

(19) Országkód:

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG**

**MAGYAR
SZABADALMI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

211 981 A9

- (21) A kérelem ügyszám: P/P 00746
(22) A bejelentés napja: 1995. 07. 03.
(30) Elsőbbségi adatok:
325 338 1989. 03. 17. US
341 324 1989. 04. 20. US
355 002 1989. 05. 18. US

Az alapul szolgáló szabadalom
száma: 297 446 országkódja: DD
Az alapul szolgáló külföldi szabadalomnak
az oltalmi idő számítása szempontjából
figyelembe veendő kezdő napja: 1990. 03. 16.
Az oltalom e naptól számított 20 évig tartható fenn.
A hazai oltalom kezdete: 1994. 07. 01.

(51) Int. Cl.⁶

C 12 N 15/51

C 12 Q 1/70

G 01 N 33/576

A 61 K 39/29

(72) Feltalálók:

Houghton, Michael, Danvill, Kalifornia (US)
Choo, Qui-Lim, El Cerrito, Kalifornia (US)
Kuo, George, San Francisco, Kalifornia (US)

(73) Szabadalmas:

Chiron Corporation, Emeryville, Kalifornia (US)

(74) Képviselő:

S.B.G. & K. Budapesti Nemzetközi Szabadalmi
Iroda, Budapest

(54)

NANBV-diagnosztika és vakcina

Az átmeneti oltalom az 1–3., a 7–14., a 24. és a 26. igénypontokra vonatkozik.

A találmány tárgyát olyan anyagok és módszerek képezik, melyek a Non-A és Non-B hepatitis vírus (NANBV) fertőzése terjedésének kézben tartására irányulnak. Még specifikusabban, olyan polinukleotidokkal kapcsolatos, melyek egy, az NANBV aetológiai anyagának genomjából származtak, a hepatitis C vírusból (HCV), olyan polipeptidekkel, melyek ezekben vannak kódolva, és antitestekkel, melyek a polipeptidekhez irányulnak. A reagensek a HCV és fertőzésének sceneelésére használhatók. Ezenkívül védőanyagként is alkalmazhatók a betegséggel szemben.

A találmány háttere

A Non-A és Non-B hepatitis (NANBH) egy, a feltételezések szerint vírus által indukált átvihető betegség család, mely megkülönböztethető a vírussal kapcsolatos májbetegségek más formáitól. A következő ismert hepatitis vírusok tartoznak ezek közé: hepatitis A vírus (HAV), hepatitis B vírus (HBV), delta hepatitis vírus (HDV), cytomegalo vírus (CMV), vagy az Epstein-Barr vírus (EBV). Az NANBV-t először a vérátömlesztést kapott egyéneknél azonosították. Emberről csimpánzra való átvitele, majd csimpánzokon való sorozatos átoltása azt bizonyítja, hogy az NANBH egy átvihető fertőző anyagnak, vagy anyagoknak az eredménye.

Járványtani adatok azt sugallják, hogy az NANBH-nak 3 fajtája lehetséges: a víz-eredetű epidémiás típus, a vérrel, vagy injekciós tűvel kapcsolatos típus és a szóróanyagban előforduló (közösségben szerzett) forma. Azonban az NANBH-t okozó anyagoknak a száma nem ismert.

Az NANBH klinikai diagnózist és azonosítást először más vírus markerek kizárásával végezték. Az NANBV feltételes antigénjeinek és antitestjeinek detektálásához a következő módszereket alkalmazták: agar-gél diffúzió, ellen-immunoelektroforézis, immunofluoreszcensz mikroszkópia, immuno-elektron mikroszkópia, radioimmuno vizsgálatok, enzimhez-kötött immunoszorbens vizsgálat (ELISA). Azonban ezen vizsgálatok egyike sem bizonyult elegendően érzékenynek, specifikusnak vagy reprodukálhatónak az NANBH diagnosztikai tesztként való alkalmazására.

Korábban sem világosság, sem megegyezés nem volt az NANBH anyagaival kapcsolatos antigén-antitest rendszer azonosságát vagy specifikitását illetően. Ez részben annak volt köszönhető, hogy az egyének HBV-vel fertőződtek először, vagy a HBV-NANBV közösen fertőzte meg őket, és a HBV-sal kapcsolatos oldható és szemeses antigén ismert komplexitása miatt, és amiatt, hogy a HBV DNS integrálódott a májsejtek genomjába. Lehetséges, hogy az NANBH-t több mint egy fertőző anyag okozza, és hogy az NANBH rosszul diagnosztizált. Ezenkívül nem tiszta, hogy az NANBH betegek szérumban a szerológiai vizsgálatok mit detektálnak. Lehetségesnek tartják, hogy az agar-gél diffúzió és az ellen-immunoelektroforézis vizsgálatok a szérum alkotók között alkalmanként előforduló autoimmun válaszokat, vagy a nem specifikus fehérje interakciókat detektálják, és hogy ezek nem képviselik a specifikus

NANBV antigén-antitest reakciókat. Az immunofluoreszcensz, ELISA és radioimmuno vizsgálatok valószínűleg az NANBH betegek és más máj, vagy nem máj betegségben szenvedő betegek szérumban gyakran előforduló reumaszerű faktor anyagok alacsony szintjét detektálják. Az észlelt reakciók között lehetnek olyanok, melyek a gazda által meghatározott citoplazma antigénekre adnak antitestet.

Számos NANBV jelölt létezik. Lásd pl. a következő szerzők közleményeit: Prince (1983), Feinstone és Hoofnagle (1984), Overby (1985, 1986, 1987) és Iwarson (1987). De nincs arra bizonyíték, hogy ezen jelöltek valamelyike is az NANBH aetológiai anyagát reprezentálná.

Jelentős az NANBV és az NANBV-sal fertőzött vér, vagy vérvérsejtmények hordozóinak screenelésére és azonosítására használható módszerek érzékenysége és specifikuságára iránti igény. A vérátömlesztést kapott betegek mintegy 10%-a vérátömlesztés utáni hepatitist (PTH) kap, és ezen esetek 90%-ban az NANBH-t jelentik. A legfőbb probléma ezzel a betegséggel kapcsolatban a krónikus májkárosodás gyakori terjedése (25-55%).

A beteggondozás, akárcsak az NANBH vérrel vagy vérvérsejtményekkel való, vagy szoros személyi érintkezéssel való terjesztésének megelőzése igényt tart a megbízható screenelésre, diagnosztikai és prognosztikai eszközökre, melyekkel az NANBV-sal kapcsolatos nukleinsavakat, antigéneket és antitesteket detektálni lehet. Továbbá szükség van hatékony vakcinákra és immunoterápiás, terápiás anyagokra, melyek segítségével a betegség megelőzhető és/vagy gyógyítható.

A szabadalmaztatók felfedeztek egy új vírust a Hepatitis C vírust (HCV), mely a vér-eredetű NANBH (BB-NANBH) fő aetológiai ágensének bizonyult. A szabadalmaztatók kezdeti munkája, mely magába foglalja a HCV prototípus izolátum részleges genom szekvenciáját, CDC (HCVI) HCVI-nak is nevezett (az EPO Pub. No. 318 216-ban (1989. máj. 31-én közölt) és a PCT Pub. No. WO 89/04 669-ben (1989. június 1-jén közölt) került leírásra. Ezen szabadalmi felhasználások, akárcsak az egyéb vonatkozó nemzeti szabadalmi felhasználások közzlése a vonatkozó irodalmi utalások között szerepelnek. Ezek az alkalmazások többek között megmutatják a HCV szekvencia és a HCV polipeptidek klónozásának és expresszáálásának rekombináns DNS módszerét, a HCV immunodiagnosztikai technikáit, a HCV próba diagnosztikai technikáit, az anti-HCV antitestet, az új HCV szekvenciák izolálási módszereit, beleértve az új HCV izolátumok szekvenciáit is.

A találmány közzlése

A jelen találmány részben azokon az új HCV szekvenciákon és polipeptideken alapul, melyeket nem közöltünk az EPO Pub. No. 318 216 vagy a PCT Pub. No. WO 89/04 669. közleményekben. A találmány vonatkozik ezen új szekvenciák és polipeptidek, többek között immun-diagnosztikumokban, próba diagnosztikumokban, HCV elleni antitest termelésben, PCR techno-

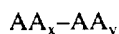
lógiaiban és a rekombináns DNS technológiában való alkalmazására. A találmány vonatkozik továbbá olyan immunvizsgálatokra is, amelyek az itt közölt HCV-polipeptidek immunogenicitásán alapulnak. Az itt igényelt új anyagnak, melyet pl. az EPO Pub. No. 318 216 közleményben leírt technikák alkalmazásával fejlesztünk ki, olyan elsőbbségi dátuma van, mely megelőzi az említett publikációt, vagy annak bármilyen másolatát. Így a találmány új leírásokat és módszereket nyújt, melyek hasznosak HCV-antigén és -antitest minták screenelésére és a HCV-fertőzés kezelésére.

Ezek szerint tehát a találmány vonatkozik egy rekombináns polinukleotidra, mely egy HCV cDNS-ből származó szekvenciából áll, mely esetben a HCV cDNS a következő klónokban található: 13i klón, vagy 26j klón, vagy 59a klón, vagy 84a klón, vagy CA156e klón, vagy 167b klón, pi14a klón, vagy CA216a klón, vagy CA 290a klón, vagy ag30a klón, vagy 205a klón, vagy 18g klón, vagy 16jh klón, vagy ahol a HCV cDNS olyan szekvenciában található, melyet a következő nukleotid számokkal jelölünk: -319-től 1348-ig, vagy 8659-től 8866-ig a 17. ábra szerint.

A találmány vonatkozik egy a HCV cDNS-ban kódolt epitópból álló tisztított polipeptidre, ahol a HCV cDNS olyan szekvenciában található, melyet a következő nukleotid számokkal jelölünk: -319-től 1348-ig, vagy 8659-től 8866-ig a 17. ábra szerint.

A találmány vonatkozik egy olyan immunogén polipeptidre, melyet egy rekombináns expressziós vektorral transzformált sejt termel. Ezen vektor a HCV cDNS-ből származó DNS ORF-jéből áll, ahol a HCV cDNS olyan szekvenciából áll, ahol a HCV cDNS szekvencia a következő klónokból származik: CA279a klón, vagy CA74a klón, vagy 13i klón, vagy CA290a klón, vagy 33c klón, vagy 40b klón, vagy 33b klón, vagy 25c klón, vagy 14c klón, vagy 8f klón, vagy 33f klón, vagy 33g klón, vagy 39c klón, vagy 15e klón. Az ORF működőképesen kapcsolódik a kívánt gazdával kompatibilis kontroll szekvenciához.

A találmány vonatkozik egy olyan peptidre is, mely egy HCV epitópból áll, ahol a peptid a következő formulával jellemezhető:



ahol x és y a 17. ábrán bemutatott aminosavak számát jelöli és ahol a peptidet a következő csoportokból szelektáltuk: AA1-AA25, AA1-AA50, AA1-AA84, AA9-AA177, AA1-AA10, AA5-AA20, AA20-AA25, AA35-AA45, AA50-AA100, AA40-AA90, AA45-AA65, AA65-AA75, AA80-AA90, AA99-AA120, AA95-AA110, AA105-AA120, AA100-AA150, AA150-AA200, AA155-AA170, AA190-AA210, AA200-AA250, AA220-AA240, AA245-AA265, AA250-AA300, AA290-AA330, AA290-AA305, AA300-AA350, AA310-AA330, AA350-AA400, AA380-AA395, AA405-AA495, AA400-AA450, AA405-AA415, AA415-AA425, AA425-AA435, AA437-AA582, AA450-AA500, AA440-AA460, AA460-AA470, AA475-AA495, AA500-AA550, AA511-AA690, AA515-AA550, AA550-

AA600, AA550-AA625, AA575-AA605, AA585-AA600, AA600-AA650, AA600-AA625, AA635-AA665, AA650-AA700, AA645-AA680, AA700-AA750, AA700-AA725, AA700-AA750, AA725-AA775, AA770-AA790, AA750-AA800, AA800-AA815, AA825-AA850, AA850-AA875, AA800-AA850, AA920-AA990, AA850-AA900, AA920-AA945, AA940-AA965, AA970-AA990, AA950-AA1000, AA1000-AA1060, AA1000-AA1025, AA1000-AA1050, AA1025-AA1040, AA1040-AA1055, AA1075-AA1175, AA1050-AA1200, AA1070-AA1100, AA1100-AA1130, AA1140-AA1165, AA1192-AA1457, AA1195-AA1250, AA1200-AA1225, AA1225-AA1250, AA1250-AA1300, AA1260-AA1310, AA1260-AA1280, AA1266-AA1428, AA1300-AA1350, AA1290-AA1310, AA1310-AA1340, AA1345-AA1405, AA1345-AA1365, AA1350-AA1400, AA1365-AA1380, AA1380-AA1405, AA1400-AA1450, AA1450-AA1500, AA1460-AA1475, AA1475-AA1515, AA1475-AA1500, AA1500-AA1550, AA1500-AA1515, AA1515-AA1500, AA1550-AA1600, AA1545-AA1560, AA1569-AA1931, AA1570-AA1590, AA1595-AA1610, AA1590-AA1650, AA1610-AA1645, AA1650-AA1690, AA1685-AA1770, AA1689-AA1805, AA1690-AA1720, AA1694-AA1735, AA1720-AA1745, AA1745-AA1770, AA1750-AA1800, AA1775-AA1810, AA1795-AA1850, AA1850-AA1900, AA1900-AA1950, AA1900-AA1920, AA1916-AA2021, AA1920-AA1940, AA1949-AA2124, AA1950-AA2000, AA1950-AA1985, AA1980-AA2000, AA2000-AA2050, AA2005-AA2025, AA2020-AA2045, AA2045-AA2100, AA2045-AA2070, AA2054-AA2223, AA2070-AA2100, AA2100-AA2150, AA2150-AA2200, AA2200-AA2250, AA2200-AA2325, AA2250-AA2330, AA2255-AA2270, AA2265-AA2280, AA2280-AA2290, AA2287-AA2385, AA2300-AA2350, AA2290-AA2310, AA2310-AA2330, AA2330-AA2350, AA2350-AA2400, AA2348-AA2464, AA2345-AA2415, AA2345-AA2375, AA2370-AA2410, AA2371-AA2502, AA2400-AA2450, AA2400-AA2425, AA2415-AA2450, AA2445-AA2500, AA2445-AA2475, AA2470-AA2490, AA2500-AA2550, AA2505-AA2540, AA2535-AA2560, AA2550-AA2600, AA2560-AA2580, AA2600-AA2650, AA2605-AA2620, AA2620-AA2650, AA2640-AA2660, AA2650-AA2700, AA2655-AA2670, AA2670-AA2700, AA2700-AA2750, AA2740-AA2760, AA2750-AA2800, AA2755-AA2870, AA2780-AA2830, AA2785-AA2810, AA2796-AA2886, AA2810-AA2825, AA2800-AA2850, AA2850-AA2900, AA2850-AA2865, AA2885-AA2905, AA2900-AA2950, AA2910-AA2930, AA2925-AA2950, AA2945-végződés (C'-terminális).

A találmány vonatkozik egy a HCV cDNS-ben kódolt epitópra irányuló monoklonális antitestre, ahol a HCV cDNS a 17. ábrában szereplő, a következő nukle-

otid számokkal jelölt szekvenciában fordul elő: -319-től 1348-ig, vagy 8659-től 8866-ig, vagy a szekvencia a következő klónokban található: 13i klón, vagy 26j klón, vagy 59a klón, vagy 84a klón, vagy CA156e klón, vagy 167b klón, vagy pi14a klón, vagy CA216a klón, vagy CA290a klón, vagy ag30a klón, vagy 205a klón, vagy 18g klón, vagy 16jh klón.

A találmány vonatkozik egy HCV cDNS-ban kódolt epitópból álló polipeptidre irányuló tisztított poliklonális antitest készítményre, ahol a HCV cDNS a következő nukleotid számokkal jelölt szekvenciában fordul elő: -319-től 1348-ig, vagy 8659-től 8866-ig (17. ábra) vagy a szekvencia a következő klónokban szerepel: 13i klón, vagy 26j klón, vagy 59a klón, vagy 84a klón, vagy CA156e klón, vagy 167b klón, vagy pi14a klón, vagy CA216a klón, vagy CA290a klón, vagy ag30a klón, vagy 205a klón, vagy 18g klón, vagy 16jh klón.

A találmány vonatkozik egy HCV polinukleotid próbára, ahol a próba a következő nukleotid számokkal jelölt HCV cDNS szekvenciából származó HCV szekvenciából áll: -319-től 1348-ig, vagy 8659-től 8866-ig (17. ábra), vagy a HCV cDNS szekvencia komplementérből.

A találmány vonatkozik egy HCV-ből származó polinukleotid jelenlétére irányuló minta vizsgálati kitre. A kit 8 vagy annál több nukleotidból álló nukleotid szekvenciát tartalmazó polinukleotid próbából áll, ahol a nukleotid szekvencia a következő nukleotid számokkal jelölt szekvenciájú HCV cDNS-ből származik: -319-től 1348-ig, vagy 8659-től 8866-ig (17. ábra), ahol a polinukleotid próba megfelelő tartóban van.

A találmány vonatkozik egy a HCV antigén jelenlétére irányuló minta vizsgálati kitre, amely olyan antitestből áll, mely immunológiailag reagál a HCV antigénnel, ahol az antigén a következő nukleotid számokkal jelölt szekvenciájú HCV cDNS-ban kódolt epitópot tartalmaz: -319-től 1348-ig, vagy 8659-től 8866-ig (17. ábra), vagy ahol a HCV cDNS a következő klónokban szerepel: 13i klón, vagy 26j klón, vagy 59a klón, vagy 84a klón, vagy CA156e klón, vagy 167b klón, vagy pi14a klón, vagy CA216a klón, vagy CA290a klón, vagy ag30a klón, vagy 205a klón, vagy 18g klón, vagy 16jh klón.

A találmány vonatkozik egy a HCV antitest jelenlétére irányuló minta vizsgálati kitre, mely egy a következő nukleotid számokkal jelölt szekvenciájú HCV cDNS-ban kódolt HCV epitópot tartalmazó antigén hatású polipeptidet tartalmaz: -319-től 1348-ig, vagy 8659-től 8866-ig (17. ábra) vagy a szekvencia a következő klónokban szerepel: 13i klón, vagy 26j klón, vagy 59a klón, vagy 84a klón, vagy CA156e klón, vagy 167b klón, vagy pi14a klón, vagy CA216a klón, vagy CA290a klón, vagy ag30a klón, vagy 205a klón, vagy 18g klón, vagy 16jh klón.

A találmány vonatkozik egy a HCV antitest jelenlétére irányuló minta vizsgálati kitre, amely a következő klónokban levő HCV cDNS-ből expresszálandó antigén hatású polipeptidből áll: CA279a klón, vagy CA74a klón, vagy 13i klón, vagy CA290a klón, vagy 33C

klón, vagy 40b klón, vagy 33b klón, vagy 25c klón, 14c klón, vagy 8f klón, vagy 33f klón, vagy 33g klón, vagy 39c klón, vagy 15e klón, és ahol az antigén hatású polipeptid megfelelő tartóban van.

5 A találmány továbbá vonatkozik egy mintában előforduló HCV nukleinsavak detektálására alkalmas módszerre is, ami a következőkből áll:

a) a HCV polinukleotid próbával reagáló mintában levő nukleinsavakból, ahol a próba a -319-1348, vagy 8659-8866 (17. ábra) nukleotid számokkal jelölt szekvenciában levő HCV cDNS szekvenciából származó HCV szekvenciából áll, és ahol a reakció olyan körülmények között folyik, mely lehetővé teszi, hogy a próba és a mintából származó HCV nukleinsav között polinukleotid duplex képződjék, és

10 b) az a) lépésben keletkezett, a próbát tartalmazó polinukleotid duplex detektálásából.

A találmány továbbá vonatkozik egy HCV antigén detektálására alkalmas immunovizsgálatra, mely a következőkből áll:

a) a HCV antigént feltehetően tartalmazó minta a HCV cDNS-ban kódolt HCV epitópra irányuló antitesttel való inkubálásából, ahol a HCV cDNS a -319-1348, vagy a 8659-8866 (17. ábra) nukleotid számokkal jelölt szekvenciájú, vagy a szekvencia a következő klónokban szerepel: 13i klón, vagy 26j klón, vagy 59a klón, vagy 84a klón, vagy CA156e klón, vagy 167b klón, vagy pi14a klón, vagy CA216a klón, vagy CA290a klón, vagy ag30a klón, vagy 205a klón, vagy 18g klón, vagy 16jh klón; az inkubálás olyan körülmények között folyik, mely lehetővé teszi az antigén-antitest komplex képződését, és

25 b) az a) lépésben képződött antitestet tartalmazó antigén-antitest komplex detektálásából.

30 A találmány vonatkozik a HCV antigénre irányuló antitestek kimutatására alkalmas immunovizsgálatra, mely a következőkből áll:

a) a HCV elleni antitestet feltételezetten tartalmazó minta HCV cDNS-ban kódolt epitópot tartalmazó antigén polipeptiddel való inkubálásából, ahol a HCV cDNS a -319-1348, vagy a 8659-8866 (17. ábra) nukleotid számokkal jelölt szekvenciájú, vagy a szekvencia a következő klónokban van: 13i klón, vagy 26j klón, vagy 59a klón, vagy 84a klón, vagy CA156e klón, vagy 167b klón, vagy pi14a klón, vagy CA216a klón, vagy CA290a klón, vagy ag30a klón, vagy 205a klón, vagy 18g klón, vagy 16jh klón; az inkubálás olyan körülmények között folyik, mely lehetőséget ad az antigén-antitest komplex képződésére, és

40 b) az a) lépésben képződött az antigén polipeptidet tartalmazó antigén-antitest komplex detektálásából.

A találmány továbbá vonatkozik egy a HCV fertőzés kezelésére alkalmas vakcinára, mely a HCV cDNS-ban kódolt HCV epitópot tartalmazó immunogén polipeptidből áll, ahol a HCV cDNS a -319-1348, vagy a 8659-8866 nukleotid számokkal jelölt szekvenciájú (17. ábra), vagy ahol a szekvencia a következő klónokban fordul elő: 13i klón, vagy 26j klón, vagy 59a klón, vagy 84a klón, vagy CA156e klón, vagy 167b klón, vagy pi14a klón, vagy CA216a klón, vagy CA290a

klón, vagy ag30a klón, vagy 205a klón, vagy 18g klón, vagy 16jh klón, és ahol az immunogén polipeptid a gyógyszerészetileg elfogadható kötőanyagban gyógyszer-tanilag hatásos mennyiségben van jelen.

A találmány vonatkozik a HCV elleni antitest előállításának módszerére, mely azt jelenti, hogy egy HCV cDNS-ban kódolt HCV epitópot tartalmazó izolált immunogén polipeptidet alkalmaznak egy egyén esetén, ahol a HCV cDNS a -319-1348, vagy a 8659-8866 nukleotid számokkal jelölt szekvenciájú (17. ábra), vagy ahol a szekvencia a következő klónokban szereplő szekvenciájú: CA279a klón, vagy CA74a klón, vagy 13i klón, vagy CA290a klón, vagy 33C klón, vagy 40b klón, vagy 33b klón, vagy 25c klón, vagy 14c klón, vagy 8f klón, vagy 33f klón, vagy 33g klón, vagy 39c klón, vagy 15e klón, és ahol az immunogén polipeptid a gyógyszerészetileg elfogadható kötőanyagban gyógyszer-tanilag hatásos dózisban van jelen.

A találmány vonatkozik egy a HCV cDNS-ből származó „anti-sense” polinukleotidra, ahol a HCV cDNS az, amelyik a 17. ábrán látható.

A találmány továbbá vonatkozik a C100-3 tisztított fúziós polipeptid előállításának módszerére, ami a következőkből áll:

a) a C100-3 polipeptidet tartalmazó nyers sejt lízátum beszerzéséből.

b) a nyers sejt lízátum olyan mennyiségű acetonnal való kezeléséből, mely a polipeptid kicsapódását okozza.

c) a kicsapott anyag izolálásából és oldásából.

d) a C100-3 polipeptid anion cserés kromatográfiával történő izolálásából.

e) a d) lépésben nyert polipeptid (C100-3) gél-szűrőssel történő további izolálásából.

A következőkben megadjuk a találmányhoz mellékelt ábrák leírását:

1. ábra a 12f klónban levő HCV cDNS szekvenciát mutatja, és az itt kódolt aminosavakat.
2. ábra a k9-1 klónban levő HCV cDNS szekvenciát és az itt kódolt aminosavakat mutatja.
3. ábra a 15e klón szekvenciáját mutatja és az itt kódolt aminosavakat.
4. ábra a 13i klónban szereplő HCV cDNS nukleotid szekvenciáját, az itt kódolt aminosavakat mutatja, és azokat a szekvenciákat, amelyek átfedésben vannak a 12f klónnal.
5. ábra a 26j klónban levő HCV cDNS nukleotid szekvenciáját, az itt kódolt aminosavakat és a 13i klónnal átfedésben levő szekvenciákat mutatja.
6. ábra a CA59a klónban levő HCV cDNS nukleotid szekvenciáját, és az itt kódolt aminosavakat mutatja, továbbá azokat a szekvenciákat, melyek átfedésben vannak a 26j és K9-1 klónokkal.
7. ábra a CA84a klónban szereplő HCV cDNS nukleotid szekvenciáját, az itt kódolt aminosavakat és a CA59a klónnal átfedést mutató szekvenciákat szemlélteti.
8. ábra a CA156e klónban levő HCV cDNS nukleo-

9. ábra

10. ábra

11. ábra

12. ábra

13. ábra

14. ábra

15. ábra

16. ábra

17. ábra

18. ábra

19. ábra

20. ábra

tid szekvenciáját, az itt kódolt aminosavakat mutatja és azokat a szekvenciákat, melyek átfedésben vannak a CA84a klónnal.

a CA167b klónban levő HCV cDNS nukleotid szekvenciáját mutatja, az itt kódolt aminosavakat és azokat a szekvenciákat, melyek átfedésben vannak a CA156e klónnal.

a CA216a klónban szereplő HCV cDNS nukleotid szekvenciáját mutatja, az itt kódolt aminosavakat és a CA167b klónnal való átfedést.

a CA290a klónban levő HCV cDNS nukleotid szekvenciáját, és az itt kódolt aminosavakat mutatja és a CA216a klónnal való átfedést.

az ag30a klónban levő HCV cDNS nukleotid szekvenciáját és a CA290a klónnal való átfedést szemlélteti.

a CA205a klónban levő HCV cDNS nukleotid szekvenciáját és a CA290a klónban levő HCV cDNS szekvenciával való átfedést mutatja.

a 18g klónban szereplő HCV cDNS nukleotid szekvenciáját mutatja és az ag30a klónban levő HCV cDNS szekvenciával való átfedést.

a 16jh klónban levő HCV cDNS nukleotid szekvenciáját, az itt kódolt aminosavakat és a 15e klónban levő HCV cDNS szekvenciával átfedést mutató nukleotidokat.

a pi14a, CA167b, CA156e, CA84a, CA59a, K9-1, 12f, 14i, 11b, 7f, 7e, 8h, 33c, 40b, 37b, 35, 36, 81, 82, 33b, 25c, 14c, 8f, 33f, 33g, 39c, 35f, 19g, 26g, és a 15e klónokból származó HCV cDNS ORF-jét mutatja.

a fent leírt klónokból származó összeállt HCV cDNS szekvencia értelmes szálját, és az EPO Pub. No. 318 216-ban közölt összeállt HCV cDNS szekvenciáját mutatja. A szekvencia a következő klónokból származik: b114a, 18g, ag30a, CA205a, CA290a, CA216a, pi14a, CA167b, CA156e, CA84a, CA59a, K9-1 (k9-1-nek is nevezett), 26j, 13i, 12f, 14i, 11b, 7f, 7e, 8h, 33c, 40b, 37b, 35, 36, 81, 32, 33b, 25c, 14c, 8f, 33f, 33g, 39c, 35f, 19g, 26g, 15e, b5a, és a 16jh. Az ábrán a szekvencia felett levő három vessző a feltételezett iniciátor metionin kodont jelöli. Az ábra szemlélteti a HCV cDNS-ben kódolt feltételezett poliprotein aminosav szekvenciáját is.

az antigén térképezési vizsgálatokban használt immunológiai telep screenelési módszer diagramját mutatja.

a HCV és a West Nile vírusban kódolt poliproteinek hidrofóbicitási profiljait szemlélteti.

a feltételezett HCV poliprotein hidrofilitási/hidrofóbicitási profilját és antigén indexét vázolja.

21. ábra a HCV-ben és a Flavi-vírusokban levő konzervált kolineáris peptideket mutatja.

Eljárás a találmány kivitelezéséhez

I. Definíciók

A leírásban az alábbi, részletesen magyarázott kifejezéseket használjuk.

Hepatitis C vírus:

az e területen dolgozók ezt a fogalmat a NANBH egykor ismeretlen aetiológiai anyagának tartották fenn. Ennek megfelelően, ahogy a találmányban használjuk, a „hepatitis C vírus” (HCV) a NANBH előidéző anyagára vonatkozik, ezzel a névvel korábban az NANBV és/vagy BB-NANBV-t jelölték. A találmányban a HCV, NANBV, és BB-NANBV fogalmakat felcserélhetően használjuk. A terminológia kiterjesztésének következtében a HCV által okozott betegséget, melyet korábban NANB hepatitisnek neveztek (NANBH), hepatitis C-nek hívjuk. A találmányban az NANBH és a hepatitis C fogalmakat felcserélhetően használjuk.

HCV:

A fogalom a találmány szerinti használatban olyan vírus fajt jelöl, melynek patogén törzsei NANBH-t okoznak, és gyengített törzsek és hibás zavaró részecskék származnak belőle. Ahogy az a későbbiekben látható, a HCV genomja RNS-ből áll. Ismeretes, hogy az RNS tartalmú vírusokban relatíve magas a spontán mutációs ráta, pl. a közlemények szerint 10^{-3} – 10^{-4} nagyságrendű a beépült nukleotidokra vonatkoztatva (Fields és Knipe, 1986). Ezért a későbbiekben leírt HCV fajon belül számos olyan törzs létezik, melyek lehetnek virulensek, vagy avirulensek. A későbbiekben leírt összetételek és módszerek lehetővé teszik a HCV törzsek, vagy izolátumok szaporítását, azonosítását, detektálását és izolálását. Továbbá a találmány lehetővé teszi a különböző törzsek elleni diagnosztikumok és vakcinák elkészítését, akár az antivirális anyagok screenelési folyamataiban használható összetételek és módszerek gyógyszer-tani célú felhasználását, olyan anyagokat, melyek pl. gátolják a HCV replikációját.

Az itt nyújtott információ, bár a prototípus törzsről, vagy HCV izolátumról szereztük, melyet a továbbiakban CDC/HCV1-nek (HCV1-nek is hívott) jelöljük, elegendő egy vírus rendszertannal foglalkozó számára arra, hogy a fajba tartozó többi törzset azonosítsa. Az itt nyújtott információ alátámasztja azt a sejtést, miszerint a HCV egy Flavi-szerű vírus. A Flavi-vírus részecskék morfológiája és összetétele ismert, és Brinton közleményében tárgyalt (1986). Általánosságban a morfológiát tekintve, a Flavi-vírusok egy kettős lipid réteggel körülvett központi nukleokapszidot tartalmaznak. A virionok gömb alakúak és kb. 40–50 nm átmérőűek. Magjuk átmérője kb. 25–30 nm. A virion burok külső felszínén 5–10 nm hosszú nyúlványok vannak, melyek kb. 2 nm átmérőű gombocskákban végződnek.

Azt vártuk, hogy a különböző törzsek, vagy HCV izolátumok a prototípus izolátumhoz, a HCV1-hez ké-

pest eltéréseket tartalmaznak az aminosavakban és a nukleinsavakban. Arra számítottunk, hogy sok izolátum sok homológiát (több mint 40%-ot pl.) mutat az aminosav szekvenciában a HCV1-gyel összevetve. De lehet találni ennél kisebb homológiájú HCV izolátumokat is. Ezeket az izolátumokat számos kritérium szerint lehetne jellemezni, például ilyenek szerint: egy megközelítőleg 9000 – körülbelül 12 000 nukleotidot tartalmazó ORF, mely egy olyan poliproteint kódol, mely méretben hasonló a HCV1-ben található; a kódolt poliprotein hasonló hidrofóbicitású és antigén tulajdonságú, mint a HCV1-ben kódolt; és egy a HCV1-ben konzervált kolineáris peptid szekvencia jelenléte alapján. Továbbá, a genom pozitív-szálú RNS legyen.

A HCV kódol legalább egy olyan epitópot, mely immunológailag azonosítható egy olyan HCV-genomban levő epitóppal, melyből az itt leírt cDNS-ek származnak; előnyösen az epitóp tartalmaz egy itt leírt aminosav szekvenciát. Az epitóp jellegzetes a HCV-t tekintve, ha más ismert Flavi-vírusokkal hasonlítjuk össze. Jellegzetességét úgy határozhatjuk meg, hogy immunológailag reagál a HCV-elleni antitestekkel, míg más Flavi-vírus fajok antitestjeivel szemben hiányzik ez az immunológiai aktivitása. A szakember számára ismeretesek az immunológiai aktivitás meghatározásának módszerei, ilyenek pl. a radioimmunológiai vizsgálat, az ELISA módszer, a hemagglutináció, és számos példát nyújtunk a vizsgálatra alkalmas technikákból.

A fentiekén túl a következő nukleinsav homológiai és aminosav homológiai paraméterek alkalmazhatók egyesével, vagy együttesen a törzsek, vagy izolátumok HCV-ként való azonosításában. Mivel a HCV törzsek és izolátumok fejlődéstaniilag kapcsolatban állnak, azt vártuk, hogy nukleotid szinten a genomok teljes homológiája talán 40% körül, vagy még nagyobb lesz, talán 60%, vagy nagyobb, vagy még valószínűbb, hogy 80%, vagy ennél nagyobb; és továbbá azt, hogy lesz legalább 13 nukleotidból álló hasonló szomszédos szekvencia. A feltételezett HCV törzsek genom-szekvenciája és a CDC/HCV1 cDNS szekvencia közötti hasonlóságot a tudományban ismert technikák segítségével lehet meghatározni. Például meghatározható a feltételezett HCV-ből származó polinukleotid szekvencia és a HCV cDNS szekvencia(ák) információinak közvetlen összehasonlításával. Továbbá meghatározhatók a polinukleotidok hibridizációjával is, melyet olyan körülmények között végzünk, hogy stabil duplexek képződjenek a homológ régiók között (pl. azok, melyeket az S1-gyel való emésztés előtt kívánunk használni), ezt követően egyszálú specifikus nukleáz(ok)-kal végzünk emésztést, majd az emésztett fragmentumok méretét határozzuk meg.

A HCV-törzsek vagy -izolátumok fejlődéstörténeti rokonsága miatt a feltételezett HCV-törzsek, vagy -izolátumok azonosíthatók polipeptid szinten levő homológiájuk alapján. Általában a HCV-törzsek, vagy -izolátumok esetében 40%-osnál nagyobb homológiára szá-

mítunk, esetleg 70%-osnál nagyobbra, és még valószínűbb, hogy 80%-nál is nagyobb homológiára, és néhány még a 90%-nál nagyobb homológiát is eléri polipeptid szinten. Az aminosav szekvencia homológiájának meghatározási technikája ismert a szakember számára. Például az aminosav szekvencia közvetlenül meghatározható és az itt nyújtott szekvenciával összevethető. Hasonlóképpen a feltételezett HCV-genom anyagának nukleotid szekvenciája is meghatározható (általában a cDNS közbenső termékein keresztül), az itt kódolt aminosav szekvencia meghatározható és a hasonló régiók összevetetők.

Valamiből származó polinukleotid:

ahogy a leírásban alkalmazzuk, egy kijelölt szekvenciából „származó” polinukleotid olyan polinukleotid szekvenciát jelöl, mely legalább 6 nukleotidból álló szekvenciából áll, előnyösen legalább 8 nukleotidból, még előnyösebben legalább 10–12 nukleotidból, még előnyösebben legalább 15–20 nukleotidból, mely a kijelölt nukleotid szekvencia régiójához hasonló. A „hasonló” azt jelenti, hogy homológ vagy komplementer a jelölt szekvenciával. Előnyösen, a régió szekvenciája, melyből a polinukleotid származik homológ vagy komplementer egy HCV genomra sajátosan jellemző szekvenciával. Azt, hogy egy szekvencia sajátosan jellemző-e a HCV genomra vagy sem, a témában jártas szakember által ismert technikákkal meghatározható. Például a szekvencia összehasonlítható az adatbankokban levő szekvenciákkal, pl. a Génbankban levőkkel, abból a célból, hogy meghatározzuk a szekvencia jelen van-e a nem fertőzött gazdában vagy más szervezetekben. A szekvencia összehasonlító más vírus ágensek ismert szekvenciáival, melyek közé tartoznak azok, melyek ismert hepatitisz indukálók pl.: HAV, HBV, HDV és más a Flaviviridae-be tartozó vírusok. A származtatott szekvencia más szekvenciákkal való hasonlósága vagy eltérése meghatározható a megfelelő szigorú feltételek mellett elvégzett hibridizációval is. A nukleinsav szekvenciák komplementaritásának meghatározására szolgáló hibridizációs technikák ismertek és a későbbiek során kerülnek részletezésre. Lásd pl. Maniatis et al. (1982) közleményét. Továbbá a hibridizáció során keletkezett kettősszálú polinukleotid hibás párosítása ismert technikákkal meghatározható. Ezen technikák közé tartozik pl. az olyan nukleázzal történő emésztés, mint amilyen az S1, mely specifikusan emészt a kettősszálú polinukleotidok egyszálú régióit. Az olyan régiók, melyekből tipikus DNS szekvenciák „származtathatók” tartalmaznak – de nem korlátozódnak csupán – pl. olyan régiókat, melyek specifikus építőpocok kódolnak, akárcsak nem átvitt és/vagy nem transzlatált régiókat.

A származtatott polinukleotid nem származik szükségszerűen fizikailag a bemutatott nukleotid szekvenciából, hanem bármilyen más módon előállítható pl. kémiai szintézissel, vagy DNS replikációval, vagy reverz transzkripcióval, vagy transzkripcióval. Továbbá a jelölt szekvenciához hasonló szekvenciájú régiók kombinációi úgy módosíthatók a szakember számára is-

mert módokon, hogy az a tervezett felhasználásnak megfelelő legyen.

Hasonlóképpen, egy kijelölt nukleinsav szekvenciából „származó” polipeptid, vagy aminosav szekvencia olyan polipeptidet jelöl, mely aminosav szekvenciája azonos a szekvenciában kódolt polipeptidével, vagy annak egy részletével, ahol a részlet legalább 3–5 aminosavból áll, előnyösebben legalább 8–10 aminosavból, még előnyösebben legalább 11–15 aminosavból, vagy amely immunológiaiilag azonosítható a szekvenciában kódolt polipeptiddel.

A rekombináns, vagy származtatott polipeptid nem szükségszerűen egy kijelölt nukleinsav szekvenciáról transzlálódik pl. az itt leírt HCV cDNS szekvenciáról, vagy egy HCV-genomról; bármely más módon is előállítható pl. kémiai szintézissel, vagy egy rekombináns expressziós rendszer expressziójával, vagy mutált HCV-ből történő izolálással. A rekombináns, vagy származtatott polipeptid egy vagy több analóg aminosavat, vagy nem természetes aminosavat tartalmazhat szekvenciájában. Aminosav-analógok egy szekvenciába való inzertálása ismert a tudomány e területén. Ez magába foglalhat egy vagy több elnevezést is, melyek ismeretese az e területen jártas szakemberek számára.

Rekombináns polinukleotid:

a fogalom a találmány szerinti használatban egy genom, cDNS, félszintetikus, vagy szintetikus eredetű polinukleotidot jelöl, mely annak származása, vagy manipulációja alapján 1. nem áll kapcsolatban azzal a polinukleotiddal, vagy annak egy részével, mellyel a természetben kapcsolódik, 2. egy más polinukleotidhoz kötődik, mint amelyhez a természetben kötődik, vagy 3. nem fordul elő a természetben.

Polinukleotid:

a fogalom a találmány szerinti használatban egy bármilyen hosszúságú nukleotid polimer formáját jelöli, legyen az akár ribonukleotid, vagy dezoxi-ribonukleotid. Ez a fogalom csupán a molekula elsődleges szerkezetére vonatkozik. Így a fogalom vonatkozik a két- vagy egyszálú DNS-re, akárcsak a két- vagy egyszálú RNS-re. Vonatkozik ismert modifikációkra, mint pl. a tudományban ismert olyan elnevezésekre, mint a metiláció, „védősapkák”, a természetben előforduló egy vagy több nukleotid analógokkal való helyettesítése, nukleotidok közötti modifikációk, mint pl. a töltés nélküli kötések (pl. metilfoszfónátok, foszfortriészterek, foszfoamidátok, karbamátok stb.), töltéssel rendelkező kötések (pl. foszforotioátok, foszforoditioátok stb.), a kinyúló részt tartalmazók, mint pl. a fehérjék (ide értve pl. a nukleázokat, toxinokat, antitesteket, jelpeptideket, a poli-L-lizint stb.), interkalátorokkal rendelkezők (pl. akridin, pszoralen stb.), a kelátképzők (pl. fémek, radioaktív fémek, bór, oxidatív fémek stb.), az alkilálókat tartalmazók, a módosított kötések tartalmazók (pl. alfa anomer nukleinsavak stb.), akárcsak a polinukleotidok nem módosított formái.

Tisztított vírus polinukleotid:

a meghatározás olyan HCV genomot, vagy fragmentumot jelöl, mely alapján véve mentes az olyan polipeptidektől, melyekkel a vírus polinukleotid természetes körülmények között kapcsolódik. Például kevesebb, mint kb. 50%-ot, előnyösen kevesebb, mint kb. 70%-ot, és még előnyösebben kevesebb, mint 90%-ot tartalmaz. A vírus polinukleotidok vírusrészcsekkéktől való megtisztításának technikái ismertek, ide tartoznak pl. a részecske szétadarabolása kaotropikus anyaggal, a polinukleotid(ok) és polipeptidek ioncserés kromatográfiával, affinitás-kromatográfiával történő frakcionált kivonása és elkülönítése és a denzitásuknak megfelelő szedimentáció.

Tisztított vírus polipeptid:

a meghatározás olyan HCV polipeptidet, vagy fragmentumot jelöl, mely alapján véve mentes olyan sejtalkotóktól, melyekkel a vírus polipeptid természetes körülmények között kapcsolatban áll, pl. kevesebb, mint kb. 50%-ot, előnyösen kevesebb, mint 70%-ot és még előnyösebben kevesebb, mint 90%-ot tartalmaz. A vírus polipeptidek tisztítási eljárásai ismeretek és ezen technikákra példákat a későbbiekben ismertetünk.

Rekombináns gazdasejtek, gazdasejtek, sejtek, sejtvonalak, sejtenyészetek:

ezek és az ehhez hasonló egysejtű entitásként tenyésztett mikroorganizmusokat, vagy magasabbrendű eukarióta sejtvonalakat jelölő fogalmak olyan sejtekre vonatkoznak, melyeket rekombináns vektor, vagy más transzfer DNS recipienseiként lehet használni, vagy használnak és melyek tartalmazzák az eredeti transzfrektált sejtek utódait. Érthető, hogy az egyetlen szülői sejtből származó utódsejtek nem szükségszerűen teljesen azonosak morfológiailag, vagy a genom, vagy a teljes DNS összetételében az eredeti szülői sejtrel, a természetesen bekövetkező, véletlenszerű, vagy a szándékos mutációt eredményeként.

Replikon:

bármilyen genetikai elemet jelöl ez a fogalom. Például egy plazmid, egy kromoszóma, egy vírus, kozmid stb., mely a sejtben belüli polinukleotid replikáció autonóm egységként viselkedik pl. képes saját ellenőrzése alatt szaporodni.

Vektor:

a meghatározás olyan replikont jelöl, melyben egy másik polinukleotid szegment kapcsolódik úgy, hogy előidézi a kapcsolt szegment replikációját és/vagy expresszióját.

Kontroll szekvencia:

a meghatározás olyan polinukleotid szekvenciákra vonatkozik, melyek azon kódoló szekvenciák expressziójához szükségesek, amelyekhez ligáltak. Az ilyen kontroll szekvenciák tulajdonságai a gazdaszervezettől függően különböznek; prokariótákban az ilyen

kontroll szekvenciák általában promotereket, riboszómás kötőhelyeket és terminátorokat tartalmaznak; eukariótákban általában az ilyen kontroll szekvenciák promotereket, terminátorokat és néhány esetben erősítő szekvenciákat tartalmaznak. A „kontroll szekvencia” fogalma hivatott tartalmazni minimálisan mindazokat a komponenseket, melyek jelenléte szükséges az expresszióhoz és tartalmazhat olyan további komponenseket is, melyek jelenléte előnyös, pl. a vezető szekvenciák.

Működőképesen kapcsol:

a meghatározás egy juxtapozícióra utal, melyben az így jellemzett komponensek olyan kapcsolatban vannak, amely lehetővé teszi számukra, hogy a kívánt módon funkcionáljanak. Az a kontroll szekvencia, mely „működőképesen kapcsolódik” egy kódoló szekvenciához, oly módon ligált, hogy a kódoló szekvencia expressziója olyan körülmények között valósul meg, mely kompatibilis a kontroll szekvenciával.

Nyitott leolvasási keret (ORF):

a fogalom egy polinukleotid szekvencia polipeptideket kódoló régióját jelenti; ez a régió a kódoló szekvencia egy részét, vagy a teljes kódoló szekvenciát képviselheti.

Kódoló szekvencia:

a fogalom egy polinukleotid szekvenciára vonatkozik, mely átíródik mRNS-vá és/vagy polipeptiddé transzlálódik, ha megfelelő szabályozó szekvenciák ellenőrzése alá kerül. A kódoló szekvencia kereteit az 5' végen egy transzlációs start kódon, a 3' végen egy transzlációs stop kódon határolja. Egy kódoló szekvencia állhat mRNS-ből, cDNS-ből és rekombináns polinukleotid szekvenciából, de nem korlátozódik csupán ezekre.

Immunológailag azonosítható:

a meghatározás olyan epitóp(ok) és polipeptid(ek) jelenlétére vonatkozik, melyek jelen vannak a kijelölt polipeptid(ek)ben is, rendszerint HCV proteinekben. Az immunológiai azonosság antitest kötődéssel és/vagy kötési kompetícióval határozható meg; ezek a technikák ismeretek a tudományban általánosan képzett szakemberek számára, és a későbbiekben bemutatásra kerülnek.

Epitóp:

a találmány szerinti használatban egy polipeptid antigén hatású determinánsára vonatkozik; az epitóp 3 olyan aminosavból áll, melyek térbeli konfigurációja az epitópra jellemző, általában egy epitóp legalább 5 ilyen aminosavból áll, még gyakrabban legalább 8–10 ilyen aminosavból. Az aminosavak térbeli konformációjának meghatározási módszerei ismertek, ilyenek a röntgen krisztallográfia és a kétdimenziójú nukleáris mágneses rezonancia.

Immunológailag aktív:

a fogalom szerint egy polipeptid immunológailag akkor reagál egy antitesttel, amikor kötődik hozzá.

annak következtében, hogy az antitest felismeri a specifikus epitópot, melyet a polipeptid tartalmaz. Az immunológiai aktivitás antitest kötődéssel határozható meg, még részletesebben az antitest kötődés kinetikájával és/vagy kötődési kompetícióval, ha kompetitorként használunk egy ismert polipeptid(ek)et, mely(ek) a célzott antitest elleni epitópot tartalmazzá(k). A meghatározási technikái annak, hogy egy polipeptid immunológiailag aktív-e egy antitesttel szemben, ismertek a szakemberek számára.

Immunogén polipeptid:

a találmány szerinti használatban az immunogén polipeptid olyan polipeptid, mely celluláris és/vagy humorális választ vált ki, akár egymagában, akár egy hordozóhoz kötve, adjuváns jelenlétében vagy hiányában.

Polipeptid:

a meghatározás aminosavak polimerjére vonatkozik és nem a termék egy specifikus hosszúságára; így peptidok, oligopeptidok és proteinek egyaránt a polipeptid definíciójába tartoznak. Ez a meghatározás nem vonatkozik, vagy zárja ki a polipeptid expresszió utáni modifikációit pl. a glikozilációkat, acetilációkat, foszforilációkat és az ehhez hasonlókat. A meghatározás magába foglal pl. egy vagy több aminosav analógot tartalmazó polipeptidet (pl. nem természetes aminosavakat stb.) helyettesített kötésekkel rendelkező polipeptideket, akárcsak más ismert modifikációkat, legyenek ezek természetesen előfordulók, vagy nem természetesen előfordulók.

Transzformáció:

a találmány szerinti használatban egy exogén polinukleotid gazdasejtbe való inzercióját jelenti, függetlenül attól, hogy az inzercióhoz milyen módszert használunk, pl. direkt felvételt, transzdukción, f-párosítást, vagy elektroporációt. Az exogén polinukleotid nem-integrált vektorként tartható fenn, pl. plazmidként, vagy más megoldásként a gazda genomjába integrálható.

Kezelés:

a találmány szerinti használatban jelentése profilaxis és/vagy terápia.

Egyén, egyed:

a találmány szerinti használatban az „egyén, egyed” gerincesekre vonatkozó meghatározás, ezek közül is főként az emlős fajok tagjaira. Ide tartoznak a háziállatok, sportállatok, főemlősök ide értve az embert is, bár nem korlátozódik csupán ezekre.

Kódoló szál (sense strand):

a találmány szerinti használatban egy nukleinsav „kódoló szála” olyan szekvenciából áll, mely szekvencia homológ az mRNS szekvenciájával. Az „anti-sense strand” olyan szekvenciából áll, mely komplementere a kódoló szál szekvenciájának.

Pozitív szálú genom:

a találmány szerinti használatban a meghatározás olyan vírus-genomot jelöl, mely álljon akár RNS-ből vagy DNS-ből, egyszálú és vírus-polipeptid(ek)et kódol. A pozitív szálú RNS vírusokra példa a Togaviridae, Coronaviridae, Retroviridae, Picornaviridae és a Caliciviridae. Ide tartoznak a Flaviviridae fajok is, melyeket korábban Togaviridae-ként osztályoztak. Lásd Fields és Knipe (1986) munkáját.

Antitest tartalmú testalkotók:

a találmány szerinti használatban a meghatározás az egyén testének olyan összetevőjére vonatkozik, mely a kérdéses antitest forrása. Antitest tartalmú testalkotók ismertek a szakember számára; ezek közé tartoznak, de nem korlátozódnak csupán a következőkre: plazma, szérum, gerincfolyadék, nyiroknedv, a légzőszervek, emésztőcsatorna és az urogenitális rendszer külső részei, könny, nyál, tej, fehérvérsejtek, mielőtt.

Tisztított HCV:

a találmány szerinti használatban a meghatározás olyan HCV készítményre vonatkozik, mely olyan sejtalkotókból kerül izolálásra, mellyel a vírus normális körülmények között kapcsolatban van és olyan más vírusokból, melyek jelen lehetnek a fertőzött szövetben. A tudományban jártas szakemberek számára ismertek a vírus-izolálás technikái, ilyenek pl. a centrifugálás és affinitás-kromatográfia: a tisztított HCV készítésének módszere a későbbiekben kerül leírásra.

HCV-részecskék:

a találmány szerinti használatban a meghatározás vonatkozik a teljes virionra, akárcsak a virion képzésében résztvevő köztes részecskékre. A HCV-részecskék általában egy vagy több HCV-nukleinsavakhoz kapcsolódó HCV fehérjével rendelkeznek.

Próba:

a találmány szerinti használatban a meghatározás olyan polinukleotidra vonatkozik, mely hibrid szerkezetet létesít a célzott terület szekvenciájával, annak következtében, hogy a próba legalább egy szekvenciája komplementer a célzott terület egy szekvenciájával. A próba azonban nem tartalmaz olyan szekvenciát, mely komplementer a polimeráz láncreakció beindításához használt szekvenciával(akkal).

Célzott terület:

a találmány szerinti használatban a meghatározás a nukleinsav olyan régiójára vonatkozik, melyet ki szándékozunk bővíteni és/vagy detektálni.

Vírus RNS:

a találmány szerinti használatban a meghatározás, melybe a HCV RNS is bele tartozik, a vírus-genomból származó RNS-ra vonatkozik, ennek fragmentjeire, transzkriptjeire és az ebből származó mutáns szekvenciákra.

Biológiai minta:

a találmány szerinti használatban a meghatározás egy egyedből izolált szövet, vagy folyadék mintára utal, melybe bele tartoznak a következők – bár nem korlátozódnak csupán ezekre – plazma, szérum, gerincfolyadék, nyiroknedv, a bőr, a légzőszerv, az emésztőcsatorna és az urogenitális rendszer külső részei, a könny, a nyál, tej, vérsejtek, tumorok, szervek és in vitro sejtenyészetek alkotóinak mintái (ide értve, de nem csupán a következőkre korlátozódva pl. a sejtenyészítő tápközegben való sejt szaporodás eredményeként megváltozott tápközeg, a feltételezhetően vírusfertőzött sejtek, a rekombináns sejtek és a sejtkomponensek).

II. a találmány leírása

A jelen találmányban, hacsak ezt külön nem jelöltük, a szakember számára ismert hagyományos molekuláris biológiai, mikrobiológiai, rekombináns DNS és immunológiai technikákat alkalmaztunk. Ezen technikák részletes leírása megtalálható az irodalomban. Lásd pl. a következő műveket: Maniatis, Fritsch and 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 and S. J. Higgins eds. 1984); TRANSCRIPTION AND TRANSLATION (B. D. Hames and 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); the 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 Enzymology Vol. 154 and Vol. 155 (Wu and Grossman, and Wu, eds., respectively), Mayer and Walker eds. (1987), IMMUNOCHEMICAL METHODS IN CELL AND MOLECULAR BIOLOGY (Academic Press, London), Scopes (1987), PROTEIN PURIFICATION: PRINCIPLES AND PRACTICE, Second Edition (Springer-Verlag, N. Y.), HANDBOOK OF EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY, VOLUMES I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell eds. 1986). Az összes korábban és az ezután említett szabadalom, szabadalmi alkalmazás és a közlemények a referenciában vannak feltüntetve.

A jelen találmány hasznos anyagait és eljárásait a nukleotid szekvenciák egyik családjának előállítására tette lehetővé, melyet a HCV cDNS szekvenciákat tartalmazó cDNS-könyvtárakból izoláltuk. Ezek a cDNS-könyvtárak HCV-sal fertőzött csimpánz plazmájában jelen levő nukleinsav szekvenciákból származtak. Ezen könyvtárak egyikének, a „c” könyvtárnak (ATCC No. 40 394) a felépítéséről az EPO Pub. No. 318 216-ban számoltunk be. Az itt közölt HCV cDNS-at tartalmazó klónok közül számosat a „c” könyvtárból nyertünk. Bár a találmányban közölt klónok közül másokat más HCV cDNS-könyvtárakból nyertünk, a „c” könyv-

tárban levő szekvenciákat tartalmazó klónok jelenlétét bizonyítottuk. Ahogy az EPO Pub. No. 318 216 számú szabadalomban közzé tettük, a „c” könyvtárból izolált HCV cDNS szekvenciák családja nem humán vagy csimpánz eredetűek és nem mutatnak jelentős homológiát a HBV-genomban levő szekvenciákkal.

Az itt leírt HCV cDNS-ak elérhetősége lehetővé tette olyan polinukleotid próbák létrehozását, melyek hasznos reagensek a biológiai mintákban levő – ideértve az adott vért is – vírus eredetű polinukleotidok detektálásában. Például a szekvenciákból 8–10 nukleotidból álló DNS oligomerek szintetizálhatók, vagy nagyobbak, melyek hibridizációs próbaként alkalmazhatók a HCV RNS jelenlétének detektálására pl. adott vérben, olyan alanyok szérumában, melyek feltételezetten tartalmazzák a vírust, vagy sejtenyészet-rendszerekben, ahol a vírus replikálódik. Továbbá a cDNS szekvencia lehetőséget nyújt arra, hogy HCV specifikus polipeptideket szerkesszünk és termeljünk, melyek diagnosztikai reagensekként használhatók a HCV fertőzés alatt termelt antitestek jelenlétének kimutatására. A cDNS-akból származtatott tisztított polipeptidek elleni antitestek szintén használhatók a biológiai mintákban levő vírus-antigének detektálására. Ilyen minták az adott vérminták, NANBH betegek szérumai és a HCV replikációhoz használt szövettenyésztési rendszerek. Továbbá az itt közölt immunogén polipeptidek, melyek a 17. ábrán látható HCV cDNS ORF-jének (nyitott leolvasási keret) egy részében kódoltak szintén használhatók a HCV-ra történő szkrinelésre, diagnózisra és kezelésére és olyan antitestek képzésére, melyek ilyen célokra használhatók.

Továbbá, az itt leírt új cDNS szekvenciák lehetővé teszik a HCV-genom további jellemzését. Az ezen szekvenciákból származó polinukleotid próbák és primerek használhatók a cDNS-könyvtárakban jelenlevő szekvenciák kibővítéséhez és/vagy a cDNS-könyvtárak továbbá átfedő cDNS szekvenciákra való szkrineléséhez, mely viszont további átfedő szekvenciák nyeréséhez használható. Ahogy a későbbiekben és az EPO Pub No. 318 216 sz. szabadalomban jeleztük, a HCV-genom olyan RNS-nak tűnik, mely elsősorban egy nagy poliproteint kódoló nagy ORF-ből (nyitott leolvasási keret) áll.

Az itt nyújtott HCV cDNS szekvenciák, az ezen szekvenciákból származtatott polipeptidek, az itt leírt immunogén polipeptidek, akár csak ezen polipeptidek ellen irányuló antitestek szintén használhatók a vér eredetű NABV (BB–NANBV) ágens(ek) izolálásához és azonosításához. Például a cDNS-akból származtatott polipeptidekben levő HCV epitópok ellen irányuló antitestek olyan a vírus izolálására használható eljárásokban alkalmazhatók, melyek az affinitás-kromatográfiára épülnek. Másik esetben, az antitestek az eltérő technikákkal izolált vírusrészcscék azonosítására használhatók. A vírus antigének és az izolált vírusrészcscékben levő genom anyagok a későbbiekben így tovább jellemezhetők.

Továbbá, a későbbiekben adott információ lehetőséget nyújt további HCV-törzsek vagy -izolátumok

azonosítására. A további HCV-törzsek vagy -izolátumok izolálása és jellemzése megvalósítható olyan tesztelőkészletekből való nukleinsavak izolálásával, melyek tartalmazzák a vírus részecskéket és/vagy a vírus RNS-at, a későbbiekben leírt HCV cDNS-próbákra alapozott polinukleotid próbák használatával, a cDNS-könyvtárak létrehozásával, a könyvtárak a későbbiekben leírt HCV cDNS szekvenciákat tartalmazó klónokra való szkrinelésével és az új izolátumokból származó HCV cDNS-ak későbbiekben leírt cDNS-akkal való összehasonlításával. Az ezekben vagy a vírus genomban kódolt polipeptid vizsgálatok immunológiai keresztreakciókra a fent leírt polipeptid és antitestek használatával. Azok a törzsek vagy izolátumok, melyek megfelelnek a HCV paramétereknek – ahogy azok korábban a Definíciók c. részben szerepelnek – könnyen azonosíthatók. A HCV-törzsek azonosításának más módszerei egyértelműek lesznek a tudományban jártas szakember számára a találmányban nyújtott információk alapján.

A HCV cDNS szekvenciák izolálása

A későbbiekben leírt új HCV cDNS szekvenciák kiterjesztik a cDNS szekvenciát az EPO Pub. No. 318 216 sz. szabadalomban közölt HCV-genomra. A b114a, 18g, ag30a, CA205a, CA290a, CA216a, pi14a, CA167b, CA156e, CA84a és a CA59a klónokban jelen levő szekvenciák a közölt szekvenciáktól a szintézis irányával ellentétes irányban (upstream) helyezkednek el és ha összeszerkesztjük őket, az összetett HCV cDNS szekvencia következő számú nukleotidjait eredményezik: –319–1348. (A nukleotid előtti negatív jel a nukleotid szintézis irányával ellentétes irányban levő távolságát jelöli, attól a nukleotidtól, mellyel a feltételezett MET-startkodon kezdődik.) A b5a és a 16jh klónokban levő szekvenciák a közölt szekvenciától a szintézis irányával egyező irányban (downstream) helyezkednek el és az összetett szekvencia 8659–8866 számokkal jelölt nukleotidjait eredményezi. Az összetett HCV cDNS szekvencia, mely tartalmazza a korábban említett klónokban levő szekvenciákat, a 17. ábrán látható.

Az itt bemutatott új HCV cDNS-akat számos HCV cDNS-könyvtárból izoláltuk, többek között a lambda-gt11-ben jelen levő „c” könyvtárból (ATCC No. 40 394). A HCV cDNS-könyvtárakat olyan csimpánz összegyűjtött szérumból állítottuk össze, mely krónikusan HCV-sal fertőzött volt és magas vírustiterű volt, legalább 10^6 csimpánz fertőző dózis/ml (CID/ml). Az összegyűjtött szérumot vírusrészecskék izolálására használtuk; az ezen részecskékből izolált nukleinsavakat a cDNS-könyvtárak megszerkesztésében templátként használtuk a vírus genomhoz. A feltételezett HCV részecskék izolálásának és a „c” HCV cDNS-könyvtár megszerkesztésének eljárását az EPO Pub. No. 318 216. sz. szabadalomban tettük közzé. A HCV cDNS-könyvtárak megszerkesztésének más módszerei ismertek a tudomány e területén, ezek közül néhányat a Példák c. részben a későbbiekben közlünk. A szekvenciákat, melyek az ismert HCV cDNS szekvencia 5'- és

3'-régijából származtak szintetikus polinukleotid próbákat használva a könyvtárak szkrinelésével izoláltuk. A cDNS szekvenciák visszanyerésének módszere főképpen történelmi szempontból érdekes. A kapott szekvenciákat (és ezek komplementereit) a találmányban adjuk meg; a szekvenciákat vagy ezek bármely részét szintetikus módszerekkel készíthetjük el, vagy a szintetikus módszereket kombinálhatjuk a rész-szekvenciák visszanyerésének olyan módszereivel, melyek hasonlóak a jelen találmányban leírtakhoz.

Vírus polipeptid és fragmentumok készítése

A HCV cDNS szekvenciák vagy a belőlük származó nukleotid-szekvenciák (a szekvenciák szegmenjeit és modifikációit is beleértve) hozzáférhetősége lehetővé teszi expressziós vektorok létrehozását, melyek a szálak valamelyikében kódolt polipeptid antigén aktivitású régiót kódolják. Ezek az antigén aktivitású régiók vagy a köpeny vagy a burok antigénekből vagy a mag antigénekből származhatnak, vagy olyan antigénekből, melyek nem szerkezeti antigének, ideértve pl. a polinukleotid-kötő fehérjéket, polinukleotid polimeráz(oka)t és más olyan vírusfehérjéket, melyek a vírus részecskék replikációjához és/vagy összeállításához szükségesek. A kívánt polipeptideket kódoló fragmentumokat hagyományos restrikciós emésztést vagy szintetikus módszereket használva nyerjük a cDNS-klónokból és olyan vektorokba ligáljuk őket, melyek pl. olyan fúziós szekvenciák részeit tartalmazhatják, mint a béta-galaktozidáz vagy szuperoxid dismutáz (SOD), előnyösen SOD. Az olyan módszereket és vektorokat, melyek olyan polipeptid termeléséhez hasznosak, melyek a SOD fúziós szekvenciát tartalmazzák, a 0 196 056 számú 1986. október 1-jén megjelent európai közbeérvéssel iratban írták le. A későbbiekben a Példák c. részben írjuk le a számos HCV-klónban kódolt a SOD és HCV-polipeptid fúziós polipeptidjeinek expressziójához való vektorokat. A bármelyik értelmes számban nyílt leolvasási keretet tartalmazó HCV cDNS kívánt részeit rekombináns polipeptidként nyerhetjük ki, érett vagy fúziós fehérjeként, vagy másik lehetőségként a cDNS-ban kódolt polipeptidet kémiai szintézissel állíthatjuk elő.

A kívánt polipeptideket kódoló DNS akár fuzionált, akár érett formában és akár tartalmazza a szekréciót lehetővé tevő szignál szekvenciát, akár nem, ligálható olyan expressziós vektorokba, melyek bármely alkalmas gazdának megfelelnek. Jelenleg mind az eukarióta, mind a prokarióta gazdarendszereket alkalmazzák a rekombináns polipeptid előállításához és néhány gyakoribb kontroll rendszer és gazda sejtvonal összegzését a későbbiekben adjuk meg. A polipeptidet ezután a roncsolt sejtekből vagy a tápközegből izoláljuk és a felhasználási célnak megfelelő mértékig tisztítjuk. A tisztítást ismert technikákkal végezhetjük, ilyenek pl. a frakcionált extrakció, a sóval történő frakcionálás, az ioncserélő gyantán végzett kromatográfia, az affinitáskromatográfia, a centrifugálás és a hasonlók. Lásd pl. a *Methods in Enzymology* c. könyvet, melyben számos fehérjetisztítási módszer szerepel. Az ilyen polipepti-

dek diagnosztikumokként használhatók, vagy azokból, melyek semlegesítő antitestek képzését idézik elő, vakcinák készíthetők. Az ezen polipeptidekkel szemben termelt antitestek szintén diagnosztikumokként használhatók, vagy passzív immun terápia. Továbbá, mint azt a későbbiekben tárgyaljuk, az ezen polipeptidek elleni antitestek a HCV részecskék izolálására és azonosítására használhatók.

Antigén polipeptidek készítése és hordozóval való kapcsolása

Egy polipeptid antigén régiója általában viszonylag kicsi – leggyakrabban 8–10 aminosav hosszú vagy ennél is rövidebb. Az 5 aminosavból álló fragmensek már jellemezhetnek egy antigén területet. Ezek a szegmensek megfelelhetnek a HCV-antigén régióinak. Ennek megfelelően a HCV cDNS-jait alapul véve a HCV polipeptidek rövid szegmenseit kódoló DNS-ak rekombinánsan kifejezhetők akár fúziós fehérjékként, akár izolált polipeptidekként. Továbbá a rövid aminosav szekvenciák kényelmesen előállíthatók kémiai szintézissel. Bizonyos esetekben, amikor a szintetizált polipeptid megfelelően konfigurált ahhoz, hogy jó epitópot adjon, de túl kicsi ahhoz, hogy immunogén hatású legyen, a polipeptid egy alkalmas hordozóhoz köthető.

Az ilyen kötések nyerésére számos technika ismert, ideértve az N-szukcinimidil-3-(2-piridiltio)-propionát (SPDP) és szukcinimidil-4-(N-maleimido-metil)-ciklohexán-1-karboxilát (SMCC) alkalmazásával létrehozott diszulfid-kötéseket. A vegyszerek a Perce Companytól (Rockford, Illinois) származnak. (Ha a peptidből hiányzik a szulfhidril-csoport, ezt egy cisztein-maradék hozzáadásával biztosíthatjuk.) Ezek a reagenssek diszulfid-kötést létesítenek maguk és a peptid cisztein-maradék között az egyik proteinen és amid-kötést az epszilon-aminon keresztül a lizinen, vagy más szabad aminocsoporttal másokon. Számos ilyen diszulfid/amid képző anyagot ismertünk. Lásd pl. az Immun. Rev. (1982) 62 : 185. számát. Más kétfunkciójú párosító ágens a diszulfid-kötés helyett inkább tioétert képez. A tioéter képző anyagok közül számos beszerezhetők a kereskedelemben, ide tartoznak a 6-maleimido-kapronsav, 2-bróm-ecetsav, 2-jód-ecetsav, 4-(N-maleimido-metil)-ciklohexán-1-karboxilsav reaktív észterei és számos hasonló. A karboxil-csoportok aktiválhatók, ha szukcinimiddal vagy 1-hidroxil-2-nitro-4-szulfonsavval vagy Na-sóval vegyítjük őket. Az antigének összekapcsolásához használt további módszerek rotavírus/„kötő fehérje” rendszert alkalmaznak, mely az EPO Pub. No. 259 149 sz. szabadalomban került leírásra, melyet a jelen találmány referencia részében megadtunk. Az előző listát nem szántuk kimerítőnek, a megnevezett vegyületek módoszatai természetesen használhatók.

Bármelyi hordozó használható, ha önmagában nem indukálja a gazdára káros antitest termelését. A megfelelő hordozók általában nagy, lassan lebomló makromolekulák, mint pl. a fehérjék; poliszacharidok, mint pl. a latex funkcionális szefaróz, agaróz, cellulóz,

cellulóz gyöngyök és a hasonló; polimer aminosavak, mint pl. a poliglutaminsav, polilizin és hasonló; aminosav polimer; és inaktív vírusrészecskék. Különösen alkalmas protein szubsztátok: a szérum albuminok, a kulcs alakú tapadó kagyló (keyhole limpet) hemocianinja, immunoglobulin molekulák, tiroglobulin, ovalbumin, tetanusz toxid és más e területen jártas szakember számára ismert fehérjék.

A teljes hosszúságú vírusproteinen túl a legalább egy vírus epitópot kódoló csonka HCV-aminosav-szekvenciákat tartalmazó polipeptidek is megfelelő immunológiai reagenssek. Például az ilyen csonka szekvenciából álló polipeptidek reagensként alkalmazhatók egy immunológiai vizsgálatban. Ezek a polipeptidek az antiszérum vagy vakcina előállítás összetevőinek antigén alegység jelöltjei is. Míg ezen a csonka szekvenciák a natív vírus protein számos ismert kezelésével előállíthatók, általában jobban kedvelt a HCV szekvenciából álló polipeptidek szintetikus vagy rekombináns úton való előállítása. Ezen csonka HCV szekvenciákat tartalmazó polipeptidek HCV szekvenciákból (egy vagy több epitóp, érintkező vagy nem érintkező) teljesen előállíthatók, vagy HCV szekvenciákból és egy fúziós fehérjében levő heterológ szekvenciákból állíthatók össze. A használható heterológ szekvenciák közé tartoznak olyan szekvenciák, melyek biztosítják a szekréciót a rekombináns gazdából, erősítik a HCV epitóp(ok) immunológiai aktivitását, vagy elősegítik a polipeptid kötődését egy immunológiai vizsgálat anyagához vagy egy vakcina hordozóhoz. Lásd az EPO Pub. No. 116 201 sz., U. S. Pat. No. 4 722 840 sz., EPO Pub. No. 259 149 sz., U. S. Pat. No. 4 629 783 sz. szabadalmakat, melyeket a találmány referencia részében közöltünk.

A csonka HCV szekvenciákat tartalmazó polipeptid mérete széles keretek között változik, a minimális méret olyan szekvencia, mely elegendő méretű ahhoz, hogy egy HCV epitópot biztosítson, míg a maximális méret nem kritikus. A kényelem kedvéért a maximális méret általában nem sokkal nagyobb, mint amekkora a kívánt HCV epitópok biztosításához szükséges és a heterológ szekvencia funkcióját már képes ellátni. Általában a csonka HCV aminosav szekvencia kb. 5 – kb. 100 aminosav hosszúságú. Még gyakrabban azonban a HCV szekvencia maximum kb. 50 aminosav hosszúságú lesz, előnyösen maximálisan kb. 30 aminosavból áll. Általában kívánatos olyan HCV szekvenciákat szelektálni, melyek legalább 10, 12 vagy 15 aminosavból, maximum kb. 20 vagy 25 aminosavból állnak.

Az epitópokból álló csonka HCV aminosav szekvenciák számos módon azonosíthatók. Például a teljes vírus protein szekvencia szkrinelhető úgy, hogy egy sor olyan rövid polipeptidet készítünk, melyek együtt kiadják a teljes protein szekvenciát. A HCV-poliprotein-régiók antigén szkrinelésére később adunk példát. Továbbá pl. egy 100 tagú polipeptiddel kezdve rutinmunka lenne a kívánt aktivitást mutató epitópok jelenlétére való szkrinelés, majd tovább haladva tesztelni lehetne az azonosított 100 tagú polipeptiden levő kisebb és az átfedő fragmenseket, hogy a kérdéses epitópot feltérké-

pezzük. Az ilyen polipeptidek immunológiai vizsgálati módszerekkel való tesztelése ismert a szakember számára. Ismeretes hogyan kell a protein szekvencia komputeres vizsgálatát elvégezni, ha potenciális epitópot szándékozunk azonosítani, majd a szkrineléshez az azonosított régiót tartalmazó oligopeptideket előállítani. A HCV aminosav szekvencia ilyen komputeres analízisét a 20. ábra mutatja, ahol a hidrofil/hidrofób tulajdonságot az antigén index fölött jelöltük. Az aminosavak számozása a kezdő MET-nél (1. pozíció) indul, ahogy azt a 17. ábra mutatja.

A tudományban jártas szakemberek helyesen ítélik meg, hogy az antigenitás ilyen komputeres analízise nem mindig olyan epitópot azonosít, mely valójában létezik is és helytelenül azonosíthat egy fehérje régiót, mintha epitópot tartalmazna.

A későbbiekben írunk le olyan példákat a használható HCV aminosav szekvenciákról, melyeket olyan expressziós vektorokból fejeztünk ki, amelyek tartalmazzák a következő klónokat: 5-1-1, 81, CA74a, 35f, 279a, C36, C33b, CA290a, C8f, C12f, 14c, 15e, C25c, C33c, C33f, 33g, C39c, C40b, CA167b. Más használható HCV aminosav szekvenciákat – ahogy itt leírtuk, a későbbiekben adunk meg. Meg kell érteni, hogy ezek a polipeptidek nem szükségszerűen pontosan térképeznek fel egy epitópot és hogy tartalmazhatnak nem-immunogén HCV szekvenciát is. A szekvencia ezen nem-immunogén részeit a fent leírtak szerint határozhatjuk meg hagyományos technikákat használva, a leírt szekvenciákból kiemelve. A további csonka HCV aminosav szekvenciák, melyek egy epitópból állnak vagy immunogének, a fent leírtak szerint azonosíthatók. A következő szekvenciákat az aminosav számok (pl. AAn) alapján adtuk meg, ahol n az adott aminosav pozíciójának száma, ahogy az a 17. ábrán is látható:

AA1-AA25; AA1-AA50; AA1-AA84; AA9-AA177; AA1-AA10; AA5-AA20; AA20-AA25; AA35-AA45; AA50-AA100; AA40-AA90; AA45-AA65; AA65-AA75; AA80-AA90; AA99-AA120; AA95-AA110; AA105-AA120; AA100-AA150; AA150-AA200; AA155-AA170; AA190-AA210; AA200-AA250; AA220-AA240; AA245-AA265; AA250-AA300; AA290-AA330; AA920-AA305; AA300-AA350; AA310-AA330; AA350-AA400; AA380-AA395; AA405-AA495; AA400-AA450; AA405-AA415; AA415-AA425; AA435-AA435; AA437-AA582; AA450-AA500; AA440-AA460; AA460-AA470; AA475-AA495; AA500-AA550; AA511-AA690; AA515-AA550; AA550-AA600; AA550-AA625; AA575-AA605; AA585-AA600; AA600-AA650; AA600-AA625; AA635-AA665; AA650-AA700; AA645-AA680; AA700-AA750; AA700-AA725; AA700-AA750; AA725-AA775; AA770-AA790; AA750-AA800; AA800-AA815; AA825-AA850; AA850-AA875; AA800-AA850; AA920-AA990; AA850-AA900; AA920-AA945; AA940-AA965; AA970-AA990; AA950-AA1000; AA1000-AA1060; AA1000-AA1025; AA1000-AA1050; AA1025-AA1040; AA1040-AA1055; AA1075-AA1175; AA1050-AA1200; AA1070-

AA1100; AA1100-AA1130; AA1140-AA1165; AA1192-AA1457; AA1195-AA1250; AA1200-AA1225; AA1225-AA1250; AA1250-AA1300; AA1260-AA1310; AA1260-AA1280; AA1266-AA1428; AA1300-AA1350; AA1290-AA1310; AA1310-AA1340; AA1345-AA1405; AA1345-AA1365; AA1350-AA1400; AA1365-AA1380; AA1380-AA1405; AA1400-AA1450; AA1450-AA1500; AA1460-AA1475; AA1475-AA1515; AA1475-AA1500; AA1500-AA1550; AA1550-AA1600; AA1515; AA1515-AA1550; AA1550-AA1600; AA1545-AA1560; AA1569-AA1931; AA1570-AA1590; AA1595-AA1610; AA1590-AA1650; AA1610-AA1645; AA1650-AA1690; AA1685-AA1770; AA1689-AA1805; AA1690-AA1720; AA1694-AA1735; AA1720-AA1745; AA1745-AA1770; AA1750-AA1800; AA1775-AA1810; AA1795-AA1850; AA1850-AA1900; AA1900-AA1950; AA1900-AA1920; AA1916-AA2021; AA1920-AA1940; AA1949-AA2124; AA1950-AA2000; AA1950-AA1985; AA1980-AA2000; AA2000-AA2050; AA2005-AA2025; AA2020-AA2045; AA2045-AA2100; AA2045-AA2070; AA2054-AA2223; AA2070-AA2100; AA2100-AA2150; AA2150-AA2200; AA2200-AA2250; AA2200-AA2325; AA2250-AA2330; AA2255-AA2270; AA2265-AA2280; AA2280-AA2290; AA2287-AA2385; AA2300-AA2350; AA2290-AA2310; AA2310-AA2330; AA2330-AA2350; AA2350-AA2400; AA2348-AA2464; AA2345-AA2415; AA2345-AA2375; AA2370-AA2410; AA2371-AA2502; AA2400-AA2450; AA2400-AA2425; AA2415-AA2450; AA2445-AA2500; AA2445-AA2475; AA2470-AA2490; AA2500-AA2550; AA2505-AA2540; AA2535-AA2560; AA2550-AA2600; AA2560-AA2580; AA2600-AA2650; AA2605-AA2620; AA2620-AA2650; AA2640-AA2660; AA2650-AA2700; AA2655-AA2670; AA2670-AA2700; AA2700-AA2750; AA2740-AA2760; AA2750-AA2800; AA2755-AA2780; AA2780-AA2830; AA2785-AA2810; AA2796-AA2886; AA2810-AA2825; AA2800-AA2850; AA2850-AA2900; AA2850-AA2860; AA2885-AA2905; AA2900-AA2950; AA2910-AA2930; AA2925-AA2950; AA2945- vég (C'-terminális).

A fenti HCV aminosav szekvenciákat mint diszkrét peptideket állíthatjuk elő, vagy egy nagyobb polipeptidbe építhetjük be és a találmányban leírtak szerint használhatók. További csonka HCV szekvenciákat tartalmazó polipeptideket a példákban adunk meg.

A feltételezett HCV poliproteinek és Flavi-vírusok megfigyelt kapcsolata néhány a HCV nem-szerkezeti (NS) fehérjéinek feltételezett doménjeire ad becslési lehetőséget. Az egyes NS fehérjék feltételezett Flavi-vírus prekursor poliproteinjeiben való elhelyezkedése egészen jól ismert. Továbbá ezek egybe esnek a poliproteinek hidrofóbítási profiljában megfigyelt erős ingadozásokkal. Megállapítottuk, hogy a Flavi-vírusok NS5-je a virion polimerázt kódolja, valamint azt, hogy

az NS1 megegyezik az állatokban hatásos vakcinának bizonyult komplementer fixációs antigénnel. Nemrégiben kimutattuk, hogy a Flavi-vírus proteáz funkció az NS3-ban található. A HCV és a Flavi-vírusok között megfigyelt hasonlóságoknak köszönhetően – a későbbiekben írjuk le – következtetéseket lehet levonni a megfelelő protein domének körülbelüli elhelyezkedésére és a HCV poliproteinben levő funkcióira. Az ezen doméneket tartalmazó polipeptidek számos rekombináns gazdasejtben pl. baktériumok, élesztőgombák, rovarok és gerincesek sejtjeiben való expressziója fontos immunológiai reagensként létrehozását kellene hogy eredményezze, melyek diagnózisokhoz, detektáláshoz és vakcinákhoz lennének használhatók.

Bár az itt leírt HCV-izolátum feltételezett poliproteinjeinek nem-szerkezeti fehérje régiói és a Flavi-vírusok között bizonyos hasonlóság látszik, kevésbé hasonlóak az N-terminális felé elhelyezkedő feltételezett szerkezeti régiókban. Ezen a területen nagy szekvenciabeli eltérés mutatkozik, továbbá a két régió hidrofób profilja is kevés hasonlóságot mutat. Ez az „eltérés” a HCV feltételezett NS1 doménjének N-terminális régiójában kezdődik és a feltételezett N-terminálisig tart. Azonban még így is lehetséges a feltételezett nukleokapszid (N-terminális alap domén) és az E (általában hidrofób) domének HCV-poliproteinben belüli körülbelüli elhelyezkedésének becslése. A Példák c. részben a becsléseket a HCV-poliprotein hidrofób profiljában megfigyelt változásokra és a Flavi-vírus proteinek elhelyezkedésének és jellemzőjének ismeretére alapoztuk. Ezen becslések alapján lehetővé válik a HCV poliproteinek azon körülbelüli régióinak azonosítása, melyek hasznos immunológiai reagensként felelhetnek meg. Például a Flavi-vírusok E és NS1 proteinjei védő vakcinákként hatékonyak ismereteseik. Ezek a régiók, akárcsak néhány, mely antigén hatásának mutatkozott az itt leírt HCV izolátumokban pl. azok, melyek a feltételezett NS3, C és NS5 stb.-n belül vannak, diagnosztikai reagensként szerepelhetnének. Továbbá a vírusban kódolt enzimek elhelyezkedése és expressziója lehetővé teszi a vírus elleni enzim inhibitorok becslését, pl. inhibitorok, melyek az enzimaktivitást gátolják annak következtében, hogy magával az enzimmel lépnek kapcsolatba, vagy olyan anyagok, melyek megakadályozzák az enzim expresszióját (pl. antisense RNS, vagy más drogok, melyek megakadályozzák az expressziót).

HCV-epitópot tartalmazó hibridrészecske-immunogén előállítás

A HCV-epitópok immunogenitása fokozható, ha emlős vagy élesztőgomba rendszerben készítjük őket, melyek fuzionáltak vagy összekapcsolódtak részecske-képző fehérjékkel, mint pl. a hepatitisz B felületi antigénnel kapcsolódtak. Azok a szerkezetek, melyekben az NANBV epitóp közvetlenül kötődik a részecske-képző fehérjét kódoló szekvenciával, hibrideket képeznek, melyek az epitópot figyelembe véve immunogén tulajdonságúak. Továbbá az összes elkészített vektor a

HBV-ra specifikus epitópokat foglal magába, melyek immunogenitása különböző mértékű, mint pl. a pre-S-peptid. Így a HCV szekvenciákat magába foglaló részecske-képző fehérjéből létrehozott részecskék immunogén tulajdonságúak a HCV-t és HBV-t figyelembe véve.

A hepatitisz felületi antigén (HBSAg) úgy tűnik, hogy részecskéket képez és részecskékhöz kötődik a *S. cerevisiae*-ben [Valenzuela et al. (1982)], akárcsak pl. emlős sejtekben [Valenzuela et al. (1984)]. Az ilyen részecskék képzése úgy tűnik fokozza a monomer alegységek immunogenitását. A szerkezetek magukba foglalhatják a felszín közeli (pre-S) régió 55 aminosavából álló HBSAg immunodomináns epitópot [Neurath et al. (1984)]. Az élesztőgombában expresszálnak pre-S-HBSAg részecskék szerkezetéről az EPO 174 444 sz. szabadalom (1986. március 19-én jelent meg) írtunk, az élesztőgombában való expresszálnak a heterológ vírus szekvenciákat tartalmazó hibrideket az EPO 175 261 sz. szabadalom (1966. március 26-án jelent meg). Ezek a szerkezetek emlős sejtekben is expresszálnak, mint pl. a kínai hörcsög ovarium sejtjeiben (CHO) egy SV40-dihidrolát reduktáz vektort használva [Michelle et al. (1984)].

Továbbá a részecske-képző fehérjét kódoló szekvencia részei helyettesíthetők egy HCV-epitópot kódoló kodonokkal. Ebben a helyettesítésben azokat a régiókat, melyek nem szükségesek az egységek egyesítésének közvetítésében, hogy élesztőgombában vagy emlősökben immunogén részecskék keletkezzenek, kihagyhatjuk, így kimaradnak további HBV-antigén hatású helyek a HCV-epitóppal való versengésből.

Vakcina készítés

Vakcinákat HCV cDNS-ből származó egy vagy több immunogén polipeptidből lehet készíteni, ide értve a Példák c. részben leírt cDNS szekvenciákat is. A HCV és Flavi-vírusok között megfigyelt homológia információt nyújt azokra a polipeptidekre vonatkozóan, melyek vakcinaként a leghatásosabbak lehetnek, akárcsak a genom azon régióiról, melyekben ezek kódoltak. A Flavi-vírus genomjának általános szerkezetét Rice et al. tárgyalják (1986). A Flavi-vírus genom RNS-at az egyetlen vírus specifikus RNS fajnak vélik, ez a – a C, az M, és az E – vírus szerkezeti fehérjévé transzlálódik, akárcsak két nagy – az NS4 és NS5 – nem-szerkezeti fehérjévé és kisebb nem-szerkezeti fehérjék egész komplex sorozatává. Ismeretes, hogy a Flavi-vírus fő neutralizáló epitópjai az E (burok-envelope) fehérjében helyezkednek el (Roehrig, 1986). Így a vakcinák a HCV E epitópokat tartalmazó rekombináns polipeptidekből állhatnak. Ezek a polipeptidek expresszálnak baktériumokban, élesztőgombákban vagy emlős sejtekben, vagy vírus készítményekből izolálhatók. Az is előre látható, hogy más szerkezeti fehérjék is tartalmazhatnak epitópokat, melyek védő hatású HCV elleni antitestek termelését idézhetik elő. Így az E, C és M epitópokat tartalmazó polipeptidek, akár külön, akár kombinációkban HCV vakcinákban használhatók.

A fentiekén túl, kimutatták, hogy az NS1-gyel (nem-szerkezeti fehérje 1) történő immunizálás a sárga

láz ellen is védelmet ad [Schlesinger et al. (1986)]. Ez még akkor is igaz, ha az immunizálás nem váltja ki a neutralizáló antitestek termelését. Így, kiváltképpen mivel ez a fehérje úgy tűnik erősen konzervált a Flavivírusok körében, úgy tűnik, hogy a HCV NS1 védő hatása lesz a HCV fertőzéssel szemben is. Továbbá úgy látszik, hogy a nem-szerkezeti fehérjék védelmet nyújthatnak a vírus patogenitással szemben, még akkor is, ha nem váltják ki a neutralizáló antitestek termelését. A HCV ORF-ek különböző régióit adó klónozott HCV cDNS-akból expresszált polipeptidok immunogenitását véve alapul, a Példák c. részben nyújtott információk becsléseket tesznek lehetővé vakcinákban való felhasználásukat illetően.

A fentieket figyelembe véve, a HCV elleni sokoldalú vakcinák egy vagy több szerkezeti fehérjéből származó egy vagy több epitópból és/vagy egy vagy több nem-szerkezeti fehérjéből származó egy vagy több epitópból állhatnak. Ezek a vakcinák pl. rekombináns HCV polipeptidektől és/vagy virionokból izolált polipeptidekből állhatnak. Bizonyos esetekben a vakcinákat úgy tervezik, hogy egy vagy több a következőkben felsorolt HCV proteinekből, vagy a belőlük származó alegység antigénekből álljanak: E, NS1, C, NS2, NS3, NS4, NS5. Különösen kedveltek azok a vakcinák, melyek E és/vagy NS1-ből, vagy ezek alegységeiből állnak.

A témában jártas szakember számára ismeretes az olyan vakcina előállítása, mely aktív alkotó részként immunogén polipeptide(ke)t tartalmaz. Leggyakrabban ezek a vakcinák injekciózható állapotban készülnek, vagy folyékony oldatokként vagy szuszpenziókként; a szilárd halmazállapotúak alkalmasak az oldatkészítésre vagy a felszuszpendálásra; injekciózás előtti folyadékot is lehet készíteni. A készítmény lehet emulgeált vagy liposzómákba zárt fehérje. Az aktív immunogén hatású alkotórész gyakran gyógyszerészetileg elfogadható és az aktív alkotórészszel összeegyeztethető kötőanyagokkal kevert. Megfelelő kötőanyagok pl. a víz, fiziológiás sóoldat, dextróz, glicerin, etanol vagy ehhez hasonló és ezek kombinációi. Továbbá, ha kívánatos a vakcina tartalmazhat kisebb mennyiségű segédanyagokat, mint pl. nedvesítő vagy emulgeáló szereket, pH pufferáló anyagokat és/vagy hatássegítő szereket, melyek a vakcina hatékonyságát erősítik. A hatásserkentő szerekre példa – de nem korlátozódik csupán ezekre –: alumínium-hidroxid, N-acetil-muramil-L-treonil-D-izoglutamin (thr-MDP), N-acetil-nor-muramil-L-alanil-D-izoglutamin (CGP, 11 637, nor-NDP-ként nevezték), N-acetil-muramil-L-alanil-D-izoglutaminil-L-alanin-2-(1',-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxi-foszforyl)-etilamin (CGP 19 835A, MTP-PE-ként nevezték) és RIBI, mely baktériumokból kivont három összetevőt tartalmaz: monofoszforyl-lipid A, trehalóz-dimikolát és sejtfalvázat (MPL+TDM+CWS) 2%-os squalene/Tween 80 emulzióban (squalene = C₃₀ szénhidrogén, mely 6 izoprén egységből áll, a koleszterol bioszintézis köztes terméke). A hatásserkentő szer hatékonyságát úgy határozhatjuk meg, ha mérjük az immunogén polipeptid ellen irányuló antitestek mennyiségét, mely polipeptid tartalmazza a különböző erősítőszere-

kekből álló vakcinában beadott ezen polipeptidból származó HCV antigén hatású szekvenciát.

A vakcinákat hagyományosan parenterálisan alkalmazzzák, injekciók révén pl. szubkután vagy intramuszkulárisan. További készítmények, melyek más módon való alkalmazást tesznek lehetővé, magukba foglalják a végbélkúpokat és néhány esetben a szájon át szedhető készítményeket. Végbélkúpokhoz a hagyományos kötő- és hordozó anyagok lehetnek pl. a polialkilén-glikolok vagy trigliceridek; az ilyen végbélkúpok olyan keverékekből állhatnak, melyek az aktív alkotórészt 0,5%–10%, előnyösebben 1–2%-ban tartalmazzák. A szájon át szedhető készítmények olyan hagyományos alkalmazású kötőanyagokat tartalmazhatnak, mint a gyógyszerészeti tisztaságú mannit, laktóz, keményítő, magnézium-sztearát, nátrium-szacharin, cellulóz, magnézium-karbonát és hasonló. Ezek az alkotórészek oldatok, szuszpenziók, tabletták, pirulák, kapszulák, lassan kiszabaduló készítmények vagy porok alakjában léteznek és aktív alkotórészt 10–95%-ban, előnyösen 25–70%-ban tartalmazzák.

A vakcinákhoz a fehérjéket neutrális vagy só alakjában formulázzák. A gyógyszerészetileg elfogadható sók magukba foglalják a savaddíciós sókat (a peptid szabad aminosavjaival képzett) és azokat, melyeket szerves savakkal hozunk létre, mint pl. a hidrogénklorid vagy foszforsav, vagy olyan szerves savakkal, mint az ecetsav, oxálsav, borostyánkősav, maleinsav és a hasonló. A szabad karboxil-csoportokkal előállított sók származhatnak szerves bázisokból, mint pl. a nátrium-, kálium-, ammónium-, kalcium- és vashidroxidok és olyan szerves bázisokból, mint az izopropilamin, trimetilamin, 2-etilamino-etanol, hisztidin, novokain és a hasonló.

35 A vakcinák adagolása és alkalmazása

A vakcinák adagolása oly módon történik, hogy az megfelelő az adagolt készítménynek és olyan mennyiségben, mely profilaktikusan és/vagy terápiásan hatékony. Az alkalmazandó mennyiség, mely általában 5–250 mikrogramm antigén per adag mennyiséget jelent, a kezelendő alanytól, az alany immunrendszerének antitest szintetizáló kapacitásától és a kívánt védetség mértékétől függ. Az alkalmazni kívánt aktív alkotórészek pontos mennyisége az alkalmazó orvos elbírálásától függhet és egyénenként változhat.

A vakcina adagolása egyszeri dózisadagolásban, vagy többszörös dózisadagolásban történhet. A többszörös dózisadagolás olyan, melyben az első vakcinás kezelés 1–10 különálló dózist jelenthet, melyet több egymást követő időintervallumban történő dózisadagolás követ, hogy a kívánt immunválaszt fenntartsák és megerősítsék. Például 1–4 hónap után következik a második dózis és ha szükséges további dózis(ok) néhány hónap elteltével. A dózisadagolást legalább részben az egyén igényei szerint határozzák meg és az alkalmazó orvos ítéletétől függ.

Továbbá az immunogén hatású HCV-antigén(ek)e)t tartalmazó vakcinák együttesen alkalmazhatók más immunregulációs anyagokkal pl. immunoglobulinokkal.

HCV-epitópok elleni antitestek készítése

A fent leírt módon készített immunogén polipeptid-ek mind poliklonális, mind monoklonális antitestek termelésére használatosak. Ha poliklonális antitest előállítása a cél, egy szelektált emlőst (pl. egeret, nyulat, kecskét, lovat stb.) immunizálnak a HCV-epitópo(ka)t hordozó immunogén polipeptiddel. Az immunizált állatokból a szérumot összegyűjtik és ismert eljárások szerint kezelik. Ha egy HCV-epitóp elleni poliklonális antitesteket tartalmazó szérum más antigének elleni antitesteket is tartalmaz, a poliklonális antitestek immunoaffinitási-kromatográfiával tisztíthatók. A poliklonális antiszérum előállítási és feldolgozási technikái ismertek, lásd pl. Mayer és Walker (1987) munkáját.

Másik megoldásként, poliklonális antitestek izolálhatók olyan emlősből, melyet korábban HCV-val fertőztek. Az EPO Pub. No. 318 216 sz. szabadalomban található egy példa a fertőzött egyedből vett szérumból származó HCV-epitópok elleni antitestek tisztítási módszerére, mely az affinitás-kromatográfián alapul és SOD fúziós polipeptidet és egy cDNS-5-1-1 klónban kódolt polipeptidet használ.

A HCV-epitópok ellen irányuló monoklonális antitestek szintén könnyen előállíthatók a témában jártas szakember számára. Jól ismert a hibridómákkal készített monoklonális antitest előállítás általános módszertana. Folyamatos antitest termelő sejtvonalakat lehet előállítani sejtfúzióval és más olyan technikákkal, mint pl. a B-limfociták onkogén hatású DNS-val történő direkt transzformációjával vagy Epstein-Barr-vírussal való transzfekeció révén. Lásd pl. M. Schreier et al. (1980); Hammerling et al. (1981); Kennett et al. (1980) munkáit; valamint a következő számú szabadalmakat: U. S. Patent 4 341 761; 4 399 121; 4 427 783; 4 444 887; 4 466 917; 4 472 500; 4 491 632; 4 493 890. A HCV-epitópok ellen készített monoklonális antitestek paneljeit számos tulajdonságra lehet szkrinálni, pl. izotípusra, epitóp affinitásra stb.

A HCV-epitópok ellen irányuló akár monoklonális, akár poliklonális antitestek, különösen használhatóak diagnózisban és a neutralizálók a passzív immunoterápiában. Különösen a monoklonális antitestek anti-idio-típusú antitestek termelésének kiváltására használhatók.

Az anti-idio-típusú antitestek olyan immunoglobulinok, melyek a fertőző ágens antigénjének egy „belső image”-t hordozzák, mely ellen a védekezést tervezik. Lásd pl. Nisonoff, A., et al. (1981) és Dreesman et al. (1985) munkáit.

Az anti-idio-típusú antitestek termelésére ismertek a technikák. Lásd pl. Grzych (1985), MacNamara et al. (1984) és Uytdehaag et al. (1985) munkáit. Ezek az anti-idio-típusú antitestek az NANBH kezelésére és/vagy diagnózisra használhatóak, akárcsak a HCV-antigének immunogén régióinak tisztázására.

A témában átlagosan jártas szakember felismerné azt is, hogy számos a HCV-epitópok ellen irányuló antitest típus termelhető. Ahogy a találmányban alkalmazzuk, az „antitest” olyan polipeptidre vagy polipeptidek csoportjára vonatkozik, melyek legalább egy antitest kötési hellyel rendelkeznek. Az „antitest kötési

hely” vagy „kötő domén” az antitest molekula(k) változó doménjeinek összecsavarodása révén keletkezik, hogy 3-dimenziós kötési helyek jöjjenek létre egy belső felületi alakkal és töltés eloszlással, melyek komplexmenterek egy antigén epitóp tulajdonságaival. Ez teszi lehetővé az antigénnel való immunológiai reakciót. Az antitest kötési hely kialakulhat nehéz és/vagy könnyű láncú doménből (VH és VL, megfelelően), mely hiperváltozókonny hurkokat képez, melyek elősegítik az antigén kötés létrejöttét. Az „antitest” fogalma magába foglalja pl. a gerincesek antitestjeit, a hibrid antitesteket, a kimér-antitesteket, a megváltozott antitesteket, az univalens antitesteket, a FAB-proteineket és az egyesdoménű antitesteket.

Az „egyesdoménű antitest” (dAb) olyan antitest, mely egy olyan VH doménből áll, mely immunológilag reagál egy kijelölt antigénnel. A dAb nem tartalmaz VL domént, de tartalmazhat más olyan antigén-kötő doméneket, melyek antitestekben való létezése ismert, pl. a kappa- és a lambda-doméneket. A szakember számára ismertek a dAb előállítás módszerei. Lásd pl. Ward et al. (1989) munkáját.

Az antitestek szintén állhatnak VH és VL doménekből, akárcsak más ismert antigén-kötő doménekből. Az ilyen típusú antigénekre példák és ezek előállítási módszerei ismertek (lásd pl. U. A. Patent No. 4 816 467, mely a referenciában megtalálható) és a következőket foglalják magukba. Például a „gerincesek antitestjei” fogalom olyan antitestekre vonatkozik, melyek ezek tetramerjei vagy aggregátumai, könnyű és nehéz láncokból állnak és általában Y-konfigurációvá aggregálódnak. Lehet kovalens kötés a láncok között, de hiányozhat is. A gerincesek antitestjeiben egy kiemelt antitest összes láncának aminosav-szekvenciája homológ azokkal a láncokkal, melyet egy limfocita által termelt antitestben találtak. Ez a limfocita termeli azt az antitestet in situ, vagy in vitro (pl. hibridómákban). A gerincesek antitestjei tipikusan natív antitesteket foglalnak magukba, pl. tisztított poliklonális antitesteket és monoklonális antitesteket. Az ezen antitestek előállítására szolgáló módszerekre példákat később mutatunk be.

A „hibrid antitestek” olyan antitestek, melyekben egy nehéz és könnyű láncból álló pár homológ az első antitestben található, míg a második nehéz és könnyű láncból álló pár egy eltérő második antitestben levővel homológ. Tipikusan e két pár mindegyike különböző epitópokat fog kötni, külön-külön eltérő antigénekre. Ez a „kétvegyértékűség” tulajdonságát eredményezi, azaz két antigén szimultán kötésének képességét. Az ilyen hibridek kimér láncok használatával is kialakíthatók, ahogy azt korábban említettük.

A „kimér antitestek” olyan antitestek, melyekben a nehéz és/vagy könnyű láncok fúziós proteinek. Tipikusan a láncok konstans doménje egy meghatározott fajból és/vagy osztályból származik és a változó domének egy másiktól. Magába foglal olyan bármely antitestet is, melyben akár csak a nehéz vagy a könnyű láncok, vagy mindkettő olyan szekvenciák kombinációjából tevődik össze, melyek másolatai a különböző források-

ból származó antitestek szekvenciáinak, függetlenül attól, hogy ezek a források eltérő osztályokból vagy fajokból származnak-e, valamint, hogy a fúziós pont a változó/konstans határán van-e vagy sem. Így lehetőség van olyan antitestek előállítására, melyekben sem a konstans, sem a változó régiók nem másolnak ismert antitest szekvenciákat. Így azután lehetőség van pl. olyan antitestek létrehozására, melyek változó régiójának nagyobb specifikus affinitása van egy meghatározott antigénre, vagy melyek konstans régiója előidézhethet fokozott komplement-fixációt, vagy egy meghatározott konstans régió tulajdonságában lehet fejlesztéseket létrehozni.

Másik példa a „megváltozott antitestek” példája, mely olyan antitestekre vonatkozik, melyekben a gerincesek antitestjében természetesen előforduló aminosav-szekvencia megváltozott. Rekombináns DNS-technikákat alkalmazva az antitesteket újra lehet szerkeszteni, hogy a kívánt tulajdonságokat elérjük. A lehetséges variációk száma rengeteg, egy vagy több aminosav változtatásától a régió teljes újra szerkesztéséig pl. a konstans régióig terjedhet. A konstans régióban történő változások általában azt a célt szolgálják, hogy elérjük a kívánt sejtfolyamat tulajdonságokat, azaz a komplement-fixálásban változásokat, membránokkal való interakciókat és más effektor funkciókat. A változó régióban bekövetkező változásokat az antigén-kötő tulajdonságok megváltoztatása céljából lehet elvégezni. Az antitest olyan célból is létre hozható, hogy segítse a molekula vagy anyagok specifikus szállítását egy specifikus sejthez vagy szöveti területre. A kívánt változtatásokat a molekuláris biológiában ismert technikákkal lehet elvégezni, pl. rekombináns technikával, helyre irányított mutagenézissel stb.

Egy másik példa az „univalens antitestek” példája, mely olyan aggregátumokból áll, ahol a nehéz láncú/könnyű láncú-dimer egy második nehéz lánc Fc (azaz konstans)-régiójához kötődik. Az ilyen típusú antitest elkerüli az antigén mutációt. Lásd pl. Glennie et al. (1982) munkáját.

Az antitestek definíciójába tartoznak az antitestek „Fab” fragmentumai is. A „Fab” régió a nehéz és könnyű láncok azon részeire vonatkozik, melyek durván megegyeznek, vagy analógok azokkal a szekvenciákkal, melyek a nehéz és könnyű láncok ágainak részeiből állnak és melyekről kimutatták, hogy egy megjelölt antigénnel immunológiai kötést hoznak létre, de amelyekből hiányzik az effektor-Fc-rész. A „Fab” magába foglalja egy nehéz és egy könnyű lánc aggregátumait (általában Fab'-ként ismert), akár csak a 2H és 2L láncokat tartalmazó tetramereket (F[ab]₂-ként jelölt), melyek képesek a kijelölt antigénnel vagy antigén-családdal szelektíven reagálni. A „Fab”-antitesteket alegységekre lehet osztani, melyek analógok a fent leírtakkal azaz „gerinces Fab”, „hibrid Fab”, „kimér Fab” és „megváltozott Fab”. Az antitestek „Fab”-fragmentjeinek előállítására szolgáló módszerek ismertek, ide tartoznak pl. a proteolízis és a rekombináns technikával való szintézis.

Diagnosztikai oligonukleotid-próbák és kitek

Az izolált HCV cDNS-jainak leírt részeit véve alapul, megközelítően 8 vagy több nukleotidból álló oligomereket lehet előállítani, akár kimetszéssel, akár szintetikus úton, melyek hibridizálnak a HCV genommal és melyek a vírus ágensek azonosításában, a vírus genom(ok) további jellemzésében és beteg egyedekben a vírus(ok) detektálásában használhatók. A HCV polinukleotidok (természetes vagy származtatott) próbái olyan hosszúságúak, melyek lehetővé teszik a jellemző vírus szekvenciák hibridizációval történő detektálását. Míg a 6–8 nukleotid már munkaképes hosszúságú, kedveltebbek a 10–12 nukleotidból álló szekvenciák és a kb. 20 nukleotidból álló tűnik optimálisnak. Előnyösen ezek a szekvenciák olyan régiókból származnak, melyek nem rendelkeznek heterogenitással. Ezek a próbák rutin módszerek alkalmazásával előállíthatók, ide értve az automatizált oligonukleotid szintetikus módszert. A használható próbák között vannak pl. olyanok, melyek az itt leírt új, izolált klónokból származnak, vagy a korábban említett cDNS-könyvtárak próbálásában használható különböző oligomerek. A HCV-genom bármely jellemző részéhez egy komplementer kielégítő lehet. A próbaként való alkalmazáshoz a teljes komplementaritás a kívánatos, bár ez nem feltétlenül szükséges, ha a fragmentum hosszúsága nő.

Az ilyen próbák diagnosztikumokként való használatához a vizsgálandó biológiai mintákat, mint pl. a vért, vagy szérumot kezelni lehet, ha ez kívánatos, hogy a bennük levő nukleinsavakat kivonjuk. A mintából származó kinyert nukleinsavat gélelektroforézisnek, vagy más méreten alapuló szeparációs technikának vethetjük alá, vagy a nukleinsav minta pontszűrésnek vethető alá a méret-szeparáció elhagyásával. Ezután a próbákat jelöljük. Megfelelő jelölések és a próbák jelölésének módszerei ismertek, ide tartoznak pl. a „nick”-transzlációval beültetett radioaktív nyomjelzők vagy a kinázolás, biotin, fluoreszcensz próbák és a kemilumineszcensz próbák. A mintákból kivont nukleinsavakat ezután megfelelő szigorúságú hibridizációs feltételek mellett a jelölt próbákkal kezeljük és a próbákat tartalmazó polinukleotid duplexeket detektáljuk.

A próbák úgy is készíthetők, hogy teljesen komplementerek a HCV-genommal. Ezért általában az igen szigorú feltételek biztosítása a kívánatos ahhoz, hogy elkerüljük a hamis pozitívokat. Azonban a nagyon szigorú feltételek csak olyan esetekben alkalmazandók, ha a próbák komplementerek olyan vírus genommal, mely nem mutat heterogenitást. A hibridizáció szigorúságát számos tényező határozza meg a hibridizáció és a mosási eljárás során. Ilyenek a hőmérséklet, az ione-rősség, az időtartam és a formamid-koncentráció. Ezeket a tényezőket pl. Maniatis, T. (1982) munkája foglalja össze.

Általában azt várjuk, hogy a HCV genom-szekvenciák relatíve alacsony szinten lesznek jelen a fertőzött egyes szérumában: megközelítően 10²–10³ csimpánz fertőző dózis (CID)/ml mennyiségben. Ez a szint megkívánja, hogy kiegészítő technikákat használjunk a hibridizációs eljárásban. Az ilyen technikák ismertek a

tudomány számára. Például az Enzo Biochemical Corporation „BioBridge” rendszer terminális dezoxinukleotid-transzferázt használ, hogy a módosítás nélküli 3'-poli-dT-farkakat a DNS próbához adja. A poli-dT-farkú próbát a cél nukleotid-szekvenciához hibridizálják, majd egy biotin-módosított poli-A-hoz. A PCT 84/03 520. bejelentés és az EPA 124 221 sz. szabadalom egy olyan DNS hibridizációs eljárást ír le, melyben: (1) analitot hibridizálnak (anneál = kettősszálú nukleinsavak rekonstruálása egyes szálból) egy egy-
szálú DNS próbához, amely komplementer egy enzim-jelölt oligonukleotiddal; és (2) az így kapott farokkal ellátott duplex hibridizálódik egy enzim-jelölt oligonukleotidhoz. Az EPA 204 510. sz. szabadalom leír egy olyan DNS hibridizációs eljárást, melyben analit-DNS-at hoznak össze egy farokkal (mint pl. a poli-dT farokkal) rendelkező próbával, egy segítő szállal, melynek olyan szekvenciája van, amely hibridizálódik a próba farkához, mint pl. a poli-A szekvencia és amely képes kötni számos jelölt szálat. A különösen kíváncsú technika először magába foglalja a cél HCV-szekvenciák szérumban való kb. 10 000-szeres megsokszorozását, pl. kb. 10⁶ szekvencia/ml mennyiségre. Ezt követi pl. a polimeráz lánc reakciós (PCR) technika, melyet Saiki et al. (1986), Mullis (U. S. Patent No. 4 683 195) és mullis et al. (U. S. Patent No. 4 683 202) írtak le. Az amplifikált szekvenciá(k)at ezután olyan hibridizációs eljárásokkal lehet detektálni, melyek az EP 317 077 sz. szabadalomban kerültek leírásra (1989. május 24-én közzétett). Ezek a hibridizációs eljárások, melyek a szekvenciákat 10⁶ ml szinten kellene, hogy kimutassák, olyan nukleinsav-multimereket alkalmaznak, melyek egyszálú analit-nukleinsavhoz kötődnek és melyek számos egyszálú jelölt oligonukleotidhoz is kötődnek. Egy megfelelő oldat-fázisú szendvics-eljárás, mely a jelölt nukleotid próbákkal használható és a próbák előállításának módszerei az 1987. június 16-án közölt EPO 225 807. sz. szabadalomban kerültek leírásra.

A próbákat diagnosztikai kitekbe lehet csomagolni. A diagnosztikai kit tartalmazza a próba-DNS-at, mely lehet jelölt vagy nem-jelölt és a kitben szeparált tartóban vannak a jelölő alkotórészek. A kit tartalmazhat más megfelelően csomagolt reagenst, vagy anyagot, melyekre szükség van az adott hibridizációs folyamatok elvégzéséhez, pl. standardokat vagy a teszt elvégzéséhez instrukciókat.

Immunovizsgálat és diagnosztikai kitek

Mind az olyan polipeptidek, melyek a HCV-antitesteket tartalmazó szérummal immunológiailag reagálnak, pl. azok, melyeket a Példák c. részben a későbbiekben leírt antigén szkrinelési módszerrel detektáltak, mind azok, melyek a Példák c. részben leírt izolált klónokból származnak vagy azokban kódoltak és ezek összetevői és az ezekben a polipeptidekben levő HCV-specifikus epitópok ellen termelt antitestek alkalmazhatók az immunovizsgálatban a HCV-antitestek jelenlétének detektálására, vagy a biológiai mintákban a vírus és/vagy a vírus-antigének jelenlétének kimutatására. Az immunovizsgálat elvégzése számos variációt

foglalhat magába, melyek közül jó néhány ismert. Például az immunovizsgálat alkalmazhat egy vírus-epitópot, vagy használhatja az ezen forrásokból származó vírus-epitópok kombinációit; ezek az epitópok származhatnak ugyanabból vagy más vírus polipeptidekből és lehetnek az elkülönült rekombináns vagy természetes polipeptidekben, vagy együtt ugyanabban a rekombináns polipeptidben. Alkalmazhat pl. egy vírus-epitóp ellen irányuló monoklonális antitestet, egy vírus-antigén epitópja ellen irányuló monoklonális antitestek kombinációit, különböző vírus-antigének epitópja ellen irányuló monoklonális antitesteket, ugyanazon vírus-antigén ellen irányuló poliklonális antitesteket, vagy különböző vírus-antigének ellen irányuló poliklonális antitesteket. A protokoll alapulhat pl. kompetíci-
10 ón, vagy direkt reakción, vagy szendvics-típusú vizsgálaton. A protokoll pl. alkalmazhat szilárd támasztékot, vagy végezhető immunoprecipitációval. A legújabb eljárásban alkalmaznak jelölt antitestet vagy polipeptidet; a jelölő anyagok lehetnek pl. fluoreszcensz, kemilumineszcensz, radioaktív anyagok vagy festékmolekulák. Ismertek olyan eljárások, melyek kiegészítik a próbák szignáljait; ilyenek azok a vizsgálatok, melyek biotint, avidint alkalmaznak és enzim-jelölt és mediált immunovizsgálatokat, mint pl. az ELISA módszert.

Feltételezett poliproteinek néhány antigén régióját feltérképezték és azonosították a poliprotein részei közötti HCV cDNS-ak bakteriális expressziós termékének antigenitását szkrinelve. Lásd a Példák c. részt. A HCV más antigén hatású régióit a más expressziós rendszerekben levő HCV cDNS-ak részeinek expressziójával lehet detektálni. Ezek az expressziós rendszerek magukba foglalják az élesztőgomba rendszereket és a rovarokból és gerincesekből származó sejtszisztemeket. Továbbá tanulmányokat végeztek, melyek felfedik az antigenitási indexet és a hidrofób-
30 itási/hidrofilitási profilt, és egy régió feltételezett antigenitásával kapcsolatos információkat adnak.

A HCV cDNS-ak expressziójával végrehajtott antigén feltérképezésére irányuló vizsgálatok azt mutatták, hogy számos klón, mely tartalmazza ezeket a cDNS-akat, olyan polipeptideket expresszált, melyek immunológiailag aktívak voltak az NANBH-szel fertőzött egyedekből származó szérummal szemben. Nem volt egyetlen polipeptid sem, mely immunológiailag aktív lett volna az összes szérummal. Ezen polipeptidek közül 5 erősen immunogén volt, ami abban nyilvánult meg, hogy az ezen polipeptidekben levő HCV-epitópok elleni antitesteket számos különböző beteg szérumában detektálták, bár a detektálásban átfedés nem volt teljes. Így a különböző klónokban kódolt polipeptidek immuno-
40 genitási eredményei alapján az javasolható, hogy az eredményes detektálási rendszerek tartalmazzák az epitóp „panelek” használatát. A „panelben” levő epitópok beépíthetők egy vagy több polipeptidbe.

Az immunodiagnózisra alkalmas kitek, melyek tartalmazzák a megfelelő jelölt reagenst, úgy készülnek, hogy becsomagolják a megfelelő anyagokat – beleértve a találmány szerinti HCV-epitópokat vagy HCV-epitópok ellen irányuló antitesteket tartalmazó polipep-
60

tideket – megfelelő tartókba, a fennmaradó reagensekkel és a vizsgálat elvégzéséhez szükséges anyagokkal és a megfelelő vizsgálati instrukciókkal együtt.

A HCV-genom, virionok és vírus ágensek további jellemzése a vírus genomhoz való cDNS-ből származó próbák alkalmazásával

A Példák c. részben leírt újonnan izolált klónokban levő HCV cDNS szekvenciáról szóló információk felhasználhatók a HCV-genom szekvenciájára vonatkozó további információk szerzésére és a HCV ágensek azonosítására és izolálására, így segítséget adnak annak jellemzésében, beleértve a genom tulajdonságát, a vírus részecskék szerkezetét és az antigének természetét, melyekből áll. Így viszont az információ további polinukleotid-próbákat, a HCV-genomból származó polipeptideket és a HCV-epitópok ellen irányuló antitesteket eredményez, melyek hasznosak lehetnek az NANBH-t okozó HCV diagnózisában és/vagy kezelésében.

A fent említett klónok cDNS szekvenciájáról szóló információk hasznosak a további cDNS szekvenciák izolálására szolgáló próbák megszerkesztésében. Ezek a szekvenciák az eddig nem azonosított HCV-genom régiókból származnak, melyekből a klónokban levő cDNS-ak származnak. Ezeket itt és az EPO 316 218 sz. szabadalomban írtuk le. Például a megközelítően 8 vagy több, előnyösen 20 vagy több nukleotidból álló a 17. ábrán bemutatott összetett HCV cDNS szekvencia 5'- vagy 3'-terminusaihoz közel levő régiókból származó szekvenciát tartalmazó jelölt próba a HCV cDNS-könyvtárakból való átfedő cDNS szekvenciák izolálására használható. Másik lehetőség, a genom-szegmensek jellemzése a tisztított HCV-részecskéből izolált vírus genomból végezhető el. A HCV-részecskék tisztításának módszereit és a tisztítási eljárás alatti detektálásuk módszereit a későbbiekben adjuk meg. A vírus részecskéből történő polinukleotid-genomok izolálásának eljárási módszere ismert a tudomány számára, egy alkalmazható eljárás leírása az EPO 218 316 sz. szabadalomban található. Az izolált genom-szegmensek ezután klónozhatók és szekventálhatók. Erre a technikára egy példát, mely a klónozendó szekvenciák amplifikálását használja, a későbbiekben adunk és ez a 16jh klónt eredményezi.

A cDNS-könyvtárak létrehozásának módszerei ismeretesek és az előzőekben és a későbbiekben is tárgyalásra kerültek, ill. kerülnek; a lambda-gt11-ben történő HCV cDNS-könyvtárak létrehozásának módszerét az EPO Pub. No. 318 216 sz. szabadalom tárgyalja. Azonban a cDNS-könyvtárak, melyek a nukleinsav-próbákkal való szkrinelésre alkalmasak, létrehozhatók más a tudomány számára ismert vektorokban is pl. a lambda-gt10-ben [Huynh et al. (1985)].

A HCV elleni, antivirális anyagokra való szkrinelés

A sejtenyészetek és állati modell-rendszerek HCV-ra való elérhetősége lehetővé teszi a HCV-replikációt gátló, vírusellenes ágensekre történő szkrinelést, különösen az olyan anyagokra történő szkrinelést, melyek

előnyösen engedik a sejtnövekedést és -szaporodást, míg a vírus-replikációt gátolják. Ezek a szkrinelési módszerek ismertek a témában jártas szakemberek számára. Általában a vírus-elleni anyagot különböző koncentrációban teszteljük a sejtenyészetben való vírus-replikációra kifejtett hatására – mely sejtenyészet a vírus-replikációt segíti elő – majd az állati modell-rendszerben a vírus fertőzésének vagy patogénitásának gátlására (és a toxicitás alacsony szintjére).

A HCV-antigének és HCV-polinukleotidok detektálására szolgáló itt leírt módszerek és összeállítások hasznosak a vírus-elleni anyagok szkrinelésében abban, hogy egy másik lehetőséget és talán egy érzékenyebb módszert adnak az anyagok vírus-replikációra kifejtett hatásainak detektálásában, mint a sejt-tarfoltmódszer vagy az ID₅₀-vizsgálat. Például az itt leírt HCV-polinukleotid-próbák a sejtenyészetben termelt vírus-nukleinsav mennyiségének becslésére használhatók. Ezt követheti pl. a fertőzött sejt-nukleinsavak jelölt HCV-polinukleotid-próbával való hibridizációja, vagy kompetíciós hibridizációja. Például a HCV elleni antitestek a sejtenyészetekben levő HCV-antigén(ek) azonosítására vagy mennyiségi becslésére használhatók az itt leírt immunvizsgálatot használva. Továbbá, mivel kívánatos lehet a fertőzött sejtenyészetekben levő HCV-antigének mennyiségi meghatározása kompetíciós vizsgálattal, az itt leírt HCV cDNS-akban kódolt polipeptidek hasznosak ezekben a kompetíciós vizsgálatokban. Általában a HCV cDNS-ből származó rekombináns HCV-polipeptid jelölve kellene legyen és ezen jelölt polipeptid egy HCV-polipeptidhez való kötődésének gátlását a sejtenyészet rendszerben való antigén-termelés következtében figyelemmel kellene kísérni. Továbbá ezek a technikák különösen hasznosak olyan esetekben, ahol a HCV replikálódhat a sejtvonalban anélkül, hogy a sejt pusztulását okozná.

A vírus-elleni ágense, melyek hatékonyságukra tesztelhetők ezen módszerekkel, ismertek és magukba foglalják pl. azokat az ágenseket, melyek kapcsolatba lépnek olyan virion komponensekkel és/vagy sejt-komponensekkel, melyek szükségesek a vírus kötődéséhez és/vagy replikációjához. A tipikus vírus-elleni anyagok közé tartoznak pl. a virion-polimeráz és/vagy -proteáz(ok) inhibitorai, melyek szükségesek a prekursor polipeptidek hasításához. Más vírus-elleni ágensek közé olyan ágensek tartoznak, melyek nukleinsavakkal reagálnak azért, hogy megelőzzék a vírus replikációját, pl. ilyenek az „anti-sense” polinukleotidok stb.

Az „anti-sense” polinukleotid molekulák egy olyan komplementer nukleotid-szekvenciából állnak, melyek lehetővé teszik számukra, hogy hibridizáljanak különösen a genom kijelölt régióival, vagy az RNS-akkal. Az „anti-sense” polinukleotidok magukba foglalhatnak pl. olyan molekulákat, melyek blokkolni fogják a protein-transztlációt az mRNS-hoz való kötődés révén, vagy olyan molekulákat, melyek a transzkriptáz révén akadályozzák meg a vírus-RNS replikációját. Magukba foglalhatnak olyan molekulákat is, melyek olyan ágenseket hordoznak (nem kovalens kötéssel csatolt vagy kovalensen csatolt), melynek a vírus-RNS inaktivitását

okozzák pl. a vírus-RNS-on való szakadások révén. Kötődhetnek olyan sejt-polinukleotidokhoz, melyek erősítik és/vagy szükségesek a vírus fertőzéshez, a replikációs képességhez vagy a krónikussághoz.

A HCV eredetű RNS-akhoz hibridizálódó „anti-sense” molekulák az itt nyújtott HCV cDNS-ak szekvencia információira alapozva szerkeszthetők meg. A vírus-elleni ágensek a HCV-elleni „anti-sense”-polinukleotidokra alapozva szerkeszthetők meg úgy, hogy nagy specifitással kötődjenek, megnövekedett oldékonyság jellemezze őket, stabilak legyenek és kicsi legyen a toxicitásuk. Ezután specializált rendszerekben szállíthatók pl. liposzómákban, vagy gén-terápiával. Továbbá tartalmazhatnak analógokat, csatolt proteinek és a bázisok között helyettesített vagy változtatott kötések stb.

Más típusú drogok olyan polinukleotidokra alapozhatók, melyek a HCV-genom fontos szabályozó régióit másolják és melyek terápiás hatásuk lehetnek a vírus fertőzőképességért vagy replikációért felelős rendszer kulcsalkotóival való interakcióinak következtében.

Általános módszerek

A vírusból való genom kinyerésének, a cDNS-könyvtár készítésének és próbával való vizsgálatának, klónok szekvenálásának, expressziós vektorok létrehozásának, sejtek transzformálásának, olyan immunológiai vizsgálatok elvégzésének, mint pl. a radioimmuvizsgálat és az ELISA vizsgálat, sejtek tenyésztésben való szaporításának és az ehhez hasonló általános technikái ismertek és laboratóriumi kézikönyvek szerkeszthetők be, melyek ezen technikák leírásait tartalmazzák. Azonban egy általános vezetőként bemutatunk a következőkben néhány jelenleg elérhető forrást az ilyen eljárásokról és anyagokról, melyekre ezen eljárások elvégzéséhez szükség van.

Mind prokarióta, mind eukarióta gazdasejtek használhatók a kívánt kódoló szekvenciák expressziójához, ha olyan megfelelő szabályozó szekvenciákat használunk, melyek kompatibilisek a kijelölt gazdával. A prokarióta gazdák közül az *E. coli* a leggyakrabban alkalmazott. A prokarióták expressziós kontroll szekvenciái tartalmaznak promótereket, tetszés szerint tartalmazva operátor-részeket és riboszóma kötőhelyeket. A prokarióta gazdákkal kompatibilis transzfer vektorok általában pl. a pBR322-ből származnak, egy az ampicillin- és a tetraciklin-rezisztenciát biztosító operonokat tartalmazó plazmidból és a különböző pUC vektorokból, melyek szintén tartalmaznak olyan szekvenciákat, melyek antibiotikum rezisztencia markereket hordoznak. Ezek a markerek szelekcióval történő sikeres transzformások nyelésére használhatók. Az általában alkalmazott prokarióta szabályozó szekvenciák magukba foglalják a béta-laktamázt (penicillinázt) és a laktóz promóter rendszereket [Chang et al. (1977)], a triptofán (trp) promóter rendszert [Goeddel et al. (1980)], a lambda eredetű P_L promótert és az N-gén riboszóma kötési helyet [Shimatake et al. (1981)] s a hibrid *tac* promótert [De Boer et al. (1983)], mely a *trp* és *lac* UV5 promóterek szekvenciáiból származnak. Az előbb

említett rendszerek különösen kompatibilisek az *E. coli*-al; ha kívánatos, más prokarióta gazdák, mint pl. *Bacillus* vagy *Pseudomonas* törzsek is használhatók hasonló kontroll szekvenciákkal.

Az eukarióta gazdák közé tartoznak a tenyésztési rendszerekben levő élesztőgomba és emlős sejtek. A *Saccharomyces cerevisiae* és a *Saccharomyces carlsbergensis* a leggyakrabban alkalmazott élesztőgomba gazdák és kényelmes fonalasgomba gazdák. Az élesztőgomba kompatibilis vektorok olyan markereket hordoznak, melyek lehetővé teszik sikeres transzformációk szelekcióját, prototrófiát adva az auxotróf mutánsoknak, vagy nehézfémekkel szembeni rezisztenciát a vad törzseknek. Az élesztőgomba kompatibilis vektorok felhasználhatják a replikáció 2 mikron eredetét [Broach et al. (1983)], a CEN3 és ARS1 kombinációt, vagy más olyan eszközöket, a replikáció biztosításához, mint pl. olyan szekvenciákat, melyek egy megfelelő fragmens gazdasejt genomjába való beépülését fogják eredményezni. Az élesztőgomba vektorok szabályozó szekvenciái ismertek és tartalmaznak a glikolitikus enzimek szintéziséhez promótereket [Hess et al. (1968)], [Holland et al. (1978)], ide értve a 3-foszfoglucérát-kináz promóterjét [Hitzeman (1980)]. Terminátorok is ide tartozhatnak, mint pl. azok, melyek az enoláz génből származnak [Holland (1981)]. Különösen használható kontroll rendszerek azok, melyek tartalmazzák a gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) promótert, vagy az alkohol dehidrogenáz (ADH) szabályozó promótert, a GAPDH-ből származó terminátorokat és ha szekréción kívánatos, az élesztőgomba alfa-faktorából származó vezető szekvenciát. Továbbá a működőképesen kapcsolt transzkripció regulációs régió és a transzkripció iniciátor régiók olyanok lehetnek, hogy nem természetesen csatoltak a vad típusú szervezetben. Ezeket a rendszereket részletesen leírva a következő szabadalmakban találhatjuk meg: EPO 120 551, 1984. október 3-án jelent meg, EPO 116 201, 1984. augusztus 22-én jelent meg és EPO 164 556, 1985. december 18-án jelent meg. Ezek mindegyikét engedélyezték a jelen találmány engedélyezettjének és ezek a referencia részben megtalálhatók.

Az expresszióhoz való emlős sejtvonalak, mint gazdák elérhetők és ismertek és tartalmaznak sok olyan folyamatos termelésű sejtvonalat, melyek az American Type Culture Collection (ATCC)-től szerezhetők be. Ezek közé tartoznak a HeLa-sejtek, a kínai hörcsög ovárium sejtek (CHO), a hörcsög újszülött vesesejtek (BHK) és számos más sejtvonal. Emlős sejtek megfelelő promóterei szintén ismertek, ide tartoznak az olyan vírus promóterek, mint azok, amelyek a Simian Virus 40-ből (SV40) [Fiers (1978)], a Rous-szarkóma-vírusból (RSV), az adenovírusból (ADV) és a szarvasmarha papilloma-vírusból (BPV) valók. Az emlős sejtek szintén igényelhetnek terminátor szekvenciákat és poli-A adalék szekvenciákat; olyan erősítő szekvenciák, melyek növelik az expressziót, szintén idetartozhatnak és szekvenciák, melyek a gén amplifikálását okozzák szintén kívánatosak lehetnek. Ezek a szekvenciák is

mertek a szakterületen. Vektorok, melyek alkalmasak az emlős sejtekben való replikációra magukba foglalhatják a vírus-replikonokat, vagy az olyan szekvenciákat, melyek biztosítják a megfelelő NANBV-epitópokat kódoló szekvenciák integrálását a gazda genomba.

A transzformáció bármely ismert módszerrel elvégezhető a polinukleotidok gazdasejtbe való bejuttatására, ide értve a polinukleotid vírusba való csomagolását, majd a gazdasejt vírussal való transzdukálását és a polinukleotid direkt felvételét. Az alkalmazott transzformációs eljárás függ a transzformálandó gazdától. Például az *E. coli* gazdasejtek BB-NANBV szekvenciákat tartalmazó lambda-gt11-gyel való transzformációját a későbbiekben a Példák c. részben tárgyaljuk. A direkt felvétellel történő bakteriális transzformációhoz általában kalcium- vagy rubídium-kloriddal való kezelést alkalmazunk [Cohen (1972); Maniatis (1982)]. A direkt felvételen alapuló élesztőgomba transzformáció Hinnen et al. (1978) módszerét alkalmazva végezhető el. A direkt felvételen alapuló emlős transzformáció Graham és Van der Eb (1978) kalcium-foszfátos precipitációs módszerének alkalmazásával végezhető el, vagy ennek számos ismert változatával.

A vektor létrehozása olyan technikákat alkalmaz, melyek ismertek a tudomány e területén. A hely-specifikus DNS-hasítás megfelelő restrikciós enzimmel való kezeléssel történik olyan körülmények között, melyet általában a kereskedelembe kapható enzimek gyártója ad meg. Általában 1 mikrogramm plazmid vagy DNS szekvencia hasítása 1 egység enzimmel történik kb. 20 mikroliter puffer oldatban 1-2 óra 37 °C hőmérsékleten való inkubáció alatt. A restrikciós enzimmel való inkubáció után a fehérjét fenollal/kloroformmal való extrakcióval távolítjuk el és a DNS-et etanolos kicsapással nyerjük ki. A hasított fragmenteket szeparálhatjuk poliakrilamid- vagy agaróz gél-elektroforézises technikákat használva, a Methods in Enzymology (1980) 65: 499-560 oldalakon leírt általános eljárásoknak megfelelően.

A ragadós-végű hasadó fragmentumok tompa-végűek lehetnek *E. coli* DNS-polimeráz I-et (Klenow) alkalmazva a keverékben levő megfelelő dezoxinukleotid-trifoszfátok (dNTPs) jelenlétében. Az S1-nukleázal való kezelés szintén alkalmazható, mely bármely egyszerű DNS-részecske hidrolízisét eredményezi.

A ligálás standard puffer és hőmérsékleti feltételek alkalmazásával, T4-DNS-ligáz és ATP használatával végezhető el; a ragadós végek ligálásához kevesebb ATP-ra és ligázra van szükség, mint a tompa végekéhez. Ha vektor-fragmenst gyakran bakteriális alkalikus foszfátazzal (BAP), vagy borjú emésztőcsatorna alkalikus foszfátazzal kezeljük, hogy az 5'-foszfátot eltávolítsuk és így kivédjük a vektor újraligálását. Másik megoldásként a nem-kívánt fragmentumok restrikciós enzim emésztését alkalmazhatjuk a ligálás elkerülése végett.

A ligációs keveréket megfelelő klónozó gazdába transzformáljuk, pl. *E. coli*-ba és a sikeres transzformánsokat szelektáljuk pl. antibiotikum-rezisztencia alapján és szkrináljuk a helyes szerkezetükre.

Szintetikus oligonukleotidok készíthetők automatizált oligonukleotid-szintetizáló használatával, ahogy azt Warner (1984) leírja. Ha kívánt, a szintetikus szálak ³²P-ral jelölhetők, ³²P-ATP jelenlétében használt polinukleotid-kinázzal történő kezeléssel, standard körülményeket biztosítva a reakció számára.

A DNS-szekvenciák, beleértve a cDNS-könyvtárakból izoláltakat, ismert technikákkal módosíthatók, ide értve pl. a hely-irányított mutagenézist, ahogy azt Zoler (1982) leírja. Röviden a módosítandó DNS-at egyszálú szekvenciaként fágba csomagoljuk és kétszálú DNS-vá konvertáljuk DNS-polimerázzal, primerként egy szintetikus oligonukleotidot használva, mely komplementer a módosítandó DNS részéhez és melynek megvan a kívánt módosítása a saját szekvenciájában. A kapott kétszálú DNS egy gazda baktériumban levő fágba transzformálható. A transzformált baktérium tenyészeit, melyek tartalmazzák a fág minden száljának replikációit, agarra szélesztjük, hogy tarfoltokat kapjunk. Elméletileg az új tarfoltok 50%-a mutált szekvenciát tartalmazó fagot tartalmazza, a maradék 50% az eredeti szekvenciát. A tarfoltok replikációjait jelölt szintetikus próbákhoz hibridizáljuk olyan hőmérsékleti körülmények között, melyek lehetővé teszik a jó szállal való hibridizációt, a módosítás nélküli szekvenciával való azonban nem. A hibridizációval azonosított szekvenciákat visszanyerjük és klónozzuk.

A DNS-könyvtárakat tesztelhetjük Grunstein és Hogness (1975) eljárás alkalmazva. Röviden, ebben az eljárásban a próbának alávetendő DNS-at nitrocellulóz-szűrőn immobilizáljuk, denaturáljuk és előhibridizáljuk 0-50% formamidot, 0,75 M NaCl-ot, 75 mM Na-citrátot, 0,02% (w/v) marha szérum-albumint, polivinil-pirolidont és Ficoll-t, 50 mM Na-foszfátot (pH 6,5) 0,1% SDS-t és 100 mikrogramm/ml hordozó denaturált DNS-at tartalmazó pufferrel. A pufferben levő formamid %-os mennyisége, akárcsak az előhibridizáció és az ezt követő hibridizációs lépések idő és hőmérsékleti körülményei az eljárás kívánt szigorúságától függenek. Az oligomer-próbákhoz, melyek kevésbé szigorú feltételeket igényelnek, általában alacsonyabb formamid %-ot és alacsonyabb hőmérsékletet, valamint hosszabb hibridizációs időt használunk. Az olyan 30-40-nél több nukleotidot tartalmazó próbákhoz, mint pl. melyek a cDNS-ből vagy genom-szekvenciákból származnak, általában magasabb hőmérsékletet (kb. 40-42 °C) és magasabb %-ot (pl. 50% formamidot) alkalmaznak. Az előhibridizációt követően 5'-³²P-jelölt oligonukleotid próbát adunk a pufferhez és a szűrőket ebben a keverékben inkubáljuk hibridizációs körülmények között. Mosás után a kezelt szűrőket autoradiográfiának vetjük alá, hogy kimutassuk a hibridizált próba elhelyezkedését; az eredeti agar lemezen való azonos elhelyezkedésű DNS-at a kívánt DNS forrása-ként használjuk.

A vektor rutin létrehozásához a ligációs keveréket az *E. coli* HB101 törzsébe transzformáljuk, vagy más megfelelő gazdába és a sikeres transzformánsokat antibiotikum-rezisztencia vagy más markerek alapján szelektáljuk. A transzformánsokból származó plazmidokat

Clewell et al. (1969) módszere alapján készítjük, ezt általában chloramphenicolos dúsítás követi [Clewell (1972)]. A DNS-at izoláljuk és analizáljuk, rendszerint restriktációs enzim analízissel és/vagy szekvenálással. A szekvenálást Sangen et al. (1977) didezoxi-módszerével végezhetjük, ahogy később Messing et al. (1981) leírta, vagy Maxam et al. (1980) módszerével. A sávkompresszióval kapcsolatos problémákat, melyeket néha a GC-ban gazdag régiókban figyeltek meg, megoldották a Barr et al. (1986) szerinti T-deazoguanozin használatával.

Az enzim kapcsolt immunoszorbens vizsgálatot (ELISA) az antigén vagy antitest koncentrációinak mérésére lehet felhasználni. A módszer azon alapul, hogy egy enzim hozzákötődik egy antigénhez vagy antitesthez és mennyiségi jelként használja a kötött enzim aktivitását. Az antitest méréséhez az ismert antigént szilárd fázishoz rögzítjük (pl. mikrolemezre vagy műanyag csészébe), a teszt-szérum hígításaival inkubáljuk, mossuk, enzimmal jelölt anti-immunoglobulinnal inkubáljuk és ismét mossuk. A jelölésre alkalmas enzimek ismertek, ide tartozik pl. a torna-peroxidáz. A szilárd fázishoz kötött enzim aktivitását specifikus szubsztát hozzáadásával mérjük és kolorimetriásan meghatározzuk a termék képződését vagy szubsztát fogyását. A kötött enzim aktivitása a kötött antitest mennyiségének közvetlen következménye.

Az antigén méréséhez egy ismert specifikus antitestet rögzítünk szilárd fázishoz, az antigént tartalmazó teszt anyagot hozzáadjuk, inkubálás után a szilárd fázist mossuk és egy második enzim-jelölt antitestet adunk hozzá. Mosás után szubsztátot adunk ehhez és az enzim aktivitását kolorimetriásan becsüljük és az antigén koncentrációjához viszonyítjuk.

A továbbiakban példákkal szemléltetjük a találmányt, melyeket csupán illusztrációs célból adunk meg és nem a jelen találmány körének korlátozására. A jelen leírás fényében, számos kiviteli forma nyilvánvaló lesz a területen jártas szakember számára, melyek a szabadalmi igénypontok oltalmi körébe esnek.

Példák

A 13i, 26j, CA59a, CA84a, CA156e és CA167b átfedő HCV cDNS-klónok izolálása és szekvenciája

A 13i, 26j, CA59a, CA84a, CA156e és CA167b klónokat a lambda-gt11 könyvtárból izoláltuk, mely HCV cDNS-at tartalmaz (ATCC No. 40 394). Az eljárás leírása az EPO Pub. No. 318 216 sz. (1989. május 31-én jelent meg) és a WO 89/04 869 sz. szabadalomban (1989. június 1-jén jelent meg) található. A könyvtár szkrinelését a későbbiekben leírt próbákkal végeztük, a Huynh (1985) munkájában leírt módszert alkalmazva. A megfelelő próbákkal megjelenő pozitív klónok gyakorisága kb. 1 az 50 000-ben.

A 13i klón izolálását a 12f klón szekvenciájából származó szintetikus próba alkalmazásával végeztük el. A próba szekvenciája a következő volt:

5' GAA CGT TGC GAT CTG GAA GAC AGG GAC AGG 3'.

A 26j klón izolálását a K9-1 klón 5'-régijéből

származó próba alkalmazásával végeztük. A próba szekvenciája:

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

5 A 12f és k9-1 (K9-1-nek is nevezett) klónok izolálási eljárását az EPO Pub. No. 318 216 sz. szabadalomban írtuk le és szekvenciájukat az 1. és 2. ábrákon mutatjuk be. A 13i és 26j klónok HCV cDNS-szekvenciái a 4. és 5. ábrán láthatók. Láthatók a bennük kódolt aminosavak és a 13i klón 12f klónnal való átfedése, valamint a 26j 13i klónnal való átfedése is. Ezen klónok szekvenciái igazolják a k9-1 klón szekvenciáját. A k9-1 klónt egy eltérő HCV cDNS-könyvtárból izoláltuk (lásd az EPO 218 316 sz. szabadalmat).

15 A CA59a klónt a 26j klón 5'-régijának szekvenciájára alapozott próba használatával izoláltuk. A próba szekvenciája:

5' CTG GTT AGC AGG CGT TTT CTA TCA CCA CAA 3'.

20 A CA59a klón szekvenciájából származó próbát a CA 84a klón izolálásához használtuk. Az ehhez az izoláláshoz használt próba szekvenciája a következő:

5' AAG GTC CTG GTA GTG CTG CTG CTA TTC GCC 3'.

25 A CA156e klónt a CA84a klón szekvenciájából származó próba alkalmazásával izoláltuk. A próba szekvenciája:

5' ACT GGA CGA CGC AAG GTT GCA ATT GCT CTA 3'.

30 A CA167b klónt a CA156e klón szekvenciájából származó próbát használva izoláltuk. A próba szekvenciája:

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

35 A CA59a, CA84a, CA156e és CA167b klónokban levő HCV cDNS-ak nukleotid-szekvenciáit a 6., 7., 8. és 9. ábrák mutatják. Az ezen klónokban kódolt aminosavakat, valamint az ide vonatkozó klónok szekvenciáival való átfedést is mutatják az ábrák.

40

A „pi”-HCV cDNS-könyvtár létrehozása

Egy HCV cDNS-könyvtárat, a „pi”-könyvtárat, ugyanabból a fertőző csimpánz plazma tételből hoztuk létre, melyet a lambda-gt11 HCV cDNS-könyvtár létrehozásához is használtunk (ATCC No. 40 394), melynek leírása az EPO Pub. No. 318 216 sz. szabadalomban található és melyhez lényegében ugyanazokat a technikákat használtuk. Azonban a „pi”-könyvtár megalkotásához egy primerextenziós módszert alkalmaztunk, melyben a reverz transzkriptáz primerje a CA59a klón szekvenciájára alapult. A primer szekvenciája a következő volt:

5' GGT GAC GTG GGT TTC 3'.

55 *A pi14a klón izolálása és szekvenciája*

A fent leírt „pi”-HCV cDNS-könyvtár szkrinelése a CA167b klón izolálásához használt próbával történt (lásd fent) és a pi14a klónt eredményezte. A klón kb. 800 cDNS bázispárt tartalmaz, melyek átfedésben vannak a CA167b, CA156e, CA84a és CA59a klónokkal,

60

melyeket a lambda-gt11 HCV cDNS-könyvtárból (ATCC No. 40 394) izoláltunk. Továbbá a p14a tartalmaz kb. 250 DNS bázispárt, melyek a CA167b klónban levő HCV cDNS-től upstream helyezkednek el.

A CA216a, CA290a és ag30a klónok izolálása és szekvenciája

A CA167b klón szekvenciájára alapozva egy szintetikus próbát készítettünk, melynek szekvenciája a következő:

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

A fenti próbákat a lambda-gt11 könyvtár (ATCC No. 40 394) szkrineléséhez használtuk, mely a CA216a klónt eredményezte, melynek HCV szekvenciáit a 10. ábra mutatja.

Egy másik próbát a CA216a klón szekvenciájára alapozva készítettünk, melynek szekvenciája:

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

A lambda-gt11 könyvtárat (ATCC No. 40 394) szkrinelve ezzel a próbával a CA290a klónt nyertük, az ebben levő HCV-szekvenciákat a 11. ábra mutatja.

Egy párhuzamos eljárással, egy primer-extendíós cDNS-könyvtárat készítettünk ugyanabból a fertőzött plazmából kivont nukleinsavat használva, melyet az eredeti fent leírt lambda-gt11 cDNS-könyvtárhoz használtunk. A használt primert a CA216a és CA290a klónok szekvenciáira alapoztuk:

5' GAA GCC GCA CGT AAG 3'.

A cDNS könyvtárat a p14a és k9-1 klónok izolálásában használt könyvtárak esetében alkalmazott módszerekhez hasonló módszerek segítségével készítettük. Az ezen könyvtár szkrineléséhez használt próbát a CA290a klón szekvenciájára alapoztuk:

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

Az ag30a klónt a fenti próba alkalmazásával az új könyvtárból izoláltuk, mely a HCV-szekvencia kb. 670 bázispárját tartalmazza. Lásd a 12. ábrát. A szekvencia egy része átfedi a CA216a és CA290a klónok HCV-szekvenciáját. Az ag30a szekvenciájából mintegy 300 bázispár azonban a CA290a klón szekvenciájától upstream helyezkedik el. A nem-átfedő szekvencia egy start kódont (*) és stop kodonokat mutat, melyek a HCV-ORF startját jelölhetik. A 12. ábrában jelöltünk feltételezett kis kódolt peptideket (#), melyek szerepet játszhatnak a transzláció szabályozásában, akárcsak a feltételezett polipeptid feltételezett első aminosavját (/) és a bennük kódolt downstream fekvő aminosavakat.

A CA205a klón izolálása és szekvenciája

A CA205a klónt az eredeti lambda-gt11 könyvtárból (ATCC No. 40 394) izoláltuk a CA290a klón HCV szekvenciájából származó szintetikus próba alkalmazásával (11. ábra). A próba szekvenciája a következő volt:

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

A CA205a klónban levő HCV cDNS-szekvenciája,

amit a 13. ábra mutat, átfedésben van az ag30a és a CA290a klónok cDNS-szekvenciáival. A CA290a klón szekvenciájával való átfedést a szekvencia feletti pontozott vonal mutatja (az ábrán láthatók az ebben a fragmentumban kódolt feltételezett aminosavak is).

Ahogy azt a CA290a és az ag30a klónokban levő HCV cDNS-szekvenciákban megfigyeltük a feltételezett HCV poliprotein úgy tűnik az ATG start-kodonnál kezdődik; a HCV-szekvenciák mindkét klónban tartalmaznak „in-frame„-et, folyamatos kettős stop-kodont (TGATAG) 42 nukleotiddal ettől az ATG-től upstream irányban. A HCV-ORF úgy tűnik, hogy ezek után a stop-kodonok után kezdődik és legalább 8907 nukleotid a kiterjedése (lásd a 17. ábrán mutatott összetett HCV cDNS-at).

A 18g klón izolálása és szekvenciája

Az ag30a klón (lásd a 12. ábrát) szekvenciájára és az eredeti lambda-gt11 könyvtárból (ATCC No. 40 394) származó átfedő klónra, a CA230a-ra alapozva, egy szintetikus próbát készítettünk, melynek szekvenciája a következő:

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

Az eredeti lambda-gt11 HCV cDNS-könyvtár a próbával való szkrinelés a 18g klónt eredményezte, melynek a HCV cDNS-szekvenciáját a 14. ábra mutatja. Az ábrán látható az ag30a klónnal való átfedés is, valamint a HCV cDNS-ban kódolt feltételezett polipeptid is.

A 18g (C18g vagy 18g) klónban levő cDNS átfedésben van a fent leírt ag30a és CA205a klónok cDNS-jával. A C18g klón szekvenciája is tartalmazza az ag3a klónban megfigyelt dupla stop-kodon régiót. A stop-kodontól upstream irányban levő polinukleotid-régió feltehetően a HCV-genom 5'-régijének részét reprezentálja, mely rövid ORF-eket tartalmazhat és mely a tisztított HCV-genom közvetlen szekvenálásával igazolható. Ezek a feltételezett kis kódolt peptidek szabályozó szerepet játszhatnak a transzlációban. A C18g klón által képviselt régiótól upstream irányban levő HCV-genom régiója szekvencia-analízis céljából izolálható, alapjában véve az EPO Pub No. 318 216 sz. szabadalomban a 12f klónban levő HCV cDNS-szekvenciájától upstream irányban levő cDNS-szekvenciák izolálásra leírt technika alkalmazásával. Alapjában véve a reverz-transzkriptáz kis szintetikus oligonukleotid-primerjeit, melyek a C18g szekvenciáján alapulnak, szintetizáljuk és a HCV-genom RNS-ban levő azonos szekvenciákhoz szoktuk kötni. A primer szekvenciák közelebb esnek a C18g klón 5'-terminálisához, de eleendően downstream irányban ahhoz, hogy lehetővé tegyék a primer szekvenciáktól upstream irányban levő próba-szekvenciák megszerkesztését. Primeléshez és a klónozáshoz ismert standard módszereket használunk. A nyert cDNS-könyvtárakat a primelési helyektől (ahogy a C18g értelmezett szekvenciájából levezettük) az upstream irányban levő szekvenciákkal szkrineljük. A HCV-genom RNS-at NANBH-ban szenvedő egyedek plazma- vagy májmintáiból nyerjük. Mivel úgy

tűnik, a HCV egy Flavi-szerű vírus, a genom 5'-terminális védősapka („cap”) szerkezettel módosítható. Ismert, hogy a Flavi-vírus-genomok 5'-terminális „cap”-struktúrákat tartalmaznak [Sárgaláz vírus, Rice et al. (1988); Dengue vírus, Hahn et al. (1988); Japán Encephalitis vírus (1987)].

A béta-HCV cDNS-könyvtárból származó klónok izolálása és szekvenciája

A HCV-genom 3'-terminális régióját képviselő cDNS-at tartalmazó klónokat az eredeti fertőző csimpánz plazma alaphoz létrehozott cDNS-könyvtárból izoláltuk, melyet a HCV cDNS lambda-gt11 könyvtár (ATCC No. 40 394) létrehozásához használtunk és mely az EPO Pub. No. 318 216 sz. szabadalomban került leírásra. A cDNS-könyvtár létrehozásának céljából a plazmából kivont RNS-at poli(rA)-polimerázt használva poli-rA farokkal láttuk el és cDNS-at szintetizáltunk oligo(dT)₁₂₋₁₈-at használva a reverz-transzkriptáz primerjeként. A nyert RNS : cDNS hibridet RNS-áz H-val emésztettük és kényszerítjük HCV cDNS-vá konvertáltuk. A nyert HCV cDNS-at a lambda-gt10-be klónoztuk lényegében a Huynh (1985) által leírt technikát alkalmazva, melynek eredménye a béta- (vagy b) -HCV-cDNS-könyvtár. Az alkalmazott eljárás a következő volt.

A plazma egy részét (12 ml) proteáz K-val kezeltük és 0.05 M Tris-HCl-dal telített fenol (pH 7.5), 0.05% (v/v) béta-merkapto-etanol, 0.1% (w/v) hidroxikínolin, 1 mM EDTA azonos térfogataival extraháltuk. A kapott vizes fázist újra extraháltuk a fenolos keverékkel, ezt követte 3 extrahálás egy : egy arányú keverékkel, mely fenolt és kloroform : izoamilalkohol (24 : 1) tartalmazott, ezt a kloroform és izoamilalkohol 1 : 1 arányú keverékével végzett 2 extrahálás követte. A vizes fázis NaCl-tartalmának 200 mM-ra való kiegészítését követően a vizes fázisban levő aminosavakat egy éjszakán át mínusz 20 °C hőmérsékleten 2.5 térfogat hideg abszolút etanollal kicsapattuk. A csapadékot centrifugálással (10 000 rpm, 40 perc) összegyűjtöttük, 20 mM NaCl-ot tartalmazó 70%-os etanollal, majd 100%-os hideg etanollal mostuk és 5 percig deszikkátorban szárítottuk és vízben feloldottuk.

A fertőző csimpánz plazma anyagból izolált nukleinsavakat poli-rA farokkal láttuk el poli-A-polimerázt használva, humán placenta ribonukleáz inhibitor (HPRI) (az Amersham Corp.-től vásároltuk) jelenlétében, MS2 RNS-at használva hordozóként. A 2 ml plazmában levő nukleinsavval egyenlő mennyiségű izolált nukleinsavakat olyan oldatban inkubáltuk, mely TMN-t [50 mM Tris-HCl, pH 7.9, 10 mM MgCl₂, 250 mM NaCl, 2.5 mM MgCl₂, 2 mM ditiotritol (DTT)], 40 nikroM alfa-(³²P) ATP-ot, 20 egység HPRI-t (Amersham Corp.) és kb. 9-10 egység RN-áz mentes poli-A-polimerázt (BRL) tartalmazott. Az inkubálást 10 percig 37 °C hőmérsékleten végeztük, a reakciót EDTA-val

(végkoncentrációja kb. 250 mM) állítottuk le. Az oldatot fenol-kloroform egyenlő mennyiségeivel, majd kloroform egyenlő mennyiségével extraháltuk, a nukleinsavakat egy éjszakán át -20 °C hőmérsékleten 20 mM NaCl jelenlétében 2.5 térfogat etanollal csapattuk ki.

A b5a klón izolálása

A béta-HCV cDNS-könyvtárat hibridizálással szkrineltük szintetikus próbát alkalmazva, melynek szekvenciája a 15e klón HCV cDNS-szekvenciájára alapult. A 15e klón izolálását az EPO Pub. No. 318 216 sz. szabadalom írja le és szekvenciáját a 3. ábra mutatja. A szintetikus próba szekvenciája:

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

A könyvtár szkrinelle a béta-5a (b5a) klónt eredményezte, mely megközelítően 1000 bázispárból álló HCV cDNS-régiót tartalmaz. A cDNS 5'-régija átfedésben van a 35f, 19g, 26g és a 15e klónokkal (ezeket a klónokat korábban írtuk le). A 3'-terminális poli-A-szekvencia és a 3'-szekvencia közötti régió, mely átfedi a 15e klónt, megközelítően 200 bázispárból áll. Ez a klón lehetővé teszi a HCV-genom 3'-terminális-szekvencia régiójának azonosítását.

A b5a klón szekvenciája a 16jh klónban (később írtuk le) levő HCV cDNS-szekvencián belül van. Továbbá a szekvencia jelen van az eredeti lambda-gt11 könyvtárból (ATCC No. 40 394) izolált CC34a klónban is. (Az eredeti lambda-gt11 könyvtárra itt, mint a „C” könyvtárra hivatkozunk.)

A HCV-genom 3'-régijának PCR-rel való kibővítésével előállított klónok izolálása és szekvenciái

Összetett cDNS-klónokat hoztunk létre, melyek a HCV-genom 3'-régijából származó nukleotid-szekvenciákat tartalmazták. Ezt úgy hoztuk létre, hogy a genom cél-régióját bővítettük (amplifikáltuk), polimeráz láncreakciós technikát (PCR) alkalmazva, melyet Saiki et al. (1986) és Saiki et al. (1988) írtak le, melyet a későbbiekben leírt módon módosítottak. A kibővített HCV RNS-at az EPO Pub. No. 318 216 sz. szabadalomban leírt HCV cDNS lambda-gt11 könyvtár (ATCC No. 40 394) létrehozásához használt eredeti fertőző csimpánz plazma alaphoz nyertük. A HCV RNS izolálása a korábbiakban leírtak alapján történt. Az izolált RNS-at a 3'-végen ATP-farokkal láttuk el, *E. coli* poli-A-polimerázt használva Sippel (1973) leírását alkalmazva, azzal az eltéréssel, hogy a csimpánz szérumból izolált nukleinsavakat kicseréltük a nukleinsavszubsztrátra. A farokkal ellátott RNS-at ezután reverz transzkriptáltuk cDNS-vá, reverz transzkriptáz alkalmazásával, oligo-dT-primer adaptert használva, lényegében a Han (1987) munkájában leírtak alapján, azzal az eltéréssel, hogy a primer adapter komponensei és szekvenciája a következő volt:

Minta	NotI	SP6 Promoter	Primer
AATTC	GCGGCCGC	CATACGATTAGGTGACACTATAGAA	T ₁₅

A kapott cDNS-ak PCR-rel való bővítésének vetettük alá 2 primert használva:

Primer	Szekvencia
JH32 (30 tagú)	ATAGCGGCCGCCCTCGATTGCGA-GATCTAC
JH11 (20 tagú)	AATTCGGGCGGCCGCCATACGA

A JH32 primer 20 nukleotidból álló szekvenciát tartalmaz, mely a cDNS-ban a cél-régió 5'-végéhez hibridizálható, egy becsült 66 °C hőmérsékletű T_m -mel. A JH11 az oligo-dT-primer adapter egy részéből származott; így ez specifikus a cDNS 3'-végéhez, egy 64 °C hőmérsékletű T_m -mel. Mindkét primert úgy szerkesztettük meg, hogy az 5'-végen a NotI restrikciós enzimet felismerő hellyel rendelkezzen, a későbbi bővített HCV cDNS-klónozásban való használathoz.

A PCR-reakciót úgy végeztük, hogy a cDNS-at és a primereket 100 mikroliter reakcióelegyben szuszpendáltuk, mely 4 dezoxinukleotid-trifoszfátot, puffersókat, fémionokat és egy a Perkin Elmer Cetus PCR-kitben (N801-0043 vagy N801-0055) levő *Thermus aquaticus*-ból izolált termotabil polimerázt (Taq-polimeráz) tartalmazott. A PCR-reakció 35 cikluson keresztül egy Perkin Elmer Cetus DNS thermal cyclerben zajlott le. Minden ciklus egy 1,5 perces 94 °C hőmérsékleten végzett denaturációs lépésből állt, egy 60 °C hőmérsékleten 2 percig tartó anneál (kétszálú nukleinsav létrehozása egyszálúból) lépésből és egy 72 °C hőmérsékleten 3 percig tartó primer extenziós lépésből. A PCR-termékeket a Southern-féle gél-filter kombinációs nukleinsav-hibridizálási technikának (Southern-blot analysis) vetettük alá egy 30 nukleotidból álló próbát, a JH34-et használva, melynek szekvenciája a 15e klón 3'-terminális régiójának szekvenciájára alapult. A JH34 szekvenciája:

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

A HCV cDNS-próbával detektált PCR-termékek mérete kb. 50–kb. 400 bázispárig terjedt.

A bővített HCV cDNS-ak klónozása céljából, a PCR-termékeket NotI-gyel hasítottuk és poliakrilamid-gél-elektroforézissel méret szerint szelektáltuk. A 300 bázispárnál nagyobb DNS-ak a pUC18S NotI helyére klónoztuk. A pUC18S vektort úgy hoztuk létre, hogy magába foglal egy NotI-polikötőt, mely a pUC18 EcoRI és Sall helyei közé van klónozva. A klónokat HCV cDNS-ra szkrineltük a JH34 próbát használva. Számos pozitív klónt nyertünk és szekvenáltunk. Az ezen klónok egyikében, a 16jh klónban levő HCV cDNS ismert nukleotid-szekvenciáját és az ebben kódolt aminosavat a 15. ábra mutatja. Az ábra mutatja a 16jh klónban levő HCV cDNS-szekvenciájában detektált nukleotid-heterogenitást ezen régió más klónjával összevetve.

Összeszerkesztett HCV cDNS-szekvenciák

HCV cDNS-szekvenciát szerkesztettünk össze egy sor a fent leírt különböző HCV cDNS-könyvtárakból származó átfedésben levő klónokból. Ebben a szekven-

ciában a b114a, 18g, ag30a, CA205a, CA290a, CA216a, pi14a, CA167b, CA156e, CA84a és CA59a klónokból nyert összeszerkesztett HCV cDNS szekvencia a 16. ábrán látható az EPO Pub. No. 318 216 sz. szabadalomban leírt összeszerkesztett HCV cDNS-szekvenciától upstream irányban található. A b5a és 16jh klónokból nyert összetett HCV cDNS-szekvencia az EPO Pub. No. 318 216 sz. szabadalomban leírt összetett HCV cDNS-szekvenciától downstream irányban található. A 17. ábra a fent leírt klónokból származó összetett HCV cDNS-szekvenciát és az EPO Pub. No. 318 216 sz. szabadalomban közölt összetett HCV cDNS-szekvenciát mutatja. A szekvencia a következő klónokból származik: b114a, 18g, ag30a, CA205a, CA290a, CA216a, pi14a, CA167b, CA156e, CA84a, CA59a, K9-1 (K9-1-nek is hívott), 26j, 13i, 12f, 14i, 11b, 7f, 7e, 8h, 33c, 40b, 37b, 35, 36, 81, 32, 33b, 25c, 14c, 8f, 33f, 33g, 39c, 35f, 19g, 26g, 15e, b5a és 16jh. Az ábrán a szekvencia feletti 3 vonal a feltételezett metionin kódon helyzetét jelöli.

A b114a klónt a b5a klónnál fent leírt klónozási eljárással nyertük, azzal az eltéréssel, hogy a próba, a fent leírt 18g klón detektálásához használt szintetikus próba volt. A b114a klón átfedést mutat a 18g, ag30a és a CA205a klónokkal, azzal az eltéréssel, hogy a b114a klón 2 extra nukleotidot tartalmaz a 18g klónban levő szekvenciától upstream irányban (azaz az 5'-CA-tól). Ezt a két extra nukleotidot a 17. ábrán mutatott HCV-genom magába foglalja.

Meg kell említeni, hogy bár számos fent leírt klónt az eredeti HCV cDNS lambda-gt11 C könyvtártól (ATCC No. 40 394) eltérő könyvtárakból nyertünk, ezek a klónok tartalmazzák az eredeti könyvtárban levő HCV cDNS-szekvenciákkal átfedést mutató HCV cDNS-szekvenciákat. Így lényegében az összes HCV-szekvencia származtatható az első HCV cDNS-klón (5-1-1) izolálásához használt eredeti lambda-gt11 C könyvtárból (ATCC No. 40 394). Az 5-1-1 klón izolálását az EPO Pub. No. 318 216 sz. szabadalom írja le.

A C100-3 fúziós polipeptid tisztítása (Alternatív módszer)

A C100-3 (HCV c100-3-nak vagy c100-3-nak is nevezett) fúziós polipeptid, szuperoxid-dizmutázból (SOD) áll az N-terminálisnál és egy „in-frame” C100 HCV polipeptidből a C-terminálisnál. A polipeptid élesztőgombában való expressziójával történő előállítását és az extrahált gazda élesztőgomba sejtek oldhatatlan frakcióinak extrakcióját az EPO Pub. No. 318 216 sz. szabadalom írja le. A fúziós polipeptid előállításának egy másik módszerét az alábbiakban adjuk meg. Ebben a módszerben az antigént a nyers sejtlizátumból acetonnal csapjuk ki; az acetonnal kicsapott antigént ezután ioncserés-kromatográfiának vetjük alá, majd a továbbiakban gél-filtrációval tisztítjuk.

A C100-3 (HCV c100-3) fúziós polipeptidet a pAB24C100-3-mal (ATCC No. 67 976) transzformált JSC308 élesztőgomba törzsben (ATCC No. 20 879) expresszáljuk; a transzformált élesztőgombát olyan körülmények között szaporítjuk, mely lehetővé teszi az

expresszálat (1% glükózt tartalmazó YEP-on való szaporodással) (lásd az EPO Pub. No. 318 216 sz. szabadalmát). A sejtlizátum a sejtek A-pufferben (20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF) való szuszpendálásával készül. A sejtek feltárását Dynomill-típusú homogenizátorban vagy ehhez hasonló készülékben üveggyöngyös darálással végezzük. Az sejtfeltárás mértékét mikroszkópos sejtszámlálással, fázisoptikával végezzük. A feltárt sejtek sötétek, míg az életképesek világos színűek. A feltárt sejtek százalékos arányát meghatározzuk.

Amikor a feltárt sejtek aránya eléri a 90%-ot vagy még ennél is nagyobb, a feltárt sejteket centrifugálással választjuk el az üveggyöngyöktől és az üveggyöngyöket A-pufferrel mossuk. A mosadék és a homogenizátum elegyítése után a lizátum oldhatatlan anyagát centrifugálással nyerjük. Az üledék anyagát az oldható fehérjék eltávolítása céljából B-puffer (50 mM glicin, pH 12,0, 1 mM DTT, 500 mM NaCl) szuszpenziójával mossuk, majd C-pufferrel (50 mM glicin, pH 10,0, 1 mM DTT). Az oldhatatlan anyagot centrifugálással nyerjük vissza és SDS-ot tartalmazó C-puffer szuszpenziójában oldjuk. Az extraktum oldatát béta-merkaptotetanol jelenlétében melegíthetjük és ultraszűréssel koncentrálnáljuk. Az extraktumban levő HCV c100-3-at hideg acetonnal csapjuk ki. Szükség esetén a csapadék mínusz 15 °C hőmérsékleten vagy ennek közelében tárolható.

Az ioncserés kromatográfiát megelőzően az acetonnal kicsapatott anyagot centrifugálással kinyerjük és nitrogén alatt száríthatjuk. A csapadékot D-pufferben (50 mM glicin, pH 10,0, 1 mM DTT, 7 M urea) szuszpendáljuk és centrifugáljuk az oldhatatlan anyagok ülepítése céljából. A felülúszót anioncserés oszlopra helyezzük, melyet előzőleg D-pufferrel equilibráltunk. A frakciókat összegyűjtjük és UV abszorbanciával analizáljuk, vagy SDS poliakrilamid géleken gél-elektroforézist végzünk. A HCV C100-3 polipeptidet tartalmazó frakciókat összegyűjtjük.

A HCV C100-3 polipeptid gelszűréssel történő tisztításához az ioncserés oszlopról összegyűjtött frakciókat béta-merkaptotetanol és SDS jelenlétében melegítjük és az eluátumot ultraszűréssel koncentrálnáljuk. A koncentrátumot félfiltrációs oszlopra helyezzük, melyet előzőleg E-pufferrel (20 mM Tris-HCl, pH 7,0, 1 mM DTT, 0,1% SDS) equilibráltunk. Az eluált frakciókban a HCV C100-3 és a szennyeződések jelenlétét poliakrilamid-géleken gél-elektroforézissel határoztuk meg SDS jelenlétében és a polipeptidek láthatóvá tételével.

A tiszta HCV c100-3-at tartalmazó frakciókat összegyűjtjük. A HCV c100-3-ban gazdag frakciókat további tisztítás céljából ismételten gélfiltrációs eljárásnak vethetjük alá. Ha a szemcsés anyagok eltávolítása szükséges, a HCV c100-3-at tartalmazó anyagot 0,22 mikronos szűrőn szűrhetjük.

A HCV cDNS-ban kódolt polipeptidek expressziója és antigenitása

Az E. coliban expresszált polipeptidek

A számos HCV cDNS-ban kódolt polipeptidet, me-

lyek a HCV-genom ORF-jét adják, az *E. coliban* expresszáltuk és antigenitásukra teszteltük a különböző NANBH-ban szenvedő egyedektől nyert szérumot használva. A klónozott HCV cDNS-akat tartalmazó expressziós vektorokat a pSODcf1-ből hoztuk létre [Steimer et al. (1986)]. Hogy biztosak legyünk abban, hogy egy korrekt leolvasási keretet nyerünk, 3 külön expressziós vektort, a pcflAB-t, a pcflCD-t és a pcflEF-et készítettünk úgy, hogy az AB, a CD és az EF linkerek egyikét ligáltuk egy a pSODcf1 vektor EcoRI és BamHI-gyel való teljes emésztésével nyert BamHI-EcoRI fragmenthez, melyet egy alkalikus foszfatázzal való kezelés követett. A linkert 6 oligomerből készítettük, az A, B, C, D, E és az F-ből. Minden oligomert ATP jelenlétében kináz enzimmel való kezeléssel foszforiláltunk mielőtt komplementer oligomerjeikhez hibridizáltuk volna őket. A szintetikus linker szekvenciája a következő volt:

Név	DNS-szekvencia (5'-től a 3' felé)
A	GATC CTG AAT TCC TGA TAA
B	GAC TTA AGG ACT ATT TTA A
C	GATC CGA ATT CTG TGA TAA
D	GCT TAA GAC ACT ATT TTA A
E	GATC CTG GAA TTC TGA TAA
F	GAC CTT AAG ACT ATT TTA A

A 3 linker közül mindegyik rombolja az eredeti EcoRI helyet és a linkerben belül hoz létre egy új EcoRI helyet, de egy másik leolvasási kereten belül. Ennél fogva az expressziós vektorokba való inzertáláskor a klónokból izolált HCV cDNS-EcoRI-fragmentek 3 különböző leolvasási kereten belül voltak.

A kijelölt lambda-gt11 klónokban levő HCV cDNS-fragmentumokat az EcoRI-gyel való emésztéssel hasítottuk; minden egyes fragmentumot a pcflAB-be, a pcflCD-be és a pcflEF-be inzertáltuk. Ezután ezeket az expressziós szerkezeteket a D1210 *E. coli* sejtekbe transzformáltuk, a transzformánsokat klónoztuk és az egyes klónokból való rekombináns baktériumokat a fúziós polipeptidek expresszáására indukáltuk, a baktériumok IPTG jelenlétében való szaporításával.

Az említett HCV cDNS-ak expressziós termékeit antigenitásukra teszteltük a telepek közvetlen immunológiai szkrinelésével, a Helfman et al. (1983) munkájában leírt módszer módosított változatát alkalmazva. Röviden, ahogy az a 18. ábrán is látható, a baktériumokat ampicillin-lemezekre rétegezett nitrocellulóz-szűrőre szélesztettük úgy, hogy megközelítően 1000 telep jusson egy szűrőre. A telepekkel replika-szélesztést végeztünk nitrocellulóz-lemezekre és a „replikákat” újra növesztettük egy éjszakán át 2 mM IPTG és ampicillin jelenlétében. A baktérium telepeket a nitrocellulóz-szűrők 15-20 percig történő CHCl_3 gőzzel telített légkörben való szuszpendálásával lizáltuk. Ezután a szűrőket 100 nm-es 10 ml 50 mM Tris-HCl-t, pH 7,5, 150 mM NaCl-ot, 5 mM MgCl_2 -ot, 3% (w/v) BSA-t, 40 mikrogramm/ml lizozimot és 0,1 mikrogramm/ml

DN-ázt tartalmazó Petri-csészébe helyeztük. A Petri-csészéket óvatosan legalább 8 órán keresztül szobahőmérsékleten ráztattuk. A szűrőket TBST-ben (50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 150 mM NaCl, 0,005% Tween 20) öblítettük. Inkubáció után a sejtmardványt öblítettük és 10% birka szérumot tartalmazó TBS-ben (TBST Tween nélkül) inkubáltuk 1 órán keresztül. A szűrőket ezután NANBH-es egyedekből származó TBS-ben előkezelte szérummal inkubáltuk. Az egyedek közé tartoztak a következők: 3 csimpánz, 8 krónikus NANBH-es beteg, akiknek széruma pozitív volt a HCV C100-3 (C100-nak is nevezett) polipeptid (az EPO Pub. No. 318 216 sz. szabadalomban és korábban leírt) elleni antitesteket figyelembe véve; 8 krónikus NANBH-es beteg, akiknek széruma negatív volt az anti-C100 antitestekre; egy lábadozó beteg, akinek széruma negatív volt az anti-C100 antitestekre; és 6 beteg, akik közösségben szerzett NANBH-szel voltak fertőzöttek, ide értve egyet, akinek a széruma erősen pozitív volt az anti-C100 antitesteket figyelembe véve és egyet, akinek a széruma éppen csak pozitív volt. A TBS-ben hígított szérumot hSOD-dal való preabszorpcióval előkezelte. A szűrők szérumokkal való inkubációja legalább 2 óráig tartott. Inkubálás után a szűrőket kétszer 30 percig TBST-bel mostuk. Az expresszált fehérjék jelölését, melyekhez a szérumban levő antitestek kötődtek, 2 órán keresztül ¹²⁵I-dal jelölt birka anti-humán antitesttel való inkubálással végeztük. Mosás után a szűrőket kétszer 30 percig TBST-vel mostuk. szárítottuk és autoradiografáltuk.

Számos klón (lásd később) olyan polipeptideket expresszált, melyek olyan HCV-epitópokat tartalmaztak, melyek immunológiailag aktívak voltak az NANBH-ben szenvedő betegekből származó szérummal. A polipeptidok közül 5 erősen immunogén volt abban, hogy az ezen polipeptidekben levő HCV-epitópok elleni antitesteket különböző betegek szérumában detektáltuk. Az ezen polipeptideket kódoló klónok és a polipeptid elhelyezkedése a feltételezett HCV poliproteinekben (ahol az aminosav-szám a feltételezett iniciátor kodonnal kezdődik) a következők: 5-1-1 klón, aminosavak 1694-1735; C100 klón, aminosavak 1569-1931; 33c klón, aminosavak 1192-1457; CA279a klón, aminosavak 1-84; CA290a klón, aminosavak 9-177. A feltételezett HCV-poliproteinekben belüli immunogén polipeptidek elhelyezkedését a következőkben mutatjuk.

Az NANBH-es betegek szérumával bizonyítottan aktív polipeptideket kódoló klónok

Klón	A HCV-poliproteinen belüli elhelyezkedés (az aminosav-szám a feltételezett kezdő metionin kodonnal indul)
CA279a	1-84
CA74a	437-582
13i	511-690
CA290a	9-177
33c	1192-1457

Klón	A HCV-poliproteinen belüli elhelyezkedés (az aminosav-szám a feltételezett kezdő metionin kodonnal indul)
40b	1266-1428
5-1-1	1694-1735
.81	1689-1805
33b	1916-2021
25c	1949-2124
14c	2054-2223
8f	2200-3325
33f	2287-2385
33g	2348-2464
39c	2371-2502
15e	2796-2886
C100	1569-1931

A különböző vizsgált klónokban kódolt polipeptidek immunogénitásával kapcsolatos eredmények alapján a detektálás hatékony és az immunizációs rendszerek tartalmazhatnak HCV-polipeptid/epitóp paneleket.

A HCV-epitópok expresszálása élesztőgombában

Három különböző élesztőgomba expressziós vektort készítettünk, melyek lehetővé teszik a HCV cDNS három különböző olvasási keretbe való inzertációját. Az egyik vektor, a pAB24C100-3, leírása az EPO Pub. No. 318 216, sz. szabadalomban található. A későbbi vizsgálatokban az antigenitás feltérképezésének *E. coli* expressziós termékeket használó vizsgálatában a C100 HCV cDNS-val helyettesítettük a korábban felsorolt klónokból származó HCV cDNS-at. A többi vektor létrehozásában a fenti *E. coli*-val végzett vizsgálatokban leírt adaptort a következő adaptorok egyikével helyettesítjük:

Adaptor 1

ATT TTG AAT TCC TAA TGA G
AC TTA AGG ATT ACT CAG CT

Adaptor 2

AAT TTG GAA TTC TAA TGA G
AC CTT AAG ATT ACT CAG CT

Az inzertált HCV cDNS-at a vektorokkal transzformált élesztőgombában expresszálnak a C100-3 fúziós polipeptid expresszálásához, a fent leírt expressziós körülményeket használva. A nyert polipeptideket az NANBH-es betegek szérumát használva szkrináljuk, melyet korábban az *E. coli*-ban expresszált HCV cDNS-akban kódolt immunogén polipeptidek szkrinálásánál írtunk le.

A HCV-poliproteinek hidrofób profiljainak összehasonlítása a West Nile Virus poliproteinjével és a Dengue Virus NS1-gyel

Egy HCV-poliprotein-szegmens hidrofóbitási profilját összehasonlítottuk egy tipikus Flavi-víruséval, a

West Nile vírusával. A West Nile vírus poliproteinjének polipeptid szekvenciáját a vírus nem-szerkezeti fehérjéit kódoló ismert polinukleotid-szekvenciákból vezettük le. A HCV-poliprotein-szekvenciát az átfedő cDNS-klónok szekvenciájából származtattuk. A profilokat egy olyan antigén program alkalmazásával határoztuk meg, mely egy 7 aminosav szélességű ablakot használ (a kérdéses aminosavat és 3-3 maradékot a két oldalon) az adott aminosav-maradék átlag hidrofóbitásának jelzésére. A paraméterek, melyek megadják az egyes aminosav-maradékok reaktív hidrofóbiticitását Kyte és Doolittle munkájától (1982) származnak. A 19. ábra a két poliprotein hidrofób profilját mutatja, a West Nile vírus nem-szerkezeti fehérjéinek megfelelő területeket, az ns1–ns5 területeket, az ábrán jelöltük. Amint az az ábrán is látható, széles körű hasonlóság van a HCV-poliproteinjének és a West Nile vírus poliproteinjének profiljai között.

A 16. ábrán bemutatott HCV cDNS 5'-régijében kódolt aminosavak szekvenciáját összehasonlítottuk a későbbiekben leírt Dengue vírus egy törzsének megfelelő régiójával, a területek hidrofilitását és hidrofóbiticitását figyelembe véve (adatot nem mutatunk). Ez az összehasonlítás azt mutatja, hogy a HCV-ből és a Dengue vírusból származó polipeptideknek, melyek ebben a régióban kódoltak, mely megfelelő az NS1-et kódoló régióknak (vagy annak egy részének) hasonló a hidrofób/hidofil profiljuk.

A hidrofóbiticitási profilban levő hasonlóság a HCV és Dengue Flavi-vírusok aminosav-szekvenciáiban korábban azonosított homológiákkal együttesen (lásd az EPO Pub. No. 218 316 sz. szabadalmat) azt sugallják, hogy a HCV a Flavi-vírus-család ezen tagjával rokonságban áll.

A HCV-ORF-en belül kódolt, feltételezett polipeptidek jellemzése

A 17. ábrán bemutatott HCV cDNS kódoló száljának szekvenciáját az EPO Pub. No. 318 216 sz. szabadalomban és a korábban leírt különböző klónokban levő átfedő HCV cDNS-akból származtatjuk. Származtatható abból a szekvenciából, melyet a HCV-genom tartalmaz, elsősorban egy hosszú, folyamatos ORF-ből, mely egy poliproteint kódol. A szekvenciában az 1. számú nukleotid megfelel a kezdő MET kodon első nukleotidjának; a negatív számok azt jelentik, hogy a nukleotidok az 5'-irányban upstream ilyen távolságban helyezkednek el, míg a pozitív számok azt jelzik, hogy a nukleotidok ilyen távolságban vannak downstream a 3'-irányban. Az összetett szekvencia a HCV cDNS értelmes szálját mutatja.

A HCV cDNS értelmes száljának szekvenciájából származtatott feltételezett HCV-poliprotein aminosav-szekvenciáját is a 17. ábra mutatja, ahol az 1. pozíció a feltételezett kezdő metioninnal indul.

A kódolt HCV-poliprotein lehetséges protein-doménjei, akárcsak a körülbelüli határok a következők (a zárójelen belüli azonosított polipeptidek azok, melyek a Flavi-vírus-doménben kódoltak):

Feltételezett domén	Körülbelüli határ (aminosav-számok)
„C” (nukleokapszid fehérje)	1–120
„E” [virion burk fehérjé(k) és lehetséges mátrix (M) fehérjé(k)]	120–400
„NS1” (komplement fixációs antigén)	400–660
„NS2” (ismeretlen funkció)	660–1050
„NS3” (proteáz ?)	1050–1640
„NS4” (ismeretlen funkció)	1640–2000
„NS5” (polimeráz)	2000–?

Említésre méltó azonban, hogy a hidrofilitási profilok (a későbbiekben írjuk le) alapján a HCV különbözik a Flavi-vírus modelltől, különösen az NS2-től upstream irányban levő terület tekintetében. Továbbá a jelölt határok nem szándékoznak erős demarkációkat mutatni a feltételezett polipeptidek között.

A polipeptid hidofil és antigén profilja

Komputeres analízissel határoztuk meg a 16. ábrán látható HCV cDNS-szekvenciában kódolt feltételezett poliprotein hidrofilitási/hidrofóbitási profilját és az antigén indexét. A hidrofilitási/hidrofóbitási program a fent leírt volt. Az antigén-indexet olyan komputer programból nyertük, mely a következő kritériumokra épül: 1. felszíni valószínűség; 2. az alfa-helicitás becslése két különböző módszerrel; 3. a béta-sík területek becslése két különböző módszerrel; 4. az U-fordulatok becslése két különböző módszerrel; 5. hidrofilitás/hidrofóbitás és rugalmasság. A profilok vázlatait a komputeres analízis alapján készítettük el és a 20. ábra mutatja be. A hidrofilitási profilban az abszcissa fölötti elhajlás a hidrofilitást jelzi és az ez alatti a hidrofóbitást. Egy polipeptid régió antigén tulajdonságának valószínűsége feltételezések szerint általában nő, ha a hidofil és/vagy antigén profilban az abszcisszától felfelé irányuló elhajlás van. Azonban említésre méltó, hogy ezek a profilok nem feltétlenül jelzik egy polipeptid immunogénitását erősségét.

A HCV-ban és Flavi-vírusokban levő kolineáris peptidek azonosítása

A HCV cDNS értelmes száljának kódolt feltételezett poliprotein aminosav szekvenciáját összehasonlítottuk a Flavi-vírusokat képviselő fajok ismert aminosav-szekvenciájával. Az összehasonlítás azt mutatja, hogy a homológia enyhe, de azoknak a területeknek köszönhetően, melyekben ezt találtuk, feltehetően szignifikáns. A konzervált kolineáris régiókat a 21. ábrán mutatjuk be. A szekvenciák alatt felsorolt aminosav-számok a feltételezett HCV-poliproteinben (lásd a 17. ábrát) levő számokat képviselik.

Ezen konzervált, ismétlődő részek elhelyezkedése hasonló a Flavi-vírusokban és a HCV-ban és maga után vonja, hogy valamilyen hasonlóság van a HCV és ezen Flavi-vírus-ágensek között.

A következő felsorolt anyagok letétben vannak a

Budapesti Egyezmény szerint az American Type Culture Collection (ATCC)-nál (12 301 Parlaw Dr., Rockville, Maryland 20 852) és a következő hivatkozási számokat kapták:

Lambda-gt11	ATCC szám	A deponálás ideje
HCV cDNS-könyvtár	40 394	1987. december 1.
81 klón	40 388	1987. november 17.
91 klón	40 389	1987. november 17.
1-2 klón	40 390	1987. november 17.
5-1-1 klón	40 391	1987. november 18.
12f klón	40 514	1988. november 10.
35f klón	40 511	1988. november 10.
15e klón	40 513	1988. november 10.
K9-1 klón	40 512	1988. november 10.
JSC 308	20 879	1988. május 5.
pS356	67 683	1988. április 29.

Továbbá a következő deponálásokat 1989. május 11-én végezték.

Törzs	Linker	ATCC szám
D1210 (Cf1/5-1-1)	EF	67 967
D1210 (Cf1/81)	EF	67 968
D1210 (Cf1/CA74a)	EF	67 969
D1210 (Cf1/35f)	AB	67 970
D1210 (Cf1/279a)	EF	67 971
D1210 (Cf1/C36)	CD	67 972
D1210 (Cf1/13i)	AB	67 973
D1210 (Cf1/C33b)	EF	67 974
D1210 (Cf1/CA290a)	AB	67 975
HB101 (AB24/C100#3R)		67 976

A D1210 jelű törzs következő származékait 1989. május 3-án deponálták.

Törzs származék	ATCC szám
pCF1CS/C8f	67 956
pCF1AB/C12f	67 952
pCF1EF/14c	67 949
pCF1EF/15e	67 954
pCF1AB/C25c	67 958
pCF1EF/C33c	67 953
pCF1EF/C33f	67 050
pCF1CD/33g	67 951
pCF1CD/C39c	67 955
pCF1EF/C40b	67 957
pCF1EF/CA167b	67 959

A következő törzseket 1989. május 12-én deponálták.

Törzs	ATCC szám
Lambda-gt11	40 603
Lambda-gt10	40 602
D1210 (C40b)	67 980
D120 (M16)	67 981

5

10 Ezen alkalmazásnak, mint az egyesült államokbeli szabadalomnak engedélyezése és kiadása alapján ezen deponálások hozzáférhetőségi korlátozásai visszavonhatatlanul megszűnnek; a kijelölt deponálásokhoz való hozzáférhetőség elérhető lesz a fent nevezett alkalmazás perfüggősége idején egy olyan személy számára, akit a Comissioner határoz meg, hogy jogosult erre a 37 CFR 1.14 és a 35 USC 1.22. alapján. Továbbá a jelölt depozitok fenntartási ideje a deponálástól számított 30 (harminc) év, vagy az utolsó igényléstől számított 5 (öt) év, vagy az USA szabadalom alkalmazhatóságának ideje, amely ennél hosszabb. A találmányban említett deponált anyagok csupán a kényelmet szolgálják és nem várjuk el, hogy a jelen találmányt a leírtak szerint alkalmazzák, továbbá ezen anyagokat a referencia tartalmazza.

25

Ipari alkalmazás

A találmánynak az itt leírtak alapján számos ipari alkalmazása van, melyek közül néhány a következő. A HCV cDNS-ak olyan próbák megszerkesztéséhez használhatók, melyek a minták HCV nukleinsavainak detektálására szolgálnak. A cDNS-akból származó próbák pl. a kémiai szintetikus reakciókban részt vevő HCV-nukleinsavak detektálására szolgálhatnak. Használhatók szkrinelési programokban vírus-elleni ágensek szkrinelésére, az ágensek sejtenyészet rendszerekben és állati modell-rendszerekben való vírus-replikációt gátló hatásának detektálására. A HCV poli-nukleotid-próbák használhatók a vírus-nukleinsavak emberben való detektálására, így az emberi HCV-fertőzések diagnózisának alapjául szolgálhatnak.

40

A fentiekén túl, az itt közölt cDNS-ak információt és eszközt nyújtanak a HCV-epitópokat tartalmazó polipeptidek szintetizálásához. Ezek a polipeptidek használhatók a HCV-antigének elleni antitestek detektálásában. A HCV-fertőzés HCV-epitópokat tartalmazó rekombináns polipeptidekre alapozott immunológiai vizsgálatait a találmányban leírjuk és kereskedelmi használatba vételre alkalmas lesz a HCV-indukált NANBH diagnózisában, a vérbank donorok HCV-okozta fertőző hepatitiszének szkrinelésében és a fertőzött vérdonoroktól származó fertőzött vér detektálásában. A vírus-antigének szintén használhatók lesznek az állati modell-rendszerekben való vírus-elleni ágensek hatékonyságának felmérésében. Továbbá az itt leírt HCV cDNS-akból származó polipeptidek alkalmazhatók lesznek a HCV-fertőzés kezelésére szolgáló vakcinaként.

55

A HCV cDNS-akból származó polipeptidek, a fent leírt alkalmazásokon túl, használhatók a HCV-elleni anti-

60

test termelésében. Így használhatók a HCV-elleni vakcinákban. Azonban a HCV-poli-peptidekkel való immúnizálás eredményeként termelt antitestek is hasznosak a mintákban levő vírus-antigének jelenlétének kimutatásában. Így használhatók a kémiai szintézisek során HCV-poli-peptidek vizsgálatában. A HCV-elleni antitestek alkalmazhatók a vírus-ellenes ágensek hatékonyságának felmérésében szkrinelési programokban, ahol ezeket az ágenseket szövettényezési rendszerekben tesztelik. Passzív immunoterápiára is használhatók és a HCV által okozott NANBH diagnózisához, melynek során lehetőség nyílik a vírus-antigén(ek) detektálására mind a védonorokban, mind a recipiensekben. A HCV-elleni antitestek másik fontos alkalmazása az affinitás-kromatográfiával kapcsolatos, mely módszert a vírusok és vírus-poli-peptidek tisztításában alkalmazunk. A tisztított vírus és vírus-poli-peptid készítmények a vakcinákban alkalmazhatók. Azonban a tisztított vírus is használható olyan sejtenyészeti rendszerek kifejlesztésére, melyekben a HCV replikálódik.

Az értelmetlen (anti-sense) polinukleotidok a vírus-replikáció inhibitoraként használhatók.

Célszerűen a HCV-elleni antitestek és a HCV-poli-peptidek, akár természetesek, akár rekombinánsak, kitékbe csomagolhatók.

A bejelentésben idézett irodalmak jegyzéke:

- Barr et al.: *Biotechniques* 4, 428 (1986)
 Botstein: *Gene* 8, 17 (1979)
 Brinton, M. A. – In: *The Viruses: The Togaviridae and Flaviviridae* (sorozatszerkesztő: Fraenkel-Conrat és Wagner, Schlesinger és Schlesinger által összeállított kötet), Plenum Press Kiadó, 1986, 327–374. o.
 Broach – In: *Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces*, 1. kötet, Cold Spring Harbor Press, 1981, 445. o.
 Broach et al.: *Meth. Enz.* 101, 307 (1983)
 Chang et al.: *Nature* 198, 1056 (1977)
 Chirgwin et al.: *Biochemistry* 18, 5294 (1979)
 Chomczynski és Sacchi: *Analytical Biochemistry* 162, 156 (1987)
 Clewell et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 62, 1159 (1969)
 Clewell: *J. Bacteriol.* 110, 667 (1972)
 Cohen: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 2110 (1972)
 Cousens et al.: *Gene* 61, 265 (1987)
 De Boer et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 292, 128 (1983)
 Dreesman et al.: *J. Infect. Disease* 151, 761 (1985)
 Feinstone, S. M., Hoofnagle, J. H.: *New Eng. J. Med.* 311, 185 (1984)
 Fields és Knipe – *Fundamental Virology* – Raven Press, N. Y., 1986
 Fiers et al.: *Nature* 273, 113 (1978)
 Gerety, R. J. et al. – In: *Viral Hepatitis and Liver Disease*, összeállítva B. N. Vyas, J. L. Dienstag és J. H. Hoofnagle által, Grune and Stratton, Inc., 1984, 23–47. o.
 Goeddel et al.: *Nucleic Acids Res.* 8, 4057 (1980)
 Graham és Van der Eb: *Virology* 52, 546 (1978)
 Grunstein és Hogness: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 3961 (1975)

- Grych et al.: *Nature* 316, 74 (1985)
 Gubler és Hoffman: *Gene* 25, 263 (1983)
 Hahn: *Virology* 162, 167 (1988)
 Hammerling et al. – *Monoclonal Antibodies and*

- 5 *T-Cell Hybridomas*, 1981
 Han: *Biochemistry* 26, 1017 (1987)
 Helfman: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 31 (1983)
 Hess et al.: *J. Adv. Enzyme Reg.* 7, 149 (1968)
 Hinen et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75, 1929 (1978)
 10 Hitzeman et al.: *J. Biol. Chem.* 255, 2073 (1980)
 Holland et al.: *Biochemistry* 17, 4900 (1978)
 Holland: *J. Biol. Chem.* 256, 1385 (1981)
 Houghton et al.: *Nucleic Acids Res.* 9, 247 (1981)
 Hunyh, T. V. et al. – In: *DNA Cloning Techniques – A Practical Approach*. – összeállítva D. Glover által, Oxford: IRL Press, 1985, 49–78. o.
 15 *Immun. Rev.* 62, 185 (1982)
 Iwarson: *British Medical J.* 295, 946 (1987)
 Kennett et al. – *Monoclonal Antibodies*, 1980
 20 Kyte és Doolittle: *J. Mol. Biol.* 157, 105–132 (1982)
 Laemmli: *Nature* 227, 680 (1979)
 Lee et al.: *Science* 239, 1288 (1988)
 Maniatis, T. et al. – *Molecular Cloning – A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, N. Y.: Cold Spring Harbor Press, 1982
 25 Mayer és Walker – *Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology*, London: Academic Press, 1987
 30 Maxam et al.: *Methods in Enzymology* 65, 499 (1980)
 MacNamara et al.: *Science* 226, 1325 (1984)
 Messing et al.: *Nucleic Acids Res.* 9, 309 (1981)
 Messing: *Methods in Enzymology* 101, 20–37 (1983)
 35 *Methods in Enzymology*, Academic Press
 Michelle et al. – *Int. Symposium on Viral Hepatitis*
 Monath – In: *The Viruses: The Togaviridae and Flaviviridae* (sorozatszerkesztő: Fraenkel-Conrat és Wagner, kötet szerkesztő: Schlesinger és Schlesinger), Plenum Press, 1986, 375–440. o.
 40 Nagahuma et al.: *Anal. Biochem.* 141, 74 (1984)
 Neurath et al.: *Science* 224, 392 (1984)
 Nisonoff et al.: *Clin. Immunol. Immunopathol.* 21, 397–406 (1981)
 45 Overby, L. R.: *Curr. Hepatol.* 5, 49 (1985)
 Overby, L. R.: *Curr. Hepatol.* 6, 65 (1986)
 Overby, L. R.: *Curr. Hepatol.* 7, 35 (1987)
 Peleg: *Nature* 221, 193 (1969)
 50 Pfefferkorn és Shapiro – In: *Comprehensive Virology*, 2. kötet, szerkesztő: Fraenkel-Conrat és Wagner, N. Y.: Plenum, 1974, 171–230. o.
 Prince, A. M.: *Annu. Rec. Microbiol.* 37, 217 (1983)
 55 Rice et al.: *Science* 229, 726 (1985)
 Rice et al. – In: *The Viruses: The Togaviridae and Flaviviridae* (sorozatszerkesztő: Fraenkel-Conrat és Wagner, kötet szerkesztő: Schlesinger és Schlesinger), Plenum Press, 1986, 279–328. o.
 60 Roehrig – In: *The Viruses: The Togaviridae and*

Flaviviridae (sorozatszerkesztő: Faenkel-Conrat és Wagner, kötet szerkesztő: Schlesinger és Schlesinger). Plenum Press, 1986

- Sadler et al.: Gene 8, 279 (1980)
 Saiki et al.: Nature 324, 163 (1986)
 Saiki et al.: Science 239, 487 (1988)
 Sanger et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463 (1977)
 Schlesinger et al.: J. Virol. 60, 1153 (1986)
 Schreier, M. et al. – Hibridoma Techniques, 1980
 Scopes – Protein Purification, Principles and Practice, 2. kiadás, N. Y.: Springer-Verlag, 1984
 Shimatake et al.: Nature 292, 128 (1981)
 Sippel: Eur. J. Biochem. 37, 31 (1973)
 Steimer et al.: J. Virol. 58, 9 (1986)
 Stollar – In: The Togaviruses, szerkesztő: R. W. Schlesinger, N.Y.: Academic Press, 1980, 584–622. o.
 Sumiyoshi et al.: Virology 161, 497 (1987)
 Taylor et al.: Biochem. Biophys. Acta 442, 324 (1976)
 Towbin et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350 (1979)
 Tsu és Herzenberg – In: Selected Methods in Cellular Immunology. W. H. Freeman and Co., 1980, 373–391. o.
 Vydehaag et al.: J. Immunol. 134, 1225 (1985)
 Valenzuela. P. et al.: Nature 298, 344 (1982)
 Valenzuela. P. et al. – In: Hepatitis B, szerkesztő I. Millman et al., Plenum Press, 1984, 225–236. o.
 Warner: DNA 3, 401 (1984)
 Wu és Grossman: Methods in Enzymology, 154. kötet, Recombinant DNA, E rész, 1987
 Wu: Methods in Enzymology, 155. kötet, Recombinant DNA, F rész, 1987
 Zoller: Nucleic Acids Res. 10, 6487 (1982)
 Idézett szabadalmak jegyzéke:
 EPO Pub. No. 318 216
 PCT Pub. No. WO 89/04 669
 U. S. Patent No. 4 341 761
 U. S. Patent No. 4 399 121
 U. S. Patent No. 4 427 783
 U. S. Patent No. 4 444 887
 U. S. Patent No. 4 466 917
 U. S. Patent No. 4 472 500
 U. S. Patent No. 4 491 632
 U. S. Patent No. 4 493 890

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Rekombináns polinukleotid, amely egy HCV cDNS-ből levezetett szekvencát tartalmaz, *azzal jellemezve*, hogy a HCV cDNS a 13i klónban vagy a 26j klónban vagy az 59a klónban vagy a 84a klónban vagy a CA156e klónban vagy a 167b klónban vagy a pi14a klónban vagy a CA216a klónban vagy a CA290a klónban vagy az ag30a klónban vagy a 205a klónban vagy a 18g klónban vagy a 16j klónban fordul elő, vagy hogy a HCV cDNS a 17. ábrán megadott, a –319–1348 vagy a 8659–8866 nukleotid-számok által jelölt szekvencia.

2. Az 1. igénypont szerinti rekombináns polinukleotid, *azzal jellemezve*, hogy egy HCV-epitópot kódol.

3. Rekombináns vektor, *azzal jellemezve*, hogy egy 1. vagy 2. igénypont szerinti polinukleotidot foglal magában.

4. Gazdasejt, *azzal jellemezve*, hogy a 3. igénypont szerinti vektorral van transzformálva.

5. Rekombináns expressziós rendszer, amely az 1. vagy 2. igénypont szerinti rekombináns polinukleotidból levezetett rekombináns DNS egy nyitott leolvasási keretét (ORF) tartalmazza, *azzal jellemezve*, hogy az ORF egy, a kívánt gazdával kompatibilis kontroll-szekvenciához működőképesen kapcsolódik.

6. Sejtek, *azzal jellemezve*, hogy az 5. igénypont szerinti rekombináns expressziós rendszerrel vannak transzformálva.

7. Polipeptid, *azzal jellemezve*, hogy a 6. igénypont szerinti sejtek termelik.

8. Tisztított polipeptid, amely egy HCV cDNS-ben kódolt epitópot tartalmaz, *azzal jellemezve*, hogy a HCV cDNS a 17. ábrán megadott, a –319–1348 vagy a 8659–8866 nukleotid-számok által jelölt szekvencia.

9. Immunogén polipeptid, amelyet egy olyan rekombináns expressziós vektorral transzformált sejtek termelnek, amely a HCV cDNS-ből levezetett DNS nyitott leolvasási keretét (ORF) hordozza, *azzal jellemezve*, hogy a HCV cDNS a CA279a klónban vagy a CA74a klónban vagy a 13i klónban vagy a CA290a klónban vagy a 40b klónban vagy a 33b klónban vagy a 25c klónban vagy a 14c klónban vagy a 33f klónban vagy a 33g klónban vagy a 39c klónban vagy a 15e klónban levő HCV cDNS-szekvencia egyikéből áll és hogy az ORF működőképesen kapcsolódik egy, a kívánt gazdával kompatibilis kontroll-szekvenciához.

10. Peptid, amely egy HCV-epitópot tartalmaz, *azzal jellemezve*, hogy a peptid az

AA_x–AA_y

képletű, ahol x és y jelentése a 17. ábrában megadott aminosav-számokat jelenti, és hogy a peptidet az alábbi csoportból választjuk ki:

AA1–AA25, AA1–AA50, AA1–AA84, AA9–AA177, AA1–AA10, AA5–AA20, AA20–AA25, AA35–AA45, AA50–AA100, AA40–AA90, AA45–AA65, AA65–AA75, AA80–AA90, AA99–AA120, AA95–AA110, AA105–AA120, AA100–AA150, AA150–AA200, AA155–AA170, AA190–AA210, AA200–AA250, AA220–AA240, AA245–AA265, AA250–AA300, AA290–AA330, AA290–AA305, AA300–AA350, AA310–AA330, AA350–AA400, AA380–AA395, AA405–AA495, AA400–AA450, AA405–AA415, AA415–AA425, AA425–AA435, AA437–AA582, AA450–AA500, AA440–AA460, AA460–AA470, AA475–AA495, AA500–AA550, AA511–AA690, AA515–AA550, AA550–AA600, AA550–AA625, AA575–AA605, AA585–AA600, AA600–AA650, AA600–AA625, AA635–AA665, AA650–AA700, AA645–AA680, AA700–AA750,

AA700-AA725, AA700-AA750, AA725-AA775, AA770-AA790, AA750-AA800, AA800-AA815, AA825-AA850, AA850-AA875, AA800-AA850, AA920-AA990, AA850-AA900, AA920-AA945, AA940-AA965, AA970-AA990, AA950-AA1000, AA1000-AA1060, AA1000-AA1025, AA1000-AA1050, AA1025-AA1040, AA1040-AA1055, AA1075-AA1175, AA1050-AA1200, AA1070-AA1100, AA1100-AA1130, AA1140-AA1165, AA1192-AA1457, AA1195-AA1250, AA1200-AA1225, AA1225-AA1250, AA1250-AA1300, AA1260-AA1310, AA1260-AA1280, AA1266-AA1428, AA1300-AA1350, AA1290-AA1310, AA1310-AA1340, AA1345-AA1405, AA1345-AA1365, AA1350-AA1400, AA1365-AA1380, AA1380-AA1405, AA1400-AA1450, AA1450-AA1500, AA1460-AA1475, AA1475-AA1515, AA1475-AA1500, AA1500-AA1550, AA1500-AA1515, AA1515-AA1500, AA1550-AA1600, AA1545-AA1560, AA1569-AA1931, AA1570-AA1590, AA1595-AA1610, AA1590-AA1650, AA1610-AA1645, AA1650-AA1690, AA1685-AA1770, AA1689-AA1805, AA1690-AA1720, AA1694-AA1735, AA1720-AA1745, AA1745-AA1770, AA1750-AA1800, AA1775-AA1810, AA1795-AA1850, AA1850-AA1900, AA1900-AA1920, AA1900-AA1920, AA1916-AA2021, AA1920-AA1940, AA1949-AA2124, AA1950-AA2000, AA1980-AA2000, AA2000-AA2050, AA2005-AA2025, AA2020-AA2045, AA2045-AA2100, AA2045-AA2070, AA2054-AA2223, AA2070-AA2100, AA2100-AA2150, AA2150-AA2200, AA2200-AA2250, AA2200-AA2325, AA2250-AA2330, AA2255-AA2270, AA2265-AA2280, AA2280-AA2290, AA2287-AA2385, AA2300-AA2350, AA2290-AA2310, AA2310-AA2330, AA2330-AA2350, AA2350-AA2400, AA2348-AA2464, AA2345-AA2415, AA2345-AA2375, AA2370-AA2410, AA2371-AA2502, AA2400-AA2450, AA2400-AA2425, AA2415-AA2450, AA2445-AA2500, AA2445-AA2475, AA2470-AA2490, AA2500-AA2550, AA2505-AA2540, AA2535-AA2560, AA2550-AA2600, AA2560-AA2580, AA2600-AA2650, AA2605-AA2620, AA2620-AA2650, AA2640-AA2660, AA2650-AA2700, AA2655-AA2670, AA2670-AA2700, AA2700-AA2750, AA2740-AA2760, AA2750-AA2800, AA2755-AA2780, AA2780-AA2830, AA2785-AA2810, AA2796-AA2886, AA2810-AA2825, AA2800-AA2850, AA2850-AA2900, AA2850-AA2865, AA2885-AA2905, AA2900-AA2950, AA2910-AA2930, AA2925-AA2950, AA2945-vég (C-terminális).

11. Polipeptid, *azzal jellemezve*, hogy egy 10. igénypont szerinti peptidből áll.

12. Immunogén polipeptid, amely egy szilárd szubsztráthoz kapcsolódik, *azzal jellemezve*, hogy a polipeptid egy 7. vagy 8. vagy 9. vagy 10. vagy 11. igénypont szerinti polipeptidnek felel meg, vagy hogy a polipeptid egy HCV cDNS-ben kódolt epitópból áll,

ahol a HCV cDNS a 17. ábrán megadott, a -319-1348 vagy a 8659-8866 nukleotid-számokkal jelölt szekvencia.

13. Monoklonális antitest, amely egy HCV cDNS-ben kódolt epitóp ellen irányul, *azzal jellemezve*, hogy a HCV cDNS egy, a -319-1348 vagy a 8659-8866 nukleotid-számokkal jelölt, 17. ábrán megadott szekvencia, vagy a 13i klónban vagy a 26j klónban vagy a 59a klónban vagy a 84a klónban vagy a CA156e klónban vagy a 167b klónban vagy a pi14a klónban vagy a CA216a klónban vagy a 290a klónban vagy az ag30a klónban vagy a 205a klónban vagy a 18g klónban vagy a 16jh klónban előforduló szekvencia.

14. Tisztított poliklonális antitest-készítmény, amely egy HCV cDNS-ben kódolt epitópot tartalmazó polipeptid ellen irányul, *azzal jellemezve*, hogy a HCV cDNS egy, a -319-1348 vagy a 8659-8866 nukleotid-számokkal jelölt, 17. ábrán megadott szekvencia, vagy a 13i klónban vagy a 26j klónban vagy a CA156e klónban vagy a 167b klónban vagy a pi14a klónban vagy a CA216a klónban vagy a CA290a klónban vagy az ag30a klónban vagy a 205a klónban vagy a 18g klónban vagy a 16jh klónban előforduló szekvencia.

15. Polinukleotid-próba a HCV-hez, *azzal jellemezve*, hogy a próba a -319-1348 vagy a 8659-8866 nukleotid-számokkal jelölt, 17. ábrán megadott HCV cDNS-szekvencia egyikéből, vagy a HCV cDNS-szekvencia komplementeréből levezetett HCV-szekvenciából áll.

16. Kit HCV-ből származó polinukleotidok mintákban való jelenlétének kimutatására, *azzal jellemezve*, hogy egy körülbelül 8 vagy több nukleotidból álló nukleotid-szekvenciát tartalmazó polinukleotid-próbát foglal magában, ahol a nukleotid-szekvencia a HCV cDNS-ből származik, mely a -319-1348 vagy a 8659-8866 nukleotid-számokkal jelölt, 17. ábrán megadott szekvencia, és ahol a polinukleotid-próba egy megfelelő tartóban van elhelyezve.

17. Kit egy HCV-antigén mintákban való jelenlétének kimutatására, *azzal jellemezve*, hogy egy, egy HCV-antigénrel immunológiailag reagáló antitestet tartalmaz, ahol az antigén egy epitópot hordoz, mely a HCV cDNS-ben kódolt, mely a 17. ábrán megadott, -319-1348 vagy a 8659-8866 nukleotid-számokkal jelölt szekvencia, vagy a HCV cDNS a 13i klónban vagy a 26j klónban vagy az 59a klónban vagy a 84a klónban vagy a CA156e klónban vagy a 167b klónban vagy a pi14a klónban vagy a CA216a klónban vagy a CA290a klónban vagy az ag30a klónban vagy a 205a klónban vagy a 18g klónban vagy a 16jh klónban fordul elő.

18. Kit egy HCV-antitest mintákban való jelenlétének kimutatására, *azzal jellemezve*, hogy egy antigén polipeptidet foglal magában, amely egy HCV-epitópot tartalmaz, mely egy HCV cDNS-ben kódolt, amely a 17. ábrán megadott, -319-1348 vagy a 8659-8866 nukleotid-számokkal jelölt szekvencia, vagy a 13i klónban vagy a 26j klónban vagy az 59a klónban vagy a 84a klónban vagy a CA156e klónban vagy a 167b klónban vagy a pi14a klónban vagy a CA290a klónban

vagy az ag30a klónban vagy a 205a klónban vagy a 18g klónban vagy a 16jh klónban fordul elő.

19. Kit egy HCV-antitest mintákban való jelenlétének kimutatására, *azzal jellemezve*, hogy egy antigén polipeptidet foglal magában, amely a CA279a klónban vagy a CA74a klónban vagy a 13i klónban vagy a CA290a klónban vagy a 33c klónban vagy a 40b klónban vagy a 33b klónban vagy a 25c klónban vagy a 14c klónban vagy a 8f klónban vagy a 33f klónban vagy a 39c klónban vagy a 15e klónban lévő HCV cDNS-ből expresszáldott, és ahol az antigén polipeptid egy megfelelő tartóban van elhelyezve.

20. Eljárás egy mintában lévő HCV-nukleinsavak kimutatására, *azzal jellemezve*, hogy:

a) a mintában lévő nukleinsavak reagálnak a HCV kimutatására szolgáló polinukleotid-próbával, ahol a próba a 17. ábrán megadott -319-1348 vagy a 8659-8866 nukleotid-számokkal jelölt szekvenciájú HCV cDNS-szekvenciából származó HCV-szekvenciából áll, és ahol a reakció olyan körülmények között folyik, ami a próba és a minta HCV-nukleinsavja közötti polinukleotid-duplex képződését lehetővé teszi;

b) Az a) lépésben képződött, a próbát is tartalmazó polinukleotid-duplexet detektáljuk.

21. Immunológiai vizsgálat egy HCV-antigén kimutatására, *azzal jellemezve*, hogy:

a) a HCV-antigént feltehetően tartalmazó mintát egy HCV cDNS-ben kódolt HCV-epitóp ellen irányuló antitesttel inkubáljuk, ahol a HCV cDNS a 17. ábrán megadott -319-1348 vagy a 8659-8866 nukleotid-számokkal jelölt szekvencia vagy a 13i klónban vagy a 26j klónban vagy az 59a klónban vagy a 84a klónban vagy a CA156e klónban vagy a 167b klónban vagy a pi14a klónban vagy a CA216a klónban vagy a 290a klónban vagy az ag30a klónban vagy a 205a klónban vagy a 18g klónban vagy a 16jh klónban előforduló szekvencia, és ahol az inkubálás olyan körülmények között történik, amelyek lehetővé teszik az antigén-antitest-komplex megképződését; és

b) Az a) lépésben keletkezett és az antitestet tartalmazó antigén-antitest-komplexet detektáljuk.

22. Immunológiai vizsgálat egy HCV-antigén ellen irányuló antitestek kimutatására, *azzal jellemezve*, hogy:

a) az anti-HCV-antitesteket vélhetően tartalmazó mintát egy, a HCV cDNS-ben kódolt epitópot tartalmazó antigén polipeptiddel inkubáljuk, ahol a HCV cDNS a 17. ábrán megadott -319-1348 vagy a 8659-8866 nukleotid-számokkal jelölt szekvencia vagy a 13i klónban vagy a 26j klónban vagy az 59a klónban vagy a 84a klónban vagy a CA156e klónban vagy a 167b klónban vagy a pi14a klónban vagy a CA216a klónban vagy a CA290a klónban vagy az ag30a klónban vagy a 205a klónban vagy a 18g klónban vagy a 16jh klónban előforduló szekvencia, és ahol az inkubálást olyan körülmények között végezzük, mely az antigén-antitest-komplex kialakulását lehetővé teszi; és

b) az a) lépésben képződött és az antigén-polipeptidet tartalmazó antitest-antigén-komplexet detektáljuk.

23. Immunológiai vizsgálat egy HCV-antigén ellen irányuló antitestek kimutatására, *azzal jellemezve*, hogy:

a) egy anti-HCV-antitesteket vélhetően tartalmazó mintát egy 9. igénypont szerinti polipeptiddel inkubálunk olyan körülmények között, mely az antigén-antitest-komplex képződését lehetővé teszi; és

b) az a) lépésben képződött és az antigén-polipeptidet tartalmazó antitest-antigén-komplexet kimutatjuk.

24. HCV-fertőzés kezelésére szolgáló vakcina, amely egy immunogén polipeptidet foglal magában, mely egy HCV cDNS-ben kódolt HCV-epitópot tartalmaz, *azzal jellemezve*, hogy a HCV cDNS a 17. ábrán megadott -319-1348 vagy a 8659-8866 nukleotid-számokkal jelölt szekvencia, vagy a 13i klónban vagy a 26j klónban vagy az 59a klónban vagy a 84a klónban vagy a CA156e klónban vagy a 167b klónban vagy a pi14a klónban vagy a CA216a klónban vagy a 290a klónban vagy az ag30a klónban vagy a 205a klónban vagy a 18g klónban vagy a 16jh klónban előforduló szekvencia, és hogy az immunogén polipeptid egy farmakológiai hatékony dózisban egy gyógyszerészeti leg elfogadható kötőanyagban van jelen.

25. Eljárás HCV elleni antitestek termelésére, *azzal jellemezve*, hogy egy izolált, a HCV cDNS-ben kódolt epitópot tartalmazó immunogén polipeptidet beadunk egy egyénnek, ahol a HCV cDNS a 17. ábrán megadott -319-1348 vagy a 8659-8866 nukleotid-számokkal jelölt szekvencia, vagy a CA279a klónban vagy a CA74a klónban vagy a 13i klónban vagy a 290a klónban vagy a 33c klónban vagy a 40b klónban vagy a 33b klónban vagy a 25c klónban vagy a 14c klónban vagy a 8f klónban vagy a 33f klónban vagy a 33g klónban vagy a 39c klónban vagy a 15e klónban előforduló szekvencia, és ahol az immunogén polipeptid egy farmakológiai hatékony dózisban egy gyógyszerészeti leg elfogadható kötőanyagban van jelen.

26. „Anti-sense”-polinukleotid, amely a HCV cDNS-ből származik, *azzal jellemezve*, hogy a HCV cDNS az, amelyik a 17. ábrán látható.

27. Eljárás egy tisztított fúziós polipeptid előállítására, *azzal jellemezve*, hogy:

a) előállítunk egy a C100-3 polipeptidet tartalmazó nyers sejt-lizátumot;

b) a nyers sejt-lizátumot olyan mennyiségű acetonnal kezeljük, amely a polipeptidet kicsapja;

c) a kicsapott anyagot izoláljuk és oldhatóvá tesszük;

d) anioncserélő kromatográfiával a C100-3 polipeptidet izoláljuk; és

e) a d) lépés szerint izolált C100-3 polipeptidet géliszűréssel tovább izoláljuk.

28. Eljárás egy HCV-polipeptid előállítására, *azzal jellemezve*, hogy:

a) egy HCV cDNS-ből származó DNS nyílt leolvasási keretét (ORF) tartalmazó rekombináns expressziós rendszerrel transzformált gazdasejtet állítunk elő, ahol a HCV cDNS a 13i klónban vagy a 26j klónban vagy az 59a klónban vagy a 84a klónban vagy a CA156e klónban vagy a 167b klónban vagy a pi14a

klónban vagy a CA216a klónban vagy a CA290a klónban vagy az ag30a klónban vagy a 16jh klónban fordul elő, vagy ahol a HCV cDNS a 17. ábrán megadott -319-1348 vagy a 8659-8866 nukleotid-számokkal jelölt szekvencia, és ahol az ORF működőképesen kapcsolódik a kívánt gazdasejttel kompatibilis kontroll-szekvenciához; és

b) inkubáljuk a gazdasejttel olyan körülmények között, amelyek a HCV-poliipeptid expresszióját lehetővé teszik.

29. Eljárás egy immunogén HCV-poliipeptid előállítására, *azzal jellemezve*, hogy:

a) egy HCV cDNS-ből származó DNS ORF-jét tartalmazó rekombináns expressziós vektorral transzformált gazdasejttel állítunk elő, ahol a HCV cDNS a CA279a klónban vagy a CA74a klónban vagy a 13i klónban vagy a CA290a klónban vagy a 33c klónban vagy a 40b klónban vagy a 33b klónban vagy a 25c klónban vagy a 14c klónban vagy a 8f klónban vagy a 33f klónban vagy a 33g klónban vagy a 39c klónban vagy a 15e klónban lévő HCV cDNS-szekvenciából származó szekvencia, ahol az ORF működőképesen kapcsolódik egy, a gazdasejttel kompatibilis kontroll-szekvenciához; és

b) inkubáljuk a gazdasejttel olyan körülmények között, amelyek a HCV-poliipeptid expresszióját lehetővé teszik.

30. Eljárás egy, egy HCV cDNS szekvenciát magában foglaló rekombináns polinukleotiddal transzformált gazdasejt előállítására, ahol a HCV cDNS a 13i klónban vagy a 26j klónban vagy az 59a klónban vagy a 84a klónban vagy a CA156e klónban vagy a 167b klónban vagy a pi14a klónban vagy a CA216a klónban vagy a CA290a klónban vagy az ag30a klónban vagy a 205a klónban vagy a 18g klónban vagy a 16jh klónban fordul elő, vagy ahol a HCV cDNS a 17. ábrán megadott -319-1348 vagy a 8659-8866 nukleotid-számokkal jelölt szekvencia, *azzal jellemezve*, hogy:

a) egy transzformációra alkalmas gazdasejttel állítunk elő;

b) előállítunk egy rekombináns polinukleotidot; és

c) az a) és b) lépésben leírt anyagokat olyan körülmények között inkubáljuk, mely a gazdasejtnak a polinukleotiddal való transzformációját lehetővé teszi.

31. Eljárás egy HCV cDNS szekvenciából álló rekombináns polinukleotid előállítására, ahol a HCV cDNS a 13i klónban vagy a 26j klónban vagy az 59a klónban vagy a 84a klónban vagy a CA156e klónban vagy a 167b klónban vagy a pi14a klónban vagy a CA216a klónban vagy a 290a klónban vagy az ag30a klónban vagy a 205a klónban vagy a 18g klónban vagy a 16jh klónban fordul elő, ahol a HCV cDNS egy, a -319-1348 vagy a 8659-8866 nukleotid-számokkal jelölt, a 17. ábrán megadott szekvencia, *azzal jellemezve*, hogy:

a) előállítunk egy, a rekombináns polinukleotiddal transzformált gazdasejttel, és

b) izoláljuk a gazdasejtből a polinukleotidot.

32. Eljárás HCV-mentes vér előállítására, *azzal jellemezve*, hogy:

a) előállítunk egy vérpróbát, mely a feltételezett HCV-t és anti-HCV-antitestet tartalmazza;

b) előállítunk egy immunogén polipeptidet a 28. vagy 29. igénypontban megadott módon;

10 c) inkubáljuk az a) lépésben leírt mintát a b) lépés szerinti immunogén polipeptiddel, olyan körülmények között, hogy az antitest-HCV-poliipeptid-komplex megképződjön;

d) kimutatjuk a c) lépésben képződött komplexet; és

15 e) megőrizzük azt a vért, amelynél a d) lépésben komplexet nem detektáltunk.

33. Eljárás HCV-mentes vér előállítására, *azzal jellemezve*, hogy:

20 a) előállítunk nukleinsavat egy vérmintából, mely a feltételezett HCV-polinukleotidot tartalmazza;

b) előállítunk a HCV-hez egy próbát, ahol a próba egy HCV-szekvenciából áll, amely egy HCV cDNS-ből származik, mely a 17. ábrán megadott, -319-1348 vagy 8659-8866 nukleotid-számokkal jelölt szekvencia;

25 c) reagáltatjuk az a)-t a b)-vel olyan körülmények között, mely a próba és a minta HCV-nukleinsava közti polinukleotid-duplex képződését lehetővé teszi;

30 d) kimutatjuk a c) lépésben megképződött és a próbát is tartalmazó polinukleotidot; és

e) megőrizzük azt a vért, amelyben a d) lépésben komplexet nem detektáltunk.

34. Eljárás egy, a monoklonális anti-HCV-antitestet termelő hibridóma előállítására, *azzal jellemezve*, hogy:

35 a) a HCV cDNS-ben kódolt epitópot tartalmazó immunogén polipeptiddel immunizálunk egy egyént, ahol a HCV cDNS a 13i klónban vagy a 26j klónban vagy az 59a klónban vagy a 84a klónban vagy a CA156e klónban vagy a 167b klónban vagy a pi14a klónban vagy a CA216a klónban vagy a CA290a klónban vagy az ag30a klónban vagy a 205a klónban vagy a 18g klónban vagy a 16jh klónban lévő HCV cDNS-ből származik, vagy ahol a HCV cDNS-nek a 17. ábrán megadott, -319-1348 vagy 8659-8866 nukleotid-számokkal jelölt szekvenciája van;

b) egy egyént immunizálunk egy 29. igénypont szerint készített immunogén polipeptiddel;

40 c) immortalizáljuk az immunizált egyénből származó antitestet-termelő sejteket;

50 d) szelektáljuk azokat az immortalizált sejteket, amelyek antitestet termelnek, melyek az a) vagy b) lépés immunogén polipeptidjében lévő HCV-epitóppal reagálnak; és

55 e) szaporítjuk a nevezett immortalizált sejteket.

Translation der DNA 12f

```

1   IlePheLysIleArgMetTyrValGlyGlyValGluHisArgLeuGluAlaAlaCysAsn
   CCATATTTTAAATCAGGATGTACGTGGGAGGGGTCGAACACAGGCTGGAAGCTGCCTGCA
   GGTATAAAATTTTAGTCCCTACATGCACCCCTCCCAGCTTGTGTCCGACCTTCGACGGACGT

61   TrpThrArgGlyGluArgCysAspLeuGluAspArgAspArgSerGluLeuSerProLeu
   ACTGGACGCGGGGCGAACGTTGCGATCTGGAAGACAGGGACAGGTCCGAGCTCAGCCCGT
   TGACCTGCGCCCCCGCTTGCAACGCTAGACCTTCTGTCCCTGTCCAGGCTCGAGTCGGGCA

121  LeuLeuThrThrThrGlnTrpGlnValLeuProCysSerPheThrThrLeuProAlaLeu
   TACTGCTGACCACTACACAGTGGCAGGTCCCTCCCGTGTTCCCTCACAACCCCTACCAGCCT
   ATGACGACTGGTGAATGTGTACCCGTCCAGGAGGGCACAAGGAAGTGTGGGATGGTCGGA

181  SerThrGlyLeuIleHisLeuHisGlnAsnIleValAspValGlnTyrLeuTyrGlyVal
   TGTCACCCGGCCTCATCCACCTCCACCAGAACAATTGTGGACGTGCAGTACTTGTACGGGG
   ACAGGTGGCCCCGAGTAGGTGGAGGTGGTCTTGTACACCTGCACGTCATGAACATGCCCC

-----
241  GlySerSerIleAlaSerTrpAlaIleLysTrpGluTyrValValLeuLeuPheLeuLeu
   TGGGGTCAAGCATCGCGTCCCTGGGCCATTAAAGTGGGAGTACGTCTGTCTCTCTGTTCTTC
   ACCCCAGTTCTGTAGCCAGGACCCGGTAATTACCCCTCATGCAGCAAGAGGACAAAGGAAG

-----
301  LeuAlaAspAlaArgValCysSerCysLeuTrpMetMetLeuLeuIleSerGlnAlaGlu
   TGCTTGACAGACGCGCGCGCTCTGCTCTCTGTTGTGGATGATGCTACTCATATCCCAAGCGG
   ACCAACGTCTGCGCGCGCAGACGAGGACGAACACCTACTACGATGAGTATAGGGTTGCGC

-----
361  AlaAlaLeuGluAsnLeuValIleLeuAsnAlaAlaSerLeuAlaGlyThrHisGlyLeu
   AGGCGGCTTTGGAGAACCTCCGTAATACTTAAATGCAGCATCCCTGGCCGGGACGCACGGTC
   TCCGCCGAACCTCTTGGAGCATTAATGAATTACGTCTGTAGGGACCGGCCCTGCGTCCAG

-----
421  Val
   TTGTATC
   AACATAG

```

1. obra

Translation der DNA KQ-1

1 GlyCysProGluArgLeuAlaSerCysArgProLeuThrAspGlnGlyTrpGly
 CAGCGTGTCCTGAGAGGCTAGCCAGCTGCCGACCCCTTACCGATTTCAGCAGGGCTGGG
 GTCGACAGGACTCTCCGATCGGTGCGACGCTGGGGATGGCTAAAACTGGTCCCGACCC

 1 ProIleSerTyrAlaAsnGlySerGlyProAspGlnArgProTyrCysTrpHisTyrPro
 GCGCTATCAGTTATGCCAACGGAAGCGGCCCCGACCAGCGCCCTTACTGCTGGCAGCTACC
 CGGCATAGTCAATACGGTTGCCCTTCGCCGCGGCTGGTTCGCGGGATGACGACCGTGATGG

 1 ProLysProCysGlyIleValProAlaLysSerValCysGlyProValTyrCysPheThr
 CCCCCAAACCTTGGGTATTGTGCCCGCGAAGAGTGTGTGTGGTCCGGTATATTGCTTCA
 GGGGTTTTGGAACGCCATAACACGGGCGCTTCTCACACACACCAGGCCATATAACGAAGT

 1 ProSerProValValValGlyThrThrAspArgSerGlyAlaProThrTyrSerTrpGly
 CTCCAGCCCCGTGGTGGTGGGAACGACCGACAGTCCGGCGCGCCACCTACAGCTGGG
 GAGGTCGGGGCACCAACCCTTGTGTGGTGTCCAGCCCGCGGGGTGGATGTGACCC

 1 GluAsnAspThrAspValPheValLeuAsnAsnThrArgProProLeuGlyAsnTrpPhe
 GTGAAATGATACGGACGTCTTCTGCTCTTAAACAATACCAGGCCACCGCTGGGCAATTGGT
 CACTTTTACTATGCCCTGCAGAACGAGGAATTGTTATGGTCCGGTGGCGACCCGTAAACCA

 1 GlyCysThrTrpMetAsnSerThrGlyPheThrLysValCysGlyAlaProProCysVal
 TCGGTTGTACCTGGATGAACCTCAACTGGATTACCAAAGTGTGGGAGCGCCTCCTTGTG
 AGCCAACATGGACCTACTTGAGTTGACCTAAGTGGTTTCACACGCCCTCGCGGAGGAACAC

 1 IleGlyGlyAlaGlyAsnAsnThrLeuHisCysProThrAspCysPheArgLysHisPro
 TCATCGGAGGGGCGGGCAACAACCCCTGCACCTGCCCACTGATTGCTTCCGCAAGCATC
 AGTAGCCTCCCCGCCGTTGTGTGGGACGTGACGGGGTGACTAACGAAGCGCTTCGTAG

 1 AspAlaThrTyrSerArgCysGlySerGlyProTrpIleThrProArgCysLeuValAsp
 CGGACGCCACATACTCTCGGTGCGGCTCCGGTCCCTGGATCACACCCAGGTGCCCTGGTCG
 CCTCGGGTGATATGAGAGCCACGCCGAGGCCAGGGACCTAGTGTGGGTCCACGGACACAGC

 1 TyrProTyrArgLeuTrpHisTyrProCysThrIleAsnTyrThrIlePheLysIleArg
 ACTACCCGTATAGGCTTTGGCATTATCCTTGTACCATCACTACACTATATTTAAATCA
 TGATGGGCATATCCGAAACCGTAATAGGAACATGGTAGTTGATGTGATATAAAATTTAGT

 1 MetTyrValGlyGlyValGluHisArgLeuGluAlaAlaCysAsnTrpThrArgGlyGlu
 GGATGTACGTGGGAGGGGTCGAGCACAGGCTGGAAGCTGCCTGCAACTGGACGGGGGGCG
 CCTACATGCACCCCTCCCCAGCTCGTGTCCGACCTTCGACGGACGTTGACCTGCGCCCCCGC

 1 ArgCysAspLeuGluAspArgAspArgSerGluLeuSerProLeuLeuLeuThrThrThr
 AACGTTGCGATCTGGAAGATAGGGACAGGTCCGAGCTCAGCCCGTTACTGCTGACCACTA
 TTGCAACGCTAGACCTTCTATCCCTGTCCAGGCTCGAGTCGGGCAATGACGACTGGTGAT

 1 GlnTrpGlnValLeuProCysSerPheThrThrLeuProAlaLeuSerThrGlyLeuIle
 CACAGTGGCAGGTCTCTCCGTGTTCTTCAACAACCTGCCAGCCTTGTCCACCGGCTCA
 GTGTACCGTCCAGGAGGGCACAAAGGAAGTGTGGGACCGTGGGAACAGGTGCCCGGAGT

 1 HisLeuHisGlnAsnIleValAspValGlnTyrLeuTyrGlyValGlySerSerIleAla
 TCCACCTCCACCAGAACATTGTGGACGTGCAGTACTTGTACGGGGTGGGGTCAAGCATCG
 AGGTGGAGGTGCTTGTGAACACTGCACGTCATGAACATGCCCCACCCAGTCTCGTAGC

 1 SerTrpAlaIleLysTrpGluTyrValValLeuLeuPheLeuLeuAlaAspAlaArg
 CGTCTCTGGGCATTAAGTGGGAGTACGTCTCTCTCTGTTCTCTGCTTGCAGACGGCG
 GCAGGACCCGGTAATTCACCTCATCGACGAGGAGGACAAAGGAAGACGAACGCTCTGGCG

ValCysSerCysLeuTrpMetMetLeuLeuIleSerGlnAlaGluAlaAlaLeuGluAsn
841 GCGTCTGCTCCTGCTTGTGGATGATGCTACTCATATCCCAAGCGGAACCGGCTTTGGAGA
CGCAGACGAGGACGAACACCTACTACGATGAGTATAGGGTTCGCCTTCGCCGAAACCTCT

LeuValIleLeuAsnAlaAlaSerLeuAlaGlyThrHisGlyLeuValSerPheLeuVal
901 ACCTCGTAATACTTAATGCAGCATCCCTGGCCGGGACGCACGGTCTTGTATCCTTCCTCG
TGGAGCATTATGAATTACGTCGTAGGGACCGGCCCTGCGTGCCAGAACATAGGAAGGAGC

PhePheCysPheAlaTrpTyrLeuLysGlyLysTrpValProGlyAlaValTyrThrPhe
961 TGTTCCTTCTGCTTTGCAATGGTATCTGAAGGGTAAGTGGGTGCCCGGAGCGGTCTACACCT
ACAGAAGACGAAACGTACCATAGACTTCCCATTCAACCCACGGGCCTCGCCAGATGTGGA

TyrGlyMetTrpProLeuLeuLeuLeuLeuAlaLeuProGlnArgAlaTyrAlaLeu
1021 TCTACGGGATGTGGCCTCTCCTCCTGCTCCTGTTGGCGTTGCCCGAGCGGGCGTACGCGC
AGATGCCCTACACCGGAGAGGAGGAGGACGAGACAACCGCAACGGGGTCCGCCGATGCGCG

AspThrGluValAlaAlaSerCysGlyGlyValValLeuValGlyLeuMetAlaLeuThr
1081 TGGACACGGAGGTGCCCGCGTCGTGTGGCGGTGTTGTTCTCGTCGGGTTGATGGCGCTAA
ACCTGTGCCTCCACCGGCGCAGCACACCGCCACAACAGAGCAGCCCACTACCGCGATT

LeuSerProTyrTyrLysArgTyrIleSerTrpCysLeuTrpTrpLeuGlnTyrPheLeu
1141 CTCTGTCACCATATTACAAGCGCTATATCAGCTGGTGCTTGTGGTGGCTTCAGTATTTTC
GAGACAGTGGTATAATGTTCGCGATATAGTCGACCACGAACACCACCGAAGTCATAAAG

ThrArgValGluAlaGlnLeuHisValTrpIleProProLeuAsnValArgGlyGlyArg
1201 TGACCAGAGTGGAAGCGCAACTGCACGTGTGGATTCCCCCCTCAACGTCCGAGGGGGGC
ACTGGTCTCACCTTCGCGTTGACGTGCACACCTAAGGGGGGAGTTGCAGGCTCCCCCGC

AspAlaValIleLeuLeuMetCysAlaValHisProThrLeuValPheAspIleThrLys
1261 GCGACGCTGTCTACTTACTCATGTGTGCTGTACACCCGACTCTGGTATTTGACATCACCA
CGCTGCCACAGTAGAATGAGTACACACGACATGTGGGCTGAGACCATAAACTGTAGTGGT

LeuLeuLeuAlaValPheGlyProLeuTrpIleLeuGlnAla
1321 AATTGCTGCTGGCCGTCTTCGGACCCCTTTGGATTCTTCAGCCAG
TTAACGACGACCGGCAGAAAGCCTGGGGAAACCTAAGAGTTTCGGTC

2-2 ábra

```

-----
1  GlyAlaGlyLysArgValTyrTyrLeuThrArgAspProThrThrProLeuAlaArgAla
   CGGCGCTGGAAAGAGGGTCTACTACCTCACCCGTGACCCTACAAACCCCTCGCGAGAGC
   CCGCGACCTTCTCTCCAGATGATGGAGTGGGCACTGGGATGTTGGGGGGAGCGCTCTCG

61  AlaTrpGluThrAlaArgHisThrProValAsnSerTrpLeuGlyAsnIleIleMetPhe
   TCCGTGGGAGACAGCAAGACACACTCCAGTCAATTCTGGCTAGGCAACATAATCATGTT
   ACGCACCTCTGTCTTCTGTGTGAGGTCAGTTAAGGACCGATCCGTTGTATTAGTACAA

-----
121  AlaProThrLeuTrpAlaArgMetIleLeuMetThrHisPhePheSerValLeuIleAla
   TGCCCCACACCTGTGGGCGAGGATGATACTGATGACCCATTTCTTTAGCGTCCTTATAGC
   ACGGGGGTGTGACACCCGCTCTTACTATGACTACTGGGTAAAGAAATCGCAGGAATATCG

181  ArgAspGlnLeuGluGlnAlaLeuAspCysGluIleTyrGlyAlaCysTyrSerIleGlu
   CAGGGACCAGCTTGAACAGGCCCTCGATTGCGAGATCTACGGGGCCCTGCTACTCCATAGA
   GTCCCTGGTCTGAACCTTGTCCGGGAGCTAACGCTCTAGATGCCCCGGACGATGAGGTATCT

241  ProLeuAspLeuProProIleIleGlnArgLeu
   ACCACTTGATCTACCTCCAATCATTCAAAGACTC
   TGGTGAACCTAGATGGAGGTTAGTAAGTTTCTGAG

```

3. abra

Translation der DNA 26j

```

1  LeuPheTyrHisHisLysPheAsnSerSerGlyCysProGluArgLeuAlaSerCysArg
   GCTTTTCTATCACCACAAGTTCAACTCTTCAGGCTGTCCTGAGAGGCTAGCCAGCTGCCG
   CGAAAAGATAGTGGTGTTCAGTTGAGAAGTCCGACAGGACTCTCCGATCGGTTCGACGGC

61  ProLeuThrAspPheAspGlnGlyTrpGlyProIleSerTyrAlaAsnGlySerGlyPro
   ACCCCTTACCGATTTTGACCAGGGCTGGGGCCCTATCAGTTATGCCAACGGAAGCGGGCC
   TGGGGAATGGCTAAAACTGGTCCCGACCCCGGGATAGTCAATACGGTTGCCTTCGCCGGG

121  AspGlnArgProTyrCysTrpHisTyrProProLysProCysGlyIleValProAlaLys
   CGACCAGCGCCCCCTACTGCTGGCACTACCCCCAAAACCTTGCGGTATTGTGCCCGCGAA
   GCTGGTTCGGGGGATGACGACCGTGATGGGGGGTTTTTGAACGCCATAACACGGGCGCTT

-----Überlappung mit 13i-----
181  SerValCysGlyProValTyrCysPheThrProSerProValValVal
   GAGTGTGTGTGGTCCGGTATATTGCTTCACTCCCAGCCCCGTGGTGGTGGG
   CTCACACACACCAGGCCATATAACGAAGTGAGGGTCGGGGCACCAACACCC

```

5. abra

Translation der DNA 131

ProSerProValValValGlyThrThrAspArgSerGlyAlaProThrTyrSerTrpGly
1 CTCCCAGCCCCGTGGTGGTGGGAACGACCGACAGGTCCGGGCGGCCTACCTACAGCTGGG
GAGGGTCGGGGCACCACCACCCTTGCTGGCTGTCCAGCCCCGCGGGATGGATGTCGACCC

GluAsnAspThrAspValPheValLeuAsnAsnThrArgProProLeuGlyAsnTrpPhe
61 GTGAAAATGATACGGACGTCTTCGTCCTTAACAATACCAGGCCACCGCTGGGCAATTGGT
CACTTTTACTATGCCTGCAGAAGCAGGAATTGTTATGGTCCGGTGGCGACCCGTTAACCA

GlyCysThrTrpMetAsnSerThrGlyPheThrLysValCysGlyAlaProProCysVal
121 TCGGTTGTACCTGGATGAACTCAACTGGATTACCAAAGTGTGCGGAGCGCCTCCTTGTTG
AGCCAACATGGACCTACTTGAGTTGACCTAAGTGGTTTCACACGCCCTCGCGGAGGAACAC

IleGlyGlyAlaGlyAsnAsnThrLeuHisCysProThrAspCysPheArgLysHisPro
181 TCATCGGAGGGGCGGGCAACAACACCCCTGCACTGCCCCACTGATTGCTTCCGCAAGCATC
AGTAGCCTCCCCGCCCCGTTGTTGTGGGACGTGACGGGGTGACTAACGAAGGCGTTCCGTAG

AspAlaThrTyrSerArgCysGlySerGlyProTrpLeuThrProArgCysLeuValAsp
241 CGGACGCCACATACTCTCGGTGCGGCTCCGGTCCCTGGCTCACACCCAGGTGCCTGGTCCG
GCCTGCGGTGTATGAGAGCCACGCCGAGGCCAGGGACCGAGTGTGGGTCCACGGACCAGC

TyrProTyrArgLeuTrpHisTyrProCysThrIleAsnTyrThrIlePheLysIleArg
301 ACTACCCGTATAGGCTTTGGCATTATCCTTGTACCATCAACTACACCATATTTAAATCA
TGATGGGCATATCCGAAACCGTAATAGGAACATGGTAGTTGATGTGGTATAAATTTTAGT

MetTyrValGlyGlyValGluHisArgLeuGluAlaAlaCysAsnTrpThrArgGlyGlu
361 GGATGTACGTGGGAGGGGTCGAGCACAGGCTGGAAGCTGCCTGCAACTGGACGCGGGGCG
CCTACATGCACCCTCCCCAGCTCGTGTCCGACCTTCGACGGACGTTGACCTGCGCCCCCG

-----Überlappung mit 12F-----
ArgCysAspLeuGluAspArgAspArgSerGluLeuSerProLeuLeuLeuThrThrThr
421 AACGTTGCGATCTGGAAGACAGGGACAGGTCCGAGCTCAGCCCGTTACTGCTGACCACTA
TTGCAACGCTAGACCTTCTGTCCCTGTCCAGGCTCGAGTCGGGCAATGACGACTGGTGTAT

GlnTrpGlnValLeuProCysSerPheThrThrLeuProAlaLeuSerThrGlyLeu
481 CACAGTGGCAGGTCCCTCCCGTGTTCCTTCACAACCCCTGCCAGCCTTGTCCACCGGCCCTCA
GTGTCACCGTCCAGGAGGGCACAAAGCAAGTGTGGGACGGTCGGAACAGGTGGCCCGAGT

4. obra

Translation der DNA CA59a

```

1  LeuValMetAlaGlnLeuLeuArgIleProGlnAlaIleLeuAspMetIleAlaGlyAla
   TTGGTAATGGCTCAGCTGCTCCGGATCCCACAAGCCATCTTGGACATGATCGCTGGTGCT
   AACCATTACCGAGTCGACGAGGCCTAGGGTGTTCGGTAGAACCTGTACTAGCGACCACGA

61  HisTrpGlyValLeuAlaGlyIleAlaTyrPheSerMetValGlyAsnTrpAlaLysVal
   CACTGGGGAGTCCCTGGCGGGCATAGCGTATTTCTCCATGGTGGGGAAC TGGGCGAAGGTC
   GTGACCCCTCAGGACCGCCCGTATCGCATAAAGAGGTACCACCCCTTGACCCGCTTCCAG

121  LeuValValLeuLeuLeuPheAlaGlyValAspAlaGluThrHisValThrGlyGlySer
   CTGGTAGTGCTGCTGCTATTTGCCGGCGTCGACGCGGAAACCCACGTCACCGGGGGAAGT
   GACCATCACGACGACGATAAACGGCCGCAGCTGCGCCTTTGGGTGCAGTGGCCCCCTTCA

181  AlaGlyHisThrValSerGlyPheValSerLeuLeuAlaProGlyAlaLysGlnAsnVal
   GCCGGCCACACTGTGTCTGGATTTGTTAGCCTCCTCGCACCAGGCGCCAAGCAGAACGTC
   CGGCCGGTGTGACACAGACCTAAACAATCGGAGGAGCGTGGTCCGCGGTTCGTCTTGACG

241  GlnLeuIleAsnThrAsnGlySerTrpHisLeuAsnSerThrAlaLeuAsnCysAsnAsp
   CAGCTGATCAACACCAACGGCAGTTGGCACCTCAATAGCACGGCCCTGAACTGCAATGAT
   GTCGACTAGTTGTGGTTGCCGTCAACCGTGGAGTTATCGTGCCGGGACTTGACGTTACTA

301  SerLeuAsnThrGlyTrpLeuAlaGlyLeuPheTyrHisHisLysPheAsnSerSerGly
   AGCCTCAACACCGGCTGGTTGGCAGGGCTTTTCTATCACCACAAGTTCAACTCTTCAGGC
   TCGGAGTTGTGGCCGACCAACCGTCCCGAAAAGATAGTGGTGTTCAGTTGAGAAGTCCG
   -----Überlappung mit 26j-----

-----Überlappung mit K9-1-----
361  CysProGluArgLeuAlaSerCysArgPro
   TGTCTTGAGAGGCTAGCCAGCTGCCGACCCC
   ACAGGACTCTCCGATCGGTTCGACGGCTGGGG
   -----

```

6. abra

Translation der DNA CA81a

GlnGlyCysAsnCysSerIleTyrProGlyHisIleThrGlyHisArgMetAlaTrpAsp
1 CGCAAGGTTGCAATTGCTCTATCTATCCCGGCCATATAACGGGTCACCGCATGGCATGGG
CCGTTCCAACGTTAACGAGATAGATAGGGCCGGTATATTGCCAGTGCGGTACCGTACCC

MetMetMetAsnTrpSerProThrThrAlaLeuValMetAlaGlnLeuLeuArgIlePro
61 ATATGATGATGAACCTGGTCCCCCTACGACGGCGTTGGTAATGGCTCAGCTGCTCCGGATCC
TATACTACTACTTGACCAGGGGATGCTGCCCGCAACCATTACCGAGTCGACGAGGCCTAGG

GlnAlaIleLeuAspMetIleAlaGlyAlaHisTrpGlyValLeuAlaGlyIleAlaTyr
121 CACAAGCCATCTTGGACATGATCGCTGGTGCTCACTGGGGAGTCTTGGCGGGCATAGCGT
GTGTTCCGGTAGAACCTGTACTAGCGACCACGAGTGACCCCTCAGGACCGCCCGTATCGCA

-----Überlappung mit CA59a-----
PheSerMetValGlyAsnTrpAlaLysValLeuValValLeuLeuLeuPheAlaGlyVal
181 ATTTCTCCATGGTGGGGAACCTGGGCGAAGGTCCTGGTAGTGCTGCTGCTATTTGCCGGCG
TAAAGAGGTACCACCCCTTGACCCGCTTCCAGGACCATCAGCAGCAGGATAAACCGCCCG

AspAlaGluThrHisValThrGly
241 TCGACGCGGAAACCCACGTCACCGGGG
AGCTGCGCCTTTGGGTGCAGTGGCCCC

7. abra

Translation der DNA CA156e

CysTrpValAlaMetThrProThrValAlaThrArgAspGlyLysLeuProAlaThrGln
1 GTGTTGGGTGGCGATGACCCCTACGGTGGCCACCAGGGATGGCAAACCTCCCCGCGACGCA
CACAACCCACCGCTACTGGGGATGCCACCGGTGGTCCCTACCGTTTGAGGGGCGCTGCGT

LeuArgArgHisIleAspLeuLeuValGlySerAlaThrLeuCysSerAlaLeuTyrVal
61 GCTTCGACGTACATCGATCTGCTTGTGCGGAGCGCCACCCTCTGTTCCGGCCCTCTACGT
CGAAGCTGCAGTGTAGCTAGACGAACAGCCCTCGCGGTGGGAGACAAGCCGGGAGATGCA

GlyAspLeuCysGlySerValPheLeuValGlyGlnLeuPheThrPheSerProArgArg
121 GGGGGACCTATGCGGGTCTGTCTTTCTTGTGCGCCAACTGTTACCTTCTCTCCAGGCG
CCCCCTGGATACGCCCAGACAGAAAGAACAGCCGGTTGACAAGTGAAGAGAGGGTCCGC

HisTrpThrThrGlnGlyCysAsnCysSerIleTyrProGlyHisIleThrGlyHisArg
181 CCACTGGACGACGCAAGGTTGCAATTGCTCTATCTATCCCGGCCATATAACGGGTCACCG
GGTGACCTGCTGCGTTCCAACGTTAACGAGATAGATAGGGCCGGTATATTGCCAGTGCC

-----Überlappung mit CA84a-----
MetAlaTrpAspMetMetMetAsnTrpSerProThrThrAlaLeuValValAlaGlnLeu
241 CATGGCATGGGATATGATGATGAACCTGGTCCCCCTACGACGGCGTTGGTAGTGGCTCAGCT
GTACCGTACCCTATACTACTACTTGACCAGGGGATGCTGCCCGCAACCATCACCGAGTCCA

LeuArgIleProGlnAla
301 GCTCCGGATCCCACAAGCC
CGAGGCCTAGGGTGTTCCG

8. abra

Translation der DNA CA167b

```

      SerThrGlyLeuTyrHisValThrAsnAspCysProAsnSerSerIleValTyrGluAla
1  CTCCACGGGGCTTTACCAACGTCACCAATGATTGCCCTAACTCGAGTATTGTCTACGAGGC
   GAGGTGCCCCGAAATGGTGACAGTGGTTACTAACGGGATTGAGCTCATACACATGCTCCG

      AlaAspAlaIleLeuHisThrProGlyCysValProCysValArgGluGlyAsnAlaSer
61 GGCCGATGCCATCCTGCACACTCCGGGGTGCGTCCCTTGCGTTCGTGAGGGCAACGCCTC
   CCGGTACGGTAGGACGTGTGAGGCCCCACGCAGGGAACGCAAGCACTCCCGTTGCGGGAG

-----
      ArgCysTrpValAlaMetThrProThrValAlaThrArgAspGlyLysLeuProAlaThr
121 GAGGTGTTGGGTGGCGATGACCCCTACGGTGGCCACCAGGGATGGCAAACCTCCCCGCGAC
   CTCCACAACCCACCGCTACTGGGGATGCCACCGGTGGTCCCTACCGTTTGAGGGGCGCTG

      -----Überlappung mit CA156-----
      GlnLeuArgArgHisIleAspLeuLeuValGlySerAlaThrLeuCysSerAlaLeuTyr
181 GCAGCTTCGACGTCACATCGATCTGCTTGTCGGGAGCGCTACCCTCTGTTTCGGCCCTCTA
   CGTCGAAGCTGCAGTGTAGCTAGACGAACAGCCCTCGCGATGGGAGACAAGCCGGGAGAT

-----
      ValGlyAspLeuCysGlySerValPheLeu
241 CGTGGGGGACTTGTGCGGGTCTGTCTTTCTTG
   GCACCCCTGAACACGCCCAGACAGAAAGAAC
```

9. obra

Translation der DNA ssCA216a

ArgArgArgSerArgAsnLeuGlyLysValIleAspThrLeuThrCysGlyPheAlaAsp
1 CCCGGCGTAGGTCGCGCAATTTGGGTAAAGGTCATCGATACCCTTACGTGCGGCTTCGCCG
GGGCGCATCCAGCGCGTTAAACCCATTCCAGTAGCTATGGGAATGCACGCCGAAGCGGC

LeuMetGlyTyrIleProLeuValGlyAlaProLeuGlyGlyAlaAlaArgAlaLeuAla
61 ACCTCATGGGGTACATACCGCTCGTCGGCGCCCTCTTGGAGGCGCTGCCAGGGCCCTGG
TGGAGTACCCCATGTATGGCGAGCAGCCGCGGGGAGAACCTCCGCGACGGTCCCGGGACC

HisGlyValArgValLeuGluAspGlyValAsnTyrAlaThrGlyAsnLeuProGlyCys
121 CGCATGGCGTCCGGGTTCTGGAAGACGGCGTGAACATGCAACAGGGAACCTTCCTGGTT
GCGTACCGCAGGCCCAAGACCTTCTGCCGCACTTGATACGTTGTCCCTTGGAAAGGACCAA

SerPheSerIlePheLeuLeuAlaLeuLeuSerCysLeuThrValProAlaSerAlaTyr
181 GCTCTTTCTCTATCTTCCTTCTGGCCCTGCTCTCTTGCTTGACTGTGCCCCGCTTCGGCCT
CGAGAAAGAGATAGAAGGAAGACCGGGACGAGAGAACGAACAGACAGGGCGAAGCCGGA

GlnValArgAsnSerThrGlyLeuTyrHisValThrAsnAspCysProAsnSerSerIle
241 ACCAAGTGCAGCAACTCCACGGGGCTTTACCACGTCACCAATGATTGCCCTAACTCGAGTA
TGGTTACGCGTTGAGGTGCCCCGAATGGTGCACTGGTTACTAACGGGATTGAGCTCAT

-----Überlappung mit CA167b-----
ValTyrGluAlaAlaAspAlaIleLeuHisThrProGlyCysValProCysValArgGlu
301 TTGTGTACGAAGCGGCCGATGCCATCCTGCACACTCCGGGGTGCGTCCCTTGCGTTTCGTG
AACACATGCTTCGCCGGCTACGGTAGGACGTGTGAGGCCCCACGCAGGGAACGCAAGCAC

GlyAsnAlaSerArgCysTrpValAlaMetThrProThrValAla
361 AGGGCAACGCCTCGAGGTGTTGGGTGGCGATGACCCCTACGGTGGCC
TCCCGTTGCGGAGCTCCACAACCCACCGCTACTGGGGATGCCACCGG

10. abra

Translation der DNA ssCA290a

LysLysAsnLysArgAsnThrAsnArgArgProGlnAspValLysPheProGlyGlyGly
 1 AAAAAAAAAACAAACGTAAACACCAACCGTCGCCCACAGGACGTCAMGTTCCCGGGTGGCG
 TTTTTTTTTTGTTCATTGTGGTTGGCAGCGGGTGTCTTGCAGTTCAAGGGCCCACCGC

 GlnIleValGlyGlyValTyrLeuLeuProArgArgGlyProArgLeuGlyValArgAla
 61 GTCAGATCGTTGGTGGAGTTTACTTGTGCGCGCAGGGGCCCTAGATTGGGTGTGCGCG
 CAGTCTAGCAACCACCTCAAATGAACAACGGCGCGTCCCCGGGATCTAACCCACACGCGC

 ThrArgLysThrSerGluArgSerGlnProArgGlyArgArgGlnProIleProLysAla
 121 CGACGAGAAAGACTTCCGAGCGGTTCGCAACCTCGAGGTAGACGCCAGCCTATCCCCAAGG
 GCTGCTCTTTCTGAAGGCTCGCCAGCGTTGGAGCTCCATCTGCGGTCCGATAGGGGTTC

 ArgArgProGluGlyArgThrTrpAlaGlnProGlyTyrProTrpProLeuTyrGlyAsn
 181 CTCGTCGGCCCCGAGGGCAGGACCTGGGCTCAGCCCCGGGTACCCTTGGCCCCCTCTATGGCA
 GAGCAGCCGGGCTCCCGTCTGGACCCGAGTCGGGCCCATGGGAACCGGGGAGATACCGT

 GluGlyCysGlyTrpAlaGlyTrpLeuLeuSerProArgGlySerArgProSerTrpGly
 241 ATGAGGGCTGCGGGTGGGCGGGATGGCTCCTGTCTCCCCGTGGCTCTCGGCCTAGCTGGG
 TACTCCCCGACGCCCCACCGGCCCTACCGAGGACAGAGGGGCACCGAGAGCCGGATCGACCC

 ProThrAspProArgArgArgSerArgAsnLeuGlyLysValIleAspThrLeuThrCys
 301 GCCCCACAGACCCCCGGCGTAGGTTCGCGCAATTTGGGTAAGGTCATCGATACCCTTACGT
 CGGGGTGTCTGGGGGCCGCATCCAGCGCGTTAAACCCATTCCAGTAGCTATGGGAATGCA

 GlyPheAlaAspLeuMetGlyTyrIleProLeuValGlyAlaProLeuGlyGlyAlaAla
 361 TCGGCTTCGCGGACCTCATGGGGTACATACCGCTCGTCGGCGCCCCCTCTGGAGGCGCTG
 CGCCGAAGCGGCTGGAGTACCCCATGTATGGCGAGCAGCCGCGGGGAGAACCTCCGCGAC

 -----Überlappung mit CA216a-----
 ArgAlaLeuAlaHisGlyValArgValLeuGluAspGlyValAsnTyrAlaThrGlyAsn
 421 CCAGGGCCCTGGCGCATGGCGTCCGGGTCTGGAAGACGGCGTGAACATGCAACAGGGA
 GGTCCCGGGACCGCGTACCGCAGGCCCCAAGACCTTCTGCCGCACTTGATACGTTGTCCCT

 LeuProGlyCysSerPheSerThrPhe
 481 ACCTTCCTGGTTGCTCTTTCTCTACCTTC
 TGAAGGACCAACGAGAAAGAGATGGAAG

11. abra

Translation der DNA seq30a

```

#MetSerValValGlnProProGlyProProLeu
#MetAlaLeuValOP
1  CGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTGGTGCAGCCTCCAGGACCCCCC
   GCGTCTTTTCGCAGATCGGTACCGCAATCATACTCACAGCAGCTCCGAGGTCTCTGGGGGG
   ProGlyGluProAM

61  TCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCCAGGACGAC
   AGGGCCCTCTCGGTATCACAGACGCCCTTGGCCACTCATGTGGCCTTAACGGTCTCTGCTG

#MetProGlyAspLeuGlyValProProGlnAsp
121 CGGGTCTCTTTCTTGGATCAACCCGCTCAATGCCCTGGAGATTGGGCGTGCCCCCGCAAGA
   GCGCAGCAAGAACCTAGTTGGCGGAGTTACGCACCTCTAAACCCGCACGGGGCGTTCT
   CysAM                                OP AM GlyAlaCys

181 CTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGTGCGGAAGGCCCTTGTGGTACTGCCCTGATAGGGTGCCT
   GACGATCGGCTCATCAACCCAGCGCTTTCCGGAACACCATGACGGACTATCCACGAA
   GluCysProGlyArgSerArgArgProCysThrMetSerThrAsnProLysProGlnLys

241 GCGAGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGACCATGAGCACGAATCCTAAACCTCAAA
   CGCTCACGGGGCCCTCCAGAGCATCTGGCACGTGGTACTCGTGCTTAGGATTTGGAGTTT
   LysAsnLysArgAsnThrAsnArgArgProGlnAspValLysPheProGlyGlyGlyGln

-----
301 AAAAAACAAACGTAACACCAACCGTCGCCCCACAGGACGTCAAGTTCCCGGGTGGCGGT
   TTTTITTTGTTTGCATTGTGGTTGGCAGCGGTGTCTCTGCAGTTCAAGGGCCACCGCCAG
   IleValGlyGlyValTyrLeuLeuProArgArgGlyProArgLeuGlyValArgAlaThr

-----
361 AGATCGTTGGTGGAGTTTACTTGTGGCGGCAGGGGCCCTAGATTGGGTGTGCGCGCA
   TCTAGCAACCACTCAAAATGAACACGGCGGTCCCCGGGATCTAACCACACGCGCGCT
   ArgLysThrSerGluArgSerGlnProArgGlyArgArgGlnProIleProLysAlaArg

-----
421 CGAGAAAGACTTCCGAGCGGTGCAACCTCGAGGTAGACGTCAGCCTATCCCCAAGGCTC
   GCTCTTTCTGAAGGCTCGCCAGCGTTGGAGCTCCATCTGCAGTCGGATAGGGGTTCGAG
   ArgProGluGlyArgThrTrpAlaGlnProGlyTyrProTrpProLeuTyrGlyAsnGlu

-----Überlappung mit CA290a-----
481 GTCGGCCCGAGGGCAGGACCTGGGCTCAGCCCGGGTACCCTTGGCCCCCTCTATGGCAATG
   CAGCCGGGCTCCCGTCTCTGGACCCGAGTCGGGCCCCATGGGAACCGGGGAGATACCGTTAC
   GlyCysGlyTrpAlaGlyTrpLeuLeuSerProArgGlySerArgProSerTrpGlyPro

-----
541 AGGGCTCCGGGTGGGCGGGATGGCTCCTGTCTCCCGTGGCTCTCGCCCTAGCTGGGGCC
   TCCCGACGCCACCCGCCCTACCGAGGACAGAGGGGCACCGAGAGCCGGATCGACCCCGG
   ThrAspProArgArgArgSerArgAsnLeuGlyLysValIleAspThrLeuThrCysGly

```

12-1. abra

601 CCACAGACCCCGGCGTAGGTCGCGCAATTTGGGTAAAGTCATCGATACCCCTTACGTGCC
GGTGTCTGGGGGCCGCATCCAGCGCGTTAAACCCATTCAGTAGCTATGGGAATGCACGC

Phe

661 GCTTC
CGAAG

- * - Start des langen HCV-ORF
- | - putative erste Aminosäure langer HCV-Polyproteine
- # - Putative, kleine, kodierte Peptide (die eine Translations-
Regulations-Rolle spielen können)

12-2. obra

Translation der DNA CA205a

ValLeuGlyArgGluArgProCysGlyThrAlaOP AM GlyAlaCysGluCysProGly
1 GTCTTGGGTCGCGAAAGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAGGGTGCTTGGAGTGCCCCGGG
CAGAACCCAGCGCTTTCGGGAACACCATGACGGACTATCCCACGAACGCTCACGGGGCCC

*
61 ArgSerArgArgProCysThrMetSerThrAsnProLysProGlnArgLysThrLysArg
AGGTCTCGTAGACCGTGCACCATGAGCACGAATCCTAACCTCAAAGAAAAACCAACGT
TCCAGAGCATCTGGCACGTGGTACTCGTGCTTAGGATTTGGAGTTTCTTTTGGTTTGCA

121 AsnThrAsnArgArgProGlnAspValLysPheProGlyGlyGlyGlnIleValGlyGly
AACACCAACCGTCGCCCCACAGGACGTCAAGTTCCCCGGGTGGCGGTCTAGATCGTTGGTGGA
TTGTGCTTGGCAGCGGGTGTCCTGCAGTTCAAGGGCCCACCGCCAGTCTAGCAACCACT

181 ValTyrLeuLeuProArgArgGlyProArgLeuGlyValArgAlaThrArgLysThrSer
GTTTACTTGTGCGCGCAGGGGCCCTAGATTGGGTGTGCGCGCGACGAGAAAGACTTCC
CAATGAACAACGGCGCGTCCCCGGCATCTAACCCACACGCGCGCTCCTCTTCTGAAGG

-----Überlappung mit CA290a-----
241 GluArgSerGlnProArgGlyArgArgGlnProIleProLysAlaArgArgProGluGly
GAGCGGTCGCAACCTCGAGGTAGACGTACGCCTATCCCCAAGGCTCGTCGGCCCCGAGGGC
CTCGCCAGCGTTGGAGCTCCATCTGCAGTCGGATAGGGGTTCGAGCAGCCGGGCTCCCC

301 ArgThrTrpAlaGlnProGlyTyrProTrpProLeuTyrGlyAsnGluGlyCys
AGGACCTGGGCTCAGCCCCGGTACCCTTGGCCCCCTCTATGGCAATGAGGGCTGCG
TCCTGGACCCGAGTCGGGCCCCATGGGAACCGGGGAGATACCGTTACTCCCCGACGC

* = putatives Initiator-Methionin-Kodon

13. abra

Translation der DNA 18g

```

#ProProOP
#SerThrMetAsnHisSerProValArgAsnTyrCysLeuHisAlaGluSerValAM Pro
#LeuHisHisGluSerLeuProCysGluGluLeuLeuSerSerArgArgLysArgLeuAla
1 CTCCACCATGAATCACTCCCCCTGTGAGGAAGTACTGTCTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCC
  GAGGTGGTACTTAGTGAGGGGACACTCCTTGATGACAGAAGTGCGTCTTTCGCAGATCGG
-----
#MetSerValValGlnProProGlyProProLeuProGlyGluProAM
MetAlaLeuValOP
61 ATGGCGTTAGTATGAGTGTGCGTGACGCCTCCAGGACCCCCCTCCCGGGAGAGCCATAGT
  TACCGCAATCATACTCACAGCACGTCGGAGGTCTTGGGGGGGAGGGCCCTCTCGGTATCA
-----
121 GGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCCTTTCTTGGATC
  CCAGACGCCTTGGCCACTCATGTGCGCTTAACGGTCCTGCTGCCCCAGGAAGAACCTAG
-----
#MetProGlyAspLeuGlyValProProGlnAspCysAM
181 AACCCGCTCAATGCCTGGAGATTTGGGCGTGCCCCCGCAAGACTGCTAGCCGAGTAGTGT
  TTGGGCGAGTTACGGACCTCTAAACCCGCACGGGGGCGTTCTGACGATCGGCTCATCACA
-----
OP AM GlyAlaCysGluCysProGlyArgSer
*
241 TGGGTGCGGAAAGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAGGGTGCTTGCGAGTGCCCCGGGAGGT
  ACCCAGCGCTTTCGGGAACACCATGACGGACTATCCCACGAACGCTCACGGGGCCCTCCA
-----
ArgArg
301 CTCGTAGA
  GAGCATCT

```

* = Start des langen HCV-ORF
= Putative, kleine, kodierte Peptide (die eine Trans-
lations-Regulations-Rolle spielen können)

14. abra

Translation der DNA 16jh

-----Overlap with 15e -----
1 GlyAlaCysTyrSerIleGluProLeuAspLeuProProIleIleGlnArgLeuHisGly
GGGGCCTGCTACTCCATAGAACCACTGGATCTACCTCCAATCATTCAAAGACTCCATGGC
CCCCGGACGATGAGGTATCTTGGTGACCTAGATGGAGGTTAGTAAGTTTCTGAGGTACCG
61 LeuSerAlaPheSerLeuHisSerTyrSerProGlyGluIleAsnArgValAlaAlaCys
CTCAGCGCATTTTCACTCCACAGTTACTCTCCAGGTGAAATTAATAGGGTGGCCGCATGC
GAGTCGCGTAAAAGTGAGGTGTCAATGAGAGGTCCACTTTAATTATCCCACCGGCGTACG
Gly*
G
121 LeuArgLysLeuGlyValProProLeuArgAlaTrpArgHisArgAlaArgSerValArg
CTCAGAAAACCTTGGGGTACCGCCCTTGGCAGCTTGGAGACACCGGGCCCGAGCGTCCGC
GAGTCTTTTGAACCCCATGGCGGGAACGCTCGAACCTCTGTGGCCCGGGCCCTCGCAGGCG
181 AlaArgLeuLeuAlaArgGlyGlyArgAlaAlaIleCysGlyLysTyrLeuPheAsnTrp
GCTAGGCTTCTGGCCAGAGGAGGCAGGGCTGCCATATGTGGCAAGTACCTCTTCAACTGG
CGATCCGAAGACCGGTCTCCTCCGTCCCGACGGTATACACCGTTCATGGAGAAGTTGACC
AlaValArgThrLysLeuLys
241 GCAGTAAGAACAAAGCTCAAAC
CGTCATTCTTGTTTCGAGTTTG

* - Nukleotid-Heterogenität

15. obra

Kombinierter OPF der DNSs pil4a bis 15c

(pil4a/CA167b/CA156c/CA84a/CA59a/K9-1/13f/14i/11b/7f/7e/
8h/11c/40b/17b/15/16/81/12/11b/25c/14c/9f/11f/11g/19c/
15f/19g/26g & 15c)

ArgSerArgAsnLeuGlyLysValIleAspThrLeuThrCysGlyPheAlaAspLeuMet
1 AGGTCGGCGCAATTTGGGTAAAGTCAATCCCTTACGTGGCGCTTCGCCGACCTCATG
TCCAGCGCGTTAAACCCATTCCAGTAGCTATGGGAATGCACGCCGAAGCGGCTGGAGTAC

GlyTyrIleProLeuValGlyAlaProLeuGlyGlyAlaAlaArgAlaLeuAlaHisGly
61 GGGTACATACCGCTCGTCGGGCCCCCTCTTGGAGGCGCTGCCAGGGCCCTGGCGCATGGC
CCCATGTATGGCGAGCAGCCGCGGGGAGAACCCTCCGCGACGGTCCCGGGACCGCGTACCG

ValArgValLeuGluAspGlyValAsnTyrAlaThrGlyAsnLeuProGlyCysSerPhe
121 GTCCGGTTCTGGAAGACGGCGTGAACATATGCAACAGGGAACTTCTCTGGTTCTCTTTC
CAGGCCCCAAGACCTTCTGCCGCACTTGATACGTTGTCCCTTGAAGGACCAACGAGAAAG

SerIlePheLeuLeuAlaLeuLeuSerCysLeuThrValProAlaSerAlaTyrGlnVal
181 TCTATCTTCTTCTGGCCCTGCTCTCTTGCTTGACTGTGCCCGCTTCGGCCCTACCAAGTG
AGATAGAAGGAAGACCGGGACGAGAGAAGCAACTGACACGGGGCAAGCCGGATGGTTTAC

ArgAsnSerThrGlyLeuTyrHisValThrAsnAspCysProAsnSerSerIleValTyr
241 CGCAACTCCACGGGGCTTTACCACGTCACCAATGATTGCCCTAACTCGAGTATTGTGTAC
CGGTTGAGGTGCCCCGAAATGGTGCACTGGTTACTAACGGGATTGAGCTCATACACATG

GluAlaAlaAspAlaIleLeuHisThrProGlyCysValProCysValArgGluGlyAsn
301 GAGCGGGCCGATGCCATCTGCACACTCCGGGGTGCGTCCCTTGCGTTCTGTGAGGGCAAC
TCCCGCGGCTACGGTAGGACGTGTGAGGCCCCACGAGGGAACGCAAGCACTCCCGTTG

AlaSerArgCysTrpValAlaMetThrProThrValAlaThrArgAspGlyLysLeuPro
361 GCCTCGAGGTGTTGGGTGGCGATGACCCCTACGGTGCGCCACCAGGGATGGCAAACCTCCCC
CGGAGCTCCACAACCCACCGCTACTGGGGATGCCACCGGTGGTCCCTACCGTTTGAGGGG

AlaThrGlnLeuArgArgHisIleAspLeuLeuValGlySerAlaThrLeuCysSerAla
421 GCGACGCAGCTTCGACGTACATCGATCTGCTTGTTCGGGAGCGCCACCCTCTGTTCGGCC
CGCTGCGTGAAGCTGCAGTGTAGCTAGACGAACAGCCCTCGCGGTGGGAGACAAGCCGG

LeuTyrValGlyAspLeuCysGlySerValPheLeuValGlyGlnLeuPheThrPheSer
481 CTCTACGTGGGGGACCTATCGCGGTCTGTCTTCTTGTTCGGCCAACGTTCACCTTCTCT
GAGATGCACCCCTGGATACGCCCAGACAGAAAGAACAGCCGGTTGACAAAGTGAAGAGA

ProArgArgHisTrpThrThrGlnGlyCysAsnCysSerIleTyrProGlyHisIleThr
541 CCCAGGCGCCACTGGACGACGCAAGGTTGCAATTGCTCTATCTATCCCGGCCATATAACG
GGTCCGCGGTGACCTGCTGCGTTCCAACGTTAACGAGATAGATAGGGCCGGTATATTGC

GlyHisArgMetAlaTrpAspMetMetMetAsnTrpSerProThrThrAlaLeuValMet
601 GGTCAACCGCATGGCATGGGATATGATGATGAACCTGGTCCCTACGACGGCGTTGGTAATG
CCAGTGGCGTACCGTACCCTATACTACTACTTGACCAGGGGATGCTGCCGCAACCATTAC

AlaGlnLeuLeuArgIleProGlnAlaIleLeuAspMetIleAlaGlyAlaHisTrpGly
661 GCTCAGCTGCTCCGATCCCAAGCCATCTTGGACATGATCGCTGGTGTCACTGGGGA
CGAGTCGACGAGGCTAGGGTGTTCCGGTAGAACCTGTACTAGCGACCACGAGTGACCCCT

ValLeuAlaGlyIleAlaTyrPheSerMetValGlyAsnTrpAlaLysValLeuValVal
721 GTCTGGCGGGCATAGCGTATTTCTCCATGGTGGGGAACCTGGGCGAAGGTCTGCTAGTG
CAGGACCGCCCGTATCGCATAAAGAGGTACCACCCCTTGACCGGCTTCCAGGACCATCAC

LeuLeuLeuPheAlaGlyValAspAlaGluThrHisValThrGlyGlySerAlaGlyHis
781 CTGTGCTATTTGCCGGCGTCGACGGGAAACCCACGTCACCGGGGGAAGTGCCGGCCAC
GACGACGATAAACGGCCGACGTGCGCCTTTGGGTGCAGTGGCCCCCTTACCGGCCGGTG

16-1. abra

841 ThrValSerGlyPheValSerLeuLeuAlaProGlyAlaLysGlnAsnValGlnLeuIle
ACTGTGTCTGGATTGTGTTAGCCTCCTCGCACCAGGCGCCAAAGCAGAACGTCACCTCATC
TGACACAGACCTAAACAATCGGAGGAGCGTGGTCCGCGGTTCTGCTTGCAGGTCCACTAG

901 AsnThrAsnGlySerTrpHisLeuAsnSerThrAlaLeuAsnCysAsnAspSerLeuAsn
AACACCAACGGCAGTTGGCACCTCAATAGCACGGCCCTGAACCTGCAATGATACCTCAAC
TTGTGGTTGCCGTCAACCGTGGAGTTATCGTGCCGGGACTTGACGTTACTATCGGAGTTC

961 ThrGlyTrpLeuAlaGlyLeuPheTyrHisHisLysPheAsnSerSerGlyCysProGlu
ACCGGCTGGTTGGCAGGGCTTTTCTATCACCACAAGTTCAACTCTTCAGGCTGTCTGAG
TGCCCGACCAACCGTCCCGAAAAGATAGTGGTGTTCAGTTGAGAAGTCCGACAGGACTC

1021 ArgLeuAlaSerCysArgProLeuThrAspPheAspGlnGlyTrpGlyProIleSerTyr
AGCGTAGCCAGCTGCCGACCCCTTACCGATTTTGACCAGGGCTGGGGCCCTACAGTTAT
TCCGATCCGTCGACGGCTGGGGAATGGCTAAACTGGTCCCGACCCCGGATAGTCAATA

1081 AlaAsnGlySerGlyProAspGlnArgProTyrCysTrpHisTyrProProLysProCys
GCCAACGGAAAGCGGCCCGACAGCGCCCTACTGCTGGCACTACCCCCAAAACCTTGC
CGGTTCCTTCGCCGGGGCTGGTCCGGGGATGACGACCGTGATGGGGGGTTTGGAAACG

1141 GlyIleValProAlaLysSerValCysGlyProValTyrCysPheThrProSerProVal
GGTATTGTGCCCGGAAGAGTGTGTGTGCTCCGCTATATTGCTTCACTCCAGCCCCCGTG
CCATAACACGGGGCTTCTCACACACACAGGCCATATAACGAAGTGAGGGTCCGGGGCAC

1201 ValValGlyThrThrAspArgSerGlyAlaProThrTyrSerTrpGlyGluAsnAspThr
GTGGTGGGAACGACCGACAGGTCCGGGCGCCCCACCTACAGCTGGGGTGAAAATGATACG
CACCACCCTTGCTGGCTGTCCAGCCCCGGCGGGTGGATGTCCAGCCCACTTTTACTATGC

1261 AspValPheValLeuAsnAsnThrArgProProLeuGlyAsnTrpPheGlyCysThrTrp
GACGCTTCTGCTCTTAACAATACCAGGCCACCGCTGGGCAATTGGTTCTGGTTGTACCTGG
CTGCAGAAGCAGGAATTGTTATGGTCCGGTGGCGACCGTTAACCAAGCCAACTGGACC

1321 MetAsnSerThrGlyPheThrLysValCysGlyAlaProProCysValIleGlyGlyAla
ATGAACCTCACTGGATTACCAAAGTGTCCGGAGCGCCTCCTTGTGTCATCCGAGGGGCG
TACTTGAGTTGACCTAAGTGTTTCACACGCCCTCGCGGAGGAACACAGTAGCCTCCCCCG

1381 GlyAsnAsnThrLeuHisCysProThrAspCysPheArgLysHisProAspAlaThrTyr
GGCAACAACCCCTGCACTGCCCACTGATTGCTTCCGCAAGCATCCGGACGGCCACATAC
CCGTGTTGTGGGACGTGACGGGGTGACTAACGAAGGCGTTCTGATGGCCTGCCGTGTATG

1441 SerArgCysGlySerGlyProTrpIleThrProArgCysLeuValAspTyrProTyrArg
TCTCGGTGCGGCTCCGGTCCCTGGATCACACCCAGGTGCTGCTGACTACCCGTATAGG
AGAGCCACGCCGAGGCCAGGACCTAGTGTGGGTCCACGGACAGCTGATGGGCATATCC

1501 LeuTrpHisTyrProCysThrIleAsnTyrThrIlePheLysIleArgMetTyrValGly
CTTTGGCATTATCCTTGTACCATCAACTACACCATATTTAAATCAGGATGTACGTGGGA
GAAACCGTAATAGGAACATGGTAGTTGATGTGGTATAAATTTTACTCTACATGCACCT

1561 GlyValGluHisArgLeuGluAlaAlaCysAsnTrpThrArgGlyGluArgCysAspLeu
GGGGTCGAACACAGGCTGGAAGCTGCCTGCAACTGGACGGGGGGCGAACGTTGGGATCTG
CCCCAGCTTGTGTCCGACCTTCGACGGACGTTGACCTGCCCCCCGCTTGCAACGCTAGAC

1621 GluAspArgAspArgSerGluLeuSerProLeuLeuLeuThrThrThrGlnTrpGlnVal
GAAGACAGGGACAGGTCCGAGCTCAGCCCGTTACTGCTGACCACTACACAGTGGCAGGTC
CTTCTGTCCCTGTCCAGGCTCGAGTGGGGCAATGACGACTGGTGTATGTGTACCCGTCCAG

1681 LeuProCysSerPheThrThrLeuProAlaLeuSerThrGlyLeuIleHisLeuHisGln
CTCCCGTGTTCCTTCAACAACCTACCAGCCTTGTCCACCGGCCCTCATCCACCTCCACCAG
GAGGGCACAAAGGAAGTGTGGGATGGTCCGAACAGGTGGCCGGAGTAGGTGGAGGTGGTC

1741 AsnIleValAspValGlnTyrLeuTyrGlyValGlySerSerIleAlaSerTrpAlaIle
AACATTGTGGACGTGCAGTACTTGTACGGGGTGGGGTCAAGCATCGCGTCTCGGGCATT
TTGTAACACCTGCACGTCATGAACATGCCCCACCCAGTTCGTAGCGCAGGACCTGGTAA

1801 LysTrpGluTyrValValLeuLeuPheLeuLeuLeuAlaAspAlaArgValCysSerCys
AAGTGGGAGTACGTCGTTCTCTGTCTCTTCTGCTTGCAGACGGCGCGTCTGCTCTCTGC

16-2. ábra

TTCACCCCTCATGCCAGCAAGAGGACAAAGGACGAAAGCTCTGCCGCCGCCAGAGAGGAGC
 1361 LeuTrpMetMetLeuLeuIleSerGlnAlaGluAlaAlaLeuGluAsnLeuValIleLeu
 TTGTGGATGATGCTACTCATATCCCAAGCGGAGCGCGCTTTGGAGAACCCTGTAATACTT
 AACACCTACTACGATGAGTATAGGGTTCCGCTCCGCCGAAACCTCTTGGAGTATTATGAA
 1921 AsnAlaAlaSerLeuAlaGlyThrHisGlyLeuValSerPheLeuValPhePheCysPhe
 AATGCAGCATCCCTGCCCGGACGCACGGTCTTGATCCTTCCTCGTGTCTCTCGCTTT
 TTACGTGCTAGGGACCGGCCCTGCCGTGCCAGACATAGGAAGGAGCACAAGACGAA
 1981 AlaTrpTyrLeuLysGlyLysTrpValProGlyAlaValTyrThrPheTyrGlyMetTrp
 GCATGGTATTTGAAGGGTAAGTGGGTGCCCGGAGCGGTCTACACCTTCTACGGGATGTGG
 CGTACCATAAACTTCCCATTCACCCACGGGCCCTGCCAGATGTGGAAAGATGCTCTACCC
 2041 ProLeuLeuLeuLeuLeuAlaLeuProGlnArgAlaTyrAlaLeuAspThrGluVal
 CCTCTCCTCCTGCTCCTGTTGGCGTTGCCCGAGCGGGCTACGGCTTGGACACGGAGGTG
 GGAGAGGAGGACGAGGACAAACCGCAACGGGGTCCCGCCATGCCCGACCTGTCCCTCCAC
 2101 AlaAlaSerCysGlyGlyValValLeuValGlyLeuMetAlaLeuThrLeuSerProTyr
 GCGCGCTCGTGTGGCGGTGTTGTTCTCGTCCGGTTGATGGCGCTGACTCTGTCCACCATAT
 CGGCGCAGCACACCGCCACAACAAGAGCAGCCCACTACCGCGACTGAGACAGTGGTATA
 2161 TyrLysArgTyrIleSerTrpCysLeuTrpTrpLeuGlnTyrPheLeuThrArgValGlu
 TACAAGCGCTATATCAGCTGGTGCTTGTTGGTGGCTTCAGTATTTCTGACCAGAGTGGAA
 ATGTTCCGGATATAGTCGACCACGAACACCACCGAAGTCATAAAAGACTGGTCTCACCTT
 2221 AlaGlnLeuHisValTrpIleProProLeuAsnValArgGlyGlyArgAspAlaValIle
 CGGCAACTGCACGTGTGGATTCCCCCCTCAACGTCCGAGGGGGCGCGACGGCGTCATC
 CGCGTTGACGTGCACACCTAAGGGGGGGAGTTGCAGGCTCCCCCGCGCTCGGGCAGTAG
 2281 LeuLeuMetCysAlaValHisProThrLeuValPheAspIleThrLysLeuLeuLeuAla
 TTACTCATGTGTGCTGTACACCGACTCTGGTATTTGACATCACCAAATTGCTGTGGCC
 AATGAGTACACACGACATGTGGGCTGAGACCATAACTGTAGTGGTTTAACTACGACCGG
 2341 ValPheGlyProLeuTrpIleLeuGlnAlaSerLeuLeuLysValProTyrPheValArg
 GTCTTCGGACCCCTTTGGATTCTTCAAGCCAGTTTGCTTAAAGTACCCTACTTTGTGGCG
 CAGAAGCCTGGGGAACCTAAGAAGTTCGGTCAACGAATTTCTATGGGATGAACACGGCG
 2401 ValGlnGlyLeuLeuArgPheCysAlaLeuAlaArgLysMetIleGlyGlyHisTyrVal
 GTCCAAAGGCCTTCTCCGGTTCTGCGCGTTAGCGCGGAAGATGATCGGAGGCCATTACGTG
 CAGGTTCCGGAAGAGGCCAAGACGCGCAATCGGCCTTCTACTAGCCTCCGGTAATGCGAC
 2461 GlnMetValIleIleLysLeuGlyAlaLeuThrGlyThrTyrValTyrAsnHisLeuThr
 CAAATGGTCATCATTAACTTAGGGGCGCTTACTGGCACCTATGTTTATAACCATCTCACT
 GTTTACCAGTAGTAATTCAATCCCCCGCAATGACCGTGGATACAAATATTGCTAGAGTGA
 2521 ProLeuArgAspTrpAlaHisAsnGlyLeuArgAspLeuAlaValAlaValGluProVal
 CCTCTTCGGGACTGGGCGGCACAACGGCTTGGGAGATCTGGCCGTGGCTGTAGAGCCAGTC
 GGAGAAGCCCTGACCCCGGTGTTGCCGAACGCTCTAGACCGGCACCGACATCTCGGTGAG
 2581 ValPheSerGlnMetGluThrLysLeuIleThrTrpGlyAlaAspThrAlaAlaCysGly
 GTCTTCTCCCAATGGAGACCAAGCTCATCAGTGGGGGGCAGATACCGCCCGTGGCGGT
 CAGAAGAGGGTTTACCTCTGGTTCCAGTAGTGACCCCCCGTCTATGGCGGGCCACGCCA
 2641 AspIleIleAsnGlyLeuProValSerAlaArgArgGlyArgGluIleLeuLeuGlyPro
 GACATCATCAACGGCTTGCCTGTTTCCGCCCCGAGGGGGCCGGAGATACTGCTCGGGCCA
 CTGTAGTAGTTGCCGAACGGACAAAGGCGGGCGTCCCCGGCCCTCTATGACGAGCCCGGT
 2701 AlaAspGlyMetValSerLysGlyTrpArgLeuLeuAlaProIleThrAlaTyrAlaGln
 GCGGATGGAATGGTCTCCAAGGGGTGGAGGTTGCTGGCGCCCATCACGGCGTACGGCCAG
 CGGCTACCTTACCAGAGGTTCCCCACCTCCAACGACCGCGGTAGTGCCGCA TGCGGGT
 2761 GlnThrArgGlyLeuLeuGlyCysIleIleThrSerLeuThrGlyArgAspLysAsnGln
 CAGACAAGGGGCTCCTAGGGTGCAATACACAGCCTAACTGGCCGGGACAAAACCAA
 GTCTGTTCCCGGAGGATCCACGTTATTAGTGGTGGATTGACCGGCCCTGTTTGGTT

16-3. abra;

2931 ValGlnGlyGluValGlnIleValSerThrAlaAlaGlnThrPheLeuAlaThrCysAla
GTGGAGGGTCAGGTCCAGATTGTGTCAACTGCTGCCCAACCTTCTTGGCAACCTGGCATC
CACCTCCCACTCCAGGTCTAACACAGTTGACGACGGGTTTGGAAAGAACCTTGGACGTTAG

2981 AsnGlyValCysTrpThrValTyrHisGlyAlaGlyThrArgThrIleAlaSerProLys
AATGGGGTGTGCTGGACTGTCTACCACGGGGCCGGAAACGAGGACCATGGCGTCAACCAAG
TTACCCACACGACCTGACAGATGGTGGCCCCGGCTTGTCTCTGGTACGGCACTGGGTTT

2941 GlyProValIleGlnMetTyrThrAsnValAspGlnAspLeuValGlyTrpProAlaPro
GGTCTGTCTATCCAGATGTATACCAATGTAGACCAAGACCTTGTGGGCTGCCCGCTCCG
CCAGGACAGTAGGTCTACATATGGTTACATCTGGTTCTGGAAACACCGACCGGGGAGCC

3001 GlnGlySerArgSerLeuThrProCysThrCysGlySerSerAspLeuTyrLeuValThr
CAAGGTAGCCGCTCATTGACACCCCTGCACCTTGGCGCTCCTCGGACCTTACCTGGTCAG
GTTCATCCGGAGTAAGTGTGGGACGTGAACGCCGAGGAGCTGGAAATGGACAGTGG

3061 ArgHisAlaAspValIleProValArgArgArgGlyAspSerArgGlySerLeuLeuSer
AGGCACGGCCATGTCTATCCCGTGGCGCGGGGTGATAGCAGGGGACCGCTGGTGTCTG
TCCGTGGCGCTACAGTAAGGGCAGCGGGCGCCCCACTATCGTCCCGCTCGGACGACAGC

3121 ProArgProIleSerTyrLeuLysGlySerSerGlyGlyProLeuLeuCysProAlaGly
CCCCGGCCCCATTTCTACTTGAAGGCTCCTCGGGGGGTCCGCTGTGTGCCCCCGGGGG
GGGGCGGGGTAAAGGATGAATTTCCGAGGAGCCCCCAGGCGACAACAGGGGGCCCCC

3181 HisAlaValGlyIlePheArgAlaAlaValCysThrArgGlyValAlaLysAlaValAsp
CACGGCGTGGGCATATTTAGGGCGCGGTGTGACCCCGTGGAGTGGCTAAGCGCGTGGAC
GTCCCGCACCGGTATAAATCCCGGGCCACACGTGGGCACCTCACCGATTCCGCCACCTG

3241 PheIleProValGluAsnLeuGluThrThrMetArgSerProValPheThrAspAsnSer
TTTATCCCTGTGGAGAACCTAGACACAACCATGAGGTCCCCGGTGTTCACGGATAACTCC
AATAGGGACACCTCTTGGATCTCTGTTGGTACTCCAGGGGCCACAGTGCCTATTGAGG

3301 SerProProValValProGlnSerPheGlnValAlaHisLeuHisAlaProThrGlySer
TCTCCACCACTAGTGGCCCAAGCTTCCAGGTGGCTCACCTCCATGCTCCACAGGCAGC
AGAGGTGGTCTACACGGGGTCTCGAAGGTCCACCGAGTGGAGGTACGAGGGTGTCCGTGG

3361 GlyLysSerThrLysValProAlaAlaTyrAlaAlaGlnGlyTyrLysValLeuValLeu
GGCAAAAGCACCAAGGTCCCGGTGTCATATGCAGCTCAGGGCTATAAGGTGCTAGTACTC
CCGTTTCTGTGTTCCAGGGCCGACGTATACGTCCAGTCCCGATATTCCACGATCATGAG

3421 AsnProSerValAlaAlaThrLeuGlyPheGlyAlaTyrMetSerLysAlaHisGlyIle
AACCCCTCTGTGTGCTGCAACACTGGGCTTTGGTGCTTACATGTCCAAGGCTCATGGGATC
TTGGGGAGACAACGACGTTGTGACCCGAAACCAAGTGTACAGGTTCGGAGTACCTTAG

3481 AspProAsnIleArgThrGlyValArgThrIleThrThrGlySerProIleThrTyrSer
GATCTAACATCAGGACCGGGGTGACAACAATTACCACTGGCAGCCCCATCAGTACTCC
CTAGGATTGTAGTCTTGGCCCCACTCTTGTTAATGGTGACCGTCCGGGTAGTGCATGAGG

3541 ThrTyrGlyLysPheLeuAlaAspGlyGlyCysSerGlyGlyAlaTyrAspIleIleIle
ACCTACGGCAAGTTCTTGGCCGACGGCGGGTGTCTCGGGGGGGCGCTTATGACATAATAAT
TGGATGCCGTTCAAGGAACGGCTGCCGCCCCACGAGCCCCCGGAATACTGTATTATTAA

3601 CysAspGluCysHisSerThrAspAlaThrSerIleLeuGlyIleGlyThrValLeuAsp
TGTGACGAGTCCCACTCCACGGATGCCACATCCATCTTGGGCATCGGCACCTGCTTGGAC
ACACTGTCTACGGTGAGGTGCTACGGTGTAGGTAGAACCCGTAGCCGTGACAGGAACGT

3661 GlnAlaGluThrAlaGlyAlaArgLeuValValLeuAlaThrAlaThrProProGlySer
CAAGCAGAGACTGCGGGGGCGAGACTGGTTGTGCTCGCCACCGCCACCCCTCCGGGCTCC
GTTGCTCTCTGACGCCCCCGCTCTGACCAACACGAGCGGTGGCGGTGGGGAGSCCGGAGG

3721 ValThrValProHisProAsnIleGluGluValAlaLeuSerThrThrGlyGluIlePro
GTCACTGTGCCCCATCCCAACATCGAGGAGGTTGCTCTGTCCACCACCGGAGAGATCCCT
CAGTGACACGGGGTAGGGTTGTAGCTCTCCCAACGAGACAGGTGGTGCCCTCTCTAGGGA

3781 PheTyrGlyLysAlaIleProLeuGluValIleLysGlyGlyArgHisLeuIlePheCys
TTTACGGCAAGGCTATCCCCCTCGAAGTAATCAAGGGGGGAGACATCTCATCTCTGT

16-4. obra

AAAAATGCCGTTCCGATAGGGGGAGCTTCATTAGTTCCCCCCTCTCTAGAGTAGAAGACA

1841 HisSerLysLysLysCysAspGluLeuAlaAlaLysLeuValAlaLeuGlyIleAsnAla
CATTCAAAGAAGTGGACGAACCTCCCGCAAAGCTGGTCCGATTGGCATCAATGCC
CTAAGTTTCTTCTTCACGCTGCTTGAGCGGCGTTTCGACCAGCGTAACCCGTAGTTACGG

1901 ValAlaTyrTyrArgGlyLeuAspValSerValIleProThrSerGlyAspValValVal
GTGGCCTACTACCGGGTCTTGACGTGTCCGTCATCCCGACCAGCGCGATGTTGTCTGTC
CACCGGATGATGGCGCCAGAACTGCACAGGCAGTAGGGCTGGTCCCGCTACAAACAGCAG

1961 ValAlaThrAspAlaLeuMetThrGlyTyrThrGlyAspPheAspSerValIleAspCys
GTGGCAACCGATGCCCTCATGACCGGCTATACCGCGACTTCGACTCGGTGATAGACTGC
CACCGTTGGCTACGGGAGTACTGGCGGATATGGCCGCTGAAGCTGAGCCACTATCTGACG

4021 AsnThrCysValThrGlnThrValAspPheSerLeuAspProThrPheThrIleGluThr
AATACGTGTGTACCCAGACAGTCGATTTCAGCCTTGACCCTACCTTCACCATTTGAGACA
TTATGCCACACAGTGGGTCTGTCTAGCTAAAGTCGGAACGGGATGGAAGTGGTAACCTCTGT

4081 IleThrLeuProGlnAspAlaValSerArgThrGlnArgArgGlyArgThrGlyArgGly
ATCAGCTCCCGCAGGATGCTGTCTCCCGCACTCAACGTCGGGGCAGGACTGGCAGGGGG
TAGTGGCAGGGGGTCTTACGACAGAGGGCGTGAGTTGCAGCCCCGTCCTGACCGTCCCCC

4141 LysProGlyIleTyrArgPheValAlaProGlyGluArgProSerGlyMetPheAspSer
AAGCCAGGCATCTACAGATTTGTGGCACCGGGGGAGCGCCCTCCGGCATGTTCCGACTCG
TTCGGTCCGTAGATGTCTAAACACCGTGGCCCCCTCGCGGGGAGGCCGTACAAGCTGAGC

4201 SerValLeuCysGluCysTyrAspAlaGlyCysAlaTrpTyrGluLeuThrProAlaGlu
TCCGTCCTCTGTGAGTGCTATGACGCAGGCTGTGCTTGGTATGAGCTCAGCCCCCGGAG
AGGCAGGAGACACTCAGGATACTGCGTCCGACACGAACCATACTCGAGTGCGGGCGGGCTC

4261 ThrThrValArgLeuArgAlaTyrMetAsnThrProGlyLeuProValCysGlnAspHis
ACTACAGTTAGGCTACGAGCGTACATGAACACCCCGGGGCTTCCCGTGTCGACGACCAT
TGATGTCAATCCGATGCTCGCATGTACTTGTGGGGCCCCGAAGGGCACACGGTCTCTGTA

4321 LeuGluPheTrpGluGlyValPheThrGlyLeuThrHisIleAspAlaHisPheLeuSer
CTTGAATTTTGGGAGGGCGTCTTTACAGGCCTCACTCATATAGATGCCCACTTTCTATCC
GAACTTAAACCCCTCCCGCAGAAATGTCCGGAGTGAGTATATCTACGGGTGAAAGATAGG

4381 GlnThrLysGlnSerGlyGluAsnLeuProTyrLeuValAlaTyrGlnAlaThrValCys
CAGACAAAGCAGAGTGGGGAGAACCTTCCTTACCTGGTAGCGTACCAAGCCACCGTGTGC
GTCTGTTTCTGCTCACCCCTCTTGGGAAGGAATGGACCATCGCATGGTTCCGGTGGCACAG

4441 AlaArgAlaGlnAlaProProProSerTrpAspGlnMetTrpLysCysLeuIleArgLeu
GCTAGGGCTCAAGCCCCCTCCCCCATCGTGGGACCAGATGTGGAAGTGTGTTGATTGGCTC
CGATCCCGAGTTCGGGGAGGGGGTAGCACCCCTGGTCTACACCTTCACAAACTAAGCGGAG

4501 LysProThrLeuHisGlyProThrProLeuLeuTyrArgLeuGlyAlaValGlnAsnGlu
AAGCCCCACCCTCCATGGGCCAACACCCCTGCTATACAGACTGGGCGCTGTTCAGAATGAA
TTCGGGTGGGAGGTACCCGTTGTGGGGACGATATGTCTGACCCGGACAAAGTCTTACTT

4561 IleThrLeuThrHisProValThrLysTyrIleMetThrCysMetSerAlaAspLeuGlu
ATCACCTGACGCACCCAGTCACCAAATACATCATGACATGCATGTCGGCCGACCTGGAG
TAGTGGGACTGCGTGGGTGAGTGGTTTATGTAGTACTGTACGTACAGCCGGCTGGACCTC

4621 ValValThrSerThrTrpValLeuValGlyGlyValLeuAlaAlaLeuAlaAlaTyrCys
GTCGTACGAGCACCTGGGTGCTCGTTGGCGGGCTCTGGCTGCTTTGGCCGCGTATTGC
CAGCAGTGCTCGTGACCCACGAGCAACCGCCGAGGACCGACGAAACCGGCGCATAACG

4681 LeuSerThrGlyCysValValIleValGlyArgValValLeuSerGlyLysProAlaIle
CTGTCAACAGGCTCGGTGGTCATAGTGGCAGGGTCGTCTTGTCCGGGAAGCCGGCAATC
GACAGTTGTCCGACGCACAGTATCACCCGTCCGAGCAGAACAGGCCCTTCGCCCCGTTAG

4741 IleProAspArgGluValLeuTyrArgGluPheAspGluMetGluGluCysSerGlnHis
ATACCTGACAGGGAAGTCTCTACCCAGAGATTGATGAGATGGAAGAGTGCTCTCAGCAC
TATGGACTGTCCCTTCAGGAGATGGCTCTCAAGCTACTCTACCTTCTCAGAGAGTCGTG

16-5. abra

480. LeuProTyrIleGluGlnGlyMetMetLeuAlaGluGlnPheLysGlnLysAlaLeuGly
TTACCTAGATCGAGCAAGGATGATGCTCGCCGAGCAGTTCAAGCAGAAAGCCCTCGGC
AATGGCATGTAGCTCGTTCCCTACTACGAGCGGCTCGTCAAGTTCCTCTCCGGGAGCGG

4861 LeuLeuGlnThrAlaSerArgGlnAlaGluValIleAlaProAlaValGlnThrAsnTrp
CTCCTGCAGACCGCGTCCCGTCAGGTAGAGGTTATCGCCCTGCTGTCCAGACCAACTGG
GAGGACGCTCTGGCGCAGGCGCAGTCCCTCTCCAA TAGCGGGGACGACAGGCTCTGGTTGACC

4921 GlnLysLeuGluThrPheTrpAlaLysHisMetTrpAsnPheIleSerGlyIleGlnTyr
CAAAAACTCGAGACCTTCTGGGCGAAGCATATGTGGAACCTTCATCAGTGGGATACAAATAC
GTTTTTGAGCTCTGGAAGACCGCTTCGTATACACCTTGAAGTAGTCAACCTATCTTATG

4981 LeuAlaGlyLeuSerThrLeuProGlyAsnProAlaIleAlaSerLeuMetAlaPheThr
TTGGCGGGCTTGTCAACGCTGCCTGTAACCCCGCCATTGCTTCATTGATGGCTTTTACA
AACCGCCCGAACAGTTGCGACGACCATTTGGGGCGGTAACGAAGTAACCTACCGAAATGT

5041 AlaAlaValThrSerProLeuThrThrSerGlnThrLeuLeuPheAsnIleLeuGlyGly
GCTGCTGTACCCAGCCCACTAACCACTAGCCAAACCTCCTCTTCAACATATTGGGGGGG
CGACGACAGTGGTGGGTGATTGGTGATCGGTTTGGGAGGAGAAGTTGTATAACCCCCC

5101 TrpValAlaAlaGlnLeuAlaAlaProGlyAlaAlaThrAlaPheValGlyAlaGlyLeu
TGGGTGGCTGCGCCAGCTCGCCGCCCCCGGTGCCGTACTGCTTTGTGGCGCTGGCTTA
ACCCACCGACGGGTGAGCGGGGGGGGCCACGGCGATGACGGAACACCGCGACCGAAT

5161 AlaGlyAlaAlaIleGlySerValGlyLeuGlyLysValLeuIleAspIleLeuAlaGly
GCTGGCGCCCGCATCGGCAGTGTGGACTGGGGAAGGTCCTCATAGACATCTTGCAGGG
CGACCGCGGGGTAGCCGTCACAACCTGACCCCTTCCAGGAGTATCTGTAGGAACCTCC

5221 TyrGlyAlaGlyValAlaGlyAlaLeuValAlaPheLysIleMetSerGlyGluValPro
TATGGCGCGGGCGTGGCGGGAGCTCTTGTGGCATTCAAGATCATGACGGGTAGCTCCCC
ATACCGCGCCCGCACCGCCCTCGAGAACACCGTAAGTTCTAGTACTCGCCACTCCAGGGG

5281 SerThrGluAspLeuValAsnLeuLeuProAlaIleLeuSerProGlyAlaLeuValVal
TCCACGGAGGACCTGGTCAATCTACTGCCCGCCATCCTCTCGCCCGAGCCCTCGTAGTC
AGGTGCTCTCGGACCACTAGATGACGGGGCGGTAGGAGAGCGGGCTCGGGAGCATGAG

5341 GlyValValCysAlaAlaIleLeuArgArgHisValGlyProGlyGluGlyAlaValGln
GGCGTGGTCTGTGCAGCAATACTGCCCGGCACGTTGGCCCCGGGAGGGGGGAGTGCAG
CCGCACAGACACGTCGTTATGACGGGGCGGTGCAACCGGGCCCGCTCCCCCGTCACTG

5401 TrpMetAsnArgLeuIleAlaPheAlaSerArgGlyAsnHisValSerProThrHisTyr
TGGATGAACCGGCTGATAGCCTTCGCCTCCCGGGGAACCATGTTTCCCCCACGCACTAC
ACCTACTTGGCCGACTATCGGAAGCGGAGGGCCCCCTTGGTACAAAGGGGGTGGCTGATG

5461 ValProGluSerAspAlaAlaAlaArgValThrAlaIleLeuSerSerLeuThrValThr
GTGCGCGAGAGCGATGCAGCTGCCCGGTCAGTCCATACCTACAGCAGCCTCACTGTAACC
CAGGGCCTCTCGCTACGTCGACGGGTGACGTGACGGTATGAGTCGGAGTGACATTGG

5521 GlnLeuLeuArgArgLeuHisGlnTrpIleSerSerGluCysThrThrProCysSerGly
CAGCTCCTGAGGCGACTGCACCACTGGATAAGCTCGGAGTGATCCACTCCATGCTCCGGT
GTGAGGACTCCGCTGACGTGGTCACTATTTCGAGCCTCAGTGGTGAGGTACGAGGCCA

5581 SerTrpLeuArgAspIleTrpAspTrpIleCysGluValLeuSerAspPheLysThrTrp
TCCTGGCTAAGGGACATCTGGGACTGGATATGCGAGGTGTTGAGCGACTTTAAGACCTGG
AGGACCGATTCCCTGTAGACCTGACCTATACGCTCCACAACCTCGCTGAAATTCTGGACC

5641 LeuLysAlaLysLeuMetProGlnLeuProGlyIleProPheValSerCysGlnArgGly
CTAAAAGCTAAGCTCATGCCACAGCTGCCCTGGGATCCCTTTGTGTCCTGCCAGCGCGGG
GATTTTCGATTGAGTACGGGTGCGACGGACCCTAGGGGAAACACAGGACGGTCCGCGCC

5701 TyrLysGlyValTrpArgValAspGlyIleMetHisThrArgCysHisCysGlyAlaGlu
TATAAGGGGGTCTGGCGAGTGGACGGCATCATGCACACTCGCTGCCACTGTGGAGCTGAG
ATATTTCCCCCAGACCGCTACCTGCCGTAGTACGTGTGAGCGACGGTGACACCTCGACTC

5761 IleThrGlyHisValLysAsnGlyThrMetArgIleValGlyProArgThrCysArgAsn
ATCACTGGACATGTCAAAAACGGGACGATGAGGATCGTGGTCTAGGACCTGCAGGAAC

16-6. obra

TAGTGACCTGTACAGTTTTTGCCTGCTACTCCTAGCAGCCAGCATCTCGACCTCCTT

5821 MetTrpSerGlyThrPheProIleAsnAlaTyrThrThrGlyProCysThrProLeuPro
ATGTGGAGTGGGACCTTCCCATTATGCCCTACACCACGGGCCCCCTGTACCCCCCTTCCCT
TACACCTCACCTCGAAGGGCTAATTACGGATGTGGTCCCCGGGACATGGGGGGAAGGA

5891 AlaProAsnTyrThrPheAlaLeuTrpArgValSerAlaGluGluTyrValGluIleArg
CGCCGAACCTACAGTTCCGCGCTATGGAGGGTGTCTGCAGAGCAATATGTGGAGATAAGG
CGGGCTTGATGTGAAGCGGATACCTCCACAGACGTCTCTTATACACCTCTATTCC

5941 GlnValGlyAspPheHisTyrValThrGlyMetThrThrAspAsnLeuLysCysProCys
CAGGTGGGGGACTTCCACTACGTGACGGGTATGACTACTGACAATCTCAATGCCCGTCC
GTCCACCCCTGAAGGTGATGCACTGCCCATACTGATGACTGTAGAGTTTACGGGACCG

6001 GlnValProSerProGluPhePheThrGluLeuAspGlyValArgLeuHisArgPheAla
CAGGTCCCATCGCCCAATTTTTCACAGAATTGGACGGGGTGGCCCTACATAGGTTTGGG
GTCCAGGGTAGCGGGCTTAAAGTGTCTTAACTGCCCCACGGGATGTATCCAAACGG

6061 ProProCysLysProLeuLeuArgGluGluValSerPheArgValGlyLeuHisGluTyr
CCCCCTGCAAGCCCTTCTGCGGGAGGAGGTATCATTCAGAGTAGGACTCCACGAATAC
GGGGGACGTTCCGGAACGACGCCCTCTCCATAGTAAGTCTCATCTGAGGTGCTTATG

6121 ProValGlySerGlnLeuProCysGluProGluProAspValAlaValLeuThrSerMet
CCGGTAGGGTCGCAATTACCTTGGCAGCCCGAACCGGACGTGGCCGTGTTGACGTCCATG
GGCCATCCACGGCTTAATGGAACGCTCGGGCTTGGCTGCACGGGACAACTGCAGGTAC

6181 LeuThrAspProSerHisIleThrAlaGluAlaAlaGlyArgArgLeuAlaArgGlySer
CTCACTGATCCCTCCCATATAACAGCAGAGCGCGCGGCGGAAGGTGGCGAGGGGATCA
GAGTGACTAGGGAGGGTATATTGTCTCTCCGCGGCGCGCTTCAACCCGCTCCCTTAGT

6241 ProProSerValAlaSerSerSerAlaSerGlnLeuSerAlaProSerLeuLysAlaThr
CCCCCTCTGTGGCCAGCTCCTCGGCTAGCCAGCTATCCGCTCATCTCTCAAGGCAACT
GGGGGAGACACCGGTGAGGAGCCGATCGGTGATAGCGAGGTAGAGAGTTCCTTTGA

6301 CysThrAlaAsnHisAspSerProAspAlaGluLeuIleGluAlaAsnLeuLeuTrpArg
TGACCCGCTAACCATGACTCCCTGATGCTGAGCTCATAGAGGCCAACCTCTCATGGAGG
ACGTGGCGATTGGTACTGAGGGGACTACGACTCGAGTATCTCCGGTTCGAGGATACCTCC

6361 GlnGluMetGlyGlyAsnIleThrArgValGluSerGluAsnLysValValIleLeuAsp
CAGGAGATGGGGCGCAACATCACCAGGGTTGAGTCAGAAAAACAAAGTGGTGATTCTGGAC
GTCTCTACCCCGCTTGTAGTGGTCCCACTCAGTCTTTTGTTCACCACTAAGACCTG

6421 SerPheAspProLeuValAlaGluGluAspGluArgGluIleSerValProAlaGluIle
TCCTTCGATCCGCTTGTGGCGGAGGAGGACGAGCGGAGATCTCCGTACCCGACAGAAATC
AGGAAGCTAGGCGAACACCGCTCTCTCTGCTCGCCCTCTAGAGGCATGGCGCTCTTAG

6481 LeuArgLysSerArgArgPheAlaGlnAlaLeuProValTrpAlaArgProAspTyrAsn
CTGCGGAAGTCTCGGAGATTGCGCCAGGCCCTGCCGTTTGGGCGCGCGGACTATAAC
GACGCCCTCAGAGCTCTAAGCGGGTCCGGGACGGGCAACCCGCGCGGCTGATATTG

6541 ProProLeuValGluThrTrpLysLysProAspTyrGluProProValValHisGlyCys
CCCCCGCTAGTGGAGACGTGGAAAAAGCCGACTACGAACCACTGTGGTCTATGGCTGT
GGGGCGGATCACCTCTGCACCTTTTTCGGGCTGATGCTTGGTGGACACCAAGTACCGACA

6601 ProLeuProProProLysSerProProValProProProArgLysLysArgThrValVal
CCGCTTCCACCTCCAAAGTCCCTCTCTGTCCTCCGCTCGGAAGAACGGGACGGTGGTC
GGCGAAGGTGGAGTTTTCAGGGGAGGACACGGAGGCGGAGCCTTCTTGCCTGCCACAG

6661 LeuThrGluSerThrLeuSerThrAlaLeuAlaGluLeuAlaThrArgSerPheGlySer
CTCACTGAATCAACCTATCTACTGCTTGGCCGAGCTCGCCACCAGAAGCTTTGGCAGC
GAGTGACTTAGTTGGATAGATGACGGAACGGCTCGAGCGGTGGTCTTCGAACCTCTC

6721 SerSerThrSerGlyIleThrGlyAspAsnThrThrThrSerSerGluProAlaProSer
TCCTCAACTTCCGGCATTACGGGCGCAATACGACAACATCTCTGAGCCGCGCCCTTCT
AGGAGTTGAAGCCGTAATGCCCGCTTATGCTGTTGAGGAGACTCGGGCGGGGAACA

16-7. d'bro

6701 GlyCysProProAspSerAspAlaGluSerTyrSerSerMetProProLeuGluGlyGlu
GGCTGCCCCCGGACTCCGACGGCTGAGTCTATTCTCTCATGCCCCCCTGGAGGGGGAC
CCGACGGGGGGGGCTGAGGCTGCGACTCAGGATAAGGAGCTACGGGGGGGACCTCCCCCTC

6841 ProGlyAspProAspLeuSerAspGlySerTrpSerThrValSerSerGluAlaAsnAla
CCTGGGGATCCGGATCTTAGCGACGGGTCAAGTCAACGGTCAGTAGTGAGGCCAACGGG
CGACCCCTAGCCCTAGAATCGCTGCCCAGTACCAGTTGCCAGTCATCACTCGGTTGCGC

6901 GluAspValValCysCysSerMetSerTyrSerTrpThrGlyAlaLeuValThrProCys
GAGGATGTCGTGTGCTGCTCAA TGCTTACTCTTGGACAGGGCGACTCGTCACCCCTGT
CTCTACAGCACACGACGAGTTACAGAAATGAGAACTGTCCGGCTGAGGAGTGGGGACG

6961 AlaAlaGluGluGlnLysLeuProIleAsnAlaLeuSerAsnSerLeuLeuArgHisHis
GCCGCGGAAGAACAGAACTGCCCATCAATGCACTAAGCAACTCGTTGCTACGTACCAAC
CGGCGCCTTCTTGTCTTTGACGGGTAGTTACGTGATTCTGTTGAGCAACGATGCGCTGCTG

7021 AsnLeuValTyrSerThrThrSerArgSerAlaCysGlnArgGlnLysLysValThrPhe
AATTTGGTGTTATCCACCACTCAGGCACTGCTTGCCAAAGGCAGAAAGTCAACATTT
TTAAACCAATAAGGTGGTGGAGTGGTCACGAACGGTTTCCCTCTCTCTTCAGTGTAA

7081 AspArgLeuGlnValLeuAspSerHisTyrGlnAspValLeuLysGluValLysAlaAla
GACAGACTGCAAGTTCTGGACAGCCATTACCAGGACGTACTCAAGGAGGTTAAAGCAGCG
CTGTCTGAGCTTCAAGACCTGTCGTAATGGTCTCATGAGTTCTCTCAATTTCTGCTCG

7141 AlaSerLysValLysAlaAsnLeuLeuSerValGluGluAlaCysSerLeuThrProPro
CGGTCAAAAGTGAAGGCTAACTTGCTATCCGTAGAGGAAGCTTGACGCTGACCCCGCA
CGCAGTTTTCACCTTCCGATTGAACGATAGGCATCTCTCTCGAACGTGCGACTGCGGGGGT

7201 HisSerAlaLysSerLysPheGlyTyrGlyAlaLysAspValArgCysHisAlaArgLys
CACTCAGCCAAATCCAAAGTTTGGTTATGGGGGCAAGACGTCCTGTCGCAAGCCAGAAAG
GTGAGTCGGTTTAGGTTCAAACCAATACCCCGTTTTCTGAGGCAACGGTACGGTCTTTCT

7261 AlaValThrHisIleAsnSerValTrpLysAspLeuLeuGluAspAsnValThrProIle
GCCGTAAACCCACATCAACTCCGTGTGGAAAGACCTTCTGGAAGACAATGTAACCAATA
CGGCATTGGGTGTAGTTGAGGCACACCTTTCTGGAAGACCTTCTGTTACATTGTGGTTAT

7321 AspThrThrIleMetAlaLysAsnGluValPheCysValGlnProGluLysGlyGlyArg
CACACTACCATCATGGCTAAGAACGAGGTTTTCTGCGTTACGCTGAGAGGGGGTCTGT
CTGTGATGGTAGTACCGATTCTTGCTCCAAAGACGCAAGTGGACTCTTCCCCCAGCA

7381 LysProAlaArgLeuIleValPheProAspLeuGlyValArgValCysGluLysMetAla
AAGCCAGCTCGTCTCATCGTGTCCCGCATCTGGGCGTGCGCGTGTGGCAAAAGATGGCT
TTGGGTCGAGCAGTAGTACACAAGGGGCTAGACCCGACGGCAACAGCTTTTCTACCGA

7441 LeuTyrAspValValThrLysLeuProLeuAlaValMetGlySerSerTyrGlyPheGln
TTGTACGACGTGGTTACAAAGCTCCCTTGGCCGTGATGGGAAGCTCTTACGGATTCCAA
AACATGCTGCACCAATGTTTCGAGGGGAACCGGCACTACCTTCGAGGATGCTTAAGGTT

7501 TyrSerProGlyGlnArgValGluPheLeuValGlnAlaTrpLysSerLysLysThrPro
TACTCACCAGGACAGCGGGTTGAATTCTCTGTGCAAGCGTGGAAAGTCCAAGAAACCCCA
ATGAGTGGTCTGTGCGCCAAC TTAAGGAGCACGTTCCGACCTTCAGGTTCTTTTGGGGT

7561 MetGlyPheSerTyrAspThrArgCysPheAspSerThrValThrGluSerAspIleArg
ATGGGGTTCTCGTATGATACCCGCTGCTTTGACTCCACACTCACTGAGAGCGACATCCGT
TACCCCAAGAGCATACTATGGGCGACGAACTGAGGTGTACGTGACTCTCGCTGAGGCA

7621 ThrGluGluAlaIleTyrGlnCysCysAspLeuAspProGlnAlaArgValAlaIleLys
ACGGAGGAGGCAATCTACCAATGTTGTGACCTCGACCCCAAGCCCGCTGGCCATCAAG
TGCTCTCTCCGTTAGATGGTTACAACACTGGAGCTGGGGGTTCCGGGGCACCGGTAGTTC

7681 SerLeuThrGluArgLeuTyrValGlyGlyProLeuThrAsnSerArgGlyGluAsnCys
TCCCTCACCAGAGGGCTTTATGTTGGGGGCCCTCTTACCAATTCAAGGGGGGAGAACTGC
AGGGAGTGGCTCTCCGAAATACAACCCCGGGAGAAATGGTTAAGTTCCCCCTCTCTGACG

7741 GlyTyrArgArgCysArgAlaSerGlyValLeuThrThrSerCysGlyAsnThrLeuThr
GGCTATCGCAGGTGCGCGCGGAGCGGCTACTGACAACTAGCTGTGTTAACCCCTCACT

16-8. abra

CCGATAGCGTCCACGGCGCGCTCGCCCATGACTGTTGATCGACACCATTTCTGGGAGTGA
7801 CysTyrIleLysAlaArgAlaAlaCysArgAlaAlaGlyLeuGlnAspCysThrMetLeu
TGCTACATCAAGGCCCGGGCAGCCTGTCGAGCCGCAGGGCTCCAGGACTGCACCATGCTC
ACGATGTAGTTCCGGGCCCCGTCGGACAGCTCGGCGTCCCGAGGTCCCTGACGTGGTACGAG
7861 ValCysGlyAspAspLeuValValIleCysGluSerAlaGlyValGlnGluAspAlaAla
GTGTGTGGCGACGACTTAGTTCGTTATCTGTGAAAGCGCGGGGTCCAGGAGGACCGCGCG
CACACACCGCTGCTGAATCAGCAATAGACACTTTCGCGCCCCCAGGTCTCTCTGCGCCGC
7921 SerLeuArgAlaPheThrGluAlaMetThrArgTyrSerAlaProProGlyAspProPro
AGCCTGAGAGCCTTCACGGAGGCTATGACCAGGTACTCCGCCCCCCTGGGGACCCCCCA
TCGGACTCTCGGAAGTGCTCCGATACTGGTCCATGAGGCGGGGGGACCCCTGGGGGGT
7981 GlnProGluTyrAspLeuGluLeuIleThrSerCysSerSerAsnValSerValAlaHis
CAACCAGAATACGACTTGGAGCTCATAACATCATGCTCCTCCAACGTGTCACTGCGCCAC
GTTGGTCTTATGCTGAACCTCGAGTATTGTAGTACGAGGAGGTTGCACAGTCAGCGGGTG
8041 AspGlyAlaGlyLysArgValTyrTyrLeuThrArgAspProThrThrProLeuAlaArg
GACGGCGCTGGAAAGAGGGTCTACTACCTCACCCGTGACCCTACAACCCCCCTCGCGAGA
CTGCCCGGACCTTTCTCCAGATGATGGAGTGGGCACTGGGATGTTGGGGGGAGCGCTCT
8101 AlaAlaTrpGluThrAlaArgHisThrProValAsnSerTrpLeuGlyAsnIleIleMet
GCTGCGTGGGAGACAGCAAGACACACTCCAGTCAATTCTGGCTAGGCAACATAATCATG
CGACGCACCTCTGTCTGTTCTGTGTGAGGTCAGTTAAGGACCGATCCGTTGTATTAGTAG
8161 PheAlaProThrLeuTrpAlaArgMetIleLeuMetThrHisPhePheSerValLeuIle
TTTCCCCCACACTGTGGGCGAGGATGATACTGATGACCCATTTCTTTAGCGTCTTTATA
AAACGGGGGTGTGACACCCGCTCCTACTATGACTACTGGGTAAGAAATCGCAGGAATAT
8221 AlaArgAspGlnLeuGluGlnAlaLeuAspCysGluIleTyrGlyAlaCysTyrSerIle
GCCAGGACCAAGCTTGAACAGGCCCTCGATTGCGAGATCTACGGGGCTGTACTCCATA
CGGTCCCTGGTCAACTTGTCCGGAGCTAACGCTCTAGATGCCCCGGACGATGAGGTAT
9281 GluProLeuAspLeuProProIleIleGlnArgLeu
GAACCACTTGATCTACCTCCAATCATTCAAAGACTC
CTTGGTGAAGTAGATGGAGGTAGTAAGTTTCTGAG

16-9. dbra

-312 CACTCCACCATGAATCACTCCCTCTGAGGAACACTGCTGTTTCAGGACAGAAAGCGTCTAG
CTGAGGTGGTACTTACTGAGCGGACACTCTCTTGATGACAGAAGTCCGCTCTTTCCGAGATC

-259 CCATGGCGTTAGTATGAGTGTCTGTCAGCGCTCCAGGACCCCCCTCCCGGGAGAGCCATA
GGTACCAGCATCACTACACAGCAGCTCGGAGGTCTCGGGGGGAGGGCCCTCTCGGTAT

-199 GTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTCAGGAGGACCGGGTCTCTTCTTGGGA
CACCAGAGCCCTTGGCCACTCATCTGCCCTTAACGGTCTGCTGCCCCAGGAAAGAACTT

-139 TCAACCCGCTCAATGCCCTGGAGATTGGGGCTGCCCCCGCAAGACTGCTAGCGGAGTAGT
AGTTGGGGGAGTTACGGACCTCTAAACCCGACCGGGGGCTTCTGACGATCGGCTCATCA

- 79 GTTGGGTCCGGAAGGCCCTTGTGCTACTGCTGATAGGCTGCTTGGGAGTCCCCCGGAG
CAACCCAGCGCTTCCGGAACACCATGACGGACTATCCACGAAGGCTACGGGGGCCCTC

- 19 GTCTCGTAGACCGTGCACC
CAGAGCATCTGGCAGCTGG

Arg Thr

1 MetSerThrAsnProLysProGlnLysLysAsnLysArgAsnThrAsnArgArgProGln
ATGAGCACGAATCCTAAACCTCAAAAAAAAAAACAACGTAACACCAACCGTCCGCCACAG
TACTCGTGTAGGATTGGAGTTTTTTTCTTGTGTTGTCATGTGCTTGGCAGCGGGTGTG

61 AspValLysPheProGlyGlyGlyGlnIleValGlyGlyValTyrLeuLeuProArgArg
GACGTCAAGTTCCCGGGTGGCGGTGAGATCGTTGGTGGAGTTTACTTGTGCGCGCGAGG
CTGCAGTTCAAGGGCCACCGCCAGTCTAGCAACCACTCAAAATGAACAACGGCGCGTCC

121 GlyProArgLeuGlyValArgAlaThrArgLysThrSerGluArgSerGlnProArgGly
GGCCCTAGATTGGGTGTGCGCGCGACGAGAAAGACTTCCGAGCGGTCCCAACCTCCAGGT
CCGGGATCTAACCCACACCGCGCGCTCTTCTGAAAGGCTCCGCCAGCGTTGGAGCTCCA

181 ArgArgGlnProIleProLysAlaArgArgProGluGlyArgThrTrpAlaGlnProGly
AGACGTCAAGCTATCCCAAGGCTCGTCCGCCCGAGGGCAGGACCTGGGCTCAGCCCGG
TCTGCAGTCGGATAGGGGTTCGAGCAGCGGGCTCCCGTCTTGGACCCGATCGGGCTC

241 TyrProTrpProLeuTyrGlyAsnGluGlyCysGlyTrpAlaGlyTrpLeuLeuSerPro
TACCTTGGCCCCCTCTATGGCAATGAGGGTGGGGTGGGGGATGGCTCTCTCTCC
ATGGGAACCGGGAGATACCGTTACTCCCGACGCCACCCGCCCTACCGAGGACAGAGGG

301 ArgGlySerArgProSerTrpGlyProThrAspProArgArgArgSerArgAsnLeuGly
CGTGGCTCTCGGCCCTAGCTGGGGCCACAGACCCCGGCTAGCTCGCGCAATTGGGT
GCACCGAGAGCGGATCGACCCCGGGGTCTTGGGGCGCATCCAGCGCTTAACCCA

361 LysValIleAspThrLeuThrCysGlyPheAlaAspLeuMetGlyTyrIleProLeuVal
AAGGTATCGATACCCCTTACGTGGCGCTTCCCGACCTCATGGGTACATACCGCTCGTC
TTCCAGTAGCTATGGGAATGCACGCCGAGCGGCTGGAGTACCCCATGTATGGCAGCAG

421 GlyAlaProLeuGlyGlyAlaAlaArgAlaLeuAlaHisGlyValArgValLeuGluAsp
GGCGCCCCCTTGGAGGCGCTGCCAGGGCCCTGGCGCATGGCGTCCCGGTTCTGGAAGAC
CCCGGGGAGAACCCTCCGCGACGGTCCCGGACCGGTACCGCAGGCCCAAGACCTCTG

Thr

481 GlyValAsnTyrAlaThrGlyAsnLeuProGlyCysSerPheSerIlePheLeuLeuAla
GGCGTGAACATGCAACAGGGAACCTTCTGGTTGCTCTTCTCTATCTTCTCTCTGCCC
CCGCATTGATACGTTGCTCCCTTGGAAAGACCAACGAGAAAGAGATAGAAGGAAGACGG

541 LeuLeuSerCysLeuThrValProAlaSerAlaTyrGlnValArgAsnSerThrGlyLeu
CTGCTCTCTTGGCTTGAAGTGTCCCGCTTCCGCTTACCAAGTGGCAACTCCAGGGGCTT
GACGAGAGAACGAACCTGACACGGGCGAAGCCGGATGGTTACCGCTTGAAGGTGCCCGGA

601 TyrHisValThrAsnAspCysProAsnSerSerIleValTyrGluAlaAlaAspAlaIle
TACCACGTACCAATGATTCCTTAACCTCAGTATTGTGACGAGCGCGCGATGCCATC
ATGGTGCAGTGGTTACTAACCGCATTCAGCTCATTAACACATGCTCCCGCGGCTACGCTAG

661 LeuHisThrProGlyCysValProCysValArgGluGlyAsnAlaSerArgCysTrpVal
CTGCACACTCCGGGGTGGCTCCCTTCCGTTCCGTGAGGGCAACCGCTCCAGGTGTGTTGGGTG
GACGTGTGAGGCCCCACCGAGGGAACCGAAGCACTCCCGTTGGCGAGCTCCACAACCCAC

17-1. obra

721 AlaMetThrProThrValAlaThrArgAspGlyLysLeuProAlaThrGlnLeuArgAla
GCGATGACCCCTACCGTGGCCACCAGGATGGCAAACTCCCCGCGACCGAGCTTCCAGCT
CGCTACTGGGGATGCCACCGCTGCTCCCTACCGTTTGAGGGGGCGCTGCGTCCAAAGCTGCA

781 HisIleAspLeuLeuValGlySerAlaThrLeuCysSerAlaLeuTyrValGlyAspLeu
CACATCGATCTGCTTGTGCGGGAGCGCCACCCTCTGTTCCGGCCCTCTACGTGGGGGACCTA
GTGTAGCTAGACGAACAGCCCTCGCGGTGGGAGACAAGCCGGAGATGCCACCCCTGGAT

841 CysGlySerValPheLeuValGlyGlnLeuPheThrPheSerProArgArgHisTrpThr
TCCGGGTCTGTCTTTCTTGTGCGGCCAACTGTTACCTTCTCTCCAGGGCCACTGGACG
ACGCCAGACAGAAAGAACAGCCGTTGACMAGTGGAAAGAGAGGGTCCGGGTGACCTGC

901 ThrGlnGlyCysAsnCysSerIleTyrProGlyHisIleThrGlyHisArgMetAlaTrp
ACGCAAGGTTGCAATTGCTCTATCTATCCCGGCCATATAACGGGTACCGCATGGCATGG
TGGTTCCAAAGTTAACGAGATAGATAGGGCCGGTATATTGCCAGTGGCGTACCGTACC

961 Val
AspMetMetMetAsnTrpSerProThrThrAlaLeuValMetAlaGlnLeuLeuArgIle
GATATGATCATGAACCTGGTCCCTACGACGGCGTGGTAATGGCTCAGCTGCTCCGGATC
CTATACTACTACTTGACCAAGCGGATGCTGCCGCAACCAATTACCGAGTCGACGAGGCTAG

1021 ProGlnAlaIleLeuAspMetIleAlaGlyAlaHisTrpGlyValLeuAlaGlyIleAla
CCACAAGCCATCTTGGACATGATCGCTGGTGGCTCACTGGGGAGTCCCTGGCGGGCATAGCG
GGTGTTCGGTAGAACCTGTACTAGCGACCAAGAGTGACCCCTCAGGACCGCCCGTATCCG

1081 TyrPheSerMetValGlyAsnTrpAlaLysValLeuValValLeuLeuPheAlaGly
TATTTCTCCATGGTGGGGAACCTGGCGGAAGTCTGGTAGTGCTGCTGCTATTTGCCGGC
ATAAAGAGGTACCAACCCCTTGACCCGCTTCCAGGACCATCAGCAGCAGATAAACGGCCG

1141 ValAspAlaGluThrHisValThrGlyGlySerAlaGlyHisThrValSerGlyPheVal
GTCGACGCGGAACCCACGTCAACCGGGGAAGTGGCGGCCACACTGTGTCTGGATTGTT
CAGCTGCGCCTTTGGGTGCAGTGGCCCCCTTACCGCCCGGTGTACACAGACCTAAACAA

1201 SerLeuLeuAlaProGlyAlaLysGlnAsnValGlnLeuIleAsnThrAsnGlySerTrp
AGCCTCCTCGCACCAAGGCGCCAAGCAGAACGTCCAGCTGATCAACCAACCGCAGTTGG
TCGGAGGAGCGTGGTCCGCGGTTCTGCTTGCAGGTGACTAGTTGTGGTTGCCGTCAACC

1261 HisLeuAsnSerThrAlaLeuAsnCysAsnAspSerLeuAsnThrGlyTrpLeuAlaGly
CACCTCAATAGCACGGCCCTGAACCTGCAATGATAGCCTCAACACCGGCTGTTGGCAGGG
GTGGAGTTATCGTCCCGGACTTGACGTTACTATCGGAGTTGTGGCCGACCAACCGTCCC

1321 LeuPheTyrHisHisLysPheAsnSerSerGlyCysProGluArgLeuAlaSerCysArg
CTTTTCTATCACCACAGTTCAACTCTTCAGGCTGTCTGAGAGGCTAGCCAGCTGCCGA
GAAAAGATAGTGGTGTTCAGTTGAGAGTCCGACAGGACTCTCCGATCGGTCCAGCGCT

1381 ProLeuThrAspPheAspGlnGlyTrpGlyProIleSerTyrAlaAsnGlySerGlyPro
CCCCCTACCGATTGTTGACCAAGGCTGGGGCCCTATCAGTTATGCCAAGCGGAAGCGCCCC
GGGGAAATGGCTAAACTGGTCCCGACCCCGGATAGTCATACGGTTCCCTTCGCGGGGG

1441 AspGlnArgProTyrCysTrpHisTyrProProLysProCysGlyIleValProAlaLys
GACCAGCGCCCTACTGTGGCACTACCCCCAAAACCTTGGCGTATTGTGCCCCGGAAG
CTGGTCCGGGGATGACGACCGTGATGGGGGTTTTGGAACCCATAACACGGGGCGTTT

1501 SerValCysGlyProValTyrCysPheThrProSerProValValValGlyThrThrAsp
AGTGTGTGTGGTCCGGTATATTGCTTCACTCCAGCCCCGTGGTGGTGGGAACGACCGAC
TCACACACACAGGCCATATAACGAACTGAGGGTGGGGCACCAACACCCCTTGTGTGGCT

1561 ArgSerGlyAlaProThrTyrSerTrpGlyGluAsnAspThrAspValPheValLeuAsn
AGGTCCGGGCGGCCACCTACAGCTGGGGTGAAATGATACGGAGCTTCTCGCTCTAAC
TCCAGCCCGCGGGGTGGATGTGACCCCACTTTTACTATGCTGCAGAAAGCAGGAATTG

1621 AsnThrArgProProLeuGlyAsnTrpPheGlyCysThrTrpMetAsnSerThrGlyPhe
AATACCAGGCCACCGCTGGGCAATTGGTTCGGTTGTACCTGGATGAACCTCAACTGGATT
TTATCGTCCGGTGGCGACCCGTTAACCAAGCCAACTGACCTACTTCACTTGAATTAAAG

17-2. obrc

1601 ThrLysValCysGlyAlaProProCysValIleGlyGlyAlaGlyAsnAsnThrLeuHis
ACCAAGTGTGCGGAGCGCCTCTTGTGTCATCGGAGGGGGGCAACAACACCTGCAC
TGGTTTCACAGCCCTCGCGGAGGAACACAGTAGCCTCCCCGCCCCGTTGTTGGGACGTG

1741 CysProThrAspCysPheArgLysHisProAspAlaThrTyrSerArgCysGlySerGly
TGCCCCACTGATTGCTTCGCAAGCATCCGGACGCCACATACTCTCGGTGCGGCTCCGGT
ACGGGGTGACTAACGAAGCCGTTCTGACCCCTCGGTGTATGAGAGCCAGCCGAGGCCA

1801 Leu
ProTrpIleThrProArgCysLeuValAspTyrProTyrArgLeuTrpHisTyrProCys
CCCTGGATCACACCCAGGTGCTGCTGACTACCCGTATAGGCTTTGGCATTATCCTTGT
GGGACCTAGTGTGGGTCCACGGACCAGCTGATGGGCATATCCGAACCGTAATAGGAACA

1861 ThrIleAsnTyrThrIlePheLysIleArgMetTyrValGlyGlyValGluHisArgLeu
ACCAACAACACACCATATTTAAATCAGGATGTACGTGGGAGGGGTCCGAACACAGGTG
TGGTAGTTGATGTGGTATTAATTTAGTCTACATGCACCTCCCCAGCTTGTGTCGGAC

1921 GluAlaAlaCysAsnTrpThrArgGlyGluArgCysAspLeuGluAspArgAspArgSer
GAAGCTGCCCTGCAACTGGACGCGCGCGGAACGTTGCGATCTGGAAGACAGGGACAGGTCC
CTTCGACGGACGTTGACCTGCGCCCCGCTTCGAACGCTAGACCTTCTGTCCCTGTCCAGG

1981 GluLeuSerProLeuLeuLeuThrThrThrGlnTrpGlnValLeuProCysSerPheThr
GAGCTCAGCCCGTTACTGCTGACCACTACACAGTGGCAGGTCTCCCGTGTCTCTTCA
CTCGAGTCGGCAATGACGACTGGTGTATGTGTACCCGTCAGGAGGGGCACAAGGAAGTGT

2041 ThrLeuProAlaLeuSerThrGlyLeuIleHisLeuHisGlnAsnIleValAspValGln
ACCCTACAGCCCTTGTCCACCGGCTCATCCACCTCCACCAAGAACATTGTGGACGTGCAG
TGGGATCGTCCGAACAGGTGGCGGAGTAGGTGGAGGTGGTCTTGTAAACCTTGCACGTC

2101 TyrLeuTyrGlyValGlySerSerIleAlaSerTrpAlaIleLysTrpGluTyrValVal
TACTTGTACGGGGTGGGGTCAAGCATCGCGTCTTGGGCCATTAAGTGGGAGTACGTCCT
ATGAACATGCCCAACCCAGTTCTGACCGCAGGACCCGGTAATTCACCTCATGCAACAA

2161 LeuLeuPheLeuLeuLeuAlaAspAlaArgValCysSerCysLeuTrpMetMetLeuLeu
CTCCTGTCTCTTCTGCTTGCAGACGCGCGCTCTGCTCTGCTTGTGGATGATGCTACTC
GAGGACAAGGAAGACGAACGCTTGCAGCGCAGACGAGGACGAACACCTACTACGATGAG

2221 IleSerGlnAlaGluAlaAlaLeuGluAsnLeuValIleLeuAsnAlaAlaSerLeuAla
ATATCCCAAGCGGAGGGCGGCTTTGGAGAACCCTGTAATACTTAATGCAGCATCCCTGGCC
TATAGGCTTCGCTCCGCGGAACCTCTTGGAGCATATGATTAGCTGTAGGGACCGG

2281 GlyThrHisGlyLeuValSerPheLeuValPhePheCysPheAlaTrpTyrLeuLysGly
GGGACGCACGGTCTTGATACCTTCCTCGTGTCTTCTGCTTTGCATGGTATTTGAAGGGT
CCCTGCGTGCAGAACATAGGAAGGAGCACAAGAAGACGAACGTAACATAAACTTCCCA

2341 LysTrpValProGlyAlaValTyrThrPheTyrGlyMetTrpProLeuLeuLeuLeu
AAGTGGGTGCCCGGAGCGGTCTACACCTTCTACGGGATGTGGCCTCTCCTCCTGCTCTG
TTACCCACGGGCTCGCCAGATGTGGAAGATGCCCTACACCGGAGAGGAGGACGAGGAC

2401 LeuAlaLeuProGlnArgAlaTyrAlaLeuAspThrGluValAlaAlaSerCysGlyGly
TTGGCGTTGCCCGAGCGGCGTACGCGCTGGACACGAGGTGGCGCGCTCGTGTGGCGGT
AACCGCAACGGGTCGCCCGCATGCGCGACCTGTGCTTCCACCGCGCAGCACACCGCCA

2461 ValValLeuValGlyLeuMetAlaLeuThrLeuSerProTyrTyrLysArgTyrIleSer
GTGTCTCTCGTGGGTGATGGCGCTGACTCTGTACCATATTACAGCGCTATATCAGC
CAACAAGAGCAGCCCACTACCGGCTGAGACAGTGGTATAATGTTCGGCATATAGTCG

2521 Asn
TrpCysLeuTrpTrpLeuGlnTyrPheLeuThrArgValGluAlaGlnLeuHisValTrp
TGGTGTCTGTGGTGGCTTCAGTATTTTCTGACCAAGAGTGGAAAGCGCACTGCACGTGTGG
ACCACGAACACACCGAAGTCTATAAAGACTGGTCTCACCTTCGCGTTGACGTGCACACC

2581 IleProProLeuAsnValArgGlyGlyArgAspAlaValIleLeuLeuMetCysAlaVal
ATTCCCCCTCAACGTCGAGGGGGGCGCGCAGCGGCTCATCTTACTCATGTGTGCTGT
TAAGGGGGGAGTTGCAGGCTCCCGCGCGCTCGCGCAGTAGAATGAGTACACAGCAT

17-3. abra

2641 HisProThrLeuValPheAspIleThrLysLeuLeuLeuAlaValPheGlyProLeuTrp
CAGCCGACTCTGGTATTGACATCACCAATTGCTGCTGGCCGCTCTCGGACCCCTTTGG
GTGGGCTGAGACCATAAATCTAGTGGTTTAAAGACGACCGGCAGAACCTGGGAAACC

2701 IleLeuGlnAlaSerLeuLeuLysValProTyrPheValArgValGlnGlyLeuLeuArg
ATTCTTCAAGCCACTTTGCTTAAAGTACCCTACTTTGTGCGCGTCCAAAGGCCCTCTCCGG
TAAGAAGTTCGGTCAAACGAATTTTCATGGGATGAAACACGGCGAGGTTCGGGAAGAGGCC

2761 PheCysAlaLeuAlaArgLysMetIleGlyGlyHisTyrValGlnMetValIleIleLys
TTCTGCGCGTTAGCGCGGAAGATGATCGGAGGCCATTACGTGCAAAATGGTCATCATTAAG
AAGACGCGCAATCGCGCTTCTACTAGCCTCCGGTAATGCACGTTTACCAGTAGTAATTC

2821 LeuGlyAlaLeuThrGlyThrTyrValTyrAsnHisLeuThrProLeuArgAspTrpAla
TTAGGGGCGCTTACTGGCACCTATGTTTAAACCATCTCACTCCTCTTCGGGACTGGGCG
AATCCCGCGGAATGACCGTGGATACAAATATTGGTAGAGTAGGAGAAGCCCTGACCCCG

2881 HisAsnGlyLeuArgAspLeuAlaValAlaValGluProValValPheSerGlnMetGlu
CACAAAGGCTGCGGAGATCTGGCCGTGGCTGTAGAGCCAGTCGTCTCTCCCAAAATGGAG
GTGTTGCCGAACGCTCTAGACCGGCACCGACATCTCGGTACGACAGAAGAGGGTTTACCTC

2941 ThrLysLeuIleThrTrpGlyAlaAspThrAlaAlaCysGlyAspIleIleAsnGlyLeu
ACCAAGCTCATACGTGGGGGCGAGATACCGCCGCGTGGCGTGACATCATCAACGGCTTG
TGGTTCCGACTAGTGACCCCCCGTCTATGGCGGCGCACGCCACTGTAGTACTTCCCGAAC

3001 ProValSerAlaArgArgGlyArgGluIleLeuLeuGlyProAlaAspGlyMetValSer
CCTGTTTCCGCCCCGAGGGGCGGGAGATACTGCTCGGGCCAGCCGATGGAATGGTCTCC
GGACAAAGCGGGCGTCCCGGCCCTCTATGACGAGCCCGTCCGGCTACCTTACCAGAGG

3061 LysGlyTrpArgLeuLeuAlaProIleThrAlaTyrAlaGlnGlnThrArgGlyLeuLeu
AAGGGGTGGAGGTTTGGTGGCGCCATCACGGCGTACGCCAGCAGACAAAGGGGCTCTTA
TTCCCCACCTCCAACGACCGCGGTAGTGCCGATGCGGGTCGTCTGTTCCCGGAGGAT

3121 GlyCysIleIleThrSerLeuThrGlyArgAspLysAsnGlnValGluGlyGluValGln
GGGTGCATAATCACAGCCTAACTGGCCGGGACAAAACCAAGTGGAGGCTGAGGTCCAG
CCCACGTATTAGTGCTCGGATTGACCGGCCCTGTITTTGGTTACCTCCCACTCCAGGTC

3181 IleValSerThrAlaAlaGlnThrPheLeuAlaThrCysIleAsnGlyValCysTrpThr
ATTGTGTCAACTGCTCCCCAAACCTTCTTGGCAACGTGCATCAATGGCGTGTCTGGACT
TAACACAGTTGACGACGGCTTTGGAAAGGACCGTTGCAGGTAGTTACCCACACGACCTGA

3241 ValTyrHisGlyAlaGlyThrArgThrIleAlaSerProLysGlyProValIleGlnMet
GTCTACACGGGGCGGACGAGGACCATCGCGTCACCCAAGGCTCTGTCTATCCAGATG
CAGATGGTGGCCCGGCCCTTCTCTTGGTAGCGCAGTGGGTTCACGAGACAGTAGGTCTAC

3301 Ser Thr
TyrThrAsnValAspGlnAspLeuValGlyTrpProAlaProGlnGlySerArgSerLeu
TATACCAATGTAGACCAAGACCTTGTTGGCTGGCCCGCTCCGCAAGGTAGCCGTCATTG
ATATGGTTACATCTGGTTCTGGAACACCCGACCGGGCGAGGGCTTCCATCGGCGAGTAAC

3361 ThrProCysThrCysGlySerSerAspLeuTyrLeuValThrArgHisAlaAspValIle
ACACCCCTGCACTTGGCGCTCCTCGGACCTTTACCTGGTCACGAGGCACGCCGATGTCATT
TGTGGGACGTGAACGCGGAGGAGCCTGGAATGGACAGTGCTCCGTGCGGCTACAGTAA

3421 ProValArgArgArgGlyAspSerArgGlySerLeuLeuSerProArgProIleSerTyr
CCCGTGCGCGGGCGGGGTGATAGCAGGGGCGAGCCTGCTGTGCCCCGGGCCATTTCTTAC
GGGACGCGGGCGCCCCACATATCGTCCCGTGGAGCAGCAGCGGGCGGGTAAAGGATG

3481 LeuLysGlySerSerGlyGlyProLeuLeuCysProAlaGlyHisAlaValGlyIlePhe
TTGAAAGGCTCTCGGGGGTCCGCTGTGTGCCCCGGGGGACGCGGTGGGCTATTT
AATTTCCGAGGACCCCCAGCGGACAAACAGGGGCGCCCCGTGCGGCACCGTATATA

3541 ArgAlaAlaValCysThrArgGlyValAlaLysAlaValAspPheIleProValGluAsn
AGGGCGCGGGTGTGACCCCGTGGAGTGGCTAAGGCGGTGGACTTTATCCCTGTGGAGAAC
TCCCGCGGCCACAGTGGGACCTCACCGATTCGCCACCTGAATAGGGACACCTCTTG

17-4. obra

3601 LeuGluThrThrMetArgSerProValPheThrAspAsnSerSerProProValValPro
CTAGAGACAACCATGAGGTCCCGGGTGTTCACGGATAACTCCTCTCCACCAGTAGTGGTC
GATCTCTGTTGGTACTCCAGGGGCCACAAGTGCTATTGAGGAGAGGTGGTCATCAGGGG

3661 GlnSerPheGlnValAlaHisLeuHisAlaProThrGlySerGlyLysSerThrLysVal
CAGAGCTTCCAGGTGGCTCACCTCCATGCTCCACAGGCAGCGGCAAAAGCACCAGGTG
GTCTCGAAGGTCCACCGAGTGGAGGTACGAGGGTGTCCGTGCGCGTTTTCGTGGTTCCAG

3721 ProAlaAlaTyrAlaAlaGlnGlyTyrLysValLeuValLeuAsnProSerValAlaAla
CCGGCTGCATATGCAGCTCAGGGCTATAAGGTGCTAGTACTCAACCCCTCTGTTGGTSCA
GGCCGACGTATACGTCCGAGTCCCGATATCCACGATCATGAGTTGGGGAGACAACGACGT

3781 ThrLeuGlyPheGlyAlaTyrMetSerLysAlaHisGlyIleAspProAsnIleArgThr
ACACTGGGCTTTGGTGCTTACATGTCCAAGGCTCATGGGATCGATCTTAACATCAGGACC
TGTGACCCGAACACCGAATGTACAGGTCCGAGTACCCTAGCTAGGATGTGTAGTCTGGG

3841 GlyValArgThrIleThrThrGlySerProIleThrTyrSerThrTyrGlyLysPheLeu
GGGCTGAGAACAATTACCACTGGCAGCCCCATCAGCTACTCCACCTACCGCAAGTTCCCTT
CCCCACTCTTGTAAATGGTGACCGTGGGGTAGTGATGAGGTGGATGCCGTTCAAGGAA

3901 AlaAspGlyGlyCysSerGlyGlyAlaTyrAspIleIleIleCysAspGluCysHisSer
GCGACGGCGGGTGTCTCGGGGGCGCTTATGACATAATATTGTGACGAGTGGCACTCC
CGCTGTGCCGCCACGAGCCCCCGCGAATACTGTATTATTAACACTGCTACGGTGAGG

3961 ThrAspAlaThrSerIleLeuGlyIleGlyThrValLeuAspGlnAlaGluThrAlaGly
ACGGATGCCACATCCATCTTGGGCATCGGCACCTGCTCTGACCAAGCAGAGACTGGCGGG
TGCTTACGGTGTAGGTAGAACCCCTAGCCGTGACAGGAACGTGTTCTCTCTGACGGTCCC

4021 AlaArgLeuValValLeuAlaThrAlaThrProProGlySerValThrValProHisPro
GGGAGACTGGTTGTGCTCGCCACCGCCACCCCTCCGGGCTCCCTCACTGTGCCCCATCCC
CGCTCTGACCAACACGAGCCGTGGCGGTGGGGAGGCCCGAGGCAGTGACAGGGGTAGGG

4081 AsnIleGluGluValAlaLeuSerThrThrGlyGluIleProPheTyrGlyLysAlaIle
AACATCGAGGAGGTGTCTCTGTCCACCACCGGAGAGATCCCTTTTACCGCAAGGCTATC
TTGTAGCTCTCCCAACGAGACAGGTGGTGGCTCTCTAGGGAAAAATGCCGTTCGGATAG

4141 ProLeuGluValIleLysGlyGlyArgHisLeuIlePheCysHisSerLysLysLysCys
CCCCTCGAAGTAATCAAGGGGGGAGACATCTCATCTCTGTCATTCAAAGAAGAAGTGC
GGGAGCTTCATTAGTTCCTCCCTCTCTAGAGTAGAAGACAGTAAGTTTCTTCTCACC

4201 AspGluLeuAlaAlaLysLeuValAlaLeuGlyIleAsnAlaValAlaTyrTyrArgGly
GACGAACCTCGCCGCAAGCTGGTCCGATTTGGGCATCAATGCCGTGGGCTACTACCGCGGT
CTGCTTGAGCGGGCTTTCGACCCAGCGTAACCCGTAGTTACGGCACCGGATGATGGGCCA

4261 LeuAspValSerValIleProThrSerGlyAspValValValValAlaThrAspAlaLeu
CTTGACGTGTCCGTATCCCGACCGCGGCGATGTTGTGCTGCTGGCAACCGATGCCCTC
GAACGTGCACAGGCAGTAGGGCTGGTGGCCGCTACAACAGCAGCACCGTTGGCTACGGGAG

4321 MetThrGlyTyrThrGlyAspPheAspSerValIleAspCysAsnThrCysValThrGln
ATGACCGGCTATACCGGCGACTTCGACTCGGTGATAGACTGCAATACGTGTGTCAACCCAG
TACTGGCCGATATGGCCGCTGAAGCTGAGCCACTATCTGACGTTATGCACACAGTGGGTCT

4381 ThrValAspPheSerLeuAspProThrPheThrIleGluThrIleThrLeuProGlnAsp
ACAGTCCGATTTACGCTTACCCCTACCTTCACCAATTGAGACAATCACGCTCCCCCAGGAT
TGTACGCTAAAGTCGGAACCTGGGATGGAAGTGGTAACTCTGTTAGTGCGAGGGGGTCCCTA

4441 AlaValSerArgThrGlnArgArgGlyArgThrGlyArgGlyLysProGlyIleTyrArg
GCTGTCTCCCGCACTCAACCTCGGGGCGAGGACTGGCAGGGGGAGCCAGGCATCTACAGA
CGACAGAGGGCGTAGTTGCAGCCCCGTCTGACCGTCCCCCTTCGGTCCGTAGATGTCT

4501 PheValAlaProGlyGluArgProSerGlyMetPheAspSerSerValLeuCysGluCys
TTTGTGGCACCGGGGGAGCGCCCTCCGGCATGTTCCGACTCGTCCGTCTCTGTGAGTGC
AAACACCGTGGCCCCCTCGCGGGGAGGCCGTACAAGCTGAGCAGGCAGGAGACACTCAGC

17-5. ábra

4561 TyrAspAlaGlyCysAlaTrpTyrGluLeuThrProAlaGluThrThrValArgLeuArg
TATGACGCAGGCTGTGCTTGGTATGAGCTGACGCCCGCCGAGACTACAGTTAGGCTACGA
ATACTGCGCTCCGACACGAACCATACTCGAGTGCGGGCGGCTCTGATGTCATCCGATGCT

4621 AlaTyrMetAsnThrProGlyLeuProValCysGlnAspHisLeuGluPheTrpGluGly
GCGTACATGAACACCCCGGGGCTTCCCGTGTCGACAGGACCATCTTGAATTTGGGAGGGG
CGCATGTACTTGTGGGGCCCCGAAGGGCACACGGTCTTGGTAGAACCTTAAACCCCTCCCG

4681 ValPheThrGlyLeuThrHisIleAspAlaHisPheLeuSerGlnThrLysGlnSerGly
GTCTTTACAGGCCTCACTCAATAGATGCCCACTTTCTATCCAGACAAAGGAGAGTGGG
CAGAAATGTCCGAGTGAGTATATCTACGGGTGAAGATAGGGTCTGTTTCGTCTCACCC

4741 GluAsnLeuProTyrLeuValAlaTyrGlnAlaThrValCysAlaArgAlaGlnAlaPro
GAGAACCTTCTTACCTGGTAGCGTACCAAGCCACCGTGTGCGCTAGGCTCAAGCCCTT
CTCTTGGGAAGGAATGGACCATCCCATGCTTGGTGGCACACCGGATCCCGAGTTCGGGGA

4801 ProProSerTrpAspGlnMetTrpLysCysLeuIleArgLeuLysProThrLeuHisGly
CCCCCATCGTGGGACAGATGTGGAAAGTCTTTGATTCGCGCTCAAGCCACCTCCATGGG
GGGGTAGCACCTGGTCTACACCTTCACAACTAAGCGGAGTTCGGGTGGGAGGTACCC

4961 ProThrProLeuLeuTyrArgLeuGlyAlaValGlnAsnGluIleThrLeuThrHisPro
CCAAACCCCTGTATACAGACTGGGCGCTGTTCAGAAATGAATCACCTGACGCACCCA
GGTTGTGGGACGATATGCTGACCCCGACAGTCTTACTTTAGTGGGACTGCGTGGGT

4921 ValThrLysTyrIleMetThrCysMetSerAlaAspLeuGluValValThrSerThrTrp
GTACCCAAATACATCATGACATGCCATGTGCGCCGACCTGGAGGTCGTACAGGACCTGG
CAGTGGTTTATGTAGTACTGTACGTACAGCCGGCTGGACCTCCAGCAGTGTCTGCGGACC

4981 ValLeuValGlyGlyValLeuAlaAlaLeuAlaAlaTyrCysLeuSerThrGlyCysVal
GTGCTCGTTGGCGCGCTCTGGCTGCTTTGGCCGCGTATTGCGCTGCAACAGGCTCCGTG
CAGGAGCAACCGCCGACGAGCCAGCAAAACCGCGCATACGGACAGTTGTCCGACGCGAC

5041 ValIleValGlyArgValValLeuSerGlyLysProAlaIleIleProAspArgGluVal
GTCATAGTGGGACGGTCTGTCTGTGTCGGGAAGCCGCGCAATCATACCTGACAGGCAAGTC
CAGTATCACCCGCTCCAGCAGAACAGGCCCTTCGGCCGTTAGTATGGACTGTCCCTTCAG

5101 LeuTyrArgGluPheAspGluMetGluGluCysSerGlnHisLeuProTyrIleGluGln
CTCTACCGAGAGTTGCAATGAGATGGAAGAGTGTCTCTCAGCACTTACCTGACATCGAGCA
GAGATGGCTCTCAAGCTACTCTACCTTCTCAGCAGAGTCGTGAATGGCATGTAGCTCGTT

5161 GlyMetMetLeuAlaGluGlnPheLysGlnLysAlaLeuGlyLeuLeuGlnThrAlaSer
GGGATGATGCTGCGCCGAGCAGTTCAAGCAGAAAGGCCCTCGGCTCTGACAGCCGCTCC
CCCTACTACGAGCGGCTCGTCAAGTTCTCTCTCCGGGAGCCGAGGAGCTTUGCCACAGG

5221 ArgGlnAlaGluValIleAlaProAlaValGlnThrAsnTrpGlnLysLeuGluThrPhe
CGTCAGGCAGAGGTTATCGCCCTGCTGTCCAGACCACTGGCAAAACTCGAGACCTTC
GCAGTCCGTCTCCAATAGCGGGGACGACAGGTCGTGTTGACCGTTTTCAGCTCTGGAG

5281 TrpAlaLysHisMetTrpAsnPheIleSerGlyIleGlnTyrLeuAlaGlyLeuSerThr
TGGGCGAAGCATATGTGGAACCTTCATCAGTGGGATACAATACCTGGCGGGCTTGTCAACG
ACCCGCTTCGTATACACCTTGAAGTAGTCACCTATGTTATGAACCCCGAACAGTTGC

5341 LeuProGlyAsnProAlaIleAlaSerLeuMetAlaPheThrAlaAlaValThrSerPro
CTGCGCTGGTAACCCCGCCATTGCTTCAATGATGGCTTTTACAGCTGCTGTACACGCCCA
GACCGACATTGGGGCGGTAAAGCAAGTAACTACCGAAATGTGACGACAGTGGTCCGGT

5401 LeuThrThrSerGlnThrLeuLeuPheAsnIleLeuGlyGlyTrpValAlaAlaGlnLeu
CTAACCACTAGCCAAACCTCTCTTCAACATATTGGGGGGGTGGGTGGCTGCCAGCTC
GATTGGTGATCGGTTTGGGAGGAGAAGTTGTATAAACCCCGCCACCCAGCGGTTCGAG

5461 AlaAlaProGlyAlaAlaThrAlaPheValGlyAlaGlyLeuAlaGlyAlaAlaIleGly
GCCGCCCCCGGTGCCGCTACTGCCTTTGTGGGCGCTGGCTTAGCTGGCGCCGCCATCGGC
CGGCGGGGGCCACGGCGATGACGGAACACCCCGACCGAATCGACCCCGCGGTACCGG

SerValGlyLeuGlyLysValLeuIleAspIleLeuAlaGlyTyrGlyAlaGlyValAla

17-6. abra

5521 AGTGTGTGGACTGGGGAAGGTCTCATAGACATCTCTGCAGGGTATGTCGGGGGGCGTGGG
TCACAACCTGACCCCTTCCAGGAGTATCTGTAGGAACGTCCCATACCGGGGGGACCCG

Gly

5501 GlyAlaLeuValAlaPheLysIleMetSerGlyGluValProSerThrGluAspLeuVal
GGAGCTCTTGTGGCATTCAAGATCATGAGCGGTGAGGTCCCTCCACGGAGGACCTGGTC
CCTCGAGAACACCGTAAGTCTTAGTACTCGCCACTCCAGGGGAGGTGCCTCTGGACCAG

5641 AsnLeuLeuProAlaIleLeuSerProGlyAlaLeuValValGlyValValCysAlaAla
AATCTACTGCCCGCCATCTCTCGCCCGGAGCCCTCGTAGTCCGGCTGCTCTGTGCAGCA
TTAGATGACGGGGCGGTAGGAGAGCGGGGCTCGGGAGCATCAGCCGCCACAGACACGTCTGT

5701 IleLeuArgArgHisValGlyProGlyGluGlyAlaValGlnTrpMetAsnArgLeuIle
ATACTGCCCGGCACGTTGGCCCGGGGAGGGGGCAGTGCAGTGCATGAACCGGCTGATA
TATGACGGGGCGGTGCAACCGGGGCTCGTCCCCCGTCACGTCACTTCTGGCCGACTAT

5761 AlaPheAlaSerArgGlyAsnHisValSerProThrHisTyrValProGluSerAspAla
GCCTTCGGCTCCCGGGGGAACCATGTTTCCCCCAGCCACTACGTGCCGGAGAGCGATGCA
CGGAAGCGGAGGGCCCCCTTGGTACAAAGGGGGTGGTGTATGCACGGCTCTCGCTACST

HisCys

5021 AlaAlaArgValThrAlaIleLeuSerSerLeuThrValThrGlnLeuLeuArgArgLeu
GCTGCCCGCGTCACTGCCATCTCAGCAGCCCTCACTGTAAACCAGCTCTTGAGCGACTG
CGACGGGGCGCATGACGGTATGAGTCTGCGGAGTGACATTGGGTGAGGACTCCGCTGAC

5081 HisGlnTrpIleSerSerGluCysThrThrProCysSerGlySerTrpLeuArgAspIle
CACCAGTGGATAAGCTCGGAGTGTACCCTCCATGCTCCGGTCTCTGGCTAAGGGACATG
GTGGTCACTATTCGAGCTCACTATGTTGAGGTACGAGGCCAAGGACCGATTCCCTGTAG

5941 TrpAspTrpIleCysGluValLeuSerAspPheLysThrTrpLeuLysAlaLysLeuMet
TGGGACTGGATATCGGAGCTCTTGAGCGACTTAAGACCTGGCTAAAGCTAAGCTCATC
ACCTGACCTATACGCTCCACAACCTCCCTGAAATCTGGACCGATTTTCGATTGAGTAC

6001 ProGlnLeuProGlyIleProPheValSerCysGlnArgGlyTyrLysGlyValTrpArg
CCACAGCTGCCCTGGGATCCCTTTGTGTCTGCCAGCGCGGGTATAAGGGGGTCTGGCGA
GGTGTGACGGACCTTAGGGGAACACAGGACGGTCCGGCCCATATTCGCCAGACCGCT

Gly

6061 ValAspGlyIleMetHisThrArgCysHisCysGlyAlaGluIleThrGlyHisValLys
GTGGACGGCATCATGCACACTCGCTGCCACTGTGGAGCTGAGATCACATGGACATGTCAA
CACCTGCCGTAGTACGTGTGACCGACGGTGACACCTCGACTCTAGTGACCTGTACAGTTT

6121 AsnGlyThrMetArgIleValGlyProArgThrCysArgAsnMetTrpSerGlyThrPhe
AACGGGACGATGAGGATCTGTCGGTCTAGGACCTGCAGGAACATGTGGAGTGGGACCTTC
TGGCCCTGCTACTCTTACGAGCCAGGATCTTGGACCTCTTGTACACCTACCCCTGGAG

6101 ProIleAsnAlaTyrThrThrGlyProCysThrProLeuProAlaProAsnTyrThrPhe
CCCATTAAATGCCATACACACGGGCCCCCTGTACCCCCCTTCTGCGCGGAACATACAGTTC
GGGTAAATTACGGATGTGGTGGCCGGGGACATGGGGGAAGGACGGCGCTTGATGTGCAG

6241 AlaLeuTrpArgValSerAlaGluGluTyrValGluIleArgGlnValGlyAspPheHis
GGCCTATGGACGGGTCTTCAGAGGAATATGTGGAGATAAGGCAGGTGGGGGACTTCCAC
CGGATACCTCCACAGACGTCTCTTATACACCTCTATTCGGTCCACCCCTGAAAGCTG

6301 TyrValThrGlyMetThrThrAspAsnLeuLysCysProCysGlnValProSerProGlu
TACGTGACGGGTATGACTACTGACAACTCTCAATGCGCGTCCAGGTCCCATCGCCCCGA
ATGCACTGCCCATACTGATGACTGTAGAGTTTACGGGCAGGTCCAGGTAGCGGGCTT

6361 PhePheThrGluLeuAspGlyValArgLeuHisArgPheAlaProProCysLysProLeu
TTTTTACAGAAATTGGACGGGTGCGCTACATAGGTITGCGCCCCCTGCAAGCCCTTG
AAAAAGTGTCTTAACCTGCCCCACGGGATGTATCCAAACGGGGGGAGCTTCGGGAAC

6421 LeuArgGluGluValSerPheArgValGlyLeuHisGluTyrProValGlySerGlnLeu
CTGCGGGAGGAGGTATCATTACAGTAGGACTCCACGAATACCCGGTAGGGTCCGAATTA
GACGCCCTCTCCATAGTAAGTCTCATCTGAGGTGCTTATGGCCATCCACCGCTTAAT

17-7. abra

6401 ProCysGluProGluProAspValAlaValLeuThrSerMetLeuThrAspProSerHis
CCTTGGAGGCCGGAACCGGAGGTGGCCGTGTTCACGTCCATGCTCACTGATCCCTCCCAT
CGAACCGCTCGGCTTGGCTTGCACCGGCACAACTGCAGGTACGAGTCACTAGCGGAGGTA

6511 IleThrAlaGluAlaAlaGlyArgArgLeuAlaArgGlySerProProSerValAlaSer
ATAACAGCAGACGGCCGCGGCGAAGGTTGGCGAGGGGATCACCCCTCTCTGTGGGAGG
TATTGTCTCTCGCGCGGCGCCCTTTCACACCGCTCCCTAGTGGGGGACACACCGGTGG

6601 SerSerAlaSerGlnLeuSerAlaProSerLeuLysAlaThrCysThrAlaAsnHisAsn
TCCTCGGCTAGCCAGCTATCCGCTCCATCTCTCAAGGCAACTTGCACCGCTAACCATGAC
AGGAGCCGATCGCTCGATACCGGAGGTAGAGAGTTCCGTTGAACGTGGCGATTTGGTACTG

6661 SerProAspAlaGluLeuIleGluAlaAsnLeuLeuTrpArgGluGluMetGlyGlyAsn
TCCCTTGATGCTGAGCTCATAGAGGCCAACCTCCATGGAGGCAGGAGATGGCGCCAAC
AGGGGACTACGACTCGAGTATCTCCGTTGGAGGATACCTCCGTCCTTACCCCGCGCTTG

6721 IleThrArgValGluSerGluAsnLysValValIleLeuAspSerPheAspProLeuVal
ATCACCGGGTTGAGTCAGAAAACAAAGTGGTGTCTCTGGACTCCTTCGATCCGGTTGTG
TAGTGGTCCCAACTCAGTCTTTTGTTCACCACTAAGACCTGAGGAAGCTAGCGGAACAC

6781 AlaGluGluAspGluArgGluIleSerValProAlaGluIleLeuArgLysSerArgArg
CGCGAGGAGCAGCAGCGGAGATCTCCGTACCCCGCAGAAATCCCTGCGGAAGTCTCGGAGA
CGCTCTCTCTGCTCGCCCTCTAGAGGATGGCGCTCTTTAGGACGGCTTCAGACGCTCT

6841 PheAlaGlnAlaLeuProValTrpAlaArgProAspTyrAsnProProLeuValGluThr
TTCGCCCAGGCCCTGCCCCGTTGGCGCGCGCGGACTATAACCCCGCGCTAGTGGAGACG
AAGCGGCTCGCGACGGGCAAAACCGCGCGCGCTGATATGGGGGCGATACCTCTCG

6901 TrpLysLysProAspTyrGluProProValValHisGlyCysProLeuProProLys
TGGAAAAAGCCCGACTACGAACACCTTGTGGTCCATGGCTGTCCGCTTCCACCTCCAAAG
ACCTTTTTCGGGCTCATGCTTGTCTGGACACCAAGGTACCGACAGCGGAAGGTGGAGGTTTC

6961 SerProProValProProProArgLysLysArgThrValValLeuThrGluSerThrLeu
TCCCTTCTCTGCTTCCGCTTGGGAAGAAGCGGACGCTGGTCTCTCACTGAATCAACGCTA
AGGGGAGGACCGGAGCGGAGCTTCTTCCGCTGCCACCAAGGATGACTTAGTTGGCAT

7021 Ser
SerThrAlaLeuAlaGluLeuAlaThrArgSerPheGlySerSerSerThrSerGlyIle
TCTACTGCTTGGCGAGCTCGCCACCAAGCTTTGGCAGCTCTCTCAACTTCCGGCAATT
AGATACCGGAACCGGCTCGAGCGGTGGTCTTCGAACCGTCCGAGAGTGAAGGCCGTAA

7081 ThrGlyAspAsnThrThrThrSerSerGluProAlaProSerGlyCysProProAspSer
ACCGCGGACAATACGACAACATCTCTGAGCCCGCCCTTCTTGGCTGCCCGCCCGACTCC
TCCCGCTGTTATGCTGTCTTAGGAGACTCGGGCGGGGAAGACCGAGCGGGCGGTGAGG

7141 PheAla
AspAlaGluSerTyrSerSerMetProProLeuGluGlyGluProGlyAspProAspLeu
GACGCTGAGTCTTATTCCTCCATGCCCCCTGGAGCGGGACCTGGGGATCCGGATCTT
CTGGACTCAGGATAAGCAGGTACGGCGGGGACCTCCCCCTCGGACCCCTAGCGCTAGAA

7201 SerAspGlySerTrpSerThrValSerSerGluAlaAsnAlaGluAspValValCysCys
AGCGACGGGTCTATGGTCAACGCTCAGTAGTGAGGCCAACCGCGAGGATGTGGTGTGCTGC
TCCCTGCCAGTACCAAGTGGCAGTCACTACTCGGTTGCCCTCTTACAGCACACGAGG

7261 SerMetSerTyrSerTrpThrGlyAlaLeuValThrProCysAlaAlaGluGluGlnLys
TCAATGTCTTACTCTTGGACAGGCCACCTCGTCAACCCGTGGCGCCCGGAAGAACAGAAA
AGTTACAGATGAGAACCTGTCCGCTGAGCAGTCCGGCACCGGCGCCCTCTCTGTCTTT

7321 LeuProIleAsnAlaLeuSerAsnSerLeuLeuArgHisHisAsnLeuValTyrSerThr
CTGCCCATCAATGCACCTAAGCAACTCGTTGCTACGTACCAACAATTGGTGATTTCCAGC
GACGGGTAGTTACGTGATTCTTTCACCAACGATGCAGTGGTCTTAACACCATTAAGGTGG

7381 ThrSerArgSerAlaCysGlnArgGlnLysLysValThrPheAspArgLeuGluValLeu
ACCTCAGGCAGTGGTTGCCAAAGGCAGAAAGACTCACATTTGACAGACTGCCAGTTCTG
TGCAGTGGCTCAGCAACGGTTTCCCTCTCTTTTCTAGTCTAAACTGTCTGAGCTTCAAGAC

7441 AspSerHisTyrGlnAspValLeuLysGluValLysAlaAlaAlaSerLysValLysAla
GACAGCCATTACCAAGGACCTACTCAAGGAGGTTAAAGCAGCGGGTCAAAAGTGAAGGCT
CTGTCCGTAAATGGTCTTCATGAGTTCTCTCAATTTCTGTCGCGGAGTTTTCACTTCCGA

Phe
7501 AsnLeuLeuSerValGluGluAlaCysSerLeuThrProIleHisSerAlaLysSerLys
AACTTGCTATCCGTAGAGGAAGCTTCCAGCCCTGACCCCCACACTCAGCCAAATGCCAAG
TTGAACGATAGGCATCTCTTCGAACTCGGACTGCGGGGGTCTGACTCCGTATTAGGTTT

7561 PheGlyTyrGlyAlaLysAspValArgCysHisAlaArgLysAlaValThrHisIleAsn
TTTGGTTATGGGGCAAAGACCTCCGTTCCCATGCCAGAAAGGCCGTAAACCCATCAAC
AAACCAATACCCCGTTTCTGCAAGGCAACGGTACGGTCTTTCCGGCATTTGGGTGTAGTTG

7621 SerValTrpLysAspLeuLeuGluAspAsnValThrProIleAspThrThrIleMetAla
TCCGTGTGGAAAGACCTTCTGGAAGACAATGTAAACACCAATAGACACTACCAATCATGGCT
AGGCACACCTTTCTGGAAGACCTTCTGTTACATTGTGGTTATCTGTGATGGTAGTACCGA

7681 LysAsnGluValPheCysValGlnProGluLysGlyGlyArgLysProAlaArgLeuIle
AAGAACGAGGTTTTCTGCGTTACGCTGAGAAGGGGGGTCTGTAAGCCAGCTCGTCTCATC
TTCTTGCTCCAAAGACGCAAGTCGGACTCTTCCCCCAGCATTCGGTCGAGCAGAGTAG

7741 ValPheProAspLeuGlyValArgValCysGluLysMetAlaLeuTyrAspValValThr
GTGTTCCCGCATCTGGGCGTGGCGGTGCGGAAAGATGGCTTTGTACGACGTGGTTACA
CACAAGGGGCTAGACCCGACCGCGCACAGGCTTTTCTACCGAAGCATGCTGCACCAATGT

7801 LysLeuProLeuAlaValMetGlySerSerTyrGlyPheGlnTyrSerProGlyGlnArg
AAGCTCCCTTGGCCGTGATGGGAAGCTCTTACGGATTCCAATACTCAGCAGGACAGCGG
TTCCAGGGGAACCGGCACTACCTTCGAGGATGCCAAGGTTATCAGTGGTCTCTGCGC

7861 ValGluPheLeuValGlnAlaTrpLysSerLysLysThrPrometGlyPheSerTyrAsp
GTTGAATTCTCTGTGCAAGCGTGGAAAGTCCAAGAAACCCCAATGGGGTTCTCGTATGAT
CAACTTAAGGAGCAGTTCGCACCTTCAGGTTCTTTTGGGGTTACCCCAAGACATACTA

7921 ThrArgCysPheAspSerThrValThrGluSerAspIleArgThrGluGluAlaIleTyr
ACCCGCTGCTTTGACTCCACAGTCACTGAGAGCGACATCCGTACGGAGGAGGCAATCTAC
TGGCGCAGAACTGAGGTGTCACTGACTCTCGCTGTAGGCATGCCCTCTCGGTATAGTG

7981 GlnCysCysAspLeuAspProGlnAlaArgValAlaIleLysSerLeuThrGluArgLeu
CAATGTGTGACCTCGACCCCCAACCCCGGTCGCCATCAAGTCCCTCAGCAGAGGCTT
GTTACAACTGTGAGCTCGCGGTTCCGGCGCACCGGTAGTTACGGGAGTGGCTCTCCGA

Gly
8041 TyrValGlyGlyProLeuThrAsnSerArgGlyGluAsnCysGlyTyrArgArgCysArg
TATGTTGGGGGCCCTCTTACCAATTCAAGGGGGGAGAACTGCGGCTATCCGAGGTGCCG
ATACAACCCCGGGAGAAATGGTTAAGTTCCCCCTCTTGACGCCGATAGCGTCCACGGCG

8101 AlaSerGlyValLeuThrThrSerCysGlyAsnThrLeuThrCysTyrIleLysAlaArg
GCGAGCGGCGTACTGACAAGTAGCTGTGTTAACACCTTCACTTGTACATCAAGGCCCGG
CGCTCGCCGATGACTGTGTGATCGACACCATTTGTTGGAGTGAACGATGTAGTTCCGGGGC

8161 AlaAlaCysArgAlaAlaGlyLeuGlnAspCysThrMetLeuValCysGlyAspAspLeu
GCAGCCTGTGAGCGCGCAGGGCTCCAGGACTGCACCATGCTGTGTGCGGACGACTTA
CGTCGGACAGCTTCGGCGTCCCGAGGTCTCTACGTGGTACGAGCACACACCGCTGCTGAAT

8221 ValValIleCysGluSerAlaGlyValGlnGluAspAlaAlaSerLeuArgAlaPheThr
GTGCTTATCTGTGAAGCGCGGGGTCCAGGAGGACCGGGCGAGCCTCAGAGCCTTCACG
CAGCAATAGACACTTTCGCGCCCCAGGTCCTCTGCGCGGCTCGGACTCTCGGAAGTCC

8281 GluAlaMetThrArgTyrSerAlaProProGlyAspProProGlnProGluTyrAspLeu
GAGGCTATGACCAGGTACTCCGCCCCCTGGGGACCCCAACCAAGAAATACGACTTG
CTCCGATACTGGTCCATGAGCGCGGGGACCCCTGGGGGGTGTGTTCTTATGCTGAAC

8341 GluLeuIleThrSerCysSerSerAsnValSerValAlaHisAspGlyAlaGlyLysArg
GAGCTCATAACATCATGCTCTCTCAACCTGTCACTGCGCCACGACGGCGCTGGAAGAGG
CTCGAGTATGTAGTACGAGGAGCTTCACACTCAGCGGGTGTGCGCGGACCTTCTCTC

17-9. obra

0401 ValTyrTyrLeuThrArgAspProThrThrProLeuAlaArgAlaAlaTrpGluThrAla
GTCTACTACCTCACCCTGACCTACACCCCCCTCGCGAGAGCTGCGTGGGAGACAGCA
CAGATGATGGAGTGGGCACTGGGATGTTGGGGGGAGCGCTCTCGACGCACCTCTGTCTT

0461 ArgHisThrProValAsnSerTrpLeuGlyAsnIleIleMetPheAlaProThrLeuTrp
AGACACACTCCAGTCAATTCCTGGCTAGGCACATAATCATGTTTCCCCCACACTGTGG
TCTGTGTGAGGTCAGTTAAGGACCGATCCGTTGTATTAGTACAAACGGGGGTGTGACACC

0521 AlaArgMetIleLeuMetThrHisPhePheSerValLeuIleAlaArgAspGlnLeuGlu
GCGAGGATGATACTGATGACCCATTCTTTAGCGTCTTATAGCCAGGACCGAGCTTGAA
CGCTCTACTATGACTACTGGGTAAAGAAATCGCAGGAATATCGGTCCCTGGTTCGAACCTT

0581 GlnAlaLeuAspCysGluIleTyrGlyAlaCysTyrSerIleGluProLeuAspLeuPro
CAGGCCCTCGATTGCGAGATCTACGGGGCTGCTACTCCATAGAACCACTTGATCTACCT
GTCCGGGAGCTAACGCTCTAGATGCCCGGACGATGACGTATCTTGGTGAACCTAGATGGA

0641 ProIleIleGlnArgLeuHisGlyLeuSerAlaPheSerLeuHisSerTyrSerProGly
CCAAATCATTCAAAGACTCCATGGCCTCAGCGCATTTTCACTCCACAGTTACTCTCCAGGT
GGTTAGTAAGTTTCTGAGGTACCGGAGTCGCGTAAAGTGAGGTGTCAATGAGAGGTCCA

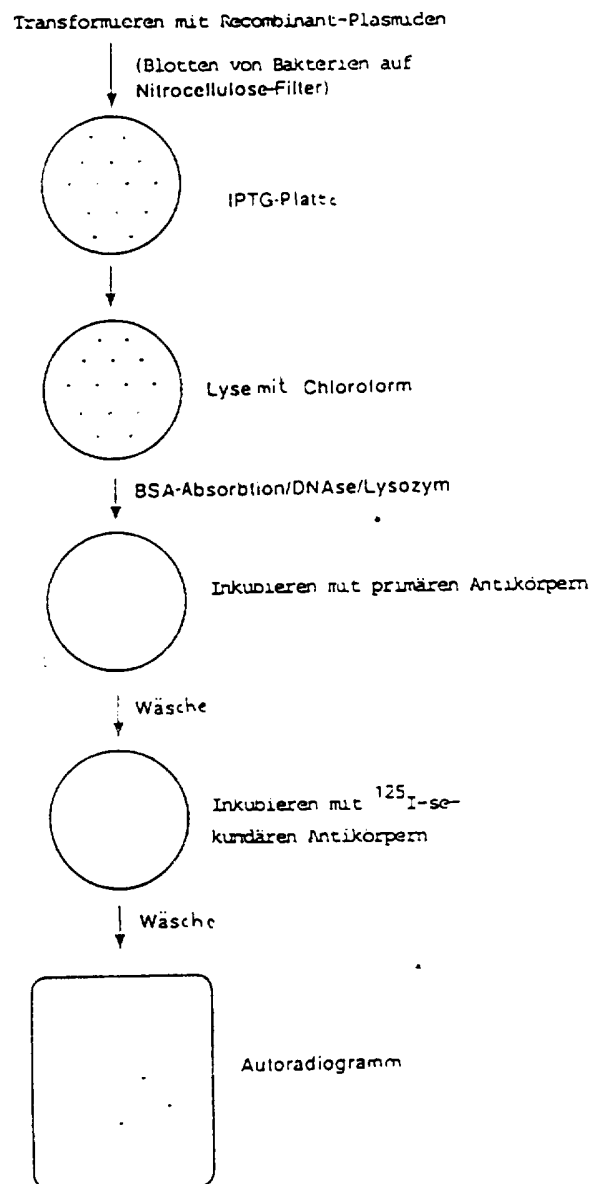
0701 GluIleAsnArgValAlaAlaCysLeuArgLysLeuGlyValProProLeuArgAlaTrp
GAAATTAAATAGGGTGGCCGCATGCCTCAGAAAACCTGGGGTACCGCCCTTGGCAGCTTGG
CTTTAATTATCCACCGGCTACGGAGTCTTTTGAACCCCATGGCGGGAACGCTCGAACCC

0761 Gly
ArgHisArgAlaArgSerValArgAlaArgLeuLeuAlaArgGlyGlyArgAlaAlaIle
AGACACCGGGCCCGGAGCGTCCGCGCTACGGCTTCTGGCCACAGGACGAGGGCTGCCATA
TCTGTGGCCCGGCTCGCAGGCGCGATCCGAAGACCGGTCTCTCCCTCCGACGGTAT

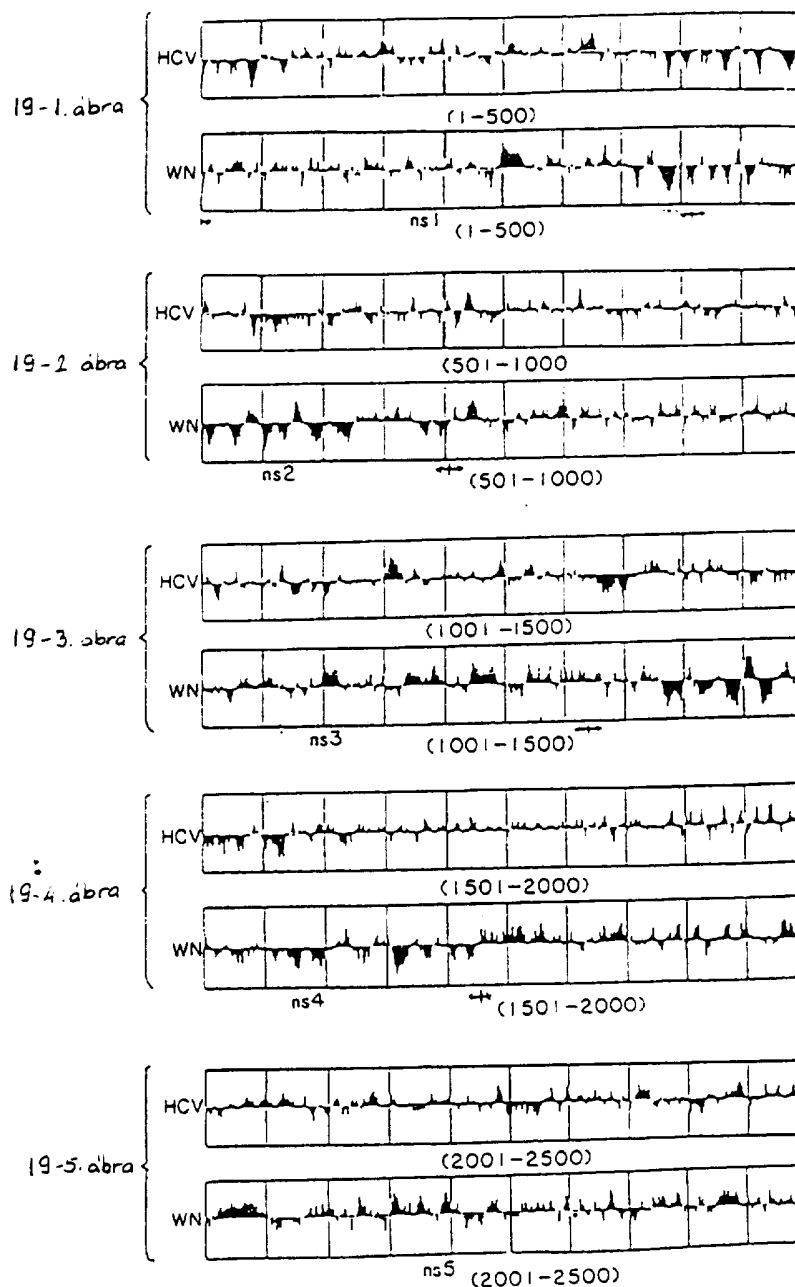
0821 CysGlyLysTyrLeuPheAsnTrpAlaValArgThrLysLeuLys
TGTGGCAAGTACCTCTTCAACTGGGCAGTAAGAACAAGCTCAAAC
ACACCGTTCATGGAGAAGTTGACCCGTCATTCCTGTGTTTCGAGTTTG

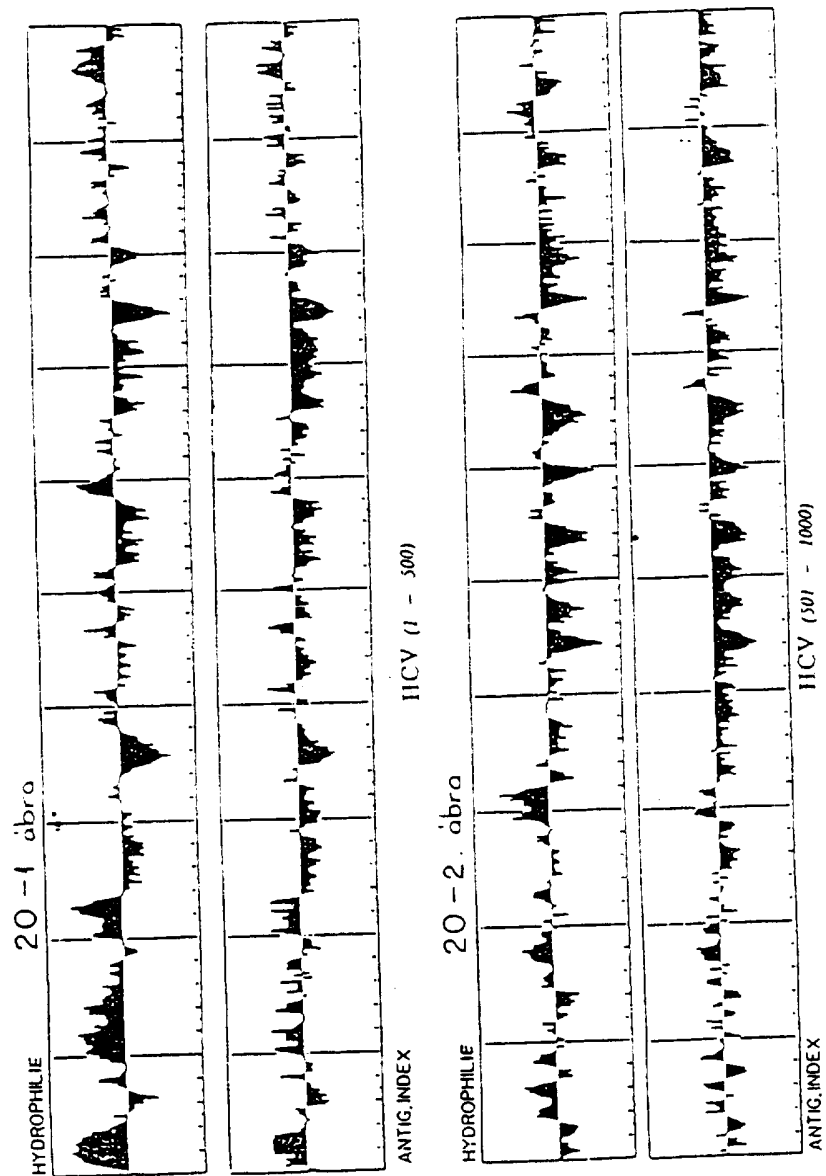
17-10 obra

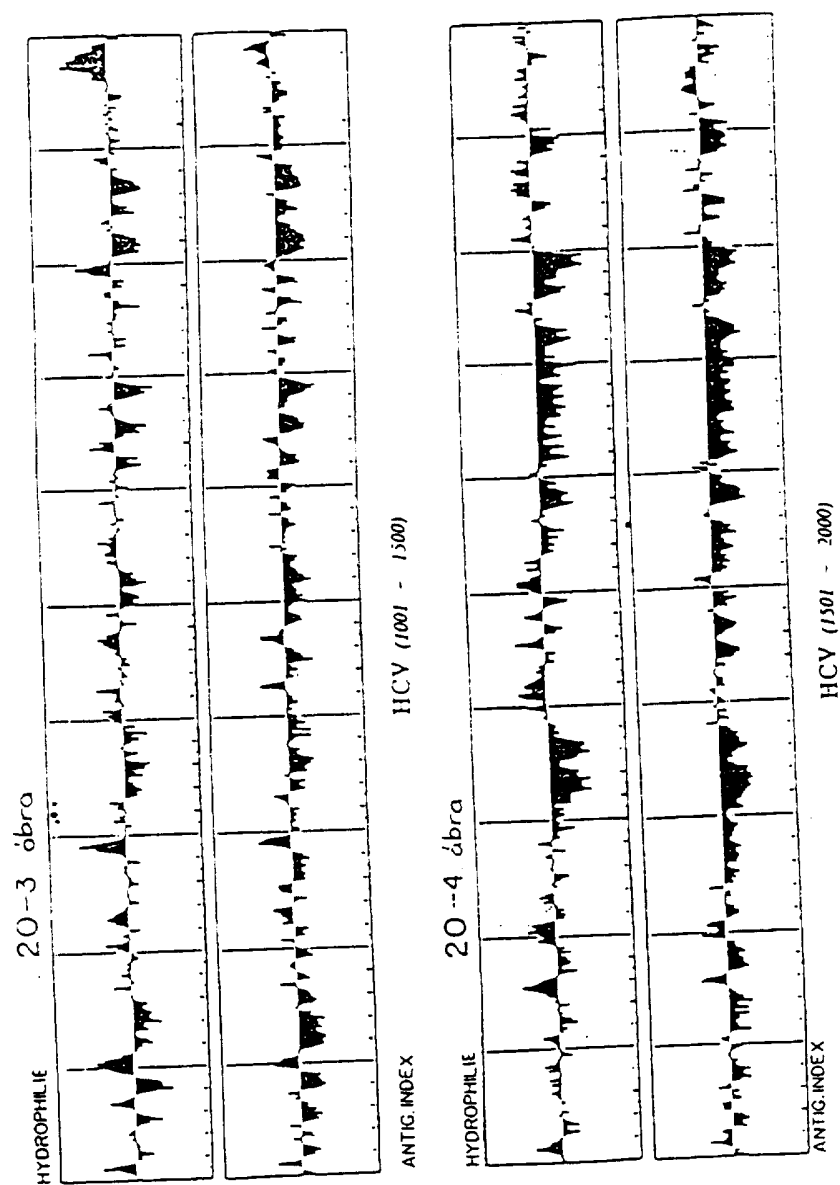
IMMUNOLOGISCHES SCREENING IN BACTERIEN

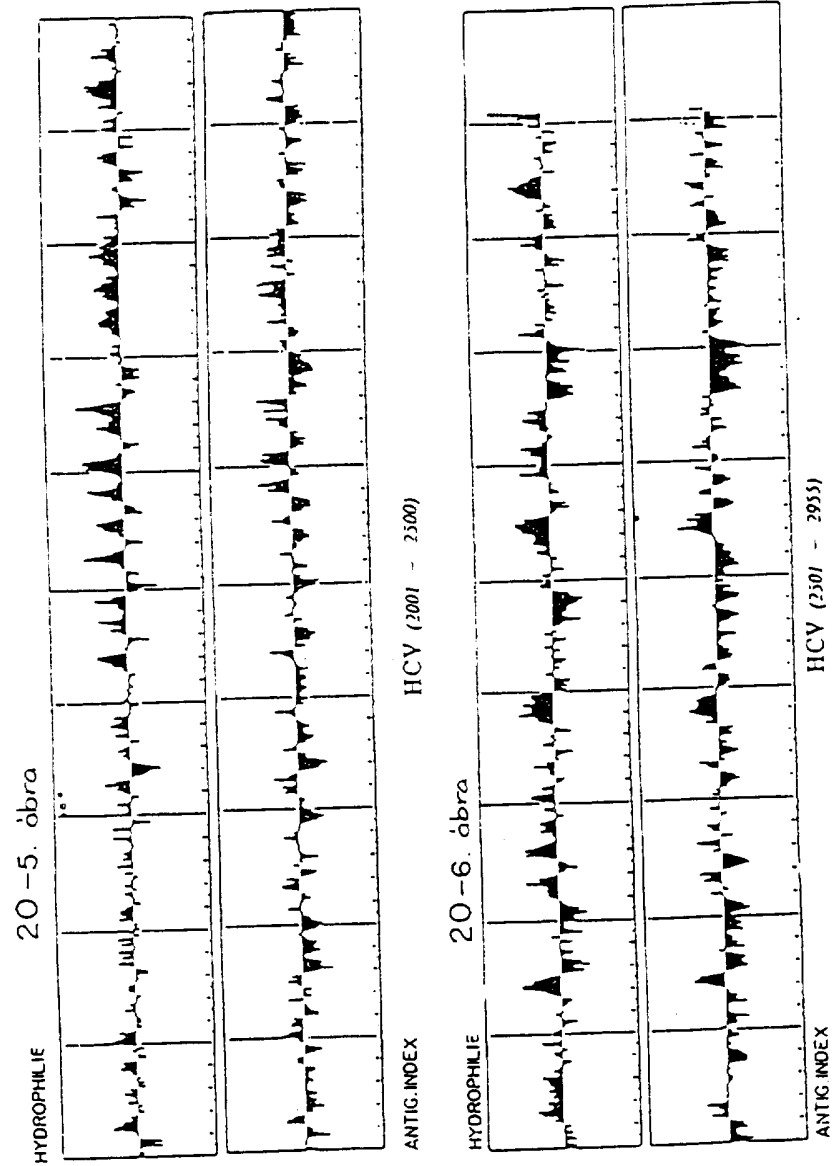


18. ábra

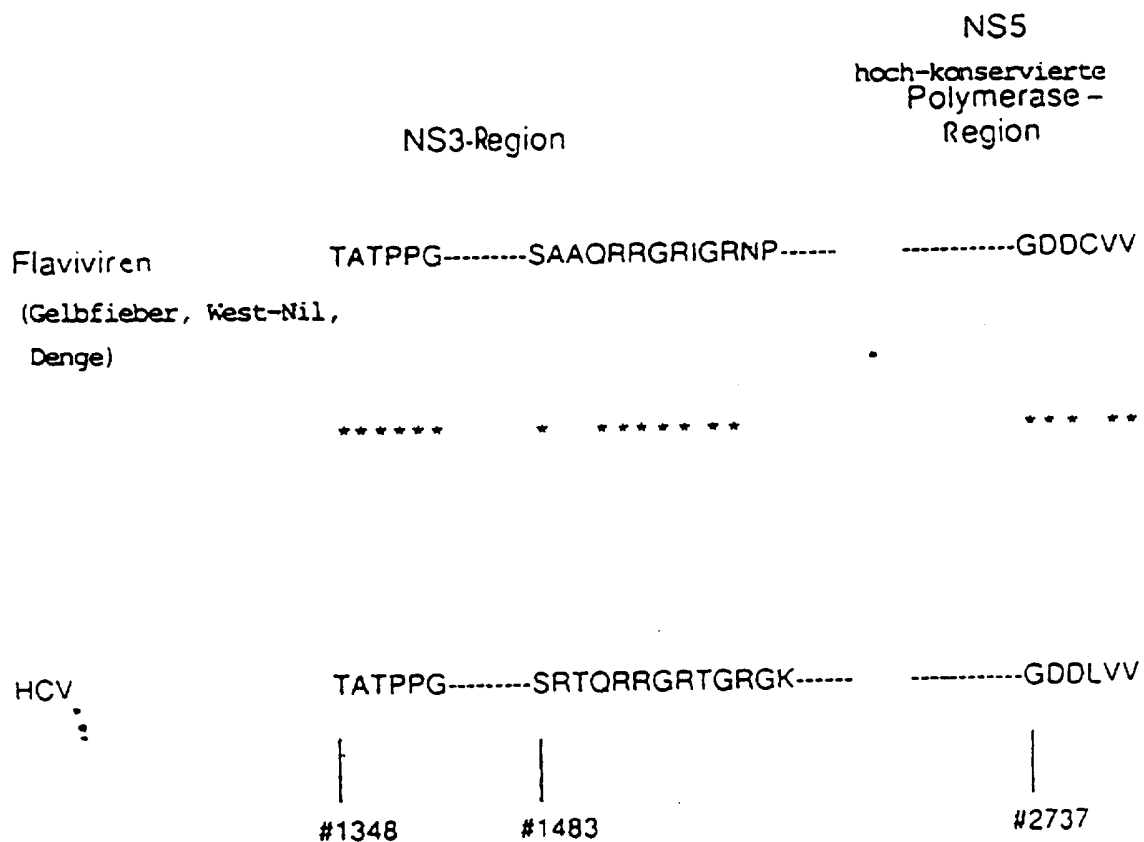








Einige konservierte co-lineare Peptide in HCV & Flaviviren



21. obra