>Data do Depósito</u>
TC-600pb (em <u>E. coli</u> HB101/pGEM3Z)	68393	11/9/90
JH-400pb (em <u>E. coli</u> HB101/pGEM3Z)	68394	11/9/90
AW-300pb (em <u>E. coli</u> HB101/pGEM3Z)	68392	11/9/90
AW-770pb-N (em <u>E. coli</u> HB101/pM1E)	68395	11/9/90
AW-700pb-C ou AW-700pb-N (em <u>E. coli</u> DH5a-F'/M13mp10)	40887	11/9/90
J1 5-1-1 (em <u>E. coli</u> DH5a-F'/M13mp10)	40888	11/9/90
HCV-J1 λ gt22	40884	6/9/90

Estes depósitos são fornecidos para conveniência dos especialistas na área. Estes depósitos não são nem uma admissão de que tais depósitos são necessários para a prática da presente invenção, nem que concretizações equivalentes não estão dentro do âmbito da presente divulgação. A disponibilidade pública destes



depósitos não é uma licença para fazer, usar ou vender os materiais depositados nesta ou em qualquer outra patente. As sequência de ácidos nucleicos dos materiais depositados são incorporados na presente divulgação para referência e controlo, no caso de conflito com qualquer das sequências aqui descritas.

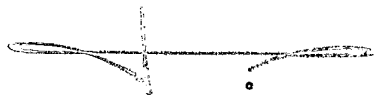
Enquanto que a presente invenção tem sido descrita através de exemplos específicos para benefício daqueles que trabalham nesta área, o alcance desta invenção não está limitado a concretizações adicionais que serão evidentes dos especialistas na área a partir da presente divulgação.

REIVINDICAÇÕES

1- Um processo de preparação de uma molécula de DNA compreendendo uma sequência de nucleótido de, pelo menos, 15 pb, de um isolado de HCV substancialmente homólogo a um isolado seleccionado do grupo J1 e J7, caracterizado pelo facto de a referida sequência de nucleótido ser diferente da sequência de nucleótido do isolado HCV1 do HCV.

2- Um processo de preparação de uma molécula de DNA compreendendo uma sequência de nucleótido de, pelo menos, 15 pb, codificando uma sequência de aminoácido do isolado de HCV J1 ou J7, caracterizado pelo facto de a sequência de aminoácido J1 ou J7 ser diferente da sequência de aminoácido do isolado HCV1 do HCV.

3- Um processo de preparação de uma molécula de DNA, conforme reivindicado na reivindicação 2, caracterizado pelo facto de a sequência de aminoácido J1 ou J7 compreender um polipeptido viral substancialmente completo.



4- Um processo de preparação de uma molécula de DNA, conforme reivindicado na reivindicação 2, caracterizado pelo facto de a sequência de aminoácido compreender do aminoácido 1 ao aminoácido 115.

5- Um processo de preparação de uma molécula de DNA, conforme reivindicado na reivindicação 1, caracterizado pelo facto da sequência de aminoácido J1 compreender do aminoácido 116 ao aminoácido 350.

6- Um processo de preparação de uma molécula de DNA, conforme reivindicado na reivindicação 2, caracterizado pelo facto da sequência de aminoácido J1 compreender do aminoácido 351 ao aminoácido 651.

7- Um processo de preparação de uma molécula de DNA, conforme reivindicado na reivindicação 2, caracterizado pelo facto de a sequência de aminoácido J1 compreender do aminoácido 1007 ao aminoácido 1650.

8- Um processo de preparação de uma molécula de DNA, conforme reivindicado na reivindicação 2, caracterizado pelo facto de a sequência de aminoácido J1 compreender do aminoácido 2100 até ao fim da sequência codificadora.

9- Um processo de preparação de um polipeptido purificado compreendendo uma sequência de aminoácido seleccionado a partir do isolado de HCV, substancialmente homólogo a um isolado seleccionado do grupo consistindo em J1 e J7, caracterizado pelo facto da sequência de aminoácido ser diferente da sequência dos polipeptidos codificados pelo isolado HCV1 do HCV.

10- Um processo de preparação de um polipeptido purificado,

conforme reivindicado na reivindicação 9, caracterizado pelo facto da sequência de aminoácido J1 ou J7 compreender um epitopo que não é imunologicamente reactivo-cruzado com qualquer epitopo de HCV1.

11- Um processo de preparação de um polipeptido purificado, conforme reivindicado na reivindicação 9, caracterizado pelo facto de a sequência de aminoácido J7 compreender do aminoácido 1 ao aminoácido 115.

12- Um processo de preparação de um polipeptido purificado, conforme reivindicado na reivindicação 9, caracterizado pelo facto da sequência de aminoácido J1 compreender do aminoácido 116 ao aminoácido 350.

13- Um processo de preparação de um polipeptido purificado, conforme reivindicado na reivindicação 9, caracterizado pelo facto de a sequência de aminoácido J1 compreender do aminoácido 351 ao aminoácido 651.

14- Um processo de preparação de um polipeptido purificado, conforme reivindicado na reivindicação 9, caracterizado pelo facto de a sequência de aminoácido J1 compreender do aminoácido 1007 ao aminoácido 1650.

15- Um processo de preparação de um polipeptido purificado, conforme reivindicado na reivindicação 9, caracterizado pelo facto de a sequência de aminoácido J1 compreender do aminoácido 2100 até ao fim da sequência codificadora.

16- Um processo de preparação de um polipeptido compreendendo uma sequência de aminoácido de um isolado de HCV seleccionado a partir do grupo consistindo em J1 e J7,



caracterizado pelo facto de a sequência de aminoácido J1 ou J7 ser diferente da sequência de aminoácido do isolado HCV1 do HCV, e sendo o polipéptido imobilizado num suporte sólido.

17- Um processo para detectar a presença de anticorpos anti-HCV, numa amostra-teste, caracterizado pelo facto de compreender:

(a) a incubação da amostra-teste sob condições que permitam a formação de complexos antígeno-anticorpo, com polipéptidos antigénicos compreendendo uma sequência de aminoácido do isolado de HCV, seleccionado a partir do grupo consistindo em J1 e J7, em que a sequência de aminoácido é diferente da sequência de aminoácido do isolado HCV1 do HCV;

(b) a sequência de aminoácido J1 e J7 não é imunologicamente reactivo-cruzada com HCV1; e

(c) detecção de um complexo antígeno-anticorpo compreendendo o polipéptido antigénico.

18- Um processo, conforme reivindicado na reivindicação 17, caracterizado pelo facto de a sequência de aminoácido J1 compreender um domínio viral seleccionado do grupo consistindo numa sequência de aminoácido do aminoácido 116 ao aminoácido 350, do aminoácido 351 ao aminoácido 651, do aminoácido 1007 ao aminoácido 1650, e do aminoácido 2100 até à sequência codificadora.

19- Um processo, conforme reivindicado na reivindicação 17, caracterizado pelo facto de a sequência de aminoácido J1 compreender do aminoácido 1 ao aminoácido 115.

20- Um processo, conforme reivindicado na reivindicação 17, caracterizado pelo facto de a amostra-teste compreender sangue



humano ou uma fracção do mesmo.

21- Um processo de preparação de uma composição compreendendo anticorpos anti-HCV que ligam um epitopo de HCV substancialmente livre de anticorpos que não se ligam a um epitopo de HCV, caracterizado pelo facto de:

(a) um epitopo de HCCV compreender uma sequência de aminoácido de um isolado de HCV, seleccionado do grupo consistindo em J1 e J7;

(b) a sequência de aminoácido é diferente da sequência de aminoácido do isolado HCV1 do HCV; e

(c) a sequência de aminoácido J1 ou J7 não é imunologicamente reactivo-cruzada com HCV1.

22- Um processo de preparação de uma composição, conforme reivindicado na reivindicação 21, caracterizada pelo facto de os anticorpos anti-HCV serem policlonais.

23- Um processo de preparação de uma composição, conforme reivindicado na reivindicação 21, caracterizada pelo facto de os anticorpos anti-HCV serem monoclonais.

24- Um processo para detectar a presença de um polipeptido de HCV, numa amostra-teste, caracterizado pelo facto de compreender:

(a) a incubação da amostra-teste sob condições que permitem a formação de complexos antigénio-anticorpo com anticorpos anti-HCV que se ligam a um epitopo de HCV, em que:

(i) o epitopo de HCV compreende uma sequência de aminoácido do isolado de HCV, seleccionado a partir do grupo consistindo em J1 e J7;

(ii) a sequência de aminoácido J1 ou J7 é diferente da sequência de aminoácido do isolado HCV1 do HCV; e

(iii) a sequência de aminoácido J1 ou J7 não é imunologicamente reactivo-cruzada com o HCV1; e

(b) detecção de um complexo antígeno-anticorpo compreendendo os anticorpos anti-HCV.

25- Um processo, conforme reivindicado na reivindicação 24, caracterizado pelo facto de a sequência de aminoácido J1 compreender um domínio viral seleccionado a partir do grupo consistindo de uma sequência de aminoácido compreendendo do aminoácido 116 ao aminoácido 350, do aminoácido 351 ao aminoácido 651, do aminoácido 1007 ao aminoácido 1650, e do aminoácido 2100 até ao fim da sequência codificadora.

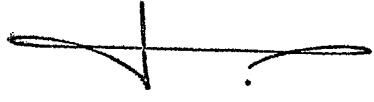
26- Um processo, conforme reivindicado na reivindicação 24, caracterizado pelo facto de a sequência de aminoácido J7 compreender do aminoácido 1 ao aminoácido 115.

27- Um método de detecção de polinucleótidos de HCV, numa amostra-teste, caracterizado pelo facto de compreender:

(a) o fornecimento de uma sonda compreendendo a molécula de DNA da reivindicação 1;

(b) o contacto da amostra-teste e da sonda sob condições que permitem a formação de um duplex polinucleotídico entre a sonda e o seu complemento, na ausência da formação substancial do duplex polinucleotídico, entre a sonda e as sequências polinucleotídicas não-HCV, presentes na amostra-teste; e

(c) detecção de quaisquer duplexes polinucleotídicos



compreendendo a sonda.

28- Um método de produção de um polipéptido recombinante compreendendo uma sequência de aminoácido de HCV, caracterizado pelo facto de compreender:

(a) o fornecimento de células hospedeiras transformadas por uma estrutura de DNA compreendendo uma sequência de controlo para a célula hospedeira, ligada, operavelmente, a uma sequência codificadora para a célula hospedeira, ligada, de uma forma operável, a uma sequência codificadora codificando uma sequência de aminoácido de um isolado de HCV, seleccionado do grupo constituído por J1 e J7, em que a sequência de aminoácido J1 ou J7 é diferente da sequência de aminoácido do HCV1 do HCV;

(b) cultura das células hospedeiras sob condições em que a sequência codificadora é transcrita e traduzida no polipéptido recombinante; e

(c) recolha do polipéptido recombinante.

29- Um processo de preparação de uma molécula de DNA, caracterizado pelo facto de compreender a polimerização de nucleótidos para produzir uma sequência de, pelo menos, 15 pb, de um isolado de HCV substancialmente homólogo a um isolado escolhido do grupo J1 e J7, em que a referida sequência nucleotídica é distinta da sequência nucleotídica do isolado HCV1 do HCV, e isolando a referida molécula de DNA.

30- Um processo de preparação de uma molécula de DNA, caracterizado pelo facto de compreender a polimerização de nucleótidos para produzir uma sequência de, pelo menos, 15 pb, codificando uma sequência de aminoácidos do isolado J1 ou J7 do



HCV , em que a sequência de aminoácido J1 ou J7 é distinta da sequência de aminoácido do isolado HCV1 do HCV, e isolando a referida molécula de DNA.

31- Um processo de preparação de uma molécula de DNA, conforme reivindicado na reivindicação 30, caracterizado pelo facto da sequência de aminoácido J1 ou J7 compreender um polipeptido viral substancialmente completo.

32- Um processo de preparação de uma molécula de DNA, conforme reivindicado na reivindicação 30, caracterizado pelo facto da sequência de aminoácido J7 compreender do aminoácido 1 até ao aminoácido 115.

33- Um processo de preparação de uma molécula de DNA, conforme reivindicado na reivindicação 29, caracterizado pelo facto da sequência de aminoácido J1 compreender do aminoácido 116 até ao aminoácido 350.

34- Um processo de preparação de uma molécula de DNA, conforme reivindicado na reivindicação 30, caracterizado pelo facto da sequência de aminoácido J1 compreender do aminoácido 351 ao aminoácido 651.

35- Um processo de preparação de uma molécula de DNA, conforme reivindicado na reivindicação 30, caracterizado pelo facto de a sequência de aminoácido J1 compreender do aminoácido 1007 ao aminoácido 1650.

36- Um processo de preparação de uma molécula de DNA, conforme reivindicado na reivindicação 30, caracterizado pelo facto da sequência de aminoácido J1 compreender do aminoácido 2100 até ao fim da sequência codificadora.

37- Um processo de preparação de um polipéptido, caracterizado pelo facto de compreender a polimerização de aminoácidos para produzir um polipéptido possuindo uma sequência substancialmente homóloga à de um polipéptido de HCV de um isolado seleccionado do grupo consistindo em J1 e J7, em que a sequência de aminoácido é distinta da sequência dos polipéptidos codificados pelo isolado HCV1 do HCV, e isolando o polipéptido.

38- Um processo, conforme reivindicado na reivindicação 37, caracterizado pelo facto da sequência de aminoácido J1 ou J7 compreender um epitopo que não é imunologicamente reactivo-cruzado com qualquer epitopo de HCV1.

39- Um processo, conforme reivindicado na reivindicação 37, caracterizado pelo facto da sequência de aminoácido J7 compreender do aminoácido 1 ao aminoácido 115.

40- Um processo, conforme reivindicado na reivindicação 37, caracterizado pelo facto de a sequência de aminoácido J1 compreender do aminoácido 116 ao aminoácido 350.

41- Um processo, conforme reivindicado na reivindicação 37, caracterizado pelo facto de a sequência de aminoácidos J1 compreender do aminoácido 351 ao aminoácido 651.

42- Um processo, conforme reivindicado na reivindicação 37, caracterizado pelo facto da sequência de aminoácido J1 compreender do aminoácido 1007 ao aminoácido 1650.

43- Um processo, conforme reivindicado na reivindicação 37, caracterizado pelo facto da sequência de aminoácido J1 compreender do aminoácido 2100 até ao fim da sequência codificadora.

44- Um processo de preparação de um polipeptido immobilizado num substrato sólido, caracterizado pelo facto de compreender:

(a) o fornecimento de um polipeptido compreendendo uma sequência de aminoácidos de um isolado de HCV seleccionado do grupo consistindo em J1 e J7, em que a sequência de aminoácidos J1 ou J7 é distinta da sequência de aminoácidos do isolado HCV1 do HCV;

(b) o fornecimento de um suporte sólido para a imobilização do polipeptido de (a); e

(c) a imobilização do polipeptido de (a) com o suporte sólido de (b).

45- Um processo de produção de uma vacina para tratamento do HCV, caracterizado pelo facto de compreender:

(a) o fornecimento de um polipeptido compreendendo uma sequência de aminoácidos proveniente de um isolado de HCV seleccionada do grupo consistindo em J1 e J7, em que a sequência de aminoácidos J1 e J7 é distinta da sequência de aminoácidos do isolado HCV1 do HCV, e em que a sequência de HCV é imunogénica; e

(b) formulação do polipeptido imunogénico numa dose farmacologicamente eficaz, num excipiente farmacêuticamente aceitável.

Lisboa, 17 de Setembro de 1990





Discrepância entre

o J7 1 AGCCGAGTAGTGTTGGGTCGCGAAAGGCCTTGTGGT
e os aminoácidos
alterados do clone

J7 37 ACTGCCTGATAGGGTGCTTGCGAGTGCCCCGGGAGG

J7 73 TCTCGTAGACCGTGCATC ATG AGC ACA AAT
Met Ser Thr Asn

J7 103 CCT AAA CCC CAA AGA AAA ACC AAA CGT
Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg
T G
b l
--- Arg

J7 130 AAC ACC AAC CGT CGC CCA CAG GAC GTT
Asn Thr Asn Arg Arg Pro Gln Asp Val
C
b

J7 157 AAG TTC CCG GGC GGT GGT CAG ATC GTC
Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val
T
l
Leu
T
b

J7 184 GGT GGA GTT TAC TTG TTG CCG CGC AGG
Gly Gly Val Tyr Leu Leu Pro Arg Arg
A
b

J7 211 GGC CCC AGG TTG GGT GTG CGT GCG ACT
Gly Pro Arg Leu Gly Val Arg Ala Thr

FIG. 1-1



J7 238 Arg Lys Thr Ser Glu Arg Ser Gln Pro
 AGG AAG ACT TCC GAG CGG TCG CAA CCT
 A
 b

J7 265 Arg Gly Arg Arg Gln Pro Ile Pro Lys
 CGT GGA AGG CGA CAA CCT ATC CCC AAG

J7 292 Ala Arg Arg Pro Glu Gly Arg Thr Trp
 GCT CGC CGG CCC GAG GGC AGG ACC TGG

J7 319 Ala Gln Pro Gly Tyr Pro Trp Pro Leu
 GCT CAG CCT GGG TAT CCT TGG CCC CTC

J7 346 Tyr Gly Asn Glu Gly Leu Gly Trp Ala
 TAT GGC AAT GAG GGC TTG GGG TGG GCA
 A
 b
 Final

J7 373 Gly Trp Leu Leu Ser Pro Arg Gly Ser
 GGA TGG CTC CTG TCA CCC CGC GGC TCT

J7 400 Arg Pro Ser Trp Gly Pro Asn Asp Pro
 CGG CCT AGT TGG GGC CCC AAT GAC CCC
 T C
 c b
 --- Thr

J7 427 Arg Arg Arg Ser Arg Asn Leu Gly Lys
 CGG CGT AGG TCG CGT AAT TTG GGT AAG

J7 454 Val Ile Asp Thr Leu Thr Cys Gly Phe
 GTC ATC GAT ACC CTT ACA TGC GGC TTC
 C
 1
 Leu

FIG. 1-2



J7	481	Ala	Asp	Leu	Met	Gly	Tyr	Ile	Pro	Leu
		GCC	GAC	CTC	ATG	GGG	TAC	ATT	CCG	CTT
								C		C
								c		b
								---		---
J7	508	Val	Gly	Ala	Pro	Leu	Gly	Gly	Ala	Ala
		GTC	GGC	GCC	CCC	TTA	GGG	GGC	GCT	GCC
J7	535	Arg	Ala	Leu	Ala	His	Gly			
		AGG	GCC	CTG	GCA	CAT	GGT			

FIG. 1-3

discrepância entre

o
J1 1 T CCG CTC GTC GGC GCC CCC TTA GGG GGC
e os aminoácidos alterados do clone
C
d
Ser

29 Ala Ala Arg Ala Leu Ala His Gly Val
GCT GCC AGG GCC CTG GCA CAT GGT GTC

56 Arg Val Leu Glu Asp Gly Val Asn Tyr
CGG GTT CTG GAG GAC GGC GTG AAC TAT

83 Ala Thr Gly Asn Leu Pro Gly Cys Ser
GCA ACA GGG AAT TTG CCC GGT TGC TCT

110 Phe Ser Ile Phe Leu Leu Ala Leu Leu
TTC TCT ATC TTC CTC TTG GCT CTG CTG
A T
g d

137 Ser Cys Leu Thr Ile Pro Ala Ser Ala
TCC TGT TTG ACC ATC CCA GCT TCC GCT

164 Tyr Glu Val Arg Asn Val Ser Gly Ile
TAT GAA GTG CGC AAC GTG TCC GGG ATA

191 Tyr His Val Thr Asn Asp Cys Ser Asn
TAC CAT GTC ACA AAC GAC TGC TCC AAC
T
d

218 Ser Ser Ile Val Tyr Glu Ala Ala Asp
TCA AGC ATT GTG TAT GAG GCG GCG GAC

FIG. 2-1



245	Val	Ile	Met	His	Ala	Pro	Gly	Cys	Val
	GTG	ATC	ATG	CAT	GCC	CCC	GGG	TGC	GTG
272	Pro	Cys	Val	Arg	Glu	Asn	Asn	Ser	Ser
	CCC	TGC	GTT	CGG	GAG	AAC	AAT	TCC	TCC
							C		
							d		

299	Arg	Cys	Trp	Val	Ala	Leu	Thr	Pro	Thr
	CGT	TGC	TGG	GTA	GCG	CTC	ACT	CCC	ACG
326	Leu	Ala	Ala	Arg	Asn	Ala	Ser	Val	Pro
	CTC	GCG	GCC	AGG	AAT	GCC	AGC	GTC	CCC
353	Thr	Thr	Thr	Leu	Arg	Arg	His	Val	Asp
	ACT	ACG	ACA	TTA	CGA	CGC	CAC	GTC	GAC
			G						
			d						

380	Leu	Leu	Val	Gly	Thr	Ala	Ala	Phe	Cys
	TTG	CTC	GTT	GGG	ACG	GCT	GCT	TTC	TGC
407	Ser	Ala	Met	Tyr	Val	Gly	Asp	Leu	Cys
	TCC	GCT	ATG	TAC	GTG	GGG	GAT	CTC	TGC
434	Gly	Ser	Val	Phe	Leu	Ile	Ser	Gln	Leu
	GGA	TCT	GTT	TTC	CTC	ATC	TCC	CAG	CTG
				T					
				d					

461	Phe	Thr	Phe	Ser	Pro	Arg	Arg	His	Glu
	TTC	ACC	TTC	TCG	CCT	CGC	CGG	CAT	GAG

FIG. 2-2



488 Thr Val Gln Asp Cys Asn Cys Ser Ile
ACA GTA CAG GAC TGC AAC TGC TCA ATC

515 Tyr Pro Gly His Val Ser Gly His Arg
TAT CCC GGC CAC GTA TCA GGC CAT CGC
T
C

542 Met Ala Trp Asp Met Met Met Asn Trp
ATG GCT TGG GAT ATG ATG ATG AAC TGG

569 Ser Pro Thr Ala
TCG CCC ACG GCA

FIG. 2-3

discrepância entre

o J1

1

Asn	Trp	Ser	Pro	Thr
AAC	TGG	TCG	CCC	ACG

e os aminoácidos alterados do clone

J1	16	Ala	Ala	Leu	Val	Val	Ser	Gln	Leu	Leu
		GCA	GCC	TTA	GTG	GTG	TCG	CAG	TTA	CTC
		!!!								
J1	43	Arg	Ile	Pro	Gln	Ala	Val	Met	Asp	Met
		CGG	ATC	CCA	CAA	GCT	GTC	ATG	GAC	ATG
J1	70	Val	Ala	Gly	Ala	His	Trp	Gly	Val	Leu
		GTG	GCG	GGG	GCC	CAC	TGG	GGA	GTC	CTA
										G
										i

J1	97	Ala	Gly	Leu	Ala	Tyr	Tyr	Ser	Met	Val
		GCG	GGC	CTT	GCC	TAC	TAT	TCC	ATG	GTG
										A
										i

J1	124	Gly	Asn	Trp	Ala	Lys	Val	Leu	Ile	Val
		GGG	AAC	TGG	GCT	AAG	GTT	TTG	ATT	GTG
J1	151	Met	Leu	Leu	Phe	Ala	Gly	Val	Asp	Gly
		ATG	CTA	CTC	TTT	GCC	GGC	GTT	GAC	GGG
J1	178	His	Thr	Arg	Val	Thr	Gly	Gly	Val	Gln
		CAT	ACC	CGC	GTG	ACG	GGG	GGG	GTG	CAA
		AG								A
		gg								i
		Ser								---

FIG. 3-1

J1	205	Gly	His	Val	Thr	Ser	Thr	Leu	Thr	Ser
		GGC	CAC	GTC	ACC	TCT	ACA	CTC	ACG	TCC
			T				G			
			c				i			
			---				Ala			
J1	232	Leu	Phe	Arg	Pro	Gly	Ala	Ser	Gln	Lys
		CTC	TTT	AGA	CCT	GGG	GCG	TCC	CAG	AAA
J1	259	Ile	Gln	Leu	Val	Asn	Thr	Asn	Gly	Ser
		ATT	CAG	CTT	GTA	AAC	ACC	AAT	GGC	AGT
				TC	T					
				ii	i					
				Ser	Leu					
J1	286	Trp	His	Ile	Asn	Arg	Thr	Ala	Leu	Asn
		TGG	CAT	ATC	AAC	AGG	ACT	GCC	CTG	AAC
										T
										g

J1	313	Cys	Asn	Asp	Ser	Leu	Gln	Thr	Gly	Phe
		TGC	AAT	GAC	TCC	CTC	CAA	ACT	GGG	TTC
J1	340	Leu	Ala	Ala	Leu					
		CTT	GCC	GCG	CTG					

FIG. 3-2



discrepância entre o J1 1
e os aminoácidos alterados do clone

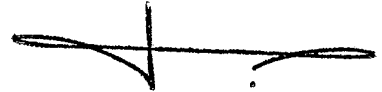
Ser
C TCA

J1	5	Val	Ile	Asp	Cys	Asn	Thr	Cys	Val	Thr
		GTG	ATC	GAC	TGT	AAC	ACA	TGT	GTC	ACT
J1	32	Gln	Thr	Val	Asp	Phe	Ser	Leu	Asp	Pro
		CAG	ACG	GTC	GAT	TTC	AGC	TTG	GAT	CCC
J1	59	Thr	Phe	Thr	Ile	Glu	Thr	Thr	Thr	Val
		ACC	TTC	ACC	ATC	GAG	ACG	ACG	ACC	GTG
		G								
		C								
		Ala								
J1	86	Pro	Gln	Asp	Ala	Val	Ser	Arg	Thr	Gln
		CCC	CAA	GAT	GCG	GTT	TCG	CGC	ACG	CAG
J1	113	Arg	Arg	Gly	Arg	Thr	Gly	Arg	Gly	Arg
		CGG	CGA	GGT	AGG	ACT	GGC	AGG	GGC	AGG
J1	140	Arg	Gly	Ile	Tyr	Arg	Phe	Val	Thr	Pro
		AGA	GGC	ATC	TAT	AGG	TTT	GTG	ACT	CCA
J1	167	Gly	Glu	Arg	Pro	Ser	Ala	Met	Phe	Asp
		GGA	GAA	CGG	CCC	TCG	GCG	ATG	TTC	GAT
J1	194	Ser	Ser	Val	Leu	Cys	Glu	Cys	Tyr	Asp
		TCT	TCG	GTC	CTA	TGT	GAG	TGT	TAT	GAC
J1	221	Ala	Gly	Cys	Ala	Trp	Tyr	Glu	Leu	Thr
		GCG	GGC	TGT	GCT	TGG	TAT	GAG	CTC	ACG
			A							
			e							
			Gly(=)							

FIG. 4-1

J1	248	Pro	Ala	Glu	Thr	Ser	Val	Arg	Leu	Arg
		CCC	GCT	GAG	ACC	TCG	GTT	AGG	TTG	CGG
J1	275	Ala	Tyr	Leu	Asn	Thr	Pro	Gly	Leu	Pro
		GCT	TAC	CTA	AAT	ACA	CCA	GGG	TTG	CCC
J1	302	Val	Cys	Gln	Asp	His	Leu	Glu	Phe	Trp
		GTC	TGC	CAG	GAC	CAT	CTG	GAG	TTC	TGG
J1	329	Glu	Ser	Val	Phe	Thr	Gly	Leu	Thr	His
		GAG	AGC	GTC	TTC	ACA	GGC	CTC	ACC	CAC
J1	356	Ile	Asp	Ala	His	Phe	Leu	Ser	Gln	Thr
		ATA	GAC	GCC	CAC	TTC	TTG	TCC	CAG	ACT
J1	383	Lys	Gln	Ala	Gly	Asp	Asn	Phe	Pro	Tyr
		AAG	CAG	GCA	GGA	GAC	AAC	TTC	CCC	TAC
J1	410	Leu	Val	Ala	Tyr	Gln	Ala	Thr	Val	Cys
		CTG	GTA	GCA	TAC	CAA	GCC	ACA	GTG	TGC
J1	437	Ala	Arg	Ala	Lys	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser
		GCC	AGG	GCT	AAG	GCT	CCA	CCT	CCA	TCG
						C				
						e				
						Ala(=)				
J1	464	Trp	Asp	Gln	Met	Trp	Lys	Cys	Leu	Ile
		TGG	GAT	CAA	ATG	TGG	AAG	TGT	CTC	ATA
J1	491	Arg	Leu	Lys	Pro	Thr	Leu	His	Gly	Pro
		CGG	CTA	AAG	CCT	ACG	CTG	CAC	GGG	CCA
									G	
									e	
									Ala	

FIG. 4-2



J1 518 Thr Pro Leu Leu Tyr Arg Leu Gly Ala
ACG CCC CTG CTG TAT AGG CTA GGA GCC
A
e
Arg(=)

J1 545 Val Gln Asn Glu Val Thr Leu Thr His
GTC CAG AAT GAG GTC ACC CTC ACA CAC

J1 572 Pro Ile Thr Lys
CCT ATA ACC AAA

FIG. 4-3

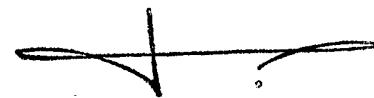


discrepância entre o J1 1
e os aminoácidos alterados do clone

Leu Thr
C CTC ACC

J1	8	Arg	Asp	Pro	Thr	Val	Pro	Leu	Ala	Arg
		CGT	GAC	CCC	ACC	GTC	CCC	CTT	GCG	CGG
J1	35	Ala	Ala	Trp	Glu	Thr	Ala	Arg	His	Thr
		GCT	GCG	TGG	GAG	ACA	GCT	AGA	CAC	ACT
									C	
									g	
									Thr(=)	
J1	62	Pro	Val	Asn	Ser	Trp	Leu	Gly	Asn	Ile
		CCA	GTC	AAC	TCC	TGG	CTA	GGC	AAC	ATC
J1	89	Ile	Met	Tyr	Ala	Pro	Thr	Leu	Trp	Ala
		ATC	ATG	TAT	GCG	CCC	ACT	TTG	TGG	GCA
		T								
		g								
		Ile(=)								
J1	116	Arg	Met	Ile	Leu	Met	Thr	His	Phe	Phe
		AGG	ATG	ATT	CTG	ATG	ACT	CAC	TTC	TTC
J1	143	Ser	Ile	Leu	Leu	Ala	Gln	Glu	Gln	Leu
		TCC	ATC	CTT	CTA	GCC	CAG	GAG	CAA	CTT
J1	170	Glu	Lys	Ala	Leu	Asp	Cys	Gln	Ile	Tyr
		GAA	AAA	GCC	CTG	GAT	TGT	CAA	ATC	TAC
J1	197	Gly	Ala	Cys	Tyr	Ser	Ile	Glu	Pro	Leu
		GGG	GCC	TGT	TAC	TCC	ATT	GAG	CCA	CTT

FIG. 5-1



J1	224	Asp	Leu	Pro	Gln	Ile	Ile	Glu	Arg	Leu
		GAC	CTA	CCT	CAG	ATC	ATT	GAA	CGA	CTC
J1	251	His	Gly	Leu	Ser	Ala	Phe	Ser	Leu	His
		CAT	GGT	CTT	AGC	GCA	TTT	TCA	CTC	CAT
J1	278	Ser	Tyr	Ser	Pro	Gly	Glu	Ile	Asn	Arg
		AGT	TAC	TCT	CCA	GGT	GAG	ATC	AAT	AGG
J1	305	Val	Ala	Ser	Cys	Leu	Arg	Lys	Leu	Gly
		GTG	GCT	TCA	TGC	CTC	AGG	AAG	CTT	GGG
J1	332	Val	Pro	Pro	Leu	Arg	Val	Trp	Arg	His
		GTA	CCA	CCC	TTG	CGA	GTC	TGG	AGA	CAT
J1	359	Arg	Ala	Arg	Ser	Val	Arg	Ala	Lys	Leu
		CGG	GCC	AGA	AGT	GTC	CGC	GCT	AAG	CTA
J1	386	Leu	Ser	Gln	Gly	Gly	Arg	Ala	Ala	Thr
		CTG	TCC	CAA	GGG	GGG	AGG	GCC	GCC	ACT
				G						
				g						
				Gln(=)						
J1	413	Lys	Gly	Lys	Tyr	Leu				
		TGT	GGC	AAG	TAC	CTC				

FIG. 5-2

J7 HCV1 1 AGCCGAGTAGTGTTGGGTCGCGAAAGGCCTTGTGGT

J7 HCV1 37 ACTGCCTGATAGGGTGCTTGCGAGTGCCCCGGGAGG

J7 HCV1 73 TCTCGTAGACCGTGCATC ATG AGC ACA AAT
C G
Met Ser Thr Asn

J7 HCV1 103 CCT AAA CCC CAA AGA AAA ACC AAA CGT
T A A
Lys Asn

J7 HCV1 130 AAC ACC AAC CGT CGC CCA CAG GAC GTT
C
Asn Thr Asn Arg Arg Pro Gln Asp Val

J7 HCV1 157 AAG TTC CCG GGC GGT GGT CAG ATC GTC
T C T
Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val

J7 HCV1 184 GGT GGA GTT TAC TTG TTG CCG CGC AGG
Gly Gly Val Tyr Leu Leu Pro Arg Arg

J7 HCV1 211 GGC CCC AGG TTG GGT GTG CGT GCG ACT
T A C G
Gly Pro Arg Leu Gly Val Arg Ala Thr

J7 HCV1 238 AGG AAG ACT TCC GAG CGG TCG CAA CCT
A
Arg Lys Thr Ser Glu Arg Ser Gln Pro

FIG. 6-1



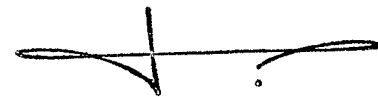
J7 HCV1	265	Arg CGT A	Gly GGA T	Arg AGG A	Arg CGA T	Gln CAA G	Pro CCT	Ile ATC	Pro CCC	Lys AAG
J7 HCV1	292	Ala GCT	Arg CGC T	Arg CGG	Pro CCC	Glu GAG	Gly GGC	Arg AGG	Thr ACC	Trp TGG
J7 HCV1	319	Ala GCT	Gln CAG	Pro CCT C	Gly GGG	Tyr TAT C	Pro CCT	Trp TGG	Pro CCC	Leu CTC
J7 HCV1	346	Tyr TAT	Gly GGC	Asn AAT	Glu GAG	Gly GGC	Leu TTG GC Cys ***	Gly GGG	Trp TGG	Ala GCA G
J7 HCV1	373	Gly GGA	Trp TGG	Leu CTC	Leu CTG	Ser TCA T	Pro CCC	Arg CGC T	Gly GGC	Ser TCT
J7 HCV1	400	Arg CGG	Pro CCT	Ser AGT C	Trp TGG	Gly GGC	Pro CCC	Asn AAT CA Thr ***	Asp GAC	Pro CCC
J7 HCV1	427	Arg CGG	Arg CGT	Arg AGG	Ser TCG	Arg CGT C	Asn AAT	Leu TTG	Gly GGT	Lys AAG
J7 HCV1	454	Val GTC	Ile ATC	Asp GAT	Thr ACC	Leu CTT	Thr ACA G	Cys TGC	Gly GGC	Phe TTC

FIG. 6-2



J7	481	Ala	Asp	Leu	Met	Gly	Tyr	Ile	Pro	Leu
HCV1		GCC	GAC	CTC	ATG	GGG	TAC	ATT	CCG	CTT
								A		C
J7	508	Val	Gly	Ala	Pro	Leu	Gly	Gly	Ala	Ala
HCV1		GTC	GGC	GCC	CCC	TTA	GGG	GGC	GCT	GCC
					T	C	T	A		
J7	535	Arg	Ala	Leu	Ala	His	Gly			
HCV1		AGG	GCC	CTG	GCA	CAT	GGT			
					G		C			

FIG. 6-3



J1	1	T A	Pro CCG	Leu CTC	Val GTC	Gly GGC	Ala GCC	Pro CCC T	Leu TTA C	Gly GGG T	Gly GGC A
J1	29		Ala GCT	Ala GCC	Arg AGG	Ala GCC	Leu CTG	Ala GCA G	His CAT	Gly GGT C	Val GTC
J1	56		Arg CGG	Val GTT	Leu CTG	Glu GAG A	Asp GAC	Gly GGC	Val GTG	Asn AAC	Tyr TAT
J1	83		Ala GCA	Thr ACA	Gly GGG	Asn AAT C	Leu TTG C	Pro CCC T	Gly GGT	Cys TGC	Ser TCT
J1	110		Phe TTC	Ser TCT	Ile ATC	Phe TTC	Leu CTC T	Leu TTG C	Ala GCT C	Leu CTG	Leu CTG C
J1	137		Ser TCC T	Cys TGT C	Leu TTG	Thr ACC T	Ile ATC G	Pro CCA C	Ala GCT	Ser TCC G	Ala GCT C
J1	164		Tyr TAT C	Glu GAA C	Val GTG	Arg CGC	Asn AAC	Val GTG TCC	Ser TCC A	Gly GGG G	Ile ATA C
				Gln ***				Ser ***	Thr		Leu
J1	191		Tyr TAC	His CAT C	Val GTC	Thr ACA C	Asn AAC T	Asp GAC T	Cys TGC	Ser TCC C	Asn AAC T
										Pro	

FIG. 7-1

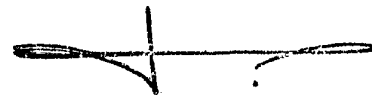
J1	218	Ser TCA G	Ser AGC T	Ile ATT	Val GTG	Tyr TAT C	Glu GAG	Ala GCG	Ala GCG C	Asp GAC T
J1	245	Val GTG CC Ala	Ile ATC	Met ATG C Leu	His CAT C	Ala GCC A T Thr	Pro CCC G	Gly GGG	Cys TGC	Val GTG C
J1	272	Pro CCC T	Cys TGC	Val GTT	Arg CGG T	Glu GAG	Asn AAC GG Gly ***	Asn AAT C	Ser TCC G Ala	Ser TCC G
J1	299	Arg CGT A G	Cys TGC T	Trp TGG	Val GTA G	Ala GCG	Leu CTC A G Met	Thr ACT C	Pro CCC T	Thr ACG
J1	326	Leu CTC G G Val	Ala GCG C	Ala GCC A Thr	Arg AGG	Asn AAT G Asp ***	Ala GCC G Gly	Ser AGC AA Lys ***	Val GTC C Leu	Pro CCC
J1	353	Thr ACT G G Ala	Thr ACG	Thr ACA CAG Gln ***	Leu TTA C T	Arg CGA	Arg CGC T	His CAC	Val GTC A Ile	Asp GAC T
J1	380	Leu TTG C	Leu CTC T	Val GTT C	Gly GGG	Thr ACG GC Ser	Ala GCT C	Ala GCT A C Thr	Phe TTC C Leu	Cys TGC T

FIG. 7-2

J1	407	Ser	Ala	Met	Tyr	Val	Gly	Asp	Leu	Cys
		TCC	GCT	ATG	TAC	GTG	GGG	GAT	CTC	TGC
		G	C	C	C			C	A	
				Leu						
J1	434	Gly	Ser	Val	Phe	Leu	Ile	Ser	Gln	Leu
		GGA	TCT	GTT	TTC	CTC	ATC	TCC	CAG	CTG
		G		C	T	T	G	GG	A	
						Val	Gly			
J1	461	Phe	Thr	Phe	Ser	Pro	Arg	Arg	His	Glu
		TTC	ACC	TTC	TCG	CCT	CGC	CGG	CAT	GAG
					T	C	A	G	C	TG
										Trp

J1	488	Thr	Val	Gln	Asp	Cys	Asn	Cys	Ser	Ile
		ACA	GTA	CAG	GAC	TGC	AAC	TGC	TCA	ATC
		G	ACG	A	GT		T		T	
			Thr		Gly					
			***		***					
J1	515	Tyr	Pro	Gly	His	Val	Ser	Gly	His	Arg
		TAT	CCC	GGC	CAC	GTA	TCA	GGC	CAT	CGC
					T	A	A	G	T	C
						Ile	Thr			
J1	542	Met	Ala	Trp	Asp	Met	Met	Met	Asn	Trp
		ATG	GCT	TGG	GAT	ATG	ATG	ATG	AAC	TGG
			A							
J1	569	Ser	Pro	Thr	Ala					
		TCG	CCC	ACG	GCA					
		C	T		A	G				
					Thr					

FIG. 7-3



				Asn	Trp	Ser	Pro	Thr	Ala		
	J1	1		AAC	TGG	TCG	CCC	ACG	GCA		
	HCV1					C	T		A G		
									Thr		
			Ala	Leu	Val	Val	Ser	Gln	Leu	Leu	Arg
	J1	19	GCC	TTA	GTG	GTG	TCG	CAG	TTA	CTC	CGG
	HCV1		G	G	A	A	G T		C G		
						Met	Ala				
			Ile	Pro	Gln	Ala	Val	Met	Asp	Met	Val
	J1	46	ATC	CCA	CAA	GCT	GTC	ATG	GAC	ATG	GTG
	HCV1					C A	T				A C
						Ile	Leu				Ile
			Ala	Gly	Ala	His	Trp	Gly	Val	Leu	Ala
	J1	73	GCG	GGG	GCC	CAC	TGG	GGA	GTC	CTA	GCG
	HCV1		T	T	T					G	
			Gly	Leu	Ala	Tyr	Tyr	Ser	Met	Val	Gly
	J1	100	GGC	CTT	GCC	TAC	TAT	TCC	ATG	GTG	GGG
	HCV1		A A	G	T	TC					
			Ile			Phe					
			Asn	Trp	Ala	Lys	Val	Leu	Ile	Val	Met
	J1	127	AAC	TGG	GCT	AAG	GTT	TTG	ATT	GTG	ATG
	HCV1				G		C C		G A		C
									Val		Leu
			Leu	Leu	Phe	Ala	Gly	Val	Asp	Gly	His
	J1	154	CTA	CTC	TTT	GCC	GGC	GTT	GAC	GGG	CAT
	HCV1		G	A				C		C	G A
										Ala	Glu

			Thr	Arg	Val	Thr	Gly	Gly	Val	Gln	Gly
	J1	181	ACC	CGC	GTG	ACG	GGG	GGG	GTG	CAA	GGC
	HCV1			A	C	C		A	AGT	GCC	
			His						Ser	Ala	
									***	***	

FIG. 8-1

J1 208
HCV1

His	Val	Thr	Ser	Thr	Leu	Thr	Ser	Leu
CAC	GTC	ACC	TCT	ACA	CTC	ACG	TCC	CTC
	ACT	GTG		GG	T T	GTT	AG	
	Thr	Val		Gly	Phe	Val		
	***	***				***		

J1 235
HCV1

Phe	Arg	Pro	Gly	Ala	Ser	Gln	Lys	Ile
TTT	AGA	CCT	GGG	GCG	TCC	CAG	AAA	ATT
C C	GC	A	C	C	AAG		C G	C
Leu	Ala				Lys		Asn	Val
	***				***		***	

J1 262
HCV1

Gln	Leu	Val	Asn	Thr	Asn	Gly	Ser	Trp
CAG	CTT	GTA	AAC	ACC	AAT	GGC	AGT	TGG
	G	A C			C			
		Ile						

J1 289
HCV1

His	Ile	Asn	Arg	Thr	Ala	Leu	Asn	Cys
CAT	ATC	AAC	AGG	ACT	GCC	CTG	AAC	TGC
	C C	T	C	G				
	Leu		Ser					

J1 316
HCV1

Asn	Asp	Ser	Leu	Gln	Thr	Gly	Phe	Leu
AAT	GAC	TCC	CTC	CAA	ACT	GGG	TTC	CTT
	T	AG		A C	C	C	GG	T G
				Asn			Trp	

J1 343
HCV1

Ala	Ala	Leu
GCC	GCG	CTG
A	G	T
	Gly	

FIG. 8-2

J1	1							Ser	Val	Ile
HCV1		ggctataaccggcgacttcga						C TCA	GTG	ATC
								G		A
J1	11	Asp	Cys	Asn	Thr	Cys	Val	Thr	Gln	Thr
HCV1		GAC	TGT	AAC	ACA	TGT	GTC	ACT	CAG	ACG
			C	T	G			C		A
J1	38	Val	Asp	Phe	Ser	Leu	Asp	Pro	Thr	Phe
HCV1		GTC	GAT	TTC	AGC	TTG	GAT	CCC	ACC	TTC
						C T	C	T		
J1	65	Thr	Ile	Glu	Thr	Thr	Thr	Val	Pro	Gln
HCV1		ACC	ATC	GAG	ACG	ACG	ACC	GTG	CCC	CAA
			T		A	TC	G C C			G
						<u>Ile</u>				
J1	92	Asp	Ala	Val	Ser	Arg	Thr	Gln	Arg	Arg
HCV1		GAT	GCG	GTT	TCG	CGC	ACG	CAG	CGG	CGA
			T	C	C		T	A	T	G
J1	119	Gly	Arg	Thr	Gly	Arg	Gly	Arg	Arg	Gly
HCV1		GGT	AGG	ACT	GGC	AGG	GGC	AGG	AGA	GGC
		C					G	A	CC	
								Lys	<u>Pro</u>	
J1	146	Ile	Tyr	Arg	Phe	Val	Thr	Pro	Gly	Glu
HCV1		ATC	TAT	AGG	TTT	GTG	ACT	CCA	GGA	GAA
			C	A			G A	G	G	G
							Ala			
J1	173	Arg	Pro	Ser	Ala	Met	Phe	Asp	Ser	Ser
HCV1		CGG	CCC	TCG	GCG	ATG	TTC	GAT	TCT	TCG
		C		C	GC			C	G	C
					Gly					

FIG. 9-1

J1	200	Val	Leu	Cys	Glu	Cys	Tyr	Asp	Ala	Gly
HCV1		GTC	CTA	TGT	GAG	TGT	TAT	GAC	GCG	GGC
			C			C			A	
J1	227	Cys	Ala	Trp	Tyr	Glu	Leu	Thr	Pro	Ala
HCV1		TGT	GCT	TGG	TAT	GAG	CTC	ACG	CCC	GCT
										C
J1	254	Glu	Thr	Ser	Val	Arg	Leu	Arg	Ala	Tyr
HCV1		GAG	ACC	TCG	GTT	AGG	TTG	CGG	GCT	TAC
			T	A	A		C	A	A	G
				Thr						
J1	281	Leu	Asn	Thr	Pro	Gly	Leu	Pro	Val	Cys
HCV1		CTA	AAT	ACA	CCA	GGG	TTG	CCC	GTC	TGC
		A	G	C	C	G	C	T		G
		Met								
J1	308	Gln	Asp	His	Leu	Glu	Phe	Trp	Glu	Ser
HCV1		CAG	GAC	CAT	CTG	GAG	TTC	TGG	GAG	AGC
					T	A	T			G
										Gly
J1	335	Val	Phe	Thr	Gly	Leu	Thr	His	Ile	Asp
HCV1		GTC	TTC	ACA	GGC	CTC	ACC	CAC	ATA	GAC
			T				T	T		T
J1	362	Ala	His	Phe	Leu	Ser	Gln	Thr	Lys	Gln
HCV1		GCC	CAC	TTC	TTG	TCC	CAG	ACT	AAG	CAG
				T	C	A		A		
J1	389	Ala	Gly	Asp	Asn	Phe	Pro	Tyr	Leu	Val
HCV1		GCA	GGA	GAC	AAC	TTC	CCC	TAC	CTG	GTA
		AGT	G	G		C	T	T		
		Ser		Glu		Leu				

FIG. 9-2



J1	416	Ala	Tyr	Gln	Ala	Thr	Val	Cys	Ala	Arg
HCV1		GCA	TAC	CAA	GCC	ACA	GTG	TGC	GCC	AGG
		G				C			T	
J1	443	Ala	Lys	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	Trp	Asp
HCV1		GCT	AAG	GCT	CCA	CCT	CCA	TCG	TGG	GAT
			C A	C	T	C				C
			<u>Gln</u>							
J1	470	Gln	Met	Trp	Lys	Cys	Leu	Ile	Arg	Leu
HCV1		CAA	ATG	TGG	AAG	TGT	CTC	ATA	CGG	CTA
		G					T G	T	C	C
J1	497	Lys	Pro	Thr	Leu	His	Gly	Pro	Thr	Pro
HCV1		AAG	CCT	ACG	CTG	CAC	GGG	CCA	ACG	CCC
			C	C	C	T			A	
J1	524	Leu	Leu	Tyr	Arg	Leu	Gly	Ala	Val	Gln
HCV1		CTG	CTG	TAT	AGG	CTA	GGA	GCC	GTC	CAG
			A	C	A	G	C	T	T	
J1	551	Asn	Glu	Val	Thr	Leu	Thr	His	Pro	Ile
HCV1		AAT	GAG	GTC	ACC	CTC	ACA	CAC	CCT	ATA
			A A			G	G		A	G C
				Ile						Val
J1	578	Thr	Lys							
HCV1		ACC	AAA							
				tacatcatgacatgcatgtc						

FIG. 9-3



											Leu Thr C CTC ACC
		J1	1								
		HCV1									
J1	8	Arg	Asp	Pro	Thr	Val	Pro	Leu	Ala	Arg	
HCV1		CGT	GAC	CCC	ACC	GTC	CCC	CTT	GCG	CGG	
				T	A	AC		C		A A	
						Thr					

J1	35	Ala	Ala	Trp	Glu	Thr	Ala	Arg	His	Thr	
HCV1		GCT	GCG	TGG	GAG	ACA	GCT	AGA	CAC	ACT	
							A				
J1	62	Pro	Val	Asn	Ser	Trp	Leu	Gly	Asn	Ile	
HCV1		CCA	GTC	AAC	TCC	TGG	CTA	GGC	AAC	ATC	
				T						A	
J1	89	Ile	Met	Tyr	Ala	Pro	Thr	Leu	Trp	Ala	
HCV1		ATC	ATG	TAT	GCG	CCC	ACT	TTG	TGG	GCA	
				T	C		A C			G	
				Phe							
J1	116	Arg	Met	Ile	Leu	Met	Thr	His	Phe	Phe	
HCV1		AGG	ATG	ATT	CTG	ATG	ACT	CAC	TTC	TTC	
				A			C	T		T	
J1	143	Ser	Ile	Leu	Leu	Ala	Gln	Glu	Gln	Leu	
HCV1		TCC	ATC	CTT	CTA	GCC	CAG	GAG	CAA	CTT	
		AG	G		A		AG	C	G		
			Val		Ile		Arg	Asp			

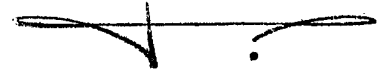
J1	170	Glu	Lys	Ala	Leu	Asp	Cys	Gln	Ile	Tyr	
HCV1		GAA	AAA	GCC	CTG	GAT	TGT	CAA	ATC	TAC	
			C G		C		C	G G			
			Gln					Glu			
			***					***			

FIG. 10-1

J1	197	Gly	Ala	Cys	Tyr	Ser	Ile	Glu	Pro	Leu
HCV1		GGG	GCC	TGT	TAC	TCC	ATT	GAG	CCA	CTT
				C			A	A		
J1	224	Asp	Leu	Pro	Gln	Ile	Ile	Glu	Arg	Leu
HCV1		GAC	CTA	CCT	CAG	ATC	ATT	GAA	CGA	CTC
		T			CA			C	A	
				Pro				Gln		
				***				***		
J1	251	His	Gly	Leu	Ser	Ala	Phe	Ser	Leu	His
HCV1		CAT	GGT	CTT	AGC	GCA	TTT	TCA	CTC	CAT
			C	C						C
J1	278	Ser	Tyr	Ser	Pro	Gly	Glu	Ile	Asn	Arg
HCV1		AGT	TAC	TCT	CCA	GGT	GAG	ATC	AAT	AGG
							A	T		
J1	305	Val	Ala	Ser	Cys	Leu	Arg	Lys	Leu	Gly
HCV1		GTG	GCT	TCA	TGC	CTC	AGG	AAG	CTT	GGG
			C	G			A	A		
				Ala						
J1	332	Val	Pro	Pro	Leu	Arg	Val	Trp	Arg	His
HCV1		GTA	CCA	CCC	TTG	CGA	GTC	TGG	AGA	CAT
			G				CT			C
							Ala			

J1	359	Arg	Ala	Arg	Ser	Val	Arg	Ala	Lys	Leu
HCV1		CGG	GCC	AGA	AGT	GTC	CGC	GCT	AAG	CTA
				C	G	C			G	T
									Arg	
J1	386	Leu	Ser	Gln	Gly	Gly	Arg	Ala	Ala	Thr
HCV1		CTG	TCC	CAA	GGG	GGG	AGG	GCC	GCC	ACT
			G	AG	A	C		T		TA
			Ala	Arg						Ile
				***						***

FIG. 10-2



J1 413 Lys Gly Lys Tyr Leu
HCV1 TGT GGC AAG TAC CTC

FIG. 10-3

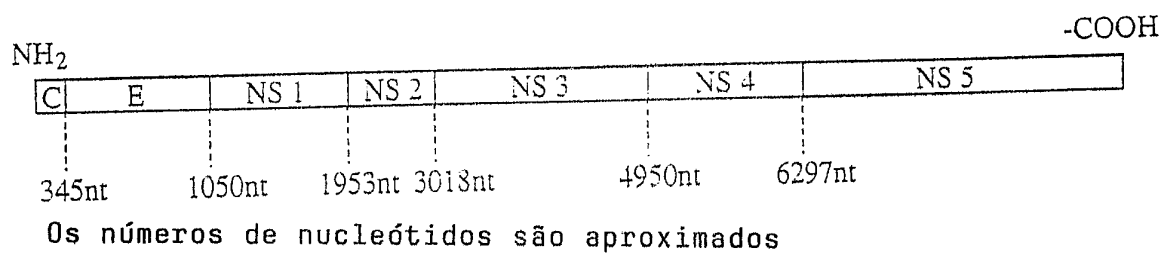


FIG. 11

HCV-1

-267 GCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTCGTGCAGCCTCCAGG
CGCAGATCGGTACCGCAATCATACTCACAGCACGTCCGGAGGTCC

-223 ACCCCCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGA
TGGGGGGGAGGGCCCTCTCGGTATCACCAGACGCCTTGGCCACT

-179 GTACACCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCCTTTCTTGGATCAA
CATGTGGCCTTAACGGTCCTGCTGGCCCAGGAAAGAACCTAGTT

-135 CCCGCTCAATGCCTCGAGATTTGGGCGTGCCCCCGCAAGACTGC
GGGCGAGTTACGGACCTCTAAACCCGCACGGGGGCGTTCTGACG

-91 TAGCCGAGTAGTGTTGGGTCCCGAAAGGCCTTGTGGTACTGCCT
ATCGGCTCATCACAACCCAGCGCTTTCCGGAACACCATGACGGA

-47 GATAGGGTGCTTGCGAGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGC
CTATCCCACGAACGCTCACGGGGGCCCTCCAGAGCATCTGGCAGG

-3 ACC -1
TGG

	Met	Ser	Thr	Asn	Pro	Lys	Pro	Gln	Lys	Lys	Asn
1	ATG	AGC	ACG	AAT	CCT	AAA	CCT	CAA	AAA	AAA	AAC
	TAC	TCG	TGC	TTA	GGA	TTT	GGA	GTT	TTT	TTT	TTG
	Lys	Arg	Asn	Thr	Asn	Arg	Arg	Pro	Gln	Asp	Val
34	AAA	CGT	AAC	ACC	AAC	CGT	CGC	CCA	CAG	GAC	GTC
	TTT	GCA	TTG	TGG	TTG	GCA	GCG	GGT	GTC	CTG	CAG
	Lys	Phe	Pro	Gly	Gly	Gly	Gln	Ile	Val	Gly	Gly
67	AAG	TTC	CCG	GGT	GGC	GGT	CAG	ATC	GTT	GGT	GGA
	TTC	AAG	GGC	CCA	CCG	CCA	GTC	TAG	CAA	CCA	CCT

FIG. 12-1



100	Val	Tyr	Leu	Leu	Pro	Arg	Arg	Gly	Pro	Arg	Leu
	GTT	TAC	TTG	TTG	CCG	CGC	AGG	GGC	CCT	AGA	TTG
	CAA	ATG	AAC	AAC	GGC	GCG	TCC	CCG	GGA	TCT	AAC
133	Gly	Val	Arg	Ala	Thr	Arg	Lys	Thr	Ser	Glu	Arg
	GGT	GTG	CGC	GCG	ACG	AGA	AAG	ACT	TCC	GAG	CGG
	CCA	CAC	GCG	CGC	TGC	TCT	TTC	TGA	AGG	CTC	GCC
166	Ser	Gln	Pro	Arg	Gly	Arg	Arg	Gln	Pro	Ile	Pro
	TCG	CAA	CCT	CGA	GGT	AGA	CGT	CAG	CCT	ATC	CCC
	AGC	GTT	GGA	GCT	CCA	TCT	GCA	GTC	GGA	TAG	GGG
199	Lys	Ala	Arg	Arg	Pro	Glu	Gly	Arg	Thr	Trp	Ala
	AAG	GCT	CGT	CGG	CCC	GAG	GGC	AGG	ACC	TGG	GCT
	TTC	CGA	GCA	GCC	GGG	CTC	CCG	TCC	TGG	ACC	CGA
232	Gln	Pro	Gly	Tyr	Pro	Trp	Pro	Leu	Tyr	Gly	Asn
	CAG	CCC	GGG	TAC	CCT	TGG	CCC	CTC	TAT	GGC	AAT
	GTC	GGG	CCC	ATG	GGA	ACC	GGG	GAG	ATA	CCG	TTA
265	Glu	Gly	Cys	Gly	Trp	Ala	Gly	Trp	Leu	Leu	Ser
	GAG	GGC	TGC	GGG	TGG	GCG	GGA	TGG	CTC	CTG	TCT
	CTC	CCG	ACG	CCC	ACC	CGC	CCT	ACC	GAG	GAC	AGA
298	Pro	Arg	Gly	Ser	Arg	Pro	Ser	Trp	Gly	Pro	Thr
	CCC	CGT	GGC	TCT	CGG	CCT	AGC	TGG	GGC	CCC	ACA
	GGG	GCA	CCG	AGA	GCC	GGA	TCG	ACC	CCG	GGG	TGT
331	Asp	Pro	Arg	Arg	Arg	Ser	Arg	Asn	Leu	Gly	Lys
	GAC	CCC	CGG	CGT	AGG	TCG	CGC	AAT	TTG	GGT	AAG
	CTG	GGG	GCC	GCA	TCC	AGC	GCG	TTA	AAC	CCA	TTC
364	Val	Ile	Asp	Thr	Leu	Thr	Cys	Gly	Phe	Ala	Asp
	GTC	ATC	GAT	ACC	CTT	ACG	TGC	GGC	TTC	GCC	GAC
	CAG	TAG	CTA	TGG	GAA	TGC	ACG	CCG	AAG	CGG	CTG

FIG. 12-2

397 Leu Met Gly Tyr Ile Pro Leu Val Gly Ala Pro
 CTC ATG GGG TAC ATA CCG CTC GTC GGC GCC CCT
 GAG TAC CCC ATG TAT GGC GAG CAG CCG CGG GGA

430 Leu Gly Gly Ala Ala Arg Ala Leu Ala His Gly
 CTT GGA GGC GCT GCC AGG GCC CTG GCG CAT GGC
 GAA CCT CCG CGA CGG TCC CGG GAC CGC GTA CCG

463 Val Arg Val Leu Glu Asp Gly Val Asn Tyr Ala
 GTC CGG GTT CTG GAA GAC GGC GTG AAC TAT GCA
 CAG GCC CAA GAC CTT CTG CCG CAC TTG ATA CGT

496 Thr Gly Asn Leu Pro Gly Cys Ser Phe Ser Ile
 ACA GGG AAC CTT CCT GGT TGC TCT TTC TCT ATC
 TGT CCC TTG GAA GGA CCA ACG AGA AAG AGA TAG

529 Phe Leu Leu Ala Leu Leu Ser Cys Leu Thr Val
 TTC CTT CTG GCC CTG CTC TCT TGC TTG ACT GTG
 AAG GAA GAC CGG GAC GAG AGA ACG AAC TGA CAC

562 Pro Ala Ser Ala Tyr Gln Val Arg Asn Ser Thr
 CCC GCT TCG GCC TAC CAA GTG CGC AAC TCC ACG
 GGG CGA AGC CGG ATG GTT CAC GCG TTG AGG TGC

595 Gly Leu Tyr His Val Thr Asn Asp Cys Pro Asn
 GGG CTT TAC CAC GTC ACC AAT GAT TGC CCT AAC
 CCC GAA ATG GTG CAG TGG TTA CTA ACG GGA TTG

628 Ser Ser Ile Val Tyr Glu Ala Ala Asp Ala Ile
 TCG AGT ATT GTG TAC GAG GCG GCC GAT GCC ATC
 AGC TCA TAA CAC ATG CTC CGC CGG CTA CGG TAG

661 Leu His Thr Pro Gly Cys Val Pro Cys Val Arg
 CTG CAC ACT CCG GGG TGC GTC CCT TGC GTT CGT
 GAC GTG TGA GGC CCC ACG CAG GGA ACG CAA GCA

FIG. 12-3

694	Glu	Gly	Asn	Ala	Ser	Arg	Cys	Trp	Val	Ala	Met
	GAG	GGC	AAC	GCC	TCG	AGG	TGT	TGG	GTG	GCG	ATG
	CTC	CCG	TTG	CGG	AGC	TCC	ACA	ACC	CAC	CGC	TAC
727	Thr	Pro	Thr	Val	Ala	Thr	Arg	Asp	Gly	Lys	Leu
	ACC	CCT	ACG	GTG	GCC	ACC	AGG	GAT	GGC	AAA	CTC
	TGG	GGA	TGC	CAC	CGG	TGG	TCC	CTA	CCG	TTT	GAG
760	Pro	Ala	Thr	Gln	Leu	Arg	Arg	His	Ile	Asp	Leu
	CCC	GCG	ACG	CAG	CTT	CGA	CGT	CAC	ATC	GAT	CTG
	GGG	CGC	TGC	GTC	GAA	GCT	GCA	GTG	TAG	CTA	GAC
793	Leu	Val	Gly	Ser	Ala	Thr	Leu	Cys	Ser	Ala	Leu
	CTT	GTC	GGG	AGC	GCC	ACC	CTC	TGT	TCG	GCC	CTC
	GAA	CAG	CCC	TCG	CGG	TGG	GAG	ACA	AGC	CGG	GAG
826	Tyr	Val	Gly	Asp	Leu	Cys	Gly	Ser	Val	Phe	Leu
	TAC	GTG	GGG	GAC	CTA	TGC	GGG	TCT	GTC	TTT	CTT
	ATG	CAC	CCC	CTG	GAT	ACG	CCC	AGA	CAG	AAA	GAA
859	Val	Gly	Gln	Leu	Phe	Thr	Phe	Ser	Pro	Arg	Arg
	GTC	GGC	CAA	CTG	TTC	ACC	TTC	TCT	CCC	AGG	CGC
	CAG	CCG	GTT	GAC	AAG	TGG	AAG	AGA	GGG	TCC	GCG
892	His	Trp	Thr	Thr	Gln	Gly	Cys	Asn	Cys	Ser	Ile
	CAC	TGG	ACG	ACG	CAA	GGT	TGC	AAT	TGC	TCT	ATC
	GTG	ACC	TGC	TGC	GTT	CCA	ACG	TTA	ACG	AGA	TAG
925	Tyr	Pro	Gly	His	Ile	Thr	Gly	His	Arg	Met	Ala
	TAT	CCC	GGC	CAT	ATA	ACG	GGT	CAC	CGC	ATG	GCA
	ATA	GGG	CCG	GTA	TAT	TGC	CCA	GTG	GCG	TAC	CGT
958	Trp	Asp	Met	Met	Met	Asn	Trp	Ser	Pro	Thr	Thr
	TGG	GAT	ATG	ATG	ATG	AAC	TGG	TCC	CCT	ACG	ACG
	ACC	CTA	TAC	TAC	TAC	TTG	ACC	AGG	GGA	TGC	TGC

FIG. 12-4

991	Ala	Leu	Val	Met	Ala	Gln	Leu	Leu	Arg	Ile	Pro
	GCG	TTG	GTA	ATG	GCT	CAG	CTG	CTC	CGG	ATC	CCA
	CGC	AAC	CAT	TAC	CGA	GTC	GAC	GAG	GCC	TAG	GGT
1024	Gln	Ala	Ile	Leu	Asp	Met	Ile	Ala	Gly	Ala	His
	CAA	GCC	ATC	TTG	GAC	ATG	ATC	GCT	GGT	GCT	CAC
	GTT	CGG	TAG	AAC	CTG	TAC	TAG	CGA	CCA	CGA	GTG
1057	Trp	Gly	Val	Leu	Ala	Gly	Ile	Ala	Tyr	Phe	Ser
	TGG	GGA	GTC	CTG	GCG	GGC	ATA	GCG	TAT	TTC	TCC
	ACC	CCT	CAG	GAC	CGC	CCG	TAT	CGC	ATA	AAG	AGG
1090	Met	Val	Gly	Asn	Trp	Ala	Lys	Val	Leu	Val	Val
	ATG	GTG	GGG	AAC	TGG	GCG	AAG	GTC	CTG	GTA	GTG
	TAC	CAC	CCC	TTG	ACC	CGC	TTC	CAG	GAC	CAT	CAC
1123	Leu	Leu	Leu	Phe	Ala	Gly	Val	Asp	Ala	Glu	Thr
	CTG	CTG	CTA	TTT	GCC	GGC	GTC	GAC	GCG	GAA	ACC
	GAC	GAC	GAT	AAA	CGG	CCG	CAG	CTG	CGC	CTT	TGG
1156	His	Val	Thr	Gly	Gly	Ser	Ala	Gly	His	Thr	Val
	CAC	GTC	ACC	GGG	GGA	AGT	GCC	GGC	CAC	ACT	GTG
	GTG	CAG	TGG	CCC	CCT	TCA	CGG	CCG	GTG	TGA	CAC
1189	Ser	Gly	Phe	Val	Ser	Leu	Leu	Ala	Pro	Gly	Ala
	TCT	GGA	TTT	GTT	AGC	CTC	CTC	GCA	CCA	GGC	GCC
	AGA	CCT	AAA	CAA	TCG	GAG	GAG	CGT	GGT	CCG	CGG
1222	Lys	Gln	Asn	Val	Gln	Leu	Ile	Asn	Thr	Asn	Gly
	AAG	CAG	AAC	GTC	CAG	CTG	ATC	AAC	ACC	AAC	GGC
	TTC	GTC	TTG	CAG	GTC	GAC	TAG	TTG	TGG	TTG	CCG
1255	Ser	Trp	His	Leu	Asn	Ser	Thr	Ala	Leu	Asn	Cys
	AGT	TGG	CAC	CTC	AAT	AGC	ACG	GCC	CTG	AAC	TGC
	TCA	ACC	GTG	GAG	TTA	TCG	TGC	CGG	GAC	TTG	ACG

FIG. 12-5

1288	Asn Asp Ser Leu Asn Thr Gly Trp Leu Ala Gly
	AAT GAT AGC CTC AAC ACC GGC TGG TTG GCA GGG
	TTA CTA TCG GAG TTG TGG CCG ACC AAC CGT CCC
1321	Leu Phe Tyr His His Lys Phe Asn Ser Ser Gly
	TTT TCT ATC ACC ACA AGT TCA ACT CTT CAG GCT
	GAA AAG ATA GTG GTG TTC AAG TTG AGA AGT CCG
1354	Cys Pro Glu Arg Leu Ala Ser Cys Arg Pro Leu
	GTC CTG AGA GGC TAG CCA GCT GCC GAC CCC CTT
	ACA GGA CTC TCC GAT CGG TCG ACG GCT GGG GAA
1387	Thr Asp Phe Asp Gln Gly Trp Gly Pro Ile Ser
	ACC GAT TTT GAC CAG GGC TGG GGC CCT ATC AGT
	TGG CTA AAA CTG GTC CCG ACC CCG GGA TAG TCA
1420	Tyr Ala Asn Gly Ser Gly Pro Asp Gln Arg Pro
	TAT GCC AAC GGA AGC GGC CCC GAC CAG CGC CCC
	ATA CGG TTG CCT TCG CCG GGG CTG GTC GCG GGG
1453	Tyr Cys Trp His Tyr Pro Pro Lys Pro Cys Gly
	TAC TGC TGG CAC TAC CCC CCA AAA CCT TGC GGT
	ATG ACG ACC GTG ATG GGG GGT TTT GGA ACG CCA
1486	Ile Val Pro Ala Lys Ser Val Cys Gly Pro Val
	ATT GTG CCC GCG AAG AGT GTG TGT GGT CCG GTA
	TAA CAC GGG CGC TTC TCA CAC ACA CCA GGC CAT
1519	Tyr Cys Phe Thr Pro Ser Pro Val Val Val Gly
	TAT TGC TTC ACT CCC AGC CCC GTG GTG GTG GGA
	ATA ACG AAG TGA GGG TCG GGG CAC CAC CAC CCT
1552	Thr Thr Asp Arg Ser Gly Ala Pro Thr Tyr Ser
	ACG ACC GAC AGG TCG GGC GCG CCC ACC TAC AGC
	TGC TGG CTG TCC AGC CCG CGC GGG TGG ATG TCG

FIG. 12-6

1585	Trp	Gly	Glu	Asn	Asp	Thr	Asp	Val	Phe	Val	Leu
	TGG	GGT	GAA	AAT	GAT	ACG	GAC	GTC	TTC	GTC	CTT
	ACC	CCA	CTT	TTA	CTA	TGC	CTG	CAG	AAG	CAG	GAA
1618	Asn	Asn	Thr	Arg	Pro	Pro	Leu	Gly	Asn	Trp	Phe
	AAC	AAT	ACC	AGG	CCA	CCG	CTG	GGC	AAT	TGG	TTC
	TTG	TTA	TGG	TCC	GGT	GGC	GAC	CCG	TTA	ACC	AAG
1651	Gly	Cys	Thr	Trp	Met	Asn	Ser	Thr	Gly	Phe	Thr
	GGT	TGT	ACC	TGG	ATG	AAC	TCA	ACT	GGA	TTC	ACC
	CCA	ACA	TGG	ACC	TAC	TTG	AGT	TGA	CCT	AAG	TGG
1684	Lys	Val	Cys	Gly	Ala	Pro	Pro	Cys	Val	Ile	Gly
	AAA	GTG	TGC	GGA	GCG	CCT	CCT	TGT	GTC	ATC	GGA
	TTT	CAC	ACG	CCT	CGC	GGA	GGA	ACA	CAG	TAG	CCT
1717	Gly	Ala	Gly	Asn	Asn	Thr	Leu	His	Cys	Pro	Thr
	GGG	GCG	GGC	AAC	AAC	ACC	CTG	CAC	TGC	CCC	ACT
	CCC	CGC	CCG	TTG	TTG	TGG	GAC	GTG	ACG	GGG	TGA
1750	Asp	Cys	Phe	Arg	Lys	His	Pro	Asp	Ala	Thr	Tyr
	GAT	TGC	TTC	CGC	AAG	CAT	CCG	GAC	GCC	ACA	TAC
	CTA	ACG	AAG	GCG	TTC	GTA	GGC	CTG	CGG	TGT	ATG
1783	Ser	Arg	Cys	Gly	Ser	Gly	Pro	Trp	Ile	Thr	Pro
	TCT	CGG	TGC	GGC	TCC	GGT	CCC	TGG	ATC	ACA	CCC
	AGA	GCC	ACG	CCG	AGG	CCA	GGG	ACC	TAG	TGT	GGG
1816	Arg	Cys	Leu	Val	Asp	Tyr	Pro	Tyr	Arg	Leu	Trp
	AGG	TGC	CTG	GTC	GAC	TAC	CCG	TAT	AGG	CTT	TGG
	TCC	ACG	GAC	CAG	CTG	ATG	GGC	ATA	TCC	GAA	ACC
1849	His	Tyr	Pro	Cys	Thr	Ile	Asn	Tyr	Thr	Ile	Phe
	CAT	TAT	CCT	TGT	ACC	ATC	AAC	TAC	ACC	ATA	TTT
	GTA	ATA	GGA	ACA	TGG	TAG	TTG	ATG	TGG	TAT	AAA

FIG. 12-7

1882	Lys	Ile	Arg	Met	Tyr	Val	Gly	Gly	Val	Glu	His
	AAA	ATC	AGG	ATG	TAC	GTG	GGA	GGG	GTC	GAA	CAC
	TTT	TAG	TCC	TAC	ATG	CAC	CCT	CCC	CAG	CTT	GTG
1915	Arg	Leu	Glu	Ala	Ala	Cys	Asn	Trp	Thr	Arg	Gly
	AGG	CTG	GAA	GCT	GCC	TGC	AAC	TGG	ACG	CGG	GGC
	TCC	GAC	CTT	CGA	CGG	ACG	TTG	ACC	TGC	GCC	CCG
1948	Glu	Arg	Cys	Asp	Leu	Glu	Asp	Arg	Asp	Arg	Ser
	GAA	CGT	TGC	GAT	CTG	GAA	GAC	AGG	GAC	AGG	TCC
	CTT	GCA	ACG	CTA	GAC	CTT	CTG	TCC	CTG	TCC	AGG
1981	Glu	Leu	Ser	Pro	Leu	Leu	Leu	Thr	Thr	Thr	Gln
	GAG	CTC	AGC	CCG	TTA	CTG	CTG	ACC	ACT	ACA	CAG
	CTC	GAG	TCG	GGC	AAT	GAC	GAC	TGG	TGA	TGT	GTC
2014	Trp	Gln	Val	Leu	Pro	Cys	Ser	Phe	Thr	Thr	Leu
	TGG	CAG	GTC	CTC	CCG	TGT	TCC	TTC	ACA	ACC	CTA
	ACC	GTC	CAG	GAG	GGC	ACA	AGG	AAG	TGT	TGG	GAT
2047	Pro	Ala	Leu	Ser	Thr	Gly	Leu	Ile	His	Leu	His
	CCA	GCC	TTG	TCC	ACC	GGC	CTC	ATC	CAC	CTC	CAC
	GGT	CGG	AAC	AGG	TGG	CCG	GAG	TAG	GTG	GAG	GTG
2080	Gln	Asn	Ile	Val	Asp	Val	Gln	Tyr	Leu	Tyr	Gly
	CAG	AAC	ATT	GTG	GAC	GTG	CAG	TAC	TTG	TAC	GGG
	GTC	TTG	TAA	CAC	CTG	CAC	GTC	ATG	AAC	ATG	CCC
2113	Val	Gly	Ser	Ser	Ile	Ala	Ser	Trp	Ala	Ile	Lys
	GTG	GGG	TCA	AGC	ATC	GCG	TCC	TGG	GCC	ATT	AAG
	CAC	CCC	AGT	TCG	TAG	CGC	AGG	ACC	CGG	TAA	TTC
2146	Trp	Glu	Tyr	Val	Val	Leu	Leu	Phe	Leu	Leu	Leu
	TGG	GAG	TAC	GTC	GTT	CTC	CTG	TTC	CTT	CTG	CTT
	ACC	CTC	ATG	CAG	CAA	GAG	GAC	AAG	GAA	GAC	GAA

FIG. 12-8

2179	Ala	Asp	Ala	Arg	Val	Cys	Ser	Cys	Leu	Trp	Met
	GCA	GAC	GCG	CGC	GTC	TGC	TCC	TGC	TTG	TGG	ATG
	CGT	CTG	CGC	GCG	CAG	ACG	AGG	ACG	AAC	ACC	TAC
2212	Met	Leu	Leu	Ile	Ser	Gln	Ala	Glu	Ala	Ala	Leu
	ATG	CTA	CTC	ATA	TCC	CAA	GCG	GAG	GCG	GCT	TTG
	TAC	GAT	GAG	TAT	AGG	GTT	CGC	CTC	CGC	CGA	AAC
2245	Glu	Asn	Leu	Val	Ile	Leu	Asn	Ala	Ala	Ser	Leu
	GAG	AAC	CTC	GTA	ATA	CTT	AAT	GCA	GCA	TCC	CTG
	CTC	TTG	GAG	CAT	TAT	GAA	TTA	CGT	CGT	AGG	GAC
2278	Ala	Gly	Thr	His	Gly	Leu	Val	Ser	Phe	Leu	Val
	GCC	GGG	ACG	CAC	GGT	CTT	GTA	TCC	TTC	CTC	GTG
	CGG	CCC	TGC	GTG	CCA	GAA	CAT	AGG	AAG	GAG	CAC
2311	Phe	Phe	Cys	Phe	Ala	Trp	Tyr	Leu	Lys	Gly	Lys
	TTC	TTC	TGC	TTT	GCA	TGG	TAT	TTG	AAG	GGT	AAG
	AAG	AAG	ACG	AAA	CGT	ACC	ATA	AAC	TTC	CCA	TTC
2344	Trp	Val	Pro	Gly	Ala	Val	Tyr	Thr	Phe	Tyr	Gly
	TGG	GTG	CCC	GGA	GCG	GTC	TAC	ACC	TTC	TAC	GGG
	ACC	CAC	GGG	CCT	CGC	CAG	ATG	TGG	AAG	ATG	CCC
2377	Met	Trp	Pro	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Ala	Leu
	ATG	TGG	CCT	CTC	CTC	CTG	CTC	CTG	TTG	GCG	TTG
	TAC	ACC	GGA	GAG	GAG	GAC	GAG	GAC	AAC	CGC	AAC
2410	Pro	Gln	Arg	Ala	Tyr	Ala	Leu	Asp	Thr	Glu	Val
	CCC	CAG	CGG	GCG	TAC	GCG	CTG	GAC	ACG	GAG	GTG
	GGG	GTC	GCC	CGC	ATG	CGC	GAC	CTG	TGC	CTC	CAC
2443	Ala	Ala	Ser	Cys	Gly	Gly	Val	Val	Leu	Val	Gly
	GCC	GCG	TCG	TGT	GGC	GGT	GTT	GTT	CTC	GTC	GGG
	CGG	CGC	AGC	ACA	CCG	CCA	CAA	CAA	GAG	CAG	CCC

FIG. 12-9

2476 Leu Met Ala Leu Thr Leu Ser Pro Tyr Tyr Lys
 TTG ATG GCG CTG ACT CTG TCA CCA TAT TAC AAG
 AAC TAC CGC GAC TGA GAC AGT GGT ATA ATG TTC

2509 Arg Tyr Ile Ser Trp Cys Leu Trp Trp Leu Gln
 CGC TAT ATC AGC TGG TGC TTG TGG TGG CTT CAG
 GCG ATA TAG TCG ACC ACG AAC ACC ACC GAA GTC

2542 Tyr Phe Leu Thr Arg Val Glu Ala Gln Leu His
 TAT TTT CTG ACC AGA GTG GAA GCG CAA CTG CAC
 ATA AAA GAC TGG TCT CAC CTT CGC GTT GAC GTG

2575 Val Trp Ile Pro Pro Leu Asn Val Arg Gly Gly
 GTG TGG ATT CCC CCC CTC AAC GTC CGA GGG GGG
 CAC ACC TAA GGG GGG GAG TTG CAG GCT CCC CCC

2608 Arg Asp Ala Val Ile Leu Leu Met Cys Ala Val
 CGC GAC GCC GTC ATC TTA CTC ATG TGT GCT GTA
 GCG CTG CGG CAG TAG AAT GAG TAC ACA CGA CAT

2641 His Pro Thr Leu Val Phe Asp Ile Thr Lys Leu
 CAC CCG ACT CTG GTA TTT GAC ATC ACC AAA TTG
 GTG GGC TGA GAC CAT AAA CTG TAG TGG TTT AAC

2674 Leu Leu Ala Val Phe Gly Pro Leu Trp Ile Leu
 CTG CTG GCC GTC TTC GGA CCC CTT TGG ATT CTT
 GAC GAC CGG CAG AAG CCT GGG GAA ACC TAA GAA

2707 Gln Ala Ser Leu Leu Lys Val Pro Tyr Phe Val
 CAA GCC AGT TTG CTT AAA GTA CCC TAC TTT GTG
 GTT CGG TCA AAC GAA TTT CAT GGG ATG AAA CAC

2740 Arg Val Gln Gly Leu Leu Arg Phe Cys Ala Leu
 CGC GTC CAA GGC CTT CTC CGG TTC TGC GCG TTA
 GCG CAG GTT CCG GAA GAG GCC AAG ACG CGC AAT

FIG. 12-10

2773 Ala Arg Lys Met Ile Gly Gly His Tyr Val Gln
 GCG CCG AAG ATG ATC GGA GGC CAT TAC GTG CAA
 CGC GCC TTC TAC TAG CCT CCG GTA ATG CAC GTT

2806 Met Val Ile Ile Lys Leu Gly Ala Leu Thr Gly
 ATG GTC ATC ATT AAG TTA GGG GCG CTT ACT GGC
 TAC CAG TAG TAA TTC AAT CCC CGC GAA TGA CCG

2839 Thr Tyr Val Tyr Asn His Leu Thr Pro Leu Arg
 ACC TAT GTT TAT AAC CAT CTC ACT CCT CTT CGG
 TGG ATA CAA ATA TTG GTA GAG TGA GGA GAA GCC

2872 Asp Trp Ala His Asn Gly Leu Arg Asp Leu Ala
 GAC TGG GCG CAC AAC GGC TTG CGA GAT CTG GCC
 CTG ACC CGC GTG TTG CCC AAC GCT CTA GAC CGG

2905 Val Ala Val Glu Pro Val Val Phe Ser Gln Met
 GTG GCT GTA GAG CCA GTC GTC TTC TCC CAA ATG
 CAC CGA CAT CTC GGT CAG CAG AAG AGG GTT TAC

2938 Glu Thr Lys Leu Ile Thr Trp Gly Ala Asp Thr
 GAG ACC AAG CTC ATC ACG TGG GGG GCA GAT ACC
 CTC TGG TTC GAG TAG TGC ACC CCC CGT CTA TGG

2971 Ala Ala Cys Gly Asp Ile Ile Asn Gly Leu Pro
 GCC GCG TGC GGT GAC ATC ATC AAC GGC TTG CCT
 CGG CGC ACG CCA CTC TAG TAG TTG CCG AAC GGA

3004 Val Ser Ala Arg Arg Gly Arg Glu Ile Leu Leu
 GTT TCC GCC CGC AGG GGC CGG GAG ATA CTG CTC
 CAA AGG CGG GCG TCC CCG GCC CTC TAT GAC GAG

3037 Gly Pro Ala Asp Gly Met Val Ser Lys Gly Trp
 GGG CCA GCC GAT GGA ATG GTC TCC AAG GGG TGG
 CCC GGT CGG CTA CCT TAC CAG AGG TTC CCC ACC

FIG. 12-11

3070	Arg	Leu	Leu	Ala	Pro	Ile	Thr	Ala	Tyr	Ala	Gln
	AGG	TTG	CTG	GCG	CCC	ATC	ACG	GCG	TAC	GCC	CAG
	TCC	AAC	GAC	CGC	GGG	TAG	TGC	CGC	ATG	CGG	GTC
3103	Gln	Thr	Arg	Gly	Leu	Leu	Gly	Cys	Ile	Ile	Thr
	CAG	ACA	AGG	GGC	CTC	CTA	GGG	TGC	ATA	ATC	ACC
	GTC	TGT	TCC	CCG	GAG	GAT	CCC	ACG	TAT	TAG	TGG
3136	Ser	Leu	Thr	Gly	Arg	Asp	Lys	Asn	Gln	Val	Glu
	AGC	CTA	ACT	GGC	CGG	GAC	AAA	AAC	CAA	GTG	GAG
	TCG	GAT	TGA	CCG	GCC	CTG	TTT	TTG	GTT	CAC	CTC
3169	Gly	Glu	Val	Gln	Ile	Val	Ser	Thr	Ala	Ala	Gln
	GGT	GAG	GTC	CAG	ATT	GTG	TCA	ACT	GCT	GCC	CAA
	CCA	CTC	CAG	GTC	TAA	CAC	AGT	TGA	CGA	CGG	GTT
3202	Thr	Phe	Leu	Ala	Thr	Cys	Ile	Asn	Gly	Val	Cys
	ACC	TTC	CTG	GCA	ACG	TGC	ATC	AAT	GGG	GTG	TGC
	TGG	AAG	GAC	CGT	TGC	ACG	TAG	TTA	CCC	CAC	ACG
3235	Trp	Thr	Val	Tyr	His	Gly	Ala	Gly	Thr	Arg	Thr
	TGG	ACT	GTC	TAC	CAC	GGG	GCC	GGA	ACG	AGG	ACC
	ACC	TGA	CAG	ATG	GTG	CCC	CGG	CCT	TGC	TCC	TGG
3268	Ile	Ala	Ser	Pro	Lys	Gly	Pro	Val	Ile	Gln	Met
	ATC	GCG	TCA	CCC	AAG	GGT	CCT	GTC	ATC	CAG	ATG
	TAG	CGC	AGT	GGG	TTC	CCA	GGA	CAG	TAG	GTC	TAC
3301	Tyr	Thr	Asn	Val	Asp	Gln	Asp	Leu	Val	Gly	Trp
	TAT	ACC	AAT	GTA	GAC	CAA	GAC	CTT	GTG	GGC	TGG
	ATA	TGG	TTA	CAT	CTG	GTT	CTG	GAA	CAC	CCG	ACC
3334	Pro	Ala	Pro	Gln	Gly	Ser	Arg	Ser	Leu	Thr	Pro
	CCC	GCT	CCG	CAA	GGT	AGC	CGC	TCA	TTG	ACA	CCC
	GGG	CGA	GGC	GTT	CCA	TCG	GCG	AGT	AAC	TGT	GGG

FIG. 12-12

3367 Cys Thr Cys Gly Ser Ser Asp Leu Tyr Leu Val
TGC ACT TGC GGC TCC TCG GAC CTT TAC CTG GTC
ACG TGA ACG CCG AGG AGC CTG GAA ATG GAC CAG

3400 Thr Arg His Ala Asp Val Ile Pro Val Arg Arg
ACG AGG CAC GCC GAT GTC ATT CCC GTG CGC CGG
TGC TCC GTG CGG CTA CAG TAA GGG CAC GCG GCC

3433 Arg Gly Asp Ser Arg Gly Ser Leu Leu Ser Pro
CGG GGT GAT AGC AGG GGC AGC CTG CTG TCG CCC
GCC CCA CTA TCG TCC CCG TCG GAC GAC AGC GGG

3466 Arg Pro Ile Ser Tyr Leu Lys Gly Ser Ser Gly
CGG CCC ATT TCC TAC TTG AAA GGC TCC TCG GGG
GCC GGG TAA AGG ATG AAC TTT CCG AGG AGC CCC

3499 Gly Pro Leu Leu Cys Pro Ala Gly His Ala Val
GGT CCG CTG TTG TGC CCC GCG GGG CAC GCC GTG
CCA GGC GAC AAC ACG GGG CGC CCC GTG CCG CAC

3532 Gly Ile Phe Arg Ala Ala Val Cys Thr Arg Gly
GGC ATA TTT AGG GCC GCG GTG TGC ACC CGT GGA
CCG TAT AAA TCC CGG CGC CAC ACG TGG GCA CCT

3565 Val Ala Lys Ala Val Asp Phe Ile Pro Val Glu
GTG GCT AAG GCG GTG GAC TTT ATC CCT GTG GAG
CAC CGA TTC CGC CAC CTG AAA TAG GGA CAC CTC

3598 Asn Leu Glu Thr Thr Met Arg Ser Pro Val Phe
AAC CTA GAG ACA ACC ATG AGG TCC CCG GTG TTC
TTG GAT CTC TGT TGG TAC TCC AGG GGC CAC AAG

3631 Thr Asp Asn Ser Ser Pro Pro Val Val Pro Gln
ACG GAT AAC TCC TCT CCA CCA GTA GTG CCC CAG
TGC CTA TTG AGG AGA GGT GGT CAT CAC GGG GTC

FIG. 12-13

3664 Ser Phe Gln Val Ala His Leu His Ala Pro Thr
AGC TTC CAG GTG GCT CAC CTC CAT GCT CCC ACA
TCG AAG GTC CAC CGA GTG GAG GTA CGA GGG TGT

3697 Gly Ser Gly Lys Ser Thr Lys Val Pro Ala Ala
GGC AGC GGC AAA AGC ACC AAG GTC CCG GCT GCA
CCG TCG CCG TTT TCG TGG TTC CAG GGC CGA CGT

3730 Tyr Ala Ala Gln Gly Tyr Lys Val Leu Val Leu
TAT GCA GCT CAG GGC TAT AAG GTG CTA GTA CTC
ATA CGT CGA GTC CCG ATA TTC CAC GAT CAT GAG

3763 Asn Pro Ser Val Ala Ala Thr Leu Gly Phe Gly
AAC CCC TCT GTT GCT GCA ACA CTG GGC TTT GGT
TTG GGG AGA CAA CGA CGT TGT GAC CCG AAA CCA

3796 Ala Tyr Met Ser Lys Ala His Gly Ile Asp Pro
GCT TAC ATG TCC AAG GCT CAT GGG ATC GAT CCT
CGA ATG TAC AGG TTC CGA GTA CCC TAG CTA GGA

3829 Asn Ile Arg Thr Gly Val Arg Thr Ile Thr Thr
AAC ATC AGG ACC GGG GTG AGA ACA ATT ACC ACT
TTG TAG TCC TGG CCC CAC TCT TGT TAA TGG TGA

3862 Gly Ser Pro Ile Thr Tyr Ser Thr Tyr Gly Lys
GGC AGC CCC ATC ACG TAC TCC ACC TAC GGC AAG
CCG TCG GGG TAG TGC ATG AGG TGG ATG CCG TTC

3895 Phe Leu Ala Asp Gly Gly Cys Ser Gly Gly Ala
TTC CTT GCC GAC GGC GGG TGC TCG GGG GGC GCT
AAG GAA CGG CTG CCG CCC ACG AGC CCC CCG CGA

3928 Tyr Asp Ile Ile Ile Cys Asp Glu Cys His Ser
TAT GAC ATA ATA ATT TGT GAC GAG TGC CAC TCC
ATA CTG TAT TAT TAA ACA CTG CTC ACG GTG AGG

FIG. 12-14

3961	Thr	Asp	Ala	Thr	Ser	Ile	Leu	Gly	Ile	Gly	Thr
	ACG	GAT	GCC	ACA	TCC	ATC	TTG	GGC	ATC	GGC	ACT
	TGC	CTA	CGG	TGT	AGG	TAG	AAC	CCG	TAG	CCG	TGA
3994	Val	Leu	Asp	Gln	Ala	Glu	Thr	Ala	Gly	Ala	Arg
	GTC	CTT	GAC	CAA	GCA	GAG	ACT	GCG	GGG	GCG	AGA
	CAG	GAA	CTG	GTT	CGT	CTC	TGA	CGC	CCC	CGC	TCT
4027	Leu	Val	Val	Leu	Ala	Thr	Ala	Thr	Pro	Pro	Gly
	CTG	GTT	GTG	CTC	GCC	ACC	GCC	ACC	CCT	CCG	GGC
	GAC	CAA	CAC	GAG	CGG	TGG	CGG	TGG	GGA	GGC	CCG
4060	Ser	Val	Thr	Val	Pro	His	Pro	Asn	Ile	Glu	Glu
	TCC	GTC	ACT	GTG	CCC	CAT	CCC	AAC	ATC	GAG	GAG
	AGG	CAG	TGA	CAC	GGG	GTA	GGG	TTG	TAG	CTC	CTC
4093	Val	Ala	Leu	Ser	Thr	Thr	Gly	Glu	Ile	Pro	Phe
	GTT	GCT	CTG	TCC	ACC	ACC	GGA	GAG	ATC	CCT	TTT
	CAA	CGA	GAC	AGG	TGG	TGG	CCT	CTC	TAG	GGA	AAA
4126	Tyr	Gly	Lys	Ala	Ile	Pro	Leu	Glu	Val	Ile	Lys
	TAC	GGC	AAG	GCT	ATC	CCC	CTC	GAA	GTA	ATC	AAG
	ATG	CCG	TTC	CGA	TAG	GGG	GAG	CTT	CAT	TAG	TTC
4159	Gly	Gly	Arg	His	Leu	Ile	Phe	Cys	His	Ser	Lys
	GGG	GGG	AGA	CAT	CTC	ATC	TTC	TGT	CAT	TCA	AAG
	CCC	CCC	TCT	GTA	GAG	TAG	AAG	ACA	GTA	AGT	TTC
4192	Lys	Lys	Cys	Asp	Glu	Leu	Ala	Ala	Lys	Leu	Val
	AAG	AAG	TGC	GAC	GAA	CTC	GCC	GCA	AAG	CTG	GTC
	TTC	TTC	ACG	CTG	CTT	GAG	CGG	CGT	TTC	GAC	CAG
4225	Ala	Leu	Gly	Ile	Asn	Ala	Val	Ala	Tyr	Tyr	Arg
	GCA	TTG	GGC	ATC	AAT	GCC	GTG	GCC	TAC	TAC	CGC
	CGT	AAC	CCG	TAG	TTA	CGG	CAC	CGG	ATG	ATG	GCG

FIG. 12-15

4258 Gly Leu Asp Val Ser Val Ile Pro Thr Ser Gly
GGT CTT GAC GTG TCC GTC ATC CCG ACC AGC GGC
CCA GAA CTG CAC AGG CAG TAG GGC TGG TCG CCG

4291 Asp Val Val Val Val Ala Thr Asp Ala Leu Met
GAT GTT GTC GTC GTG GCA ACC GAT GCC CTC ATG
CTA CAA CAG CAG CAC CGT TGG CTA CGG GAG TAC

4324 Thr Gly Tyr Thr Gly Asp Phe Asp Ser Val Ile
ACC GGC TAT ACC GGC GAC TTC GAC TCG GTG ATA
TGG CCG ATA TGG CCG CTG AAG CTG AGC CAC TAT

4357 Asp Cys Asn Thr Cys Val Thr Gln Thr Val Asp
GAC TGC AAT ACG TGT GTC ACC CAG ACA GTC GAT
CTG ACG TTA TGC ACA CAG TGG GTC TGT CAG CTA

4390 Phe Ser Leu Asp Pro Thr Phe Thr Ile Glu Thr
TTC AGC CTT GAC CCT ACC TTC ACC ATT GAG ACA
AAG TCG GAA CTG GGA TGG AAG TGG TAA CTC TGT

4423 Ile Thr Leu Pro Gln Asp Ala Val Ser Arg Thr
ATC ACG CTC CCC CAG GAT GCT GTC TCC CGC ACT
TAG TGC GAG GGG GTC CTA CGA CAG AGG GCG TGA

4456 Gln Arg Arg Gly Arg Thr Gly Arg Gly Lys Pro
CAA CGT CGG GGC AGG ACT GGC AGG GGG AAG CCA
GTT GCA GCC CCG TCC TGA CCG TCC CCC TTC GGT

4489 Gly Ile Tyr Arg Phe Val Ala Pro Gly Glu Arg
GGC ATC TAC AGA TTT GTG GCA CCG GGG GAG CGC
CCG TAG ATG TCT AAA CAC CGT GGC CCC CTC GCG

4522 Pro Ser Gly Met Phe Asp Ser Ser Val Leu Cys
CCC TCC GGC ATG TTC GAC TCG TCC GTC CTC TGT
GGG AGG CCG TAC AAG CTG AGC AGG CAG GAG ACA

FIG. 12-16

4555 Glu Cys Tyr Asp Ala Gly Cys Ala Trp Tyr Glu
 GAG TGC TAT GAC GCA GGC TGT GCT TGG TAT GAG
 CTC ACG ATA CTG CGT CCG ACA CGA ACC ATA CTC

4588 Leu Thr Pro Ala Glu Thr Thr Val Arg Leu Arg
 CTC ACG CCC GCC GAG ACT ACA GTT AGG CTA CGA
 GAG TGC GGG CGG CTC TGA TGT CAA TCC GAT GCT

4621 Ala Tyr Met Asn Thr Pro Gly Leu Pro Val Cys
 GCG TAC ATG AAC ACC CCG GGG CTT CCC GTG TGC
 CGC ATG TAC TTG TGG GGC CCC GAA GGG CAC ACG

4654 Gln Asp His Leu Glu Phe Trp Glu Gly Val Phe
 CAG GAC CAT CTT GAA TTT TGG GAG GGC GTC TTT
 GTC CTG GTA GAA CTT AAA ACC CTC CCG CAG AAA

4687 Thr Gly Leu Thr His Ile Asp Ala His Phe Leu
 ACA GGC CTC ACT CAT ATA GAT GCC CAC TTT CTA
 TGT CCG GAG TGA GTA TAT CTA CGG GTG AAA GAT

4720 Ser Gln Thr Lys Gln Ser Gly Glu Asn Leu Pro
 TCC CAG ACA AAG CAG AGT GGG GAG AAC CTT CCT
 AGG GTC TGT TTC GTC TCA CCC CTC TTG GAA GGA

4753 Tyr Leu Val Ala Tyr Gln Ala Thr Val Cys Ala
 TAC CTG GTA GCG TAC CAA GCC ACC GTG TGC GCT
 ATG GAC CAT CGC ATG GTT CGG TGG CAC ACG CGA

4786 Arg Ala Gln Ala Pro Pro Pro Ser Trp Asp Gln
 AGG GCT CAA GCC CCT CCC CCA TCG TGG GAC CAG
 TCC CGA GTT CGG GGA GGG GGT AGC ACC CTG GTC

4819 Met Trp Lys Cys Leu Ile Arg Leu Lys Pro Thr
 ATG TGG AAG TGT TTG ATT CGC CTC AAG CCC ACC
 TAC ACC TTC ACA AAC TAA GCG GAG TTC GGG TGG

FIG. 12-17

4852 Leu His Gly Pro Thr Pro Leu Leu Tyr Arg Leu
 CTC CAT GGG CCA ACA CCC CTG CTA TAC AGA CTG.
 GAG GTA CCC GGT TGT GGG GAC GAT ATG TCT GAC

4885 Gly Ala Val Gln Asn Glu Ile Thr Leu Thr His
 GGC GCT GTT CAG AAT GAA ATC ACC CTG ACG CAC
 CCG CGA CAA GTC TTA CTT TAG TGG GAC TGC GTG

4918 Pro Val Thr Lys Tyr Ile Met Thr Cys Met Ser
 CCA GTC ACC AAA TAC ATC ATG ACA TGC ATG TCG
 GGT CAG TGG TTT ATG TAG TAC TGT ACG TAC AGC

4951 Ala Asp Leu Glu Val Val Thr Ser Thr Trp Val
 GCC GAC CTG GAG GTC GTC ACG AGC ACC TGG GTG
 CGG CTG GAC CTC CAG CAG TGC TCG TGG ACC CAC

4984 Leu Val Gly Gly Val Leu Ala Ala Leu Ala Ala
 CTC GTT GGC GGC GTC CTG GCT GCT TTG GCC GCG
 GAG CAA CCG CCG CAG GAC CGA CGA AAC CGG CGC

5017 Tyr Cys Leu Ser Thr Gly Cys Val Val Ile Val
 TAT TGC CTG TCA ACA GGC TGC GTG GTC ATA GTG
 ATA ACG GAC AGT TGT CCG ACG CAC CAG TAT CAC

5050 Gly Arg Val Val Leu Ser Gly Lys Pro Ala Ile
 GGC AGG GTC GTC TTG TCC GGG AAG CCG GCA ATC
 CCG TCC CAG CAG AAC AGG CCC TTC GGC CGT TAG

5083 Ile Pro Asp Arg Glu Val Leu Tyr Arg Glu Phe
 ATA CCT GAC AGG GAA GTC CTC TAC CGA GAG TTC
 TAT GGA CTG TCC CTT CAG GAG ATG GCT CTC AAG

5116 Asp Glu Met Glu Glu Cys Ser Gln His Leu Pro
 GAT GAG ATG GAA GAG TGC TCT CAG CAC TTA CCG
 CTA CTC TAC CTT CTC ACG AGA GTC GTG AAT GGC

FIG. 12-18

5149 Tyr Ile Glu Gln Gly Met Met Leu Ala Glu Gln
TAC ATC GAG CAA GGG ATG ATG CTC GCC GAG CAG
ATG TAG CTC GTT CCC TAC TAC GAG CGG CTC GTC

5182 Phe Lys Gln Lys Ala Leu Gly Leu Leu Gln Thr
TTC AAG CAG AAG GCC CTC GGC CTC CTG CAG ACC
AAG TTC GTC TTC CGG GAG CCG GAG GAC GTC TGG

5215 Ala Ser Arg Gln Ala Glu Val Ile Ala Pro Ala
GCG TCC CGT CAG GCA GAG GTT ATC GCC CCT GCT
CGC AGG GCA GTC CGT CTC CAA TAG CGG GGA CGA

5248 Val Gln Thr Asn Trp Gln Lys Leu Glu Thr Phe
GTC CAG ACC AAC TGG CAA AAA CTC GAG ACC TTC
CAG GTC TGG TTG ACC GTT TTT GAG CTC TGG AAG

5281 Trp Ala Lys His Met Trp Asn Phe Ile Ser Gly
TGG GCG AAG CAT ATG TGG AAC TTC ATC AGT GGG
ACC CGC TTC GTA TAC ACC TTG AAG TAG TCA CCC

5314 Ile Gln Tyr Leu Ala Gly Leu Ser Thr Leu Pro
ATA CAA TAC TTG GCG GGC TTG TCA ACG CTG CCT
TAT GTT ATG AAC CGC CCG AAC AGT TGC GAC GGA

5347 Gly Asn Pro Ala Ile Ala Ser Leu Met Ala Phe
GGT AAC CCC GCC ATT GCT TCA TTG ATG GCT TTT
CCA TTG GGG CGG TAA CGA AGT AAC TAC CGA AAA

5380 Thr Ala Ala Val Thr Ser Pro Leu Thr Thr Ser
ACA GCT GCT GTC ACC AGC CCA CTA ACC ACT AGC
TGT CGA CGA CAG TGG TCG GGT GAT TGG TGA TCG

5413 Gln Thr Leu Leu Phe Asn Ile Leu Gly Gly Trp
CAA ACC CTC CTC TTC AAC ATA TTG GGG GGG TGG
GTT TGG GAG GAG AAG TTG TAT AAC CCC CCC ACC

FIG. 12-19

5446 Val Ala Ala Gln Leu Ala Ala Pro Gly Ala Ala
 GTG GCT GCC CAG CTC GCC GCC CCC GGT GCC GCT
 CAC CGA CGG GTC GAG CGG CGG GGG CCA CGG CGA

5479 Thr Ala Phe Val Gly Ala Gly Leu Ala Gly Ala
 ACT GCC TTT GTG GGC GCT GGC TTA GCT GGC GCC
 TGA CGG AAA CAC CCG CGA CCG AAT CGA CCG CGG

5512 Ala Ile Gly Ser Val Gly Leu Gly Lys Val Leu
 GCC ATC GGC AGT GTT GGA CTG GGG AAG GTC CTC
 CGG TAG CCG TCA CAA CCT GAC CCC TTC CAG GAG

5545 Ile Asp Ile Leu Ala Gly Tyr Gly Ala Gly Val
 ATA GAC ATC CTT GCA GGG TAT GGC GCG GGC GTG
 TAT CTG TAG GAA CGT CCC ATA CCG CGC CCG CAC

5578 Ala Gly Ala Leu Val Ala Phe Lys Ile Met Ser
 GCG GGA GCT CTT GTG GCA TTC AAG ATC ATG AGC
 CGC CCT CGA GAA CAC CGT AAG TTC TAG TAC TCG

5611 Gly Glu Val Pro Ser Thr Glu Asp Leu Val Asn
 GGT GAG GTC CCC TCC ACG GAG GAC CTG GTC AAT
 CCA CTC CAG GGG AGG TGC CTC CTG GAC CAG TTA

5644 Leu Leu Pro Ala Ile Leu Ser Pro Gly Ala Leu
 CTA CTG CCC GCC ATC CTC TCG CCC GGA GCC CTC
 GAT GAC GGG CGG TAG GAG AGC GGG CCT CGG GAG

5677 Val Val Gly Val Val Cys Ala Ala Ile Leu Arg
 GTA GTC GGC GTG GTC TGT GCA GCA ATA CTG CGC
 CAT CAG CCG CAC CAG ACA CGT CGT TAT GAC GCG

5710 Arg His Val Gly Pro Gly Glu Gly Ala Val Gln
 CGG CAC GTT GGC CCG GGC GAG GGG GCA GTG CAG
 GCC GTG CAA CCG GGC CCG CTC CCC CGT CAC GTC

FIG. 12-20

5743 Trp Met Asn Arg Leu Ile Ala Phe Ala Ser Arg
TGG ATG AAC CGG CTG ATA GCC TTC GCC TCC CGG
ACC TAC TTG GCC GAC TAT CGG AAG CGG AGG GCC

5776 Gly Asn His Val Ser Pro Thr His Tyr Val Pro
GGG AAC CAT GTT TCC CCC ACG CAC TAC GTG CCG
CCC TTG GTA CAA AGG GGG TGC GTG ATG CAC GGC

5809 Glu Ser Asp Ala Ala Ala Arg Val Thr Ala Ile
GAG AGC GAT GCA GCT GCC CGC GTC ACT GCC ATA
CTC TCG CTA CGT CGA CGG GCG CAG TGA CGG TAT

5842 Leu Ser Ser Leu Thr Val Thr Gln Leu Leu Arg
CTC AGC AGC CTC ACT GTA ACC CAG CTC CTG AGG
GAG TCG TCG GAG TGA CAT TGG GTC GAG GAC TCC

5875 Arg Leu His Gln Trp Ile Ser Ser Glu Cys Thr
CGA CTG CAC CAG TGG ATA AGC TCG GAG TGT ACC
GCT GAC GTG GTC ACC TAT TCG AGC CTC ACA TGG

5908 Thr Pro Cys Ser Gly Ser Trp Leu Arg Asp Ile
ACT CCA TGC TCC GGT TCC TGG CTA AGG GAC ATC
TGA GGT ACG AGG CCA AGG ACC GAT TCC CTG TAG

5941 Trp Asp Trp Ile Cys Glu Val Leu Ser Asp Phe
TGG GAC TGG ATA TGC GAG GTG TTG AGC GAC TTT
ACC CTG ACC TAT ACG CTC CAC AAC TCG CTG AAA

5974 Lys Thr Trp Leu Lys Ala Lys Leu Met Pro Gln
AAG ACC TGG CTA AAA GCT AAG CTC ATG CCA CAG
TTC TGG ACC GAT TTT CGA TTC GAG TAC GGT GTC

6007 Leu Pro Gly Ile Pro Phe Val Ser Cys Gln Arg
CTG CCT GGG ATC CCC TTT GTG TCC TGC CAG CGC
GAC GGA CCC TAG GGG AAA CAC AGG ACG GTC GCG

FIG. 12-21

6040 Gly Tyr Lys Gly Val Trp Arg Val Asp Gly Ile
 GGG TAT AAG GGG GTC TGG CGA GTG GAC GGC ATC
 CCC ATA TTC CCC CAG ACC GCT CAC CTG CCG TAG

6073 Met His Thr Arg Cys His Cys Gly Ala Glu Ile
 ATG CAC ACT CGC TGC CAC TGT GGA GCT GAG ATC
 TAC GTG TGA GCG ACG GTG ACA CCT CGA CTC TAG

6106 Thr Gly His Val Lys Asn Gly Thr Met Arg Ile
 ACT GGA CAT GTC AAA AAC GGG ACG ATG AGG ATC
 TGA CCT GTA CAG TTT TTG CCC TGC TAC TCC TAG

6139 Val Gly Pro Arg Thr Cys Arg Asn Met Trp Ser
 GTC GGT CCT AGG ACC TGC AGG AAC ATG TGG AGT
 CAG CCA GGA TCC TGG ACG TCC TTG TAC ACC TCA

6172 Gly Thr Phe Pro Ile Asn Ala Tyr Thr Thr Gly
 GGG ACC TTC CCC ATT AAT GCC TAC ACC ACG GGC
 CCC TGG AAG GGG TAA TTA CGG ATG TGG TGC CCG

6205 Pro Cys Thr Pro Leu Pro Ala Pro Asn Tyr Thr
 CCC TGT ACC CCC CTT CCT GCG CCG AAC TAC ACG
 GGG ACA TGG GGG GAA GGA CGC GGC TTG ATG TGC

6238 Phe Ala Leu Trp Arg Val Ser Ala Glu Glu Tyr
 TTC GCG CTA TGG AGG GTG TCT GCA GAG GAA TAT
 AAG CGC GAT ACC TCC CAC AGA CGT CTC CTT ATA

6271 Val Glu Ile Arg Gln Val Gly Asp Phe His Tyr
 GTG GAG ATA AGG CAG GTG GGG GAC TTC CAC TAC
 CAC CTC TAT TCC GTC CAC CCC CTG AAG GTG ATG

6304 Val Thr Gly Met Thr Thr Asp Asn Leu Lys Cys
 GTG ACG GGT ATG ACT ACT GAC AAT CTC AAA TGC
 CAC TGC CCA TAC TGA TGA CTG TTA GAG TTT ACG

FIG. 12-22

6337 Pro Cys Gln Val Pro Ser Pro Glu Phe Phe Thr
CCG TGC CAG GTC CCA TCG CCC GAA TTT TTC ACA
GGC ACG GTC CAG GGT AGC GGG CTT AAA AAG TGT

6370 Glu Leu Asp Gly Val Arg Leu His Arg Phe Ala
GAA TTG GAC GGG GTG CGC CTA CAT AGG TTT GCG
CTT AAC CTG CCC CAC GCG GAT GTA TCC AAA CGC

6403 Pro Pro Cys Lys Pro Leu Leu Arg Glu Glu Val
CCC CCC TGC AAG CCC TTG CTG CGG GAG GAG GTA
GGG GGG ACG TTC GGG AAC GAC GCC CTC CTC CAT

6436 Ser Phe Arg Val Gly Leu His Glu Tyr Pro Val
TCA TTC AGA GTA GGA CTC CAC GAA TAC CCG GTA
AGT AAG TCT CAT CCT GAG GTG CTT ATG GGC CAT

6469 Gly Ser Gln Leu Pro Cys Glu Pro Glu Pro Asp
GGG TCG CAA TTA CCT TGC GAG CCC GAA CCG GAC
CCC AGC GTT AAT GGA ACG CTC GGG CTT GGC CTG

6502 Val Ala Val Leu Thr Ser Met Leu Thr Asp Pro
GTG GCC GTG TTG ACG TCC ATG CTC ACT GAT CCC
CAC CGG CAC AAC TGC AGG TAC GAG TGA CTA GGG

6535 Ser His Ile Thr Ala Glu Ala Ala Gly Arg Arg
TCC CAT ATA ACA GCA GAG GCG GCC GGG CGA AGG
AGG GTA TAT TGT CGT CTC CGC CGG CCC GCT TCC

6568 Leu Ala Arg Gly Ser Pro Pro Ser Val Ala Ser
TTG GCG AGG GGA TCA CCC CCC TCT GTG GCC AGC
AAC CGC TCC CCT AGT GGG GGG AGA CAC CGG TCG

6601 Ser Ser Ala Ser Gln Leu Ser Ala Pro Ser Leu
TCC TCG GCT AGC CAG CTA TCC GCT CCA TCT CTC
AGG AGC CGA TCG GTC GAT AGG CGA GGT AGA GAG

FIG. 12-23



6634	Lys	Ala	Thr	Cys	Thr	Ala	Asn	His	Asp	Ser	Pro
	AAG	GCA	ACT	TGC	ACC	GCT	AAC	CAT	GAC	TCC	CCT
	TTC	CGT	TGA	ACG	TGG	CGA	TTG	GTA	CTG	AGG	GGA
6667	Asp	Ala	Glu	Leu	Ile	Glu	Ala	Asn	Leu	Leu	Trp
	GAT	GCT	GAG	CTC	ATA	GAG	GCC	AAC	CTC	CTA	TGG
	CTA	CGA	CTC	GAG	TAT	CTC	CGG	TTG	GAG	GAT	ACC
6700	Arg	Gln	Glu	Met	Gly	Gly	Asn	Ile	Thr	Arg	Val
	AGG	CAG	GAG	ATG	GGC	GGC	AAC	ATC	ACC	AGG	GTT
	TCC	GTC	CTC	TAC	CCG	CCG	TTG	TAG	TGG	TCC	CAA
6733	Glu	Ser	Glu	Asn	Lys	Val	Val	Ile	Leu	Asp	Ser
	GAG	TCA	GAA	AAC	AAA	GTG	GTG	ATT	CTG	GAC	TCC
	CTC	AGT	CTT	TTG	TTT	CAC	CAC	TAA	GAC	CTG	AGG
6766	Phe	Asp	Pro	Leu	Val	Ala	Glu	Glu	Asp	Glu	Arg
	TTC	GAT	CCG	CTT	GTG	GCG	GAG	GAG	GAC	GAG	CGG
	AAG	CTA	GGC	GAA	CAC	CGC	CTC	CTC	CTG	CTC	GCC
6799	Glu	Ile	Ser	Val	Pro	Ala	Glu	Ile	Leu	Arg	Lys
	GAG	ATC	TCC	GTA	CCC	GCA	GAA	ATC	CTG	CGG	AAG
	CTC	TAG	AGG	CAT	GGG	CGT	CTT	TAG	GAC	GCC	TTC
6832	Ser	Arg	Arg	Phe	Ala	Gln	Ala	Leu	Pro	Val	Trp
	TCT	CGG	AGA	TTC	GCC	CAG	GCC	CTG	CCC	GTT	TGG
	AGA	GCC	TCT	AAG	CGG	GTC	CGG	GAC	GGG	CAA	ACC
6865	Ala	Arg	Pro	Asp	Tyr	Asn	Pro	Pro	Leu	Val	Glu
	GCG	CGG	CCG	GAC	TAT	AAC	CCC	CCG	CTA	GTG	GAG
	CGC	GCC	GGC	CTG	ATA	TTG	GGG	GGC	GAT	CAC	CTC
6898	Thr	Trp	Lys	Lys	Pro	Asp	Tyr	Glu	Pro	Pro	Val
	ACG	TGG	AAA	AAG	CCC	GAC	TAC	GAA	CCA	CCT	GTG
	TGC	ACC	TTT	TTC	GGG	CTG	ATG	CTT	GGT	GGA	CAC

FIG. 12-24

6931	Val	His	Gly	Cys	Pro	Leu	Pro	Pro	Pro	Lys	Ser
	GTC	CAT	GGC	TGT	CCG	CTT	CCA	CCT	CCA	AAG	TCC
	CAG	GTA	CCG	ACA	GGC	GAA	GGT	GGA	GGT	TTC	AGG
6964	Pro	Pro	Val	Pro	Pro	Pro	Arg	Lys	Lys	Arg	Thr
	CCT	CCT	GTG	CCT	CCG	CCT	CGG	AAG	AAG	CGG	ACG
	GGA	GGA	CAC	GGA	GGC	GGA	GCC	TTC	TTC	GCC	TGC
6997	Val	Val	Leu	Thr	Glu	Ser	Thr	Leu	Ser	Thr	Ala
	GTG	GTC	CTC	ACT	GAA	TCA	ACC	CTA	TCT	ACT	GCC
	CAC	CAG	GAG	TGA	CTT	AGT	TGG	GAT	AGA	TGA	CGG
7030	Leu	Ala	Glu	Leu	Ala	Thr	Arg	Ser	Phe	Gly	Ser
	TTG	GCC	GAG	CTC	GCC	ACC	AGA	AGC	TTT	GGC	AGC
	AAC	CGG	CTC	GAG	CGG	TGG	TCT	TCG	AAA	CCG	TCG
7063	Ser	Ser	Thr	Ser	Gly	Ile	Thr	Gly	Asp	Asn	Thr
	TCC	TCA	ACT	TCC	GGC	ATT	ACG	GGC	GAC	AAT	ACG
	AGG	AGT	TGA	AGG	CCG	TAA	TGC	CCG	CTG	TTA	TGC
7096	Thr	Thr	Ser	Ser	Glu	Pro	Ala	Pro	Ser	Gly	Cys
	ACA	ACA	TCC	TCT	GAG	CCC	GCC	CCT	TCT	GGC	TGC
	TGT	TGT	AGG	AGA	CTC	GGG	CGG	GGA	AGA	CCG	ACG
7129	Pro	Pro	Asp	Ser	Asp	Ala	Glu	Ser	Tyr	Ser	Ser
	CCC	CCC	GAC	TCC	GAC	GCT	GAG	TCC	TAT	TCC	TCC
	GGG	GGG	CTG	AGG	CTG	CGA	CTC	AGG	ATA	AGG	AGG
7162	Met	Pro	Pro	Leu	Glu	Gly	Glu	Pro	Gly	Asp	Pro
	ATG	CCC	CCC	CTG	GAG	GGG	GAG	CCT	GGG	GAT	CCG
	TAC	GGG	GGG	GAC	CTC	CCC	CTC	GGA	CCC	CTA	GGC
7195	Asp	Leu	Ser	Asp	Gly	Ser	Trp	Ser	Thr	Val	Ser
	GAT	CTT	AGC	GAC	GGG	TCA	TGG	TCA	ACG	GTC	AGT
	CTA	GAA	TCG	CTG	CCC	AGT	ACC	AGT	TGC	CAG	TCA

FIG. 12-25

7228 Ser Glu Ala Asn Ala Glu Asp Val Val Cys Cys
AGT GAG GCC AAC GCG GAG GAT GTC GTG TGC TGC
TCA CTC CGG TTG CGC CTC CTA CAG CAC ACG ACG

7261 Ser Met Ser Tyr Ser Trp Thr Gly Ala Leu Val
TCA ATG TCT TAC TCT TGG ACA GGC GCA CTC GTC
AGT TAC AGA ATG AGA ACC TGT CCG CGT GAG CAG

7294 Thr Pro Cys Ala Ala Glu Glu Gln Lys Leu Pro
ACC CCG TGC GCC GCG GAA GAA CAG AAA CTG CCC
TGG GGC ACG CGG CGC CTT CTT GTC TTT GAC GGG

7327 Ile Asn Ala Leu Ser Asn Ser Leu Leu Arg His
ATC AAT GCA CTA AGC AAC TCG TTG CTA CGT CAC
TAG TTA CGT GAT TCG TTG AGC AAC GAT GCA GTG

7360 His Asn Leu Val Tyr Ser Thr Thr Ser Arg Ser
CAC AAT TTG GTG TAT TCC ACC ACC TCA CGC AGT
GTG TTA AAC CAC ATA AGG TGG TGG AGT GCG TCA

7393 Ala Cys Gln Arg Gln Lys Lys Val Thr Phe Asp
GCT TGC CAA AGG CAG AAG AAA GTC ACA TTT GAC
CGA ACG GTT TCC GTC TTC TTT CAG TGT AAA CTG

7426 Arg Leu Gln Val Leu Asp Ser His Tyr Gln Asp
AGA CTG CAA GTT CTG GAC AGC CAT TAC CAG GAC
TCT GAC GTT CAA GAC CTG TCG GTA ATG GTC CTG

7459 Val Leu Lys Glu Val Lys Ala Ala Ala Ser Lys
GTA CTC AAG GAG GTT AAA GCA GCG GCG TCA AAA
CAT GAG TTC CTC CAA TTT CGT CGC CGC AGT TTT

7492 Val Lys Ala Asn Leu Leu Ser Val Glu Glu Ala
GTG AAG GCT AAC TTG CTA TCC GTA GAG GAA GCT
CAC TTC CGA TTG AAC GAT AGG CAT CTC CTT CGA

FIG. 12-26

7525 Cys Ser Leu Thr Pro Pro His Ser Ala Lys Ser
TGC AGC CTG ACG CCC CCA CAC TCA GCC AAA TCC
ACG TCG GAC TGC GGG GGT GTG AGT CGG TTT AGG

7558 Lys Phe Gly Tyr Gly Ala Lys Asp Val Arg Cys
AAG TTT GGT TAT GGG GCA AAA GAC GTC CGT TGC
TTC AAA CCA ATA CCC CGT TTT CTG CAG GCA ACG

7591 His Ala Arg Lys Ala Val Thr His Ile Asn Ser
CAT GCC AGA AAG GCC GTA ACC CAC ATC AAC TCC
GTA CGG TCT TTC CGG CAT TGG GTG TAG TTG AGG

7624 Val Trp Lys Asp Leu Leu Glu Asp Asn Val Thr
GTG TGG AAA GAC CTT CTG GAA GAC AAT GTA ACA
CAC ACC TTT CTG GAA GAC CTT CTG TTA CAT TGT

7657 Pro Ile Asp Thr Thr Ile Met Ala Lys Asn Glu
CCA ATA GAC ACT ACC ATC ATG GCT AAG AAC GAG
GGT TAT CTG TGA TGG TAG TAC CGA TTC TTG CTC

7690 Val Phe Cys Val Gln Pro Glu Lys Gly Gly Arg
GTT TTC TGC GTT CAG CCT GAG AAG GGG GGT CGT
CAA AAG ACG CAA GTC GGA CTC TTC CCC CCA GCA

7723 Lys Pro Ala Arg Leu Ile Val Phe Pro Asp Leu
AAG CCA GCT CGT CTC ATC GTG TTC CCC GAT CTG
TTC GGT CGA GCA GAG TAG CAC AAG GGG CTA GAC

7756 Gly Val Arg Val Cys Glu Lys Met Ala Leu Tyr
GGC GTG CGC GTG TGC GAA AAG ATG GCT TTG TAC
CCG CAC GCG CAC ACG CTT TTC TAC CGA AAC ATG

7789 Asp Val Val Thr Lys Leu Pro Leu Ala Val Met
GAC GTG GTT ACA AAG CTC CCC TTG GCC GTG ATG
CTG CAC CAA TGT TTC GAG GGG AAC CGG CAC TAC

FIG. 12-27



7822	Gly	Ser	Ser	Tyr	Gly	Phe	Gln	Tyr	Ser	Pro	Gly
	GGA	AGC	TCC	TAC	GGA	TTC	CAA	TAC	TCA	CCA	GGA
	CCT	TCG	AGG	ATG	CCT	AAG	GTT	ATG	AGT	GGT	CCT
7855	Gln	Arg	Val	Glu	Phe	Leu	Val	Gln	Ala	Trp	Lys
	CAG	CGG	GTT	GAA	TTC	CTC	GTG	CAA	GCG	TGG	AAG
	GTC	GCC	CAA	CTT	AAG	GAG	CAC	GTT	CGC	ACC	TTC
7888	Ser	Lys	Lys	Thr	Pro	Met	Gly	Phe	Ser	Tyr	Asp
	TCC	AAG	AAA	ACC	CCA	ATG	GGG	TTC	TCG	TAT	GAT
	AGG	TTC	TTT	TGG	GGT	TAC	CCC	AAG	AGC	ATA	CTA
7921	Thr	Arg	Cys	Phe	Asp	Ser	Thr	Val	Thr	Glu	Ser
	ACC	CGC	TGC	TTT	GAC	TCC	ACA	GTC	ACT	GAG	AGC
	TGG	GCG	ACG	AAA	CTG	AGG	TGT	CAG	TGA	CTC	TCG
7954	Asp	Ile	Arg	Thr	Glu	Glu	Ala	Ile	Tyr	Gln	Cys
	GAC	ATC	CGT	ACG	GAG	GAG	GCA	ATC	TAC	CAA	TGT
	CTG	TAG	GCA	TGC	CTC	CTC	CGT	TAG	ATG	GTT	ACA
7987	Cys	Asp	Leu	Asp	Pro	Gln	Ala	Arg	Val	Ala	Ile
	TGT	GAC	CTC	GAC	CCC	CAA	GCC	CGC	GTG	GCC	ATC
	ACA	CTG	GAG	CTG	GGG	GTT	CGG	GCG	CAC	CGG	TAG
8020	Lys	Ser	Leu	Thr	Glu	Arg	Leu	Tyr	Val	Gly	Gly
	AAG	TCC	CTC	ACC	GAG	AGG	CTT	TAT	GTT	GGG	GGC
	TTC	AGG	GAG	TGG	CTC	TCC	GAA	ATA	CAA	CCC	CCG
8053	Pro	Leu	Thr	Asn	Ser	Arg	Gly	Glu	Asn	Cys	Gly
	CCT	CTT	ACC	AAT	TCA	AGG	GGG	GAG	AAC	TGC	GGC
	GGA	GAA	TGG	TTA	AGT	TCC	CCC	CTC	TTG	ACG	CCG
8086	Tyr	Arg	Arg	Cys	Arg	Ala	Ser	Gly	Val	Leu	Thr
	TAT	CGC	AGG	TGC	CGC	GCG	AGC	GGC	GTA	CTG	ACA
	ATA	GCG	TCC	ACG	GCG	CGC	TCG	CCG	CAT	GAC	TGT

FIG. 12-28

8119	Thr	Ser	Cys	Gly	Asn	Thr	Leu	Thr	Cys	Tyr	Ile
	ACT	AGC	TGT	GGT	AAC	ACC	CTC	ACT	TGC	TAC	ATC
	TGA	TCG	ACA	CCA	TTG	TGG	GAG	TGA	ACG	ATG	TAG
8152	Lys	Ala	Arg	Ala	Ala	Cys	Arg	Ala	Ala	Gly	Leu
	AAG	GCC	CGG	GCA	GCC	TGT	CGA	GCC	GCA	GGG	CTC
	TTC	CGG	GCC	CGT	CGG	ACA	GCT	CGG	CGT	CCC	GAG
8185	Gln	Asp	Cys	Thr	Met	Leu	Val	Cys	Gly	Asp	Asp
	CAG	GAC	TGC	ACC	ATG	CTC	GTG	TGT	GGC	GAC	GAC
	GTC	CTG	ACG	TGG	TAC	GAG	CAC	ACA	CCG	CTG	CTG
8218	Leu	Val	Val	Ile	Cys	Glu	Ser	Ala	Gly	Val	Gln
	TTA	GTC	GTT	ATC	TGT	GAA	AGC	GCG	GGG	GTC	CAG
	AAT	CAG	CAA	TAG	ACA	CTT	TCG	CGC	CCC	CAG	GTC
8251	Glu	Asp	Ala	Ala	Ser	Leu	Arg	Ala	Phe	Thr	Glu
	GAG	GAC	GCG	GCG	AGC	CTG	AGA	GCC	TTC	ACG	GAG
	CTC	CTG	CGC	CGC	TCG	GAC	TCT	CGG	AAG	TGC	CTC
8284	Ala	Met	Thr	Arg	Tyr	Ser	Ala	Pro	Pro	Gly	Asp
	GCT	ATG	ACC	AGG	TAC	TCC	GCC	CCC	CCT	GGG	GAC
	CGA	TAC	TGG	TCC	ATG	AGG	CGG	GGG	GGA	CCC	CTG
8317	Pro	Pro	Gln	Pro	Glu	Tyr	Asp	Leu	Glu	Leu	Ile
	CCC	CCA	CAA	CCA	GAA	TAC	GAC	TTG	GAG	CTC	ATA
	GGG	GGT	GTT	GGT	CTT	ATG	CTG	AAC	CTC	GAG	TAT
8350	Thr	Ser	Cys	Ser	Ser	Asn	Val	Ser	Val	Ala	His
	ACA	TCA	TGC	TCC	TCC	AAC	GTG	TCA	GTC	GCC	CAC
	TGT	AGT	ACG	AGG	AGG	TTG	CAC	AGT	CAG	CGG	GTG
8383	Asp	Gly	Ala	Gly	Lys	Arg	Val	Tyr	Tyr	Leu	Thr
	GAC	GGC	GCT	GGA	AAG	AGG	GTC	TAC	TAC	CTC	ACC
	CTG	CCG	CGA	CCT	TTC	TCC	CAG	ATG	ATG	GAG	TGG

FIG. 12-29



8416	Arg	Asp	Pro	Thr	Thr	Pro	Leu	Ala	Arg	Ala	Ala
	CGT	GAC	CCT	ACA	ACC	CCC	CTC	GCG	AGA	GCT	GCG
	GCA	CTG	GGA	TGT	TGG	GGG	GAG	CGC	TCT	CGA	CGC
8449	Trp	Glu	Thr	Ala	Arg	His	Thr	Pro	Val	Asn	Ser
	TGG	GAG	ACA	GCA	AGA	CAC	ACT	CCA	GTC	AAT	TCC
	ACC	CTC	TGT	CGT	TCT	GTG	TGA	GGT	CAG	TTA	AGG
8482	Trp	Leu	Gly	Asn	Ile	Ile	Met	Phe	Ala	Pro	Thr
	TGG	CTA	GGC	AAC	ATA	ATC	ATG	TTT	GCC	CCC	ACA
	ACC	GAT	CCG	TTG	TAT	TAG	TAC	AAA	CGG	GGG	TGT
8515	Leu	Trp	Ala	Arg	Met	Ile	Leu	Met	Thr	His	Phe
	CTG	TGG	GCG	AGG	ATG	ATA	CTG	ATG	ACC	CAT	TTC
	GAC	ACC	CGC	TCC	TAC	TAT	GAC	TAC	TGG	GTA	AAG
8548	Phe	Ser	Val	Leu	Ile	Ala	Arg	Asp	Gln	Leu	Glu
	TTT	AGC	GTC	CTT	ATA	GCC	AGG	GAC	CAG	CTT	GAA
	AAA	TCG	CAG	GAA	TAT	CGG	TCC	CTG	GTC	GAA	CTT
8581	Gln	Ala	Leu	Asp	Cys	Glu	Ile	Tyr	Gly	Ala	Cys
	CAG	GCC	CTC	GAT	TGC	GAG	ATC	TAC	GGG	GCC	TGC
	GTC	CGG	GAG	CTA	ACG	CTC	TAG	ATG	CCC	CGG	ACG
8614	Tyr	Ser	Ile	Glu	Pro	Leu	Asp	Leu	Pro	Pro	Ile
	TAC	TCC	ATA	GAA	CCA	CTT	GAT	CTA	CCT	CCA	ATC
	ATG	AGG	TAT	CTT	GGT	GAA	CTA	GAT	GGA	GGT	TAG
8647	Ile	Gln	Arg	Leu	His	Gly	Leu	Ser	Ala	Phe	Ser
	ATT	CAA	AGA	CTC	CAT	GGC	CTC	AGC	GCA	TTT	TCA
	TAA	GTT	TCT	GAG	GTA	CCG	GAG	TCG	CGT	AAA	AGT
8680	Leu	His	Ser	Tyr	Ser	Pro	Gly	Glu	Ile	Asn	Arg
	CTC	CAC	AGT	TAC	TCT	CCA	GGT	GAA	ATT	AAT	AGG
	GAG	GTG	TCA	ATG	AGA	GGT	CCA	CTT	TAA	TTA	TCC

FIG. 12-30

8713 Val Ala Ala Cys Leu Arg Lys Leu Gly Val Pro
GTG GCC GCA TGC CTC AGA AAA CTT GGG GTA CCG
CAC CGG CGT ACG GAG TCT TTT GAA CCC CAT GGC

8746 Pro Leu Arg Ala Trp Arg His Arg Ala Arg Ser
CCC TTG CGA GCT TGG AGA CAC CGG GCC CGG AGC
GGG AAC GCT CGA ACC TCT GTG GCC CGG GCC TCG

8779 Val Arg Ala Arg Leu Leu Ala Arg Gly Gly Arg
GTC CGC GCT AGG CTT CTG GCC AGA GGA GGC AGG
CAG GCG CGA TCC GAA GAC CGG TCT CCT CCG TCC

8812 Ala Ala Ile Cys Gly Lys Tyr Leu Phe Asn Trp
GCT GCC ATA TGT GGC AAG TAC CTC TTC AAC TGG
CGA CGG TAT ACA CCG TTC ATG GAG AAG TTG ACC

8845 Ala Val Arg Thr Lys Leu Lys
GCA GTA AGA ACA AAG CTC AAA C
CGT CAT TCT TGT TTC GAG TTT G

FIG. 12-31

"Primer" J159S

J1
PTACTGCCCTGAACTGCAATGA
G

J1	1	C	TCC	CTC	AAA	ACT	GGG	TTT	CTT	GCC	GCG
PT		T	AG		C	C	C	GG	T G	A	G
					<u>Asn</u>			Trp			Gly

J1	29		CTG	TTC	TAC	ACA	CAC	AAG	TTC	AAC	GCG
PT			T		T	CAC					T T
						<u>His</u>					Ser

"Primer" 166A para J1-1216

J1	56		TCC	GGA	TGC	CCG	GAG	CGC	ATG	GCC	AGC
PT			A	C	T	T		A G	C A		
										Leu	

J1	83		TGT	CGC	TCC	ATT	GAC	AAG	TTC	GAC	CAG
PT			C	A	C	C	AC	G T	T		
					Pro	Leu	<u>Thr</u>	<u>Asp</u>			

J1	110		GGA	TGG	GGT	CCC	ATC	ACC	TAT	GCT	CAA
PT			C		C	T		GT		C	A C
								Ser			Asn

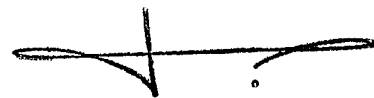
J1	137		CCT	GAC	AAC	TCG	GAC	CAG	AGG	CCG	TAT
PT			GGA	AG	GG	C C			C C	C	C
			Gly	<u>Ser</u>	<u>Gly</u>	Pro					

J1	164		TGC	TGG	CAC	TAC	GCA	CCT	CGA	CAG	TGT
PT							C C	A	AA	CT	C
							Pro		Lys	<u>Pro</u>	

FIG. 13-1

Compatibilidade de Nucleótidos: 259/367 (70.6%)
Compatibilidade de Aminoácidos (rigorosa) 93/122 (76.2%)
(relaxada): 111/122 (91.0%)

FIG. 13-2



São mostradas sequências de prototipo do HCV(PT) diferentes do HCV dos japoneses (J1).

Compatibilidade de aminoácidos relaxados: Gly=Ala=Pro=Ser=Thr,
Asp=Glu, Asn=Gln,
Arg=Lys=His, Leu=Ile=Val=Met, Phe=Trp=Tyr.
O sublinhado refere-se aos diferentes aminoácidos de compatibilidade relaxada.

FIG. 13-3



da parte central até à NS1 vs. HCV-1

J1								Pro	Leu	Val
HCV-1								T CCG	CTC	GTC
								A ---	---	---
J1	11	Gly	Ala	Pro	Leu	Gly	Gly	Ala	Ala	Arg
		GGC	GCC	CCC	TTA	GGG	GGC	GCT	GCC	AGG
		---	---	--T	C-T	--A	---	---	---	---
J1	38	Ala	Leu	Ala	His	Gly	Val	Arg	Val	Leu
		GCC	CTG	GCA	CAT	GGT	GTC	CGG	GTT	CTG
		---	---	--G	---	--C	---	---	---	---
J1	65	Glu	Asp	Gly	Val	Asn	Tyr	Ala	Thr	Gly
		GAG	GAC	GGC	GTG	AAC	TAT	GCA	ACA	GGG
		--A	---	---	---	---	---	---	---	---
J1	92	Asn	Leu	Pro	Gly	Cys	Ser	Phe	Ser	Ile
		AAT	TTG	CCC	GGT	TGC	TCT	TTC	TCT	ATC
		--C	C-T	--T	---	---	---	---	---	---
J1	119	Phe	Leu	Leu	Ala	Leu	Leu	Ser	Cys	Leu
		TTC	CTC	TTG	GCT	CTG	CTG	TCC	TGT	TTG
		---	--T	C--	---	---	--C	--T	--C	---
J1	146	Thr	Ile	Pro	Ala	Ser	Ala	Tyr	Glu	Val
		ACC	ATC	CCA	GCT	TCC	GCT	TAT	GAA	GTG
		--T	G-G	--C	---	--G	--C	--C	C--	---
			Val						Gln	
J1	173	Arg	Asn	Val	Ser	Gly	Ile	Tyr	His	Val
		CGC	AAC	GTG	TCC	GGG	ATA	TAC	CAT	GTC
		---	---	TCC	A-G	---	C-T	---	--C	---
				Ser	Thr		Leu			
J1	200	Thr	Asn	Asp	Cys	Ser	Asn	Ser	Ser	Ile
		ACA	AAC	GAC	TGC	TCC	AAC	TCA	AGC	ATT
		--C	--T	--T	---	C-T	---	--G	--T	---
						Pro				

FIG. 14-1

J1	227	Val GTG ---	Tyr TAT --C	Glu GAG ---	Ala GCG ---	Ala GCG --C	Asp GAC --T	Val GTG -CC Ala	Ile ATC ---	Met ATG C-- Leu
J1	254	His CAT --C	Ala GCC A-T Thr	Pro CCC --G	Gly GGG ---	Cys TGC ---	Val GTG --C	Pro CCC --T	Cys TGC ---	Val GTT ---
J1	281	Arg CGG --T	Glu GAG ---	Asn AAC GG-	Asn AAT --C	Ser TCC G-- Ala	Ser TCC --G	Arg CGT A-G	Cys TGC --T	Trp TGG ---
J1	308	Val GTA --A	Ala GCG ---	Leu CTC A-G Met	Thr ACT --C	Pro CCC --T	Thr ACG ---	Leu CTC G-G Val	Ala GCG --C	Ala GCC A-- Thr
J1	335	Arg AGG ---	Asn AAT G-- Asp	Ala GCC -G- Gly	Ser AGC -AA Lys	Val GTC C-- Leu	Pro CCC ---	Thr ACT G-G Ala	Thr ACG ---	Thr ACA CAG
Gln										
J1	362	Leu TTA C-T	Arg CGA ---	Arg CGC --T	His CAC ---	Val GTC A-- Ile	Asp GAC --T	Leu TTG C--	Leu CTC --T	Val GTT --C
J1	389	Gly GGG ---	Thr ACG -GC Ser	Ala GCT --C	Ala GCT A-C Thr	Phe TTC C-- Leu	Cys TGC --T	Ser TCC --G	Ala GCT --C	Met ATG C-C Leu
J1	416	Tyr TAC ---	Val GTG ---	Gly GGG ---	Asp GAT --C	Leu CTC --A	Cys TGC ---	Gly GGA --G	Ser TCT ---	Val GTT --C

FIG. 14-2

J1	443	Phe	Leu	Ile	Ser	Gln	Leu	Phe	Thr	Phe
		TTC	CTC	ATC	TCC	CAG	CTG	TTC	ACC	TTC
		--T	--T	G--	GG-	--A	---	---	---	---
				Val	Gly					
J1	470	Ser	Pro	Arg	Arg	His	Glu	Thr	Val	Gln
		TCG	CCT	CGC	CGG	CAT	GAG	ACA	GTA	CAG
		--T	--C	A-G	--C	--C	TG-	--G	ACG	--A
							Trp		Thr	
J1	497	Asp	Cys	Asn	Cys	Ser	Ile	Tyr	Pro	Gly
		GAC	TGC	AAC	TGC	TCA	ATC	TAT	CCC	GGC
		-GT	---	--T	---	--T	---	---	---	---
		Gly								
J1	524	His	Val	Ser	Gly	His	Arg	Met	Ala	Trp
		CAC	GTA	TCA	GGC	CAT	CGC	ATG	GCT	TGG
		--T	A--	A-G	--T	--C	---	---	--A	---
			Ile	Thr						
J1	551	Asp	Met	Met	Met	Asn	Trp	Ser	Pro	Thr
		GAT	ATG	ATG	ATG	AAC	TGG	TCG	CCC	ACG
		---	---	---	---	---	---	--C	--T	---
J1	578	Ala	Ala	Leu	Val	Val	Ser	Gln	Leu	Leu
		GCA	GCC	TTA	GTG	GTG	TCG	CAG	TTA	CTC
		A-G	--G	--G	--A	A--	G-T	---	C-G	---
		Thr				Met	Ala			
J1	605	Arg	Ile	Pro	Gln	Ala	Val	Met	Asp	Met
		CGG	ATC	CCA	CAA	GCT	GTC	ATG	GAC	ATG
		---	---	---	---	--C	A--	T--	---	---
							Ile	Leu		
J1	632	Val	Ala	Gly	Ala	His	Trp	Gly	Val	Leu
		GTG	GCG	GGG	GCC	CAC	TGG	GGA	GTC	CTA
		A-C	--T	--T	--T	---	---	---	---	--G
		Ile								

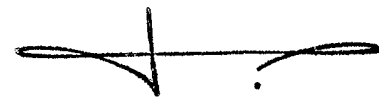
FIG. 14-3

J1	659	Ala	Gly	Leu	Ala	Tyr	Tyr	Ser	Met	Val
		GCG	GGC	CTT	GCC	TAC	TAT	TCC	ATG	GTG
		----	----	A-A	--G	--T	-TC	----	----	----
				Ile			Phe			
J1	686	Gly	Asn	Trp	Ala	Lys	Val	Leu	Ile	Val
		GGG	AAC	TGG	GCT	AAG	GTT	TTG	ATT	GTG
		----	----	----	--G	----	--C	C--	G-A	----
									Val	
J1	713	Met	Leu	Leu	Phe	Ala	Gly	Val	Asp	Gly
		ATG	CTA	CTC	TTT	GCC	GGC	GTT	GAC	GGG
		C--	--G	--A	----	----	----	--C	----	-C-
		Leu								Ala
J1	740	His	Thr	Arg	Val	Thr	Gly	Gly	Val	Gln
		CAT	ACC	CGC	GTG	ACG	GGG	GGG	GTG	CAA
		G-A	----	-A-	--C	--C	----	--A	AGT	GCC
		Glu		His					Ser	Ala
J1	767	Gly	His	Val	Thr	Ser	Thr	Leu	Thr	Ser
		GGC	CAC	GTC	ACC	TCT	ACA	CTC	ACG	TCC
		----	----	ACT	GTG	----	GGA	T-T	GTT	AG-
				Thr	Val		Gly	Phe	Val	
J1	794	Leu	Phe	Arg	Pro	Gly	Ala	Ser	Gln	Lys
		CTC	TTT	AGA	CCT	GGG	GCG	TCC	CAG	AAA
		----	C-C	GC-	--A	--C	--C	AAG	C--	--C
			Leu	Ala				Lys		Asn
J1	821	Ile	Gln	Leu	Val	Asn	Thr	Asn	Gly	Ser
		ATT	CAG	CTT	GTA	AAC	ACC	AAT	GGC	AGT
		G-C	----	--G	A-C	----	----	--C	----	----
		Val			Ile					
J1	848	Trp	His	Ile	Asn	Arg	Thr	Ala	Leu	Asn
		TGG	CAT	ATC	AAC	AGG	ACT	GCC	CTG	AAC
		----	--C	C--	--T	--C	--G	----	----	----
						Ser				

FIG. 14-4

J1	875	Cys TGC ---	Asn AAT ---	Asp GAC --T	Ser TCC AG-	Leu CTC ---	Gln CAA A-C Asn	Thr ACT --C	Gly GGG --C	Phe TTC -GG Trp
J1	902	Leu CTT T-G	Ala GCC --A	Ala GCG -G- Gly	CTG --T	TTC ---	TAC --T	ACA CAC His	CAC C--	AAG ---
J1	929	TTC ---	AAC ---	GCG T-T Ser	TCC --A	GGA --C	TGC --T	CCG --T	GAG ---	CGC A-G
J1	956	ATG C-A Leu	GCC ---	AGC ---	TGT --C	CGC --A	Ser TCC C-- Pro	Ile ATT C-- Leu	Asp GAC AC- Thr	Lys AAG G-T Asp
J1	983	Phe TTC --T	Asp GAC ---	Gln CAG ---	Gly GGA --C	Trp TGG ---	Gly GGT --C	Pro CCC --T	Ile ATC ---	Thr ACC -GT Ser
J1	1010	Tyr TAT ---	Ala GCT --C	Gln CAA AAC Asn	Pro CCT GGA Gly	Asp GAC AGC Ser	Asn AAC GG- Gly	Ser TCG C-C Pro	Asp GAC ---	Gln CAG ---
J1	1037	Arg AGG C-C	Pro CCG --C	Tyr TAT --C	Cys TGC ---	Trp TGG ---	His CAC ---	Tyr TAC ---	Ala GCA C-C Pro	Pro CCT --A
J1	1064	Arg CGA AA- Lys	Gln CAG -CT Pro	Cys TGT --C	Gly GGT ---	Ile ATC --T	Val GTA --G	Pro CCC ---	Ala GCG ---	Ser TCG AA- Lys

FIG. 14-5



J1	1091	Gln	Val	Cys	Gly	Pro	Val	Tyr	Cys	Phe
		CAG	GTG	TGC	GGT	CCA	GTG	TAT	TGC	TTC
		AGT	---	--T	---	--G	--A	---	---	---
		Ser								
J1	1118	Thr	Pro	Ser	Pro	Val	Val	Val	Gly	Thr
		ACC	CCA	AGC	CCT	GTT	GTA	GTG	GGG	ACG
		--T	--C	---	--C	--G	--G	---	--A	---
J1	1145	Thr	Asp	Arg	Phe	Gly	Ala	Pro	Thr	Tyr
		ACC	GAT	CGT	TTC	GGC	GCC	CCT	ACG	TAT
		---	---	A-G	-CG	---	--G	--C	--C	--C
					Ser					
J1	1172	Asn	Trp	Gly	Asp	Asn	Glu	Thr	Asp	Val
		AAC	TGG	GGG	GAC	AAT	GAG	ACG	GAC	GTG
		-G-	---	--T	--A	---	--T	---	---	--C
		Ser			Glu		Asp			
J1	1199	Leu	Leu	Leu	Asn	Asn	Thr	Arg	Pro	Pro
		CTG	CTC	CTA	AAC	AAC	ACG	CGG	CCC	CCG
		T-C	G--	--T	---	--T	--C	A--	--A	---
		Phe	Val							
J1	1226	His	Gly	Asn	Trp	Phe	Gly	Cys	Thr	
		CAC	GGC	AAC	TGG	TTC	GGC	TGT	ACA	
		-TG	---	--T	---	---	--T	---	--	
		Leu								

FIG. 14-6

J1	1	Gly Asn Trp Phe Gly Cys Thr Trp Met
HCV-1		TG GGC AAC TGG TTC GGC TGT ACA TGG ATG
		-- ---- --T ---- --T ---- --C ----
J1	30	Asn Ser Thr Gly Phe Thr Lys Thr Cys
HCV-1		AAT AGC ACT GGG TTC ACC AAG ACG TGC
		--C TCA ---- --A ---- --A GT- Val
J1	57	Gly Gly Pro Pro Cys Asn Ile Gly Gly
HCV-1		GGA GGC CCC CCG TGT AAC ATC GGG GGG
		---- -CG --T --T ---- GT- Val
J1	84	Val Gly Asn Asn Thr Leu Thr Cys Pro
HCV-1		GTC GGC AAC AAC ACC TTG ACC TGC CCC
		-CG ---- ---- ---- C-- CA- His
J1	111	Thr Asp Cys Phe Arg Lys Thr Pro Thr
HCV-1		ACG GAC TGC TTC CGG AAG ACC CCG ACG
		--T --T ---- ---- --C ---- CAT His Asp
J1	138	Ala Thr Tyr Thr Lys Cys Gly Ser Gly
HCV-1		GCC ACT TAC ACA AAA TGT GGT TCG GGC
		--- --A --- T-T CGG --C --C --C --T
		Ser Arg
J1	165	Pro Trp Leu Thr Pro Arg Cys Leu Val
HCV-1		CCT TGG TTG ACA CCT AGG TGC TTG GTT
		--C ---- A-C ---- --C ---- C-- --C
		Ile
J1	192	Asp Tyr Pro Tyr Arg Leu Trp His Tyr
HCV-1		GAC TAC CCA TAC AGG CTC TGG CAC TAC
		--- ---- --G --T ---- --T ---- --T --T

FIG. 15-1

J1	219	Pro	Cys	Thr	Val	Asn	Phe	Thr	Ile	Phe
HCV-1		CCC	TGC	ACT	GTC	AAC	TTT	ACC	ATC	TTC
		--T	--T	--C	A--	----	-AC	----	--A	--T
					Ile		Tyr			
J1	246	Lys	Val	Arg	Met	Tyr	Val	Gly	Gly	Val
HCV-1		AAG	GTT	AGG	ATG	TAT	GTG	GGG	GGC	GTG
		--A	A-C	----	----	--C	----	--A	--G	--C
			Ile							
J1	273	Glu	His							
HCV-1		GAG	CAC							
		--A	----							

FIG. 15-2

Sequência da região C200 vs. HCV-1

C200						3799		Asn	Met	Ser
HCV-1	3781	ACA	CTG	GGC	TTT	GGT	GCT	AAT	ATG	TCC
		Thr	Leu	Gly	Phe	Gly	Ala	T-C	---	---
								Tyr		
C200	3808	Lys	Ala	His	Gly	Thr	Asp	Pro	Asn	Ile
HCV-1		AAG	GCA	CAT	GGC	ACC	GAC	CCC	AAC	ATC
		---	---T	---	---G	---T	---T	---	---	---
						Ile				
C200	3835	Arg	Thr	Gly	Val	Arg	Thr	Ile	Thr	Thr
HCV-1		AGA	ACT	GGG	GTA	AGG	ACC	ATC	ACC	ACA
		---G	---C	---	---G	---A	---A	---T	---	---T
C200	3862	Gly	Ala	Pro	Ile	Thr	Tyr	Ser	Thr	Tyr
HCV-1		GGT	GCC	CCC	ATT	ACG	TAC	TCC	ACC	TAT
		---C	AG-	---	---C	---	---	---	---	---C
			Ser							
C200	3889	Arg	Lys	Phe	Leu	Ala	Asp	Gly	Gly	Cys
HCV-1		CGC	AAG	TTC	CTT	GCC	GAC	GGT	GGT	TGC
		G--	---	---	---	---	---	---C	---G	---
		Gly								
C200	3916	Ser	Gly	Gly	Ala	Tyr	Asp	Ile	Ile	
HCV-1		TCC	GGG	GGC	GCC	TAT	GAC	ATC	ATA	A
		---G	---	---	---T	---	---	---A	---	---TT
										Ile
HCV-1	3943	TGT	GAC	GAG	TGC	CAC	TCC	ACG	GAT	GCC
		Cys	Asp	Glu	Cys	His	Ser	Thr	Asp	Ala
HCV-1	3970	ACA	TCC	ATC	TTG	GGC	ATC	GGC	ACT	GTC
		Thr	Ser	Ile	Leu	Gly	Ile	Gly	Thr	Val

FIG. 16-1

HCV-1	3997	CTT GAC CAA GCA GAG ACT GCG GGG GCG	Leu Asp Gln Ala Glu Thr Ala Gly Ala
HCV-1	4024	AGA CTG GTT GTG CTC GCC ACC GCC ACC	Arg Leu Val Val Leu Ala Thr Ala Thr
HCV-1	4051	CCT CCG GGC TCC GTC ACT GTG CCC CAT	Pro Pro Gly Ser Val Thr Val Pro His
HCV-1	4078	CCC AAC ATC GAG GAG GTT GCT CTG TCC	Pro Asn Ile Glu Glu Val Ala Leu Ser
HCV-1	4105	ACC ACC GGA GAG ATC CCT TTT TAC GGC	Thr Thr Gly Glu Ile Pro Phe Tyr Gly
C200	4132	Ser Ile Pro Ile Glu Ala Ile Lys	
HCV-1		A AGC ATC CCC ATC GAG GCC ATC AAG	
		AAG GCT --- --- C-- --A -TA --- ---	
		Lys Ala	Val
C200	4159	Gly Gly Arg His Leu Ile Phe Cys His	
HCV-1		GGG GGA AGG CAT CTC ATC TTC TGC CAT	
		--- --G --A --- --- --- --- --T ---	
C200	4186	Ser Lys Lys Lys Cys Asp Glu Leu Ala	
HCV-1		TCC AAG AAG AAG TGT GAC GAG CTC GCC	
		--A --- --- --- --C --- --A --- ---	
C200	4213	Ala Lys Leu Ser Ala Leu Gly Leu Asn	
HCV-1		GCA AAG CTG TCA GCC CTC GGA CTC AAT	
		--- --- --- GTC --A T-G --C A-- ---	
			Val Ile
C200	4240	Ala Val Ala Tyr Tyr Arg Gly Leu Asp	
HCV-1		GCC GTG GCG TAT TAC CGC GGT CTT GAT	
		--- --- --C --C --- --- --- --- --C	

FIG. 16-2

C200	4267	Val	Ser	Val	Ile	Pro	Thr	Ser	Gly	Asp
HCV-1		GTG	TCC	GTC	ATA	CCA	ACT	AGC	GGA	GAC
		---	---	---	--C	--G	--C	---	--C	--T
C200	4294	Val	Val	Val	Val	Ala	Thr	Asp		
HCV-1		GTC	GTT	GTC	GTG	GCA	ACA	GAC	GC	4316
		--T	--C	---	---	---	--C	--T	--C	CTC
HCV-1	4321	ATG	ACC	GGC	TAT	ACC	GGC	GAC	TTC	GAC
		Met	Thr	Gly	Tyr	Thr	Gly	Asp	Phe	Asp
HCV-1	4348	TCG	GTG	ATA	GAC	TGC	AAT	ACG	TGT	GTC
		Ser	Val	Ile	Asp	Cys	Asn	Thr	Cys	Val
HCV-1	4375	ACC	CAG	ACA	GTC	GAT	TTC	AGC	CTT	GAC
		Thr	Gln	Thr	Val	Asp	Phe	Ser	Leu	Asp
HCV-1	4402	CCT	ACC	TTC	ACC	ATT	GAG	ACA	ATC	ACG
		Pro	Thr	Phe	Thr	Ile	Glu	Thr	Ile	Thr
HCV-1	4429	CTC	CCC	CAG	GAT	GCT	GTC	TCC	CGC	ACT
		Leu	Pro	Gln	Asp	Ala	Val	Ser	Arg	Thr
HCV-1	4456	CAA	CGT	CGG	GGC	AGG	ACT	GGC	AGG	GGG
		Gln	Arg	Arg	Gly	Arg	Thr	Gly	Arg	Gly
HCV-1	4483	AAG	CCA	GGC	ATC	TAC	AGA	TTT	GTG	GCA
		Lys	Pro	Gly	Ile	Tyr	Arg	Phe	Val	Ala
HCV-1	4510	CCG	GGG	GAG	CGC	CCC	TCC	GGC	ATG	TTC
		Pro	Gly	Glu	Arg	Pro	Ser	Gly	Met	Phe
HCV-1	4537	GAC	TCG	TCC	GTC	CTC	TGT	GAG	TGC	TAT
		Asp	Ser	Ser	Val	Leu	Cys	Glu	Cys	Tyr

FIG. 16-3

HCV-1 4564 GAC GCA GGC TGT GCT TGG TAT GAG CTC
Asp Ala Gly Cys Ala Trp Tyr Glu Leu

HCV-1 4591 ACG CCC GCC GAG ACT ACA GTT AGG CTA
Thr Pro Ala Glu Thr Thr Val Arg Leu

HCV-1 4618 CGA GCG TAC ATG AAC ACC CCG GGG CTT
Arg Ala Tyr Met Asn Thr Pro Gly Leu

HCV-1 4645 CCC GTG TGC CAG GAC CAT CTT GAA TTT
Pro Val Cys Gln Asp His Leu Glu Phe

HCV-1 4672 TGG GAG GGC GTC TTT ACA GGC CTC ACT
Trp Glu Gly Val Phe Thr Gly Leu Thr

HCV-1 4699 CAT ATA GAT GCC CAC TTT CTA TCC CAG
His Ile Asp Ala His Phe Leu Ser Gln

HCV-1 4726 ACA AAG CAG AGT GGG GAG AAC CTT CCT
Thr Lys Gln Ser Gly Glu Asn Leu Pro

HCV-1 4753 TAC CTG GTA GCG TAC CAA GCC ACC GTG
Tyr Leu Val Ala Tyr Gln Ala Thr Val

HCV-1 4780 TGC GCT AGG GCT CAA GCC CCT CCC CCA
Cys Ala Arg Ala Gln Ala Pro Pro Pro

HCV-1 4807 TCG TGG GAC CAG ATG TGG AAG TGT TTG
Ser Trp Asp Gln Met Trp Lys Cys Leu

HCV-1 4834 ATT CGC CTC AAG CCC ACC CTC CAT GGG
Ile Arg Leu Lys Pro Thr Leu His Gly

HCV-1 4861 CCA ACA CCC CTG CTA TAC AGA CTG GGC
Pro Thr Pro Leu Leu Tyr Arg Leu Gly

FIG. 16-4

HCV-1	4888	GCT	GTT	CAG	AAT	GAA	ATC	ACC	CTG	ACG	
		Ala	Val	Gln	Asn	Glu	Ile	Thr	Leu	Thr	
HCV-1	4915	CAC	CCA	GTC	ACC	AAA	TAC	ATC	ATG	ACA	
		His	Pro	Val	Thr	Lys	Tyr	Ile	Met	Thr	
HCV-1	4942	TGC	ATG	TCG	GCC	GAC	CTG	GAG	GTC	GTC	
		Cys	Met	Ser	Ala	Asp	Leu	Glu	Val	Val	
HCV-1	4969	ACG	AGC	ACC	TGG	GTG	CTC	GTT	GGC	GGC	
		Thr	Ser	Thr	Trp	Val	Leu	Val	Gly	Gly	
HCV-1	4996	GTC	CTG	GCT	GCT	TTG	GCC	GCG	TAT	TGC	
		Val	Leu	Ala	Ala	Leu	Ala	Ala	Tyr	Cys	
HCV-1	5023	CTG	TCA	ACA	GGC	TGC	GTG	GTC	ATA	GTG	
		Leu	Ser	Thr	Gly	Cys	Val	Val	Ile	Val	
HCV-1	5050	GGC	AGG	GTC	GTC	TTG	TCC	GGG	AAG	CCG	
		Gly	Arg	Val	Val	Leu	Ser	Gly	Lys	Pro	
C200									Glu	Val	Leu
HCV-1	5077	GCA	ATC	ATA	CCT	GAC	AGG	---	GAA	GTC	CTC
		Ala	Ile	Ile	Pro	Asp	Arg				
C200	5104	Tyr	Arg	Glu	Phe	Asp	Glu	Met	Glu	Glu	
HCV-1		TAC	CGA	GAG	TTC	GAT	GAG	ATG	GAA	GAG	
		---	---	---	---	---	---	---	---	---	
C200	5131	Cys	Ala	Ser	His	Leu	Pro	Tyr	Ile	Glu	
HCV-1		TGC	GCC	TCA	CAC	CTC	CCC	TAC	ATC	GAA	
		---	T-T	CAG	---	T-A	--G	---	---	--G	
			Ser	Gln							

FIG. 16-5

C200 5158 Gln Gly Met Gln Leu Ala Glu Gln Phe
HCV-1 CAG GGA ATG CAG CTC GCC GAG CAA TTC
--A --G --- AT- --- --- --G ---
Met

C200 5185 Lys Gln Lys Ala Leu Gly Leu Leu Gln
HCV-1 AAG CAG AAG GCG CTC GGG TTG CTG CAA
--- --- --- --C --- --C C-C --- --G

C200 5212 Thr Ala Thr Lys Gln Ala Glu Ala Ala
HCV-1 ACA GCC ACC AAG CAA GCG GAG GCT GCT
--C --G T-- CGT --G --A --- -T- ATC
Ser Arg Val Ile

C200 5239 Ala Pro Cys Glu Ser Met His Ala Ser
HCV-1 GCT CCG TGT GAG TCA ATG CAC GCC TCG
--C --T GC- -TC CAG -CC A-- TGG CAA
Ala Val Gln Thr Asn Trp Gln

C200 5266 A
HCV-1 -AA CTC GAG ACC TTC TGG GCG AAG CAT
Lys Leu Glu Thr Phe Trp Ala Lys His

HCV-1 5293 ATG TGG AAC TTC ATC AGT GGG ATA CAA TA
Met Trp Asn Phe Ile Ser Gly Ile Gln

FIG. 16-6

Sequência NS1 vs. HCV-1

J1	1	Leu Gly Asn Trp Phe Gly Cys Thr Trp
HCV-1		G TTG GGC AAT TGG TTC GGT TGC ACC TGG
		- C- - - - - - - - - - T - - - - -
J1	29	Met Asn Ser Ser Gly Phe Thr Lys Val
HCV-1		ATG AAC TCA TCT GGA TTT ACC AAA GTG
		- - - - - A- - - - - C - - - - -
		Thr
J1	56	Cys Gly Ala Pro Pro Cys Val Ile Gly
HCV-1		TGC GGA GCG CCT CCT TGT GTC ATC GGA
Ala		- - - - - - - - - - - - - - - -
J1	83	Gly Val Gly Asn Asn Thr Leu Gln Cys
HCV-1		GGG GTG GGC AAC AAC ACC TTG CAA TGC
		- - - - C- - - - - - - - - C- - - -
		Ala His
J1	110	Pro Thr Asp Cys Phe Arg Lys His Pro
HCV-1		CCC ACT GAC TGT TTC CGC AAG CAT CCG
		- - - - - T - - - - - - - - - - - - -
J1	137	Asp Ala Thr Tyr Ser Arg Cys Gly Ser
HCV-1		GAC GCC ACA TAC TCT CGG TGC GGT TCC
		- - - - - - - - - - - - - - C - - - -
J1	164	Gly Pro Trp Ile Thr Pro Arg Cys Leu
HCV-1		GGT CCC TGG ATT ACG CCC AGG TGC CTG
		- - - - - C - - A - - - - - - - - - -
J1	191	Val His Tyr Pro Tyr Arg Leu Trp His
HCV-1		GTC CAC TAC CCT TAT AGG CTT TGG CAT
		- - - G- - - - - G - - - - - - - - - -
		Asp
J1	218	Tyr Pro Cys Thr Val Asn Tyr Thr Leu
HCV-1		TAT CCC TGT ACT GTC AAC TAC ACC TTG
		- - - - T - - - - C A- - - - - - - - A-A
		Ile Ile

FIG. 17-1

J1	245	Phe	Lys	Val	Arg	Met	Tyr	Val	Gly	Gly
HCV-1		TTC	AAA	GTC	AGG	ATG	TAC	GTG	GGA	GGG
		--T	---	A--	---	---	---	---	---	---
				Ile						
J1	272	Val	Glu	His	Arg	Leu	Glu	Val	Ala	Cys
HCV-1		GTC	GAG	CAC	AGG	CTG	GAA	GTT	GCT	TGC
		---	--A	---	---	---	---	-C-	--C	---
								Ala		
J1	299	Asn	Trp	Thr	Arg	Gly	Glu	Arg	Cys	Asp
HCV-1		AAC	TGG	ACG	CGG	GGC	GAG	CGT	TGT	GAT
		---	---	---	---	---	--A	---	--C	---
J1	326	Leu	Asp	Asp	Arg	Asp				
HCV-1		CTG	GAC	GAC	AGG	GAC	A			
		---	--A	---	---	---	--			
			Glu							

FIG. 17-2

Sequência da Parte Central vs. HCV-1

J1	1	GCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTC
HCV-1		-----
J1	31	GTGCAGCCTCCAGGACCCCCCTCCCGGGAGAGCC
HCV-1		-----
J1	66	ATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAAT
HCV-1		-----
J1	101	TGCCAGGACGACCGGGTCCTTTCTTGGATCAACCC
HCV-1		-----
J1	136	GCTCAATGCCTGGAGATTTGGGCGTGCCCCCGCGA
HCV-1		-----A-
J1	171	GACTGCTAGCCGAGTAGTGTTGGGTGCGGAAAGGC
HCV-1		-----
J1	206	CTTGTGGTACTGCCTGATAGGGTGCTTGCGAGTGC
HCV-1		-----
J1	241	Met Ser CCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCATCATG AGC
HCV-1		-----C-----
J1	274	Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr ACA AAT CCT AAA CCT CAA AGA AAA ACC --G --- --- --- --- --- -A- --- -A- Lys Asn
HCV-1		
J1	301	Lys Arg Asn Thr Asn Arg Arg Pro Gln AAA CGT AAC ACC AAC CGC CGC CCA CAG --- --- --- --- --- --T --- --- ---
HCV-1		
J1	328	Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln GAC GTC AAG TTC CCG GGC GGT GGT CAG --- --- --- --- --- --T --C --- ---
HCV-1		
J1	355	Ile Val Gly Gly Val Tyr Leu Leu Pro ATC GTT GGT GGA GTT TAC CTG TTG CCG --- --- --- --- --- --- T-- --- ---
HCV-1		
J1	382	Arg Arg Gly Pro Arg Leu Gly Val Arg CGC AGG GGC CCC AGG TTG GGT GTG CGC --- --- --- --T --A --- --- ---
HCV-1		

FIG. 18-1

J1 HCV-1	409	Ala Thr Arg Lys Thr Ser Glu Arg Ser GCC ACT AGG AAG ACT TCC GAG CGG TCG --- --G --A --- --- --- --- ---
J1 HCV-1	436	Gln Pro Arg Gly Arg Arg Gln Pro Ile CAA CCT CGT GGA AGG CGA CAA CCT ATC --- --- --A --T --A --T --G --- ---
J1 HCV-1	463	Pro Lys Ala Arg Gln Pro Glu Gly Arg CCC AAG GCT CGC CAG CCC GAG GGC AGG --- --- --- --T -G- --- --- --- Arg
J1 HCV-1	490	Ala Trp Ala Gln Pro Gly Tyr Pro Trp GCC TGG GCT CAG CCC GGG TAC CCT TGG A-- --- --- --- --- --- --- --- Thr
J1 HCV-1	517	Pro Leu Tyr Gly Asn Glu Gly Met Gly CCC CTC TAT GGC AAC GAG GGC ATG GGG --- --- --- --- --T --- --- TGC --- Cys
J1 HCV-1	544	Trp Ala Gly Trp Leu TGG GCA GGA TGG CTC CT --- --G --- --- --- --

FIG. 18-2

CAMPO DAS CEBOLAS, 1100 LISBOA
TEL.: 888 51 51 / 2 / 3 TELEX: 18356 INPI
TELEFAX: 87 53 08

FOLHA DO RESUMO

Modalidade e n.º (11)	T D	Data do pedido: (22)	Classificação Internacional (51)
95329			
Requerente (71): Dr. AKIRA OYA, japonês, Director Geral do Instituto Nacional de Saúde do Japão, em representação do Instituto Nacional de Saúde do Japão, residente em 2-10-35 Kamio-saki, Shinagawa-ku, Quilo 141, Japão, e CHIRON CORPORATION, norte americana (Estado de Delaware), industrial e comercial, com sede em 4560 Haight Street, Emeryville, California 94608, Estados Unidos da América.			
Inventores (72): Takanobu Iiyamura, japonês; Izumu Saito, japonês; Michael H. Anton, britânico; Amy J. Weinberg, norte americana; Jang Han, coreano; Janice A. Kolchak, norte americana; Tai-an Chang, chinês; Gordon Irvine, norte americano, residentes respectivamente em 4-21-22-115, Hamada-cho, Suginami, Tokyo 168, Japão; em 15-412, Yagogi, Shibuya-ku, Tokyo 151, Japão; em 53 Rosemead Court, Danville, California 94526, E.U.A.;			
Reivindicação de prioridade(s) (30)			Figura (para interpretação do resumo)
Data do pedido	País de Origem	N.º de pedido	
15.Set.1989	U.A.	408.045	
21.Dez.1989		456.142	
Epígrafe: (54) "PROCESSOS PARA PREPARAÇÃO DE POLI-NUCLEOTÍDOS E POLI-PEPTÍDOS A PARTIR DE NOVOS ISOLADOS DE HCV"			
Resumo: (máx. 150 palavras) (57) Esta invenção refere-se a processos de preparação de novos polipéptidos e polinucleótidos a partir de dois novos isolados do vírus da hepatite C (HCV), J1 e J7. Estes novos isolados compreendem sequências nucleotídicas e aminoacídicas que são distintas do isolado prototipo, o HCV. Assim, o J1 e o J7 proporcionam novos polinucleótidos e polipéptidos para utilizar, inter alia, como diagnósticos, produção de proteínas recombinantes e desenvolvimento de vacinas.			

NÃO PREENCHER AS ZONAS SOMBRÉADAS