



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 38 86 363 T3** 2004.09.09

(12) **Übersetzung der geänderten europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 318 216 B2**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **P 38 86 363.4**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **88 310 922.5**

(96) Europäischer Anmeldetag: **18.11.1988**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **31.05.1989**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **15.12.1993**

(97) Veröffentlichungstag

des geänderten Patents beim EPA: **29.08.2001**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **09.09.2004**

(51) Int Cl.⁷: **G01N 33/576**

C12N 15/00, C12N 7/00, C12Q 1/70,

C12Q 1/68

(30) Unionspriorität:

122714 18.11.1987 US

139886 30.12.1987 US

161072 26.02.1988 US

191263 06.05.1988 US

263584 26.10.1988 US

271450 14.11.1988 US

(73) Patentinhaber:

**Chiron Corp. (n.d.Ges.d. Staates Delaware),
Emeryville, Calif., US**

(74) Vertreter:

Vossius & Partner, 81675 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, DE, ES, FR, GR, IT, LI, LU, NL, SE

(72) Erfinder:

Houghton, Michael, Danville California 94526, US;

Choo, Qui-Lim, El Cerrito California 94530, US;

Kuo, George, San Francisco California 94122, US

(54) Bezeichnung: **NANBV-Diagnostika**

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Technisches Gebiet

[0001] Die Erfindung betrifft Materialien und Methoden, um die Ausbreitung einer Non-A-, Non-B-Hepatitis-Virusinfektion (NANBV) in den Griff zu bekommen. Genauer betrifft sie diagnostische DNA-Fragmente, diagnostische Proteine, diagnostische Antikörper und schützende Antigene und Antikörper gegen einen ätiologischen Erreger der NANB-Hepatitis, d.h. das Hepatitis-C-Virus.

In der Anmeldung zitierte Literaturstellen

- Barr et al. (1986), *Biotechniques* 4:428.
 Botstein (1979), *Gene* 8:17.
 Brinton, M.A. (1986) in *THE VIRUSES: THE TOGAVIRIDAE AND FLAVIVIRIDAE* (Serien-Hrsg. Fraenkel-Conrat und Wagner, Hrsg. des Bandes Schlesinger and Schlesinger, Plenum Press), S. 327–374.
 Broach (1981) in: *Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces*, Bd. 1, S. 445, Cold Spring Harbor Press.
 Broach et al. (1983), *Meth. Enz.* 101:307.
 Chang et al. (1977), *Nature* 198:1056.
 Chirgwin et al. (1979), *Biochemistry* 18:5294.
 Chomczynski and Sacchi (1987), *Analytical Biochemistry* 162:156.
 Clewell et al. (1969), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 62:1159.
 Clewell (1972), *J. Bacteriol.* 110:667.
 Cohen (1972), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69:2110.
 Cousens et al. (1987), *Gene* 61:265.
 De Boer et al. (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 292:128.
 Dreesman et al. (1985), *J. Infect. Disease* 151:761.
 Feinstone, S.M. und Hoofnagle, J.H. (1984), *New Engl. J. Med.* 311:185.
 Fields & Knipe (1986), *FUNDAMENTAL VIROLOGY* (Raven Press, N.Y.).
 Fiers et al. (1978), *Nature* 273:113,
 Gerety, R.J. et al., in *VIRAL HEPATITIS AND LIVER DISEASE* (Vyas, B.N., Dienstag, J.L., und Hoofnagle, J.H., Hrsg., Grune und Stratton, Inc., 1984) S. 23–47.
 Goeddel et al. (1980), *Nucleic Acids Res.* 8:4057.
 Graham and Van der Eb (1978), *Virology*, 52:546.
 Grunstein and Hogness (1975), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73:3961.
 Grych et al. (1985), *Nature* 316:74.
 Gubler and Hoffmann (1983), *Gene* 25:263.
 Hämmerling et al. (1981), *MONOCLONAL ANTIBODIES AND T-CELL HYBRIDOMAS*.
 Hess et al. (1968), *J. Adv. Enzyme Reg* 7:149.
 Hinnen et al. (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:1929.
 Hitzeman et al. (1980), *J. Biol. Chem.* 255:2073.
 Holland et al. (1978), *Biochemistry* 17:4900.
 Holland (1981), *J. Biol. Chem.* 256:1385.
 Houghton et al. (1981), *Nucleic Acids Res.* 9:247.
 Hunyh, T.V. et al. (1985) in *DNA CLONING TECHNIQUES; A PRACTICAL APPROACH* (D. Glover, Hrsg., IRL Press, Oxford, UK) S. 49–78.
 Immun. Rev. (1982) 62:185.
 Iwarson (1987), *British Medical J.* 295:946.
 Kennett et al. (1980) *MONOCLONAL ANTIBODIES*.
 Laemmli (1970), *Nature* 227, 680.
 Lee et al. (1988) *Science* 239:1288.
 Maniatis, T., et al. (1982) *MOLECULAR CLONING; A LABORATORY MANUAL* (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y.).
 Mayer und Walker, Hrsg. (1987), *IMMUNOCHEMICAL METHODS IN CELL AND MOLECULAR BIOLOGY* (Academic Press, London).
 Maxam et al. (1980), *Methods in Enzymology* 65:499.
 MacNamara et al. (1984), *Science* 226:1325.
 Messing et al. (1981), *Nucleic Acids Res.* 9:309.
 Messing (1983), *Methods in Enzymology* 101:20–37.
METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press).
 Michelle et al., *Int. Symposium on Viral Hepatitis*.

- Monath (1986) in THE VIRUSES: THE TOGAVIRIDAE AND FLAVIVIRIDAE (Serien-Hrsg. Fraenkel-Conrat und Wagner, Hrsg. des Bandes Schlesinger und Schlesinger, Plenum Press). S. 375–440.
- Nagahuma et al. (1984), Anal. Biochem. 141:74.
- Neurath et al. (1984), Science 224:392.
- Nisonoff et al. (1981), Clin. Immunol. Immunopathol. 21:397–406.
- Overby, L.R. (1985), Curr. Hepatol. 5:49.
- Overby, L.R. (1986), Curr. Hepatol. 6:65.
- Overby, L.R. (1987), Curr. Hepatol. 7:35.
- Peleg (1969), Nature 221:193.
- Pfefferkorn und Shapiro (1974), in COMPREHENSIVE VIROLOGY, Bd. 2 (Fraenkel-Conrat & Wagner, Hrsg. Plenum, N.Y.) S. 171–230.
- Prince, A.M. (1983), Annu. Rev. Microbiol. 37:217.
- Rice et al. (1986) in THE VIRUSES: THE TOGAVIRIDAE AND FLAVIVIRIDAE (Serien-Hrsg. Fraenkel-Conrat und Wagner, "Hrsg. des Bandes Schlesinger und Schlesinger, Plenum Press), S. 279–328.
- Roehrig (1986) in THE VIRUSES: THE TOGAVIRIDAE AND FLAVIVIRIDAE (Serien-Hrsg. Fraenkel-Conrat und Wagner, Hrsg. des Bandes, Schlesinger und Schlesinger, Plenum Press)
- Sadler et al. (1980), Gene 8, 279.
- Saiki et al. (1985), Nature 324:163.
- Sanger et al. (1977), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463.
- Schlesinger et al. (1986), J. Virol. 60:1153.
- Schreier, M., et al. (1980) HYBRIDOMA TECHNIQUES
- Scopes (1984), PROTEIN PURIFICATION, PRINCIPLES AND PRACTICE, 2. Auflage (Springer-Verlag, N.Y.),
- Shimatake et al. (1981), Nature 292:128.
- Steimer et al. (1986), J. Virol. 58:9.
- Stollar (1980), in THE TOGAVIRUSES (R.W. Schlesinger, Hrsg. Academic Press, N.Y.), S. 584–622.
- Taylor et al. (1976), Biochem. Biophys. Acta 442:324.
- Towbin et al. (1979), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350.
- Tsu und Herzenberg (1980), in SELECTED METHODS IN CELLULAR IMMUNOLOGY (W.H. Freeman und Co.) S. 373–391.
- Vytdehaag et al. (1985), J. Immunol. 134:1225.
- Valenzuela, P., et al. (1982), Nature 298:344.
- Valenzuela, P., et al. (1984), in HEPATITIS B (Millman, I., et al. Hrsg. Plenum Press), S. 225–236.
- Warner (1984), DNA 3:401.
- Wu und Grossman (1987), Methods in Enzymology, Bd. 154, RECOMBINANT DNA, Teil E.
- Wu (1987), Methods in Enzymology, Bd. 155, RECOMBINANT DNA, Teil F.
- Zoller (1982), Nucleic Acids Res. 10:6487.

Zitierte Patente

US-Patent Nr. 4 341 761
 US-Patent Nr. 4 399 121
 US-Patent Nr. 4 427 783
 US-Patent Nr. 4 444 887
 US-Patent Nr. 4 466 917
 US-Patent Nr. 4 472 500
 US-Patent Nr. 4 491 632
 US-Patent Nr. 4 493 890

Stand der Technik

[0002] Die Non-A-, Non-B-Hepatitis (NANBH) ist eine übertragbare Krankheit oder Familie von Krankheiten, von denen man annimmt, daß sie durch Viren induziert werden, und daß sie sich von anderer Formen von virus-assoziierten Lebererkrankungen einschließlich derer unterscheiden, die durch die bekannten Hepatitisviren, d.h. das Hepatitis A-Virus (HAV), das Hepatitis B-Virus (HBV) und das δ -Hepatitisvirus (HDV) verursacht werden, ebenso wie von der Hepatitis, die durch das Cytomegalovirus (CMV) oder das Epstein-Barr-Virus (EBV) hervorgerufen wird. NANBH wurde zuerst bei Transfusionspatienten identifiziert. Die Übertragung vom Menschen auf den Schimpansen und die schrittweise Weitergabe in Schimpansen erbrachte den Beweis, daß die NANBH auf einen übertragbaren infektiösen Erreger oder mehrere Erreger zurückzuführen ist. Jedoch ist der übertragbare Erreger, der für die NANBH verantwortlich ist, immer noch nicht identifiziert, und die Anzahl der Erreger, die die Krankheit hervorrufen können, ist unbekannt.

[0003] Epidemiologische Nachweise legen nahe, daß es drei Typen von NANBH geben kann: der epidemische Typ, übertragen durch das Wasser; der Blut- oder Nadel-assoziierte Typ und der sporadisch auftretende Typ (in der Gemeinschaft erworben). Jedoch ist die Zahl der Erreger, die NANBH verursachen können, unbekannt.

[0004] Die klinische Diagnose und Identifizierung von NANBH wurde in erster Linie durch Ausschluß anderer viraler Marker durchgeführt. Unter den Verfahren, die zum Nachweis vermutlicher NANBV-Antigene und -Antikörper verwendet wurden, sind Agargeldiffusion, Gegenstromimmunelektrophorese, Immunfluoreszenzmikroskopie, Immunelektronenmikroskopie, Radioimmunassay und Enzym-gebundener Immunabsorptionstest. Jedoch erwies sich keiner dieser Assays als ausreichend empfindlich, spezifisch und reproduzierbar, um als ein diagnostischer Test auf NANBH verwendet werden zu können.

[0005] Bis jetzt gab es weder Klarheit noch eine Übereinstimmung hinsichtlich der Identität oder Spezifität der mit den NANBH-Erregern assoziierten Antigen-Antikörper-Systeme. Dies ist, zumindest teilweise auf die frühere oder begleitende Infektion von HBV mit NANBV bei den Patienten und auf die bekannte Komplexität der löslichen und teilchenförmigen HBV-assoziierten Antigene, ebenso wie auf die Integration von HBV-DNA in das Genom von Leberzellen zurückzuführen. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, daß NANBH durch mehr als einen infektiösen Erreger hervorgerufen wird, sowie die Möglichkeit, daß NANBH fehldiagnostiziert wurde. Ferner ist unklar, was die serologischen Assays im Serum von NANBH-Patienten nachweisen. Es wurde postuliert, daß die Agargeldiffusion und die Gegenstromimmunelektrophoreseassays Autoimmunantworten oder nichtspezifische Proteinwechselwirkungen, die manchmal zwischen den Serumproben auftreten, nachweisen, und daß sie keine spezifischen NANBV-Antigen-Antikörper-Reaktionen darstellen. Die Immunfluoreszenz und der Enzym-gebundene Immunabsorptionstest und die Radicimmunassays scheinen niedrige Gehalte eines einem rheumatoiden Faktor ähnlichen Materials, das häufig im Serum von NANBH-Patienten ebenso wie bei Patienten mit anderen hepatischen und nicht-hepatischen Erkrankungen vorhanden ist, nachzuweisen. Ein Teil der nachgewiesenen Reaktivität kann Antikörper gegen durch den Wirt bestimmte cytoplasmatische Antigene darstellen.

[0006] Es gibt eine Anzahl von NANBV-Kandidaten. Vergleiche beispielsweise die Übersichtartikel von Prince (1983), Feinstone und Hoofnagle (1984) und Overby (1985, 1986, 1987) und den Artikel von Iwarson (1987). Jedoch gibt es keinen Beweis, daß irgendeiner dieser Kandidaten den ätiologischen NANBH-Erreger darstellt.

[0007] Die Nachfrage für empfindliche und spezifische Verfahren zum Aufsuchen und Identifizieren von NANBV-Trägern und von NANBV-kontaminiertem Blut oder Blutprodukten ist signifikant. Posttransfusionelle Hepatitis (PTH) tritt bei etwa 10% der Transfusionspatienten auf, und NANBH macht bis zu 90% dieser Fälle aus. Das Hauptproblem bei dieser Krankheit ist das häufige Fortschreiten bis zum chronischen Leberschaden (25 bis 55%).

[0008] Die Fürsorge für den Patienten ebenso wie die Verhütung der Übertragung von NANBH durch Blut oder Blutprodukte oder durch engen persönlichen Kontakt erfordern zuverlässige diagnostische und prognostische Mittel, um Nucleinsäuren, Antigene und Antikörper im Zusammenhang mit NANBV nachzuweisen. Zusätzlich besteht auch eine Nachfrage nach effektiven Impfstoffen und immuntherapeutischen, therapeutischen Mittel zur Verhütung und/oder Behandlung der Krankheit.

Beschreibung der Erfindung

[0009] Die Erfindung betrifft die Isolierung und Charakterisierung eines neu entdeckten, ätiologischen NANBH-Erregers, des Hepatitis C-Virus (HCV). Genauer wird durch die Erfindung eine Familie von cDNA-Replikaten von Teilen des HCV-Genoms bereitgestellt. Diese cDNA-Replikate wurden durch eine Technik isoliert, die eine neue Stufe des Absuchens auf Expressionsprodukte aus cDNA-Banken umfaßte, die von einem teilchenförmigen Erreger in mit Seren aus NANBH-Patienten infiziertem Gewebe erzeugt wurden, um neu synthetisierte Antigene nachzuweisen, die sich von dem Genom des bisher nichtisolierten und nichtcharakterisierten viralen Erregers ableiteten, sowie der Auswahl der Clone, die Produkte erzeugten, die immunologisch nur mit den Seren von infizierten Patienten im Vergleich zu nichtinfizierten Patienten reagierten.

[0010] Studien zur Natur des HCV-Genoms, bei denen von HCV-cDNA-abgeleitete Sonden verwendet wurden, ebenso wie Sequenzinformation, die in der HCV-cDNA enthalten ist, legen nahe, daß das HCV ein Flavivirus oder ein Flavi-artiges Virus ist.

[0011] Teile der cDNA-Sequenzen, die von HCV abgeleitet sind, sind als Sonden nützlich, um das Vorhandensein des Virus in Proben zu diagnostizieren und natürlich vorkommende Varianten des Virus zu isolieren. Diese cDNAs machen auch Polypeptidsequenzen der im (in) HCV-Genom(en) codierter HCV-Antigene verfügbar und gestatten die Produktion von Polypeptiden, die als Standard oder Reagentien in diagnostischen Tests und/oder als Impfstoffkomponenten nützlich sind. Sowohl polyclonale als auch monoclonale Antikörper gegen HCV-Epitope, die in diesen Polypeptid-Sequenzen enthalten sind, sind ebenfalls für diagnostische Tests, als therapeutische Mittel, bei der Suche nach antiviralen Mitteln und zur Isolierung des NANBV-Erregers, von dem sich diese cDNAs ableiten, nützlich. Zusätzlich ist es unter Verwendung von von diesen cDNAs abgeleiteten

Sonden möglich, andere Teile des HCV-Genoms zu isolieren und zu sequenzieren, wodurch weitere Sonden und Polypeptide erhalten werden, die zur Diagnose und/oder prophylaktischen oder therapeutischen Behandlung von NANBH nützlich sind.

[0012] Somit stellt die Erfindung einen Polymerasekettenreaktions-(PCR)-Kit zur Verfügung, umfassend ein Paar von Primern, die zum Primen der Synthese von cDNA in einer PCR-Reaktion fähig sind, wobei jeder der Primer ein Polynucleotid ist, das eine benachbarte Sequenz von Nucleotiden umfaßt, die zur selektiven Hybridisierung mit dem Genom von Hepatitis C-Virus (HCV) oder dem Komplement davon fähig ist, wobei HCV charakterisiert ist durch ein Plusstrang-RNA-Genom; wobei das Genom ein offenes Leseraster (ORF) umfaßt, welches ein Polypeptid codiert; und dadurch, daß die Gesamtheit des codierten Polypeptids eine mindestens 40%-ige Homologie zu dem gesamten Polypeptid eines viralen Isolats hat, von dessen Genom cDNAs hergestellt wurden, hinterlegt in einer Lambda gt-11-cDNA Bibliothek bei der American Type Culture Collection (ATCC) unter der Hinterlegungsnummer 40394.

[0013] Die Erfindung stellt ferner ein Verfahren zur Durchführung einer Polymerasekettenreaktion zur Verfügung, wobei die Primer ein wie vorstehend in Bezug auf die erfindungsgemäßen PCR-Kits definiertes Paar von Polynucleotiden sind.

[0014] Die Erfindung stellt auch ein Verfahren zum Testen einer Probe auf Gegenwart oder Abwesenheit von HCV-Polynucleotiden zur Verfügung, umfassend:

(a) Inkontaktbringen der Probe mit einer Sonde, unter Bedingungen, die die selektive Hybridisierung der Sonde mit einem HCV-Polynucleotid oder dem Komplement davon in der Probe ermöglichen, wobei die Sonde ein Polynucleotid umfaßt, das eine benachbarte Sequenz von Nucleotiden umfaßt, die zur selektiven Hybridisierung mit dem Genom von HCV oder dem Komplement davon fähig ist, wobei HCV charakterisiert ist:

(i) durch ein Plusstrang-RNA-Genom, wobei das Genom ein offenes Leseraster (ORF) umfaßt, welches ein Polypeptid codiert; und

(ii) dadurch, daß die Gesamtheit des codierten Polypeptids eine mindestens 40%-ige Homologie zu dem gesamten Polypeptid eines viralen Isolats hat, von dessen Genom cDNAs hergestellt wurden, hinterlegt in einer Lambda-gt-11-cDNA Bibliothek bei der American Type Culture Collection (ATCC) unter der Hinterlegungsnummer 40394, und

(b) Bestimmung, ob Polynucleotidduplexe gebildet wurden, die die Sonde umfassen,

und wobei ferner das Polynucleotid ein DNA-Polynucleotid ist und gegebenenfalls einen nachweisbaren Marker umfaßt.

[0015] Wir beschreiben ferner ein gereinigtes HCV-Polynucleotid, ein rekombinantes HCV-Polynucleotid, ein rekombinantes Polynucleotid, umfassend eine Sequenz, die von einem HCV-Genom oder von HCV-cDNA abgeleitet ist, ein rekombinantes Polynucleotid, das ein HCV-Epitop codiert, einen rekombinanten Vektor, der irgendeines der vorstehenden rekombinanten Polynucleotide enthält und eine mit irgendeinem dieser Vektoren transformierte Wirtszelle.

[0016] Wir beschreiben ferner ein rekombinantes Expressionssystem, umfassend ein offenes Leseraster (ORF) der DNA, die von einem HCV-Genom oder von HCV-cDNA abgeleitet ist, wobei das ORF funktionell mit einer Kontrollsequenz, die mit einem gewünschten Wirt kompatibel ist, verknüpft ist, eine Zelle, die mit dem rekombinanten Expressionssystem transformiert ist und ein von der transformierten Zelle produziertes Polypeptid.

[0017] Es ist auch möglich, gereinigte HCV-Teilchen, ein Präparat aus Polypeptiden aus dem gereinigten HCV, ein gereinigtes HCV-Polypeptid, ein gereinigtes Polypeptid, umfassend ein Epitop, das immunologisch mit einem in HCV enthaltenen Epitop identifizierbar ist, zu erhalten.

[0018] Wir beschreiben ferner ein rekombinantes HCV-Polypeptid, ein rekombinantes Polypeptid mit einer Sequenz, die von einem HCV-Genom oder einer HCV-cDNA abgeleitet ist, ein rekombinantes Polypeptid mit einem HCV-Epitop und ein Fusionspolypeptid mit einem HCV-Polypeptid.

[0019] Wir beschreiben ferner eine Anti-HCV-Antikörperzusammensetzung, umfassend Antikörper, die die antigene Determinante eines erfindungsgemäßen Polypeptids binden, das

(a) ein gereinigtes Präparat polyclonaler Antikörper oder

(b) eine Zusammensetzung monoclinaler Antikörper ist.

[0020] Wir beschreiben ferner ein Teilchen, das gegen eine HCV-Infektion immunogen ist, umfassend ein Non-HCV-Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz mit der Fähigkeit zur Bildung eines Teilchens, wenn die Sequenz in einem eukaryontischen Wirt reproduziert wird, und ein HCV-Epitop. Die Erfindung betrifft auch eine Polynucleotidsonde für HCV, wobei die Sonde ein erfindungsgemäßes Polynucleotid umfaßt, das auch einen nachweisbaren Marker umfaßt. Die Erfindung betrifft auch ein Polymerasekettenreaktions(PCR)-Kit, umfassend ein Paar von Primern, mit der Fähigkeit, die Synthese von cDNA in einer PCR-Reaktion zu starten, wobei jeder der Primer ein erfindungsgemäßes Polynucleotid ist. Die Erfindung findet auch Anwendung bei der Her-

stellung von Kits, wie solchen zum Test einer Probe auf das Vorhandensein oder Fehlen von HCV-Polynucleotiden durch (a) Inkontaktbringen der Probe mit einer Sonde, umfassend ein erfindungsgemäßes Polynucleotid, beispielsweise eines, das etwa 8 oder mehr Nucleotide enthält, unter Bedingungen, die die selektive Hybridisierung der Sonde mit einem HCV-Polynucleotid oder der Komplementärsequenz davon in der Probe ermöglichen, und (b) Bestimmung, ob Polynucleotidduplexe gebildet wurden, die die Sonde umfassen.

[0021] Wir beschreiben ferner ein Polypeptid mit einem HCV-Epitop, gebunden an ein festes Substrat, und ein Antikörper gegen ein HCV-Epitop, gebunden an ein festes Substrat.

[0022] Wir beschreiben ferner ein Verfahren zur Erzeugung eines Polypeptids, welches ein HCV-Epitop enthält, wobei man mit einem Expressionsvektor, der eine Sequenz enthält, die ein ein HCV-Epitop enthaltendes Polypeptid codiert, transformierte Wirtszellen unter Bedingungen inkubiert, die die Expression des Polypeptids ermöglichen, und ein Polypeptid, das ein HCV-Epitop enthält, das nach diesem Verfahren erzeugt wurde.

[0023] Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zum Nachweis von HCV-Nucleinsäuren in einer Probe, wobei man die Nucleinsäuren der Probe mit einer Sonde auf ein HCV-Polynucleotid unter Bedingungen umsetzt, die die Bildung eines Polynucleotiddoppelstrangs zwischen der Sonde und der HCV-Nucleinsäure der Probe ermöglichen, und einen Polynucleotiddoppelstrang nachweist, der die Sonde enthält.

[0024] Wir beschreiben ferner Immunoassays.

[0025] Diese umfassen einen Immunoassay zum Nachweis eines HCV-Antigens, umfassend die folgenden Schritte: (a) Bereitstellung einer erfindungsgemäßen Antikörperzusammensetzung, (b) Inkubieren einer Probe mit der Antikörperzusammensetzung unter Bedingungen, die die Bildung eines Antikörper-Antigen-Komplexes ermöglichen und (c) Nachweis von Antikörper-Antigen-Komplexen, die Anti-HCV-Antikörper umfassen. Diese umfassen auch einen Immunoassay zum Nachweis von Antikörpern gegen ein HCV-Antigen, umfassend die Schritte: (a) Bereitstellen eines Polypeptids, das eine antigene Determinante umfaßt, die von dem Anti-HCV-Antikörper gebunden werden kann, wobei die antigene Determinante eine aufeinanderfolgende Aminosäuresequenz umfaßt, die von dem Genom codiert wird, (b) Inkubieren einer biologischen Probe mit dem Polypeptid unter Bedingungen, die die Bildung eines Antikörper-Antigen-Komplexes ermöglichen und (c) Nachweis der Antikörper-Antigen-Komplexe, die das Polypeptid umfassen.

[0026] Wir beschreiben ferner Impfstoffzusammensetzungen zur Behandlung von HCV-Infektionen, umfassend ein immunogenes Peptid, das ein HCV-Epitop enthält, oder ein inaktiviertes HCV-Präparat oder ein attenuiertes HCV-Präparat.

[0027] Wir beschreiben ferner eine HCV-infizierte Zelle, die in einer Gewebeskultur gezüchtet wurde, und die Erfindung umfaßt ein Verfahren zur Züchtung von HCV, indem Zellen, z.B. Hepatocyten oder Makrophagen, bereitgestellt werden, die mit HCV infiziert wurden, und solche Zellen in vitro vermehrt werden.

[0028] Wir beschreiben ferner ein Verfahren zur Erzeugung von Antikörpern gegen HCV, wobei man einer Person ein isoliertes immunogenes Polypeptid, das ein HCV-Epitop enthält, in einer Menge verabreicht, die ausreicht, eine Immunantwort hervorzurufen.

[0029] Wir beschreiben ferner ein Verfahren zur Isolierung einer von dem Genom eines nichtidentifizierten, infektiösen Erregers abgeleiteten cDNA, umfassend die folgenden Schritte: (a) Bereitstellung von Wirtszellen, die mit Expressionsvektoren transformiert wurden, die eine aus Nucleinsäuren hergestellte cDNA-Bank enthalten, die aus mit dem Erreger infiziertem Gewebe isoliert wurden, und Züchten der Wirtszellen unter Bedingungen, die die Expression des (der) Polypeptids(e) ermöglichen, das (die) von der cDNA codiert wird (werden), (b) Wechselwirkung der Expressionsprodukte der cDNA mit einer einen Antikörper enthaltenden Körperkomponente einer Person, die mit dem infektiösen Erreger infiziert ist, unter Bedingungen, die eine Immunreaktion ermöglichen, und Nachweis der als Ergebnis der Wechselwirkung gebildeten Antikörper-Antigen-Komplexe, (c) Züchten von Wirtszellen, die Polypeptide exprimieren, die Antigen-Antikörper-Komplexe in Stufe (b) bilden, unter Bedingungen, die ihr Wachstum als Individualclone ermöglichen, und Isolieren der Clone, (d) Züchten von Zellen aus den Clonen von (c) unter Bedingungen, die die Expression des (der) Polypeptids(e) ermöglichen, das (die) von der cDNA codiert wird (werden), und Wechselwirkung der Expressionsprodukte mit Antikörper enthaltenden Körperkomponenten der Personen außer der Person in Stufe (a), die mit dem infektiösen Erreger infiziert sind, und mit Kontrollpersonen, die mit dem Erreger nicht infiziert wurden, und Nachweis der als Ergebnis der Wechselwirkung gebildeten Antikörper-Antigen-Komplexe, (e) Züchten von Wirtszellen, die Polypeptide exprimieren, die Antikörper-Antigen-Komplexe mit antikörperhaltigen Körperkomponenten infizierter Personen und vermutlich infizierter Personen und nicht mit den Komponenten von Kontrollpersonen bilden, unter Bedingungen, die ihr Wachstum als Individualclone ermöglichen und Isolieren der Clone, und (f) Isolieren der cDNA aus den Wirtszellclonen von (e).

Kurze Beschreibung der Figuren

[0030] **Fig. 1** zeigt die doppelsträngige Nucleotidsequenz der HCV-cDNA-Insertion in Clon 5-1-1 und die vermutliche Aminosäuresequenz des davon codierten Polypeptids.

[0031] **Fig. 2** zeigt die Homologien der überlappenden HCV-cDNA-Sequenzen in den Clonen 5-1-1, 81, 1-2

und 91.

[0032] **Fig. 3** zeigt eine zusammengesetzte Sequenz der HCV-cDNA, abgeleitet von den überlappenden Clonen 81, 1-2 und 91 und die davon codierte Aminosäuresequenz.

[0033] **Fig. 4** zeigt die doppelsträngige Nucleotidsequenz der HCV-cDNA-Insertion in Clon 81 und die vermutliche Aminosäuresequenz des davon codierten Polypeptids.

[0034] **Fig. 5** zeigt die HCV-cDNA-Sequenz in Clon 36, das Segment, das mit der NANBV-cDNA von Clon 81 überlappt und die von Clon 36 codierte Polypeptidsequenz.

[0035] **Fig. 6** zeigt das kombinierte ORF der HCV-cDNAs in den Clonen 36 und 81 und das davon codierte Polypeptid.

[0036] **Fig. 7** zeigt die HCV-cDNA-Sequenz in Clon 32, das Segment, das mit Clon 81 überlappt, und das davon codierte Polypeptid.

[0037] **Fig. 8** zeigt die HCV-cDNA-Sequenz in Clon 35, das Segment, das mit Clon 36 überlappt, und das davon codierte Polypeptid.

[0038] **Fig. 9** zeigt das kombinierte ORF der HCV-cDNAs in den Clonen 35, 36, 81 und 32 und das davon codierte Polypeptid.

[0039] **Fig. 10** zeigt die HCV-cDNA-Sequenz in Clon 37b, das Segment, das mit Clon 35 überlappt, und das davon codierte Polypeptid.

[0040] **Fig. 11** zeigt die HCV-cDNA-Sequenz in Clon 33b, das Segment, das mit Clon 32 überlappt, und das davon codierte Polypeptid.

[0041] **Fig. 12** zeigt die HCV-cDNA-Sequenz in Clon 40b, das Segment, das mit Clon 37b überlappt und das davon codierte Polypeptid.

[0042] **Fig. 13** zeigt die HCV-cDNA-Sequenz in Clon 25c, das Segment, das mit Clon 33b überlappt und das davon codierte Polypeptid.

[0043] **Fig. 14** zeigt die Nucleotidsequenz und das davon codierte Polypeptid des ORF s, das sich durch die HCV-cDNAs in den Clonen 40b, 37b, 35, 36, 81, 32, 33b und 25c erstreckt.

[0044] **Fig. 15** zeigt die HCV-cDNA-Sequenz in Clon 33c, das Segment, das mit der. Clonen 40b und 33c überlappt, und die davon codierten Aminosäuren.

[0045] **Fig. 16** zeigt die HCV-cDNA-Sequenz in Clon 8h, das Segment, das mit Clon 33c überlappt, und die davon codierten Aminosäuren.

[0046] **Fig. 17** zeigt die HCV-cDNA-Sequenz in Clon 7e, das Segment, das mit Clon 8h überlappt, und die davon codierten Aminosäuren.

[0047] **Fig. 18** zeigt die HCV-cDNA-Sequenz in Clon 14c, das Segment, das mit Clon 25c überlappt, und die davon codierten Aminosäuren.

[0048] **Fig. 19** zeigt die HCV-cDNA-Sequenz in Clon 8f, das Segment, das mit Clon 14c überlappt, und die davon codierten Aminosäuren.

[0049] **Fig. 20** zeigt die HCV-cDNA-Sequenz in Clon 33f, das Segment, das mit Clon 8f überlappt, und die davon codierten Aminosäuren.

[0050] **Fig. 21** zeigt die HCV-cDNA-Sequenz in Clon 33g, das Segment, das mit Clon 33f überlappt, und die davon codierten Aminosäuren.

[0051] **Fig. 22** zeigt die HCV-cDNA-Sequenz in Clon 7f, das Segment, das mit der Sequenz in Clon 7e überlappt, und die davon codierten Aminosäuren.

[0052] **Fig. 23** zeigt die HCV-cDNA-Sequenz in Clon 11b, das Segment, das mit der Sequenz in Clon 7f überlappt, und die davon codierten Aminosäuren.

[0053] **Fig. 24** zeigt die HCV-cDNA-Sequenz in Clon 14i, das Segment, das mit der Sequenz in Clon 11b überlappt, und die davon codierten Aminosäuren.

[0054] **Fig. 25** zeigt die HCV-cDNA-Sequenz in Clon 39c, das Segment, das mit der Sequenz in Clon 33g überlappt, und die davon codierten Aminosäuren.

[0055] **Fig. 26** zeigt eine zusammengesetzte HCV-cDNA-Sequenz, abgeleitet von den angeordneten cDNAs in den Clonen 14i, 11b 7f, 7e, 8h, 33c, 40b, 37b, 35, 36, 81, 32, 33b, 25c, 14c, 8f, 33f, 33g und 39c. Ebenfalls gezeigt ist die Aminosäuresequenz des von dem ausgedehnten ORF in der abgeleiteten Sequenz codierten Polypeptids.

[0056] **Fig. 27** zeigt die Sequenz der HCV-cDNA in Clon 12f, das Segment, das mit Clon 14i überlappt, und die davon codierten Aminosäuren.

[0057] **Fig. 28** zeigt die Sequenz der HCV-cDNA in Clon 35f, das Segment, das mit Clon 39c überlappt, und die davon codierten Aminosäuren.

[0058] **Fig. 29** zeigt die Sequenz der HCV-cDNA in Clon 19g, das Segment, das mit Clon 35f überlappt, und die davon codierten Aminosäuren.

[0059] **Fig. 30** zeigt die Sequenz von Clon 26g, das Segment, das mit Clon 19g überlappt, und die davon codierten Aminosäuren.

[0060] **Fig. 31** zeigt die Sequenz von Clon 15e, das Segment, das mit Clon 26g überlappt, und die davon co-

derten Aminosäuren.

[0061] **Fig. 32** zeigt die Sequenz in einer zusammengesetzten cDNA, die durch Anordnen der Clone 12f bis 15e in der 5'→3'-Richtung abgeleitet wurde. Sie zeigt auch die von dem kontinuierlichen ORF codierten Aminosäuren.

[0062] **Fig. 33** zeigt eine Fotografie von Western-Blots eines Fusionsproteins, SOD-NANB₅₋₁₋₁, mit Schimpansen-Serum aus mit BB-NANB, HAV und HBV-infizierten Schimpansen.

[0063] **Fig. 34** zeigt eine Fotografie von Western-Blots eines Fusionsproteins, SOD-NANB₅₋₁₋₁, mit Serum aus mit NANBV, HAV, HBV-infizierten Menschen und von Kontrollpersonen.

[0064] **Fig. 35** ist eine Karte, die die signifikanten Merkmale des Vektors pAB24 zeigt.

[0065] **Fig. 36** zeigt die vermutliche Aminosäuresequenz des Carboxylterminus des Fusionspolypeptids C100-3 und der Nucleotidsequenz, die es codiert.

[0066] **Fig. 37A** ist eine Fotografie eines mit Coomassie-Blau gefärbten Polyacrylamidgels, das C100-3 identifiziert, das in Hefe exprimiert wurde.

[0067] **Fig. 37B** zeigt einen Western-Blot von C100-3 mit Serum aus einem NANBV-infizierten Menschen.

[0068] **Fig. 38** zeigt ein Autoradiogramm eines Northern-Blots von RNA, isoliert aus der Leber eines BB-NANBV-infizierten Schimpansen, die mit BB-NANBV-cDNA von Clon 81 abgesucht wurde.

[0069] **Fig. 39** zeigt ein Autoradiogramm einer NANBV-Nucleinsäure, die mit RNase A oder DNase I behandelt wurde und mit BB-NANBV-cDNA, von Clon 81 abgesucht wurde.

[0070] **Fig. 40** zeigt ein Autoradiogramm von Nucleinsäuren, die aus NANBV-Teilchen extrahiert wurden, die aus infiziertem Plasma mit Anti-NANB₅₋₁₋₁ gewonnen worden waren und mit ³²P-markierter NANBV-cDNA aus Clon 81 abgesucht worden waren.

[0071] **Fig. 41a und b** zeigen Autoradiogramme von Filtern, die isolierte NANBV-Nucleinsäuren enthalten, die mit ³²P-markierten plus- und minus-strängigen DNA-Sonden, abgeleitet von NANBV-cDNA in Clon 81, abgesucht worden waren.

[0072] **Fig. 41-1** zeigt die Homologien zwischen einem Polypeptid, das von HCV-cDNA codiert wird, und einem NS-Protein aus dem Dengue-Flavivirus.

[0073] **Fig. 43** zeigt ein Histogramm der Verteilung der HCV-Infektion in Zufallsproben, bestimmt mittels eines ELISA-Absuchtests.

[0074] **Fig. 44** zeigt ein Histogramm der Verteilung der HCV-Infektion in Zufallsproben unter Verwendung von zwei Konfigurationen von Immunglobulinenzymkonjugaten in einem ELISA-Test.

[0075] **Fig. 45** zeigt die Sequenzen in einem Primer-Mix, abgeleitet von einer konservierten Sequenz in NS1 der Flaviviren.

[0076] **Fig. 46** zeigt die HCV-cDNA-Sequenz in Clon k9-1, das Segment, das mit der cDNA in **Fig. 27** überlappt, und die davon codierten Aminosäuren.

[0077] **Fig. 47** zeigt die Sequenz in einer zusammengesetzten cDNA, die durch Anordnen der Clone k9-I bis 15e in der 5'→3'-Richtung abgeleitet wurde. Sie zeigt auch die Aminosäuren, die von dem kontinuierlichen ORF codiert wurden.

I. Definitionen

[0078] Der Begriff "Hepatitis C-Virus" wurde von Forschern auf dem Gebiet für einen bisher unbekannten ätiologischen Erreger von NANBH reserviert. Folglich bezeichnet der hier verwendete Begriff "Hepatitis C-Virus" (HCV) einen Erreger, der NANBH hervorruft, wobei der Erreger ein Virus ist, das charakterisiert ist durch: ein Plusstrang-RNA-Genom, wobei das Genom ein offenes Leseraster (ORF) umfaßt, das ein Polyprotein codiert; und dadurch, daß die Gesamtheit des codierten Polyproteins eine mindestens 40%-ige Homologie zu dem gesamten Polyprotein eines viralen Isolats hat, von dessen Genom cDNAs hergestellt wurden, hinterlegt in einer Lambda-gt-11-cDNA Bibliothek bei der American Type Culture Collection (ATCC) unter der Hinterlegungsnummer 40394. Dieser Erreger wurde früher als NANBV und/oder BB-NANBV bezeichnet. Die Begriffe HCV, NANBV und BB-NANBV werden hier austauschbar verwendet, aber sie bezeichnen alle das vorstehend definierte Virus.

[0079] Als Erweiterung dieser Terminologie wird die von HCV hervorgerufene Erkrankung, die früher als NANB-Hepatitis (NANBH) bezeichnet wurde, als Hepatitis C bezeichnet. Die Begriffe NANBH und Hepatitis C können hier austauschbar verwendet werden.

[0080] Der hier verwendete Begriff "HCV" bezeichnet einen Virustyp, der NANBH hervorruft, und attenuierte Stämme oder defekte interferierende Teilchen, die davon abgeleitet sind. Wie nachstehend gezeigt, besteht das HCV-Genom aus RNA. Es ist bekannt, daß RNA-haltige Viren eine relativ hohe spontane Mutationsrate besitzen, d.h. wie berichtet wird, in der Größenordnung von 10⁻³ bis 10⁻⁴ pro Nucleotid (Fields & Knipe (1986)). Daher fallen diese multiplen Stämme unter die nachstehend beschriebenen HCV-Typen. Die hier beschriebenen Zusammensetzungen und Verfahren ermöglichen die Fortpflanzung, Identifizierung, den Nachweis und die Isolierung der verschiedenen verwandten Stämme. Ferner ermöglichen sie auch die Herstellung von Dia-

agnostika und Impfstoffen auf bzw. gegen verschiedene Stämme und sind bei Absuchverfahren auf antivirale Mittel zur pharmakologischen Verwendung dahingehend nützlich, daß sie die HCV-Replikation hemmen.

[0081] Obwohl die hier angegebene Information von einem HCV-Stamm abgeleitet ist, der nachstehend als CDC/HCV1 bezeichnet wird, reicht sie aus, um einem Virustaxenomen die Identifizierung anderer Stämme, die unter den Typ fallen, zu ermöglichen. Wie bereits beschrieben, haben die Erfinder gefunden, daß HCV ein Flavivirus oder ein flaviartiges Virus ist. Die Morphologie und die Zusammensetzung der Flavivirusteilchen sind bekannt und sind in Brinton (1986) diskutiert. Allgemein enthalten Flaviviren morphologisch ein zentrales Nucleocapsid, das von einer Lipiddoppelschicht umgeben ist. Die Virionen sind kugelförmig und besitzen einen Durchmesser von etwa 40 bis 50 nm. Ihre Cores besitzen einen Durchmesser von etwa 25 bis 30 nm. Entlang der äußeren Oberfläche der Virionenumhüllung sind Projektionen, die etwa 5 bis 10 nm lang sind und terminale Knoten mit einem Durchmesser von etwa 2 nm besitzen.

[0082] HCV codiert ein Epitop, das immunologisch mit einem Epitop in dem HCV-Genom, von dem die hier beschriebenen cDNAs abgeleitet sind, identifizierbar ist. Bevorzugt wird das Epitop von einer hier beschriebenen cDNA codiert. Das Epitop ist im Vergleich mit anderen bekannten Flaviviren HCV-spezifisch. Die Einzigartigkeit des Epitops kann durch dessen immunologische Reaktivität mit HCV und durch die fehlende immunologische Reaktivität mit anderen Flavivirustypen bestimmt werden. Verfahren zur Bestimmung der immunologischen Reaktivität sind auf dem Fachgebiet bekannt, beispielsweise mittels Radioimmunoassay, mittels Elisa-Assay, mittels Hämagglutination und verschiedene Beispiele geeigneter Techniken sind hier angegeben.

[0083] Zusätzlich zu den vorstehenden Angaben sind die folgenden Parameter anwendbar, entweder allein oder in Kombination, um einen Stamm als HCV zu identifizieren. Da HCV-Stämme evolutionär verwandt sind, wird angenommen, daß die Gesamthomologie des Genoms auf der Nucleotidebene 40% oder größer, bevorzugt 50% oder größer und noch bevorzugter 80 oder größer, ist, und es zusätzlich dazu entsprechende Sequenzen von mindestens etwa 13 aufeinanderfolgenden Nucleotiden gibt. Die Entsprechung zwischen der Genomsequenz des vermutlichen HCV-Stammes und der CDC/HCV1-cDNA-Sequenz kann nach auf dem Fachgebiet bekannten Techniken bestimmt werden. Beispielsweise kann sie durch direkten Vergleich der Sequenzinformation des Polynucleotids aus dem vermutlichen HCV und der (den) HCV-cDNA-Sequenz(en), die hier beschrieben ist (sind), bestimmt werden. Sie kann beispielsweise auch durch Hybridisierung der Polynucleotide unter Bedingungen, die stabile Doppelstränge zwischen homologen Bereichen (beispielsweise denjenigen, die vor der S₁-Spaltung verwendet werden) bilden, durch anschließende Spaltung mit einer einzelstrangspezifischen Nuclease bzw. Nucleasen und anschließender Größenbestimmung der gespaltenen Fragmente bestimmt werden.

[0084] Wegen der evolutionären Verwandtschaft der HCV-Stämme sind vermutliche HCV-Stämme durch ihre Homologie auf der Polypeptidebene identifizierbar. Im allgemeinen sind HCV-Stämme mehr als 40% homolog, bevorzugt mehr als 60 homolog und noch bevorzugter mehr als 80% homolog auf der Polypeptidebene. Die Techniken zur Bestimmung der Homologie einer Aminosäuresequenz sind auf dem Fachgebiet bekannt. Beispielsweise kann die Aminosäuresequenz direkt bestimmt werden und mit den hier angegebenen Sequenzen verglichen werden. Beispielsweise kann auch die Nucleotidsequenz des genomischen Materials des vermutlichen HCVs bestimmt werden (üblicherweise über ein cDNA-Zwischenprodukt). Die davon codierte Aminosäuresequenz kann bestimmt werden und die entsprechenden Bereiche verglichen werden.

[0085] Der hier verwendete Begriff ein Polynucleotid "abgeleitet von" einer bestimmten Sequenz, beispielsweise der HCV-cDNA, insbesondere solchen, die in den Sequenzen der **Fig. 1** bis 47 beispielhaft aufgeführt sind, oder von einem HCV-Genom, bezeichnet eine Polynucleotidsequenz aus einer Sequenz von etwa mindestens 6 Nucleotiden, bevorzugt mindestens 8 Nucleotiden, bevorzugter mindestens 10 bis 12 Nucleotiden und noch bevorzugter mindestens 15 bis 20 Nucleotiden, entsprechend, d.h. homolog zu oder komplementär zu, einem Bereich der bezeichneten Nucleotidsequenz. Bevorzugt ist die Sequenz des Bereichs, von dem sich das Polynucleotid ableitet, zu einer Sequenz homolog oder komplementär, die für ein HCV-Genom einzigartig ist. Ob eine Sequenz für das HCV-Genom einzigartig ist oder nicht, kann nach einem Fachmann auf dem Gebiet bekannten Techniken bestimmt werden. Beispielsweise kann die Sequenz mit Sequenzen in Datenbanken, beispielsweise Genbank, verglichen werden, um zu bestimmen, ob sie in dem nichtinfizierten Wirt oder anderen Organismen vorhanden ist. Die Sequenz kann auch mit den bekannten Sequenzen anderer viraler Erreger einschließlich derer, die bekanntlich Hepatitis induzieren, z.B. HAV, HBV und HDV, und anderen Mitgliedern der Flaviviridae verglichen werden. Die Entsprechung oder Nichtentsprechung der abgeleiteten Sequenz mit anderen Sequenzen kann auch durch Hybridisierung unter den geeigneten stringenten Bedingungen bestimmt werden. Die Hybridisierungstechniken zur Bestimmung der Komplementarität der Nucleinsäuresequenzen sind auf dem Fachgebiet bekannt und werden nachstehend diskutiert. Vergleiche beispielsweise auch Maniatis et al. (1982). Zusätzlich können Fehlpaarungen der durch Hybridisierung gebildeten Doppelstrang-Polynucleotide nach bekannten Techniken bestimmt werden, die beispielsweise die Spaltung mit einer Nuclease, wie S1, die spezifisch einzelsträngige Bereiche in Doppelstrang-Polynucleotiden spaltet, bestimmt werden. Bereiche, von denen typische DNA-Sequenzen abgeleitet werden können, umfassen z.B. Bereiche, die spezifische Epitope codieren, wie nichttranskribierte und/oder nichttranslatierte Bereiche, sind aber nicht

darauf beschränkt.

[0086] Das abgeleitete Polynucleotid muß nicht notwendigerweise physikalisch von der gezeigten Nucleotidsequenz abgeleitet sein, aber kann auf jede beliebige Weise erzeugt werden, umfassend beispielsweise chemische Synthese oder DNA-Replikation oder reverse Transkription oder Transkription, die auf der Information durch die Basensequenzen in dem (den) Bereich(en), von dem (denen) das Polynucleotid abgeleitet ist, beruht. Zusätzlich können Kombinationen von Bereichen entsprechend der der bezeichneten Sequenz nach Arten, die auf dem Fachgebiet bekannt sind, und die der beabsichtigten Verwendung entsprechen, modifiziert werden.

[0087] Ruf ähnliche Weise bezeichnet ein Polypeptid oder eine Aminosäuresequenz, die sich von einer bezeichneten Nucleinsäuresequenz, beispielsweise den Sequenzen in **Fig. 1** bis 47, oder einem HCV-Genom ableitet, ein Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz, die mit der eines Polypeptids, das von der Sequenz codiert wird oder mit einem Teil davon identisch ist, wobei der Teil aus mindestens drei bis fünf Aminosäuren und bevorzugter aus mindestens 8 bis 10 Aminosäuren und noch bevorzugter aus mindestens 11 bis 15 Aminosäuren besteht, oder das immunologisch mit einem von der Sequenz codierten Polypeptid identifizierbar ist.

[0088] Ein rekombinantes oder abgeleitetes Polypeptid ist nicht notwendigerweise von einer bezeichneten Nucleinsäuresequenz, beispielsweise den Sequenzen in den **Fig. 1** bis 47, oder von einem HCV-Genom translatiert. Es kann auf jede beliebige Weise erzeugt werden, einschließlich beispielsweise chemischer Synthese oder Expression eines rekombinanten Expressionssystems oder Isolierung aus einem mutierten HCV.

[0089] Der hier verwendete Begriff "rekombinantes Polynucleotid" bezeichnet ein Polynucleotid genomischen Ursprungs, aus cDNA, semisynthetischen oder synthetischen Ursprungs, das kraft seines Ursprungs oder seiner Manipulation: (1) nicht mit dem gesamten Polynucleotid oder einem Teil davon assoziiert ist, mit dem es in der Natur oder in Form einer Bank assoziiert ist, und/oder (2) an ein Polynucleotid geknüpft ist, außer an das, an das es natürlicherweise geknüpft ist.

[0090] Der hier verwendete Begriff "Polynucleotid" bezeichnet eine polymere Form von Nucleotiden beliebiger Länge, entweder Ribonucleotide oder Desoxyribonucleotide. Dieser Begriff bezeichnet nur die Primärstruktur des Moleküls. So umfaßt dieser Begriff doppel- und einzelsträngige DNA ebenso wie doppel- und einzelsträngige RNA. Er umfaßt auch modifizierte, beispielsweise durch Methylierung und/oder durch Capping, und unmodifizierte Formen des Polynucleotids.

[0091] Der hier verwendete Begriff "HCV enthaltend eine Sequenz entsprechend einer cDNA" bedeutet, daß das HCV eine Polynucleotidsequenz enthält, die einer Sequenz der bezeichneten DNA homolog oder komplementär ist. Der Grad an Homologie oder Komplementarität zu der cDNA beträgt etwa 50% oder größer, bevorzugt mindestens etwa 70% und noch bevorzugter mindestens etwa 90%. Die entsprechenden Sequenzen sind mindestens etwa 70 Nucleotide, bevorzugt mindestens etwa 80 Nucleotide und noch bevorzugter mindestens etwa 90 Nucleotide lang. Die Entsprechung zwischen der HCV-Sequenz und der cDNA kann nach auf dem Fachgebiet bekannten Techniken bestimmt werden, einschließlich beispielsweise eines direkten Vergleiches des sequenzierten Materials mit den beschriebenen cDNAs oder Hybridisierung und Spaltung mit Einzelstrangnucleasen mit anschließender Größenbestimmung der gespaltenen Fragmente.

[0092] Techniken zur Reinigung viraler Polynucleotide aus viralen Teilchen sind auf dem Fachgebiet bekannt und umfassen beispielsweise Aufbrechen des Teilchens mit einem chaotropen Mittel und Abtrennung des Polynucleotids bzw. der Polynucleotide und der Polypeptide durch Ionenaustauschchromatographie, Affinitätschromatographie und Dichtegradientensedimentation.

[0093] Techniken zur Reinigung viraler Polypeptide sind auf dem Fachgebiet bekannt und Beispiele für diese Techniken werden nachstehend diskutiert.

[0094] "Rekombinante Wirtszellen", "Wirtszellen", "Zellen", "Zell-Linien", "Zellkulturen" und andere derartige Begriffe bezeichnen Mikroorganismen oder höhere eukaryontische Zell-Linien, die als einzellige Einheiten gezüchtet wurden, und beziehen sich auf Zellen, die als Empfänger für einen rekombinanten Vektor oder eine andere Transfer-DNA verwendet werden können oder verwendet wurden und umfassen die Nachkommen der ursprünglichen Zelle, die transfiziert wurde. Selbstverständlich müssen die Nachkommen einer einzigen Elternzelle nicht notwendigerweise vollständig in der Morphologie oder im Genom oder dem gesamten DNA-Komplement mit der ursprünglichen Elternzelle infolge zufälliger oder gezielter Mutationen identisch sein. Die Nachkommen der Elternzellen, die mit der durch die relevanten Eigenschaft zu charakterisierenden Elternzelle ausreichend ähnlich sind, wie das Vorhandensein einer Nucleotidsequenz, die ein gewünschtes Peptid codiert, fallen unter die durch diese Definition umfaßten Nachkommen und werden von den vorstehenden Termini gedeckt.

[0095] Ein "Replicon" ist jedes beliebige genetische Element, z.B. ein Plasmid, ein Chromosom, ein Virus, das sich als autonome Einheit der Polynucleotidreplikation in einer Zelle verhält, d.h. die Fähigkeit zur Replikation unter seiner eigenen Kontrolle besitzt.

[0096] Ein "Vektor" ist ein Replicon, an den ein anderes Polynucleotidsegment geknüpft ist, um die Replikation und/oder Expression des angeknüpften Segments zu bewirken.

[0097] "Kontrollsequenz" bezeichnet Polynucleotidsequenzen, die notwendig sind, um die Expression der co-

dierten Sequenzen, an die sie ligiert sind, zu bewirken. Die Natur solcher Kontrollsequenzen unterscheidet sich je nach dem Wirtsorganismus; in Prokaryonten umfassen solche Kontrollsequenzen allgemein einen Promotor, eine ribosomale Bindungsstelle und Terminatoren. In Eukaryonten umfassen solche Kontrollsequenzen allgemein Promotoren, Terminatoren und in einigen Fällen Enhancer. Der Begriff "Kontrollsequenzen" soll mindestens alle Komponenten, deren Vorhandensein zur Expression notwendig ist, umfassen und kann auch zusätzliche Komponenten umfassen, deren Vorhandensein vorteilhaft ist, beispielsweise Leader-Sequenzen.

[0098] "Funktionell verknüpft" bezeichnet eine Nebeneinanderordnung, bei der die so beschriebenen Komponenten in einer Beziehung stehen, die ihre Funktion in beabsichtigter Weise ermöglicht. Eine Kontrollsequenz, die "funktionell" an eine codierende Sequenz "gebunden" ist, ist so ligiert, daß die Expression der codierenden Sequenz unter Bedingungen, die mit den Kontrollsequenzen kompatibel sind, bewirkt wird.

[0099] Ein "offenes Leseraster" (ORF) ist ein Bereich einer Polynucleotidsequenz, der ein Polypeptid codiert. Dieser Bereich kann einen Teil einer codierenden Sequenz oder eine vollständige codierende Sequenz darstellen.

[0100] Eine "codierende Sequenz" ist eine Polynucleotidsequenz, die in mRNA transkribiert wird und/oder in ein Polypeptid translatiert wird, wenn sie unter die Kontrolle geeigneter Regulatorsequenzen gestellt wird. Die Grenzen der codierenden Sequenz werden durch ein Translationsstartcodon am 5'-Terminus und ein Translationsstoppcodon am 3'-Terminus bestimmt. Eine codierende Sequenz kann mRNA, cDNA und rekombinante Polynucleotidsequenzen umfassen, ist aber nicht darauf beschränkt.

[0101] "Immunologisch identifizierbar mit/als" bezeichnet das Vorhandensein eines Epitops (von Epitopen) und eines Polypeptids (von Polypeptiden), das (die) auch auf dem (den) bezeichneten Polypeptid(en), üblicherweise HCV-Proteine, vorhanden und für sie einzigartig ist (sind). Die immunologische Identität kann durch Antikörperbindung und/oder kompetitive Bindung bestimmt werden. Diese Techniken sind einem Durchschnittsfachmann bekannt und werden auch nachstehend erläutert. Die Einzigartigkeit eines Epitops kann auch durch Computerrecherchen bekannter Datenbanken, beispielsweise Genbank, auf die Polynucleotidsequenzen, die das Epitop codieren, und durch Aminosäuresequenzvergleiche mit anderen bekannten Proteinen bestimmt werden.

[0102] Der hier verwendete Begriff "Epitop" bezeichnet eine antigene Determinante eines Polypeptids. Ein Epitop kann 3 Aminosäuren in räumlicher Konformation, die für das Epitop einzigartig ist, umfassen. Im allgemeinen besteht ein Epitop aus mindestens 5 solchen Aminosäuren und üblicherweise aus mindestens 8 bis 10 solchen Aminosäuren. Verfahren zur Bestimmung der räumlichen Konformation von Aminosäuren sind auf dem Fachgebiet bekannt und umfassen beispielsweise Röntgenkristallographie und zweidimensionale kernmagnetische Resonanz.

[0103] Ein Polypeptid ist "immunologisch reaktiv" mit einem Antikörper, wenn es an einen Antikörper infolge der Antikörpererkennung eines spezifischen Epitops, das in dem Polypeptid enthalten ist, bindet. Die immunologische Reaktivität kann durch Antikörperbindung, genauer durch die Kinetiken der Antikörperbindung und/oder kompetitive Bindung unter Verwendung eines bekannten (bekannter) Polypeptids(e), das (die) ein Epitop, gegen das der Antikörper gerichtet ist, enthält (enthalten), als Kompetitor(en) bestimmt werden. Die Techniken zur Bestimmung, ob ein Polypeptid immunologisch mit einem Antikörper reaktiv ist, sind auf dem Fachgebiet bekannt.

[0104] Der hier verwendete Begriff "immunogenes Polypeptid, enthaltend ein HCV-Epitop" umfaßt natürlicherweise vorkommende HCV-Polypeptide oder Fragmente davon, ebenso wie Polypeptide, die durch andere Mittel, beispielsweise chemische Synthese oder die Expression des Polypeptids in einem rekombinanten Organismus, hergestellt wurden.

[0105] Der Begriff "Polypeptid" bezeichnet eine Molekülkette aus Aminosäuren und bezieht sich nicht auf eine spezifische, Länge des Produkts. So fallen Peptide, Oligopeptide und Proteine unter die Definition eines Polypeptids. Dieser Begriff bezieht sich auch nicht auf postexpressionelle Modifikationen des Polypeptids, beispielsweise Glycosylierungen, Acetylierungen, Phosphorylierungen und dgl.

[0106] Der hier verwendete Begriff "Transformation" bezieht sich auf die Insertion eines exogenen Polynucleotids in eine Wirtszelle, unabhängig von dem zur Insertion verwendeten Verfahren, beispielsweise direkte Aufnahme, Transduction oder f-Paarung. Das exogene Polynucleotid kann als nichtintegrierter Vektor, beispielsweise als ein Plasmid, beibehalten werden, oder kann alternativ in das Wirtsgenom integriert werden.

[0107] Der hier verwendete Begriff "Behandlung" bezieht sich auf Prophylaxe und/oder Therapie.

[0108] Der hier verwendete Begriff "Individuum" bezieht sich auf Vertebraten, insbesondere Mitglieder der Säugerspezies, und umfaßt Haustiere, beim Sport eingesetzte Tiere, Primaten und Menschen, ist aber nicht darauf beschränkt.

[0109] Der hier verwendete Begriff "Plusstrang" einer Nucleinsäure enthält die Sequenz, die das Polypeptid codiert. Der "Minusstrang" enthält die Sequenz, die zu der des "Plusstranges" komplementär ist.

[0110] Der hier verwendete Begriff "positiv-strängiges Genom" eines Virus ist eines, in dem das Genom, entweder RNA oder DNA, einzelsträngig ist und das ein virales (firale) Polypeptid(e) codiert. Beispiele für positiv-strängige RNA-Viren umfassen Togaviridae, Coronaviridae, Retroviridae, Picornaviridae und Caliciviridae.

Eingeschlossen sind auch die Flaviviridae, die früher als Togaviridae klassifiziert wurden. Siehe Fields & Knipe (1986).

[0111] Der hier verwendete Begriff "antikörperhaltige Körperkomponente" bezeichnet eine Komponente des Körpers eines Individuums, die als Quelle für die Antikörper von Interesse ist. Antikörperhaltige Körperkomponenten sind auf dem Fachgebiet bekannt und umfassen beispielsweise Plasma, Serum, Spinalflüssigkeit, Lymphflüssigkeit, die externen Bereiche des Atmungs-, Intestinal- und Urogenitaltrakts, Tränen, Speichel, Milch, weiße Blutkörperchen und Myelome sind aber nicht darauf beschränkt.

[0112] Der hier verwendete Begriff "gereinigtes HCV" bezeichnet ein HCV-Präparat, das aus den zellulären Bestandteilen, mit denen das Virus normalerweise assoziiert ist, und aus anderen Virustypen, die in dem infizierten Gewebe vorhanden sein können, isoliert wurde. Die Techniken zur Isolierung von Viren sind einem Fachmann bekannt und umfassen beispielsweise Zentrifugation und Affinitätschromatographie. Ein Verfahren zur Herstellung von gereinigtem HCV wird nachstehend diskutiert.

II. Beschreibung

[0113] Bei der Durchführung der Erfindung werden, außer wenn es anders angegeben ist, herkömmliche Techniken der Molekularbiologie, der Mikrobiologie, der DNA-Rekombination und Immunologie verwendet, die auf dem Fachgebiet eingeführt sind. Solche Techniken sind vollständig in der Literatur beschrieben. Vergleiche beispielsweise Maniatis, Fitch & Sambrook, *Molecular Cloning; A Laboratory Manual* (1982); *DNA Cloning*, Bd. I und II (D.N. Glover Hrsg., 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait Hrsg., 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (B.D. Hames & S.J. Higgins Hrsg., 1984); *Transcription and Translation* (B.D. Hames & S.J. Higgins Hrsg., 1984); *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney Hrsg., 1986); *Immobilized Cells and Enzymes* (IRL Press, 1986); B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); die Serien, *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.); *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells* (J.H. Miller und M.P. Calos Hrsg., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory), *Methods in Enzymology* Bd. 154 und Bd. 155 (Wu und Grossmann bzw. Wu, Hrsg.), Mayer und Walker, Hrsg. (1987), *Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology* (Academic Press, London), Scopes (1987), *Protein Purification: Principles and Practice*, 2. Auflage (Springer-Verlag, N.Y.) und *Handbook of Experimental Immunology*, Bd. I-IV (D.M. Weir und C.C. Blackwell Hrsg. 1986).

[0114] Auf alle sowohl vorstehend als auch nachstehend erwähnten Patente, Patentanmeldungen und Publikationen wird hiermit Bezug genommen.

[0115] Die nützlichen Materialien und Verfahren der vorliegenden Erfindung werden durch die Bereitstellung einer Familie von eng homologen Nucleotidsequenzen ermöglicht, die aus einer cDNA-Bank isoliert wurden, die von Nucleinsäuresequenzen stammt, die in dem Plasma eines HCV-infizierten Schimpansen vorhanden sind. Diese Familie von Nucleotidsequenzen ist nicht menschlichen Ursprungs und stammt auch nicht von einem Schimpansen ab, da sie mit genomischer DNA von nicht-infizierten Individuen weder des Menschen noch des Schimpansen hybridisiert, da die Nucleotide dieser Sequenzfamilie nur in Leber und Plasma von Schimpansen mit HCV-Infektion vorkommen und da die Sequenz in Genbank nicht vorhanden ist. Zusätzlich zeigt die Sequenzfamilie keine signifikante Homologie zu Sequenzen, die in dem HBV-Genom enthalten sind.

[0116] Die Sequenz eines Mitglieds der Familie, die in Clon 5-1-1 enthalten ist, besitzt ein kontinuierliches offenes Leseraster (ORF), das ein Polypeptid mit etwa 50 Aminosäuren codiert. Seren von HCV-infizierten Menschen enthalten Antikörper, die an dieses Polypeptid binden, während Seren von nichtinfizierten Menschen keine Antikörper gegen dieses Polypeptid enthalten. Schließlich, während die Seren von nichtinfizierten Schimpansen keine Antikörper gegen dieses Polypeptid enthalten, werden Antikörper in Schimpansen nach akuter NANBH-Infektion induziert. Ferner werden Antikörper gegen dieses Polypeptid bei Schimpansen und Menschen, die mit HAV und HBV infiziert sind, nicht nachgewiesen. Anhand dieser Kriterien ist die Sequenz eine cDNA gegen eine virale Sequenz, wobei das Virus NANBH hervorruft oder damit assoziiert ist. Diese cDNA-Sequenz ist in **Fig. 1** gezeigt. Wie nachstehend diskutiert, unterscheidet sich die cDNA-Sequenz in Clon 5-1-1 von der anderer isolierter cDNAs dahingehend, daß sie 28 zusätzliche Basenpaare enthält.

[0117] Eine Zusammenstellung anderer identifizierter Mitglieder der cDNA-Familie, die unter Verwendung einer synthetischen Sequenz, die einem cDNA-Fragment in Clon 5-1-1 äquivalent ist, als Sonde isoliert wurden, ist in **Fig. 3** gezeigt. Ein Mitglied der cDNA-Familie, das unter Verwendung einer synthetischen Sequenz, die von der cDNA in Clon 81 abgeleitet ist, isoliert wurde, ist in **Fig. 5** gezeigt, und die Zusammensetzung dieser Sequenz mit der von Clon 81 ist in **Fig. 6** gezeigt. Andere Mitglieder der cDNA-Familie einschließlich derjenigen, die in den Clonen 12f, 14i, 11b, 7f, 7e, 8h, 33c, 40b, 37b, 35, 36, 81, 32, 33b, 25c, 14c, 8f, 33f, 33g, 39c, 35f, 19g, 26g und 15e vorhanden sind, sind in Absatz IV.A. beschrieben. Eine Zusammensetzung der cDNAs in diesen Clonen ist in Absatz IV.A.19 beschrieben und in **Fig. 32** gezeigt. Die zusammengesetzte cDNA zeigt, daß sie ein kontinuierliches ORF enthält und so ein Polyprotein codiert. Diese Daten entsprechen den nachstehend diskutierten Vorschlägen, daß HCV ein Flavivirus oder ein flaviartiges Virus ist. Clon k9-1 überlappt mit der Sequenz von **Fig. 32**. Eine zusammengesetzte cDNA ist in **Fig. 47** gezeigt.

[0118] Die Verfügbarkeit dieser cDNA-Familie, die in **Fig. 1** bis 47 einschließlich gezeigt ist, ermöglicht die

Konstruktion von DNA-Sonden und Polypeptiden, die zur Diagnose von NANBH als Folge einer HCV-Infektion und zum Absuchen von Blutspendern ebenso wie. Spenderblut und Blutprodukten auf Infektion nützlich sind. Beispielsweise ist es, ausgehend von der Sequenzen, möglich, DNA-Oligomere mit etwa 8 bis 10 Nucleotiden oder größer zu synthetisieren, die als Hybridisierungs sonden nützlich sind, um das Vorhandensein des viralen Genoms in beispielsweise Seren von Individuen, die vermutlich das Virus beherbergen, nachzuweisen oder um Spenderblut auf das Vorhandensein des Virus abzusuchen. Die Familie von cDNA-Sequenzen ermöglicht auch die Entwicklung und Produktion von HCV-spezifischen Polypeptiden, die als diagnostische Reagentien auf das Vorhandensein von Antikörpern, die während einer NANBH erzeugt wurden, nützlich sind. Antikörper gegen gereinigte Polypeptide, die von den cDNAs abgeleitet sind, können auch verwendet werden, um virale Antigene in infizierten Individuen und im Blut nachzuweisen.

[0119] Die Kenntnis dieser cDNA-Sequenzen ermöglicht auch die Entwicklung und Produktion von Polypeptiden, die als Impfstoffe gegen HCV verwendet werden können, und auch die Produktion von Antikörpern, die ihrerseits zum Schutz gegen die Krankheit und/oder zur Therapie von HCV-infizierten Individuen verwendet werden können.

[0120] Ferner ermöglicht die Familie von cDNA-Sequenzen die weitere Charakterisierung des HCV-Genoms.

[0121] Von diesen Sequenzen abgeleitet Polynucleotidsonden können verwendet werden, um cDNA-Banken auf zusätzliche überlappende cDNA-Sequenzen abzusuchen, die ihrerseits verwendet werden können, um mehr überlappende Sequenzen zu erhalten. Außer das Genom ist segmentiert und den Segmenten fehlen gemeinsame Sequenzen, kann diese Technik verwendet werden, um Sequenzen des vollständigen Genoms zu gewinnen. Wenn jedoch das Genom segmentiert ist, können andere Segmente des Genoms erhalten werden, indem man das λ -gt11-serologische Absuchverfahren, das zur Isolierung der cDNA-Clone, wie hier beschrieben, verwendet wurde, wiederholt oder alternativ das Genom aus gereinigten HCV-Teilchen isoliert.

[0122] Die Familie der cDNA-Sequenzen und der von diesen Sequenzen abgeleiteten Polypeptide ebenso wie die gegen diese Polypeptide gerichteten Antikörper sind ebenfalls nützlich, um den (die) BB-NANBV-Erreger zu isolieren und zu identifizieren. Beispielsweise können Antikörper gegen HCV-Epitope, die in den von den cDNAs abgeleiteten Polypeptiden enthalten sind, in Verfahren verwendet werden, die auf der Affinitätschromatographie beruhen, um das Virus zu isolieren. Alternativ können die Antikörper verwendet werden, um die nach anderen Techniken isolierten viralen Teilchen zu identifizieren. Die viralen Antigene und das genomische Material in den isolierten viralen Teilchen kann dann weiter charakterisiert werden.

[0123] Die durch weitere Sequenzierung des (der) HCV-Genoms(e) sowie aus der weiteren Charakterisierung der HCV-Antigene und der Charakterisierung des Genoms erhaltene Information ermöglicht die Entwicklung und Synthese weiterer Sonden und Polypeptide und Antikörper, die zur Diagnose, zur Verhütung und zur Therapie der HCV-induzierten NANBH und zum Absuchen von infiziertem Blut und Blutprodukten verwendet werden können.

[0124] Die Verfügbarkeit von HCV-Sonden, einschließlich Antigene und Antikörper, und von Polynucleotiden, abgeleitet von dem Genom, von dem die Familie der cDNAs abgeleitet ist, ermöglicht auch die Entwicklung von Gewebekultursystemen, die von größerem Nutzen bei der Aufklärung der Biologie des HCV sein werden. Dies seinerseits kann zur Entwicklung neuer Behandlungsstrategien auf der Basis antiviraler Komponenten führen, die bevorzugt die Replikation von oder Infektion durch HCV hemmen.

[0125] Das zur Identifizierung und Isolierung des ätiologischen NANBH-Erregers verwendete Verfahren ist neu, und es kann auf die Identifizierung und/oder Isolierung von bisher nichtcharakterisierten Erregern angewendet werden, die ein Genom enthalten und die mit einer Vielzahl von Erkrankungen einschließlich solcher, die durch Viren, Viroide, Bakterien, Pilze und Parasiten induziert werden, assoziiert sind. Bei diesem Verfahren wurde eine cDNA-Bank aus in infizierten Gewebe aus einem infizierten Individuum vorhandenen Nucleinsäuren erzeugt. Die Bank wurde in einem Vektor erzeugt, der die Expression der von der cDNA codierten Polypeptide ermöglichte. Clone der Wirtszellen, die den Vektor enthalten, die ein immunologisch reaktives Fragment eines Polypeptids des ätiologischen Erregers exprimierten, wurden durch immunologisches Absuchen der Expressionsprodukte der Bank mit einer antikörperhaltigen Körperkomponente aus einem anderen Individuum, das zuvor mit dem möglichen Erreger infiziert wurde, selektioniert. Die Stufen bei der immunologischen Absuch-Technik umfaßten die Wechselwirkung der Expressionsprodukte der cDNA-enthaltende Vektoren mit der antikörperhaltigen Körperkomponente eines zweiten infizierten Individuums und den Nachweis der Bildung von Antikörper-Antigen-Komplexen zwischen dem Expressionsprodukt bzw. den Expressionsprodukten und den Antikörpern des zweiten infizierten Individuums. Die isolierten Clone werden weiter immunologisch durch Wechselwirkung ihrer Expressionsprodukte mit den antikörperhaltigen Körperkomponenten anderer Individuen, die mit dem vermutlichen Erreger infiziert wurden, und mit Kontrollindividuen, die mit dem vermutlichen Erreger nicht infiziert wurden, und Nachweis der Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen mit Antikörpern aus den infizierten Individuen abgesucht. Die cDNA-enthaltenden Vektoren, die Polypeptide codieren, die immunologisch mit den Antikörpern aus den infizierten Individuen und den vermutlich mit dem Erreger infizierten Individuen, aber nicht mit den Kontrollindividuen, reagieren, werden isoliert. Die zur Konstruktion der cDNA-Bank und zum immunologischen Absuchen verwendeten infizierten Individuen müssen nicht der gleichen Art ange-

hören.

[0126] Die als Ergebnis dieses Verfahrens isolierten cDNAs und ihre Expressionsprodukte und die Antikörper gegen die Expressionsprodukte sind nützlich zur Charakterisierung und/oder zum Einfangen, des ätiologischen Erregers. Wie nachstehend ausführlicher beschrieben, wurde dieses Verfahren erfolgreich verwendet, um eine Familie von cDNAs, die von dem HCV-Genom abgeleitet ist, zu isolieren.

II.A. Herstellung der cDNA-Sequenz

[0127] Vereinigtes Serum aus einem Schimpansen mit einer chronischen HCV-Infektion, das einen hohen Titer des Virus, d.h. mindestens 10^6 Schimpanseninfektionsdosen/ml (CID/ml) enthielt, wurde verwendet, um die viralen Teilchen zu isolieren. Die aus diesen Teilchen isolierten Nucleinsäuren wurden als Matrize zur Konstruktion einer cDNA-Bank für das virale Genom verwendet. Die Verfahren zur Isolierung der vermutlichen HCV-Teilchen und zur Konstruktion der cDNA-Bank in λ -gt11 ist in Abschnitt IV.A.1. diskutiert. λ -gt11 ist ein Vektor, der spezifisch entwickelt wurde, um die insertierten cDNRs als Fusionspolypeptide mit β -Galactosidase zu exprimieren, und um eine große Anzahl von rekombinanten Phagen mit spezifischen Antiseren gegen ein definiertes Antigen abzusuchen. Die λ -gt11-cDNA-Bank, die aus einem cDNA-Pool erzeugt wurde, der cDNA mit einer ungefähren mittleren Größe von 200 Basenpaaren enthielt, wurde auf codierte Epitope abgesucht, die spezifisch mit Seren binden konnten, die von Patienten stammten, die zuvor eine NANB-Hepatitis hatten. Huynh, T.V, et al. (1985). Etwa 10^6 Phagen wurden abgesucht und fünf positive Phagen wurden identifiziert, gereinigt und dann auf die Spezifität ihrer Bindung an Seren aus verschiedenen Menschen und Schimpansen, die zuvor mit dem HCV-Erreger infiziert worden waren, getestet. Einer dieser Phagen 5-1-1 band an 5 der 8 getesteten Humansera. Diese Bindung schien selektiv zu sein für die Seren aus Patienten mit vorherigen NANB-Hepatitisinfektionen, da 7 normale Blutspenderseren keine solche Bindung zeigten.

[0128] Die Sequenz der cDNA in den rekombinanten Phagen 5-1-1 wurde bestimmt und ist in **Fig. 1** gezeigt. Das von dieser clonierten cDNA codierte Polypeptid, das im gleichen Leseraster wie der N-terminale β -Galactosidaserest des Fusionspolypeptids ist, ist, über der Nucleotidsequenz gezeigt. Dieses Translations-ORF codiert daher ein Epitop(e), das (die) spezifisch von Seren von Patienten mit NANB-Hepatitisinfektionen erkannt wird (werden).

[0129] Die Verfügbarkeit der cDNA in dem rekombinanten Phagen 5-1-1 ermöglichte die Isolierung anderer Clone, die zusätzliche Segmente und/oder alternative Segmente der cDNA des viralen Genoms erhalten. Die vorstehend beschriebene λ -gt11-cDNA-Bank wurde unter Verwendung eines synthetischen Polynucleotids, das von der Sequenz der clonierten 5-1-1 cDNA abgeleitet ist, abgesucht. Dieses Absuchen ergab drei weitere Clone, die als 81, 1-2 und 91 identifiziert wurden. Die cDNAs, die in diesen Clonen enthalten waren, wurden sequenziert. Vergleiche Abschnitte IV.A.3. und IV.A.4. Die Homologien zwischen den vier unabhängigen Clonen sind in **Fig. 2** gezeigt, in denen die Homologien durch die vertikale Linien angegeben sind. Die Sequenzen von Nucleotiden, die nur in den Clonen 5-1-1, 81 und 91 vorhanden sind, sind durch kleine Buchstaben angegeben.

[0130] Die clonierten cDNAs, die in den rekombinanten Phagen in den Clonen 5-1-1, 81, 1-2 und 91 vorhanden sind, sind stark homolog und unterscheiden sich nur in zwei Bereichen.

[0131] Erstens, das Nucleotid Nummer 67 in Clon 1-2 ist ein Thymin, wohingegen die anderen drei Clone einen Cytidinrest in dieser Position enthalten. Diese Substitution ändert jedoch nicht die Natur der codierten Aminosäure.

[0132] Der zweite Unterschied zwischen den Clonen ist, daß Clon 5-1-1 28 Basenpaare an seinem 5'-Terminus enthält, die in den anderen Clonen nicht vorhanden sind. Diese Extrasequenz kann ein 5'-terminales Clonierungsartefakt sein. 5'-terminale Clonierungsartefakte werden üblicherweise bei den Produkten der cDNA-Verfahren beobachtet.

[0133] Synthetische Sequenzen, die von der 5'-Region und der 3'-Region der HCV-cDNA in Clon 81 abgeleitet sind, wurden verwendet, um die cDNAs aus der λ -gt11-NANBV-cDNA-Bank abzusuchen und zu isolieren, die mit der cDNA von Clon 81 überlappten (Absatz IV.A.5.). Die Sequenzen der so erhaltenen cDNAs, die in Clon 36 bzw. Clon 32 vorhanden sind, sind in **Fig. 5** und **Fig. 7** gezeigt.

[0134] Auf ähnliche Weise wurde ein synthetisches Polynucleotid auf der Basis des 5'-Bereichs von Clon 36 verwendet, um die cDNAs der λ -gt11-NANBV-cDNA-Bank abzusuchen und zu isolieren, die mit der cDNA von Clon 35 überlappten (Absatz IV.A.8.). Ein gereinigter Clon der rekombinanten phagenhaltigen cDNA, der mit der synthetischen Polynucleotidsonde hybridisierte, wurde als Clon 5 bezeichnet, und die NANBV-cDNA-Sequenz, die in diesem Clon enthalten ist, ist in **Fig. 8** gezeigt.

[0135] Unter Verwendung der Technik zur Isolierung überlappender cDNA-Sequenzen wurden Clone erhalten, die zusätzlich stromaufwärts und stromabwärts HCV-cDNA-Sequenzen enthielten. Die Isolierung dieser Clone ist nachstehend in Absatz IV.A. beschrieben.

[0136] Die Analyse der Nucleotidsequenzen der HCV-cDNAs, die von den isolierten Clonen codiert wird, zeigt, daß die zusammengesetzte cDNA ein langes kontinuierliches ORF enthält. **Fig. 26** zeigt die Sequenz

der zusammengesetzten cDNA von diesen Clonen zusammen mit dem vermutlichen HCV-Polypeptid, das davon codiert wird.

[0137] Die Beschreibung des Verfahrens zur Gewinnung der cDNA-Sequenzen ist vor allem von historischem Interesse. Die so erhaltenen Sequenzen (und ihre Komplementärsequenzen) werden hier bereitgestellt, und die Sequenzen oder jeder Teil davon könnte unter Verwendung synthetischer Verfahren oder durch eine Kombination von synthetischen Verfahren mit Gewinnung von Teilsequenzen unter Verwendung von Verfahren, die ähnlich den hier beschriebenen sind, hergestellt werden.

[0138] Die λ -gt11-Stämme, die von der HCV-cDNA-Bank und von den Clonen 5-1-1, 81, 1-2 und 91 repliziert wurden, wurden gemäß dem Budapester Vertrag bei der American Type Culture Collection (ATCC), 12301 Parklawn Dr., Rockville, Maryland 20852 hinterlegt und erhielten die folgenden Hinterlegungs-Nr.

<u>λ-gt11</u>	<u>ATCC-Nr.</u>	<u>Hinterlegungsdatum</u>
HCV-cDNA-Bank	40394	1. Dez. 1987
Clon 81	40388	17. Nov. 1987
Clon 91	40389	17. Nov. 1987
Clon 1-2	40390	17. Nov. 1987
Clon 5-1-1	40391	18. Nov. 1987

[0139] Die bezeichneten Hinterlegungen werden für eine Zeitspanne von dreißig (30) Jahren vom Hinterlegungsdatum an oder von fünf (5) Jahren nach der letzten Nachfrage nach der Hinterlegung oder für die durchsetzbare Lebensdauer des US-Patents, je nach dem, welche Frist länger dauert, aufbewahrt. Diese Hinterlegungen und andere hier erwähnte hinterlegte Materialien sind nur aus Gründen der Zweckmäßigkeit angegeben und werden nicht benötigt, um die vorliegende Erfindung angesichts der angegebenen Beschreibung durchzuführen. Auf die HCV-cDNA-Sequenzen in allen hinterlegten Materialien wird hiermit Bezug genommen.

[0140] Die vorstehende Beschreibung des "Genom-Walkings" durch Isolierung überlappender cDNA-Sequenzen aus der HCV- λ -gt11-Bank bietet ein Verfahren, nach dem cDNAs entsprechend dem vollständigen HCV-Genom isoliert werden können. Jedoch sind angesichts der hier angegebenen Information andere Verfahren zur Isolierung dieser cDNAs für einen Fachmann offensichtlich. Einige dieser Verfahren sind in dem nachstehenden Abschnitt IV.A. beschrieben.

II.B. Herstellung von viralen Polypeptiden und Fragmenten

[0141] Die Verfügbarkeit der cDNA-Sequenzen, nämlich entweder derjenigen, die unter Verwendung der cDNA-Sequenzen in den **Fig. 1** bis 32, wie nachstehend diskutiert, isoliert wurden, oder der cDNA-Sequenzen in diesen Figuren, ermöglicht die Konstruktion von Expressionsvektoren, die antigenisch aktive Bereiche des Polypeptids, das von jedem Strang codiert wird, codieren. Diese antigenisch aktiven Bereiche können von Hüll-Antigenen oder von Core-Antigenen, einschließlich beispielsweise Polynucleotidbindungsproteine, Polynucleotidpolymerase(n) und anderer viraler Proteine, die zur Replikation und/oder zum Zusammenbau des Virusteilchens benötigt werden, abgeleitet werden. Fragmente, die die gewünschten Polypeptide codieren, leiten sich von den cDNA-Clonen unter Verwendung der herkömmlichen Restriktionsspaltung oder aus synthetischen Verfahren ab und werden in Vektoren ligiert, die beispielsweise Teile von Fusionssequenzen, wie β -Galactosidase oder Superoxiddismutase (SOD), bevorzugt SOD, enthalten. Die Verfahren und die Vektoren, die zur Produktion von Polypeptiden geeignet sind, die die Fusionssequenzen von SOD enthalten, sind in der europäischen Patentpublikation Nr. 0196056, veröffentlicht am 1. Okt. 1986, beschrieben. Vektoren, die die Fusionspolypeptide von SOD und HCV-

[0142] Polypeptiden, d.h. NANB₅₋₁₋₁, NRNB₈₁ und C100-3 codieren, die von zusammengesetzten HCV-cDNAs codiert werden, sind in den Abschnitten IV.B.1, IV.B.2 bzw. IV.B.4 beschrieben. Jeder gewünschte Teil der HCV-cDNA der ein offenes Leseraster in jedem Sinnstrang enthält, kann als rekombinantes Polypeptid, wie als reifes oder Fusionsprotein, erhalten werden. Alternativ kann ein Polypeptid, das von der cDNA codiert wird, durch chemische Synthese bereitgestellt werden.

[0143] Die DNA, die das gewünschte Polypeptid codiert, entweder in fusionierter oder reifer Form, die eine Signalsequenz für die Sekretion enthalten kann oder nicht, kann in Expressionsvektoren ligiert werden, die für jeden beliebigen geeigneten Wirt geeignet sind. Sowohl eukaryontische als auch prokaryontische Wirtssysteme werden gegenwärtig zur Bildung rekombinanter Polypeptide verwendet, und eine Zusammenfassung einiger der üblicheren Kontrollsysteme und Wirtszell-Linien ist in dem nachstehenden Abschnitt III.A. angegeben. Das Polypeptid wird dann aus den lysierten Zellen oder aus dem Kulturmedium isoliert und bis zum gewünschten Grad, der für dessen Verwendung benötigt wird, gereinigt. Die Reinigung kann nach Techniken, die auf dem Fachgebiet bekannt sind, beispielsweise Salzfractionierung, Chromatographie an Ionenaustauscherharzen,

Affinitätschromatographie, Zentrifugation und dgl. durchgeführt werden. Vergleiche beispielsweise Methods in Enzymology bzgl. einer Vielzahl von Verfahren zur Reinigung von Proteinen. Solche Polypeptide können als Diagnostika verwendet werden, oder solche, die die Bildung neutralisierender Antikörper hervorrufen, können in Impfstoffe formuliert werden. Antikörper gegen diese Polypeptide können auch als Diagnostika oder zur passiven Immuntherapie verwendet werden. Zusätzlich, wie in dem nachstehenden Abschnitt II.J. diskutiert, sind Antikörper gegen diese Polypeptide nützlich, um HCV-Teilchen zu isolieren und zu identifizieren.

[0144] Die HCV-Antigene können auch aus HCV-Virionen isoliert werden. Die Virionen können in HCV-infizierten Zellen in Gewebeskultur oder in einem infizierten Wirt gezüchtet werden.

II.C Herstellung von antigenen Polypeptiden und Konjugation mit einem Träger

[0145] Ein antigener Bereich eines Polypeptids ist allgemein relativ schmal – typischerweise weist er eine Länge von 8 bis 10 Aminosäuren oder weniger auf. Fragmente von nur 5 Aminosäuren können einen antigenen Bereich charakterisieren.

[0146] Diese Segmente können Bereichen des HCV-Antigens entsprechen. Folglich können unter Verwendung von HCV-cDNAs als Basis, DNAs, die kurze Segmente der HCV-Polypeptide codieren, rekombinant entweder als Fusionsproteine oder als isolierte Polypeptide exprimiert werden. Zusätzlich können kurze Aminosäuresequenzen bequem durch chemische Synthese erhalten werden. In Fällen, in denen das synthetisierte Polypeptid die korrekte Konfiguration hat, so daß es das korrekte Epitop ergibt, aber zu klein ist, um immunogen zu sein, kann das Polypeptid an einen geeigneten Träger geknüpft werden.

[0147] Eine Anzahl von Techniken zum Erhalt solcher Verknüpfungen sind auf dem Fachgebiet bekannt und umfassen die Bildung von Disulfidbindungen unter Verwendung von N-Succinimidyl-3-(2-pyridylthio)propionat (SPDP) und Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexan-1-carboxylat (SMCC), erhalten von Pierce Company, Rockford, Illinois, (wenn dem Peptid eine Sulfhydrylgruppe fehlt, kann diese durch Hinzufügen eines Cysteinrests bereitgestellt werden.) Diese Reagenzien erzeugen eine Disulfidbindung zwischen ihnen selbst und den Cysteinresten des Peptids auf einem Protein und eine Amidbindung über die ϵ -Aminogruppe auf einem Lysin oder andere freie Aminogruppen in dem anderen Protein. Eine Vielzahl von solchen disulfid/amid-bildenden Mitteln sind bekannt. Vergleiche beispielsweise Immun. Rev. (1982) 62:185. Andere bifunktionelle Kopplungsmittel bilden einen Thioether anstelle einer Disulfidbindung. Viele dieser thioetherbildenden Mittel sind im Handel erhältlich und umfassen reaktive Ester von 6-Maleimidocaprinsäure, 2-Bromessigsäure, 2-Iodessigsäure, 4-(N-Maleimidomethyl)cyclohexan-1-carbonsäure und dgl. Die Carboxylgruppen können durch ihre Kombination mit Succinimid oder dem Natriumsalz von 1-Hydroxyl-2-nitro-4-sulfonsäure aktiviert werden. Die vorstehende Liste soll nicht vollständig sein, und Modifikationen der genannten Verbindungen können natürlich verwendet werden.

[0148] Jeder beliebige Träger kann verwendet werden, der seinerseits keine Produktion von Antikörpern induziert, die für den Wirt schädlich sind. Geeignete Träger sind typischerweise große, langsam metabolisierte Makromoleküle, wie Proteine, Polysaccharide, wie Latex-funktionalisierte Sepharose, Agarose, Cellulose, Cellulosekügelchen und dgl., polymere Aminosäuren, wie Polyglutaminsäure, Polylysin und dgl., Aminosäurecopolymere und inaktive Virusteilchen, vergleiche beispielsweise Abschnitt II.D. Besonders nützliche Proteinsubstrate sind Serumalbumine, Napfschneckenhäemocyanin, Immunglobulinmoleküle, Thyroglobulin, Ovalbumin, Tetanustoxoid und andere Proteine, die einem Fachmann gut bekannt sind.

II.D Herstellung von hybriden teilchenförmigen Immunogenen, die HCV-Epitope enthalten

[0149] Die Immunogenität der HCV-Epitope kann auch durch ihre Herstellung in Säuger- oder Hefesystemen verstärkt werden, die mit teilchenbildenden Proteinen fusioniert oder zusammengebaut sind, wie beispielsweise diejenigen, die mit dem Hepatitis B-Oberflächenantigen assoziiert sind. Konstruktionen, in denen das NAN-BV-Epitop direkt an die das teilchenbildende Protein codierenden Sequenzen gebunden ist, erzeugen Hybride, die bezüglich des HCV-Epitops immunogen sind. Zusätzlich umfassen alle hergestellten Vektoren Epitope, die für HBV spezifisch sind und verschiedene Immunogenitätsgrade besitzen, wie beispielsweise das Prä-S-Peptid. So sind Teilchen, die aus dem teilchenbildenden Protein, das HCV-Sequenzen umfaßt, konstruiert wurden, hinsichtlich HCV und HBV immunogen.

[0150] Es wurde gezeigt, daß das Hepatitis-Oberflächenantigen (HBSAg) in *S. cerevisiae* (Valenzuela et al., 1982) sowie beispielsweise auch in Säugerzellen (Valenzuela, P., et al. (1984)) gebildet und zu Teilchen zusammengebaut wird. Es wurde gezeigt, daß die Bildung solcher Teilchen die Immunogenität der Monomereinheit verstärkt. Die Konstruktionen können auch das immundominante Epitop von HBSAg mit den 55 Aminosäuren des "Präsurface" (Pre-S)-Bereichs (Neurath et al. (1984)) umfassen. Konstruktionen des Prä-S-HBSAg-Teilchens, das in Hefe exprimierbar ist, sind in der EP-A 174 444, veröffentlicht am 19. März 1986, beschrieben. Hybride, umfassend heterologe virale Sequenzen zur Expression in Hefe, sind in der EP-A 175 261, veröffentlicht am 26. März 1986, beschrieben. Beide Anmeldungen sind auf den vorliegenden Anmel-

der übertragen und auf sie wird hiermit Bezug genommen. Diese Konstruktionen können auch in Säugerzellen, wie Ovarzellen des chinesischen Hamsters (CHO), unter Verwendung eines SV40-Dihydrofolat-Reduktase-vektors (Michelle et al. (1984)) exprimiert werden.

[0151] Zusätzlich können Teile der codierenden Sequenz des teilchenbildenden Proteins durch Codons, die ein HCV-Epitop codieren, ausgetauscht werden. Bei diesem Austausch können Bereiche, die zur Vermittlung der Aggregation der Einheiten zur Bildung immunogener Teilchen in Hefe oder Säugern nicht benötigt werden, deletiert werden, wodurch zusätzliche antigene HBV-Stellen als Konkurrenz zu dem HCV-Epitop eliminiert werden.

II.E. Herstellung von Impfstoffen

[0152] Impfstoffe können aus einem oder mehreren immunogenen Polypeptiden, abgeleitet von der HCV-cDNA sowie von den cDNA-Sequenzen in den **Fig. 1** bis 32 oder dem HCV-Genom, dem sie entsprechen, hergestellt werden. Die beobachtete Homologie zwischen HCV und den Flaviviren liefert die Information über die Polypeptide, die wahrscheinlich als Impfstoffe am meisten wirksam sind, sowie über die Bereiche, des Genoms, von denen sie codiert werden. Die allgemeine Struktur des Flavivirus-Genoms ist in Rice et al. (1986) diskutiert. Man nimmt an, daß die genomische RNA des Flavivirus die einzige viruspezifische mRNA-Art ist, und in die drei viralen Strukturproteine, nämlich C, M und E, ebenso wie in zwei große Nicht-Strukturproteine, NV4 und NV5, und ein komplexes Set kleinerer Nicht-Strukturproteine translatiert wird. Es ist bekannt, daß die hauptsächlich neutralisierenden Epitope für Flaviviren in dem E (Envelope)-Protein (Roehrig (1986)) vorhanden sind. Das entsprechende HCV-E-Gen und der das Polypeptid codierende Bereich können auf der Basis der Homologie zu den Flaviviren vorhergesagt werden. So können die Impfstoffe aus rekombinanten Polypeptiden, die HCV-E-Epitope enthalten, zusammengesetzt sein. Diese Polypeptide können in Bakterien, Hefen oder Säugerzellen exprimiert werden, oder können alternativ aus viralen Präparaten isoliert werden. Man nimmt auch an, daß die anderen Strukturproteine auch Epitope enthalten können, die die Bildung schützender Anti-HCV-Antikörper hervorrufen. So können Polypeptide, die die Epitope von E, C und M enthalten, entweder einzeln oder in Kombination in HCV-Impfstoffen verwendet werden.

[0153] Zusätzlich zu den vorstehenden Ausführungen wurde gezeigt, daß die Immunisierung mit NS1 (Nicht-Strukturprotein 1) zum Schutz gegen Gelbfieber (Schlesinger et al. (1986)) führt. Dies trifft zu, selbst wenn die Immunisierung nicht zu neutralisierenden Antikörpern führt. So ist es wahrscheinlich, insbesondere da dieses Protein unter den Flaviviren stark konserviert zu sein scheint, daß HCV-NS1 auch gegen HCV-Infektionen schützt. Ferner wird auch gezeigt, daß Nicht-Strukturproteine einen Schutz gegen virale Pathogenität gewährleisten, selbst wenn sie nicht die Produktion neutralisierender Antikörper hervorrufen.

[0154] Angesichts der vorstehenden Ausführungen können multivalente Impfstoffe gegen HCV aus einem oder mehreren Strukturproteinen und/oder einem oder mehreren Nicht-Strukturproteinen bestehen. Diese Impfstoffe können beispielsweise aus rekombinanten HCV-Polypeptiden und/oder Polypeptiden, die aus den Virionen isoliert wurden, bestehen. Zusätzlich kann es möglich sein, inaktiviertes HCV in Impfstoffen zu verwenden. Die Inaktivierung kann durch die Herstellung von viralen Lysaten oder durch andere Mittel durchgeführt werden, von denen auf dem Fachgebiet bekannt ist, daß sie die Inaktivierung von Flaviviren hervorrufen, beispielsweise Behandlung mit organischen Lösungsmitteln oder Detergentien oder Behandlung mit Formalin. Ferner können die Impfstoffe auch aus attenuierten HCV-Stämmen hergestellt werden. Die Herstellung von attenuierten HCV-Stämmen ist nachstehend beschrieben.

[0155] Es ist bekannt, daß einige der Proteine in Flaviviren stark konservierte Bereiche enthalten, und so wird eine gewisse immunologische Kreuzreaktivität zwischen HCV und anderen Flaviviren erwartet. Es ist möglich, daß gemeinsame Epitope zwischen den Flaviviren und HCV die Bildung schützender Antikörper gegen eine oder mehrere der Störungen, die von diesen pathogenen Erregern hervorgerufen werden, hervorruft. So kann es möglich sein, Mehrzweckimpfstoffe auf der Grundlage dieses Wissens zu entwickeln.

[0156] Die Herstellung von Impfstoffen, die ein immunogene(s) Polypeptid(e) als Wirkstoff enthalten, ist einem Fachmann bekannt. Typischerweise werden solche Impfstoffe in injizierbarer Form, entweder als flüssige Lösungen oder Suspensionen, hergestellt. Feste Formen, die zur Auflösung oder Suspension in einer Flüssigkeit vor der Injektion geeignet sind, können auch hergestellt werden. Das Präparat kann auch emulgiert sein, oder das Protein kann in Liposome verkapselt sein. Die aktiven immunogenen Inhaltsstoffe werden oft mit Excipienten vermischt, die pharmazeutisch verträglich und mit dem Wirkstoff kompatibel sind. Geeignete Excipienten sind beispielsweise Wasser, Kochsalzlösung, Dextrose, Glycerin, Ethanol oder dgl. und Kombinationen davon. Zusätzlich kann der Impfstoff ggf. geringe Mengen an Hilfssubstanzen enthalten, wie Benetzung- oder Emulgiermittel, pH-Puffermittel und/oder Adjuvantien, die die Effektivität des Impfstoffs erhöhen. Beispiele für Adjuvantien, die effektiv sein können, umfassen ohne Beschränkung: Aluminiumhydroxid, N-Acetylmuramyl-L-threonyl-D-isoglutamin (thr-MDP), N-Acetyl-normuramyl-L-alanyl-D-isoglutamin (CGP 11537, bezeichnet als nor-MDP), N-Acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-L-alanin-2-(1'-2'-dipalmitoyl-sn-glycero-3-hydroxyphosphoryl-xy)ethylamin (CGP 19835A, bezeichnet als MTP-PE) und RIBI, das drei Komponenten, die aus

Bakterien extrahiert wurden, Monophosphoryllipid A, Trehalosedimycolat und Zellwandgerüst (MPL+TDM+CWS) in einer 2%igen Squalen/Tween 80-Emulsion enthält. Die Effektivität eines Adjuvans kann durch Messung der Menge der Antikörper gegen ein immunogenes Polypeptid, das eine antigene HCV-Sequenz enthält, nach Verabreichung dieses Polypeptids in Impfstoffen, die auch aus den verschiedenen Adjuvantien bestehen, bestimmt werden.

[0157] Die Impfstoffe werden üblicherweise parenteral, durch Injektion, beispielsweise entweder subkutan oder intramuskulär, verabreicht. Zusätzliche Formulierungen, die für andere Verabreichungswege geeignet sind, umfassen Suppositorien und in einigen Fällen orale Formulierungen. Für Suppositorien können traditionelle Bindemittel und Träger beispielsweise Polyalkylenglycole oder Triglyceride umfassen. Solche Suppositorien können aus Gemischen gebildet werden, die den Wirkstoff im Bereich von 0,5 bis 10%, bevorzugt 1% bis 2%, enthalten. Orale Formulierungen umfassen solche normalerweise verwendeten Excipientien, wie beispielsweise pharmazeutische Reinheitsgrade von Mannit, Lactose, Stärke, Magnesiumstearat, Natrium-Saccharin, Cellulose, Magnesiumcarbonat und dgl. Diese Zusammensetzungen besitzen die Form von Lösungen, Suspensionen, Tabletten, Pillen, Kapseln, Formulierungen mit verzögerter Freigabe oder Pulver und enthalten 10% bis 95%, bevorzugt 25% bis 70% Wirkstoff.

[0158] Die Proteine können in den Impfstoff als Neutralstoff oder in Salzformen formuliert werden. Pharmazeutisch verträgliche Salze umfassen die Säureadditionssalze (gebildet mit freien Aminogruppen des Peptids), die mit anorganischen Säuren, wie beispielsweise Salzsäure oder Phosphorsäure oder solchen organischen Säuren, wie Essigsäure, Oxalsäure, Weinsäure, Maleinsäure und dgl. gebildet wurden. Salze, die mit den freien Carboxylgruppen gebildet wurden, können auch von anorganischen Basen, wie beispielsweise Natrium-, Kalium-, Ammonium-, Calcium- oder Eisen(III)-hydroxiden, und solchen organischen Basen, wie Isopropylamin, Trimethylamin, 2-Ethylaminoethanol, Histidin, Procain und dgl. abgeleitet sein.

II.F. Dosierung und Verabreichung der Impfstoffe

[0159] Die Impfstoffe werden in einer Weise verabreicht, die mit der Dosisformulierung kompatibel ist und in einer solchen Menge, die prophylaktisch und/oder therapeutisch effektiv ist. Die zu verabreichende Menge, die im allgemeinen im Bereich von 5 µg bis 250 µg des Antigens pro Dosis liegt, hängt von dem zu behandelnden Patienten, der Fähigkeit des Immunsystems des Patienten, Antikörper zu synthetisieren, und von dem gewünschten Schutzgrad ab. Präzise Mengen des Wirkstoffs, die verabreicht werden müssen, können von dem Urteil des praktischen Arztes abhängen und können für jeden Patienten eigentümlich sein.

[0160] Der Impfstoff kann in einem Einzeldosisdosierschema oder bevorzugt in einem Mehrfachdosisdosierschema verabreicht werden. Ein Mehrfachdosisdosierschema ist eines, in dem ein erster Impfyklus 1 bis 10 separate Dosen umfassen kann, an den sich andere Dosen anschließen, die später in den Zeitintervallen verabreicht werden, die benötigt werden, um die Immunantwort aufrechtzuerhalten oder zu verstärken, beispielsweise 1 bis 4 Monate für eine zweite Dosis, und ggf. eine oder mehrere weitere Dosen nach einigen Monaten. Das Dosierschema wird auch zumindest teilweise von den Bedürfnissen des Individuums bestimmt und hängt von dem Urteil des praktischen Arztes ab.

[0161] Zusätzlich kann der Impfstoff, der das immunogene HCV-Antigen bzw. -Antigene enthält, zusammen mit anderen immunregulatorischen Mitteln, beispielsweise Immunglobulinen, verabreicht werden.

II.G. Herstellung von Antikörpern gegen HCV-Epitope

[0162] Die immunogenen Polypeptide, die, wie vorstehend beschrieben, hergestellt wurden, werden verwendet, um sowohl polyclonale als auch monoclonale Antikörper zu produzieren. Wenn polyclonale Antikörper gewünscht werden, wird ein ausgewähltes Säugetier (z.B. Maus, Kaninchen, Ziege, Pferd etc.) mit einem immunogenen Polypeptid, das ein HCV-Epitop bzw. -Epitope trägt, immunisiert. Das Serum aus dem immunisierten Tier wird gewonnen und nach bekannten Verfahren behandelt. Wenn das Serum, das polyclonale Antikörper gegen ein HCV-Epitop enthält, Antikörper gegen andere Antigene enthält, können die polyclonalen Antikörper mittels Immunaффinitätschromatographie gereinigt werden. Techniken zur Erzeugung und Verarbeitung polyclonaler Antisera sind auf dem Fachgebiet bekannt, vgl. beispielsweise Mayer und Walker (1987).

[0163] Alternativ können die polyclonalen Antikörper aus einem Säugetier, das zuvor mit HCV infiziert worden war, isoliert werden. Ein Beispiel für ein Verfahren zur Reinigung von Antikörpern gegen HCV-Epitope aus dem Serum eines infizierten Individuums auf der Basis einer Affinitätschromatographie und unter Verwendung eines Fusionspolypeptids von SOD und einem Polypeptid, das von dem cDNA-Clon 5-1-1 codiert wird, ist in Abschnitt V.E. dargestellt.

[0164] Monoclonale Antikörper gegen HCV-Epitope können auch leicht vor einem Fachmann erzeugt werden. Das allgemeine Verfahren zur Erzeugung monoclonaler Antikörper mittels Hybridome ist gut bekannt. Unsterbliche antikörperproduzierende Zell-Linien können durch Zellfusion geschaffen werden und auch durch andere Techniken, wie direkte Transformation von B-Lymphocyten mit oncogener DNA oder Transfektion mit dem Ep-

stein-Barr-Virus. Vergleiche beispielsweise M. Schreier et al. (1980), Hammerling et al. (1981), Kennett et al. (1980), vergleiche auch US-Patente Nrn. 4 341 761, 4 399 121, 4 427 783, 4 444 887, 4 466 917, 4 472 500, 4 491 632 und 4 493 890. Gruppen von monoklonalen Antikörpern, die gegen HCV-Epitope produziert wurden, können auf verschiedene Eigenschaften abgesucht werden, beispielsweise den Isotyp, die Epitopaffinität etc. [0165] Sowohl monoklonale als auch polyclonale Antikörper, die gegen HCV-Epitope gerichtet sind, sind besonders nützlich zur Diagnose und solche, die neutralisierende Antikörper sind, sind nützlich für die passive Immuntherapie. Monoklonale Antikörper insbesondere können verwendet werden, um die Bildung von Anti-Idiotyp-Antikörpern hervorzurufen.

[0166] Anti-Idiotyp-Antikörper sind Immunglobuline, die ein "internes Bild" des Antigens des infektiösen Erregers, gegen den Schutz gewünscht wird, tragen. Vergleiche beispielsweise Nisonoff, A., et al. (1981) und Dreesman et al. (1985).

[0167] Techniken zur Erzeugung von Anti-Idiotyp-Antikörpern sind auf dem Fachgebiet bekannt. Vergleiche beispielsweise Grzych (1985), MacNamara et al. (1984) und Uytdehaag et al. (1985). Diese Anti-Idiotyp-Antikörper können auch zur Behandlung von NANBH ebenso wie zur Aufklärung der immunogenen Bereiche der HCV-Antigene nützlich sein.

II.H. Diagnostische Oligonucleotidsonden und Kits

[0168] Unter Verwendung der offenbaren Teile der isolierten HCV-cDNAs als Basis, einschließlich derer in den **Fig. 1** bis 32, können Oligomere von etwa 8 Nucleotiden oder mehr entweder durch Excision oder synthetisch hergestellt werden, die mit dem HCV-Genom hybridisieren und die zur Identifizierung des viralen Erregers bzw. der viralen Erreger, der weiteren Charakterisierung des viralen Genoms bzw. der viralen Genome ebenso wie zum Nachweis des Virus bzw. der Viren in erkrankten Individuen nützlich sind. Diese Sonden für HCV-Polynucleotide (natürlich oder abgeleitet) besitzen eine Länge, die den Nachweis einzigartiger viraler Sequenzen durch Hybridisierung gestattet. Während 8 bis 12 Nucleotide eine Länge ist, mit der man arbeiten kann, sind Sequenzen von 10 bis 20 Nucleotiden bevorzugt und etwa 20 Nucleotide erscheinen optimal. Bevorzugt sind diese Sequenzen von Bereichen abgeleitet, denen Heterogenität fehlt. Diese Sonden können unter Verwendung von Routineverfahren, einschließlich automatisierter Oligonucleotid-Syntheseverfahren, hergestellt werden. Unter den nützlichen Sonden sind beispielsweise der Clon 5-1-1 und die weiteren hier beschriebenen Clone, ebenso wie die verschiedenen Oligomeren, die zum Absuchen der cDNA-Banken, wie nachstehend beschrieben, nützlich sind. Eine Komplementärsequenz zu jedem einzigen Teil des HCV-Genoms ist ausreichend. Zur Verwendung als Sonden ist vollständige Komplementarität wünschenswert, obwohl sie überflüssig werden kann, wenn die Länge des Fragments erhöht wird.

[0169] Zur Verwendung solcher Sonden als Diagnostika wird die biologische Probe, die analysiert werden soll, wie Blut oder Serum, ggf. behandelt, um die darin enthaltenen Nucleinsäuren zu extrahieren. Die so erhaltene Nucleinsäure aus der Probe kann einer Gelelektrophorese oder anderen Techniken zur Trennung nach Größe unterworfen werden. Alternativ kann die Nucleinsäureprobe ohne Größentrennung dot-geblottet werden. Die Sonden werden dann markiert. Geeignete Marken und Verfahren zur Markierung der Sonden sind auf dem Fachgebiet bekannt und umfassen beispielsweise radioaktive Marker, die durch Nick-Translation oder Kinasereaktion eingebracht wurden, Biotin, fluoreszierende Sonden und chemilumineszierende Sonden. Die aus der Probe extrahierten Nucleinsäuren werden dann mit der markierten Sonde unter Hybridisierungsbedingungen mit geeigneter Stringenz behandelt.

[0170] Die Sonde kann vollständig komplementär zu dem HCV-Genom gemacht werden. Daher sind üblicherweise hochstringente Bedingungen zweckmäßig, um falsch-positive zu verhindern. Jedoch sollten Bedingungen mit hoher Stringenz nur verwendet werden, wenn die Sonden zu Bereichen des viralen Genoms, denen Heterogenität fehlt, komplementär sind. Die Hybridisierungsstringenz wird durch eine Anzahl von Faktoren während der Hybridisierung und während des Waschverfahrens bestimmt, welche Temperatur, Ionenstärke, Zeitdauer und Konzentration an Formamid einschließen. Diese Faktoren sind beispielsweise in Maniatis, T. (1982) beschrieben.

[0171] Im allgemeinen nimmt man an, daß die HCV-Genom-Sequenzen im Serum infizierter Individuen in relativ niedrigen Gehalten, d.h. etwa 102 bis 103 Sequenzen pro ml, vorhanden sind. Dieser Gehalt kann die Verwendung von Amplifikationstechniken in den Hybridisierungstests erforderlich machen. Solche Techniken sind auf dem Fachgebiet bekannt. Beispielsweise wird bei dem "Bio-Bridge"-System der Enzo Biochemical Corporation terminale Desoxynucleotidtransferase verwendet, um nichtmodifizierte 3'-Poly-dT-Schwänze an die DNA-Sonde anzufügen. Die Sonde mit dem Poly-dT-Schwanz wird mit der Ziel-Nucleotidsequenz und dann mit einem biotinmodifizierten Poly-A hybridisiert. Die PCT-Anmeldung 84/03520 und die EP-A-124221 beschreiben einen DNA-Hybridisierungstest, worin: (1) der Analyt an eine einzelsträngige DNA-Sonde, die zu einem enzymmarkierten Oligonucleotid komplementär ist, aneliert wird; und (2) der so erhaltene maßgeschneiderte Doppelstrang mit einem enzymmarkierten Oligonucleotid hybridisiert wird. Die EP-A-204510 beschreibt einen DNA-Hybridisierungstest, bei dem die Analyt-DNA mit einer Sonde, die einen Schwanz besitzt, z.B. ei-

nen Poly-dT-Schwanz, einem Amplifizierungsstrang, der eine Sequenz besitzt, die mit dem Schwanz der Sonde hybridisiert, wie eine Poly-A-Sequenz, und die eine Vielzahl markierter Stränge binden kann, in Kontakt gebracht wird. Gemäß einer besonders zweckmäßigen Technik kann man zuerst die Ziel-HCV-Sequenzen in Serien etwa 10000-fach, d.h. auf etwa 10^6 Sequenzen/ml, amplifizieren. Dies kann beispielsweise nach der Technik von Saiki et al. (1986) durchgeführt werden. Die amplifizierte(n) Sequenz(en) kann/können dann unter Verwendung eines Hybridisierungstests nachgewiesen werden. Ein geeigneter Lösungsphasen-Sandwich-Assay, der mit markierten Polynucleotidsonden verwendet werden kann, und die Verfahren zur Herstellung der Sonden sind in der EP-A 225 807, veröffentlicht am 16. Juni 1987, beschrieben, die auf den hier benannten Anmelder übertragen wurde und auf die hiermit Bezug genommen wird.

[0172] Die Sonden können in diagnostische Kits gepackt werden. Diagnostische Kits umfassen die DNA-Sonde, die markiert sein kann. Alternativ kann die DNA-Sonde unmarkiert sein, und die Bestandteile zur Markierung können in dem Kit enthalten sein. Das Kit kann auch andere geeignet verpackte Reagenzien und Materialien enthalten, die für das spezielle Hybridisierungsprotokoll benötigt werden, beispielsweise Standards, sowie Instruktionen zur Durchführung des Tests.

II.I. Immunoassay und Diagnostikkits

[0173] Sowohl die Polypeptide, die immunologisch mit Serum reagieren, das HCV-Antikörper enthält, beispielsweise diejenigen, die sich von den in Abschnitt IV.A. beschriebenen Clonen ableiten oder davon codiert werden, und zusammengesetzte Produkte davon (vgl. Abschnitt IV.A.), als auch die Antikörper, die gegen die HCV-spezifischen Epitope in diesen Polypeptiden erzeugt wurden (vergleiche beispielsweise Abschnitt IV.E.), sind in Immunoassays zum Nachweis des Vorhandenseins von HCV-Antikörpern oder des Vorhandenseins des Virus und/oder viraler Antigene in biologischen Proben, einschließlich beispielsweise Blut- oder Serumproben, nützlich. Die Entwicklung von Immunoassays unterliegt großen Variationen, und eine Vielzahl davon ist auf dem Fachgebiet bekannt. Beispielsweise kann bei dem Immunoassay ein virales Antigen verwendet werden, beispielsweise ein Polypeptid, abgeleitet von irgendeinem der Clone, der die HCV-cDNA enthält, wie in Abschnitt IV.A. beschrieben, oder von den zusammengesetzten cDNAs, abgeleitet von den cDNAs in diesen Clonen, oder von, dem HCV-Genom, von dem die cDNA in diesen Clonen abgeleitet ist. Alternativ kann bei dem Immunoassay eine Kombination von viralen Antigenen verwendet werden, die von diesen Quellen stammen. Beispielsweise können ein monoklonaler Antikörper gegen ein virales Epitop bzw. virale Epitope, eine Kombination von monoklonalen Antikörpern gegen ein virales Antigen, monoklonale Antikörper gegen verschiedene virale Antigene, polyclonale Antikörper gegen das gleiche virale Antigen oder polyclonale Antikörper gegen verschiedene virale Antigene verwendet werden. Die Reaktionsabläufe können beispielsweise auf Konkurrenz, einer direkten Reaktion oder Tests vom Sandwich-Typ beruhen. Die Reaktionsabläufe können beispielsweise auch die Verwendung von festen Trägern oder eine Immunpräzipitation vorsehen. Bei den meisten Tests wird ein markierter Antikörper oder Polypeptid verwendet. Die Marker können beispielsweise fluoreszierende, chemilumineszierende, radioaktive oder Farbmoleküle sein. Tests, die die Signale von der Sonde amplifizieren, sind auch bekannt. Beispiele dafür sind Tests, bei denen Biotin und Avidin verwendet werden und enzym-markierte und -vermittelte Immunoassays, wie ELISA-Tests.

[0174] Das Flavivirus-Modell für HCV ermöglicht Vorhersagen hinsichtlich der wahrscheinlichen Lokalisation diagnostischer Epitope für die Strukturproteine des Virions. Die C-, Prä-M-, M- und E-Domänen enthalten wahrscheinlich alle Epitope mit signifikantem Potential zum Nachweis viraler Antigene und insbesondere für die Diagnose. Man vermutet, daß die Domänen der Nicht-Strukturproteine in ähnlicher Weise wichtige diagnostische Epitope (z.B. NS5, das eine vermutliche Polymerase codiert, und NS1, das ein vermutliches komplement-bindendes Antigen codiert) enthalten. Die rekombinanten Polypeptide oder die viralen Polypeptide, die Epitope von diesen spezifischen Domänen umfassen, können für den Nachweis viraler Antikörper in infektiösen Blutspendern und infizierten Patienten nützlich sein.

[0175] Zusätzlich können Antikörper gegen die E- und/oder M-Proteine in Immunoassays zum Nachweis viraler Antigene in Patienten mit durch HCV hervorgerufener NANBH und in infektiösen Blutspendern verwendet werden. Ferner sind diese Antikörper extrem nützlich, um Spender und Patienten in der akuten Phase nachzuweisen.

[0176] Kits, die für die Immundiagnose geeignet sind und die geeignet markierte Reagentien enthalten, werden durch Verpackung der geeigneten Materialien, einschließlich der erfindungsgemäßen Polypeptide, die die HCV-Epitope oder Antikörper gegen die HCV-Epitope enthalten, in geeigneten Containern zusammen mit den restlichen Reagentien und Materialien, die zur Durchführung des Tests benötigt werden, ebenso wie einem geeigneten Satz von Testanleitungen hergestellt.

II.J. Weitere Charakterisierung des HCV-Genoms der Visionen und der viralen Antigene unter Verwendung von Sonden, die von der cDNA für das virale Genom abgeleitet sind

[0177] Die HCV-cDNA-Sequenzinformation in den in Abschnitt IV.A. beschriebenen Clonen ist in den **Fig. 1** bis 32 einschließlich gezeigt und kann verwendet werden, um weitere Informationen zur Sequenz des HCV-Genoms zu gewinnen, und zur Identifizierung und Isolierung des HCV-Erregers, und unterstützt so dessen Charakterisierung einschließlich der Natur des Genoms, der Struktur des viralen Teilchens und der Natur des Antigens, aus dem es besteht. Diese Information ihrerseits kann zu zusätzlichen Polynucleotidsonden, vom HCV-Genom abgeleiteten Polypeptiden und Antikörpern gegen die HCV-Epitope führen, die zur Diagnose und/oder Behandlung von HCV-verursachter NANBH nützlich sein würde.

[0178] Die cDNA-Sequenzinformation in den vorstehend erwähnten Clonen ist nützlich zur Entwicklung von Sonden zur Isolierung weiterer cDNA-Sequenzen, die von noch undefinierten Bereichen des (der) HCV-Genoms(e) abgeleitet sind, von denen die cDNAs in den in Abschnitt IV.A beschriebenen Clonen abgeleitet sind. Beispielsweise können markierte Sonden, die eine Sequenz von etwa 8 oder mehr Nucleotiden und bevorzugt 20 oder mehr Nucleotiden enthalten, die von Bereichen in der Nähe der 5'-Termini oder 3'-Termini der Familie der HCV-cDNA-Sequenzen abgeleitet sind, die in den **Fig. 1, 3, 6, 9, 14** und 32 gezeigt sind, zur Isolierung von überlappenden cDNA-Sequenzen aus den HCV-cDNA-Banken verwendet werden. Diese Sequenzen, die mit den cDNAs in den vorstehend erwähnten Clonen überlappen, aber die auch Sequenzen enthalten, die abgeleitet sind von Bereichen des Genoms, von denen die cDNA in den vorstehend erwähnten Clonen nicht abgeleitet ist, können dann verwendet werden, um Sonden zur Identifizierung anderer überlappender Fragmente, die nicht notwendigerweise mit den cDNAs in den in Abschnitt IV.A. beschriebenen Clonen überlappen, zu synthetisieren. Außer das HCV-Genom ist segmentiert und den Segmenten fehlen gemeinsame Sequenzen, ist es möglich, das (die) vollständige(n) virale(n) Genom(e) unter Verwendung der Technik der Isolierung überlappender cDNAs, die von dem (den) viralen Genom(en) stammen, zu sequenzieren. Obwohl dies unwahrscheinlich ist, können, wenn das Genom ein segmentiertes Genom ist, dem gemeinsame Sequenzen fehlen, die Sequenzen des Genoms durch serologisches Absuchen der λ -gt11-HCV-cDNA-Banken, die zur Isolierung des Clons 5-1-1 verwendet wurden, Sequenzieren der cDNA-Isolate und Verwendung der isolierten cDNAs zur Isolierung überlappender Fragmente, bestimmt werden, wobei die zur Isolierung und Sequenzierung der in Abschnitt IV.A. beschriebenen Clone beschriebenen Techniken verwendet werden. Alternativ kann die Charakterisierung der genomischen Segmente aus dem (den) viralen Genom(en), das (die) aus gereinigten HCV-Teilchen isoliert wurde (wurden), durchgeführt werden. Verfahren zur Reinigung der HCV-Teilchen und zu ihrem Nachweis während des Reinigungsverfahrens sind nachstehend beschrieben. Verfahren zur Isolierung von Polynucleotidgenomen aus viralen Teilchen sind auf dem Fachgebiet bekannt, und ein Verfahren, das verwendet werden kann, ist in Beispiel IV.A.1 gezeigt. Die isolierten genomischen Segmente könnten dann gecclont und sequenziert werden. So ist es anhand der hier angegebenen Information möglich, das (die) HCV-Genom(e) unabhängig von ihrer Art zu klonieren und zu sequenzieren.

[0179] Verfahren zur Konstruktion von cDNA-Banken sind auf dem Fachgebiet bekannt und sind vorstehend und nachstehend diskutiert. Ein Verfahren zur Konstruktion von HCV-cDNA-Banken in λ -gt11 ist nachstehend in Absatz IV.A. diskutiert.

[0180] Jedoch können die cDNA-Banken, die zum Absuchen mit Nucleinsäuresonden nützlich sind, auch in anderen auf dem Fachgebiet bekannten Vektoren konstruiert werden, beispielsweise λ -gt10 (Huynh et al. (1985)). Die von HCV abgeleitete cDNA, die mit den Sonden nachgewiesen werden, die von den cDNAs in **Fig. 1** bis 32 abgeleitet sind und von den Sonden, die ausgehend von Polynucleotiden, die von diesen cDNAs abgeleitet sind, synthetisiert wurden, können aus dem Clon durch Spaltung des isolierten Polynucleotids mit dem (den) geeigneten Restriktionsenzym(en) isoliert und sequenziert werden. Vergleiche beispielsweise Abschnitt IV.A.3. und IV.A.4. bezüglich der Techniken, die zur Isolierung und Sequenzierung der HCV-cDNA, die mit der HCV-cDNA in Clon 5-1-1 überlappt, verwendet wurden, die Abschnitte IV.A.5 bis IV.A.7 bezüglich der Isolierung und Sequenzierung der HCV-cDNA, die mit der in Clon 81 überlappt, und Abschnitt IV.A.8 und IV.A.9 zur Isolierung und Sequenzierung eines Clons, der mit einem weiteren Clon (Clon 36) überlappt, der mit Clon 81 überlappt.

[0181] Die von diesen überlappenden HCV-cDNAs abgeleitete Sequenzinformation ist nützlich, um Bereiche mit Homologie und Heterogenität innerhalb des viralen Genoms bzw. der viralen Genome zu bestimmen, die das Vorhandensein verschiedener Stämme des Genoms und/oder Populationen defekter Teilchen anzeigen könnten. Es ist auch zur Entwicklung von Hybridisierungssonden nützlich um HCV oder HCV-Antigene oder HCV-Nucleinsäuren in biologischen Proben und während der Isolierung von HCV (nachstehend diskutiert) nachzuweisen, wobei die in Abschnitt II.G. beschriebenen Techniken verwendet werden. Ferner können überlappende cDNAs verwendet werden, um Expressionsvektoren für Polypeptide zu erzeugen, welche von dem HCV-Genom bzw. den HCV-Genomen abgeleitet sind, das bzw. die auch die in den Clonen 5-1-1, 36, 81, 91 und 1-2 und in den anderen Clonen, die in Abschnitt IV.A. beschrieben sind, codierten Polypeptide codieren. Die Techniken zur Schaffung dieser Polypeptide, die HCV-Epitope enthalten, und von Antikörpern gegen

HCV-Epitope, die darin enthalten sind, ebenso wie ihre Verwendungen, sind analog denen, die für die Polypeptide beschrieben sind, die von NANBV-cDNA-Sequenzen stammen, die in den Clonen 5-1-1, 32, 35, 36, 1-2, 81 und 91 enthalten sind, wie vorstehend und nachstehend diskutiert.

[0182] In der Familie der cDNA-Sequenzen, die in den Clonen 5-1-1, 32, 35, 36, 81, 91, 1-2 und den anderen Clonen, die in Abschnitt IV.A. beschrieben sind, enthalten sind, wird (werden) ein Antigen (Antigene) codiert, die Epitope enthalten, die für HCV einzigartig zu sein scheinen, d.h. Antikörper gegen diese Antigene fehlen Individuen, die mit HAV oder HBV infiziert sind, und Individuen, die nicht mit HCV infiziert sind (vergleiche die in Abschnitt IV.B. angegebenen serologischen Daten). Ferner zeigt ein Vergleich der Sequenzinformation dieser cDNAs mit den Sequenzen von HAV, HBV, HDV und mit den genomischen Sequenzen in Genbank, daß eine minimale Homologie zwischen diesen cDNAs und den Polynucleotidsequenzen aus diesen Quellen vorhanden ist. So können die Antikörper gegen die Antigene, die von den cDNAs dieser Clone codiert werden, verwendet werden, um BB-NANBV-Teilchen, die aus infizierten Individuen isoliert wurden, zu identifizieren. Zusätzlich sind sie auch nützlich, um den (die) NANBH-Erreger zu isolieren.

[0183] HCV-Teilchen können aus Seren von BB-NANBV-infizierten Individuen oder aus Zellkulturen nach jedem beliebigen auf dem Fachgebiet bekannten Verfahren isoliert werden, umfassend beispielsweise Techniken auf der Basis der Unterscheidung nach Größe, wie Sedimentations- oder Ausschlußverfahren, oder Techniken auf der Basis der Dichte, wie Ultrazentrifugation in Dichtegradienten, oder Präzipitation mit Mitteln, wie Polyethylenglycol, oder Chromatographie an einer Vielzahl von Materialien, wie anionischen oder kationischen Austauschermaterialien und Materialien, die infolge der Hydrophobizität binden, ebenso wie Affinitätssäulen. Während des Isolierungsverfahrens kann das Vorhandensein des HCV durch Hybridisationsanalyse des extrahierten Genoms unter Verwendung von von HCV-cDNAs, wie vorstehend beschrieben, abgeleiteten Sonden oder mittels eines Immunoassays (vgl. Abschnitt II.I.) nachgewiesen werden, wobei als Sonde Antikörper gegen HCV-Antigene, die von der Familie der cDNA-Sequenzen codiert werden, die in den **Fig. 1** bis 32 gezeigt sind, und auch gegen HCV-Antigene, die von den überlappenden HCV-cDNA-Sequenzen, wie vorstehend diskutiert, codiert werden, verwendet werden. Die Antikörper können monoclonal oder polyclonal sein, und es kann zweckmäßig sein, die Antikörper vor ihrer Verwendung bei dem Immunoassay zu reinigen. Ein Reinigungsverfahren für polyclonale Antikörper gegen das (die) Antigen(e), das (die) von dem Clon 5-1-1 cloniert wird (werden), ist in Abschnitt IV.E. beschrieben. Analoge Reinigungsverfahren können für Antikörper gegen andere HCV-Antigene verwendet werden.

[0184] Antikörper gegen HCV-Antigene, die von der Familie der cDNAs, die in **Fig. 1** bis 32 gezeigt ist, ebenso wie die, die von den überlappenden HCV-cDNAs codiert werden, die an feste Träger fixiert sind, sind nützlich, um HCV mit Immunaффinitätschromatographie zu isolieren. Techniken für die Immunaффinitätschromatographie sind auf dem Fachgebiet bekannt und umfassen Techniken zur Fixierung von Antikörpern an feste Träger, so daß sie ihre immunselektive Aktivität beibehalten. Die Techniken können diejenigen sein, in denen die Antikörper an den Träger adsorbiert sind (vgl. beispielsweise Kurstak in *Enzyme Immunodiagnosis*, S. 31–37), ebenso wie diejenigen, bei denen die Antikörper kovalent an den Träger gebunden sind. Allgemein sind die Techniken denen ähnlich, die zur kovalenten Bindung der Antigene an einen festen Träger verwendet werden, die allgemein in Abschnitt II.C. beschrieben sind. Jedoch können Spacer-Gruppen in die bifunktionellen Koppelmittel eingeschlossen sein, so daß die Antigenbindungsstelle des Antikörpers zugänglich bleibt.

[0185] Während des Reinigungsverfahrens kann das Vorhandensein von HCV durch Nucleinsäurehybridisierung nachgewiesen und/oder bestätigt werden, wobei als Sonden Polynucleotide verwendet werden, die von der Familie der HCV-cDNA-Sequenzen, die in den **Fig. 1** bis 32 gezeigt sind, sowie von den überlappenden HCV-cDNA-Sequenzen abgeleitet sind, die vorstehend beschrieben wurden. In diesem Falle werden die Fraktionen unter Bedingungen behandelt, die das Aufbrechen der viralen Teilchen verursachen, beispielsweise mit Detergenzien in Gegenwart von chelatbildenden Mitteln, und das Vorhandensein der viralen Nucleinsäure wird durch die in Abschnitt II.H. beschriebenen Hybridisierungstechniken bestimmt. Eine weitere Bestätigung, daß die isolierten Teilchen Mittel sind, die HCV induzieren, kann erhalten werden durch Infektion von Schimpansen mit den isolierten Virusteilchen und anschließende Bestimmung, ob die Symptome von NANBH von der Infektion stammen.

[0186] Die viralen Teilchen aus den gereinigten Präparaten können dann weiter charakterisiert werden. Die genomische Nucleinsäure wurde gereinigt. Auf der Basis der Empfindlichkeit gegenüber RNase, aber nicht gegenüber DNase I, scheint es, daß das Virus aus einem RNA-Genom besteht. Vergleiche nachstehendes Beispiel IV.C.2. Die Strangform und die Zirkularität oder fehlende Zirkularität kann nach auf dem Fachgebiet bekannten Techniken, einschließlich beispielsweise deren Sichtbarmachung durch Elektronenmikroskopie, deren Wanderung in Dichtegradienten und deren Sedimentationseigenschaften, bestimmt werden. Auf der Basis der Hybridisierung des eingefangenen HCV-Genoms mit den negativen Strängen der HCV-cDNAs scheint es, daß das HCV aus einem positivsträngigen RNA-Genom besteht (vergleiche Abschnitt IV.H.I.). Derartige Techniken sind beispielsweise in *Methods in Enzymology* beschrieben. Zusätzlich kann die gereinigte Nucleinsäure nach bekannten Techniken, einschließlich reverser Transkription, da das genomische Material RNA ist, cloniert und sequenziert werden. Vergleiche beispielsweise Maniatis (1982) und Gover (1985). Unter Verwendung der

von den viralen Teilchen abgeleiteten Nucleinsäuren ist es möglich, das vollständige Genom zu sequenzieren, unabhängig davon, ob es segmentiert ist oder nicht.

[0187] Die Untersuchung der Homologie des in dem kontinuierlichen ORF der kombinierten Clon 14i bis 39c (vergleiche **Fig. 26**) codierten Polypeptids zeigt, daß das HCV-Polypeptid Bereiche enthält, die mit den entsprechenden Proteinen in konservierten Bereichen der Flaviviren homolog sind. Ein Beispiel dafür ist in Absatz IV.H.3. beschrieben. Diese Entdeckung hat viele wichtige Auswirkungen. Erstens, dieser Beweis im Zusammenhang mit den Ergebnissen, die zeigen, daß HCV ein positivsträngiges Genom enthält, dessen Größe etwa 10000 Nucleotide beträgt, entspricht dem Vorschlag, daß HCV ein Flavivirus oder ein flaviartiges Virus ist. Im allgemeinen besitzen Flavivirus-Virionen und ihre Genome eine relativ übereinstimmende Struktur und Organisation, die bekannt sind. Vergleiche Rice et al. (1986) und Brinton, M.A. (1988). So können die Strukturgene, die die Polypeptide C, Prä-M/M und E codieren, im 5'-Terminus des Genoms stromaufwärts von Clon 14i lokalisiert sein. Ferner können anhand des Vergleichs mit anderen Flaviviren Vorhersagen hinsichtlich der genauen Lokalisation der Sequenzen, die diese Proteine codieren, getroffen werden.

[0188] Die Isolierung der Sequenzen stromaufwärts derer in Clon 14i kann auf eine Vielzahl von Wegen durchgeführt werden, die anhand der hier gegebenen Information einem Fachmann offensichtlich sind. Beispielsweise kann die Genom-"Walking"-Technik verwendet werden, um andere Sequenzen, die 5' zu denen in Clon 14i sind, die aber mit diesem Clon überlappen, zu isolieren. Dies seinerseits führt zur Isolierung zusätzlicher Sequenzen. Diese Technik ist hinreichend im nachstehenden Abschnitt IV.A. dargestellt. Beispielsweise ist auch bekannt, daß die Flaviviren konservierte Epitope und Bereiche mit konservierten Nucleinsäuresequenzen besitzen. Polynucleotide, die die konservierten Sequenzen enthalten, können als Sonden, die an das HCV-Genom binden, verwendet werden, wodurch dessen Isolierung ermöglicht wird. Zusätzlich können diese konservierten Sequenzen zusammen mit denjenigen, die von den HCV-cDNAs abgeleitet sind, die in **Fig. 22** gezeigt sind, verwendet werden, um Primer zur Verwendung in Systemen herzustellen, die die Genomsequenzen stromaufwärts von denen in Clon 14i amplifizieren, wobei die Polymerasekettenreaktionstechnik verwendet wird. Ein Beispiel dafür ist nachstehend beschrieben.

[0189] Die Struktur von HCV kann ebenfalls bestimmt werden, und seine Komponenten können isoliert werden. Die Morphologie und Größe können beispielsweise elektronenmikroskopisch bestimmt werden. Die Identifizierung und Lokalisierung von spezifischen viralen Polypeptid-Antigenen, wie Hüll-Antigenen oder internen Antigenen, wie Nucleinsäurebindungsproteine, Coreantigene und Polynucleotidpolymerase(n) können ebenfalls bestimmt werden, indem man beispielsweise feststellt, ob die Antigene als Haupt- oder Nebenkomponten des Virus vorhanden sind, sowie durch Verwendung von Antikörpern, die gegen die spezifischen Antigene, die von den isolierten cDNAs codiert werden, gerichtet sind, als Sonden. Diese Information ist zur Entwicklung von Impfstoffen nützlich. Beispielsweise kann es bevorzugt sein, ein äußeres Antigen in ein Impfstoffpräparat aufzunehmen. Mehrwertige Impfstoffe können beispielsweise aus einem Polypeptid, abgeleitet vom Genom, das ein Strukturprotein, beispielsweise E, codiert, sowie einem Polypeptid aus einem anderen Teil des Genoms, beispielsweise einem Nicht-Struktur- oder Strukturpolypeptid, bestehen.

II.K. Zellkultursysteme und Tiermodellssysteme zur HCV-Replikation

[0190] Der Vorschlag, daß HCV ein Flavivirus oder ein flaviartiges Virus ist, liefert auch Informationen über Verfahren zur Züchtung von HCV. Der Ausdruck "flaviartig" bedeutet, daß das Virus eine signifikant hohe Homologie zu den bekannten konservierten Bereichen von Flaviviren zeigt, und daß der Hauptteil des Genoms ein einziges ORF ist. Verfahren zur Züchtung von Flaviviren sind einem Fachmann bekannt (vergleiche beispielsweise die Übersichtsartikel von Brinton (1986) und Stollar, V. (1980)). Im allgemeinen können geeignete Zellen oder Zelllinien zur Züchtung von HCV, diejenigen umfassen, die bekanntlich die Flavivirusreplikation unterstützen, beispielsweise die folgenden: Affennierenzelllinien (z.B. MK₂, VERO), Schweinenierenzelllinien (z.B. PS), Babyhamsternierenzelllinien (z.B. BHK), Maus-Makrophagenzelllinien (z.B. P388D1, MK1, Mm1), menschliche Makrophagenzelllinien (z.B. U-937), menschliche periphere Blutleukocyten, menschliche adhärenente Monocyten, Hepatocyten oder Hepatocytenzelllinien (z.B. HUH7, HEPG2), Embryos oder embryonale Zellen (z.B.

[0191] Hühnerembryonenfibroblasten) oder Zelllinien, abgeleitet von Invertebraten, vorzugsweise von Insekten (z.B. Drosophila-Zelllinien) oder bevorzugter von Arthropoden, z.B. Moskitozelllinien (z.B. A. Albopictus, Aedes aegypti, Culex tritaeniorhynchus) oder Zeckenzelllinien (z.B. RML-14 Dermacentor parumapertus).

[0192] Es ist möglich, primäre Hepatocyten zu züchten und dann mit HCV zu infizieren. Alternativ könnten die Hepatocytenkulturen von der Lebern infizierter Individuen (z.B. Menschen oder Schimpansen) abgeleitet werden. Dieser zuletzt genannte Fall ist ein Beispiel für eine Zelle, die in vivo infiziert wird und in vitro weitergeführt wird. Zusätzlich können verschiedene verfahren zur Immortalisierung verwendet werden, um Zelllinien zu erhalten, die von Hepatocytenkulturen abgeleitet sind. Beispielsweise können primäre Leberkulturen (vor und nach Anreicherung der Hepatocytenpopulation) mit einer Vielzahl von Zellen fusioniert werden, um die Stabilität aufrechtzuerhalten. Beispielsweise können die Kulturen auch mit transformierenden Viren infiziert werden

oder mit transformierenden Genen transfiziert werden, um permanente oder semipermanente Zelllinien zu erzeugen. Zusätzlich können beispielsweise die Zellen in Leberkulturen fusioniert werden, um Zelllinien einzurichten (z.B. HepG2). Verfahren zur Zellfusion sind auf dem Fachgebiet bekannt und umfassen beispielsweise die Verwendung von Fusionsmitteln, wie Polyethylenglycol, Sendai-Virus und Epstein-Barr-Virus.

[0193] Wie vorstehend diskutiert, ist HCV ein Flavivirus oder flaviartiges Virus. Daher ist es naheliegend, daß die HCV-Infektion der Zelllinien mit Techniken durchgeführt wird, die auf dem Fachgebiet zur Infektion von Zellen mit Flaviviren bekannt sind. Diese umfassen beispielsweise Inkubation der Zellen mit viralen Präparaten unter Bedingungen, die den Eintritt des Virus in die Zelle ermöglichen. Zusätzlich kann es möglich sein, eine Virusproduktion durch Transfektion der Zellen mit isolierten viralen Polynucleotiden zu erhalten. Es ist bekannt, daß Togavirus- und Flavivirus-RNAs in einer Vielzahl von Vertebraten-Zelllinien (Pfefferkorn und Shapiro (1974)) und in einer Moskitozelllinie (Peleg (1969)) infektiös sind.

[0194] Verfahren zur Transfektion von Gewebeskulturzellen mit RNA-Doppelsträngen, positivsträngigen RNAs und DNAs (einschließlich cDNAs) sind auf dem Fachgebiet bekannt und umfassen beispielsweise Techniken, bei denen Elektroporation und Präzipitation mit DEAE-Dextran oder Calciumphosphat verwendet werden. Eine reichliche Quelle für HCV-RNA kann durch Durchführung einer in vitro-Transkription einer HCV-cDNA, entsprechend dem vollständigen Genom, erhalten werden. Die Transfektion mit diesem Material oder mit clonierter HCV-cDNA sollte zu einer Virusreplikation und der in vitro Fortpflanzung des Virus führen.

[0195] Zusätzlich zu den gezüchteten Zellen können Tiermodellsysteme zur viralen Replikation verwendet werden. Tiersysteme mit Flaviviren sind einem Fachmann bekannt (vergleiche beispielsweise den Übersichtsartikel von Monath (1986)). So kann die HCV-Replikation nicht nur in Schimpansen, sondern auch beispielsweise in Krallenaffen und Jungmäusen eintreten.

II.L. Suche nach antiviralen Mitteln gegen das HCV

[0196] Die Verfügbarkeit der Zellkultur- und Tiermodellsysteme für HCV ermöglicht auch die Suche nach antiviralen Mitteln, die die HCV-Replikation hemmen, und insbesondere nach solchen Mitteln, die bevorzugt Zellwachstum und -multiplikation ermöglichen, während sie die virale Replikation hemmen. Diese Absuchverfahren sind einem Fachmann bekannt. Im allgemeinen werden die antiviralen Mittel in einem Tiermodellsystem in einer Vielzahl von Konzentrationen auf ihre Wirkung zur Verhinderung der viralen Replikation in Zellkultursystemen getestet, die die virale Replikation unterstützen, und dann auf eine Hemmung der Infektiosität oder der viralen Pathogenität (und einen niedrigen Toxizitätsgrad).

Verfahren und Zusammensetzungen zum Nachweis von HCV-Antigenen und HCV-Polynucleotiden

[0197] Sind dahingehend zum Suchen nach antiviralen Mitteln nützlich, daß sie ein alternatives und vielleicht empfindlicheres Mittel zum Nachweis der Wirkung des Mittels auf die virale Replikation als der Zell-Plaque-Test oder der ID₅₀-Test liefern. Beispielsweise können die hier beschriebenen HCV-Polynucleotidsonden verwendet werden, um die Menge der viralen Nucleinsäure, die in einer Zellkultur produziert wird, quantitativ zu bestimmen. Dies könnte beispielsweise durch Hybridisierung oder kompetitive Hybridisierung der infizierten Zellnucleinsäuren mit einer markierten HCV-Polynucleotidsonde durchgeführt werden. Beispielsweise können auch Anti-HCV-Antikörper verwendet werden, um das (die) HCV-Antigen(e) in der Zellkultur zu identifizieren und quantitativ zu bestimmen, wobei die hier beschriebenen Immunoassays verwendet werden. Da es zweckmäßig sein könnte, die HCV-Antigene in der infizierten Zellkultur durch einen kompetitiven Test quantitativ zu bestimmen, sind zusätzlich die von den hier beschriebenen HCV-cDNAs codierten Polypeptide in diesen kompetitiven Test nützlich. Im allgemeinen würde ein rekombinantes HCV-Polypeptid, das von der HCV-cDNA abgeleitet ist, markiert werden, und die Hemmung der Bindung dieses markierten Polypeptids an ein HCV-Polypeptid infolge des in dem Zellkultursystem produzierten Antigens würde gemessen werden. Ferner sind diese Techniken besonders nützlich in den Fällen, in denen HCV in einer Zelllinie, ohne den Zelltod zu verursachen, replizieren könnte.

II.M. Herstellung von attenuierten HCV-Stämmen

[0198] Zusätzlich zu den vorstehenden Ausführungen können unter Verwendung der Gewebeskultursysteme und/oder der Tiermodellsysteme attenuierte HCV-Stämme isoliert werden. Diese Stämme würden sich für Impfstoffe oder zur Isolierung viraler Antigene eignen. Attenuierte Stämme sind nach mehrfachen Passagen in einer Zellkultur und/oder einem Tiermodell isolierbar. Der Nachweis eines attenuierten Stammes in einer infizierten Zelle oder einem Individuum kann nach auf dem Fachgebiet bekannten Techniken erfolgen und könnte beispielsweise die Verwendung von Antikörpern gegen ein oder mehrere Epitop(e), das (die) von HCV codiert wird (werden), als Sonde oder die Verwendung eines Polynucleotids, das eine HCV-Sequenz von mindestens etwa 8 Nucleotiden enthält, als Sonde umfassen. Alternativ oder zusätzlich kann ein attenuierter Stamm unter

Verwendung der hier angegebenen genomischen Information von HCV und unter Verwendung rekombinanter Techniken konstruiert werden. Im allgemeinen würde man versuchen, einen Bereich des Genoms zu deletieren, der beispielsweise ein Polypeptid für die Pathogenität, das aber die virale Replikation ermöglicht, codiert. Zusätzlich würde die Genomkonstruktion die Expression eines Epitops ermöglichen, das die Bildung neutralisierender Antikörper für HCV hervorruft. Das veränderte Genom könnte dann verwendet werden, um Zellen zu transformieren, die die HCV-Replikation ermöglichen, und die Zellen könnten dann unter Bedingungen, die die virale Replikation ermöglichen, gezüchtet werden. Attenuierte HCV-Stämme sind nicht nur zu Impfzwecken, sondern auch als Quellen zur handelsmäßigen Produktion von viralen Antigenen nützlich, da die Verarbeitung dieser Viren weniger strenge Schutzmaßnahmen für die an der viralen Produktion und/oder der Produktion viralen Produkte beteiligten Angestellten erfordern würde.

III. Allgemeine Verfahren

[0199] Die allgemeinen Techniken, die zur Extraktion des Genoms aus einem Virus, zur Herstellung und zum Absuchen einer cDNA-Bank, zur Sequenzierung von Clonen, zur Konstruktion von Expressionsvektoren, zur Transformation von Zellen, zur Durchführung von immunologischen Tests, wie Radioimmunoassays und ELISA-Assays, zur Züchtung von Zellen in Kultur und dgl. verwendet werden, sind auf dem Fachgebiet bekannt, und Laborhandbücher, die diese Techniken beschreiben, sind verfügbar. Jedoch werden als allgemeine Anleitung nachstehend einige Quellen dargelegt, die gegenwärtig für solche Verfahren und für Materialien, die zu deren Durchführung nützlich sind, verfügbar sind.

III.A. Wirte und Kontrollsequenzen für die Expression

[0200] Sowohl prokaryontische als auch eukaryontische Wirtszellen können zur Expression der gewünschten codierenden Sequenzen verwendet werden, wenn geeignete Kontrollsequenzen, die mit dem bezeichneten Wirt kompatibel sind, verwendet werden. Unter den prokaryontischen Wirten wird am häufigsten *E. coli* verwendet. Sequenzen zur Kontrolle der Expression für Prokaryonten umfassen Promotoren, die ggf. Operorteile enthalten, und Ribosomenbindungsstellen. Transfervektoren, die mit den prokaryontischen Wirten kompatibel sind, leiten sich im allgemeinen von beispielsweise pBR322 ab, einem Plasmid, das Operons enthält, die Ampicillin- und Tetracyclinresistenz verleihen, und den verschiedenen pUC-Vektoren, die ebenfalls Sequenzen enthalten, die Antibiotikaresistenzmarker übertragen. Diese Marker können verwendet werden, um erfolgreiche Transformanten durch Selektion zu erhalten. Allgemein verwendete prokaryontische Kontrollsequenzen umfassen β -Lactamase (Penicillinase) und Lactosepromotorsysteme (Chang et al. (1977)), das Tryptophan (*trp*)-Promotorsystem (Goeddel et al. (1980)) und den λ -abgeleiteten P_L -Promotor und die N-Gen-Ribosomenbindungsstelle (Shimatake et al. (1981)) und den hybriden *tac*-Promotor (De Boer et al. (1983)), abgeleitet von den Sequenzen der *trp*- und *lac*-UV5-Promotoren. Die vorstehenden Systeme sind besonders mit *E. coli* kompatibel.

[0201] Ggf. können andere prokaryontische Wirte, wie *Bacillus*- oder *Pseudomonas*-Stämme mit entsprechenden Kontrollsequenzen verwendet werden.

[0202] Eukaryontische Wirte umfassen Hefe- und Säugerzellen in Kultursystemen. *Saccharomyces cerevisiae* und *Saccharomyces carlsbergensis* sind die am häufigsten verwendeten Hefewirte und sind geeignete Pilzwirte. Mit Hefe kompatible Vektoren tragen Marker, die die Selektion erfolgreicher Transformanten durch Verleihen von Prototrophie an auxotrophe Mutanten oder Resistenz gegenüber Schwermetallen an Wildtypstämme gestatten. In hefekompatiblen Vektoren können der 2-Mikron-Replikations-Origin (Broach et al. (1983)), die Kombination aus CEN3 und ARS1 oder andere Mittel zur Gewährleistung der Replikation verwendet werden, wie Sequenzen, die zum Einbau eines geeigneten Fragments in das Wirtszellgenom führen. Kontrollsequenzen für Hefevektoren sind auf dem Fachgebiet bekannt und umfassen Promotoren zur Synthese glycolytischer Enzyme (Ness et al. (1968), Holland et al. (1978)) einschließlich des Promotors der 3-Phosphoglyceratkinase (Hitzeman (1980)). Terminatoren können auch aufgenommen werden, wie beispielsweise diejenigen, die sich von dem Enolasegen (Holland (1981)) ableiten. Besonders nützliche Kontrollsysteme sind solche, die den Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH)-Promotor oder den regulierbaren Alkoholdehydrogenase (ADH)-Promotor, Terminatoren, die auch von GAPDH abgeleitet sind, und, sofern Sekretion gewünscht ist, Leader-Sequenzen von dem Hefe- α -Faktor enthalten. Zusätzlich können der Transkriptionsregulatorbereich und der Transkriptionsinitiationsbereich, die funktionell verbunden sind, so sein, wie sie in dem Wildtyporganismus nicht natürlicherweise assoziiert sind. Diese Systeme sind ausführlich in der EP-A 120 551, veröffentlicht am 3. Okt. 1984, der EP-A 116 201, veröffentlicht am 22. Aug. 1984 und der EP-A 164 556, veröffentlicht am 18. Dez. 1985, die alle auf den vorliegenden Anmelder übertragen wurden und auf die hiermit Bezug genommen wird, beschrieben.

[0203] Als Wirte zur Expression verfügbare Säugerzelllinien sind auf dem Fachgebiet bekannt und umfassen viele immortalisierte Zelllinien, die von der American Type Culture Collection (ATCC) verfügbar sind, einschließ-

lich HeLa-Zellen, Ovarzellen des chinesischen Hamsters ((CHO)-Zellen), Babyhamsternieren (BHK)-Zellen und eine Anzahl anderer Zell-linien. Geeignete Promotoren für die Säugerzellen sind auf dem Fachgebiet bekannt und umfassen virale Promotoren, wie den des Simian-Virus 40 (SV40) (Fiers (1978)), des Rous-Sarcom-Virus (RSV), des Adenovirus (ADV) und des Rinderpapilloma-Virus (BPV). Säugerzellen können auch Terminationssequenzen und Poly A-Additionssequenzen benötigen. Enhancer-Sequenzen, die die Expression erhöhen, können auch eingeschlossen sein, und Sequenzen, die die Amplifikation des Gens verursachen, können auch zweckmäßig sein. Diese Sequenzen sind auf dem Fachgebiet bekannt. Vektoren, die zur Replikation in Säugerzellen geeignet sind, können virale Replicons oder Sequenzen umfassen, die die Integration der geeigneten Sequenzen, die die NANBV-Epitope codieren, in das Wirtsgenom sichern.

III.B. Transformationen

[0204] Die Transformationen können nach jedem beliebigen bekannten Verfahren zur Einschleusung von Polynucleotiden in eine Wirtszelle durchgeführt werden und umfassen beispielsweise das Verpacken des Polynucleotids in ein Virus und Transduktion einer Wirtszelle mit dem Virus; sie kann auch durch direkte Aufnahme des Polynucleotids durchgeführt werden. Das verwendete Transformationsverfahren hängt von dem zu transformierenden Wirt ab. Beispielsweise wird die Transformation der E. coli-Wirtszellen mit λ -gt11, welcher die BB-NANBV-Sequenzen enthält, in dem nachstehenden Beispielteil diskutiert. Bei der bakteriellen Transformation durch direkte Aufnahme wird im allgemeinen mit Calcium- oder Rubidiumchlorid (Cohen (1972); Maniatis (1982)) behandelt. Die Hefetransformationen durch direkte Aufnahme kann unter Verwendung des Verfahrens von Hinnen et al. (1978) durchgeführt werden. Säugertransformationen durch direkte Aufnahme können unter Verwendung des Calciumphosphatpräzipitationsverfahrens von Graham und Van der Eb (1978) oder der verschiedenen bekannten Modifikationen davon durchgeführt werden.

III.C. Vektorkonstruktion

[0205] Bei der Vektorkonstruktion werden Techniken, die auf dem Fachgebiet bekannt sind, verwendet. Die ortsspezifische DNA-Spaltung wird durch Behandlung mit geeigneten Restriktionsenzymen unter Bedingungen, die im allgemeinen vom Hersteller dieser im Handel erhältlichen Enzyme angegeben werden, durchgeführt. Im allgemeinen werden etwa 1 μ g Plasmid oder DNA-Sequenz durch eine Enzymeinheit in etwa 20 μ l Pufferlösung durch 1- bis 2-stündige Inkubation bei 37°C gespalten. Nach Inkubation mit dem Restriktionsenzym wird das Protein durch Phenol/Chloroform-Extraktion entfernt, und die DNA durch Präzipitation mit Ethanol gewonnen. Die gespaltenen Fragmente können unter Verwendung von Polyacrylamid- oder Agarosegelelektrophoresetechniken nach den in Methods and Enzymology (1980) 65:499–560 zu findenden allgemeinen Verfahren getrennt werden.

[0206] Spaltfragmente mit klebrigen Enden können unter Verwendung von E. coli-DNA-Polymerase I (Klenow) in Gegenwart der geeigneten Desoxynucleotidtriphosphate (dNTPs), die in dem Gemisch vorhanden sind, glattendig gemacht werden. Die Behandlung mit S1-Nuclease kann ebenfalls verwendet werden, was zur Hydrolyse aller einzelsträngigen DNA-Teile führt.

[0207] Die Ligierungen werden unter Verwendung von Standardpuffer- und Temperaturbedingungen mit T4 DNA-Ligase und ATP durchgeführt. Ligierungen mit klebrigen Enden benötigen weniger ATP und weniger Ligase als Ligierungen mit glatten Enden. Wenn Vektorfragmente als Teil eines Ligierungsgemisches verwendet werden, wird das Vektorfragment oft mit bakterieller alkalischer Phosphatase (BAP) oder alkalischer Phosphatase aus Rinderdarm behandelt, um das 5'-Phosphat zu entfernen und so die Religierung des Vektors zu verhindern. Alternativ kann die Spaltung unerwünschter Fragmente durch Restriktionsenzyme verwendet werden, um die Ligierung zu verhindern.

[0208] Die Ligierungsgemische werden in geeignete Clonierungswirte, wie E. coli, transformiert, und erfolgreiche Transformanten werden beispielsweise durch Antibiotikaresistenz selektiert und auf die korrekte Konstruktion abgesehen.

III.D. Konstruktion der gewünschten DNA-Sequenzen

[0209] Synthetische Oligonucleotide können unter Verwendung eines automatisierten Oligonucleotidsynthesegeräts, wie von Warner (1984) beschrieben, hergestellt werden. Ggf. können die synthetischen Stränge mit 32 P durch Behandlung mit Polynucleotidkinase in Gegenwart von 32 P-ATP unter Verwendung von Standardreaktionsbedingungen markiert werden.

[0210] Die DNA-Sequenzen einschließlich derjenigen, die aus den cDNA-Banken isoliert wurden, können nach bekannten Techniken modifiziert werden, welche beispielsweise die ortsspezifische Mutagenese umfassen, wie von Zoller (1982) beschrieben. Kurz, die zu modifizierende DNA wird in den Phagen als eine einzelsträngige Sequenz verpackt und mit DNA-Polymerase in eine doppelsträngige DNA umgewandelt, wobei als

Primer ein synthetisches Oligonucleotid verwendet wird, das dem zu modifizierenden Teil der DNA komplementär ist, und bei dem die gewünschte Modifikation in dessen eigener Sequenz vorhanden ist. Die so erhaltene doppelsträngige DNA wird in ein Phagen-kompatibles Wirtsbakterium transformiert. Kulturen der transformierten Bakterien, die Replikationen jedes Phagenstranges enthalten, werden auf Agar ausplattiert, um Plaques zu erhalten. Theoretisch enthalten 50% der neuen Plaques den Phagen mit der mutierten Sequenz, und die verbleibenden 50% besitzen die Originalsequenz. Replikate der Plaques werden dann mit einer markierten synthetischen Sonde bei Temperaturen und Bedingungen hybridisiert, die die Hybridisierung mit dem korrekten Strang, aber nicht mit der nicht-modifizierten Sequenz ermöglichen. Die Sequenzen, die durch Hybridisierung identifiziert wurden, werden isoliert und cloniert.

III.E. Hybridisierung mit der Sonde

[0211] DNA-Banken können nach dem Verfahren von Grunstein und Hogness (1975) abgesucht werden. In Kürze, bei diesem Verfahren wird die abzusuchende DNA auf Nitrocellulosefiltern immobilisiert, denaturiert und mit einem Puffer aus 0 bis 50% Formamid, 0,75 M NaCl, 75 mM Na-Citrat, 0,02 (Gewicht/Volumen) jeweils an Rinderserumalbumin, Polyvinylpyrrolidon und Ficoll, 50 mM Na-Phosphat (pH 6,5), 0,1% SDS und 100 µg/ml denaturierter Träger-DNA vorhybridisiert. Der Prozentsatz an Formamid in dem Puffer, sowie die Zeit- und Temperaturbedingungen der Vorhybridisierung und die anschließenden Hybridisierungsstufen hängen von der benötigten Stringenz ab. Oligomere Sonden, die weniger stringente Bedingungen benötigen, werden im allgemeinen mit niedrigen Prozentanteilen an Formamid, niedrigen Temperaturen und längeren Hybridisierungszeiten verwendet. Sonden, die mehr als 30 oder 40 Nucleotide enthalten, wie diejenigen, die sich von cDNA oder genomischen Sequenzen ableiten, benötigen im allgemeinen höhere Temperaturen, z.B. etwa 40 bis 42°C, und einen hohen Prozentanteil, z.B. 50%, Formamid. Nach der Vorhybridisierung wird die 5'-³²P-markierte Oligonucleotidsonde dem Puffer zugesetzt, und die Filter werden in diesem Gemisch unter Hybridisierungsbedingungen inkubiert. Nach Waschen werden die behandelten Filter einer Autoradiographie unterworfen, um den Ort der hybridisierten Sonde zu zeigen. Die DNA an den entsprechenden Orten auf den Originalagarplatten wird als Quelle für die gewünschte DNA verwendet.

III.F. Bestätigung der Konstruktion und Sequenzierung

[0212] Für Routinevektorkonstruktionen werden die Ligierungsgemische in den E. coli-Stamm HB101 oder einen anderen geeigneten Wirt transformiert, und erfolgreiche Transformanten werden durch Antibiotikaresistenz oder andere Marker ausgewählt. Plasmide aus den Transformanten werden dann nach dem Verfahren von Clewell et al. (1969), üblicherweise nach Chloramphenicolamplifikation (Clewell (1972)), hergestellt. Die DNA wird üblicherweise durch Restriktionsenzymanalyse und/oder Sequenzierung isoliert und analysiert. Die Sequenzierung kann nach dem Dideoxyverfahren von Sanger et al. (1977), wie weiter von Messing et al. (1981) beschrieben, oder nach dem Maxam et al.-Verfahren (1980) durchgeführt werden. Probleme mit der Bandenkompression, die manchmal in GC-reichen Bereichen beobachtet werden, wurden durch Verwendung von T-Desazoguanosin nach Barr et al. (1986) überwunden.

III.G. Enzym-gebundener-Immunadsorptionstest

[0213] Der Enzym-gebundene-Immunadsorptionstest (ELISA) kann verwendet werden, um entweder die Antigen- oder Antikörperkonzentrationen zu messen. Dieses Verfahren hängt von der Konjugation eines Enzyms an entweder ein Antigen oder einen Antikörper ab und verwendet die Aktivität des gebundenen Enzyms als einen quantitativen Marker. Zur Messung des Antikörpers wird das bekannte Antigen an eine feste Phase (z.B. eine Mikrotiterplatte oder ein Plastikröhrchen) fixiert, mit den Verdünnungen des Testserums inkubiert, gewaschen, mit Antiimmunglobulin, das mit einem Enzym markiert ist, inkubiert und erneut gewaschen. Zur Markierung geeignete Enzyme sind auf dem Fachgebiet bekannt und umfassen beispielsweise Meerrettichperoxidase. Die an die feste Phase gebundene Enzymaktivität wird durch Zugabe des spezifischen Substrats und kolorimetrische Bestimmung der Produktbildung oder der Substratverwertung gemessen. Die gebundene Enzymaktivität ist eine direkte Funktion der Menge des gebundenen Antikörpers.

[0214] Zur Messung des Antigens wird ein bekannter spezifischer Antikörper an die feste Phase fixiert, das Testmaterial, das das Antigen enthält, wird zugesetzt, und nach einer Inkubation wird die feste Phase gewaschen, und ein zweiter enzymmarkierter Antikörper zugesetzt. Nach dem Waschen wird das Substrat zugesetzt, und die Enzymaktivität wird kolorimetrisch bestimmt und auf die Antigenkonzentration bezogen.

IV. Beispiele

[0215] Nachstehend werden erfindungsgemäße Beispiele beschrieben sowie verwandte Daten, die die Erfin-

derung nur erläutern sollen, ihren Umfang aber nicht beschränken sollen. Angesichts der vorliegenden Offenbarung sind zahlreiche Ausführungsformen im Schutzbereich der Ansprüche einem Durchschnittsfachmann offensichtlich. Die beispielsweise in den Abschnitten IV.A. dargestellten Beispiele können, falls gewünscht, wiederholt werden, müssen aber nicht wiederholt werden, da Techniken zur Konstruktion der gewünschten Nucleotidsequenzen auf der Basis der erfindungsgemäß bereitgestellten Information verfügbar sind. Die Expression wird beispielhaft in *E. coli* durchgeführt. Jedoch sind andere Systeme, wie ausführlicher in Abschnitt III.A. dargelegt, verfügbar. Zusätzliche Epitope, die sich von der Genomstruktur ableiten, können auch gebildet und zur Erzeugung von Antikörpern, wie nachstehend dargelegt, verwendet werden.

IV.A. Herstellung Isolierung und Sequenzierung der HCV-cDNA

IV.A.1. Herstellung der HCV-cDNA

[0216] Die Quelle für den NANB-Erreger war ein Sammelplasma von einem Schimpanse mit chronischer NANBH. Der Schimpanse war experimentell mit Blut von einem anderen Schimpanse mit chronischer NANBH infiziert worden, die das Ergebnis einer HCV-Infektion in einer kontaminierten Charge eines Faktor VI-II-Konzentrats war, das von einem menschlichen Sammelserum stammte. Das Sammelplasma des Schimpansen wurde durch Vereinigung vieler einzelner Plasmaproben, die hohe Spiegel an Alanin-Aminotransferaseaktivität enthielten, hergestellt. Diese Aktivität ist das Ergebnis eines Leberschadens als Folge der HCV-Infektion. Da 1 ml einer 10^{-6} -Verdünnung dieses Sammelserums bei intravenöser Verabreichung in, einem anderen Schimpanse NANBH hervorrief, betrug dessen CID-Wert mindestens 10^6 /ml, d.h. es hatte einen hohen Titer an infektiösem Virus.

[0217] Eine cDNA-Bank von dem Sammelplasma mit hohem Titer wurde, wie nachstehend beschrieben, hergestellt. Zuerst wurden die viralen Teilchen aus dem Plasma isoliert. Ein 90 ml Aliquot wurde mit 310 ml einer Lösung, die 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl enthielt, verdünnt. Die Zelltrümmer wurden durch 10-minütige Zentrifugation bei 15000 xg bei 20°C entfernt. Die viralen Teilchen in dem so erhaltenen Überstand wurden dann durch 5-minütige Zentrifugation in einem Beckman-SW28-Rotor bei 28000 UpM bei 20°C pelletiert. Um das virale Genom freizusetzen, wurden die Teilchen durch Suspendieren der Pellets in 15 ml einer Lösung, die 1% Natriumdodecylsulfat (SDS), 10 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 und auch 2 mg/ml Proteinase K enthielt, und anschließende 90-minütige Inkubation bei 45°C aufgebrochen. Die Nucleinsäuren wurden durch Zugabe von 0,8 µg MS2 Bakteriophagen-RNA als Träger und viermalige Extraktion des Gemisches mit einem 1:1-Gemisch aus Phenol-Chloroform (Phenol, gesättigt mit 0,5 M Tris-HCl, pH 7,5, 0,1% (Vol/Vol) β-Mercaptoethanol, 0,1% (Gewicht/Vol) Hydroxychinolin) und anschließende zweimalige Extraktion mit Chloroform isoliert. Die wässrige Phase wurde mit 1-Butanol vor Präzipitation mit 2,5 Volumina absolutem Ethanol über Nacht bei -20°C eingeeengt. Die Nucleinsäure wurde durch 90-minütige Zentrifugation in einem Beckman-SW41-Rotor bei 40000 UpM bei 4°C gewonnen und in Wasser, das mit 0,05 (Vol/Vol) Diethylpyrocarbonat behandelt worden war, aufgelöst und autoklaviert.

[0218] Die nach dem vorstehenden Verfahren erhaltene Nucleinsäure (<2 µg) wurde mit 17,5 mM CH_3HgOH denaturiert. Die cDNA wurde unter Verwendung dieser denaturierten Nucleinsäure als Matrize synthetisiert und in die EcoRI-Spaltstelle des Phagen λ-gt11 nach den von Huynh (1985) beschriebenen Verfahren cloniert, ausgenommen, daß Zufallsprimer Oligo(dT)₁₂₋₁₈ während der Synthese des ersten Stranges durch reverse Transkriptase (Taylor et al. (1976)) ersetzt. Die so erhaltenen doppelsträngigen cDNAs wurden nach Größe auf einer Sepharose CL-4B-Säule fraktioniert. Das eluierte Material mit einer ungefähren mittleren Größe von 400, 300, 200 und 100 Basenpaaren wurde in die cDNA-Pools 1, 2, 3 bzw. 4 vereinigt. Die λ-gt11-cDNA-Bank wurde aus der cDNA in Pool 3 erzeugt.

[0219] Die λ-gt11-cDNA-Bank, die aus Pool 3 erzeugt wurde, wurde auf Epitope abgesucht, die spezifisch mit Serum von einem Patienten, der zuvor eine NANBH-Infektion hatte, binden konnten. Etwa 106 Phagen wurden mit Patientenserum nach den Verfahren von Huynh et al. (1985) abgesucht, ausgenommen, daß der gebundene menschliche Antikörper mit Schaf-Antimensch-Ig-Antiserum, die mit ^{125}I radioaktiv markiert worden waren, nachgewiesen wurde. Fünf positive Phagen wurden identifiziert und gereinigt. Die fünf positiven Phagen wurden auf Bindungsspezifität gegenüber Serum von 8 verschiedenen Menschen, die zuvor mit dem NANBH-Erreger infiziert worden waren, nach dem gleichen Verfahren getestet. Vier der Phagen codierten ein Polypeptid, das immunologisch mit nur einem menschlichen Serum reagierte, d.h. dem Serum, das zum ersten Absuchen der Phagenbank verwendet worden war. Der fünfte Phage (5-1-1) codierte ein Polypeptid, das immunologisch mit 5 der 8 getesteten Seren reagierte. Ferner reagierte dieses Polypeptid immunologisch nicht mit Seren von 7 normalen Blutspendern. Daher scheint es, daß Clon 5-1-1 ein Polypeptid codiert, das immunologisch spezifisch durch Seren von NANB-Patienten erkannt wird.

VI.A.2. Sequenzen der HCV-cDNA in dem rekombinanten Phagen 5-1-1 und des Polypeptids das von der Sequenz codiert wird.

[0220] Die cDNA in dem rekombinanten Phagen 5-1-1 wurde nach dem Verfahren von Sanger et al. (1977) sequenziert. Genauer wurde die cDNA mit EcoRI herausgeschnitten und durch Größenfraktionierung mit Gelelektrophorese isoliert. Die EcoRI-Restriktionsfragmente wurden in die M13-Vektoren mp18 und mp19 (Messing (1983)) subcloniert und unter Verwendung des Didesoxykettenterminationsverfahrens von Sanger et al. (1977) sequenziert. Die erhaltene Sequenz ist in **Fig. 1** gezeigt.

[0221] Das in **Fig. 1** codierte Polypeptid, das von der HCV-cDNA codiert wird, besitzt das gleiche Leseraster wie die N-terminale β -Galactosidaseeinheit, an die es fusioniert ist. Wie in Abschnitt IV.A. gezeigt, codiert das offene Leseraster (ORF) zur Translation von 5-1-1 das (die) Epitop(e), das (die) von Seren von Patienten und Schimpansen mit NANBH-Infektionen spezifisch erkannt wird (werden).

IV.A.3. Isolierung der mit cDNA überlappenden HCV cDNA in Clon 5-1-1

[0222] Die mit der cDNA in Clon 5-1-1 überlappende HCV-cDNA wurde durch Absuchen der gleichen λ -gt11-Bank, die, wie in Abschnitt IV.A.1. beschrieben, erzeugt worden war, mit einem synthetischen Polynucleotid erhalten, das von der in **Fig. 1** gezeigten Sequenz der HCV-cDNA in den Clonen 5-1-1 abgeleitet ist. Die Sequenz des zum Absuchen verwendeten Polynucleotids lautete:

```
5' -TCC CTT GCT CGA TGT ACG GTA AGT GCT GAG AGC
ACT CTT CCA TCT CAT CGA ACT CTC GGT AGA GGA CTT CCC TGT
CAG GT-3'
```

[0223] Die λ -gt11-Bank wurde mit dieser Sonde nach dem in Huynh (1985) beschriebenen Verfahren abgesucht. Etwa einer von 50000 Clonen hybridisierte mit der Sonde. Drei Clone, die die cDNAs enthielten, die mit der synthetischen Sonde hybridisierten, wurden als 81, 1-2 und 91 numeriert.

IV.A.4. Nucleotidsequenzen der mit der cDNA in Clon 5-1-1 überlappenden HCV-cDNAs

[0224] Die Nucleotidsequenzen der drei cDNAs in den Clonen 81, 1-2 und 91 wurden im wesentlichen wie in Abschnitt IV.A.2 bestimmt. Die Sequenzen dieser Clone, bezogen auf den HCV-cDNA-Sequenz in dem Phagen 5-1-1, ist in **Fig. 2** gezeigt. Diese Figur zeigt den Strang, der das nachgewiesene HCV-Epitop codiert, und die Homologien in den Nucleotidsequenzen sind durch vertikale Linien zwischen den Sequenzen angegeben.

[0225] Die Sequenzen der clonierten HCV-cDNAs sind in den überlappenden Bereiche stark homolog (siehe **Fig. 2**). Jedoch gibt es Unterschiede in zwei Bereichen. Das Nucleotid 67 in Clon 1-2 ist ein Thymidin, wohingegen die anderen drei Clone an dieser Position einen Cytidinrest besitzen. Es sollte jedoch darauf hingewiesen werden, daß die gleiche Aminosäure codiert wird, wenn entweder C oder T an dieser Position vorhanden ist.

[0226] Der zweite Unterschied liegt darin, daß der Clon 5-1-1 28 Basenpaare enthält, die in den anderen drei Clonen nicht vorhanden sind. Diese Basenpaare kommen am Start der cDNA-Sequenz in 5-1-1 vor und sind durch kleine Buchstaben angegeben. Basierend auf den Daten des Radioimmunassays, der nachstehend in Abschnitt IV.D diskutiert ist, ist es möglich, daß ein HCV-Epitop in diesem 28 bp-Bereich codiert wird.

[0227] Das Fehlen der 28 Basenpaare von 5-1-1 in den Clonen 81, 1-2 und 91 kann bedeuten, daß die cDNA in diesen Clonen von defekten HCV-Genomen abgeleitet war. Alternativ könnte der 28 bp-Bereich ein terminales Artefakt in Clon 5-1-1 sein.

[0228] Die Sequenzen mit den kleinen Buchstaben in der Nucleotidsequenz der Clone 81 und 91 zeigen einfach an, daß diese Sequenzen in den anderen cDNAs nicht gefunden wurden, weil cDNAs, die mit diesen Bereichen überlappen, noch nicht isoliert wurden.

[0229] Eine zusammengesetzte HCV-cDNA-Sequenz, abgeleitet von überlappenden cDNAs in den Clonen 5-1-1, 81, 1-2 und 91 ist in **Fig. 3** gezeigt. Jedoch sind in dieser Figur die einzigartigen 28 Basenpaare von Clon 5-1-1 weggelassen. Die Figur zeigt auch die Sequenz des Polypeptids, das von dem ORF der zusammengesetzten HCV-cDNA codiert wird.

IV.A.5. Isolierung von mit der cDNA in Clon S1 über lappenden HCV-cDNAs

[0230] Die Isolierung der HCV-cDNA-Sequenzen stromaufwärts derjenigen in der Clon 81-cDNA, die damit überlappen, wurde wie folgt durchgeführt. Die λ -gt11-cDNA-Bank, die wie in Abschnitt IV.A.1 beschrieben, hergestellt worden war, wurde durch Hybridisierung mit einer synthetischen Polynucleotidsonde, die einer 5'-terminalen Sequenz von Clon 81 homolog war, abgesucht. Die Sequenz des Clons 81 ist in **Fig. 4** dargestellt. Die

Sequenz des zum Absuchen verwendeten synthetischen Polynucleotids lautete:

5' CTG TCA GGT ATG ATT GCC GGC TTC CCG GAC 3'.

[0231] Die Verfahren waren im wesentlichen diejenigen, die in Huynh (1985) beschrieben sind, ausgenommen, daß die Filter der Bank zweimal unter stringenten Bedingungen gewaschen wurden, d.h. es wurde jeweils in $5 \times \text{SSC}$, 0,1% SDS bei 55°C 30 min lang gewaschen. Etwa einer aus 50000 Clonen hybridisierte mit der Sonde. Ein positiver rekombinanter Phage, der die cDNA enthielt, die mit der Sequenz hybridisierte, wurde isoliert und gereinigt. Diese Phage wurde als Clon 36 numeriert.

[0232] Stromabwärts liegende cDNA-Sequenzen, die mit den carboxylterminalen Sequenzen in der Clon 81-cDNA überlappen, wurden nach einem Verfahren, das dem zur Isolierung der stromaufwärts liegenden cDNA-Sequenzen ähnlich ist, isoliert, ausgenommen, daß eine synthetische Oligonucleotidsonde hergestellt wurde, die einer 3'-terminalen Sequenz von Clon 81 homolog ist. Die Sequenz des zum Absuchen verwendeten synthetischen Polynucleotids lautete:

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

[0233] Ein positiver rekombinanter Phage, der cDNA enthielt, die mit dieser zuletzt genannten Sequenz hybridisierte, wurde isoliert und gereinigt und als Clon 32 numeriert.

IV.A.6 Nucleotidsequenz der HCV-cDNA in Clon 36.

[0234] Die Nucleotidsequenz der cDNA in Clon 36 wurde im wesentlichen, wie in Abschnitt IV.A.2. beschrieben, bestimmt. Die doppelsträngige Sequenz dieser cDNA, ihr Bereich, der mit der HCV-cDNA in Clon 81 überlappt, und das von dem ORF codierte Polypeptid sind in **Fig. 5** gezeigt.

[0235] Das ORF in Clon 36 ist im gleichen Leseraster wie das in Clon 81 codierte HCV-Antigen. So codieren in Kombination die ORFs in den Clonen 36 und 81 ein Polypeptid, das einen Teil eines großen HCV-Antigens darstellt. Die Sequenz dieses vermutlichen HCV-Polypeptids und die doppelsträngige DNA-Sequenz, die es codiert, die von den kombinierten ORFs der HCV-cDNAs der Clone 36 und 81 abgeleitet ist, ist in **Fig. 6** gezeigt.

[0236] IV.A.7 Nucleotidsequenzen der HCV-cDNA in Clon 32 Die Nucleotidsequenz der cDNA in Clon 32 wurde im wesentlichen, wie in Abschnitt IV.A.2. bezüglich der Sequenz des Clons 5-1-1 beschrieben, bestimmt. Die Sequenzdaten zeigten, daß die cDNA in dem rekombinanten Phagen von Clon 32 aus zwei verschiedenen Quellen stammte. Ein Fragment der cDNA bestand aus 418 Nucleotiden, die von dem HCV-Genom abgeleitet waren. Das andere Fragment bestand aus 172 Nucleotiden, die von dem Genom des Bacteriophagen MS2 abgeleitet waren, der als Träger während der Herstellung der λ -gt11-Plasma-cDNA-Bank verwendet worden war.

[0237] Die Sequenz der cDNA in Clon 32, entsprechend der des HCV-Genoms, ist in **Fig. 7** gezeigt. Der Bereich der Sequenzen, der mit der von Clon 81 überlappt, und das von dem ORF codierte Polypeptid sind ebenfalls in der Figur angegeben. Diese Sequenz enthält einen kontinuierlichen ORF, der im gleichen Leseraster wie das von Clon 81 codierte HCV-Antigen ist.

IV.A.8. Isolierung von mit cDNA in Clon 36 überlappender HCV-cDNA

[0238] Die Isolierung der HCV-cDNA-Sequenzen stromaufwärts derer, die mit denen in der Clon 36-cDNA überlappen, wurde wie in Abschnitt IV.A.5. für diejenigen beschrieben, die mit der Clon 81-cDNA überlappen, durchgeführt, ausgenommen, daß das synthetische Polynucleotid auf der 5'-Region von Clon 36 beruhte. Die Sequenz des zum Absuchen verwendeten synthetischer. Polynucleotids lautete:

5' AAG CCA CCG TGT GCG CTA GGG CTG AAG CCC 3'

[0239] Etwa einer von 50000 Clonen hybridisierte mit der Sonde. Der isolierte gereinigte Clon des rekombinanten Phagen, der die cDNA, die mit dieser Sequenz hybridisierte, enthielt, wurde als Clon 35 bezeichnet.

IV.A.9. Nucleotidsequenz der HCV-cDNA in Clon 35

[0240] Die Nucleotidsequenz der cDNA in Clon 35 wurde im wesentlichen, wie in Abschnitt IV.A.2. beschrieben, bestimmt. Die Sequenz, ihr Bereich, der mit der cDNA in Clon 36 überlappt, und das vermutliche davon codierte Polypeptid sind in **Fig. 8** gezeigt.

[0241] Clon 35 enthält offensichtlich einen einzelnen kontinuierlichen ORF, der ein Polypeptid im gleichen Leseraster wie das, das von Clon 36, Clon 81 und Clon 32 codiert wird, codiert. Die **Fig. 9** zeigt die Sequenz des langen kontinuierlichen ORFs, der sich durch die Clone 35, 36, 81 und 32 erstreckt, zusammen mit dem ver-

mutlichen davon codierten HCV-Polypeptid. Diese kombinierte Sequenz wurde unter Verwendung anderer unabhängiger cDNA-Clone, abgeleitet von der gleichen λ -gt11-cDNA-Bank, bestätigt.

IV.A.10. Isolierung von mit cDNA in Clon 35 überlappender HCV-cDNA

[0242] Die Isolierung der HCV-cDNA-Sequenzen stromaufwärts derjenigen in der Clon 35-cDNA, die mit dieser überlappen, wurde, wie in Abschnitt IV.A.8. für diejenigen beschrieben, die mit der Clon 36-cDNA überlappen, durchgeführt, ausgenommen, daß das synthetische Polynucleotid auf dem 5'-Bereich von Clon 35 beruhte. Die Sequenz des zum Absuchen verwendeten synthetischen Polynucleotids lautete:

5' CAG GAT GCT GTC TCC CGC ACT CAA CGT 3'

[0243] Etwa einer aus 50000 Clonen hybridisierte mit der Sonde. Der isolierte, gereinigte Clon des rekombinanten Phagen, der cDNA enthielt, die mit dieser Sequenz hybridisierte, wurde als Clon 37b bezeichnet.

IV.A.11. Nucleotidsequenz von HCV in Clon 37b

[0244] Die Nucleotidsequenz der cDNA in Clon 37b wurde im wesentlichen, wie in Abschnitt IV.A.2. beschrieben, bestimmt. Die Sequenz, ihr mit der cDNA in Clon 35 überlappender Bereich und das vermutliche, davon codierte Polypeptid, sind in **Fig. 10** gezeigt.

[0245] Das 5'-terminale Nucleotid von Clon 35 ist ein T, wohingegen das entsprechende Nucleotid in Clon 37b ein A ist. Die cDNAs aus drei anderen unabhängigen Clonen, die während des Isolierungsverfahrens von Clon 37b, wie in Abschnitt IV.A.10. beschrieben, isoliert wurden, wurden ebenfalls sequenziert. Die cDNAs aus diesen Clonen enthalten auch ein A an dieser Position. So kann das 5'-terminale T in Clon 35 ein Artefakt des Clonierungsverfahrens sein. Es ist bekannt, daß Artefakte oft an den 5'-terminalen Enden der cDNA-Moleküle auftreten.

[0246] Der Clon 37b enthält offensichtlich ein kontinuierliches ORF, das ein Polypeptid codiert, das eine Fortsetzung des von dem ORF codierten Polypeptids ist, das sich durch die überlappenden Clone 35, 36, 81 und 32 erstreckt.

IV.A.12. Isolierung der mit der cDNA in Clon 32 überlappenden HCV-cDNA

[0247] Die Isolierung der HCV-cDNA-Sequenzen stromabwärts von Clon 32 wurde wie folgt durchgeführt. Zuerst wurde der Clon cla unter Verwendung einer synthetischen Hybridisierungssonde, die auf der Nucleotidsequenz der HCV-cDNA-Sequenz in Clon 32 beruhte, isoliert. Das Verfahren war im wesentlichen das in Abschnitt IV.A.5 beschriebene, ausgenommen, daß die Sequenz der synthetischen Sonde lautete:

5' AGT GCA GTG GAT GAA CCG GCT GAT AGC CTT 3'.

[0248] Unter Verwendung der Nucleotidsequenz aus Clon cla wurde ein anderes synthetisches Nucleotid synthetisiert, das die Sequenz

5' TCC TGA GCC GAC TGC ACC AGT GGA TAA GCT 3'.

hatte. Das Absuchen der λ -gt11-Bank unter Verwendung der von Clon cla abgeleiteten Sequenz als Sonde ergab etwa eine aus 50000 positiven Kolonien. Ein isolierter, gereinigter Clon, der mit dieser Sonde hybridisierte, wurde als Clon 33b bezeichnet.

IV.A.13. Nucleotidsequenz der HCV-cDNA in Clon 33b

[0249] Die Nucleotidsequenz der cDNA in Clon 33b wurde im wesentlichen, wie in Abschnitt IV.A.2. beschrieben, bestimmt.

[0250] Die Sequenz, der mit der cDNA in Clon 32 überlappende Bereich und das vermutliche, davon codierte Polypeptid sind in **Fig. 11** gezeigt.

[0251] Clon 33b enthält offensichtlich ein kontinuierliches ORF, das eine Extension der ORFs in den überlappenden Clonen 37b, 35, 36, 81 und 32 ist. Das von Clon 33b codierte Polypeptid ist im gleichen Leseraster wie das, das von dem ausgedehnten ORF dieser überlappenden Clone codiert wird.

IV.A.14. Isolierung von mit der cDNA des Clons 37b und der cDNA des Clons 33b überlappenden HCV-cDNAs

[0252] Um HCV-cDNAs, die mit den cDNAs in Clon 37b und Clon 33b überlappen, zu isolieren, wurden die

folgenden synthetischen Oligonucleotidsonden, die von den cDNAs dieser Clone abgeleitet waren, verwendet, um die λ -gt11-Bank abzusuchen, wobei im wesentlichen das in Abschnitt IV.A.3. beschriebene Verfahren verwendet wurde. Die verwendeten Sonden waren:

5' CAG GAT GCT GTC TCC CGC ACT CAA CGT C 3'

und

5' TCC TGA GGC GAC TGC ACC AGT GGA TAA GCT 3'

um Kolonien nachzuweisen, die HCV-cDNA-Sequenzen enthalten, die mit denen der Clone 37b bzw. 33b überlappen. Etwa eine aus 50000 Kolonien wurde mit jeder Sonde nachgewiesen. Ein Clon, der cDNA enthielt, die stromaufwärts der cDNA in Clon 37b war und damit überlappte, wurde als Clon 40b bezeichnet. Ein Clon, der cDNA enthielt, die stromabwärts der cDNA von Clon 33b war und damit überlappte, wurde als Clon 25c bezeichnet.

IV.A.15. Nucleotidsequenzen der HCV-cDNA in Clon 40b und in Clon 25c

[0253] Die Nucleotidsequenzen der cDNAs in Clon 40b und in Clon 25c wurden im wesentlichen, wie in Abschnitt IV.A.2. beschrieben, bestimmt. Die Sequenzen von 40b und 25c, ihre Bereiche, die mit den cDNAs der Clone 37b und 33b überlappten und die vermutlichen, davon codierten Polypeptide sind in **Fig. 12** (Clon 40b) und in **Fig. 13** (Clon 25c) gezeigt.

[0254] Das 5'-terminale Nucleotid von Clon 40b ist ein G. Jedoch wurden cDNAs aus fünf anderen unabhängigen Clonen, die während des Isolierungsverfahrens von Clon 40b, das in Abschnitt IV.A.14. beschrieben ist, isoliert wurden, ebenfalls sequenziert. Die cDNAs aus diesen Clonen enthalten ebenfalls ein T in dieser Position. So kann G ein Clonierungsartefakt darstellen (vergleiche die Diskussion in Abschnitt IV.A.11.).

[0255] Der 5'-Terminus von Clon 25c ist ACT, aber die Sequenz dieses Bereichs in Clon cla (Sequenz nicht gezeigt) und in Clon 33b ist TCA. Dieser Unterschied kann auch ein Clonierungsartefakt darstellen, ebenso wie die 28 zusätzlichen 5'-terminalen Nucleotide in Clon 5-1-1.

[0256] Die Clon 40b und 25c enthalten offensichtlich je einen ORF, der eine Extension des kontinuierlichen ORFs in den zuvor sequenzierten Clonen ist. Die Nucleotidsequenz des ORFs, das sich durch die Clon 40b, 37b, 35, 36, 81, 32, 33b und 25c erstreckt und die Aminosäuresequenz des vermutlichen, davon codierten Polypeptids sind in **Fig. 14** gezeigt. In dieser Figur wurden mögliche Artefakte von der Sequenz weggelassen, und stattdessen sind die entsprechenden Sequenzen der nicht-5'-terminalen Bereiche der mehrfach überlappenden Clone gezeigt.

IV.A.16. Herstellung einer zusammengesetzten HCV-cDNA aus der cDNAs in den Clonen 36, 81 und 32

[0257] Die zusammengesetzte HCV-cDNA, C100, wurde wie folgt konstruiert. Zuerst wurden die cDNAs aus den Clonen 36, 81 und 32 mit EcoRI herausgeschnitten. Dann wurde das EcoRI-Fragment der cDNA aus jedem Clon individuell in die EcoRI-Spaltstelle des Vektors pGEM3-Blue (Promega Biotec) cloniert. Die so erhaltenen rekombinanten Vektoren, die die cDNAs aus den Clonen 36, 81 und 32 enthielten, wurden als pGEM3-Blue/36, pGEM3-Blue/81 bzw. pGEM3-Blue/32 bezeichnet. Die geeignet orientierte Rekombinante von pGEM3-Blue/81 wurde mit NaeI und NarI gespalten, und das große Fragment (≈ 2850 bp) wurde gereinigt und mit dem kleinen gereinigten NaeI/NarI-Restriktionsfragment (≈ 570 bp) aus pGEM3-Blue/36 ligiert. Dieser Verbund der cDNAs aus den Clonen 36 und 81 wurde verwendet, um einen anderen pGEM3-Blue-Vektor, der das kontinuierliche HCV-ORF enthält, das in der überlappenden cDNA in diesen Clonen enthalten ist, zu erzeugen. Dieses neue Plasmid wurde dann mit PvuII und EcoRI gespalten, wodurch ein Fragment von etwa 680 bp freigesetzt wurde, das dann mit dem kleinen PvuII/EcoRI-Fragment (580 bp), das aus dem geeignet orientierten pGEM3-Blue/32-Plasmid isoliert worden war, ligiert, und die zusammengesetzte cDNA aus den Clonen 36, 81 und 32 wurde in den durch EcoRI linearisierten Vektor pSODcf1, der in Abschnitt IV.B.1 beschrieben ist und der zur Expression des Clons 5-1-1 in Bakterien verwendet wurde, ligiert. Rekombinanten, die das ≈ 1270 bp EcoRI-Fragment der zusammengesetzten HCV-cDNA (C100) enthielten, wurden selektiert, und die cDNA aus den Plasmiden wurde mit EcoRI herausgeschnitten und gereinigt.

IV.A.17. Isolierung und Nucleotidsequenzen der HCV-cDNAs in den Clonen 14i, 11b, 7f, 7e, 8h, 33c, 14c, 8f, 33f, 33a und 39c

[0258] Die HCV-cDNAs in den Clonen 14i, 11b, 7f, 7e, 8h, 33c, 14c, 8f, 33f, 33g und 39c wurden nach der

Technik zur Isolierung überlappender cDNA-Fragmente aus der λ -gt11-Bank der HCV-cDNAs, wie in Abschnitt IV.A.1. beschrieben, isoliert. Die verwendete Technik entsprach im wesentlichen der in Abschnitt IV.A.3. beschriebenen, ausgenommen, daß die verwendeten Sonden aus der Nucleotidsequenz der zuletzt isolierten Clone von dem 5'- und dem 3'-Ende der kombinierten HCV-Sequenzen entwickelt wurden. Die Häufigkeit der Clone, die mit den nachstehend beschriebenen Sonden hybridisierten, betrug etwa eine aus 50000 in jedem Fall.

[0259] Die Nucleotidsequenzen der HCV-cDNAs in den Clonen 14i, 7f, 7e, 8h, 33c, 14c, 8f, 33f, 33g und 39c wurden im wesentlichen, wie in Abschnitt IV.A.2. beschrieben, bestimmt, ausgenommen, daß die aus diesen Phagen herausgeschnittene cDNA durch die cDNA, die aus Clon 5-1-1 isoliert worden war, ersetzt wurde.

[0260] Clon 33c wurde unter Verwendung einer Hybridisierungssonde auf der Basis der Nucleotidsequenz in Clon 40b isoliert. Die Nucleotidsequenz von Clon 40b ist in **Fig. 12** dargestellt. Die Nucleotidsequenz der zur Isolierung von 33c verwendeten Sonde war:

5' ATC AGG ACC GGG GTG AGA ACA ATT ACC ACT 3'

[0261] Die Sequenz der HCV-cDNA in Clon 33c und die Überlappung mit der in Clon 40b ist in **Fig. 15** gezeigt, die auch die davon codierten Aminosäuren zeigt.

[0262] Clon 8h wurde unter Verwendung einer Sonde auf der Basis der Nucleotidsequenz in Clon 33c isoliert. Die Nucleotidsequenz der Sonde lautete:

5' AGA GAC AAC CAT GAG GTC CCC GGT GTT C 3'.

[0263] Die Sequenz der HCV-cDNA in Clon 8h und die Überlappung mit der von Clon 33c und die davon codierten Aminosäuren sind in **Fig. 16** gezeigt.

[0264] Clon 7e wurde mit einer Sonde auf der Basis der Nucleotidsequenz in Clon 8h isoliert. Die Nucleotidsequenz der Sonde lautete:

5' TCG GAC CTT TAC CTG GTC ACG AGG CAC 3'.

[0265] Die Sequenz der HCV-cDNA in Clon 7e, die Überlappung, mit Clon 8h und die davon codierten Aminosäuren sind in **Fig. 17** gezeigt.

[0266] Clon 14c wurde mit einer Sonde auf der Basis der Nucleotidsequenz in Clon 25c isoliert. Die Sequenz von Clon 25c ist in **Fig. 13** gezeigt. Die Sonde zur Isolierung von Clon 14c hatte die Sequenz:

5' ACC TTC CCC ATT AAT GCC TAC ACC ACG GGC 3'.

[0267] Die Sequenz der HCV-cDNA in Clon 14c, ihre Überlappung mit der von Clon 25c und die davon codierten Aminosäuren sind in **Fig. 18** gezeigt.

[0268] Clon 8f wurde mit einer Sonde auf der Basis der Nucleotidsequenz von Clon 14c isoliert. Die Nucleotidsequenz der Sonde lautete:

5' TCC ATC TCT CAA GGC AAC TTG CAC CGC TAA 3'.

[0269] Die Sequenz der HCV-cDNA in Clon 8f, ihre Überlappung mit der von Clon 14c und die davon codierten Aminosäuren sind in **Fig. 19** gezeigt.

[0270] Clon 33f wurde unter Verwendung einer Sonde auf der Basis der in Clon 8f vorhandenen Nucleotidsequenz isoliert. Die Nucleotidsequenz der Sonde lautete:

5' TCC ATG GCT GTC CGC TTC CAC CTC CAA AGT 3'.

[0271] Die Sequenz der HCV-cDNA von Clon 33f, deren Überlappung mit der von Clon 8f und die dadurch codierten Aminosäuren sind in **Fig. 20** gezeigt.

[0272] Clon 33g wurde unter Verwendung einer Sonde auf der Basis der Nucleotidsequenz von Clon 33f isoliert. Die Nucleotidsequenz der Sonde lautete:

5' GCG ACA ATA CGA CAA CAT CCT CTG AGC CCG 3'.

[0273] Die Sequenz der HCV-cDNA von Clon 33g, deren Überlappung mit der von Clon 33f und die davon codierten Aminosäuren sind in **Fig. 21** gezeigt.

[0274] Clon 7f wurde unter Verwendung einer Sonde auf der Basis der Nucleotidsequenz von Clon 7e isoliert. Die Nucleotidsequenz der Sonde lautete:

5' AGC AGA CAA GGG GCC TCC TAG GGT GCA TAA T 3'.

[0275] Die Sequenz der HCV-cDNA von Clon 7f, deren Überlappung mit Clon 7e und die davon codierten Aminosäuren sind in **Fig. 22** gezeigt.

[0276] Clon 11b wurde unter Verwendung einer Sonde auf der Basis der Sequenz von Clon 7f isoliert. Die Nucleotidsequenz der Sonde lautete:

5' CAC CTA TGT TTA TAA CCA TCT CAC TCC TCT 3'.

[0277] Die Sequenz der HCV-cDNA in Clon 11b, deren Überlappung mit Clon 7f und die davon codierten Aminosäuren sind in **Fig. 23** gezeigt.

[0278] Clon 14i wurde unter Verwendung einer Sonde auf der Basis der Nucleotidsequenz von Clon 11b isoliert. Die Nucleotidsequenz der Sonde lautete:

5' CTC TGT CAC CAT ATT ACA AGC GCT ATA TCA 3'.

[0279] Die Sequenz der HCV-cDNA von Clon 14i, deren Überlappung mit 11b und die davon codierten Aminosäuren sind in **Fig. 24** gezeigt.

[0280] Clon 39c wurde unter Verwendung einer Sonde auf der Basis der Nucleotidsequenz von Clon 33g isoliert. Die Nucleotidsequenz der Sonde lautete:

5' CTC GTT GCT ACG TCA CCA CAA TTT GGT GTA 3'.

[0281] Die Sequenz der HCV-cDNA in Clon 39c, deren Überlappung mit Clon 33g und die davon codierten Aminosäuren sind in **Fig. 25** gezeigt.

IV.A.18. Uusammenaesezte HCV-cDNA-Sequenz abgeleitet von den isolierten Clonen, die HCV-cDNA enthalten

[0282] Die HCV-cDNA-Sequenzen in den isolierten Clonen, die vorstehend beschrieben wurden, wurden ausgerichtet, um eine zusammengesetzte HCV-cDNA-Sequenz zu schaffen. Die isolierten Clone, die in der 5'→3'-Richtung ausgerichtet sind, sind: 14i, 7f, 7e, 8h, 33c, 40b, 37b, 35, 36, 81, 32, 33b, 25c, 14c, 8f, 33f, 33g und 39c.

[0283] Eine zusammengesetzte HCV-cDNA-Sequenz, abgeleitet von den isolierten Clonen, und die davon codierten Aminosäuren sind in **Fig. 2b** gezeigt.

[0284] Bei der Schaffung der zusammengesetzten Sequenz wurden die folgenden Sequenzheterogenitäten berücksichtigt. Clon 33c enthält eine HCV-cDNA von 800 Basenpaaren, die mit den cDNAs in den Clonen 40b und 37c überlappen. In Clon 33c, ebenso wie in fünf anderen überlappenden Clonen, ist das Nucleotid #789 ein G. Jedoch ist in Clon 37b (siehe Abschnitt IV.A.11.) das entsprechende Nucleotid ein A. Dieser Sequenzunterschied erzeugt eine offensichtliche Heterogenität in den davon codierten Aminosäuren, die entweder CYS oder TYR für G bzw. A sein wurden. Diese Heterogenität kann wichtige weitere Folgen hinsichtlich der Proteinfaltung besitzen.

[0285] Der Nucleotidrest #2 in der HCV-cDNA von Clon 8h ist ein T. Jedoch ist, wie nachstehend gezeigt, der entsprechende Rest in Clon 7e ein A. Ferner findet sich ein A in dieser Position auch in drei anderen isolierten, überlappenden Clonen. So kann der T-Test in Clon 8h ein Clonierungsartefakt darstellen. Daher wird in **Fig. 26** der Rest in dieser Position als A bezeichnet.

[0286] Das 3'-terminale Nucleotid in der HCV-cDNA von Clon 8f ist ein G. Jedoch ist der entsprechende Rest in Clon 33f und in zwei anderen überlappenden Clonen ein T. Daher ist in **Fig. 26** der Rest in dieser Position als T bezeichnet.

[0287] Die 3'-terminale Sequenz in der HCV-cDNA von Clon 33f ist TTGC. Jedoch ist die entsprechende Sequenz in Clon 33g und in zwei anderen überlappenden Clonen ATTC. Daher ist in **Fig. 26** der entsprechende Bereich als ATTC dargestellt.

[0288] Der Nucleotidrest #4 in der HCV-cDNA von Clon 33g ist ein T. Jedoch ist in Clon 33f und zwei anderen überlappenden Clonen der entsprechende Rest ein A. Daher ist in **Fig. 26** der entsprechende Rest als A bezeichnet.

[0289] Der 3'-Terminus von Clon 14i ist ein AA, wohingegen das entsprechende Dinucleotid in Clon 11b und in drei anderen Clonen TA ist. Daher ist in **Fig. 26** der TA-Rest dargestellt.

[0290] Die Lösung der anderen Sequenzheterogenitäten ist vorstehend diskutiert.

[0291] Eine Untersuchung der zusammengesetzten HCV-cDNA zeigt, daß sie ein großes ORF enthält. Dies legt nahe, daß das virale Genom in ein großes Polypeptid translatiert wird, das begleitend mit oder anschließend an die Translation prozessiert wird.

IV.A.19. Isolierung und Nucleotidsequenzen der HCV-cDNAs in den Clonen 12f, 35f, 19q, 26q und 15e

[0292] Die HCV-cDNAs in den Clonen 12f, 35f, 19g, 26g und 15e wurden im wesentlichen nach der in Abschnitt IV.A.17. beschriebenen Technik isoliert, ausgenommen, daß die Sonden, wie nachstehend angegeben,

lauteten. Die Häufigkeit der Clone, die mit den Sonden hybridisierten, betrug etwa 1 aus 50000 in jedem Fall. Die Nucleotidsequenzen der HCV-cDNAs in diesen Clonen wurden im wesentlichen, wie in Abschnitt IV.A.2. beschrieben, bestimmt, außer daß die cDNA der angegebenen Clone durch die aus Clon 5-1-1 isolierte cDNA ersetzt wurde.

[0293] Die Isolierung von Clon 12f, der cDNA stromaufwärts der HCV-cDNA in **Fig. 26** enthält, wurde unter Verwendung einer Hybridisierungssonde, basierend auf der Sequenz der Nucleotide in Clon 14i, durchgeführt. Die Nucleotidsequenz der Sonde lautete:

5' TGC TTG TGG ATG ATG CTA CTC ATA TCC CAA 3'.

[0294] Die HCV-cDNA-Sequenz von Clon 12f, deren Überlappung mit Clon 14i und die davon codierten Aminosäuren sind in **Fig. 27** gezeigt.

[0295] Die Isolierung von Clon 35f, der cDNR stromabwärts der HCV-cDNA in **Fig. 26** enthält, wurde unter Verwendung einer Hybridisierungssonde auf der Basis der Sequenz der Nucleotide in Clon 39c durchgeführt. Die Nucleotidsequenz der Sonde lautete:

5' AGC AGC GGC GTC AAA AGT GAA GGC TAA CTT 3'.

[0296] Die Sequenz des Clons 35f, deren Überlappung mit der Sequenz von Clon 39c und die davon codierten Aminosäuren sind in **Fig. 28** gezeigt.

[0297] Die Isolierung von Clon 19g wurde unter Verwendung einer Hybridisierungssonde auf der Basis der 3'-Sequenz von Clon 35f durchgeführt. Die Nucleotidsequenz der Sonde lautete:

5' TTC TCG TAT GAT ACC CGC TGC TTT GAC TCC 3'.

[0298] Die HCV-cDNA-Sequenz von Clon 19g, deren Überlappung mit der Sequenz von Clon 35f und die davon codierten Aminosäuren sind in **Fig. 29** gezeigt.

[0299] Die Isolierung von Clon 26g wurde unter Verwendung einer Hybridisierungssonde auf der Basis der 3'-Sequenz von Clon 19g durchgeführt. Die Nucleotidsequenz der Sonde lautete:

5' TGT GTG GCG ACG ACT TAG TCG TTA TCT GTG 3'.

[0300] Die HCV-cDNA-Sequenz von Clon 26g, deren Überlappung mit der Sequenz von Clon 19g und die davon codierten Aminosäuren sind in **Fig. 30** gezeigt.

[0301] Clon 15e wurde unter Verwendung einer Hybridisierungssonde auf der Basis der 3'-Sequenz von Clon 26g isoliert. Die Nucleotidsequenz der Sonde lautete:

5' CAC ACT CCA GTC AAT TCC TGG CTA GGC AAC 3'.

[0302] Die HCV-cDNA-Sequenz von Clon 15e, deren Überlappung mit der Sequenz von Clon 26g und die davon codierten Aminosäuren sind in **Fig. 31** gezeigt.

[0303] Die in diesem Abschnitt beschriebenen Clone wurden bei der ATCC unter den in Abschnitt II.A. beschriebenen Bedingungen hinterlegt und mit den folgenden Hinterlegungs-Nr. versehen.

<u>λ-gt11</u>	<u>ATCC Nr.</u>	<u>Hinterlegungsdatum</u>
Clon 12f	40514	10. Nov. 1988
Clon 35f	40511	10. Nov. 1988
Clon 15e	40513	10. Nov. 1988
Clon k9-1	40512	10. Nov. 1988

[0304] Die HCV-cDNA-Sequenzen der vorstehend beschriebenen, isolierten Clone wurden ausgerichtet, wodurch eine zusammengesetzte HCV-cDNA-Sequenz gebildet wurde. Die isolierten Clone, die in der 5'→3'-Richtung ausgerichtet sind, sind 12f, 14i, 7f, 7e, 8h, 33c, 40b, 37b, 35, 36, 81, 32, 33b, 25c, 14c, 8f, 33f, 33g, 39c, 35f, 19g, 26g und 15e.

[0305] Eine zusammengesetzte HCV-cDNA-Sequenz, abgeleitet von den isolierten Clonen und die davon codierten Aminosäuren sind in **Fig. 32** gezeigt.

IV.A.20. Alternatives Verfahren zur Isolierung der cDNA-Sequenzen stromaufwärts der HCV-cDNA-Sequenz in Clon 12f

[0306] Basierend auf der häufigsten 5'-HCV-Sequenz in **Fig. 32**, die von der HCV-cDNA von Clon 12f abgeleitet ist, werden kleine synthetische Oligonucleotid-Primer der reversen Transkriptase synthetisiert und verwendet, um die entsprechende Sequenz der genomischen HCV-RNA zu binden, um die reverse Transkription

der stromaufwärts liegenden Sequenzen zu initiieren. Die Primer-Sequenzen sind der bekannten 5'-terminalen Sequenz von Clon 12f benachbart, aber ausreichend stromabwärts, um die Entwicklung der Sondensequenzen stromaufwärts der Primer-Sequenz zu ermöglichen. Bekannte Standardverfahren zur Initiierung und Clonierung werden verwendet. Die so erhaltenen cDNA-Banken werden mit Sequenzen stromaufwärts der Startstellen (abgeleitet von der ermittelten Sequenz von Clon 12f) abgesucht. Die genomische HCV-RNA wird entweder von Plasma- oder Leberproben von Schimpansen mit NANBH oder von analogen Proben von Menschen mit NANBH erhalten.

IV.A.21. Alternatives Verfahren unter Anfügung eines Schwanzes, um Sequenzen von dem 5'-terminalen Bereich des HCV-Genoms zu isolieren

[0307] Um die äußeren 5'-terminalen Sequenzen des HCV-RNA-Genoms zu isolieren, wird das cDNA-Produkt der ersten Runde der reversen Transkription, das mit Matrizen-RNA dupliziert ist, mit einem Oligo C-Schwanz versehen. Dies wird durch Inkubieren des Produkts mit terminaler Transferase in Gegenwart von CTP durchgeführt. Die zweite Runde der cDNA-Synthese, die die Komplementärsequenz des ersten cDNA-Stranges ergibt, wird unter Verwendung von Oligo-G als Primer für die reverse Transkriptase-Reaktion durchgeführt. Die Quellen für die genomische HCV-RNA sind in Abschnitt IV.A.20. beschrieben. Die Verfahren zur Schwanzbildung mit terminaler Transferase und für die reverse Transkriptasereaktionen sind wie in Maniatis et al. (1982) beschrieben. Die cDNA-Produkte werden dann cloniert, abgesucht und sequenziert.

IV.A.22. Alternatives Verfahren unter Anfügen eines Schwanzes um Sequenzen von dem 3'-terminalen Bereich des HCV-Genoms zu isolieren

[0308] Diese Verfahren beruht auf früher verwendeten Verfahren zur Clonierung der cDNAs der Flavivirus-RNA. Bei diesem Verfahren wird die RNA denaturierenden Bedingungen unterworfen, um die Sekundärstrukturen an dem 3'-Terminus zu entfernen, und dann mit Poly-A-Polymerase unter Verwendung von rATP als Substrat mit einem Schwanz versehen. Die reverse Transkription der mit einem Poly-A-Schwanz versehenen RNA wird durch die reverse Transkriptase katalysiert, wobei Oligo-dT als Primer verwendet wird. Die zweiten cDNA-Stränge werden synthetisiert, die cDNA-Produkte cloniert, abgesucht und sequenziert.

IV.A.23. Bildung von λ -gt11-HCV-cDNA-Banken, die größere cDNA-Insertionen enthalten

[0309] Das zur Bildung und zum Absuchen der λ -gt11-Banken verwendete Verfahren ist im wesentlichen, wie in Abschnitt IV.A.1. beschrieben, außer, daß die Bank aus einem Pool von cDNAs mit größerer Größe, die von der Sepharose CL-4B-Säule eluierten, gebildet wird.

IV.A.24. Bildung von HCV-cDNA-Banken unter Verwendung synthetischer Oligomere als Primer

[0310] Neue HCV-cDNA-Banken wurden aus der RNA, abgeleitet von dem Sammelplasma infektiöser Schimpansen, wie in Abschnitt IV.A.1. beschrieben, und aus der Poly A⁺-RNA-Traktion, abgeleitet von der Leber dieses infizierten Tieres, hergestellt. Die cDNA wurde im wesentlichen, wie von Gubler und Hoffman (1983) beschrieben, konstruiert, außer daß die Primer für die Synthese des ersten cDNA-Stranges zwei synthetische Oligomere auf der Basis der Sequenz des vorstehend beschriebenen HCV-Genoms waren. Die Primer auf der Basis der Sequenz von Clon 11b und 7e waren

5' CTG GCT TGA AGA ATC 3'

bzw.

5' AGT TAG GCT GGT GAT TAT GC 3'.

[0311] Die so erhaltenen cDNAs wurden in λ -Bakteriophagenvektoren cloniert und mit verschiedenen anderen synthetischen Oligomeren, deren Sequenzen auf der HCV-Sequenz in **Fig. 32** beruhten, abgesucht.

IV.B. Expression der Polypeptide die von den HCV-cDNAs codiert werden und Identifizierung der Expressionsprodukte als HCV-induzierte Antigene

IV.B.1. Expression des von Clon 5-1-1 codierten Polypeptids

[0312] Das von Clon 5-1-1 codierte HCV-Polypeptid (vergleiche den vorstehenden Abschnitt IV.A.2.) wurde als Fusionspolypeptid mit Superoxiddismutase (SOD) exprimiert. Dies wurde durch Subclonieren der cDNA-Insertion von Clon 5-1-1 in den Expressionsvektor pSODcf1 (Steimer et al (1986)) wie folgt durchgeführt.

[0313] Zuerst wurde die aus pSODcf1 isolierte DNA mit BamHI und EcoR2 behandelt, und der folgende Linker wurde in die durch Restriktionsenzyme erzeugte lineare DNA ligiert:

```

5 '   GAT CCT GGA ATT CTG ATA A           3 '
3 '           GA CCT TAA GAC TAT TTT AA    5 '

```

[0314] Nach dem Clonieren wurde das Plasmid, das die Insertion enthielt, isoliert.

[0315] Das Plasmid, das die Insertion enthielt, wurde mit EcoRI gespalten. Die HCV-cDNA-Insertion in Clon 5-1-1 wurde mit EcoRI herausgeschnitten und in diese durch EcoRI linearisierte Plasmid-DNA ligiert. Das DNA-Gemisch wurde zur Transformation des E. coli-Stammes D1210 (Sadler et al. (1980)) verwendet. Rekombinanten mit der 5-1-1-cDNA in korrekter Orientierung zur Expression des ORFs, die in **Fig. 1** gezeigt sind, wurden durch Restriktionskartierung und Nucleotidsequenzierung identifiziert.

[0316] Die rekombinanten Bakterien aus einem Clon wurden zur Expression des SOD-NANB₅₋₁₋₁-Polypeptids durch Züchten der Bakterien in Gegenwart von IPTG veranlaßt.

IV.B.2. Expression des Polypeptids, das von Clon 81 codiert wurde

[0317] Die in Clon 81 enthaltene HCV-cDNA wurde als SOD-NANB₈₁-Fusionspolypeptid exprimiert. Das Verfahren zur Herstellung des Vektors, der dieses Fusionspolypeptid codiert, war dem analog, das zur Bildung des Vektors, der SOD-NANB₅₋₁₋₁ codiert, verwendet wurde, ausgenommen, daß die Quelle der HCV-cDNA Clon 81 war, der, wie in Abschnitt IV.A.3. beschrieben, isoliert wurde, und für den die cDNA-Sequenz, wie in Abschnitt IV.A.4. beschrieben, bestimmt wurde. Die Nucleotidsequenz der HCV-cDNA in Clon 81 und die vermutliche Aminosäuresequenz des davon codierten Polypeptids sind in **Fig. 4** gezeigt.

[0318] Die HCV-cDNA-Insertion in Clon 81 wurde mit EcoRI herausgeschnitten und in pSODcf1 ligiert, das den Linker (vergleiche IV.B.1) enthielt und das durch Behandlung mit EcoRI linearisiert worden war. Das DNA-Gemisch wurde zur Transformation des E. coli-Stammes D1210 verwendet. Rekombinanten mit der HCV-cDNA von Clon 81 in der korrekten Orientierung zur Expression des ORFs, die in **Fig. 4** gezeigt sind, wurden durch Restriktionskartierung und Nucleotidsequenzierung identifiziert.

[0319] Die rekombinanten Bakterien aus einem Clon wurden zur Expression des SOD-NANB₈₁-Polypeptids durch Züchten der Bakterien in Gegenwart von IPTG veranlaßt.

IV.B.3. Identifizierung des Polypeptids, das von Clon 5-1-1 codiert ist, als HCV- und NANBH-assoziiertes Antigen

[0320] Das von der HCV-cDNA des Clons 5-1-1 codierte Polypeptid wurde als ein NANBH-assoziiertes Antigen identifiziert, indem gezeigt wurde, daß Seren von Schimpansen und Menschen, die mit NANBH infiziert waren, immunologisch mit dem Fusionspolypeptid SOD-NANB₅₋₁₋₁ reagierten, das aus Superoxiddismutase an dessen N-terminalem Ende und dem 5-1-1-Antigen im Leseraster an dessen C-terminalem Ende besteht. Dies wurde durch "Western"-Blotting (Towbin et al. (1979)) wie folgt durchgeführt.

[0321] Ein rekombinanter Stamm von Bakterien, die mit einem Expressionsvektor transformiert waren, der das SOD-NANB₅₋₁₋₁-Polypeptid codiert, das in Abschnitt IV.B.1. beschrieben ist, wurde zur Expression des Fusionspolypeptids durch Züchten in Gegenwart von IPTG veranlaßt. Das Gesamtbakterienlysat wurde einer Elektrophorese auf Polyacrylamidgel in Gegenwart von SDS gemäß Laemmli (1970) unterworfen. Die getrennten Polypeptide wurden auf Nitrocellulosefilter (Towbin et al. (1979)) überführt. Die Filter wurden dann in dünne Streifen geschnitten, und die Streifen wurden getrennt mit verschiedenen Schimpansen- und Mensch-Seren inkubiert. Die gebundenen Antikörper wurden durch weitere Inkubation mit ¹²⁵I-markiertem Schaf-Anti-Mensch-Ig, wie in Abschnitt IV.A.1. beschrieben, nachgewiesen.

[0322] Die Charakterisierung der Schimpansenseren, die für die Western-Blots verwendet wurden, und die Ergebnisse, die in den Fotos der Autoradiographiestreifen gezeigt sind, sind in **Fig. 33** dargestellt. Nitrocellulosestreifen, die Polypeptide enthielten, wurden mit Seren inkubiert, die von Schimpansen zu verschiedenen Zeiten während akuter NANBH-Infektionen (Hutchinson-Strain) (Bahnen 1–16), Hepatitis A-Infektionen (Bahnen 17–24 und 26–33) und Hepatitis B-Infektionen (Bahnen 34–44) abgeleitet sind. Die Bahnen 25 und 45 zeigten positive Kontrollen, bei denen die Immunblots mit Serum aus dem Patienten, der zur Identifizierung des

rekombinanten Clons 5-1-1 im ursprünglichen Absuchen der λ -gt11-cDNA-Bank (vergleiche Abschnitt IV.A.1.) verwendet wurde, inkubiert wurden.

[0323] Die in den Kontrollbahnen 25 und 45 in **Fig. 23** sichtbare Bande zeigt die Bindung der Antikörper an die NANB₅₋₁₋₁-Einheit des SOD-Fusionspolypeptids. Diese Antikörper zeigen keine Bindung gegenüber SOD allein, da dies auch als negative Kontrolle in diesen Proben enthalten war und als Bande, die signifikant schneller als das SOD-NANB₅₋₁₋₁-Fusionspolypeptid wanderte, erschienen wäre.

[0324] Die Bahnen 1–16 von **Fig. 33** zeigen die Bindung der Antikörper in Serumproben von vier Schimpansen. Die Seren wurden kurz vor der Infektion mit NANBH und nach und nach während der akuten Infektion erhalten. Wie aus der Figur hervorgeht, induzierten alle vier Tiere schließlich zirkulierende Antikörper gegen dieses Polypeptid während des letzten Teils von oder nach der akuten Phase, während Antikörper, die immunologisch mit dem SOD-NANB₅₋₁₋₁-Polypeptid reagierten, in den Serumproben fehlten, die vor der Verabreichung des infektiösen HCV-Inoculums und während der frühen akuten Phase der Infektion erhalten wurden. Zusätzliche Banden, die auf den Immunblots bei den Schimpansen Nr. 3 und 4 beobachtet wurden, waren auf die Hintergrundbindung an bakterielle Proteine des Wirts zurückzuführen.

[0325] Im Gegensatz zu den Ergebnissen, die mit Seren von Schimpansen, die mit NANBH infiziert waren, beobachtet wurden, wurde die Entwicklung von Antikörpern gegen die NANB₅₋₁₋₁-Einheit des Fusionspolypeptids bei vier Schimpansen, die mit HAV infiziert waren, oder drei Schimpansen, die mit HBV infiziert waren, nicht beobachtet. Die einzige Bindung in diesen Fällen war die Hintergrundbindung an die bakteriellen Proteine des Wirts, die auch in den HCV-infizierten Proben auftrat.

[0326] Die Charakterisierung der für die Western-Blots verwendeten Humansen und die Ergebnisse, die in dem Foto der Autoradiographiestreifen gezeigt sind, sind in **Fig. 34** dargestellt. Nitrocellulosestreifen, die Polypeptide enthalten, wurden mit zu verschiedenen Zeiten während Infektionen mit NANBH (Bahnen 1–21), HAV (Bahnen 33–40) und HBV (Bahnen 41–49) erhaltenen Seren von Menschen inkubiert. Die Bahnen 25 und 50 zeigen positive Kontrollen, in denen die Immunblots mit Serum von dem Patienten, das für das ursprüngliche Absuchen der λ -gt11-Bank verwendet wurde, wie vorstehend beschrieben, inkubiert wurden. Die Bahnen 22–24 und 26–32 zeigen "nicht-infizierte" Kontrollen, in denen die Seren von "normalen" Blutspendern stammen.

[0327] Wie aus **Fig. 34** hervorgeht, enthielten die Seren von neun NANBH-Patienten, einschließlich des Serums, das zum Absuchen der λ -gt11-Bank verwendet wurde, Antikörper gegen die NANB₅₋₁₋₁-Einheit des Fusionspolypeptids. Seren von diesen Patienten mit NANBH enthielten diese Antikörper nicht. Es ist möglich, daß die Anti-NANB₅₋₁₋₁-Antikörper sich zu einem späteren Zeitpunkt bei diesen Patienten entwickeln. Es ist auch möglich, daß diese fehlende Reaktion von einem anderen NANBV-Erreger stammte, der die Ursache der Erkrankung bei diesen Individuen ist, von denen das nichtansprechende Serums entnommen war.

[0328] Die **Fig. 34** zeigt auch, daß Seren von vielen Patienten, die mit HAV und HBV infiziert waren, keine Anti-NANB₅₋₁₋₁-Antikörper enthielten, und daß diese Antikörper auch in Seren von "normalen" Kontrollen nicht vorhanden waren. Obwohl ein HAV-Patient (Bahn 36) anscheinend Anti-NANB₅₋₁₋₁-Antikörper enthält, ist es möglich, daß dieser Patient zuvor mit HCV infiziert worden war, da das Auftreten von NANBH sehr häufig ist, und da es oft subklinisch ist.

[0329] Die serologischen Studien zeigen, daß die cDNA in Clon 5-1-1 Epitope codiert, die spezifisch von Seren von Patienten und Tieren, die mit BB-NANBV infiziert waren, erkannt werden. Zusätzlich scheint die cDNA nicht von dem Primatengenom abgeleitet zu sein. Eine Hybridisierungssonde von Clon 5-1-1 oder von Clon 81 hybridisierte nicht mit "Southern"-Blots von zur Kontrolle verwendeter genomischer DNA von Menschen und Schimpansen, die nicht infiziert waren, unter Bedingungen, unter denen einzigartige, in einer Kopie vorhandene Gene nachweisbar sind. Diese Sonden hybridisierten nicht mit Southern-Blots von zur Kontrolle verwendeter genomischer DNA von Rindern.

IV.B.4. Expression des Polypeptids, das von einem zusammengesetzten Produkt der HCV-cDNAs in den Clonen 36, 81 und 32 codiert wird

[0330] Das HCV-Polypeptid, das von dem ORF codiert wird, der sich durch die Clone 36, 81 und 32 erstreckt, wurde als Fusionspolypeptid mit SOD exprimiert. Diese wurde durch Insertion der zusammengesetzten cDNA, C100, in eine Expressionskassette, die das menschliche Superoxiddismutasegen enthält, Insertion der Expressionskassette in einen Expressionsvektor der Hefe und Expression des Polypeptids in Hefe durchgeführt.

[0331] Eine Expressionskassette, die die zusammengesetzte C100-cDNA, abgeleitet von den Clonen 36, 81 und 32, enthielt, wurde durch Insertion des ≈ 1270 bp EcoRI-Fragments in die EcoRI-Spaltstelle des Vektors pS3-56 (auch als pS356 bezeichnet), konstruiert, wodurch das Plasmid pS3-56C100 erhalten wurde. Die Konstruktion von C100 ist in dem vorstehenden Abschnitt IV.A.16 beschrieben.

[0332] Der Vektor pS3-56, der ein pBR322-Derivat ist, enthält eine Expressionskassette, die aus dem ADH1/GAPDH-Hybrid-Hefepromotor stromaufwärts des menschlichen Superoxiddismutasegens und einem stromabwärts liegenden GAPDH-Transkriptionsterminator besteht. Eine ähnliche Kassette, die diese Kontrol-

lelemente und das Superoxiddismutasegen enthält, wurde in Cousens et al. (1987) und in der anhängigen EP-A 196 056, veröffentlicht am 1. Oktober 1986, die dem hier benannten Anmelder gehört, beschrieben. Die Kassette in pS3-56 unterscheidet sich jedoch von der in Cousens et al. (1987) dahingehend, daß das heterologe Proinsulingen und das Immunglobulingelenk deletiert sind, und daß auf Gln₁₅₄ der Superoxiddismutase eine Adaptorsequenz folgt, die eine EcoRI-Spaltstelle enthält. Die Sequenz des Adaptors lautet:

```
5' -AAT TTG GGA ATT CCA TAA TGA G      -3'
      AC CCT TAA GGT ATT ACT CAG CT
```

[0333] Die EcoRI-Spaltstelle ermöglicht die Insertion der heterologen Sequenzen, die bei Expression von einem Vektor, der die Kassette enthält, Polypeptide ergeben, die an Superoxiddismutase über einen Oligopeptidlinker, der die Aminosäuresequenz:

```
-asn-leu-gly-ile-arg-
```

enthält, fusioniert sind.

[0334] Eine Probe von pS356 wurde am 29. April 1988 gemäß den Bedingungen des Budapester Vertrags bei der American Type Culture Collection (ATCC), 12301 Parklawn Dr., Rockville, Maryland 20853, hinterlegt und erhielt die Hinterlegungs-Nr. 67683. Die Bedingungen zur Verfügbarkeit und Zugänglichkeit der Hinterlegung und zur Aufrechterhaltung der Hinterlegung sind diejenigen, die in Abschnitt II.A. für die Stämme, die NAN-BV-cDNAs enthalten, ausgeführt sind. Diese Hinterlegung erfolgte aus Gründen der Zweckmäßigkeit und ist angesichts der ausführlichen Beschreibung für die Durchführung der Erfindung nicht erforderlich. Auf das hinterlegte Material wird hiermit Bezug genommen.

[0335] Nachdem Rekombinanten, die die C100-cDNA-Insertion in korrekter Orientierung enthalten, isoliert wurden, wurde die Expressionskassette, die die C100-cDNA enthielt, aus pS3-56_{C100} mit BamHI herausgeschnitten, und ein Fragment von = 3400 bp, das die Kassette enthält, wurde isoliert und gereinigt. Dieses Fragment wurde dann in die BamHI-Spaltstelle des Hefevektors pAB24 insertiert.

[0336] Das Plasmid pAB24, dessen signifikante Eigenschaften in **Fig. 35** gezeigt sind, ist ein Hefe-shuttle-vektor, der die vollständige 2 µ-Sequenz zur Replikation (Broach (1981)) und pBR322-Sequenzen enthält. Er enthält auch das URA3-Gen der Hefe, das von dem Plasmid YEp24 [Botstein et al. (1979)] abgeleitet ist und das LEU^{2d}-Gen, das von dem Plasmid pC1/1 abgeleitet ist (EP-Veröffentlichungs-Nr. 116 201). Das Plasmid pAB24 wurde durch Spalten von YEp24 mit EcoRI und Religieren des Vektors unter Entfernung der 2 µ-Teilsequenzen konstruiert. Das so erhaltene Plasmid YEP24δRI wurde durch Spalten mit ClaI linearisiert und mit dem vollständigen 2 µ-Plasmid, daß mit ClaI linearisiert worden war, ligiert. Das so erhaltene Plasmid, pC-Bou, wurde dann mit XbaI gespalten, und das 8605 bp lange Vektorfragment wurde über ein Gel isoliert. Dieses isolierte XbaI-Fragment wurde mit einem 4460 bp langen XbaI-Fragment, das das aus pC1/1 isolierte LEU^{2d}-Gen enthielt, ligiert. Das LEU^{2d}-Gen ist in die gleiche Richtung orientiert wie das URA3-Gen. Die Insertion der Expression erfolgt in der einzigen BamHI-Spaltstelle der pBR322-Sequenz, wodurch das Gen für bakterielle Tetracyclinresistenz unterbrochen wurde.

[0337] Das rekombinante Plasmid, das die SOD-C110-Expressionkassette enthielt, pAB24C100-3, wurde in den Hefestamm JSC 308 ebenso wie in andere Hefestämme transformiert. Die Zellen wurden, wie von Hinnen et al. (1978) beschrieben, transformiert und auf ura-selektive Platten plattiert. Die einzelnen Kolonien wurden in leu-selektive Medien inokuliert und bis zur Sättigung gezüchtet. Die Kultur wurde zur Expression des SOD-C100-Polypeptids (als C100-3 bezeichnet) durch Wachstum in 1% Glucose enthaltendem YEP induziert.

[0338] Der Stamm JSC 308 gehört dem Genotyp MAT⁺, leu2, ura3(del) DM15 (Gap/ADR1), welche an dem ADR1-Locus integriert sind, an. In JSC 308 führt die Überexpression des Genprodukts des positiven Aktivators, ADR1, zur Hyperderepression (bezogen auf einen ADR1-Wildtyp als Kontrolle) und signifikant höheren Ausbeuten der exprimierten heterologen Proteine, wenn solche Proteine über ein ADH2-UAS-regulatorisches System synthetisiert werden.

[0339] Eine JSC-308-Probe wurde am 5. Mai 1988 bei der ATCC gemäß den Bedingungen des Budapester Vertrags hinterlegt und erhielt die Hinterlegungs-Nr. 20879. Die Bedingungen für die Verfügbarkeit und Zugänglichkeit der Hinterlegung sind die gleichen, wie sie in Abschnitt II.A. für die Stämme, die HCV-cDNAs enthalten, aufgeführt wurden.

[0340] Das vollständige C100-3-Fusionspolypeptid, das von pAB24C100-3 codiert wurde, sollte 154 Aminosäuren von menschlicher SOD am Aminoterminal, 5 Aminosäurereste, abgeleitet von dem synthetischen Adaptor, der die EcoRI-Spaltstelle enthält, 363 Aminosäurereste, abgeleitet von der C100-cDNA und 5 carboxylterminale Aminosäuren, abgeleitet von der MS2-Nucleotidsequenz, welche sich an die HCV-cDNA-Sequenz in Clon 32 anschließt (siehe Abschnitt IV.A.7.), enthalten. Die vermutliche Aminosäuresequenz des Carboxylterminus dieses Polypeptids, welche mit dem vorletzten AlaRest von SOD beginnt, ist in **Fig. 36** gezeigt. Ebenfalls gezeigt ist die Nucleotidsequenz, die diesen Teil des Polypeptids codiert.

IV.B.5. Identifizierung des Polypeptids das von C100 als NANBH assoziiertes Antigen codiert wird

[0341] Das C100-3-Fusionspolypeptid, das von dem Plasmid pAB24C100-3 in dem Hefestamm JSC 308 exprimiert wurde, wurde hinsichtlich der Größe charakterisiert, und das von C100 codierte Polypeptid wurde als ein NANBH-assoziiertes Antigen durch dessen immunologische Reaktivität mit Serum von einem Menschen mit chronischer NANBH identifiziert.

[0342] Das C100-3-Polypeptid, das, wie in Abschnitt IV.B.4 beschrieben, exprimiert wurde, wurde wie folgt analysiert. JSC 300-Zellen von Hefe wurden mit pAB24 oder mit pABC24100-3 transformiert und wurden zur Expression des heterologen, durch das Plasmid codierten Polypeptids induziert. Die induzierten Hefezellen in 1 ml Kultur (OD_{650} nm ~ 20) wurden durch 1-minütige Zentrifugation bei 10000 UpM pelletiert und durch heftiges Mischen (10×1 min) mit 2 Volumina Lösung und 1 Volumen Glaskugeln (0,2 mm Durchmesser) lysiert. Die Lösung enthielt 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) und 1 µg/ml Pepstatin. Das unlösliche Material in diesem Lysat, das das C100-3-Polypeptid enthielt, wurde durch Zentrifugation (10000 UpM für 5 min) gewonnen und durch 5-minütiges Kochen in einem Laemmli-SDS-Probenpuffer aufgelöst [vergleiche Laemmli (1970)]. Eine Menge des Polypeptids, die der in 0,3 ml der induzierten Hefekultur äquivalent war, wurde einer Elektrophorese auf 10%igen Polyacrylamidgelen in Gegenwart von SDS gemäß Laemmli (1970) unterworfen. Proteinstandards wurden auf den Gelen einer gleichzeitigen Elektrophorese unterworfen. Gele, die die exprimierten Polypeptide enthielten, wurden entweder mit Coomassie-Brillantblau gefärbt oder einem "Western"-Blotting, wie in Abschnitt IV.B.2. beschrieben, unter Verwendung von Serum von einem Patienten mit chronischer NANBH unterworfen, um die immunologische Reaktivität der von pAB24 und von pAB24C100-3 exprimierten Polypeptide zu bestimmen. Die Ergebnisse sind in **Fig. 37** gezeigt. Die Polypeptide in **Fig. 37A** wurden mit Coomassie-Brillantblau gefärbt. Das (die) unlösliche(n) Polypeptid(e) aus dem mit pAB24 transformierten JSC 308 und aus zwei verschiedenen mit pAB24C100-3 transformierten JSC-Kolonien ist (sind) in Bahn 1 (pAB24) bzw. den Bahnen 2 und 3 gezeigt. Ein Vergleich der Bahnen 2 und 3 mit der Bahn 1 zeigt die induzierte Expression eines Polypeptids entsprechend einem Molekulargewicht von ≈ 54000 Dalton von mit pAB24C100-3 transformiertem JSC 308, das in mit pAB24 transformiertem JSC 308 nicht induziert wird. Dieses Polypeptid ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

[0343] Die **Fig. 37B** zeigt die Ergebnisse der Western-Blots der unlöslichen Polypeptide, die von mit pAB24 (Bahn 1) oder mit pAB24C100-3 (Bahn 2) transformiertem JSC 308 exprimiert wurden. Die von pAB24 exprimierten Polypeptide reagieren immunologisch nicht mit Serum von einem Menschen mit NANBH. Jedoch, wie durch den Pfeil gekennzeichnet, exprimierte mit pAB24C100-3 transformierter JSC 308 ein Polypeptid mit einem Molekulargewicht von ≈ 54000 Dalton, das immunologisch nicht mit menschlichem NANBH-Serum reagierte. Die anderen immunologisch reaktiven Polypeptide in Bahn 2 können Abbau- und/oder Aggregationsprodukte dieses 54000 Dalton Polypeptids sein.

IV.B.6. Reinigung des Fusionspolypeptids C100-3

[0344] Das Fusionspolypeptid C100-3 aus SOD am N-Terminus und einem C100-HCV-Polypeptid im Leseraster am C-Terminus wurde durch differentielle Extraktion der unlöslichen Fraktion der extrahierten Wirtszellen, in denen das Polypeptid exprimiert wurde, gereinigt.

[0345] Das Fusionspolypeptid C100-3 wurde in dem mit pAB24C100-3 transformierter: Hefestamm JSC 308, wie in Abschnitt IV.B.4 beschrieben, exprimiert. Die Hefezellen wurden dann durch Homogenisierung lysiert, das unlösliche Material in dem Lysat wurde bei einem pH-Wert von 12,0 extrahiert, und C100-3 in der verbleibenden unlöslichen Fraktion wurde in einem SDS-haltigen Puffer solubilisiert.

[0346] Das Hefelysat wurde im wesentlichen nach Nagahuma et al. (1984) hergestellt. Eine Hefezellsuspension wurde hergestellt, die aus 33 % Zellen (Vol/Vol) bestand, suspendiert in einer Lösung (Puffer A), die 20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM Dithiothreitol und 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) enthielt. Ein 25 ml-Aliquot der Suspension wurde mit einem gleichen Volumen Glaskugeln (0,45 bis 0,50 mm Durchmesser) vermischt, und das Gemisch wurde mit Höchstgeschwindigkeit auf einem Supermixer (Lab Line Instruments, Inc.) 8 min lang geschüttelt. Das Homogenat und die Glaskugeln wurden getrennt, und die Glaskugeln wurden dreimal mit dem gleichen Volumen an Puffer A wie die ursprünglich gepackten Zellen gewaschen. Nach Vereinigen der Waschlösungen und des Homogenats wurde das unlösliche Material in dem Lysat durch 15-minütige Zentrifugation des Homogenats bei 7000 g bei 4°C, Resuspension der Pellets in zweimal dem Volumen der ursprünglichen gepackten Zellen, an Puffer A und erneute Pelletierung des Materials durch 15-minütige Zentrifugation bei 7000 g erhalten. Das Waschverfahren wurde dreimal wiederholt.

[0347] Das unlösliche Material aus dem Lysat wurde bei pH 12,0 wie folgt extrahiert. Das Pellet wurde in einem Puffer, der 0,5 M NaCl, 1 mM EDTA enthielt, suspendiert, wobei das Suspendiervolumen gleich dem 1,8-fachen dessen der ursprünglichen gepackten Zellen war. Der pH-Wert der Suspension wurde durch Zugabe von 0,2 Volumina an 0,4 M Na-Phosphatpuffer, pH 12,0, eingestellt. Nach Vermischen wurde die Suspension 15 min lang bei 7000 g bei 4°C zentrifugiert, und der Überstand wurde entfernt. Die Extraktion wurde zwei-

mal wiederholt. Die extrahierten Pellets wurden durch Suspension in 0,5 M NaCl, 1 mM EDTA in einem Suspensionsvolumen, das zwei Volumina der ursprünglichen gepackten Zellen äquivalent war, gewaschen und anschließend 15 min lang bei 7000 g bei 4°C zentrifugiert.

[0348] Das C100-3-Polypeptid in dem extrahierten Pellet wurde durch Behandlung mit SDS solubilisiert. Die Pellets wurden in Puffer A, der 0,9 Volumina des Volumens der ursprünglichen gepackten Zellen äquivalent war, suspendiert, und 0,1 Volumina an 2%igem SDS wurden zugesetzt. Nach Vermischen der Suspension wurde 15 min lang bei 7000 g bei 4°C zentrifugiert. Das so erhaltene Pellet wurde drei weitere Male mit SDS extrahiert. Die so erhaltenen Überstände, die C100-3 enthielten, wurden vereinigt.

[0349] Durch dieses Verfahren wird C100-3 auf das mehr als 10-fache aus der unlöslichen Fraktion des Hefehomogenats gereinigt und die Polypeptidgewinnung ist höher als 50%.

[0350] Das gereinigte Präparat des Fusionspolypeptids wurde durch Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli (1970) analysiert. Auf der Basis dieser Analyse war das Polypeptid reiner als 80% und besaß ein offensichtliches Molekulargewicht von ≈ 54000 Dalton.

IV.C. Identifizierung von RNA in infizierten Individuen, die mit der HCV-cDNA hybridisiert

IV.C.1. Identifizierung von RNA in der Leber eines Schimpansen mit NANBH, die mit HCV-cDNA hybridisiert

[0351] Es wurde wie folgt durch Northern-Blotting gezeigt, daß die RNA aus der Leber eines Schimpansen mit NANBH eine RNA-Art enthielt, die mit der HCV-cDNA, die in Clon 81 enthalten ist, hybridisiert.

[0352] Die RNA wurde unter Verwendung der in Maniatis et al. (1982) zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Säugerzellen und zu deren Auftrennung in Poly A⁺- und Poly A⁻-Fraktionen beschriebenen Techniken aus einer Leberbiopsie des Schimpansen, von dem der hohe Plasmatiter stammte (vergleiche Abschnitt IV.A.1.), isoliert. Diese RNA-Fractionen wurden einer Elektrophorese auf einem Formaldehyd/agarosegel (1% Gewicht/Volumen) unterworfen und auf Nitrocellulose überführt (Maniatis et al. (1982)). Die Nitrocellulosefilter wurden mit radioaktiv markierter HCV-cDNA aus Clon 81 (vergleiche **Fig. 4** bezüglich der Nucleotidsequenz der Insertion) hybridisiert. Um die radioaktiv markierte Sonde herzustellen, wurde die aus Clon 81 isolierte HCV-cDNA-Insertion radioaktiv mit ³²P durch Nick-Translation unter Verwendung von DNA-Polymerase I (Maniatis et al. (1982)) markiert. Es wurde 18 h lang bei 42°C in einer Lösung aus 10% (Gewicht/Volumen) Dextransulfat, 50 (Gewicht/Volumen) entionisiertem Formamid, 750 mM NaCl, 75 mM Na-Citrat, 20 mM Na₂HPO₄ pH 6,5, 0,1% SDS, 0,02% (Gewicht/Volumen) Rinderserumalbumin (BSA), 0,02% (Gewicht/Volumen) Ficoll-400, 0,02% (Gewicht/Volumen) Polyvinylpyrrolidon, 100 µg/ml Lachssperma-DNA, die durch Ultraschall aufgespalten und denaturiert worden war, und 106 CPM/ml der nick-translatierten cDNA-Sonde-hybridisiert.

[0353] Ein Autoradiogramm des abgesuchten Filters ist in **Fig. 38** gezeigt. Die Bahn 1 enthält die mit ³²P-markierten Restriktionsfragmentmarker. Die Bahnen 2 bis 4 enthalten RNAs aus der Schimpansenleber wie folgt: Bahn 2 enthält 30 µg Gesamt-RNA, Bahn 3 enthält 30 µg Poly A-RNA und Bahn 4 enthält 20 µg Poly A+RNA. Wie in **Fig. 38** gezeigt, enthält die Leber des Schimpansen mit NANBH eine heterogene Population von verwandter Poly A+RNA-Molekülen, die mit der HCV-cDNA-Sonde hybridisieren und die eine Größe von etwa 5000 Nucleotiden bis etwa 11000 Nucleotiden zu besitzen scheinen. Diese RNA, die mit der HCV-cDNA hybridisiert, könnte virale Genome und/oder spezifische Transkripte des viralen Genoms darstellen.

[0354] Das in dem nachstehenden Abschnitt IV.C.2. beschriebene Experiment unterstützt die Vermutung, daß das HCV ein RNA-Genom enthält.

IV.C.2. Identifizierung der von HCV abgeleiteten RNA in Serum von infizierten Individuen

[0355] Nucleinsäuren wurden aus Teilchen extrahiert, die aus Schimpansen-NANBH-Plasma mit hohem Titer, wie in Abschnitt IV.A.1. beschrieben, isoliert wurden. Aliquote (äquivalent zu 1 ml Originalplasma) der isolierten Nucleinsäuren wurden in 20 µl 50 mM Hepes, pH 7,5, 1 mM EDTA und 15 µg/ml löslicher Hefe-RNA resuspendiert. Die Proben wurden durch 5-minütiges Kochen mit daran anschließendem unmittelbarem Einfrieren denaturiert und mit RNase A (5 µl, enthaltend 0,1 mg/ml RNase A in 25 mM EDTA, 40 mM Hepes, pH 7,5) oder mit DNase I (5 µl, enthaltend 1 Einheit DNase I in 10 mM MgCl₂, 25 mM Hepes, pH 7,5) denaturiert. Die Kontrollproben wurden ohne Enzym inkubiert. Nach Inkubation wurden 230 µl an eiskaltem 2×SSC, enthaltend 2 µg/ml lösliche Hefe-RNA, zugesetzt, und die Proben wurden auf einem Nitrocellulosefilter filtriert. Die Filter wurden mit einer cDNA-Sonde aus Clon 81, die mit ³²P durch Nick-Translation markiert worden war, hybridisiert. Die **Fig. 39** zeigt ein Autoradiogramm des Filters. Die Hybridisierungsassignale wurden in den mit DNase behandelten und in den Kontrollproben (Bahnen 2 bzw. 1) nachgewiesen, wurden aber nicht in der mit RNase behandelten Probe (Bahn 3) nachgewiesen. Da so die RNase A-Behandlung die Nucleinsäuren, die aus den Teilchen isoliert wurden, zerstörte, und die DNase I-Behandlung keine Wirkung hatte, legt dieser Nachweis stark nahe, daß das HCV-Genom aus RNA besteht.

IV.C.3. Nachweis von amplifizierten HCV-Nucleinsäuresequenzen aus HCV-Nucleinsäuresequenzen in Leber- und Plasmaproben von Schimpansen mit NANBH

[0356] Die in Leber und Plasma von Schimpansen mit NANBH und von Kontroll-Schimpansen vorhandenen HCV-Nucleinsäuren wurden unter Verwendung im wesentlichen der Polymerasekettenreaktionstechnik (PCR), wie von Saiki et al. (1986) beschrieben, amplifiziert. Die Primer-Oligonucleotide wurden von den HCV-cDNA-Sequenzen in Clon 81 oder den Clonen 36 und 37 abgeleitet. Die amplifizierten Sequenzen wurden durch Gelelektrophorese und Southern-Blotting nachgewiesen, wobei als Sonden das geeignete cDNA-Oligomere mit einer Sequenz vom Bereich zwischen den zwei Primern, aber ohne sie einzuschließen, verwendet wurde.

[0357] RNA-Proben, die die durch das Amplifikationssystem zu untersuchenden HCV-Sequenzen enthielten, wurden aus Leberbiopsieproben von drei Schimpansen mit NANBH und aus zwei Kontroll-Schimpansen isoliert. Die Isolierung der RNA-Fraktion wurde nach dem Guanidiniumthiocyanatverfahren, wie in Abschnitt IV.C.1. beschrieben, durchgeführt.

[0358] RNA-Proben, die durch das Amplifikationssystem untersucht werden sollten, wurden auch aus den Plasmaproben von zwei Schimpansen mit NANBH und von einem Kontroll-Schimpansen, ebenso wie von einem Sammelplasma von Kontroll-Schimpansen isoliert. Ein infizierter Schimpanse hatte einen CID/ml-Wert gleich oder größer als 10^6 und der andere infizierte Schimpanse hatte einen CID/ml-Wert gleich oder größer als 10^5 .

[0359] Die Nucleinsäuren wurden aus dem Plasma wie folgt extrahiert. Entweder 0,1 ml oder 0,01 ml Plasma wurde auf ein Endvolumen von 1,0 ml mit einer TENB/Proteinase K/SDS-Lösung (0,05 M Tris-HCl, pH 5,0, 0,001 M EDTA, 0,1 M NaCl, 1 mg/ml Proteinase K und 0,5% SDS), enthaltend 10 µg/ml Polyadenylsäure, verdünnt und 60 min lang bei 37°C inkubiert. Nach diesem Abbau mit Proteinase K, wurden die so erhaltenen Plasmafraktionen durch Extraktion mit TE (10,0 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA)-gesättigtem Phenol von Protein befreit. Die Phenolphase wurde durch Zentrifugation abgetrennt und erneut mit TENB, enthaltend 0,1% SDS, extrahiert. Die so erhaltenen wäßrigen Phasen aus jeder Extraktion wurden vereinigt und zweimal mit einem gleichen Volumen an Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol [1:1(99:2)] und dann zweimal mit einem gleichen Volumen eines 99:1-Gemisches aus Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert. Nach der Phasentrennung durch Zentrifugation wurde die wäßrige Phase auf eine Endkonzentration von 0,2 M Na-Acetat gebracht, und die Nucleinsäuren wurden durch Zugabe von 2 Volumina Ethanol präzipitiert. Die präzipitierten Nucleinsäuren wurden durch 60-minütige Ultrazentrifugation in einem SW41-Rotor bei 38 K bei 4°C gewonnen.

[0360] Zusätzlich wurden das Schimpansenplasma mit hohem Titer und das vereinigte Kontrollplasma alternativ mit 50 µg Poly A-Träger nach dem Verfahren von Chomczynski und Sacchi (1987) extrahiert. Bei diesem Verfahren wird eine saure Guanidiniumthiocyanatextraktion verwendet. Die RNA wurde durch 4-minütige Zentrifugation bei 10000 UpM bei 4°C in einer Eppendorf-Mikrozentrifuge gewonnen.

[0361] Bei zwei Gelegenheiten vor der Synthese der cDNA in der PCR-Reaktion wurden die Nucleinsäuren, die aus dem Plasma nach dem Proteinase K/SDS/Phenol-Verfahren extrahiert worden waren, weiter durch Bindung an und Elution von S- und S Elutip-R-Säulen gereinigt. Es wurde das Verfahren nach den Anweisungen des Herstellers angewendet.

[0362] Die als Matrize für die PCR-Reaktion verwendete cDNA wurde von den Nucleinsäuren (entweder Gesamtnucleinsäuren oder RNA), die, wie vorstehend beschrieben, hergestellt worden waren, abgeleitet. Nach Ethanol-fällung wurden die gefällten Nucleinsäuren getrocknet und in mit DEPC behandeltem destilliertem Wasser resuspendiert. Die Sekundärstrukturen der Nucleinsäuren wurden durch 10-minütiges Erhitzen auf 65°C aufgebrochen, und die Proben wurden sofort auf Eis gekühlt. Die cDNA wurde unter Verwendung von 1 bis 3 µg Gesamt-RNA von Schimpansen aus Leber oder aus Nucleinsäuren (oder RNA), extrahiert aus 10 bis 100 µl Plasma, synthetisiert. Bei der Synthese wurde reverse Transkriptase verwendet, und sie wurde in einer 25 µl-Reaktion nach dem Protokoll des Herstellers BRL durchgeführt. Die Primer für die cDNA-Synthese waren diejenigen, die auch in der nachstehend beschriebenen PCR-Reaktion verwendet wurden. Alle Reaktionsgemische für die cDNA-Synthese enthielten 23 Einheiten des RNase-Inhibitors, RNASIN™ (Fisher/Promega). Nach der cDNA-Synthese wurden die Reaktionsgemische mit Wasser verdünnt, 10 min lang erhitzt und dann rasch auf Eis abgeschreckt.

[0363] Die PCR-Reaktionen wurden im wesentlichen nach den Angaben des Herstellers (Cetus-Perkin-Elmer) durchgeführt, ausgenommen, daß 1 µg RNase A zugesetzt wurde. Die Reaktionen wurden in einem Endvolumen von 100 µl durchgeführt. Die PCR wurde für 35 Zyklen mit einer Temperaturabfolge von 37°C, 72°C und 94°C durchgeführt.

[0364] Die Primer für die cDNA-Synthese und für die PCR-Reaktionen waren von den HCV-cDNA-Sequenzen entweder in Clon 81, 36 oder 37b abgeleitet. (Die HCV-cDNA-Sequenzen der Clone 81, 36 und 37b sind in den **Fig. 4, 5 bzw. 10** gezeigt.) Die Sequenzen der zwei 16-mer-Primer, abgeleitet von Clon 81, lauteten:

5' CAA TCA TAC CTG ACA G 3'

und

5' GAT AAC CTC TGC CTG A 3'.

[0365] Die Sequenz des Primers aus Clon 36 lautete:

5' GCA TGT CAT GAT GTA T 3'.

[0366] Die Sequenz des Primers aus Clon 37b lautete:

5' ACA ATA CGT GTG TCA C 3'.

[0367] In den PCR-Reaktionen bestanden die Primer-Paare entweder aus den zwei 16-meren, abgeleitet von Clon 81, oder dem 16-mer aus Clon 36 und dem 16-mer aus Clon 37b.

[0368] Die PCR-Reaktionsprodukte wurden durch Abtrennen der Produkte durch alkalische Gelelektrophorese mit anschließendem Southern-Blotting und Nachweis der amplifizierten HCV-cDNA-Sequenzen mit einer mit ³²P markierten, internen Oligonucleotidsonde, abgeleitet von einem Bereich der HCV-cDNA, der mit den Primern nicht überlappt, analysiert. Die PCR-Reaktionsgemische wurden mit Phenol/Chloroform extrahiert, und die Nucleinsäuren wurden aus der wäßrigen Phase mit Salz und Ethanol ausgefällt. Die ausgefällten Nucleinsäuren wurden durch Zentrifugation gewonnen und in destilliertem Wasser aufgelöst. Aliquote der Proben wurden einer Elektrophorese auf 1,8%igem alkalischem Agarosegel unterworfen. Einzelsträngige DNA mit 60, 108 und 161 Nucleotiden Länge ließ man gleichzeitig auf den Gelen als Molekulargewichtsmarker elektrophoretisch mitlaufen. Nach der Elektrophorese wurden die DNAs in dem Gel auf ein Biorad-Zeta-Probe™-Papier überführt. Die Vorhybridisierung und Hybridisierung und die Waschbedingungen waren diejenigen, die von dem Hersteller angegeben wurden (Biorad).

[0369] Die zur Hybridisierung/Nachweis der amplifizierten HCV-cDNA-Sequenzen verwendeten Sonden waren die folgenden. Wenn das Paar der PCR-Primer von Clon 81 abgeleitet war, war die Sonde ein 108-mer mit einer Sequenz entsprechend derjenigen, die im Bereich zwischen den Sequenzen der beiden Primer lokalisiert ist. Wenn das Paar der PCR-Primer von den Clonen 36 und 37b abgeleitet war, war die Sonde die nick-translatierte HCV-cDNA-Insertion, abgeleitet von Clon 35. Die Primer sind von den Nucleotiden 155 bis 170 der Insertion des Clons 37b und 206 bis 268 der Insertion des Clons 36 abgeleitet. Das 3'-Ende der HCV-cDNA-Insertion in Clon 35 überlappt mit den Nucleotiden 1 bis 186 der Insertion in Clon 36, und das 5'-Ende der Insertion des Clons 35 überlappt mit den Nucleotiden 207 bis 269 der Insertion in Clon 37b. (Vergleiche die **Fig. 5, 8 und 10.**) So umfaßt die cDNA-Insertion in Clon 35 einen Teil des Bereichs zwischen den Sequenzen der von Clon 36 und 37b abgeleiteten Primer und ist als Sonde für die amplifizierten Sequenzen, die diese Primer umfassen, nützlich.

[0370] Die Analyse der RNA von Leberproben wurde nach dem vorstehenden Verfahren unter Verwendung beider Sätze von Primern und Sonden durchgeführt. Die RNA von der Leber der drei Schimpansen mit NANBH ergab positive Hybridisierungsergebnisse für die Amplifikationssequenzen der erwarteten Größe (161 und 586 Nucleotide für 81 bzw. 36 und 37b), während die Kontroll-Schimpansen negative Hybridisierungsergebnisse ergaben. Die gleichen Ergebnisse wurden bei dreimaliger Wiederholung des Versuchs erzielt.

[0371] Die Analyse der Nucleinsäuren und der RNA aus Plasma wurde ebenfalls nach dem vorstehenden Verfahren unter Verwendung der Primer und der Sonde aus Clon 81 durchgeführt. Die Plasmaproben stammten von zwei Schimpansen mit NANBH, von einem Kontroll-Schimpansen und waren Sammelplasma aus Kontroll-Schimpansen. Beide NANBH-Plasmaproben enthielten Nucleinsäuren/RNA, die positive Ergebnisse in dem PCR-Amplifikationsassay ergaben, während beide Kontrollplasmaproben negative Ergebnisse ergaben. Diese Ergebnisse wurden reproduzierbar mehrere Male erhalten.

IV.D. Radioimmunassay zum Nachweis von HCV-Antikörpern in Serum aus infizierten Individuen

[0372] Festphasenradioimmunassays zum Nachweis von Antikörpern gegen HCV-Antigene wurden auf der Basis von Tsu und Herzenberg (1980) entwickelt. Mikrotiterplatten (Immulon 2, Removawell strips) werden mit gereinigten Polypeptiden, die HCV-Epitope enthalten, beschichtet. Die beschichteten Platten werden entweder mit solchen menschlichen Serumproben, die vermutlich Antikörper gegen die HCV-Epitope enthalten, oder mit geeigneten Kontrollen inkubiert. Während der Inkubation wird der Antikörper, sofern vorhanden, immunologisch an das Antigen der festen Phase gebunden. Nach Entfernen des nichtgebundenen Materials und Waschen der Mikrotiterplatten werden die Komplexe aus menschlichem Antikörper-NANBV-Antigen durch Inkubation mit ¹²⁵I-markiertem Schaf-Anti-Mensch-Immunglobulin nachgewiesen. Nichtgebundener, markierter Antikörper wird durch Aspiration entfernt, und die Platten werden gewaschen. Die Radioaktivität in den einzelnen Vertiefungen wird bestimmt. Die Menge an gebundenem menschlichem Anti-HCV-Antikörper ist der Radioaktivität in der Vertiefung proportional.

IV.D.1. Reinigung des Fusionspolypeptids SOD-NANB₅₋₁₋₁

[0373] Das Fusionspolypeptid SOD-NANB₅₋₁₋₁, das in rekombinanten Bakterien, wie in Abschnitt IV.B.1. beschrieben, exprimiert wird, wurde aus den rekombinanten E. coli-Zellen durch differentielle Extraktion des Zellextrakte mit Harnstoff und anschließender Chromatographie auf Anionen- und Kationenaustauschersäulen wie folgt gereinigt.

[0374] Aufgetaute Zellen aus 1 l Kultur wurden in 10 ml 20%iger (Gewicht/Volumen) Saccharoselösung, enthaltend 0,01 M Tris-HCl, pH 8,0, resuspendiert, und 0,4 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0, wurden zugesetzt. Nach 5 min bei 0°C wurde das Gemisch 10 min lang bei 4000 g zentrifugiert. Das so erhaltene Pellet wurden in 10 ml 25%iger (Gewicht/Volumen) Saccharoselösung, enthaltend 0,05 M Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) und 1 µg/ml Pepstatin A suspendiert, anschließend mit 0,5 ml Lysozym (10 mg/ml) versetzt und 10 min lang bei 0°C inkubiert. Nach Zugabe von 10 ml 1%igem (Volumen/Volumen) Triton X-100 in 0,05 M Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, wurde das Gemisch weitere 10 min bei 0°C unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Die so erhaltene viskose Lösung wurde durch 6malige Passage durch eine sterile 20-Gauge-hypodermische Nadel homogenisiert und 25 min lang bei 13000 g zentrifugiert. Das pelletierte Material wurde in 5 ml 0,01 M Tris-HCl, pH 8,0, suspendiert, und die Suspension wurde 10 min lang bei 4000 g zentrifugiert. Das Pellet, das das SOD-NANB₅₋₁₋₁-Fusionsprotein enthielt, wurde in 5 ml 6 M Harnstoff in 0,02 M Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM Dithiothreitol (Puffer A) aufgelöst und auf eine Säule aus Q-Sepharose-Fast-Flow, die mit Puffer A equilibriert worden war, aufgebracht. Die Polypeptide wurden in einem linearen Gradienten von 0,0 bis 0,3 M NaCl in Puffer A eluiert. Nach der Elution wurden die Fraktionen durch Polyacrylamidgelelektrophorese in Gegenwart von SDS analysiert, um ihren SOD-NANB₅₋₁₋₁-Gehalt zu bestimmen. Fraktionen, die dieses Polypeptid enthielten, wurden vereinigt und gegen 6 M Harnstoff in 0,02 M Natriumphosphatpuffer, pH 6,0, 1 mM Dithiothreitol (Puffer B) dialysiert. Die dialysierte Probe wurde auf eine Säule aus S-Sepharose-Fast-Flow, die mit Puffer B equilibriert worden war, aufgebracht und die Polypeptide wurden in einem linearen Gradienten von 0,0 bis 0,3 M NaCl in Puffer B eluiert. Die Fraktionen wurden durch Polyacrylamidgelelektrophorese auf das Vorhandensein von SOD-NANB₅₋₁₋₁ analysiert, und die geeigneten Fraktionen wurden vereinigt.

[0375] Das abschließende Präparat des SOD-NANB₅₋₁₋₁-Polypeptids wurde durch Elektrophorese auf Polyacrylamidgel in Gegenwart von SDS untersucht. Auf der Basis dieser Analyse war das Peptid zu mehr als 80% rein.

IV.D.2. Reinigung des Fusionspolypeptids SOD-NANB₈₁

[0376] Das Fusionspolypeptid SOD-NANB₈₁, das in rekombinanten Bakterien, wie in Abschnitt IV.B.2. beschrieben, exprimiert wurde, wurde aus rekombinanten E. coli-Zellen durch differentielle Extraktion der Zellextrakte mit Harnstoff und anschließende Chromatographie auf Anionen- und Kationenaustauschersäulen unter Verwendung des zur Isolierung des Fusionspolypeptids SOD-NANB₅₋₁₋₁ beschriebenen Verfahrens (vergleiche Abschnitt IV.D.1.) gereinigt.

[0377] Das abschließend erhaltene Präparat des SOD-NANB₈₁-Polypeptids wurde durch Elektrophorese auf Polyacrylamidgelen in Gegenwart von SDS untersucht. Auf der Basis dieser Analyse war das Präparat zu mehr als 50% rein.

IV.D.3. Nachweis von Antikörpern gegen die HCV-Epitope durch einen Festphasenradioimmunassay

[0378] Serumproben von 32 Patienten, bei denen NANBH diagnostiziert worden war, wurden mittels eines Radioimmunassays (RIA) untersucht, um zu bestimmen, ob Antikörper gegen die HCV-Epitope, die in den Fusionspolypeptiden SOD-NANB₅₋₁₋₁ und SOD-NANB₈₁ vorhanden waren, nachgewiesen wurden.

[0379] Mikrotiterplatten wurden mit SOD-NANB₅₋₁₋₁ oder SOD-NANB₈₁, die gemäß den Abschnitten IV.D.1. bzw. IV.D.2. teilgereinigt worden waren, beschichtet. Die Tests wurden wie folgt durchgeführt.

[0380] 100 µl Aliquote, enthaltend 0,1 bis 0,5 µg SOD-NANB₅₋₁₋₁ oder SOD-NANB₈₁ in 0,125 M Na-Boratpuffer, pH 8,3, 0,075 M NaCl (BBS) wurden jeder Vertiefung einer Mikrotiterplatte (Dynatech Immulon 2 Removawell Strips) zugesetzt. Die Platte wurde über Nacht bei 4°C in einer Feuchtkammer inkubiert, und danach wurde die Proteinlösung entfernt, und die Vertiefungen wurden dreimal mit BBS, enthaltend 0,02% Triton X-100 (BBST) gewaschen. Um nichtspezifische Bindungen zu verhindern, wurden die Vertiefungen mit Rinderserumalbumin (BSA) durch Zugabe von 100 µl einer 5 mg/ml Lösung von BSA in BBS beschichtet und anschließend 1 h lang bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde die BSA-Lösung entfernt. Die Polypeptide in den beschichteten Vertiefungen wurden mit Serum durch Zugabe von 100 µl Serumproben, verdünnt 1:100 in 0,01 M Na-Phosphatpuffer, pH 7,2, 0,15 M NaCl (PBS), enthaltend 10 mg/ml BSA, und 1-stündige Inkubation der serumhaltigen Vertiefungen bei 37°C umgesetzt. Nach der Inkubation wurden die Serumproben durch Aspiration entfernt, und die Vertiefungen wurden 5mal mit BBST gewaschen. Anti-NANB₅₋₁₋₁ und Anti-NANB₈₁, die an die Fusionspolypeptide gebunden waren, wurden durch Bindung des ¹²⁵I-markierten

F(ab)₂-Schaf-Anti-Mensch-IgGs an die beschichteten Vertiefungen bestimmt. Aliquote von 100 µl der markierten Sonde (spezifische Aktivität 5 bis 20 µCi/µg) wurden jeder Vertiefung zugesetzt, und die Platten wurden bei 37°C 1 h lang inkubiert. Anschließend wurde überschüssige Sonde durch Aspiration entfernt, und es wurde 5mal mit BBST gewaschen. Die Menge der in jeder Vertiefung gebundenen Radioaktivität wurde durch Zählen in einem Counter für die γ-Strahlung bestimmt.

[0381] Die Ergebnisse des Nachweises von Anti-NANB₅₋₁₋₁ und Anti-NANB₈₁ in Individuen mit NANBH sind in Tabelle 1 angegeben.

Tabelle 1
Nachweis von Anti-5-1-1 und Anti-81 in Seren von NANB-, HAV- und HBV-Hepatitispatienten

Referenz-Nr. des Patienten	Diagnose	S/N	
		Anti-5-1-1	Anti-81
1. 28 ¹	Chronische NANB, IVD ²	0,77	4,20
	Chronische NANB, IVD	1,14	5,14
	Chronic NANB, IVD	2,11	4,05
2. 29 ¹	AVH ³ , NANB, sporadisch	1,09	1,05
	Chronische NANB	33,89	11,39
	Chronische NANB	36,22	13,67
3. 30 ¹	AVH, NANB, IVD	1,90	1,54
	Chronische NANB, IVD	34,17	30,28
	Chronische NANB, IVD	32,45	30,84
4. 31	Chronische NANB, PT ⁴	16,09	8,05
5. 32 ¹	späte AVH NANB, IVD	0,69	0,94
	späte AVH NANB, IVD	0,73	0,68
6. 33 ¹	AVH, NANB, IVD	1,66	1,96
	AVH, NANB, IVD	1,53	0,56
7. 34 ¹	Chronische NANB, PT	34,40	7,55
	Chronische NANB, PT	45,55	13,11
	Chronische NANB, PT	41,58	13,45
	Chronische NANB, PT	44,20	15,48
8. 35 ¹	AVH NANB, IVD	31,92	31,95
	"geheilte" jüngere NANB, AVH	6,87	4,45
9. 36	späte AVH NANB PT	11,84	5,79
10. 37	AVH NANB, IVD	6,52	1,33
11. 38	späte AVH NANB, PT	39,44	39,18
12. 39	Chronische NANB, PT	42,22	37,54
13. 40	AVH, NANB, PT	1,35	1,17
14. 41	Chronische NANB? PT	0,35	0,28

Referenz-Nr.

des Patienten	Diagnose	S/N	
		Anti-5-1-1	Anti-81
15. 42	AVH, NANB, IVD	6,25	2,34
16. 43	chronische NANB, PT	0,74	0,61
17. 44	AVH, NANB, PT	5,40	1,83
18. 45	chronische NANB, PT	0,52	0,32
19. 46	AVH, NANB	23,35	4,45
20. 47	AVH, Typ A	1,60	1,35
21. 48	AVH, Typ A	1,30	0,66
22. 49	AVH, Typ A	1,44	0,74
23. 50	nichtpersistierende kürzliche AVH Typ A	0,48	0,56
24. 51	AVH, Typ A	0,68	0,64
	nichtpersistierende AVH, Typ A	0,80	0,65
25. 52	nichtpersistierende kürzliche AVH Typ A	1,38	1,04
	nichtpersistierende kürzliche AVH Typ A	0,80	0,65
26. 53	AVH, Typ A	1,85	1,16
	nichtpersistierende kürzliche AVH Typ A	1,02	0,88
27. 54	AVH, Typ A	1,35	0,74
28. 55	späte AVH, HBV	0,58	0,55
29. 56	chronische HBV	0,84	1,06
30. 57	späte AVH, HBV	3,20	1,60
31. 58	chronische HBV	0,47	0,46
32. 59 ¹	AVH, HBV	0,73	0,60
	geheilte AVH, HBV	0,43	0,44
33. 60 ¹	AVH, HBV	1,06	0,92
	geheilte AVH, HBV	0,75	0,68

Referenz-Nr.

des Patienten	Diagnose	S/N	
		Anti-5-1-1	Anti-81
34. 61 ¹	AVH, HBV	1,66	0,61
	geheilte AVH, HBV	0,63	0,36
35. 62 ¹	AVH, HBV	1,02	0,73
	geheilte AVH, HBV	0,41	0,42
36. 63 ¹	AVH, HBV	1,24	1,31
	geheilte AVH, HBV	1,55	0,45
37. 64 ¹	AVH, HBV	0,82	0,79
	geheilte AVH, HBV	0,53	0,37
38. 65 ¹	AVH, HBV	0,95	0,92
	geheilte AVH, HBV	0,70	0,50
39. 66 ¹	AVH, HBV	1,03	0,68
	geheilte AVH, HBV	1,71	1,39

¹Aufeinanderfolgende Serenproben, verfügbar von diesen Patienten²IVD = intravenöse Anwendung von Medikamenten³AVH = Akute virale Hepatitis⁴PT = Nach Transfusion

[0382] Wie aus Tabelle 1 hervorgeht, waren 19 der 32 Seren von Patienten mit einer NANBH-Diagnose bezüglich der Antikörper gegen die in SOD-NANB₅₋₁₋₁ und SOD-NANB₈₁ vorhandenen HCV-Epitope positiv.

[0383] Jedoch zeigten die Serumproben, die positiv waren, nicht in gleicher Weise eine immunologische Reaktion mit SOD-NANB₅₋₁₋₁ und SOD-NANB₈₁. Serumproben von dem Patienten Nr. 1 waren für SOD-NANB₈₁, aber nicht für SOD-NANB₅₋₁₋₁ positiv. Serumproben von den Patienten Nr. 10, 15 und 17 waren für SOD-NANB₅₋₁₋₁, aber nicht für SOD-NANB₈₁ positiv. Serumproben von den Patienten Nr. 3, 8, 11 und 12 reagierten in gleicher Weise mit beiden Fusionspolypeptiden, wohingegen die Serumproben von den Patienten Nr. 2, 4, 7 und 9 eine 2- bis 3-fach höhere Reaktion gegen SOD-NANB₅₋₁₋₁ als gegen SOD-NANB₈₁ zeigten. Diese Ergebnisse legen nahe, daß NANB₅₋₁₋₁ und NANB₈₁ mindestens drei verschiedene Epitope enthalten können, d.h. es ist möglich, daß jedes Polypeptid mindestens ein einziges Epitop enthält, und daß die zwei Polypeptide mindestens ein Epitop gemeinsam haben.

IV.D.4. Spezifität des Festphasen-RIAs für NANBH

[0384] Die Spezifität der Festphasen-RIAs für NANBH wurde unter Verwendung des Tests an Serum von Patienten mit einer HAV- oder HBV-Infektion und an Seren von Kontrollindividuen getestet. Die Tests, bei denen teilgereinigtes SOD-NANB₅₋₁₋₁ und SOD-NANB₈₁ verwendet wurde, wurden im wesentlichen, wie in Abschnitt IV.D.3. beschrieben, durchgeführt, ausgenommen, daß die Seren von Patienten mit einer zuvor gestellten HAV- oder HBV-Diagnose oder von Individuen, die Blutbankspender waren, stammten. Die Ergebnisse für die Seren von HAV- und HBV-infizierten Patienten sind in Tabelle 1 dargestellt. Der RIA wurde unter Verwendung von 11 Serumproben von HAV-infizierten Patienten und 20 Serumproben von HBV-infizierten Patienten getestet. Wie in Tabelle 1 gezeigt, ergab keines dieser Seren eine positive immunologische Reaktion mit den Fusionspolypeptiden, die BB-NANBV-Epitope enthielten.

[0385] Der RIA, bei dem das NANB₅₋₁₋₁-Antigen eingesetzt wurde, wurde verwendet, um die immunologische Reaktivität von Serum aus Kontrollindividuen zu testen. Von 230 Serumproben, die von einer normalen Blutspenderpopulation erhalten worden waren, ergaben nur zwei positive Reaktionen in dem RIA (Daten nicht gezeigt). Es ist möglich, daß die zwei Blutspender, von denen diese Serumproben stammten, zuvor eine HCV-Exposition hatten.

IV.D.5. Reaktivität von NANB₅₋₁₋₁ im Verlauf der NANBH-Infektion

[0386] Das Vorhandensein von Anti-NANB₅₋₁₋₁-Antikörpern im Verlauf einer NANBH-Infektion von zwei Patienten und vier Schimpansen wurde unter Verwendung des RIAs, wie in Abschnitt IV.D.3. beschrieben, verfolgt. Zusätzlich wurde der RIA verwendet, um das Vorhandensein oder Fehlen von Anti-NANB₅₋₁₋₁-Antikörpern im Verlauf von HAV- und HBV-Infektionen in infizierten Schimpansen zu bestimmen.

[0387] Die Ergebnisse, die in Tabelle 2 dargestellt sind, zeigen, daß bei Schimpansen und bei Menschen An-

ti-NANB₅₋₁₋₁-Antikörper nach dem Einsetzen der akuten Phase der NANBH-Infektion nachgewiesen wurden. Anti-NANB₅₋₁₋₁-Antikörper wurden in Serumproben von Schimpanzen, die mit entweder HAV oder HBV infiziert worden waren, nicht nachgewiesen. So dienen Anti-NANB₅₋₁₋₁-Antikörper als Marker für die Exposition eines Individuums gegen HCV.

Tabelle 2

Seroconversion in aufeinanderfolgenden Serumproben von Hepatitispatienten und Schimpanzen unter Verwendung des 5-1-1-Antigens

Patient/ Schimpanse	Probandatum (Tage) 0=Inokulationstag	Hepatitis- viren	Anti-5-1-1 (S/N)	ALT (mu/ml)
Patient 29	T#	NANB	1,09	1180
	T+180		33,89	425
	T+208		36,22	--
Patient 30	T	NANB	1,90	1830
	T+307		34,17	290
	T+799		32,45	276
Schimpanse 1	0	NANB	0,87	9
	76		0,93	71
	118		23,67	19
	154		32,41	--
Schimpanse 2	0	NANB	1,00	5
	21		1,08	52
	73		4,64	13
	138		25,01	--
Schimpanse 3	0	NANB	1,08	8
	43		1,44	205
	53		1,82	14
	159		11,87	6
Schimpanse 4	-3	NANB	1,12	11
	55		1,25	132
	83		5,60	--
	140		17,51	--
Schimpanse 5	0	HAV	1,50	4
	25		2,39	147
	40		1,92	18
	268		1,53	5
Schimpanse 6	-8	HAV	0,85	--
	15		--	106
	41		0,81	10
	129		1,33	--

Patient/ Schimpanse	Probandatum (Tage) o=Inokulationstag	Hepatitis- viren	Anti-5-1-1 (S/N)	ALT (μ u/ml)
Schimpanse 7	0	HAV	1,17	7
	22		1,60	83
	115		1,55	5
	139		1,60	--
Schimpanse 8	0	HAV	0,77	15
	26		0,98	130
	74		1,77	8
	205		1,27	5
Schimpanse 9	-290	HBV	1,74	--
	379		3,29	9
	435		2,77	6
Schimpanse 10	0	HBV	2,35	8
	111-118 (Sammelprobe)		2,74	96-156 (Sammelprobe)
	205		2,05	9
	240		1,78	13
Schimpanse 11	0	HVB	1,82	11
	28-56 (Sammelprobe)		1,26	8-100 (Sammelprobe)
	169		--	9
	223		0,52	10

*T = Tag der ersten Probenahme

IV.E. Reinigung von polyclonalen Serumantikörpern gegen NANB₅₋₁₋₁

[0388] Auf der Basis der spezifischen immunologischen Reaktivität des SOD-NANB₅₋₁₋₁-Polypeptids mit den Antikörpern in Serumproben von NANBH-Patienten wurde ein Verfahren entwickelt, um Serumantikörper zu reinigen, die immunologisch mit dem (den) Epitop(en) in NANB₅₋₁₋₁ reagieren. Bei diesem Verfahren wird die Affinitätschromatographie verwendet. Das gereinigte SOD-NANB₅₋₁₋₁-Polypeptid (vergleiche Abschnitt IV.D.1.) wurde an einen unlöslichen Träger gebunden. Die Bindung ist so, daß das immobilisierte Polypeptid seine Affinität für den Antikörper gegen NANB₅₋₁₋₁ beibehält. Der Antikörper in den Serumproben wird an das matrixgebundene Polypeptid adsorbiert. Nach Waschen zur Entfernung unspezifisch gebundener Materialien und nicht-gebundener Materialien wird der gebundene Antikörper von dem gebundenen SOD-HCV-Polypeptid durch pH-Veränderung und/oder durch chaotrope Reagentien, beispielsweise Harnstoff, freigesetzt. Nitrocellulosemembranen, die gebundenes SOD-NANB₅₋₁₋₁ enthalten, wurden wie folgt hergestellt. Eine Nitrocellulosemembran, 2,1 cm, Sartorius, mit einer Porengröße von 0,2 μ , wurde 3 min lang dreimal mit BBS gewaschen. SOD-NANB₅₋₁₋₁ wurde an die Membran durch 2-stündige Inkubation des gereinigten Präparats in BBS bei Raumtemperatur gebunden. Alternativ wurde bei 4°C über Nacht inkubiert. Die Lösung, die das nichtgebundene Antigen enthielt, wurde entfernt, und das Filter wurde dreimal mit BBS 3 min lang pro Waschung gewaschen. Die verbleibenden aktiven Stellen auf der Membran wurden mit BSA durch 30-minütige Inkubation in einer 5 mg/ml BSA-Lösung blockiert. Überschüssiges BSA wurde durch fünfmaliges Waschen der Membran mit BBS und dreimaliges Waschen mit destilliertem Wasser entfernt. Die Membran, die das virale Antigen und BSA enthielt, wurde dann mit 0,05 M Glycinhydrochlorid, pH 2,5, 0,10 M NaCl (Gly-HCl) 15 min lang behandelt und anschließend 3 min lang mit PBS gewaschen.

[0389] Polyclonale Anti-NANB₅₋₁₋₁-Antikörper wurden durch 2-stündige Inkubation der Membranen, die das Fusionspolypeptid enthielten, mit einem Serum von einem Individuum mit NANBH isoliert. Nach der Inkubation wurden die Filter fünfmal mit BBS und zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen. Die gebundenen Antikörper wurden dann von jedem Filter mit 5 Gly-HCl-Elutionen eluiert, wobei eine Elution 3 min dauerte. Der pH-Wert der Eluate wurde durch Sammeln jedes Eluats in einem Reagenzglas, das 2,0 M Tris HCl, pH 8,0, enthielt, auf einen Wert von 8,0 eingestellt. Die Ausbeute des Anti-NANB₅₋₁₋₁-Antikörpers nach der Affinitätschromatographie war etwa 50%.

[0390] Die Nitrocellulosemembranen, die das gebundene virale Antigen enthalten, können mehrere Male ohne nachweisbare Abnahme der Bindungskapazität verwendet werden. Um die Membranen erneut zu verwenden, werden sie nach Elution der Antikörper dreimal mit BBS 3 min lang gewaschen. Danach werden sie in BBS bei 4°C gelagert.

IV.F. Einfangen der HCV-Teilchen aus infiziertem Plasma unter Verwendung von gereinigten menschlichen, polyclonalen Anti-HCV-Antikörpern; Hybridisierung der Nucleinsäure in den eingefangenen Teilchen mit HCV-cDNA

IV.F.1. Einfangen der HCV-Teilchen aus infiziertem Plasma unter Verwendung polyclonaler menschlicher Anti-HCV-Antikörper

[0391] Die im infektiösen Plasma eines Schimpansen mit NANBH vorhandenen Protein-Nucleinsäure-Komplexe wurden unter Verwendung menschlicher polyclonaler Anti-HCV-Antikörper, die an Polystyrolkugeln gebunden waren, isoliert.

[0392] Polyclonale Anti-NANB₅₋₁₋₁-Antikörper wurden aus Serum von einem Menschen mit NANBH unter Verwendung des von Clon 5-1-1 codierten SOD-HCV-Polypeptids gereinigt. Das Verfahren zur Reinigung war das in Abschnitt IV.E. beschriebene.

[0393] Die gereinigten Anti-NANB₅₋₁₋₁-Antikörper wurden an Polystyrolkugeln (1/4" Durchmesser, glänzender Überzug, Precision Plastic Ball Co., Chicago, Illinois) durch deren Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur mit 1 ml Antikörper (1 µg/ml in Borat-gepufferter Kochsalzlösung, pH 8,5) gebunden. Nach der Inkubation über Nacht wurden die Kugeln einmal mit TBST [50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,05% (Volumen/Volumen) Tween 20] und dann mit Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS), enthaltend 10 mg/ml BSA, gewaschen.

[0394] Die Kontrollkugeln wurden auf identische Weise hergestellt, ausgenommen, daß die gereinigten Anti-NANB₅₋₁₋₁-Antikörper durch Gesamthumanimmunglobulin ersetzt wurden.

[0395] Das Einfangen von HCV aus mit NANBH infiziertem Schimpansenplasma unter Verwendung von an die Kugeln gebundenen Anti-NANB₅₋₁₋₁-Antikörpern wurde wie folgt durchgeführt. Das verwendete Plasma von einem Schimpansen mit NANBH ist in Abschnitt IV.A.1. beschrieben. Ein 1 ml-Aliquot des Plasmas des Schimpansen mit der NANBV-Infektion wurde 3 h lang bei 37°C mit jedem der fünf Kugeln, die entweder mit Anti-NANB₅₋₁₋₁-Antikörpern oder mit Kontrollimmunglobulinen beschichtet waren, inkubiert. Die Kugeln wurden dreimal mit TBST gewaschen.

IV.F.2. Hybridisierung der Nucleinsäure in der eingefangenen Teilchen mit NANBV-cDNA

[0396] Die aus den mit den Anti-NANB₅₋₁₋₁-Antikörpern eingefangenen Teilchen freigesetzte Nucleinsäurekomponente wurde bezüglich der Hybridisierung mit der HCV-cDNA, die von Clon 81 abgeleitet ist, analysiert.

[0397] Die HCV-Teilchen wurden aus Plasma von mit NANBH infizierten Schimpansen, wie in IV.F.1. beschrieben, eingefangen. Um die Nucleinsäuren aus den Teilchen freizusetzen, wurden die gewaschenen Kugeln bei 37°C 60 min lang mit 0,2 ml pro Kugel einer Lösung aus Proteinase K (1 mg/ml), 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM EDTA, 0,25% (Gewicht/Volumen) SDS, 10 µg/ml lösliche Hefe-RNA inkubiert, und die überstehende Lösung wurde entfernt. Der Überstand wurde mit Phenol und Chloroform extrahiert, und die Nucleinsäuren wurden mit Ethanol über Nacht bei -20°C gefällt. Das Nucleinsäurepräzipitat wurde durch Zentrifugation gewonnen, getrocknet und in 50 mM Hepes, pH 7,5, aufgelöst. Doppelte Aliquote der löslichen Nucleinsäuren aus den Proben, die von den mit Anti-NANB₅₋₁₋₁-Antikörpern beschichteten Kugeln und von Kontrollkugeln, die das Gesamthumanimmunglobulin enthielten, erhalten wurden, wurden auf Nitrocellulosefilter filtriert. Die Filter wurden mit einer ³²P markierten, nick-translatierten Sonde, die von dem gereinigten HCV-cDNA-Fragment in Clon 81 hergestellt worden war, hybridisiert. Die Verfahren zur Herstellung der Sonde und zur Hybridisierung sind in Abschnitt IV.C.1. beschrieben.

[0398] Die Autoradiogramme eines abgesuchten Filters, der die Nucleinsäuren von den durch die Anti-NANB₅₋₁₋₁-Antikörper enthaltenden Kugeln eingefangenen Teilchen enthielten, sind in **Fig. 40** gezeigt. Der unter Verwendung des Anti-NANB₅₋₁₋₁-Antikörpers (A₁, A₂) erhaltene Extrakt ergab klare Hybridisierungssignale bezogen auf den Extrakt des Kontroll-Antikörpers (A₃, A₄) und auf die Kontroll-RNA der Hefe (B₁, B₂). Standards, die aus 1 pg, 5 pg und 10 pg des gereinigten cDNA-Fragments von Clon 81 bestehen, sind jeweils in C1-3 gezeigt.

[0399] Diese Ergebnisse zeigen, daß die aus NANBH-Plasma durch Anti-NANB₅₋₁₋₁-Antikörper eingefangenen Teilchen Nucleinsäuren enthalten, die mit der HCV-cDNA in Clon 81 hybridisieren und somit einen weiteren Beweis ergeben, daß die cDNAs in diesen Clonen von dem ätiologischen NANBH-Erreger abgeleitet sind.

IV.G. Immunologische Reaktivität von C100-3 mit gereinigten Anti-NANB₅₋₁₋₁-Antikörpern

[0400] Die immunologische Reaktivität des C100-3-Fusionspolypeptids mit Anti-NANB₅₋₁₋₁-Antikörpern wurde mittels eines Radioimmunassays bestimmt, indem die Antigene an eine feste Phase, gebunden wurden und mit gereinigten Anti-NANB₅₋₁₋₁-Antikörpern stimuliert wurden, und der Antigen-Antikörper-Komplex mit ¹²⁵I-markierten Schaf-Anti-Mensch-Antikörpern nachgewiesen wurde. Die immunologische Reaktivität des C100-3-Polypeptids wurde mit der des SOD-NANB₅₋₁₋₁-Antigens verglichen.

[0401] Das Fusionspolypeptid C100-3 wurde, wie in Abschnitt IV.B.5. bzw. in Abschnitt IV.B.6. beschrieben, synthetisiert und gereinigt. Das Fusionspolypeptid SOD-NANB₅₋₁₋₁ wurde, wie in Abschnitt IV.B.1. bzw. in Abschnitt IV.D.1. beschrieben, synthetisiert und gereinigt. Gereinigte Anti-NANB₅₋₁₋₁-Antikörper wurden, wie in Abschnitt IV.E. beschrieben, erhalten.

[0402] 100 µl Aliquote, die variierende Mengen des gereinigten C100-3-Antigens in einem 0,125 M Na-Borat-Puffer, pH 8,3, 0,075 M NaCl (BBS) enthielten, wurden jeder Vertiefung einer Mikrotiterplatte (Dynatech Immulon 2 Removawell Strips) zugesetzt. Die Platte wurde bei 4°C über Nacht in einer Feuchtkammer inkubiert, danach wurde die Proteinlösung entfernt und die Vertiefungen dreimal mit BBS, welches 0,02 Triton X-100 enthielt (BBST), gewaschen. Um nichtspezifische Bindung zu verhindern, wurden die Vertiefungen durch Zugabe von 100 µl einer 5 mg/ml Lösung an BSA in BBS und anschließender 1-stündiger Inkubation bei Raumtemperatur mit anschließender Entfernung überschüssiger BSA-Lösung mit BSA beschichtet. Die Polypeptide in den beschichteten Vertiefungen wurden durch Zugabe von 1 µg Antikörper/Vertiefung und 1-stündige Inkubation der Proben bei 37°C mit gereinigten Anti-NANB₅₋₁₋₁-Antikörpern umgesetzt. Nach der Inkubation wurde die überschüssige Lösung durch Aspiration entfernt, und die Vertiefungen wurden fünfmal mit EBST gewaschen. Anti-NANB₅₋₁₋₁, das an die Fusionspolypeptide gebunden war, wurde durch die Bindung von ¹²⁵I-markiertem F(ab')₂-Schaf-Anti-Mensch-IgG an die beschichteten Vertiefungen bestimmt. Aliquote von 100 µl der markierten Sante (spezifische Aktivität 5 bis 20 µCi/µg) wurden jeder Vertiefung zugesetzt, und die Platten wurden bei 37°C 1 h lang inkubiert. Danach wurde die überschüssige Sonde durch Aspiration und fünfmaliges Waschen mit BBST entfernt. Die Menge an Radioaktivität, die in jeder Vertiefung gebunden war, wurde durch Zählen in einem Counter für γ-Strahlung bestimmt. Die Ergebnisse der immunologischen Reaktivität von C100 mit gereinigtem Anti-NANB₅₋₁₋₁ im Vergleich zu der von NANB₅₋₁₋₁ mit den gereinigten Antikörpern sind in der Tabelle 3 gezeigt.

Tabelle 3
Immunologische Reaktivität von C100-3 im Vergleich zu NANB₅₋₁₋₁ mittels Radioimmunoassay

	RIA (cpm/Test)					
AG (ng)	400	320	240	160	60	0
NANB ₅₋₁₋₁	7332	6732	4954	4050	3051	57
C100-3	7450	6985	5920	5593	4096	67

[0403] Die Ergebnisse in Tabelle 3 zeigen, daß Anti-NANB₅₋₁₋₁ ein Epitop bzw. Epitope in der C100-Einheit des C100-3-Polypeptids erkennt. So besitzen NANB₅₋₁₋₁ und C100 ein gemeinsames Epitop bzw. gemeinsame Epitope. Die Ergebnisse legen nahe, daß die cDNA-Sequenz, die diese(s) NANBV-Epitop(e) codiert, eine ist, die sowohl in Clon 5-1-1 als auch in Clon 81 vorhanden ist.

IV.H. Charakterisierung von HCV

IV.H.1. Charakterisierung der Strangform des HCV-Genoms

[0404] Das HCV-Genom wurde bezüglich seiner Strangform durch Isolieren der Nucleinsäurefraktion aus Teilchen, die auf den mit Anti-NANB₅₋₁₋₁-Antikörpern beschichteten Polystyrolkugeln eingefangen wurden, und Bestimmen, ob die isolierte Nucleinsäure mit den Plus- und/oder Minussträngen der HCV-cDNA hybridisierte, charakterisiert.

[0405] Die Teilchen wurden aus Plasma von mit HCV infizierten Schimpansen unter Verwendung von Polystyrolkugeln, die mit einem immungereinigten Anti-NANB₅₋₁₋₁-Antikörper, wie in Abschnitt IV.F.1. beschrieben, beschichtet waren, eingefangen. Die Nucleinsäurekomponente der Teilchen wurde unter Verwendung des in Abschnitt IV.F.2. beschriebenen Verfahrens freigesetzt. Aliquote der isolierten genomischen Nucleinsäure, die 3 ml eines Plasmas mit hohem Titer äquivalent waren, wurden auf Nitrocellulosefilter geblottet. Als Kontrollen wurden Aliquote der denaturierten HCV-cDNA aus Clon 81 (2 pg) ebenfalls auf die gleichen Filter geblottet. Die Filter wurden mit einem ³²P-markierten Gemisch aus Plus- oder einem Gemisch aus Minussträngen der einzelsträngigen DNA, die aus HCV-cDNAs cloniert war, abgesucht. Die cDNAs wurden aus den Clonen 40b, 81 und 25c herausgeschnitten.

[0406] Die einzelsträngigen Sonden wurden durch Herausschneiden der HCV-cDNAs aus den Clonen 81, 40b und 25c mit EcoRI und Clonieren der cDNA-Fragmente in M13-Vektoren, mp18 und mp19 [Messing (1983)] erhalten. Die M13-Clone wurden sequenziert, um zu bestimmen, ob sie die Plus- oder Minusstränge der DNA, abgeleitet von den HCV-cDNAs, enthielten. Die Sequenzierung wurde nach dem Didesoxykettenterminationsverfahren von Sanger et al. (1977) durchgeführt.

[0407] Jedes einer Reihe von doppelten Filtern, die Aliquote des HCV-Genoms, das aus den eingefangenen

Teilchen isoliert worden war, enthielten, wurde mit entweder plus- oder minussträngigen Sonden, abgeleitet von HCV-cDNAs, hybridisiert. Die **Fig. 41** zeigt die Autoradiogramme, die vom Absuchen des NANBV-Genoms mit dem Gemisch der Sonden erhalten wurden, die von den Clonen 81, 40b und 25c abgeleitet sind. Dieses Gemisch wurde verwendet, um die Empfindlichkeit des Hybridisierungstests zu erhöhen. Die Proben in der Versuchsgruppe I wurden mit dem Sondengemisch des Plusstranges hybridisiert. Die Proben in der Versuchsgruppe 22 wurden durch Hybridisierung mit dem Sondengemisch des Minusstranges abgesucht. Die Zusammensetzung der Proben in den Versuchsgruppen des Immunblots sind in der Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4

	A	B
Bahn		
1	HCV-Genom	*
2	----	*
3	*	cDNA 81
4	----	cDNA 81
*ist eine nicht beschriebene Probe		

[0408] Wie aus den Ergebnissen in **Fig. 41** hervorgeht, hybridisiert nur die minussträngige DNA-Sonde mit dem isolierten HCV-Genom. Dieses Ergebnis legt zusammen mit dem Ergebnis, das zeigt, daß das Genom RNase-empfindlich, aber nicht DNase-empfindlich ist (siehe Abschnitt IV.C.2.), nahe, daß das Genom von NANBV eine positivsträngige RNA ist.

[0409] Diese Daten und Daten von anderen Laboratorien betreffend die physikalisch-chemischen Eigenschaften eines vermutlichen NANBV bzw. vermutlicher NANBVs stimmen mit der Möglichkeit, daß HCV ein Mitglied der Flaviviridae ist, überein. Jedoch wurde die Möglichkeit, daß HCV eine neue Klasse eines viralen Erregers darstellt, noch nicht ausgeschlossen.

IV.H.2. Nachweis von Sequenzen in eingefangenen Teilchen, die bei Amplifikation mit PCR mit von Clon 81 abgeleiteter HCV-cDNA hybridisieren

[0410] Die RNA in den eingefangenen Teilchen wurde, wie in Abschnitt IV.H.1. beschrieben, erhalten. Die Analyse auf Sequenzen, die mit HCV-cDNA, die von Clon 81 abgeleitet ist, hybridisieren, wurde unter Verwendung des PCR-Amplifikationsverfahrens, wie in Abschnitt IV.C.3 beschrieben, durchgeführt, außer daß die Hybridisierungssonde ein mit Kinase behandeltes Oligonucleotid, abgeleitet von der cDNA-Sequenz von Clon 81, war. Die Ergebnisse zeigten, daß die amplifizierten Sequenzen mit der HCV-cDNA-Sonde, die von Clon 81 abgeleitet ist, hybridisieren.

IV.H.3. Homologie zwischen dem Nicht-Strukturprotein des Dengue-Flavivirus (MNWWVD1) und den HCV-Polypeptiden die von dem kombinierten ORF der Clone 14i bis 39c codiert werden

[0411] Die kombinierten HCV-cDNAs der Clone 14i bis 39c enthalten einen kontinuierlichen ORF, wie in **Fig. 26** gezeigt. Das davon codierte Polypeptid wurde auf Sequenzhomologie mit dem Bereich des (der) Nicht-Strukturpolypeptids(e) in dem Dengue-Flavivirus (MNWVD1) analysiert. Bei der Analyse wurde die Dayhoff-Proteindatenbank verwendet, und sie wurde mit einem Computer durchgeführt. Die Ergebnisse sind in **Fig. 42** gezeigt. Darin bedeutet das Symbol (:) eine exakte Homologie und das Symbol (.) einen konservativen Austausch in der Sequenz. Die Striche zeigen Abstände an, die in die Sequenz eingeführt wurden, um die größten Homologien zu erreichen. Wie aus der Figur hervorgeht, besteht eine signifikante Homologie zwischen der von der HCV-cDNA codierten Sequenz und dem (den) Nicht-Strukturpolypeptid(en) des Dengue-Virus. Zusätzlich zu der in **Fig. 42** (als **Fig. 41-1** und **41-2** gekennzeichnet) gezeigten Homologie enthielt die Analyse des Polypeptidsegments, das von einem Bereich gegen das 3'-Ende der cDNA codiert wurde, auch Sequenzen, die Sequenzen der Dengue-Polymerase homolog sind. Von Bedeutung ist die Entdeckung, daß die kanonische Gly-Asp-Asp (GDD)-Sequenz, die als wesentlich für die RNA-abhängige RNA-Polymerase gilt, in dem von der HCV-cDNA codierten Polypeptid an einem Ort enthalten ist, der dem in dem Dengue 2-Virus entspricht. (Daten nicht gezeigt.)

IV.H.4. HCV-cDNA ist in NANBH-infiziertem Gewebe nicht nachweisbar

[0412] Zwei Typen von Studien ergaben Ergebnisse, die nahelegen, daß die HCV-cDNA in Gewebe von ei-

nem Individuum mit NANBH nicht nachweisbar ist. Diese Ergebnisse zusammen mit denjenigen, die in IV.C. und IV.H.1. und IV.H.2. beschrieben sind, liefern den Nachweis, daß HCV nicht ein DNA-haltiges Virus ist, und daß an der Replikation keine cDNA, beteiligt ist.

IV.H.4.a. Southern-Blotting-Verfahren

[0413] Um zu bestimmen, ob Leber von mit NANBH infizierten Schimpansen eine nachweisbare HCV-DNA (oder HCV-cDNA) enthält, wurden Restriktionsfragmente der aus dieser Quelle isolierten DNA nach Southern geblottet, und die Blots wurden mit einer ³²P-markierten HCV-cDNA abgesucht. Die Ergebnisse zeigten, daß die markierte HCV-cDNA mit der geblotteten DNA aus der Leber der infizierten Schimpansen nicht hybridisierte. Sie hybridisierte auch nicht mit einer zur Kontrolle geblotteten DNA aus normaler Schimpansenleber. Im Gegensatz dazu hybridisierte in einer positiven Kontrolle eine markierte Sonde des β -Interferongens stark mit Southern-Blots von menschlicher Placenta-DNA, die durch Restriktionsenzyme gespalten worden war. Diese Systeme wurden so entwickelt, daß sie eine einzige Kopie des Gens, das mit der markierten Sonde nachgewiesen werden soll, nachwiesen.

[0414] Die DNAs wurden aus den Lebern von zwei Schimpansen mit NANBH isoliert. Die Kontroll-DNAs wurden aus der Leber nichtinfizierter Schimpansen und aus menschlichen Placentas isoliert. Das Verfahren zur Extraktion der DNA war im wesentlichen das nach Maniatis et al. (1982), und die DNA-Proben wurden während des Isolierungsverfahrens mit RNase behandelt.

[0415] Jede DNA-Probe wurde mit entweder EcoRI, MboI oder HincII (12 µg) nach den Angaben des Herstellers behandelt. Die gespaltenen DNAs wurden auf 1%igen neutralen Agarosegelen elektrophoretisch untersucht, nach Southern auf Nitrocellulose geblottet, und das geblottete Material wurde mit der geeigneten cDNA einer nick-translatierten Sonde (3 × 10⁶ cpm/ml Hybridisierungsgemisch) hybridisiert. Die DNA aus der Leber infizierter Schimpansen und aus normaler Leber wurde mit ³²P-markierter HCV-cDNA aus den Clonen 36 plus 81 hybridisiert. Die DNA aus menschlicher Placenta wurde mit ³²P-markierter DNA aus dem β -Interferongen hybridisiert. Nach der Hybridisierung wurden die Blots unter stringenten Bedingungen, d.h. mit einer Lösung aus 0,1 × SSC, 0,1% SDS bei 65°C, gewaschen.

[0416] Die DNA des β -Interferongens wurde, wie von Houghton et al. (1981) beschrieben, hergestellt.

IV.H.4.b. Amplifikation nach der PCR-Technik

[0417] Um zu bestimmen, ob die HCV-DNA in Leber von Schimpansen mit NANBH nachgewiesen werden kann, wurde DNA aus dem Gewebe isoliert, und der PCR-Amplifikations-Nachweisteknik unter Verwendung von Primern und Sondenpolynucleotiden, die von der HCV-cDNA von Clon 81 abgeleitet waren, unterworfen. Die negativen Kontrollen waren DNA-Proben, die aus nichtinfizierten HepG2-Gewebskulturzellen und aus vermutlich nichtinfizierter menschlicher Placenta isoliert wurden. Die positiven Kontrollen waren die Proben der negativen Kontroll-DNAs, denen eine bekannte relativ kleine Menge (250 Moleküle) der HCV-cDNA-Insertion aus Clon 81 zugesetzt war.

[0418] Zusätzlich wurde zur Bestätigung, daß die RNA-Fractionen, die aus den gleichen Lebern von Schimpansen mit NANBH isoliert worden waren, Komplementärsequenzen der HCV-cDNA-Sonde enthielten, das PCR-Amplifikationsnachweissystem ebenfalls an den isolierten RNA-Proben verwendet.

[0419] In den Studien wurden die DNAs nach dem in Abschnitt IV.H.4.a. beschriebenen Verfahren isoliert, und die RNAs wurden im wesentlichen, wie von Chirgwin et al. (1981) beschrieben, extrahiert.

[0420] Die DNA-Proben wurden aus zwei Lebern von infizierten Schimpansen, aus nichtinfizierten HepG2-Zellen und aus menschlicher Placenta isoliert. 1 µg jeder DNA wurde mit HindIII nach den Angaben des Herstellers gespalten. Die gespaltenen Proben wurden der PCR-Amplifikation und dem Nachweis auf die amplifizierte HCV-cDNA im wesentlichen, wie in Abschnitt IV.C.3. beschrieben, unterworfen, ausgenommen, daß die Stufe der reversen Transkriptase weggelassen wurde. Die PCR-Primer und die Sonde stammten von der HCV-cDNA von Clon 81 und sind in Abschnitt IV.C.3. beschrieben. Vor der Amplifikation wurde als positive Kontrollen 1 µg einer Probe jeder DNA durch Zugabe von 250 Molekülen der aus Clon 81 isolierten HCV-cDNA-Insertion gekennzeichnet ("spiked").

[0421] Um zu bestimmen, ob die HCV-Sequenzen in RNA, die aus den Lebern von Schimpansen mit NANBH isoliert worden war, vorhanden waren, wurden Proben, die 0,4 µg der Gesamt-RNA enthielten, dem Amplifikationsverfahren im wesentlichen, wie in Abschnitt IV.C.3. beschrieben, unterworfen, ausgenommen, daß die reverse Transkriptase von einigen Proben als negative Kontrolle weggelassen wurde. Die PCR-Primer und die Sonde stammten von der HCV-cDNA von Clon 81, wie vorstehend beschrieben.

[0422] Die Ergebnisse zeigten, daß amplifizierte Sequenzen, die der HCV-cDNA-Sonde komplementär waren, in den DNAs von der Leber infizierter Schimpansen nicht nachweisbar waren und auch nicht in den negativen Kontrollen nachweisbar waren. Im Gegensatz dazu wurden, wenn die Proben einschließlich der DNA aus der Leber von infizierten Schimpansen mit der HCV-cDNA vor der Amplifikation gekennzeichnet wurden,

die Sequenzen von Clon 81 in allen positiven Kontrollproben nachgewiesen. Zusätzlich wurden in den RNA-Studien Sequenzen von amplifizierter HCV-cDNA von Clon 81 nur nachgewiesen, wenn die reverse Transkriptase verwendet wurde, was stark nahelegt, daß die Ergebnisse nicht auf eine DNA-Kontamination zurückzuführen waren.

[0423] Diese Ergebnisse zeigen, daß Hepatocyten aus Schimpansen mit NANBH keine oder nichtnachweisbare Mengen an HCV-DNA enthalten. Basierend auf der Kennzeichnungsstudie ist die HCV-DNA, sofern sie vorhanden ist, in einer Menge weit unter 0,06 Kopien pro Hepatocyt vorhanden. Im Gegensatz dazu wurden HCV-Sequenzen in Gesamt-RNA aus den gleichen Leberproben sofort mit der PCR-Technik nachgewiesen.

IV.I. ELISA-Bestimmungen auf HCV-Infektion unter Verwendung von HCV-c100-3 als Test-Antigen

[0424] Alle Proben wurden unter Verwendung des HCV-c100-3-ELISAs untersucht. Bei diesem Test wurde das HCV-c100-3-Antigen (das, wie in Abschnitt IV.B.5. beschrieben, synthetisiert und gereinigt worden war) und ein Meerrettichperoxidase (HRP)-Konjugat von monoklonalem Maus-Anti-Mensch-IgG verwendet.

[0425] Mit dem HCV-c100-3-Antigen beschichtete Platten wurden wie folgt hergestellt. Eine Lösung aus dem Beschichtungspuffer (50 mM Na-Borat, pH 9,0), 21 ml/Platte, BSA (25 µg/ml), c100-3 (2,50 µg/ml) wurde kurz vor der Zugabe auf die Removeawell-Immulon-I-Platten (Dynatech Corp.) hergestellt. Nach 5-minütigem Vermischen wurden 0,2 ml/Vertiefung der Lösung auf die Platten gegeben, und sie wurden bedeckt und 2 h lang bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Lösung durch Aspiration entfernt. Die Vertiefungen wurden einmal mit 400 µl Waschpuffer (100 mM Natriumphosphat, pH 7,4, 140 mM Natriumchlorid, 0,1% (Gewicht/Volumen) Casein, 1% (Gewicht/Volumen) Triton X-100, 0,01% (Gewicht/Volumen) Thimerosal) gewaschen. Nach Entfernen der Waschlösung wurden 200 µl/Vertiefung Postcoat-Lösung (10 mM Natriumphosphat, pH 7,2, 150 mM Natriumchlorid, 0,1% (Gewicht/Volumen) Casein und 2 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) zugesetzt. Die Platten wurden locker bedeckt, um die Verdunstung zu verhindern, und wurden 30 min lang bei Raumtemperatur stehengelassen. Die Vertiefungen wurden dann aspiriert, um die Lösung zu entfernen und über Nacht trocken lyophilisiert, ohne Erhitzung des Lagerorts. Die hergestellten Platten können bei 2 bis 8°C in versiegelten Aluminiumbeuteln gelagert werden.

[0426] Um die ELISA-Bestimmung durchzuführen, wurden 20 µl Serumprobe oder Kontrollprobe einer Vertiefung, die 200 µl Probenverdünner (100 mM Natriumphosphat, pH 7,4, 500 mM Natriumchlorid, 1 mM EDTA, 0,1% (Gewicht/Volumen) Casein, 0,015 (Gewicht/Volumen) Therosal, 1% (Gewicht/Volumen) Triton X-100, 100 µg/ml Hefeextrakt) enthielt, zugegeben. Die Platten wurden versiegelt und 2 h lang bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Lösung durch Aspiration entfernt und die Vertiefungen wurden mit 400 µl Waschpuffer (phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), enthaltend 0,05 Tween 20) gewaschen. Die gewaschenen Vertiefungen wurden mit 200 µl Maus-Anti-Mensch-IgG-HRP-Konjugat, das in einer Lösung des Ortho-Konjugatverdünners (10 mM Natriumphosphat, pH 7,2, 150 mM Natriumchlorid, 50% (Volumen/Volumen) fötales Rinderserum, 1% (Volumen/Volumen) hitzebehandeltes Pferdeserum, 1 mM $K_3Fe(CN)_6$, 0,05% (Gewicht/Volumen) Tween 20, 0,02% (Gewicht/Volumen) Thimerosal) enthalten war, behandelt. Die Behandlung dauerte 1 h bei 37°C, die Lösung wurde durch Aspiration entfernt, und die Vertiefungen wurden mit Waschpuffer, der ebenfalls durch Aspiration entfernt wurde, gewaschen. Um die Menge des gebundenen Enzymkonjugats zu bestimmen, wurden 200 µl Substratlösung (10 mg o-Phenylendiamindihydrochlorid pro 5 ml Entwicklerlösung) zugesetzt. Die Entwicklerlösung enthält 50 mM Natriumcitrat, eingestellt mit Phosphorsäure auf pH 5,1 und 0,6 µl/ml 30 H_2O_2 . Die Platten, die die Substratlösung enthielten, wurden im Dunkeln 30 min lang bei Raumtemperatur inkubiert, die Reaktionen wurde durch Zugabe von 50 µl/ml 4N Schwefelsäure gestoppt, und die OD-Werte wurden bestimmt.

[0427] Die nachstehend angegebenen Beispiele zeigen, daß der Mikrotiterplatten-Absuch-ELISA, bei dem das HCV-c100-3-Antigen verwendet wird, einen hohen Spezifitätsgrad besitzt, wie durch eine anfängliche Reaktivitätsrate von etwa 1%, bezogen auf eine wiederholte Rate von etwa 0,5% an Zufallsspendern nachgewiesen wurde. Mit dem Test kann eine Immunantwort sowohl in der postakuten Phase der Infektion, als auch während der chronischen Phase der Erkrankung nachgewiesen werden. Zusätzlich können mit dem Test einige Proben nachgewiesen werden, die ein negatives Ergebnis in den Ersatztests auf NANBH ergeben. Diese Proben stammen von Individuen mit einer NANBH-Anamnese oder von Spendern, die an der NANBH-Übertragung beteiligt sind.

[0428] In den nachstehend beschriebenen Beispielen werden die folgenden Abkürzungen verwendet:

ALT	Alanin-Aminotransferase
Anti-HBc	Antikörper gegen HBc
Anti-HBsAg	Antikörper gegen HBsAg
HBc	Hepatitis-B-Core-Antigen
HBsAg	Hepatitis B-Oberflächen-Antigen
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IE/I	Internationale Einheiten/I
NA	nicht verfügbar
NT	nicht getestet
N	Probengröße
Neg	negativ
OD	optische Dichte
Pos	positiv
S/C	O Signal/Endpunkt
SD	Standardabweichung
x	Durchschnitt oder Mittelwert
WNL	innerhalb normaler Grenzen

IV.I.1. HCV-Infektion in einer Population zufälliger Blutspender

[0429] Eine Gruppe von 1056 Proben (frische Seren) von zufälligen Blutspendern wurde von der Irwin-Memorial-Blood-Bank, San Francisco, Kalifornien, erhalten. Die mit diesen Proben erhaltenen Testergebnisse sind in einem Histogramm, das die Verteilung der OD-Werte zeigt, zusammengefaßt (**Fig. 43**). Wie aus **Fig. 43** hervorgeht, sind vier Proben >3 , eine Probe zwischen 1 und 3, fünf Proben zwischen 0,4 und 1 und die verbleibenden 1046 Proben $<0,4$, wobei über 90% dieser Proben $<0,1$ sind.

[0430] Die Ergebnisse an den reaktiven Zufallsproben sind in Tabelle 5 dargestellt. Unter Verwendung eines Endpunktwerts, der dem Mittelwert plus 5 Standardabweichungen entspricht, waren anfänglich 10 Proben von den 1056 (0,95%) reaktiv. Von diesen erwiesen sich fünf Proben (0,47%) erneut als reaktiv, wenn sie ein zweites Mal unter Verwendung des ELISAs getestet wurden. Die Tabelle 5 zeigt auch den ALT- und Anti-HBd-Status für jede der wiederholt reaktiven Proben. Von besonderem Interesse ist die Tatsache, daß alle fünf wiederholt reaktiven Proben in beiden Ersatztests auf NANBH negativ waren, während sie in dem HCV-ELISA ein positives Ergebnis ergaben.

Tabelle 5
Ergebnisse an reaktiven Zufallsproben

$N = 1051$
 $\bar{x} = 0,049^*$
 $SD = \pm 0,074$
 Endpunkt: $\bar{x} + 5SD = 0,419$ (0,400 + negative Kontrolle)

Proben	Anfänglich reaktiv	Wiederholt reaktiv	ALT** (IE/l)	Anti- HBc*** (OD)
	OD	OD		
4227	0,462	0,084	NA	NA
6292	0,569	0,294	NA	NA
6188	0,699	0,326	NA	NA
6157	0,735	0,187	NA	NA
6277	0,883	0,152	NA	NA
6397	1,567	1,392	30,14	1,433
6019	>3,000	>3,000	46,48	1,057
6651	>3,000	>3,000	48,53	1,343
6669	>3,000	>3,000	60,53	1,165
4003	>3,000	3,000	WNL****	negativ

10/1056 = 0,95 % 5/1056 = 0,47 %

*Proben >1,5 wurden bei der Berechnung des Mittelwerts und der SD nicht aufgenommen

**ALT ≥ 68 IE/l ist über den Normalwerten

***Anti-HBc $\leq 0,535$ (kompetitiver Test) gilt als positiv

****WNL: in den normalen Grenzen

IV.1.2. Schimpansenserumproben

[0431] Serumproben von 11 Schimpansen wurden mit dem HCV-c100-3-ELISA getestet. Vier von diesen Schimpansen wurden durch eine kontaminierte Charge von Faktor VIII (vermutlich Hutchinson-Stamm) mit NANBH nach einem etablierten Verfahren in Zusammenarbeit mit Dr. Daniel Bradley am Center for Disease Control infiziert. Als Kontrollen wurden vier andere Schimpansen mit HAV und drei mit HBV infiziert. Die Serumproben wurden zu verschiedenen Zeiten nach der Infektion gewonnen.

[0432] Die Ergebnisse, die in Tabelle 6 zusammengefaßt sind, zeigen eine dokumentierte Antikörper-Seroconversion bei allen Schimpansen, die mit dem Hutchinson-Stamm von NANBH infiziert worden waren. Nach der akuten Phase der Infektion (wie durch das signifikante Ansteigen und anschließende Abfallen auf normale ALT-Werte nachgewiesen ist) wurden Antikörper gegen HCV-c100-3 in den Seren von 4/4-NANBH-infizierten Schimpansen nachweisbar. Von diesen Proben war zuvor, wie in Abschnitt IV.B.3. diskutiert, gezeigt worden, daß sie in einer Western-Analyse und in einem RIA positiv waren. Im Gegensatz dazu zeigte keiner der Kontroll-Schimpansen, der mit HAV oder HBV infiziert worden war, einen Reaktivitätsnachweis in dem ELISA.

Tabelle 6
Schimpansenserumproben

	OD	S/CO	Inokulati- onsdatum	Datum der Blutent- nahme	ALT (IE/l)	Transfundi ert
Negative Kontrolle	0,001					
Positive Kontrolle	1,504					
Endpunkt	0,401					
Schimpanse 1	-0,007	0,00	24.5.84	24.5.84	9	NANB
	0,003	0,01		7.8.84	71	
	>3,000	>7,48		18.9.84	19	
	>3,000	>7,48		24.10.84	---	
Schimpanse 2	---	---	7.6.84	---	---	NANB
	-0,003	0,00		31.5.84	5	
	-0,005	0,00		28.6.84	52	
	0,945	2,36		20.8.84	13	
	>3,000	>7,48		24.10.84	---	
Schimpanse 3	0,005	0,01	14.3.85	14.3.85	8	NANB
	0,017	0,04		26.4.85	205	
	0,006	0,01		6.5.85	14	
	1,010	2,52		20.8.85	6	
Schimpanse 4	-0,006	0,00	11.3.85	11.3.85	11	NANB
	0,003	0,01		9.5.85	132	
	0,523	1,31		6.6.85	---	
	1,574	<u>3,93</u>		1.8.85	---	
Schimpanse 5	-0,006	0,00	21.11.80	21.11.80	4	HAV
	0,001	0,00		16.12.80	147	
	0,003	0,01		30.12.80	18	
	0,006	0,01		29.7. -	5	
				21.8.81		
Schimpanse 6	---	---	25.5.82	---	---	HAV
	-0,005	0,00		17.5.82	---	
	0,001	0,00		10.6.82	106	
	-0,004	0,00		6.7.82	10	
	0,290	0,72		1.10.82	---	
Schimpanse 7	-0,008	0,00	25.5.82	25.5.82	7	HAV
	-0,004	0,00		17.6.82	83	
	-0,006	0,00		16.9.82	5	
	0,005	0,01		9.10.82	---	
Schimpanse 8	-0,007	0,00	21.11.80	21.11.80	15	HAV
	0,000	0,00		16.12.80	130	
	0,004	0,01		3.2.81	8	
	0,000	0,00		3.6. -	4,5	
				10.6.81		

Schimpanse 9	---	---	24.7.80	---	---	HBV
	0,019	0,05		22.8. -	---	
				10.10.79		
	---	---		11.3.81	57	
	0,015	0,04		1.7. -	9	
				5.8.81		
	0,008	0,02		1.10.81	6	
Schimpanse 10	---	---	12.5.82	---	---	HBV
	0,011	0,03		21.4. -	9	
				12.5.82		
	0,015	0,04		1.9. -	126	
				8.9.82		
	0,008	0,02		2.12.82	9	
	0,010	0,02		6.1.83	13	
Schimpanse 11	---	---	12.5.82	---	---	HBV
	0,000	0,00		6.1. -	11	
				12.5.82		
	---	---		23.6.82	100	
	-0,003	0,00		9.6. -	---	
				7.7/82		
	-0,003	0,00		28.10.82	9	
	-0,003	0,00		20.12.82	10	

IV.I.3. Versuchsgruppe 1: Erwiesen infektiöse Seren aus menschlichen chronischen NANBH-Trägern

[0433] Eine codierte ("coded") Versuchsgruppe bestand aus 22 Einzelproben, die jeweils doppelt vorhanden waren, insgesamt 44 Proben. Die Proben stammten aus erwiesen infektiösen Seren von chronischen NANBH-Trägern, infektiösen Seren von beteiligten Spendern und infektiösen Seren von Patienten in der akuten NANBH-Phase. Zusätzlich stammten die Proben von Kontrollen mit deutlich negativem Hintergrund ("pedigree"). und anderen erkrankten Kontrollen. Diese Versuchsgruppe wurde von Dr. H. Alter vom Department of Health and Human Service, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, zur Verfügung gestellt. Die Versuchsgruppe wurde von Dr. Alter vor mehreren Jahren zusammengestellt und wurde von Dr. Alter als geeignete Versuchsgruppe für vermutliche NANBH-Tests verwendet.

[0434] Die gesamte Versuchsgruppe wurde zweimal mit dem ELISA-Test getestet, und die Ergebnisse wurden zur Auswertung an Dr. Alter geschickt. Die Ergebnisse der Auswertung sind in Tabelle 7 dargestellt. Obwohl die Tabelle die Ergebnisse nur einer Reihe der Doppelproben darstellt, wurden die gleichen Werte für jede der Doppelproben erhalten.

[0435] Wie in Tabelle 7 gezeigt, waren sechs Seren, die in einem Schimpansenmodell sich als infektiös erwiesen hatten, stark positiv. Das siebte infektiöse Serum entsprach einer Probe für einen akuten NANBH-Fall und reagierte in diesem ELISA nicht. Eine Probe von einem beteiligten Spender mit normalen ALT-Gehalten und zweideutigen Ergebnissen in Schimpansenstudien war in dem Test nicht reaktiv. Drei andere Serienproben von einem Individuum mit akuter NANBH waren ebenfalls nicht reaktiv. Alle Proben von den sehr deutlich negativen Kontrollen, die von Spendern, die mindestens 10 Blutspenden ohne Hepatitis-Beteiligung erhalten hatten, waren in dem ELISA nicht reaktiv. Schließlich hatten vier der getesteten Proben zuvor in einem vermutlichen NANBH-Test, der von anderen entwickelt worden war, ein positives Ergebnis ergeben, aber diese Tests konnten nicht bestätigt werden. Diese vier Proben ergaben in dem HCV-ELISA ein negatives Ergebnis.

Tabelle 7
H. Alters Versuchsgruppe 1:

<u>Versuchsgruppe</u>	<u>1. Ergebnis</u>	<u>2. Ergebnis</u>
1) Erwiesen infektiös durch Schimpansenansteckung		
A. Chronische NANB; Post-Tx		
JF	+	+
EB	+	+
PG	+	+
B. Beteiligte Spender mit erhöhtem ALT-Wert		
BC	+	+
JJ	+	+
BB	+	+
C. Akute NANB; Post-Tx		
WH	-	-
2) Zweideutig infektiös durch		
Schimpansenansteckung		
A. Beteiligter Spender mit normalem ALT-Wert		
CC	-	-
3) Akute NANB; Post-Tx		
JL Woche 1	-	-
JL Woche 2	-	-
JL Woche 3	-	-
4) Krankheitskontrollen		
A. Primäre biliäre Leberzirrhose		
FK	-	-
B. Genesende Alkoholiker-Hepatitis		
HB	-	-
5) Deutlich negative Kontrollen		
DM	-	-
DC	-	-
LV	-	-
ML	-	-
AH	-	-
6) Potentielle NANB-"Antigene"		
JS-80-01T-O (ISHIDA)	-	-
ASTERIX (TREPO)	-	-
ZURTZ (ARNOLD)	-	-
BECASSDINE (TREPO)	-	-

IV.1.4. Versuchsgruppe 2: Spender/Empfänger-NANBH

[0436] Die codierte Versuchsgruppe bestand aus 10 eindeutigen Spender-Empfänger-Fällen von transfusi-

ons-assoziiertes NANBH mit einer Gesamtzahl von 188 Proben. Jeder Fall bestand aus Proben von einigen oder allen Spendern für den Empfänger und von Reihenproben (3, 6 und 12 Monate nach Transfusion entnommen) von dem Empfänger. Ebenfalls mit aufgenommen wurde eine Vorblutprobe, die dem Empfänger vor der Transfusion entnommen worden war. Die codierte Versuchsgruppe wurde von Dr. H. Alter vom NIH bereitgestellt, und die Ergebnisse wurden an ihn zur Auswertung geschickt.

[0437] Die Ergebnisse, die in Tabelle 8 zusammengefaßt sind, zeigen, daß der ELISA Antikörper-Seroconversion in 9 von 10 Fällen der transfusions-assoziierten NANBH nachwies. Proben aus Fall 4 (in dem keine Seroconversion nachgewiesen wurde) reagierten beständig schwach in dem ELISA. Zwei von den 10 Empfängerproben reagierten drei Monate nach der Transfusion. Nach sechs Monaten reagierten 8 Empfängerproben, und nach 12 Monaten reagierten mit Ausnahme von Fall 4 alle Proben. Zusätzlich wurde mindestens ein Antikörper-positiver Spender in 7 von den 10 Fällen gefunden, wobei der Fall 10 zwei positive Spender hatte. Auch im Fall 10 war die Vorblutprobe des Empfängers auf HCV-Antikörper positiv. Die 1-Monatsblutprobe von diesem Empfänger fiel auf die Grenzlinie für reaktive Spiegel, während sie bei den 4- und 10-Monatsblutproben als positiv bewertet wurde. Im allgemeinen galt ein S/CO-Wert von 0,4 als positiv. So kann dieser Fall eine frühere Infektion des Individuums mit HCV darstellen.

[0438] Der ALT- und HBc-Status für alle reaktiven, d.h. positiven Proben sind in Tabelle 9 zusammengefaßt. Wie aus der Tabelle hervorgeht, war 1/8 der Spenderproben bezüglich der Ersatzmarker negativ und reagierte in dem HCV-Antikörper-ELISA. Andererseits hatten die Empfängerproben (bis zu 12 Monate nach der Transfusion verfolgt) entweder erhöhte ALT-Werte oder positives Anti-HBc oder beides.

Tabelle 8
Spender/Empfänger NANB-Versuchsgruppe
H Alter Spender/Empfänger NANB-Versuchsgruppe

Fall	Spender		Empfänger-				Post-Tx			
			Vorblut		3 Monate		6 Monate		12 Monate	
	OD	S/CO	OD	S/CO	OD	S/CO	OD	S/CO	OD	S/CO
1.	---	---	,032	0,07	,112	0,26	>3,000	>6,96	>3,000	>6,96
2.	---	---	,059	0,14	,050	0,12	1,681	3,90	>3,000	>6,96
3.	,403	0,94	,049	0,11	,057	0,13	>3,000	>6,96	>3,000	>6,96
4.	---	---	,065	0,15	,073	0,17	,067	0,16	,217	0,50
5.	>3,000	>6,96	,034	0,08	,096	0,22	>3,000	>6,96	>3,000	>6,96
6.	>3,000	>6,96	,056	0,13	1,475	3,44	>3,000	>6,96	>3,000	>6,96
7.	>3,000	>6,96	,034	0,08	,056	0,13	>3,000	>6,96	>3,000	>6,96
8.	>3,000	>6,96	,061	0,14	,078	0,18	2,262	5,28	>3,000	>6,96
9.	>3,000	>6,96	,080	0,19	,127	0,30	,055	0,13	>3,000	>6,96
10.	>3,000	>6,96	>3,000	>6,96	,317*	0,74	>3,000**	>6,96	>3,000***	>6,96
	>3,000	>6,96								

* 1 Monat, ** 4 Monate, *** 10 Monate

Tabelle 9
ALT und HBc-Status für reaktive Proben in der Versuchsgruppe 1 nach H Alter

Proben		Anti-ALT*	HBc**
<u>Spender</u>			
Fall 3		normal	negativ
Fall 5		erhöht	positiv
Fall 6		erhöht	positiv
Fall 7		nicht vergügbar	negativ
Fall 8		normal	positiv
Fall 9		erhöht	nicht verfügbar
Fall 10		normal	positiv
Fall 10		normal	positiv
<u>Empfänger</u>			
Fall 1	6 mo	erhöht	positiv
	12 mo	erhöht	nicht getestet
Fall 2	6 mo	erhöht	negativ
	12 mo	erhöht	nicht getestet
Fall 3	6 mo	normal	nicht getestet***
	12 mo	erhöht	nicht getestet***
Fall 5	6 mo	erhöht	nicht getestet
	12 mo	erhöht	nicht getestet
Fall 6	3 mo	erhöht	negativ
	6 mo	erhöht	negativ
	12 mo	erhöht	nicht getestet
Fall 7	6 mo	erhöht	negativ
	12 mo	erhöht	negativ
Fall 8	6 mo	normal	positiv
	12 mo	erhöht	nicht getestet
Fall 9	12 mo	erhöht	nicht getestet
Fall 10	4 mo	erhöht	nicht getestet
	10 mo	erhöht	nicht getestet

*Alt ≥ 45 IE/l liegt über den normalen Grenzen.

**Anti-HBc $\leq 50\%$ (kompetitiver Test) gilt als positiv.

***Vorblutprobe und 3-Monatsproben waren auf HBc negativ.

IV.I.5. Bestimmung der HCV-Infektion in Proben einer Hochrisikogruppe

[0439] Proben von Hochrisikogruppen wurden unter Verwendung des ELISAs geprüft, um die Reaktivität gegen das HCV-c100-3-Antigen zu bestimmen. Diese Proben wurden von Dr. Gary Tegtmeier, Community Blood Bank, Kansas City, bezogen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 zusammengefaßt.

[0440] Wie in der Tabelle gezeigt, werden die Proben mit der höchsten Reaktivität von Hämophilen (76%) erhalten. Zusätzlich waren die Proben von Individuen mit einem erhöhten ALT-Wert und einer positiven Reaktion auf Anti-HBc zu 51% reaktiv, ein Wert, der dem aus klinischen Daten und der Verbreitung von NANBH in dieser Gruppe erwarteten Wert entspricht. Das Auftreten von Antikörpern gegen HCV war bei Blutspendern mit erhöhtem ALT-Wert allein, Blutspendern, die auf Antikörper gegen den Hepatitis B-Core allein positiv waren, und bei Blutspendern, die aus anderen Gründen als einem hohen ALT-Wert oder einem Anti-Core-Antikörper zu-

rückgewiesen wurden, ebenfalls höher, verglichen mit zufällig gewählten freiwilligen Spendern.

Tabelle 10
Proben von einer Gruppe mit hohem NANBH-Risiko

<u>Gruppe</u>	<u>Verteilung</u>			
	<u>N</u>	<u>N</u>	<u>OD</u>	<u>% Reaktiv</u>
Erhöhter ALT-Wert	35	3	>3,000	11,4 %
	1	0,728		
Anti-HBc	24	5	>3,000	20,8 %
Erhöhter ALT-Wert, Anti-HBc	33	12	>3,000	51,5 %
	1	2,768		
	1	2,324		
	1	0,939		
	1	0,951		
	1	0,906		
Zurückgewiesene Spender	25	5	>3,000	20,0 %
Spender mit einer Hepatitis-	150	19	>3,000	14,7 %
Anamnese				
	1	0,837		
	1	0,714		
	1	0,460		
Hämophile	50	31	>3,000	76,0 %
	1	2,568		
	1	2,483		
	1	2,000		
	1	1,979		
	1	1,495		
	1	1,209		
	1	0,819		

IV.I.6 Vergleichsstudien unter Verwendung monoklonalen Anti-IgG- oder Anti-IgM-Antikörper oder polyclonaler Antikörper als zweitem Antikörper in dem HCV-c100-3-ELISA

[0441] Die Empfindlichkeit der ELISA-Bestimmung, bei der das monoklonale Anti-IgG-Konjugat verwendet wird, wurde mit der verglichen, die unter Verwendung entweder eines monoklonalen Anti-IgM-Konjugats oder durch Ersatz beider mit einem polyclonalen Antiserum, das als sowohl für die schwere als auch die leichte Kette spezifisch beschrieben wird. Die folgenden Studien wurden durchgeführt.

IV.I.6.a. Reihenproben von Seroconvertern

[0442] Reihenproben von drei Fällen von NANB-Seroconvertern wurden in dem HCV-c100-3-ELISA-Test unter Verwendung des Enzymkonjugats entweder mit dem monoclonalen Anti-IgG allein oder in Kombination mit einem monoclonalen Anti-IgM oder unter Verwendung eines polyclonalen Antiserums untersucht. wie Proben wurden von Dr. Cladd Stevens, N.Y. Blood Centre, N.Y.C., N.Y., bereitgestellt. Die Probenanamnesen sind in Tabelle 11 gezeigt.

[0443] Die unter Verwendung eines monoclonalen Anti-IgG-Antikörper-Enzymkonjugats erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 12 gezeigt. Die Daten zeigen, daß eine starke Reaktivität anfänglich in den Proben 1–4, 2–8 und 3–5 der Fälle 1, 2 bzw. 3 beobachtet wird.

[0444] Die Ergebnisse, die unter Verwendung einer Kombination eines monoclonalen Anti-IgG-Konjugats und eines Anti-IgM-Konjugats erhalten wurden, sind in Tabelle 13 gezeigt. Drei verschiedene Verhältnisse von Anti-IgG zu Anti-IgM wurden getestet; die 1:10000-Verdünnung von Anti-IgG war durchwegs konstant. Die Verdünnungen, die für das monoclonale Anti-IgM-Konjugat getestet wurden, betrugen 1:30000, 1:60000 und 1:120000. Die Daten zeigen, daß in Übereinstimmung mit den Untersuchungen mit Anti-IgG allein eine anfängliche starke Reaktivität in den Proben 1–4, 2–8 und 3–5 nachgewiesen wird.

[0445] Die Ergebnisse, die mit dem ELISA unter Verwendung eines monoclonalen Anti-IgG-Konjugats (Verdünnung 1:10000) oder des polyclonalen Konjugats von Tago (Verdünnung 1:80000) oder des polyclonalen Konjugats von Jackson (Verdünnung 1:80000) erhalten wurden, sind in Tabelle 14 gezeigt. Die Daten zeigen, daß eine anfängliche starke Reaktivität in den Proben 1–4, 2–8 und 3–5 unter Verwendung aller drei Konfigurationen nachgewiesen wird. Die polyclonalen Antikörper von Tago ergaben die niedrigsten Signale.

[0446] Die vorstehend dargelegten Ergebnisse zeigen, daß alle drei Konfigurationen reaktive Proben zur gleichen Zeit nach der akuten Phase der Krankheit (wie durch die ALT-Bewertung nachgewiesen) nachweisen. Ferner zeigen die Ergebnisse, daß die Empfindlichkeit des HCV-c100-3-ELISAs unter Verwendung eines monoclonalen Anti-IgG-Enzymkonjugats gleich oder besser ist als die, die unter Verwendung der anderen getesteten Konfigurationen für das Enzymkonjugat erhalten wird.

Tabelle 11
Beschreibung der Proben aus der Cladd-Stevens-Versuchsgruppe

	Datum	HbSAg	Anti-HBs	Anti-HBc	ALT	Bilirubin
<u>Fall 1</u>						
1-1	8/5/81	1,0	91,7	12,9	40,0	-1,0
1-2	9/2/81	1,0	121,0	15,1	274,0	1,4
1-3	10/7/81	1,0	64,0	23,8	261,0	0,9
1-4	11/19/81	1,0	67,3	33,8	75,0	0,9
1-5	12/15/81	1,0	50,5	27,6	71,0	1,0
<u>Fall 2</u>						
2-1	10/19/81	1,0	1,0	116,2	17,0	-1,0
2-2	11/17/81	1,0	0,8	89,5	46,0	1,1
2-3	12/02/81	1,0	1,2	78,3	63,0	1,4
2-4	12/14/81	1,0	0,9	90,6	117,0	1,4
2-5	12/23/81	1,0	0,8	93,6	624,0	1,7
2-6	1/20/82	1,0	0,8	92,9	66,0	1,5
2-7	2/15/82	1,0	0,8	86,7	70,0	1,3
2-8	3/17/82	1,0	0,9	69,8	24,0	-1,0
2-9	4/21/82	1,0	0,9	67,1	53,0	1,5
2-10	5/19/82	1,0	0,5	74,8	95,0	1,6
2-11	6/14/82	1,0	0,8	82,9	37,0	-1,0
<u>Fall 3</u>						
3-1	4/7/81	1,0	1,2	88,4	13,0	-1,0
3-2	5/12/81	1,0	1,1	126,2	236,0	0,4
3-3	5/30/81	1,0	0,7	99,9	471,0	0,2
3-4	6/9/81	1,0	1,2	110,8	315,0	0,4
3-5	7/6/81	1,0	1,1	89,9	273,0	0,4
3-6	8/10/81	1,0	1,0	118,2	158,0	0,4
3-7	9/8/81	1,0	1,0	112,3	84,0	0,3
3-8	10/14/81	1,0	0,9	102,5	180,0	0,5
3-9	11/11/81	1,0	1,0	84,6	154,0	0,3

Tabelle 12

ELISA-Egebnisse, erhalten unter Verwendung eines monoclonalen Anti-IaG-Konjuaats

<u>Probe</u>	<u>Datum</u>	<u>ALT</u>	<u>OD</u>	<u>S/CO</u>
negative Kontrolle			,076	
Endpunkt			,476	
PC (1:128)			1,390	
<u>Fall #1</u>				
1-1	08/05/81	40,0	,178	,37
1-2	09/02/81	274,0	,154	,32
1-3	10/07/81	261,0	,129	,27
1-4	11/19/81	75,0	,937	1,9,
1-5	12/15/81	71,0	>3,000	>6,30
<u>Fall #2</u>				
2-1	10/19/81	17,0	,058	0,12
2-2	11/17/81	46,0	,050	0,11
2-3	12/02/81	63,0	,047	0,10
2-4	12/14/81	152,0	,059	0,12
2-5	12/23/81	624,0	,070	0,15
2-6	01/20/82	66,0	,051	0,11
2-7	02/15/82	70,0	,139	0,29
2-8	03/17/82	24,0	1,867	3,92
2-9	04/21/82	53,0	>3,000	>6,30
2-10	05/19/82	95,0	>3,000	>6,30
2-11	06/14/82	37,0	>3,000	>6,30
<u>Fall #3</u>				
3-1	04/07/81	13,0	,090	,19
3-2	05/12/81	236,0	,064	,13
3-3	05/30/81	471,0	,079	,17
3-4	06/09/81	315,0	,211	,44
3-5	07/06/81	273,0	1,707	3,59
3-6	08/10/81	158,0	>3,000	>6,30
3-7	09/08/81	84,0	>3,000	>6,30
3-8	10/14/81	180,0	>3,000	>6,30
3-9	11/11/81	154,0	>3,000	>6,30

Tabelle 13

ELISA-Ergebnisse, erhalten unter Verwendung eines monoklonalen Anti-IgG und Anti-IgM-Konjugats

Probe	Datum	ALT	NANB ELISAs					
			Monoklonale		Monoklonale		Monoklonale	
			IgG 1:10K		IgG 1:10K		IgG 1:10K	
			IgM 1:30K		IgM 1:60K		IgM 1:120K	
			OD	S/CO	OD	S/CO	OD	S/CO
Negative Kontrolle			,100		,080		,079	
Endpunkt								
PC (1:128)			1,083		1,328		1,197	
<u>Fall #1</u>								
1-1	08/05/81	40	,173		,162		,070	
1-2	09/02/81	274	,194		,141		,079	
1-3	10/07/81	261	,162		,129		,063	
1-4	11/19/81	75	,812		,85		,709	
1-5	12/15/81	71	>3,00		>3,00		>3,00	
<u>Fall #2</u>								
2-1	10/19/81	17	,442		,045		,035	
2-2	11/17/81	46	,102		,029		,030	
2-3	12/02/81	63	,059		,036		,027	
2-4	12/14/81	152	,065		,041		,025	
2-5	12/23/81	624	,082		,033		,032	
2-6	01/20/82	66	,102		,042		,027	
2-7	02/15/82	70	,188		,068		,096	
2-8	03/17/82	24	1,728		1,668		1,541	
2-9	04/21/82	53	>3,00		2,443		>3,00	
2-10	05/19/82	95	>3,00		>3,00		>3,00	
2-11	06/14/82	37	>3,00		>3,00		>3,00	
<u>Fall #3</u>								
3-1	04/07/81	13	,193		,076		,049	
3-2	05/12/81	236	,201		,051		,038	
3-3	05/30/81	471	,132		,067		,052	
3-4	06/09/81	315	,175		,155		,140	
3-5	07/06/81	273	1,335		1,238		1,260	
3-6	08/10/81	158	>3,00		>3,00		>3,00	
3-7	09/08/81	84	>3,00		>3,00		>3,00	
3-8	10/14/81	180	>3,00		>3,00		>3,00	
3-9	11/11/81	154	>3,00		>3,00		>3,00	

Tabelle 14
ELISA-Ergebnisse, erhalten unter Verwendung polyclonaler Konjugate

Probe	Datum	ALT	NANB ELISAs					
			MONOCLONAL		TAGO		JACKSON	
			1:10K		1:80K		1:80K	
			OD	S/CO	OD	S/CO	OD	S/CO
Negative Kontrolle			,076		,045		,154	
Endpunkt			,476		,545		,654	
PC (1:128)			<u>1,390</u>		<u>,727</u>		<u>2,154</u>	
<u>Fall #1</u>								
1-1	08/05/81	40	,178	,37	,067	,12	,153	,23
1-2	09/02/81	274	,154	,32	,097	,18	,277	,34
1-3	10/07/81	261	,129	,27	,026	,05	,167	,26
1-4	11/19/81	75	,937	1,97	,324	,60	,793	1,21
1-5	12/15/81	71	>3,00	>6,30	1,778	3,27	>3,00	>4,59
<u>Fall #2</u>								
2-1	10/19/81	17	,058	,12	,023	,04	,052	,08
2-2	11/17/81	46	,050	,11	,018	,03	,058	,09
2-3	12/02/81	63	,047	,10	,020	,04	,060	,09
2-4	12/14/81	152	,059	,12	,025	,05	,054	,08
2-5	12/23/81	624	,070	,15	,026	,05	,074	,11
2-6	01/20/82	66	,051	,11	,018	,03	,058	,09
2-7	02/15/82	70	,139	,29	,037	,07	,146	,22
2-8	03/17/82	24	1,867	3,92	,355	,65	1,429	2,19
2-9	04/21/82	53	>3,00	>6,30	,748	1,37	>3,00	>4,59
2-10	05/19/82	95	>3,00	>6,30	1,025	1,88	>3,00	>4,59
2-11	06/14/82	37	>3,00	>6,30	,917	1,68	>3,00	>4,59
<u>Fall #3</u>								
3-1	04/07/81	13	,090	,19	,049	,09	,138	,21
3-2	05/12/81	236	,064	,13	,040	,07	,094	,14
3-3	05/30/81	471	,079	,17	,045	,08	,144	,22
3-4	06/09/81	315	,211	,44	,085	,16	,275	,42
3-5	07/06/81	273	1,707	3,59	,272	,50	1,773	2,71
3-6	08/10/81	158	>3,00	>6,30	1,347	2,47	>3,00	>4,59
3-7	09/08/81	84	>3,00	>6,30	2,294	4,21	>3,00	>4,59
3-8	10/14/81	180	>3,00	>6,30	>3,00	>5,50	>3,00	>4,59
3-9	11/11/81	154	>3,00	>6,30	>3,00	>5,50	>3,00	>4,59

IV.1.6.b. Proben von Zufallsblutspendern

[0447] Proben von Zufallsblutspendern (vergleiche Abschnitt IV.1.1.) wurden auf eine HCV-Infektion abgesehen unter Verwendung des HCV-c100-3-ELISAs, in dem das Antikörper-Enzymkonjugat entweder ein monoklonales Anti-IgG-Konjugat oder ein polyclonales Konjugat war. Die Gesamtzahl der abgesehenen Proben war 2077 bzw. 1056 für das polyclonale Konjugat bzw. das monoklonale Konjugat. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse dieses Tests ist in Tabelle 15 gezeigt, und die Probenverteilungen sind in den Histogrammen in Fig. 44 gezeigt.

[0448] Die Berechnung des Mittelwerts und der Standardabweichung wurden unter Ausschluß der Proben, die ein Signal über 1,5 ergaben, durchgeführt, d.h. 1073 OD-Werte wurden für die Berechnungen unter Verwendung des polyclonalen Konjugats und 1051 für das monoklonale Anti-IgG-Konjugat verwendet. Wie aus Tabelle 15 hervorgeht, verschob sich bei Verwendung des polyclonalen Konjugats der Mittelwert von 0,0493 auf 0,0931, und die Standardabweichung erhöhte sich von 0,074 auf 0,0933. Ferner zeigen die Ergebnisse auch, daß, wenn das Kriterium von $x + 5SD$ zur Definition des Endpunkts des Tests verwendet wird, die Konfi-

guration des Konjugats aus polyclonalen Antikörpern und Enzym in dem ELISA einen höheren Endpunktwert benötigt. Dies zeigt eine verringerte Testspezifität im Vergleich zu dem monoklonalen System an. Zusätzlich tritt, wie in dem Histogramm in **Fig. 44** gezeigt, eine größere Streuung der Ergebnisse zwischen negativen und positiven Verteilungen auf, wenn Zufallsblutspender in einem ELISA unter Verwendung des monoklonalen Anti-IgG-Konjugats abgesucht werden, verglichen mit dem Test, bei dem ein handelsüblicher polyclonaler Marker verwendet wird.

Tabelle 15
Vergleich der zwei ELISA-Konfigurationen in Testproben von zufälligen Blutspendern

<u>Konjugat</u>	<u>Polyclonal</u> (Jackson)	<u>Monoklonales Anti-IgG</u>
Anzahl der Proben	1073	1051
Mittelwert (x)	0,0931	0,04926
Standardabweichung (SD)	0,0933	0,07427
5 SD	0,4666	0,3714
Endpunkt (5 SD + x)	0,5596	0,4206

IV.J. Nachweis von HCV-Seroconversion in NPNBH-Patienten von einer Vielzahl geographischer Orte

[0449] Seren von Patienten, die auf der Basis erhöhter ALT-Werte vermutlich NANBH hatten, und die in den HAV- und HBV-Tests negativ waren, wurden unter Verwendung des RIAs im wesentlichen, wie in Abschnitt IV.D. beschrieben, abgesucht, ausgenommen, daß das HCV-C100-3-Antigen als zum Absuchen verwendetes Antigen in den Mikrotiterplatten verwendet wurde. Wie aus den in Tabelle 16 dargestellten Ergebnissen hervorgeht, wurden mit dem RIA positive Proben in einem hohen Prozentsatz der Fälle nachgewiesen.

Tabelle 16
Seroconversionshäufigkeit für Anti-c100-3 unter NANBH-Patienten in verschiedenen Ländern

<u>Land</u>	<u>Niederlande</u>	<u>Italien</u>	<u>Japan</u>
Untersuchte			
Anzahl	5	36	26
Positive	3	29	19
Anzahl			
% Positiv	60	80	73

IV.K. Nachweis der HCV-Seroconversion in Patienten mit "in der Gemeinschaft erworbener" ("community acquired") NANBH

[0450] Seren von 100 NANBH-Patienten, für die kein offensichtlicher Übertragungsweg vorhanden war (d.h. keine Transfusion, keine i.v.-Medikamentenanwendung, Promiskuität etc. wurden als Risikofaktoren festgestellt) wurden von Dr. M. Alter vom Center for Disease Control und Dr. J. Dienstag von der Havard Universität bereitgestellt. Diese Proben wurden unter Verwendung eines RIAs im wesentlichen, wie in Abschnitt IV.D. beschrieben, abgesucht, ausgenommen, daß das HCV-c100-3-Antigen als absuchendes Antigen, das an den Mikrotiterplatten haftete, verwendet wurde. Die Ergebnisse zeigten, daß von den 100 Serumproben 55 Antikörper enthielten, die immunologisch mit dem HCV-c100-3-Antigen reagierten.

[0451] Die vorstehend beschriebenen Ergebnisse legen nahe, daß die "in der Gemeinschaft erworbene" NANBH ebenfalls durch HCV verursacht wird. Da hier nachgewiesen wurde, daß HCV mit den Flaviviren verwandt ist, von denen die meisten durch Arthropoden übertragen werden, kann man annehmen, daß die HCV-Übertragung in den "in der Gemeinschaft erworbenen" Fällen ebenfalls von einer Arthropoden-Übertragung stammt.

IV.L. Vergleich des Auftretens von HCV-Antikörpern und Ersatzmarkern in Spendern die an der NANBH-Übertragung beteiligt sind

[0452] Eine prospektive Studie wurde durchgeführt, um zu bestimmen, ob Blutempfänger von vermutlich NANBH-positiven Spendern, die NANBH entwickelten, zu Anti-HCV-Antikörper-positiv seroconvertierten. Die Blutspender wurden auf Abnormalitäten des Ersatzmarkers, die gegenwärtig als Marker für die NANBH-Infektion verwendet werden, d.h. erhöhte ALT-Werte und Vorhandensein von Anti-Core-Antikörpern, getestet. Zusätzlich wurden die Spender auch auf das Vorhandensein von Anti-HCV-Antikörpern getestet. Die Bestimmung des Vorhandenseins von Anti-HCV-Antikörpern wurde unter Verwendung eines Radioimmunoassays, wie in Abschnitt IV.K. beschrieben, durchgeführt. Die Ergebnisse der Studie sind in Tabelle 17 dargestellt, die zeigt: die Patienten-Nummer (Spalte 1), das Vorhandensein von Anti-HCV-Antikörpern in dem Patientenserum (Spalte 2), die Anzahl der von dem Patienten erhaltenen Spenden, wobei jede Spende von einem anderen Spender stammte (Spalte 3), das Vorhandensein von Anti-HCV-Antikörpern in Spenderserum (Spalte 4) und die Abnormalität des Ersatzmarkers des Spenders (Spalte 5) (NT oder - bedeutet nicht getestet) (ALT bedeutet erhöhte Transaminase und Anti-HBc bedeutet Anti-Core-Antikörper).

[0453] Die Ergebnisse in Tabelle 17 zeigen, daß der HCV-Antikörpertest beim Nachweis infizierter Blutspender genauer als die Tests mit Ersatzmarkern ist. Neun von zehn Patienten, die NANBH-Symptome entwickelten, waren im Test auf Anti-HCV-Antikörper-Seroconversion positiv. Von den 11 vermutlich infizierten Spendern (Patient 6 erhielt Spenden von zwei verschiedenen Individuen, die vermutlich NANBH-Träger waren) waren neun auf Anti-HCV-Antikörper positiv und einer war ein positiver Grenzfall und daher zweideutig (Spender für Patient 1). Im Gegensatz dazu waren unter Verwendung des Tests auf erhöhten ALT-Wert sechs von zehn Spendern negativ und unter Verwendung des Tests auf den Anti-Core-Antikörper fünf von zehn Spendern negativ. Von größerer Bedeutung noch ist die Tatsache, daß in drei Fällen (Spender für Patienten 8, 9 und 10) der ALT-Test und der Anti-HBc-Test nicht übereinstimmende Ergebnisse ergaben.

Tabelle 17

Entwicklung von Anti-HCV-Antikörpern in Patienten die Blut von Spendern, die vermutlich NANBH-Träger waren erhielten

Patient	Anti-HCV-Serokonversion in dem Patienten	Anzahl der Spenden/Spender	Anti-HCV positive Spender	Abnormalität des Ersatzmarkers	
				ALT	Anti-HB
1	ja	18	zweideutig	nein	nein
2	ja	18	ja	NT	ja
3	ja	13	ja	nein	nein
4	nein	18	nein	--	--
5	ja	16	ja	ja	ja
6	ja	11	ja (2)	nein	nein
				ja	ja
7	ja	15	ja	NT	nein
8	ja	20	ja	nein	ja
9	ja	5	ja	ja	nein
10	ja	15	ja	nein	ja

*Gleicher Spender wie Anti-NANBV positiv.

IV.M. Amplifikation zur Clonierung der HCV-cDNA-Sequenzen unter Verwendung der PCR und von konservierten Bereichen genomischer Sequenzen des Flavivirus abgeleiteter Primer

[0454] Die vorstehend dargestellten Ergebnisse, die nahelegen, daß HCV ein Flavivirus oder ein flaviartiges

Virus ist, erlauben eine Strategie zur Clonierung nichtcharakterisierter HCV-cDNA-Sequenzen unter Verwendung der PCR-Technik und von Primern, die von Bereichen abgeleitet sind, die konservierte Aminosäuresequenzen in Flaviviren codieren. Im allgemeinen ist einer der Primer von einer definierten HCV-Genomsequenz abgeleitet, und der andere Primer, der einen Bereich von nicht-sequenziertem HCV-Polynucleotid flankiert, ist von einem konservierten Bereich des Flavivirusgenoms abgeleitet. Die Flavivirusgenome enthalten bekanntlich konservierte Sequenzen in den NS1- und E-Polypeptiden, die in der 5'-Region des Flavivirusgenoms codiert werden. Entsprechende Sequenzen, die diese Bereiche codieren, liegen stromaufwärts der HCV-cDNA-Sequenz, die in **Fig. 26** gezeigt ist. So werden zur Isolierung von cDNA-Sequenzen, die von diesem Bereich des HCV-Genoms abgeleitet sind, stromaufwärts liegende Primer entwickelt, die von den konservierten Sequenzen innerhalb dieser Flaviviruspolypeptide abgeleitet sind. Die stromabwärts liegenden Primer sind von einem stromaufwärts liegenden Ende des bekannten Teils der HCV-cDNA abgeleitet.

[0455] Wegen der Degeneration des Codes ist es wahrscheinlich, daß zwischen den Flavivirussonden und der entsprechenden genomischen HCV-Sequenz Fehlpaarungen sind. Daher wird eine Strategie verwendet, die der von Lee (1988) beschriebenen ähnlich ist. Bei dem Lee-Verfahren werden gemischte Oligonucleotid-Primer verwendet, die zu Produkten der reversen Translation einer Aminosäuresequenz komplementär sind. Die Sequenzen in den gemischten Primern berücksichtigen jede Codon-Degeneration für die konservierte Aminosäuresequenz.

[0456] Drei Reihen von Primergemischen werden erzeugt, basierend auf den Aminosäurehomologien, die sich in verschiedenen Flaviviren, einschließlich Dengue-2,4 (D-2,4), Japan-Encephalitis-Virus (JEV), Gelbfieber (YF) und West-Nile-Virus (WN), finden. Das von der am meisten konservierten stromaufwärts liegenden Sequenz (5'-1) abgeleitete Primergemisch beruht auf der Aminosäuresequenz gly-trp-gly, die ein Teil der konservierten Sequenz asp-arg-aly-trp-gly-asn ist, die sich in dem E-Protein von D-2, JEV, YF und WN findet. Das nächste Primergemisch (5'-2) beruht auf einer konservierten stromabwärts liegenden Sequenz in dem E-Protein, phe-asp-gly-asp-ser-tyr-ileu-phe-gly-asp-ser-tyr-ileu, und ist von phe-gly-asp abgeleitet. Die konservierte Sequenz ist in D-2, JEV, YF und WN vorhanden. Das dritte Primergemisch (5'-3) beruht auf der Aminosäuresequenz arg-ser-cys, die Teil der konservierten Sequenz cys-cys-arg-ser-cys in dem NS1-Protein von D-2, D-4, JEV, YF und WN ist. Die einzelnen Primer, die das Gemisch in 5'-3 bilden, sind in **Fig. 45** gezeigt. Zusätzlich zu den variierten Sequenzen, die von dem konservierten Bereich abgeleitet sind, enthält jeder Primer in jedem Gemisch ebenfalls einen konstanten Bereich an dem 5'-Ende, der eine Sequenz enthält, die Restriktionsspaltstellen für die Enzyme HindIII, MboI und EcoRI codiert.

[0457] Der stromabwärts liegende Primer ssc5h20A leitet sich von einer Nucleotidsequenz in Clon 5h ab, die HCV-cDNA mit Sequenzen enthält, die mit denjenigen in den Clonen 14i und 11b überlappen. Die Sequenz von ssc5h20A lautet

5' GTA ATA TGG TGA CAG AGT CA 3'.

[0458] Ein alternativer Primer, ssc5h34A, kann ebenfalls verwendet werden. Dieser Primer leitet sich von einer Sequenz in Clon 5h ab und enthält zusätzlich Nucleotide an dem 5'-Ende, die eine Restriktionsenzymspaltstelle erzeugen, wodurch die Clonierung erleichtert wird. Die Sequenz von ssc5h34A lautet

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

[0459] Die PCR-Reaktion, die zuerst von Saiki et al. (1986) beschrieben wurde, wird im wesentlichen, wie in Lee et al. (1988) beschrieben, durchgeführt, ausgenommen, daß die Matrize für die cDNA eine RNA ist, die aus der Leber von mit HCV infizierten Schimpansen, wie in Abschnitt IV.C.2. beschrieben, isoliert wurde oder aus viralen Teilchen, die aus Serum von mit HCV infizierten Schimpansen, wie in Abschnitt IV.A.1. beschrieben, isoliert wurden. Zusätzlich sind die Anelierungsbedingungen in dem ersten Amplifikationszyklus (0,6 M NaCl und 25°C) weniger stringent, da der Teil des Primers, der an die HCV-Sequenz anliert, nur 9 Nucleotide lang ist, und Fehlpaarungen auftreten könnten. Wenn ssc5h34A verwendet wird, neigen ferner die zusätzlichen Sequenzen, die nicht von dem HCV-Genom abgeleitet sind, dazu, das Primer-Matrize-Hybrid zu destabilisieren. Nach dem ersten Amplifikationszyklus können die Anelierungsbedingungen stringenter sein (0,066 M NaCl und 32°C bis 37°C), da die amplifizierten Sequenzen nun Bereiche enthalten, die den Primern komplementär sind oder sie duplizieren. Zusätzlich werden die ersten 10 Amplifikationszyklen mit dem Klenow-Enzym I unter geeigneten PCR-Bedingungen für dieses Enzym durchgeführt. Nach der Beendigung dieser Zyklen werden die Proben extrahiert und mit Taq-Polymerase nach den Angaben für den Kit, wie von Cetus/Perkin-Elmer bereitgestellt, laufengelassen.

[0460] Nach der Amplifikation werden die amplifizierten HCV-cDNA-Sequenzen durch Hybridisierung unter Verwendung einer von dem Clon 5h abgeleiteten Sonde nachgewiesen. Diese Sonde leitet sich von Sequenzen stromaufwärts derjenigen, die zur Ableitung des Primers verwendet wurden, ab und überlappt mit den Sequenzen der von dem Clon 5h abgeleiteten Primer nicht. Die Sequenz der Sonde lautet

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

IV.N.1. Erzeugung der HCV-cDNA-Bank aus der Leber eines Schimpansen mit infektiöser NANBH

[0461] Eine HCV-cDNA-Bank wurde aus der Leber des Schimpansen, aus der die HCV-cDNA-Bank in Abschnitt IV.A.1. erzeugt worden war, hergestellt. Die Technik zur Erzeugung der Bank war derjenigen in Abschnitt IV.A.24 ähnlich mit Ausnahme dieser unterschiedlichen RNA-Quelle und der Tatsache, daß ein Primer, basierend auf der Sequenz der HCV-cDNA in Clon 11b verwendet wurde. Die Sequenz des Primers lautete

5' CTG GCT TGA AGA ATC 3'.

IV.N.2. Isolierung und Nucleotidsequenz von HCV-cDNA in Clon k9-1 die mit cDNA in Clon 11b überlappt

[0462] Der Clon k9-1 wurde aus der HCV-cDNA-Bank isoliert, die aus Leber eines mit NANBH infizierten Schimpansen, wie in Abschnitt IV.A.25. beschrieben, erzeugt wurde. Die Bank wurde unter Verwendung eines Clons, der mit Clon 11b an dem 5'-Terminus überlappt, Clon 11e, auf Clon abgesucht, die mit der Sequenz in Clon 11b überlappen. Die Sequenz von Clon 11b ist in **Fig. 23** gezeigt. Positive Clone wurden mit einer Häufigkeit von 1 aus 500000 isoliert. Ein isolierter Clon k9-1 wurde weiter untersucht. Die überlappende Natur der HCV-cDNA in Clon k9-1 mit dem 5'-Ende der HCV-cDNA-Sequenz in **Fig. 26** wurde durch Absuchen des Clons mit dem Clon Alex 46 bestätigt. Dieser zuletzt genannte Clon enthält eine HCV-cDNA-Sequenz aus 30 Basenpaaren, die den Basenpaaren an dem 5'-Terminus der HCV-cDNA in Clon 14i, der vorstehend beschrieben wurde, entspricht.

[0463] Die Nucleotidsequenz der HCV-cDNA, die aus Clon k9-1 isoliert wurde, wurde unter Verwendung der vorstehend beschriebenen Techniken bestimmt. Die Sequenz der HCV-cDNA in Clon k9-1, die Überlappung mit der HCV-cDNA in **Fig. 26** und die davon codierten Aminosäuren sind in **Fig. 46** gezeigt.

[0464] Die HCV-cDNA-Sequenz in Clon k9-1 wurde mit denjenigen der Clone, die in Abschnitt IV.A.19. beschrieben wurden, ausgerichtet, um eine zusammengesetzte HCV-cDNA-Sequenz zu erzeugen, wobei die k9-1-Sequenz stromaufwärts der in **Fig. 32** gezeigten Sequenz angeordnet ist. Die zusammengesetzte HCV-cDNA, die die k9-1-Sequenz umfaßt, und die davon codierten Aminosäuren sind in **Fig. 47** gezeigt.

[0465] Die Sequenz der von dem 5'-Bereich der HCV-cDNA, die in **Fig. 47** gezeigt ist, codierten Aminosäuren wurde mit dem entsprechenden Bereich eines der Stämme des vorstehend beschriebenen Dengue-Virus bezüglich des Profils der hydrophoben und hydrophilen Bereiche verglichen. Dieser Vergleich zeigte, daß die Polypeptide aus HCV und Dengue, die in diesem Bereich codiert wurden, der dem Bereich entspricht, der NS1 (oder einen Teil davon) codiert, ein ähnliches Hydrophobie-/Hydrophilie-Profil besitzen.

[0466] Die vorstehend dargestellte Information erlaubt die Identifizierung der HCV-Stämme. Die Isolierung und Charakterisierung anderer HCV-Stämme kann durch Isolieren der Nucleinsäuren aus Körperkomponenten, die virale Teilchen enthalten, Erzeugen von cDNA-Banken unter Verwendung von Polynucleotidsonden auf der Basis der HCV-cDNA-Sonden, die vorstehend beschrieben wurden, Absuchen der Banken auf Clone, die die vorstehend beschriebenen HCV-cDNA-Sequenzen enthalten, und Vergleich der HCV-cDNAs aus den neuen Isolat mit den nachstehend beschriebenen cDNAs durchgeführt werden. Die davon oder von dem viralen Genom codierten Polypeptide können auf immunologische Kreuzreaktivität unter Verwendung der vorstehend beschriebenen Polypeptide und Antikörper überwacht werden. Stämme, die die HCV-Parameter, wie sie in dem vorstehenden Abschnitt "Definitionen" beschrieben sind, erfüllen, sind leicht identifizierbar. Andere Verfahren zur Identifizierung von HCV-Stämmen sind einem Fachmann, basierend auf der hier bereitgestellten Information, offensichtlich.

Gewerbliche Anwendbarkeit

[0467] Die Erfindung besitzt in den vorstehend offenbarten, verschiedenen Ausführungsformen viele gewerbliche Verwendungen, von denen nachfolgend einige aufgeführt sind. Die HCV-cDNAs können zur Entwicklung von Sonden zum Nachweis von HCV-Nucleinsäuren in Proben verwendet werden. Die von den cDNAs abgeleiteten Sonden können zum Nachweis von HCV-Nucleinsäuren, beispielsweise in chemischen synthetischen Reaktionen, verwendet werden. Sie können auch in Suchprogrammen nach anti-viralen Mitteln verwendet werden, um die Wirkung der Mittel bezüglich der Hemmung der viralen Replikation in Zellkultursystemen und in Tiermodellsystemen zu bestimmen. Die HCV-Polynucleotidsonden sind auch nützlich, um virale Nucleinsäuren in Menschen nachzuweisen, und können so als Basis zur Diagnose von HCV-Infektionen bei Menschen dienen.

[0468] Zusätzlich zu den vorstehenden Ausführungen bieten die hier bereitgestellten cDNAs Informationen und Mittel zur Synthese von Polypeptiden, die HCV-Epitope enthalten. Diese Polypeptide sind zum Nachweis

von Antikörpern gegen HCV-Antigene nützlich. Eine Reihe von Immunoassays auf HCV-Infektionen, basierend auf rekombinanten Polypeptiden, die HCV-Epitope enthalten, sind hier beschrieben und finden kommerzielle Anwendung zur Diagnose von HCV-induzierter NANBH, zum Absuchen von Blutspendern auf HCV-verursachte infektiöse Hepatitis und auch zum Nachweis von kontaminiertem Blut von infektiösen Blutspendern. Die viralen Antigene sind auch zur Überwachung der Wirksamkeit antiviraler Mittel in Tiermodellsystemen nützlich. Zusätzlich sind die von den hier offenbarten HCV-cDNAs abgeleiteten Polypeptide als Impfstoffe zur Behandlung von HCV-Infektionen nützlich.

[0469] Die von den HCV-cDNAs abgeleiteten Polypeptide sind, abgesehen von den vorstehend angegebenen Verwendungen, auch zur Erzeugung von Anti-HCV-Antikörpern nützlich. So können sie in Anti-HCV-Impfstoffen verwendet werden. Jedoch sind die Antikörper, die als Ergebnis der Immunisierung mit den HCV-Polypeptiden gebildet werden, ebenfalls zum Nachweis des Vorhandenseins viraler Antigene in Proben nützlich. So können sie verwendet werden, um die Bildung von HCV-Polypeptiden in chemischen Systemen zu testen. Die Anti-HCV-Antikörper können auch verwendet werden, um die Wirksamkeit antiviraler Mittel in Überwachungsprogrammen, bei denen diese Mittel in Gewebekultursystemen getestet werden, zu testen. Sie können auch zur passiven Immuntherapie und zur Diagnose von HCV-verursachter NANBH verwendet werden, indem sie den Nachweis des viralen Antigens bzw. der viralen Antigene sowohl in Blutspendern als auch -empfängern ermöglichen. Eine weitere wichtige Verwendung für die Anti-HCV-Antikörper ist die Affinitätschromatographie zur Reinigung von Viren und viralen Polypeptiden. Die gereinigten Virus- und viralen Polypeptidpräparate können in Impfstoffen verwendet werden. Jedoch kann das gereinigte Virus auch zur Entwicklung von Zellkultursystemen, in denen sich HCV repliziert, nützlich sein.

[0470] Die Zellkultursysteme, die mit HCV infizierte Zellen enthalten, besitzen viele Anwendungen. Sie können zur Produktion von HCV, das normalerweise ein Virus mit niedrigem Titer ist, in relativ großem Maßstab verwendet werden. Diese Systeme können auch zur Aufklärung der Molekularbiologie des Virus nützlich sein und zur Entwicklung antiviraler Mittel führen. Die Zellkultursysteme sind auch zum Absuchen der Wirksamkeit antiviraler Mittel nützlich. Zusätzlich sind HCV-permissive Zellkultursysteme zur Produktion attenuierter HCV-Stämme nützlich.

[0471] Geeigneterweise können die Anti-HCV-Antikörper und HCV-Polypeptide – entweder natürlich oder rekombinant – in Kits verpackt werden.

[0472] Das zur Isolierung der HCV-cDNA verwendete Verfahren, bei dem eine cDNA-Bank, die von infiziertem Gewebe eines Individuums abgeleitet ist, in einem Expressionsvektor erzeugt wird und Clone ausgewählt werden, die die Expressionsprodukte produzieren, die immunologisch mit den Antikörpern in antikörperhaltigen Körperkomponenten aus anderen infizierten Individuen und nicht aus nichtinfizierten Individuen reagieren, kann auch zur Isolierung von cDNAs angewendet werden, die von anderen, bisher nicht charakterisierten, krankheitsassoziierten Erregern, die aus einer genomischen Komponente bestehen, abgeleitet sind. Dies seinerseits könnte zur Isolierung und Charakterisierung dieser Erreger und zu diagnostischen Reagentien und Impfstoffen für diese anderen krankheitsassoziierten Erreger führen.

Patentansprüche

1. Polymerasekettenreaktions (PCR)-Kit, umfassend ein Paar von Primern, die zum Primen der Synthese von cDNA in einer PCR-Reaktion fähig sind, wobei jeder der Primer ein Polynucleotid ist, das eine benachbarte Sequenz von Nucleotiden umfasst, die zur selektiven Hybridisierung mit dem Genom von Hepatitis C-Virus (HCV) oder dem Komplement davon fähig ist, wobei HCV folgendermaßen charakterisiert ist:

ein positiver Strang des RNA-Genoms;

das Genom umfasst ein offenes Leseraster (ORF), welches ein Polyprotein codiert; und

die Gesamtheit des codierten Polyproteins hat eine mindestens 40%-ige Homologie zu dem gesamten Polyprotein eines viralen Isolats, von dessen Genom cDNAs hergestellt wurden, hinterlegt in einer Lambda-gt-11-cDNA-Bibliothek bei der American Type Culture Collection (ATCC) unter der Hinterlegungsnummer 40394.

2. PCR-Kit nach Anspruch 1, wobei jeder der Primer ein Polynucleotid ist, wobei die benachbarte Nucleotidsequenz mindestens 20 Nucleotide umfasst.

3. PCR-Kit nach Anspruch 1 oder 2, weiterhin eine Polynucleotidsonde umfassend, die zur selektiven Hybridisierung mit einem Bereich des HCV-Genoms fähig ist, das zwischen den HCV-Sequenzen liegt, von denen die Primer stammen, und diese nicht umfasst.

4. Verfahren zur Durchführung einer Polymerasekettenreaktion, wobei die Primer wie in Anspruch 1 oder 2 definiert sind.

5. Verfahren zum Testen einer Probe auf die Gegenwart oder Abwesenheit von HCV-Polynucleotiden, umfassend:

(a) Inkontaktbringen der Probe mit einer Sonde unter Bedingungen, die die selektive Hybridisierung der Sonde mit einem HCV-Polynucleotid oder dem Komplement davon in der Probe ermöglichen, wobei die Sonde ein Polynucleotid umfasst, das eine benachbarte Sequenz von Nucleotiden umfasst, die fähig ist zur selektiven Hybridisierung mit dem Genom von HCV oder dem Komplement davon, wobei HCV folgendermaßen charakterisiert ist:

(i) ein positiver Strang des RNA-Genoms, wobei das Genom ein offenes Leseraster (ORF) umfasst, welches ein Polyprotein codiert; und

(ii) die Gesamtheit des codierten Polyproteins hat eine mindestens 40%ige Homologie zu dem gesamten Polyprotein eines viralen Isolats, von dessen Genom cDNAs hergestellt wurden, hinterlegt in einer Lambda-gt-11-cDNA-Bibliothek bei der American Type Culture Collection (ATCC) unter der Hinterlegungsnummer 40394; und

(b) Bestimmung, ob Polynucleotidduplexe gebildet wurden, die die Sonde umfassen, und wobei weiterhin das Polynucleotid ein DNA-Polynucleotid ist und gegebenenfalls einen nachweisbaren Marker umfasst.

Es folgen 63 Blatt Zeichnungen

1 AlaSerCysLeuAsnCysSerAlaSerIleIleProAspArgGluValLeuTyrArgGlu
GGCCTCCTGCTTGAAGTCTCGGCGAGCATACCTGACAGGGAAGTCCTCTACCGAGA
CCGGAGGACGAACCTGACGAGCCGCTCGTAGTAGTGGACTGTCCCTTCAGGAGATGGCTCT

61 PheAspGluMetGluGluCysSerGlnHisLeuProTyrIleGluGlnGlyMetMetLeu
GTTTCGATGAGATGGAAGAGTGTCTCTCAGCACTTACCGTACATCGAGCAAGGGATGATGCT
CAAGCTACTCTACCTTCTCAGGAGAGTCGTGAATGGCATGTAGCTCGTTCCTTACTACGA

121 AlaGluGlnPheLysGlnLysAlaLeuGlyLeu
CGCCGAGCAGTTCAAGCAGAAGGCCCTCGGCCTCC
GCGCCTCGTCAAGTTCGTCTTCCGGGAGCCGGAGG

1 GlyCysValIleValGlyArgValValIleuSerGlyLysProAlaIleIleProAsp
CTGGCTGCGTGGTTCATAGTGGGACAGGGTTCGTCTTGTCCGGGAAGCCGGCAATCATACCTG
GACCGACGCACCAGTATCACCCGTCCCAGCAGAACAGGCCCTTCGGCCGTTAGTATGGAC

T

61 ArgGluValIleuTyrArgGluPheAspGluMetGluGluCysSerGlnHisLeuProTyr
ACAGGGAAGTCCCTCTACCGAGAGTTCGATGAGATGGAAGAGTGCCTCTCAGCACTTACCCT
TGTCCCTTCAGGAGATGGCTCTCAAGCTACTCTACCTTCTCAGCAGAGTCTGTAATGGCA

A

121 IleGluGlnGlyMetMetLeuAlaGluGlnPheLysGlnLysAlaLeuGlyLeuLeuGln
ACATCGAGCAAGGGATGATGCTCGCCGAGCAGTTCAAGCAGAAGGCCCTCGGCCTCCTGC
TATAGCTCGTTCCTACTACGAGCGGCTCGTCAAGTTCGTCTTCCGGGAGCCGGAGGACG

181 ThrAlaSerArgGlnAlaGluValIleAlaProAlaValGlnThrAsnTrpGlnLysLeu
AGACCGCGTCCCGTCAGGCAGAGGTTATCGCCCCGTGCTGTCCAGACCAACTGGCAAAAAC
TCTGGCGCAGGGCAGTCCGTCTCCAATAGCGGGGACGACAGGTCTGGTTGACCGTTTTTG

241 GluThrPheTrpAlaLysHisMetTrpAsnPheIleSerGlyIleGlnTyrLeuAlaGly
TCGAGACCTTCTGGGCGAAGCATATGTGGAACCTTCATCAGTGGGATACAATACTTGGCGG
AGCTCTGGAAGACCCGCTTCGTATACACCTTGAAAGTAGTCACCCTATGTTATGAACCGCC

301 LeuSerThrLeuProGlyAsnProAlaIleAlaSerLeuMetAlaPheThrAlaAlaVal
GCTTGTCAACGCTGCCTGGTAAACCCCGCCATTGCTTCATTGATGGCTTTTACAGCTGCTG
CGAACAGTTGCGACGGACCATTTGGGGCGGTAACGAAGTAACTACCGAAAATGTCGACGAC

361 ThrSerProLeuThrThrSerGln
TCACCAGCCCACTAACCCTAGCCAAA
AGTGGTTCGGGTGATTGGTGATCGGTTT

၁၆၆

FIG. 4. Translation der DNA 81

1 SerGlyLysProAlaIleIleProAspArgGluValLeuTyrArgGluPheAspGluMet
 GTCCGGGAAGCCGGCAATCATACCTGACAGGGAAGTCCTCTACCGAGAGTTCCATGAGAT
 CAGGCCCTTCGGCCGTTAGTATGGACTGTCCCTTCAGGAGATGGCTCTCAAGCTACTCTA
 61 GluGluCysSerGlnHisLeuProTyrIleGluGlnGlyMetMetLeuAlaGluGlnPhe
 GGAAGAGTGCTCTCAGCACTTACCGTACATCGAGCAAGGGATGATGCTCGCCGAGCAGTT
 CCTTCTCAGAGAGTCGTGAATGGCATGTAGCTCGTTCCTACTACGAGCGGCTCGTCAA
 121 LysGlnLysAlaLeuGlyLeuLeuGlnThrAlaSerArgGlnAlaGluValIleAlaPro
 CAAGCAGAAGGCCCTCGGCCCTCCTGCAGACCGCGTCCCGTCAGGCAGAGGTTATCGCCCC
 GTTCGTCTTCCGGGAGCCGGAGGACGTCTGGCGCAGGGCAGTCCGTCTCCAATAGCGGGG
 181 AlaValGlnThrAsnTrpGlnLysLeuGluThrPheTrpAlaLysHisMetTrpAsnPhe
 TGCTGTCCAGACCAACTGGCAAAACTCGAGACCTTCTGGGCGAAGCATATGTGGAACCTT
 ACGACAGGTCTGGTTGACCGTTTTTGAGCTCTGGAAGACCCGCTTCGTATACACCTTGAA
 241 IleSerGlyIleGlnTyrLeuAlaGlyLeuSerThrLeuProGlyAsnProAlaIleAla
 CATCAGTGGGATACAATACTTGGCGGGCTTGTCAACGCTGCCTGGTAACCCCGCCATTGC
 GTAGTCACCCATATGTTATGAACCGCCCCGAACAGTTGCGACGGACCAATTGGGGCGGTAAACG
 301 SerLeuMetAlaPheThrAlaAlaValThrSerProLeuThrThrSerGln
 TTCATTGATGGCTTTTACAGCTGCTGTCAACAGCCCACTAACCCTAGCCAAA
 AAGTAACTACCGAAAATGTGACGACAGTGGTGGGTGATTGGTGATCGGTTT

FIG. 5 Translation der DNA 36

1 AspAlaHisPheLeuSerGlnThrLysGlnSerGlyGluAsnLeuProTyrLeuValAla
 GATGCCCACTTTCTATCCCAGACAAAGCAGAGTGGGGAGAACCTTCTTACCTGGTAGCG
 CTACGGGTGAAAGATAGGGTCTGTTTCGTCTCACCCTCTTGAAGGAATGGACCATCGC
 61 TyrGlnAlaThrValCysAlaArgAlaGlnAlaProProProSerTrpAspGlnMetTrp
 TACCAAGCCACCGTGTGCGCTAGGGCTCAAGCCCTCCCCATCGTGGGACCAGATGTGG
 ATGGTTCCGGTGGCACCAGCATCCCGAGTTCGGGGAGGGGTAGCACCCCTGCTACACC
 121 LysCysLeuIleArgLeuLysProThrLeuHisGlyProThrProLeuLeuTyrArgLeu
 AAGTGTGTGATTGCGCTCAAGCCCACTTCCATGGGCCAACACCCCTGCTATACAGACTG
 TTCACAACTAAGCGGAGTTCGGGTGGGAGGTACCCGTTGTGGGGACGATATGCTGAC
 181 GlyAlaValGlnAsnGluIleThrLeuThrHisProValThrLysTyrIleMetThrCys
 GGCCTGTTCAGAATGAAATCACCCCTGACGCACCCAGTCACCAATACATCATGACATGC
 CCGCGACAAGTCTTACTTTAGTGGGACTGCGTGGGTGAGTGGTTTATGTAGTACTGTACG
 241 MetSerAlaAspLeuGluValValThrSerThrTrpValLeuValGlyGlyValLeuAla
 ATGTCCGGCCGACCTGGAGGTGCTCAGAGCACCTGGGTGCTCGTTGGCGCGTCTGGCT
 TACAGCCGGCTGGACCTCCAGCAGTGTCTGTTGACCCACGAGCAACCGCCGAGGACCGA
 301 AlaLeuAlaAlaTyrCysLeuSerThrGlyCysValValIleValGlyArgValValLeu
 CCTTTGGCCGCGTATTGCTGTCAACAGGCTGCGTGGTCAATAGTGGGCAGGGTCTGCTTG
 CGAAACCGGCGCATACCGGACAGTTGTCCGACGCACCACTATCACCCGTCCAGCAGAAC

Überlappung mit 81

361 SerGlyLysProAlaIleIleProAspArgGluValLeuTyrArg
 TCCGGGAAGCCGGCAATCATACCTGACAGGGAAGTCCTCTACCGAG
 AGGCCCTTCGGCCGTTAGTATGGACTGTCCCTTCAGGAGATGGCTC

FIG. 6 Kombiniertes ORF der DNAs 36 und 81

1 AspAlaHisPheLeuSerGlnThrLysGlnSerGlyGluAsnLeuProTyrLeuValAla
 GATGCCCACTTTCTATCCCAGACAAAGCAGAGTGGGGAGAACCTTCCTTACCTGGTAGCG
 CTACGGGTGAAAGATAGGGTCTGTTTCGTCTCACCCCTCTTGAAGGAATGGACCATCGC
 61 TyrGlnAlaThrValCysAlaArgAlaGlnAlaProProProSerTrpAspGlnMetTrp
 TACCAAGCCACCGTGTGCGCTAGGGCTCAAGCCCCCTCCCCATCGTGGGACCAGATGTGG
 ATGGTTCGGTGGCACACCGATCCCGAGTTCGGGGAGGGGGTAGCACCCCTGGTCTACACC
 121 LysCysLeuIleArgLeuLysProThrLeuHisGlyProThrProLeuLeuTyrArgLeu
 AAGTGTGTTGATTGCGCTCAAGCCCCACCTCCATGGGCCAACACCCCTGCTATACAGACTG
 TTCACAACTAAGCGGAGTTCGGGTGGGAGGTACCCGGTGTGGGGACGATATGTCTGAC
 181 GlyAlaValGlnAsnGluIleThrLeuThrHisProValThrLysTyrIleMetThrCys
 GCGCTGTTTCAAGATGAAATCACCTGACGCACCCAGTCACCAAATACATCATGACATGC
 CCGGACAAAGTCTTACTTTAGTGGGACTGCGTGGGTGAGTGGTTTATGTAGTACTGTACG
 241 MetSerAlaAspLeuGluValValThrSerThrTrpValLeuValGlyGlyValLeuAla
 ATGTCGGCCGACCTGGAGGTCGTACGAGCACCTGGGTGCTCGTTGGCGGCGTCTGGCT
 TACAGCCGGCTGGACCTCCAGCAGTGTCTGTCGACCCACGAGCAACCGCCGAGGACCGA
 301 AlaLeuAlaAlaTyrCysLeuSerThrGlyCysValValIleValGlyArgValValLeu
 GCTTTGGCCCGGTATTGCTGTCAACAGGCTGCGTGGTCATAGTGGGCAGGGTCTGCTTG
 CGAAACCGGCGCATACCGACAGTTGTCCGACGCACAGTATCACCCGTCCAGCAGAAC
 361 SerGlyLysProAlaIleIleProAspArgGluValLeuTyrArgGluPheAspGluMet
 TCCGGGAAGCCCGCAATCATACCTGACAGGGAAGTCTCTACCGAGAGTTGATGAGATG
 AGCCCCCTTCGGCCGTAGTATGGAAGTCTCCCTTCAGGAGATGGCTCTCAAGCTACTCTAC
 421 GluGluCysSerGlnHisLeuProTyrIleGluGlnGlyMetMetLeuAlaGluGlnPhe
 GAAAGTGTCTCTCAGCACTTACCGTACATCGAGCAAGGGATGATGCTCGCCGAGCAGTTC
 CTTCTCACGAGAGTCTGTAATGGCATGTAGCTCGTTCCCTACTACGAGCGGCTCGTCAAG
 481 LysGlnLysAlaLeuGlyLeuLeuGlnThrAlaSerArgGlnAlaGluValIleAlaPro
 AAGCAGAAGGCCCTCGGCCCTCTGCAGACCGCTCCCGTCAGGCAGAGGTTATCGCCCCCT
 TTCGTCTTCGGGAGCCGGAGGACGTCTGGCGCAGGGCAGTCCGTCTCCAATAGCGGGGA
 541 AlaValGlnThrAsnTrpGlnLysLeuGluThrPheTrpAlaLysHisMetTrpAsnPhe
 GCTGTCCAGACCAACTGGCAAAACTCGAGACCTTCTGGGCGAAGCATATGTGGAACCTTC
 CGACAGGTCTGGTTGACCGTTTTTGTAGCTCTGGAAGACCCGCTTCGTATACACCTTGAAG
 601 IleSerGlyIleGlnTyrLeuAlaGlyLeuSerThrLeuProGlyAsnProAlaIleAla
 ATCAGTGGGATACAATACTTGGCGGGCTTGTCAACGCTGCCTCGTAACCCCGCCATTGCT
 TAGTCACCCTATGTTATGAACCGCCGACAGTTGCGACGGACCATGGGGCGGTAAACGA
 661 SerLeuMetAlaPheThrAlaAlaValThrSerProLeuThrThrSerGln
 TCATTGATGGCTTTTACAGCTGCTGTACACAGCCCACTAACCACTAGCCAAA
 AGTAACTACCGAAAATGTGACGACAGTGGTGGGTGATTGGTGATCGGTTT

FIG. 7

Translation der DNA 32

Überlappung mit 81

1 PheThrAlaAlaValThrSerProLeuThrThrSerGlnThrLeuLeuPheAsnIleLeu
 CTTTTACAGCTGCTGTCACCAGCCCCTAACCCTAGCCAAACCCTCCTCTTCAACATAT
 GAAAATGTCGACGACAGTGGTCGGGTGATTGGTGATCGGTTTGGGAGGAGAAGTTGTATA

61 GlyGlyTrpValAlaAlaGlnLeuAlaAlaProGlyAlaAlaThrAlaPheValGlyAla
 TGGGGGGGTGGGTGGCTGCCCAGCTCGCCGCCCCCGGTGCCGCTACTGCCTTTGTGGGCG
 ACCCCCCACCCACCGACGGGTGAGCGGGCGGGGGCCACGGCGATGACGGAAACACCCGC

121 GlyLeuAlaGlyAlaAlaIleGlySerValGlyLeuGlyLysValLeuIleAspIleLeu
 CTGGCTTAGCTGGCGCCGCCATCGGCAGTGTGTGGACTGGGGAAGGTCCTCATAGACATCC
 GACCGAATCGACCGCGGCGGTAGCCSTCACAACCTGACCCCTTCCAGGAGTATCTGTAGG

181 AlaGlyTyrGlyAlaGlyValAlaGlyAlaLeuValAlaPheLysIleMetSerGlyGlu
 TTGCAGGGTATGGCGCGGGCGTGGCGGGAGCTCTTGTGGCATTCAAGATCATGACCGGTG
 AACGTCCCATACCGCGCCCGCACCCGCCCTCGAGAACACCGTAAGTTCTAGTACTCGCCAC

241 ValProSerThrGluAspLeuValAsnLeuLeuProAlaIleLeuSerProGlyAlaLeu
 AGGTCCCCCTCCACGGAGGACCTGGTCAATCTACTGCCCGCCATCCTCTCGCCCGGAGCCC
 TCCAGGGGAGGTGCCTCCTGGACAGTTAGATGACGGGCGGTAGGAGAGCGGGCCTCGGG

301 ValValGlyValValCysAlaAlaIleLeuArgArgHisValGlyProGlyGlyGlyAla
 TCGTAGTCGGCGTGGTCTGTGCAGCAATACTGCGCCGGCACGTTGGCCCGGGCGAGGGGG
 AGCATCAGCCGCACCAGACACGTCGTTATGACGCGGCGGTGCAACCGGGCCCGCTCCCCC

361 ValGlnTrpMetAsnArgLeuIleAlaPheAlaSerArgGlyAsnHisValSer
 CAGTGCAGTGGATGAACCGGCTGATAGCCTTCGCCTCCCGGGGAACCATGTTTCCCC
 GTCACGTCACCTACTTGGCCGACTATCGGAAGCGGAGGGCCCCCTTGGTACAAAGGGG

FIG. 8 Translation der DNA 35

1 SerIleGluThrIleThrLeuProGlnAspAlaValSerArgThrGlnArgArgGlyArg
 TCCATTGAGACAATCAGCTCCCCCAGGATGCTGTCTCCCGCACTCAACGTCGGGGCAGG
 AGGTAACCTCTGTTAGTGCAGGGGGTCTCTACGACAGAGGGCGTGAGTTGCAGCCCCGTCC
 61 ThrGlyArgGlyLysProGlyIleTyrArgPheValAlaProGlyGluArgProSerGly
 ACTGGCAGGGGGAAGCCAGGCATCTACAGATTGTGGCACCAGGGGAGCGCCCTCCGGC
 TGACCGTCCCGCTTCGGTCCGTAGATGTCTAAACACCGTGGCCCCCTCGCGGGGAGGCCG
 121 MetPheAspSerSerValLeuCysGluCysTyrAspAlaGlyCysAlaTrpTyrGluLeu
 ATGTTTCGACTCGTCCGTCTCTGTGAGTGCTATGACGCAGGCTGTGCTTGGTATGAGCTC
 TACAAGCTGAGCAGGCAGGAGACACTCAGATACTGCGTCCGACACGAACCATACTCGAG
 181 ThrProAlaGluThrThrValArgLeuArgAlaTyrMetAsnThrProGlyLeuProVal
 ACGCCCCCGGAGACTACAGTTAGGCTACGAGCGTACATGAACACCCCGGGCTTCCCGTG
 TGCGGGCGGCTCTGATGTCAATCCGATGCTCGCATGTACTTGTGGGGCCCCGAAGGGCAC
 241 CysGlnAspHisLeuGluPheTrpGluGlyValPheThrGlyLeuThrHisIleAspAla
 TGCCAGGACCATCTTGAATTTTGGGAGGGCGTCTTTACAGGCCTCACTCATATAGATGCC
 ACGGTCCTGGTAGAACTTAAACCCCTCCCGCAGAAATGTCCGGAGTGAGTATATCTACGG
 301 HisPheLeuSerGlnThrLysGlnSerGlyGluAsnLeuProTyrLeuValAlaTyrGln
 CACTTTCTATCCCAGACAAAGCAGAGTGGGGAGAACCTTCCTTACCTGGTAGCGTACCAA
 GTGAAAGATAGGGTCTGTTTCGTCTCACCCCTCTTGGGAAGGAATGGACCATCGCATGGTT
 Überlappung mit 36...
 361 AlaThrValCysAlaArgAlaGlnAlaProProProSerTrpAspGlnMetTrpLysCys
 GCCACCGTGTGCGCTAGGGCTCAAGCCCCCTCCCCATCGTGGGACCAGATGTGGAAGTGT
 CGGTGGCACACGCGATCCCGAGTTCGGGGAGGGGGTAGCACCCCTGGTCTACACCTTCACA
 421 LeuIleArgLeuLysProThrLeuHisGlyProThrProLeuLeuTyrArgLeuGlyAla
 TTGATTGCGCTCAAGCCCCACCTCCATGGGGCCCAACACCCCTGCTATACAGACTGGGGCGCT
 AACTAAGCGGAGTTCGGGTGGGAGGTACCCGGTGTGGGGACGATATGTCTGACCCGCGA

FIG. 9-1 Kombiniertes ORF der DNAs 35, 36, 81 & 32

1 SerIleGluThrIleThrLeuProGlnAspAlaValSerArgThrGlnArgArgGlyArg
 TCCATTGAGACAATCAGCTCCCCCAGGATGCTGTCTCCCCCACTCAACGTCGGGGCAGG
 AGGTAACCTCTGTTAGTGCGAGGGGGTCTACGACAGAGGGCGTGAGTTGCAGCCCCGTCC
 61 ThrGlyArgGlyLysProGlyIleTyrArgPheValAlaProGlyGluArgProSerGly
 ACTGGCAGGGGGAAGCCAGGCATCTACAGATTTGTGGCACCGGGGAGCGCCCTCCGGC
 TGACCGTCCCCCTTCGGTCCGTAGATGTCTAAACACCGTGGCCCCCTCGCGGGGAGGCCG
 121 MetPheAspSerSerValLeuCysGluCysTyrAspAlaGlyCysAlaTrpTyrGluLeu
 ATGTTTCGACTCGTCCGTCTCTGTGAGTGCTATGACGCAGGCTGTGCTTGGTATGAGCTC
 TACAAGCTGAGCAGGCAGGAGACACTCAGATACTGCGTCCGACACGAACCATACTCGAG
 181 ThrProAlaGluThrThrValArgLeuArgAlaTyrMetAsnThrProGlyLeuProVal
 ACGCCCCCGGAGACTACAGTTAGGCTACGAGCGTACATGAACACCGGGGCTTCCCGTG
 TGCGGGCGGCTCTGATGTCAATCCGATGCTCGCATGTACTTGTGGGGCCCCGAAGGGCAG
 241 CysGlnAspHisLeuGluPheTrpGluGlyValPheThrGlyLeuThrHisIleAspAla
 TGCCAGGACCATCTTGAATTTTGGGAGGGCGTCTTACAGGCCTCACTCATATAGATGCC
 ACGGTCCTGGTAGAAGCTTAAACCCCTCCCGCAGAAATGTCCGGAGTGAGTATATCTACGG
 301 HisPheLeuSerGlnThrLysGlnSerGlyGluAsnLeuProTyrLeuValAlaTyrGln
 CACTTTCTATCCCAGACAAAGCAGAGTGGGGAGAACCTTCCTTACCTGGTAGCGTACCAA
 GTGAAAGATAGGGTCTGTTTCGTCTCACCCCTCTTGAAGGAATGGACCATCCCATGGTT
 361 AlaThrValCysAlaArgAlaGlnAlaProProProSerTrpAspGlnMetTrpLysCys
 GCCACCGTGTGCGCTAGGGCTCAAGCCCCCTCCCCATCGTGGGACCAGATGTGGAAGTGT
 CGGTGGCACACGCGATCCCGAGTTCGGGGAGGGGTAGCACCCCTGGTCTACACCTTCACA
 421 LeuIleArgLeuLysProThrLeuHisGlyProThrProLeuLeuTyrArgLeuGlyAla
 TTGATTGCGCTCAAGCCACCCCTCCATGGGCCAACACCCCTGCTATACAGACTGGGCGCT
 AACTAAGCGGAGTTCCGGTGGGAGGTACCCGTTGTGGGGACGATATGTCTGACCCGCGA
 481 ValGlnAsnGluIleThrLeuThrHisProValThrLysTyrIleMetThrCysMetSer
 GTTCAGAATGAAATCACCCCTGACGCACCCAGTCACCAAATACATCATGACATGATGTGG
 CAGTCTTACTTTAGTGGGACTGCGTGGGTCACTGGTTTATGTAGTACTGTACGTACAGC
 541 AlaAspLeuGluValValThrSerThrTrpValLeuValGlyGlyValLeuAlaAlaLeu
 GCCGACCTGGAGGTGCTCAGGACACCTGGGTGCTCGTTGGCGGCTCCTGGCTGCTTTG
 CGGCTGGACCTCCAGCAGTGTCTGTTGACCCACGAGCAACCGCCCGAGGACCGACGAAAC
 601 AlaAlaTyrCysLeuSerThrGlyCysValValIleValGlyArgValValLeuSerGly
 GCCGCGTATTGCTGTCAACAGGCTGCGTGGTCATAGTGGGCAGGGTCTGTTGTCCGGG
 CGGCGCATAACGGACAGTTGTCCGACGCACCAAGTATCACCCGTCCCAGCAGAACAGGCC
 661 LysProAlaIleIleProAspArgGluValLeuTyrArgGluPheAspGluMetGluGlu
 AAGCCGGCAATCATACCTGACAGGGAAGTCTCTACCGAGAGTTCGATGAGATGGAAGAG
 TTCGGCCGTTAGTATGGACTGTCCCTTCAGGAGATGGCTCTCAAGCTACTCTACCTTCTC
 721 CysSerGlnHisLeuProTyrIleGluGlnGlyMetMetLeuAlaGluGlnPheLysGln
 TGCTCTCAGCACTTACCGTACATCGAGCAAGGGATGATGCTCGCCGAGCAGTTCAAGCAG
 ACGAGAGTCTGAATGGCATGTAGCTCGTTCCTACTACGAGCGGCTCGTCAAGTTCGTC
 781 LysAlaLeuGlyLeuLeuGlnThrAlaSerArgGlnAlaGluValIleAlaProAlaVal
 AAGGCCCTCGGCCTCTGCGACCCGCTCCCGTCAGGCAGAGTTATCGCCCCCTGCTGTC
 TTCGGGGAGCCGGAGGACGTCTGGCGCAGGGCAGTCCGTCTCCAATAGCGGGACGACAG

841 GlnThrAsnTrpGlnLysLeuGluThrPheTrpAlaLysHisMetTrpAsnPheIleSer
 CAGACCAACTGGCAAACTCGAGACCTTCTGGGCGAAGCATATGTGGAACCTTCATCAGT
 GTCTGGTTGACCGTTTTTGAGCTCTGGAAGACCCGCTTCGTATACACCTTGAAGTAGTCA
 901 GlyIleGlnTyrLeuAlaGlyLeuSerThrLeuProGlyAsnProAlaIleAlaSerLeu
 GGGATACAATACTTGGCGGGCTTGTCAACGCTGCCTGGTAACCCCGCCATTGCTTCATTG
 CCCTATGTTATGAACCGCCCGAACAGTTGCGACGGACCATTGGGGCGGTAACGAAGTAAC
 961 MetAlaPheThrAlaAlaValThrSerProLeuThrThrSerGlnThrLeuLeuPheAsn
 ATGGCTTTTACAGCTGCTGTCAACGAGCCCACTAACCCTAGCCAAACCCCTCCTCTTCAAC
 TACCGAAAATGTCGACGACAGTGGTGGGGTGATTGGTGATCGGTTTGGGAGGAGAAGTTG
 1021 IleLeuGlyGlyTrpValAlaAlaGlnLeuAlaAlaProGlyAlaAlaThrAlaPheVal
 ATATTGGGGGGGTGGGTGGCTGCCAGCTCGCCGCCCCCGGTGCCGCTACTGCCCTTTGTG
 TATAACCCCCCACCACCGACGGGTGAGCGGGGGGGCCACGGCGATGACGGAAACAC
 1081 GlyAlaGlyLeuAlaGlyAlaAlaIleGlySerValGlyLeuGlyLysValLeuIleAsp
 GCGGCTGGCTTAGCTGGCGCCGCCATCGGCAGTGTGGACTGGGGAGGTCTCTCATAGAC
 CCGCGACCGAATCGACCGCGCGGTAGCCGTCACAACCTGACCCCTTCCAGGAGTATCTG
 1141 IleLeuAlaGlyTyrGlyAlaGlyValAlaGlyAlaLeuValAlaPheLysIleMetSer
 ATCCTTGCAAGGTATGGCGCGGGCGTGGCGGGAGCTCTTGTGGCATTCAAGATCATGAGC
 TAGGAACGTCCCATACCGCGCCCGCACCGCCCTCGAGAACACCGTAAGTTCTAGTACTCG
 1201 GlyGluValProSerThrGluAspLeuValAsnLeuLeuProAlaIleLeuSerProGly
 GGTGAGGTCCCCCTCCACGGAGGACCTGGTCAATCTACTGCCCGCCATCCTCTGCCCCGA
 CCACTCCAGGGGAGGTGCTCTGGAACAGTTAGATGACGGGCGGTAGGAGAGCGGGCCCT
 1261 AlaLeuValValGlyValValCysAlaAlaIleLeuArgArgHisValGlyProGlyGlu
 GCCCTCGTAGTCGGCGTGGTCTGTGCAGCAATACTGCGCCGGCACGTTGGCCCCGGCGAG
 CGGGAGCATCAGCCGCACAGACAGTCGTTATGACGCGGCGGTGCAACCGGGCCCCGCTC
 1321 GlyAlaValGlnTrpMetAsnArgLeuIleAlaPheAlaSerArgGlyAsnHisValSer
 GGGGCAGTGCAGTGGATGAACCGGCTGATAGCCTTCGCCTCCCGGGGGAACCATGTTTCCCC
 CCCCCTCACGTCACCTACTTGGCCGACTATCGGAAGCGGAGGGCCCCCTTGGTACAAAGGGG

FIG. 9-2

FIG. 10 Translation der DNA 37b

1 LeuAlaAlaLysLeuValAlaLeuGlyIleAsnAlaValAlaTyrTyrArgGlyLeuAsp
 CTCGCCGCAAAGCTGGTTCGCATTGGGCATCAATGCCGTGGCCTACTACCGCGGTCTTGAC
 GAGCGGCGTTTCGACCAGCGTAACCCGTAGTTACGGCACCGGATGATGGCGCCAGAAGTCTG
 61 ValSerValIleProThrSerGlyAspValValValValAlaThrAspAlaLeuMetThr
 GTGTCCGTCATCCCGACCAGCGGCGATGTTGTCTGTCGTGGCAACCGATGCCCTCATGACC
 CACAGGCAGTAGGGCTGGTTCGCCGCTACAACAGCAGCACCGTTGGCTACGGGAGTACTGG
 121 GlyTyrThrGlyAspPheAspSerValIleAspTyrAsnThrCysValThrGlnThrVal
 GGCTATACCGGCGACTTCGACTCGGTGATAGACTACAATACGTGTGTACCCAGACAGTCTC
 CCGATATGGCCGCTGAAGCTGAGCCACTATCTGATGTTATGCACACAGTGGGTCTGTCTCAG
 181 AspPheSerLeuAspProThrPheThrIleGluThrIleThrLeuProGlnAspAlaVal
 GATTTTCAGCCTTGACCCCTACCTTCACCATTTGAGACAATCACGCTCCCCCAGGATGCTGTCT
 CTAAGTTCGGAAGCTGGGATGGAAGTGGTAACCTCTGTTAGTGGAGGGGGTCTTACGACAG
 Clon 35
 241 SerArgThrGlnArgArgGlyArgThr
 TCCCGCACTCAACGTCGGGGCAGGACTG
 AGGGCGTGAGTTGCAGCCCCGTCCTGAC

Überlappung mit

FIG. 11 Translation der DNA 33b

Überlappung mit 32
 1 MetAsnArgLeuIleAlaPheAlaSerArgGlyAsnHisValSerProThrHisTyrVal
 GATGAACCGGCTGATAGCCTTCGCCTCCCGGGGAACCATGTTCCCCCAGCACTACGT
 CTACTTGGCCGACTATCGGAAGCGGAGGGCCCCCTTGGTACAAAGGGGGTGGGTGATGCA
 61 ProGluSerAspAlaAlaAlaArgValThrAlaIleLeuSerSerLeuThrValThrGln
 GCCGGAGAGCGATGCGAGCTGCCCCGCGTCACTGCCATACTCAGCAGCCTCACTGTAAACCA
 CGGCCCTCTCGCTACGTGCGACGGGGCGAGTGACGGTATGAGTCTGCGAGTGACATTTGGGT
 121 LeuLeuArgArgLeuHisGlnTrpIleSerSerGluCysThrThrProCysSerGlySer
 GCTCCTGAGGCGACTGCACCACTGGATAAGCTCGGAGTGTACCACTCCATGCTCCGGTTC
 CGAGGACTCCGCTGACGTGGTCACTATTTCGAGCCTCACATGGTGAGGTACGAGGCCAAG
 181 TrpLeuArgAspIleTrpAspTrpIleCysGluValLeuSerAspPheLysThrTrpLeu
 CTGGCTAAGGGACATCTGGGACTGGATATGCGAGGTGTTGAGCGACTTTAAGACCTGGCT
 GACCGATTCCCTGTAGACCCCTGACCTATACGCTCCACAACCTCGCTGAAATTCCTGGACCGA
 241 LysAlaLysLeuMetProGlnLeuProGlyIleProPheValSerCysGlnArgGlyTyr
 AAAAGCTAAGCTCATGCCACAGCTGCCTGGGATCCCTTTGTGTCTGCCAGCGCGGGTA
 TTTTCGATTGAGTACGGTGTGACGGACCCTAGGGGAAACACAGGACGGTCCGCGCCCAT
 301 LysGlyValTrpArgVal
 TAAGGGGGTCTGGCGAGTG
 ATCCCCCAGACCGCTCAC

FIG. 12 Translation der DNA 40b

1 AlaTyrMetSerLysAlaHisGlyIleAspProAsnIleArgThrGlyValArgThrIle
 GGCTTACATGTCCAAGGCTCATGGGATCGATCCTAACATCAGGACCGGGGTGAGAACAAT
 CCGAATGTACAGGTTCCGAGTACCCTAGCTAGGATTGTAGTCCTGGCCCCACTTGTGTTA
 61 ThrThrGlySerProIleThrTyrSerThrTyrGlyLysPheLeuAlaAspGlyGlyCys
 TACCACTGGCAGCCCCATCACGTACTCCACCTACGGCAAGTTCCTTGCCGACGGCGGGTG
 ATGGTGACCGTCGGGGTAGTGATGAGGTGGATGCCGTTCAAGGAACGGCTGCCGCCAC
 121 SerGlyGlyAlaTyrAspIleIleIleCysAspGluCysHisSerThrAspAlaThrSer
 CTCGGGGGGCGCTTATGACATAATAATTTGTGACGAGTGCCACTCCACGGATGCCACATC
 GAGCCCCCGCAATACTGTATTATTAAACACTGCTCACGGTGAGGTGCCTACGGTGTAG
 ~ 181 IleLeuGlyIleGlyThrValLeuAspGlnAlaGluThrAlaGlyAlaArgLeuValVal
 CATCTTGGGCATCGGCCTGTCTTGACCAAGCAGAGACTGCGGGGGCAGACTGGTTGT
 GTAGAACCCGTAGCCGTGACAGGAAGTGGTTCGTCTCTGACGCCCCCGCTCTGACCAACA
 241 LeuAlaThrAlaThrProProGlySerValThrValProHisProAsnIleGluGluVal
 GCTCGCCACCGCCACCCCTCCGGGCTCCGTCACTGTGCCCCATCCCAACATCGAGGAGGT
 CGAGCGGTGGCGGTGGGGAGGCCCGAGGCAGTGACACGGGGTAGGGTTGTAGCTCCTCCA
 301 AlaLeuSerThrThrGlyGluIleProPheTyrGlyLysAlaIleProLeuGluValIle
 TGCTCTGTCCACCACCGGAGAGATCCCTTTTTACGGCAAGGCTATCCCCCTCGAAGTAAT
 ACGAGACAGGTGGTGGCCTCTCTAGGGAAAAATGCCGTTCCGATAGGGGGAGCTTCATTA
 361 LysGlyGlyArgHisLeuIlePheCysHisSerLysLysLysCysAspGluLeuAlaAla
 CAAGGGGGGGAGACATCTCATCTTCTGTCAATTCAAAGAAGAAGTGCGACGAACTCGCCGC
 GTTCCCCCTCTGTAGAGTAGAAGACAGTAAGTTTCTTCTTCACGCTGCTGAGCGGGCG
 ----- Überlappung mit 37b -----
 421 LysLeuValAlaLeuGlyIleAsnAlaValAlaTyrTyrArgGlyLeuAspValSerVal
 AAAGCTGGTTCGATTGGGCATCAATGCCGTGGCCTACTACCGCGGTCTTGACGTGTCCGT
 TTTCGACCAGCGTAACCCGTAGTTACGGCACCGGATGATGGCGCCAGAACTGCACAGGCA

 481 IleProThr
 CATCCCGACCAG
 GTAGGGCTGGTC

FIG. 13 Translation der DNA 25c

1 CysSerLeuThrValThrGlnLeuLeuArgArgLeuHisGlnTrpIleSerSerGluCys
 ACTGCAGCCTCACTGTAACCCAGCTCCTGAGGCGACTGCACCAGTGGATAAGCTCGGAGT
 TGACGTCGGAGTGACATTGGGTGAGGACTCCGCTGACGTGGTCACCTATTTCGAGCCTCA

61 ThrThrProCysSerGlySerTrpLeuArgAspIleTrpAspTrpIleCysGluValLeu
 GTACCACTCCATGCTCCGGTTCCTGGCTAAGGGACATCTGGGACTGGATATGCGAGGTGT
 CATGGTGAGGTACGAGGCCAAGGACCGATTCCCTGTAGACCCTGACCTATACGCTCCACA

Überlappung mit 33b

121 SerAspPheLysThrTrpLeuLysAlaLysLeuMetProGlnLeuProGlyIleProPhe
 TGAGCGACTTTTAAGACCTGGCTAAAAGCTAAGCTCATGCCACAGCTGCCTGGGATCCCCCT
 ACTCGCTGAAATTCTGGACCGATTTTCGATTGAGTACGGTGTGACGGACCCTAGGGGA

181 ValSerCysGlnArgGlyTyrLysGlyValTrpArgGlyAspGlyIleMetHisThrArg
 TTGTGTCTCTGCCAGCGCGGGTATAAGGGGTCTGGCGAGGGGACGGCATCATGCACACTC
 AACACAGGACGGTCGCGCCCATATTCCCCAGACCGCTCCCCTGCCGTAGTACGTGTGAG

241 CysHisCysGlyAlaGluIleThrGlyHisValLysAsnGlyThrMetArgIleValGly
 GCTGCCACTGTGGAGCTGAGATCACTGGACATGTCAAAAACGGGACGATGAGGATCGTCG
 CGACGGTGACACCTCGACTCTAGTGACCTGTACAGTTTTTGGCCCTGCTACTCCTAGCAGC

301 ProArgThrCysArgAsnMetTrpSerGlyThrPheProIleAsnAlaTyrThrThrGly
 GTCCTAGGACCTGCAGGAACATGTGGAGTGGGACCTTCCCCATTAATGCCACACCACGG
 CAGGATCCTGGACGTCCTTGTACACCTCACCTGGAAGGGTAATTACGGATGTGGTGCC

361 ProCysThrProLeuProAlaProAsnTyrThrPheAlaLeuTrpArgValSerAlaGlu
 GCCCCTGTACCCCCCTTCCTGCGCCGAACCTACACGTTGCGCTATGGAGGGTGTCTGCAG
 CGGGGACATGGGGGAAGGACGCGGCTTGATGTGCAAGCGGATACCTCCACAGACGTC

421 GluTyrValGluIleArgGlnValGlyAspPheHisTyrValThrGlyMetThrThrAsp
 AGGAATATGTGGAGATAAGGCAGGTGGGGGACTTCCACTACGTGACGGGTATGACTACTG
 TCCTTATACACCTCTATTCCGTCCACCCCTGAAGGTGATGCACTGCCATACTGATGAC

481 AsnLeuLysCysProCysGlnValProSerProGluPhePheThrGlu
 ACAATCTCAAATGCCCCGTGCCAGGTCCCATCGCCGAATTTTTCACAGAAT
 TGTTAGAGTTTACGGGCACGGTCCAGGGTAGCGGGCTTAAAAGTGTCTTA

FIG. 14-1 Kombiniertes ORF der DNAs 40b/37b/35/36/81/32/33b/25c

1 AlaTyrMetSerLysAlaHisGlyIleAspProAsnIleArgThrGlyValArgThrIle
 TGCTTACATGTCCAAGGCTCATGGGATCGATCCTAACATCAGGACCGGGGTGAGAACAAT
 ACGAATGTACAGGTTCCGAGTACCCTAGCTAGGATTGTAGTCTGGCCCCACTCTTGTTA
 61 ThrThrGlySerProIleThrTyrSerThrTyrGlyLysPheLeuAlaAspGlyGlyCys
 TACCACTGGCAGCCCCATCACGTACTCCACCTACGGCAAGTTTCCTTGGCCGACGGCGGGTG
 ATGGTGACCGTCCGGGTAGTGCATGAGGTGGATGCCGTTCAAGGAACGGCTGCCGCCAC
 121 SerGlyGlyAlaTyrAspIleIleIleCysAspGluCysHisSerThrAspAlaThrSer
 CTCGGGGGGCGCTTATGACATAATAATTTGTGACGAGTGCCACTCCACGGATGCCACATC
 GAGCCCCCGCGAATACTGTATTATTAAACACTGCTCACGGTGAGGTGCCTACGGTGTAG
 181 IleLeuGlyIleGlyThrValLeuAspGlnAlaGluThrAlaGlyAlaArgLeuValVal
 CATCTTGGGCATCGGCACTGTCCTTGACCAAGCAGAGACTGCCGGGGCGAGACTGGTTGT
 GTAGAACCCGTAGCCGTGACAGGAAGTGGTTCGTCTCTGACGCCCCCGCTCTGACCAACA
 241 LeuAlaThrAlaThrProProGlySerValThrValProHisProAsnIleGluGluVal
 GCTCGCCACCGCCACCCCTCCGGGCTCCGTCACCTGTGCCCATCCCAACATCGAGGAGGT
 CGAGCGGTGGCGGTGGGGAGGCCCCGAGGCAGTGACACGGGGTAGGGTTGTAGCTCCTCCA
 301 AlaLeuSerThrThrGlyGluIleProPheTyrGlyLysAlaIleProLeuGluValIle
 TGCTCTGTCCACCACCGGAGAGATCCCTTTTACGGCAAGGCTATCCCCCTCGAAGTAAT
 ACGAGACAGGTGGTGGCCTCTCTAGGGAAAAATGCCGTTCCGATAGGGGGAGCTTCATTA
 361 LysGlyGlyArgHisLeuIlePheCysHisSerLysLysLysCysAspGluLeuAlaAla
 CAAGGGGGGGAGACATCTCATCTTCTGTCTCAATCAAAGAAGAAGTGCGACGAAGTCCGCCG
 GTCCCCCCTCTGTAGAGTAGAAGACAGTAAGTTTCTTCTCACGCTGCTTGAGCGGGC
 421 LysLeuValAlaLeuGlyIleAsnAlaValAlaTyrTyrArgGlyLeuAspValSerVal
 AAAGCTGGTTCGCAATGGGCATCAATGCCGTGGCCTACTACCGCGGTCTTGACGTGTCCGT
 TTTCCGACCGCTAACCCGTAGTTACGGCACCGGATGATGGCGCCAGAACTGCACAGGCA
 481 IleProThrSerGlyAspValValValAlaThrAspAlaLeuMetThrGlyTyrThr
 CATCCCGACCGCGCGATGTTGTCTGTCGTGGCAACCGATGCCCTCATGACCGGCTATAC
 GTAGGGCTGGTCCGCTACAACAGCAGCACCGTGGCTACGGGAGTACTGGCCGATATG
 541 GlyAspPheAspSerValIleAspTyrAsnThrCysValThrGlnThrValAspPheSer
 CGGCGACTTCGACTCGGTGATAGACTACAATACGTGTGTACCCAGACAGTCCGATTTTCAG
 GCGCTGAAGCTGAGCCACTATCTGATGTTATGCACACAGTGGGTCTGTACGCTAAAGTC
 601 LeuAspProThrPheThrIleGluThrIleThrLeuProGlnAspAlaValSerArgThr
 CCTTGACCCTACCTTACCATTTAGACAATCACGCTCCCCCAGGATGCTGTCTCCCGCAC
 GGAAGTGGGATGGAAGTGGTAAGTCTGTTAGTGGCAGGGGGTCTACGACAGAGGGCGTG
 661 GlnArgArgGlyArgThrGlyArgGlyLysProGlyIleTyrArgPheValAlaProGly
 TCAACGTCCGGGCGAGGACTGGCAGGGGGAAGCCAGGCATCTACGATTGTGGCAGCGGG
 AGTTGCAGCCCCCTGACCGTCCCCCTCCGTCGCTAGATGTCTAAACACCGTGGCCC
 721 GluArgProSerGlyMetPheAspSerSerValLeuCysGluCysTyrAspAlaGlyCys
 GGAGCGCCCCCTCCGGCATGTTCCGACTCGTCCCTCTCTGTGAGTGCTATGACGAGGCTG
 CCTCGCGGGGAGGCGGTACAAGCTGAGCAGGCAGGAGACACTCACGATACTGCGTCCGAC
 781 AlaTrpTyrGluLeuThrProAlaGluThrThrValArgLeuArgAlaTyrMetAsnThr
 TGCTTGGTATGAGCTACGCCCGCCGAGACTACAGTTAGGCTACGAGCGTACATGAACAC
 ACGAACCATACTCGAGTGCGGGCGGCTCTGATGTCAATCCGATGCTCGCATGTACTTGTG
 841 ProGlyLeuProValCysGlnAspHisLeuGluPheTrpGluGlyValPheThrGlyLeu
 CCCGGGGCTTCCCGTGTGCCAGGACCATCTTGAATTTGGGAGGGCGTCTTACAGGCCT
 GGGCCCCGAAGGGCACAGGTCTGGTAGAACTTAAACCTCCCGCAGAAATGTCCGGA
 901 ThrHisIleAspAlaHisPheLeuSerGlnThrLysGlnSerGlyGluAsnLeuProTyr
 CACTCATATAGATGCCCACTTCTATCCCAAGCAAGCAGAGTGGGGAGAACCTTCTTCTTA
 GTGAGTATATCTACGGGTGAAAGATAGGGTCTGTTTCTGCTCTACCCCTCTTGAAGGAAT

961 LeuValAlaTyrGlnAlaThrValCysAlaArgAlaGlnAlaProProProSerTrpAsp
 CCTGGTAGCGTACCAAGCCACCGTGTGCGCTAGGGCTCAAGCCCCCTCCCCATCGTGGGA
 GGACCATCGCATGGTTCGGTGGCACACGGATCCCCAGTTCGGGGAGGGGGTAGCACCCCT
 1021 GlnMetTrpLysCysLeuIleArgLeuLysProThrLeuHisGlyProThrProLeuLeu
 CCAGATGTGGAAGTGTTCGATTTCGCTCAAGCCCCACCTCCATGGGCCAACACCCCTGCT
 GGTCTACACCTTCACAACTAAGCGGAGTTCGGGTGGGAGGTACCCGGTGTGGGGACGA
 1081 TyrArgLeuGlyAlaValGlnAsnGluIleThrLeuThrHisProValThrLysTyrIle
 ATACAGACTGGGCGCTGTTTCAAGTAAATCACCTGACGCACCCAGTACCAAATACAT
 TATGTCTGACCCGCGACAAGTCTTACTTTAGTGGGACTGCGTGGGTCACTGGTTTATGTA
 1141 MetThrCysMetSerAlaAspLeuGluValValThrSerThrTrpValLeuValGlyGly
 CATGACATGCATGTGCGCCGACCTGGAGGTGCTCAGCAGCACCTGGGTGCTCGTTGGCGG
 GTACTGTACGTACAGCCGGCTGGACCTCCAGCAGTGTCTCGTGGACCCAGAGCAACCGCC
 1201 ValLeuAlaAlaLeuAlaAlaTyrCysLeuSerThrGlyCysValValIleValGlyArg
 CGTCCTGGCTGCTTTGGCCGCGTATTCCTGTCAACAGGCTGCGTGGTTCATAGTGGGCG
 GCAGGACCGACGAAACCGGCGCATAACGGACAGTTGTCCGACGCCAGTATCACCCGTC
 1261 ValValLeuSerGlyLysProAlaIleIleProAspArgGluValLeuTyrArgGluPhe
 GGTGCTCTGTCCGGGAAGCCGGCAATCATACCTGACAGGGAAGTCTCTACCGAGAGTT
 CCAGCAGAACAGGCCCTTCGGCCGTTAGTATGGACTGTCCCTTCAGGAGATGGCTCTCAA
 1321 AspGluMetGluGluCysSerGlnHisLeuProTyrIleGluGlnGlyMetMetLeuAla
 CGATGAGATGGAAGAGTGTCTCAGCACTTACCGTACATCGAGCAAGGGATGATGCTCGC
 GCTACTCTACCTTCTCAGGAGTGTGTAATGGCATGTAGCTCGTTCCCTACTACGAGCG
 1381 GluGlnPheLysGlnLysAlaLeuGlyLeuLeuGlnThrAlaSerArgGlnAlaGluVal
 CGACGAGTTCAAGCAGAAAGCCCTCGGCCTCCTGCAGACCGCGTCCCGTCAGGCAGAGGT
 GTCGTCAGTTCTGCTTCCGGGAGCCGGAGGACGTCTGGCGCAGGGCAGTCCGTCTCCA
 1441 IleAlaProAlaValGlnThrAsnTrpGlnLysLeuGluThrPheTrpAlaLysHisMet
 TATCGCCCTGCTGTCCAGACCAACTGGCAAACTCGAGACCTTCTGGCGGAAGCATAT
 ATAGCGGGGACGACAGGTCTGGTTGACCGTTTTTGTAGCTCTGGAAGACCCGCTTCGTATA
 1501 TrpAsnPheIleSerGlyIleGlnTyrLeuAlaGlyLeuSerThrLeuProGlyAsnPro
 GTGGAACCTTCATCAGTGGGATAACAATACTTGGCGGGCTTGTCAACGCTGCCTGGTAACCC
 CACCTTGAAGTAGTCACCCCTATGTTATGAACCGCCCGAACAGTTGCGACGGACCATGGG
 1561 AlaIleAlaSerLeuMetAlaPheThrAlaAlaValThrSerProLeuThrThrSerGln
 CGCCATTGCTTCATTGATGGCTTTTACAGCTGCTGTCAACAGCCCACTAACCACTAGCCA
 GCGGTAACGAAGTAACTACCGAAATGTGACGACAGTGGTGGGTGATTGGTGATCGGT
 1621 ThrLeuLeuPheAsnIleLeuGlyGlyTrpValAlaAlaGlnLeuAlaAlaProGlyAla
 AACCTCTCTTCAACATATTGGGGGGGTGGGTGGCTGCCAGCTCGCCGCCCCGGTGC
 TTGGGAGGAGAAGTTGTATAACCCCCCACCCACCGACGGGTGAGCGGGGGGGCCACG
 1681 AlaThrAlaPheValGlyAlaGlyLeuAlaGlyAlaAlaIleGlySerValGlyLeuGly
 CGCTACTGCCTTTGTGGGCGCTGGCTTAGCTGGCGCCGCACTCGGCAGTGTGGACTGGG
 GCGATGACGGAACACCCGCGACCGAATCGACCGCGCGGTAGCCGTCACAACCTGACCC
 1741 LysValLeuIleAspIleLeuAlaGlyTyrGlyAlaGlyValAlaGlyAlaLeuValAla
 GAAGGTCTCATAGACATCCTTGCAGGGTATGGCGGGCGGTGGCGGGAGCTCTGTGGC
 CTTCCAGGAGTATCTGTAGGAACGTCCCATACCGCGCCCGCACCGCCCTCGAGAACACCG
 1801 PheLysIleMetSerGlyGluValProSerThrGluAspLeuValAsnLeuLeuProAla
 ATTCAGATCATGAGCGGTGAGGTCCCCCTCCACGGAGGACCTGGTCAATCTACTGCCCGC
 TAAGTTCTAGTACTGCCACTCCAGGGGAGGTGCTCTGACCAGTTAGATGACGGGCG
 1861 IleLeuSerProGlyAlaLeuValValGlyValValCysAlaAlaIleLeuArgArgHis
 CATCTCTCGCCCGAGCCCTCGTAGTCGGCGTGGTCTGTGCAGCAATACTGCGCCGGCA
 GTAGGAGAGCGGGCCTCGGGAGCATCAGCCGACCCAGACACGTCTGTATGACGCGGCGT
 ValGlyProGlyGluGlyAlaValGlnTrpMetAsnArgLeuIleAlaPheAlaSerArg

FIG. 14-2

1921 CGTTGGCCCCGGGCGAGGGGGCAGTGCAGTGGATGAACCGGCTGATAGCCTTCGCCTCCCG
 GCAACCGGGGCCGCTCCCCCGTCACGTACCTACTTGGCCGACTATCGGAAGCGGAGGGC
 GlyAsnHisValSerProThrHisTyrValProGluSerAspAlaAlaAlaArgValThr
 1981 GGGGAACCATGTTTCCCCCACGCACTACGTGCCGGAGAGCGATGCAGCTGCCCGCGTCAC
 CCCCTTGGTACAAAGGGGGTGCCTGATGCACGGCCTCTCGCTACGTCCAGGGGCGCAGTG
 AlaIleLeuSerSerLeuThrValThrGlnLeuLeuArgArgLeuHisGlnTrpIleSer
 2041 TGCCATACTCAGCAGCCTCACTGTAACCCAGCTCCTGAGGCGACTGCACCAGTGGATAAG
 ACGGTATGAGTCGTCCGAGTGACATTGGGTGAGGACTCCGCTGACGTGGTCACCTATTTC
 SerGluCysThrThrProCysSerGlySerTrpLeuArgAspIleTrpAspTrpIleCys
 2101 CTGGAGTGTACCACTCCATGCTCCGGTTCTGGCTAAGGGACATCTGGGACTGGATATG
 GAGCCTCACATGGTGAGGTACGAGGCCAAGGACCGATTCCCTGTAGACCCTGACCTATATC
 GluValLeuSerAspPheLysThrTrpLeuLysAlaLysLeuMetProGlnLeuProGly
 2161 CGAGGTGTTGAGCGACTTTAAGACCTGGCTAAAAGCTAAGCTCATGCCACAGCTGCCTGG
 GCTCCACAACCTCGCTGAAATTCTGGACCGATTTCGATTTCGAGTACGGTGTGACGGACC
 IleProPheValSerCysGlnArgGlyTyrLysGlyValTrpArgValAspGlyIleMet
 2221 GATCCCTTTGTGTCTTCCAGCGCGGGTATAAGGGGGTCTGGCGAGTGGACGGCATCAT
 CTAGGGGAAACACAGGACGGTCCGCGCCCATATTCCCCCAGACCGCTCACCTGCCGTAGTA
 HisThrArgCysHisCysGlyAlaGluIleThrGlyHisValLysAsnGlyThrMetArg
 2281 GCACACTCGCTGCCACTGTGGAGCTGAGATCACTGGACATGTCAAAAACGGGACGATGAG
 CGTGTGAGCGACGGTGACACCTCGACTCTAGTGACCTGTACAGTTTTTGGCCCTGCTACTC
 IleValGlyProArgThrCysArgAsnMetTrpSerGlyThrPheProIleAsnAlaTyr
 2341 GATCGTCCGTCCTAGGACCTGCAGGAACATGTGGAGTGGGACCTTCCCCATTAAATGCCTA
 CTAGCAGCCAGGATCCTGGACGTCCTTGTACACCTCACCCCTGGAAGGGGTAATTACGGAT
 ThrThrGlyProCysThrProLeuProAlaProAsnTyrThrPheAlaLeuTrpArgVal
 2401 CACCACGGGGCCCTGTACCCCCCTTCCCTGCCCGGAACCTACACGTTCCGCGCTATGGAGGGT
 GTGGTGCCCCGGGACATGGGGGAAGGACCGCGCTTGATGTGCAAGCGCGATACCTCCCA
 SerAlaGluGluTyrValGluIleArgGlnValGlyAspPheHisTyrValThrGlyMet
 2461 GTCTGCAGAGGAATATGTGGAGATAAGGCAGGTGGGGGACTTCCACTACGTGACGGGTAT
 CAGACGTCTCCTTATACACCTCTATTCCGTCCACCCCTGAAGGTGATGCACTGCCATA
 ThrThrAspAsnLeuLysCysProCysGlnValProSerProGluPhePheThrGlu
 2521 GACTACTGACAATCTCAAATGCCCCGTGCCAGGTCCCATCGCCCGAATTTTTTCACAGAAT
 CTGATGACTGTTAGAGTTTACGGGCACGGTCCAGGTAGCGGGCTTAAAAAGTGCTTA

FIG. 14-3

FIG. 15 Translation der DNA 33c

1 AlaValAspPheIleProValGluAsnLeuGluThr-ThrMetArgSerProValPheThr
 GCGGGTGGACTTATCCCTGTGGAGAACCAGAGACAACCATGAGGTCCCGGTGTTTAC
 CCGCCACCTGAAATAGGACACCTCTTGGATCTCTGTTGGTACTCCAGGGGCCACAGTG
 61 AspAsnSerSerProProValValProGlnSerPheGlnValAlaHisLeuHisAlaPro
 GGATAACTCCTCTCCACCAGTAGTGCCCCAGAGCTTCCAGGTGGCTCACCTCCATGCTCC
 CCTATTGAGGAGAGGTGCTCATCAGGGGTCTCGAAGGTCCACCGAGTGGAGGTACGAGG
 121 ThrGlySerGlyLysSerThrLysValProAlaAlaTyrAlaAlaGlnGlyTyrLysVal
 CACAGGCAGCGGCAAAAGCACCAAGGTCCCGGCTGCATATGCAGCTCAGGGCTATAAGGT
 GTGTCCGTCGCGCTTTCGTGGTTCCAGGGCCGACGTATACGTCCGAGTCCCATATTCCA
 181 LeuValLeuAsnProSerValAlaAlaThrLeuGlyPheGlyAlaTyrMetSerLysAla
 GCTAGTACTCAACCCCTCTGTTGCTGCAACACTGGGCTTTGGTGCTTACATGTCCAAGGC
 CGATCATGAGTTGGGGAGACAACGACGTTGTGACCCGAAACCACGAATGTACAGGTTCGG
 Überlappung mit 40b
 241 HisGlyIleAspProAsnIleArgThrGlyValArgThrIleThrThrGlySerProIle
 TCATGGGATCGATCCCAACATCAGGACCGGGGTGAGAAACAATTACCACTGGCAGCCCCAT
 AGTACCCCTAGCTAGGATGTAGTCCCTGGCCCCACTCTTGTAAATGGTGACCGTCGGGTA
 301 ThrTyrSerThrTyrGlyLysPheLeuAlaAspGlyGlyCysSerGlyGlyAlaTyrAsp
 CACGTACTCCACCTACGGCAAGTTCCTTGGCCGACGGCGGGTGCTCGGGGGCGCTTATGA
 GTGCATGAGGTGGATGCCGTTCAAGGAACGGCTGCCGCCACGAGCCCCCGCGAATACT
 361 IleIleIleCysAspGluCysHisSerThrAspAlaThrSerIleLeuGlyIleGlyThr
 CATATAATTTGTGACGAGTGCCACTCCACCGAATGCCACATCCATCTTGGGCATTGGCAG
 GTATTATTAAACACTGCTCAGCGTGAGGTGCCACGGTGTAGGTAGAACCCTAACCGTGTG
 421 ValLeuAspGlnAlaGluThrAlaGlyAlaArgLeuValValLeuAlaThrAlaThrPro
 TGTCTTGGACCAAGCAGAGACTGCGGGGGCGAGACTGGTGTGTGCTCGCCACCGCCACCCC
 ACAGGAACCTGCTTCTCTGACGCCGCCGCTCTGACCAACACGAGCGGTGGCGGTGGGG
 481 ProGlySerValThrValProHisProAsnIleGluGluValAlaLeuSerThrThrGly
 TCCGGGCTCCGTCACTGTGCCCCATCCCAACATCGAGGAGGTGCTCTGTCCACCAACCGG
 AGGCCGAGGCAGTGACACGGGGTAGGGTTGTAGCTCTCCCAACGAGACAGGTGGTGGCC
 541 GluIleProPheTyrGlyLysAlaIleProLeuGluValIleLysGlyGlyArgHisLeu
 AGAGATCCCTTTTACGGCAAGGCTATCCCCCTCGAAGTAATCAAGGGGGGAGACATCT
 TCTCTAGGGAATAATGCCGTTCCGATAGGGGGAGCTTCATTAGTTCCCCCCTCTGTAGA
 601 IlePheCysHisSerLysLysLysCysAspGluLeuAlaAlaLysLeuValAlaLeuGly
 CATCTTCTGTCTATTCAAAGAAGAAGTGCGACGAACCTCGCCGCAAAGCTGGTCCGATTGGG
 GTAGAAGACAGTAAGTTTCTTCTTCACGCTGCTTGAGCGGCGTTTCGACCAGCGTAACCC
 661 IleAsnAlaValAlaTyrTyrArgGlyLeuAspValSerValIleProThrSerGlyAsp
 CATCAATGCCGTGGCCTACTACCGCGGTCTTGACGTGTCCGTCTATCCCGACCAGCGGCGA
 GTAGTTACGGCACCGGATGATGGCGCCAGAACTGCACAGGCAGTAGGGCTGGTCCGCGCT
 721 ValValValValAlaThrAspAlaLeuMetThrGlyTyrThrGlyAspPheAspSerVal
 TGTGTGTCGTGGGCAACCGATGCCCTCATGACCGGCTATACCGGCGACTTCGACTCGGT
 ACAACAGCAGCACCGTTGGCTACGGGAGTACTGGCCGATATGGCCGCTGAAGCTGAGCCA
 781 IleAspCysAsnThrCys
 GATAGACTGCAATACGTGTG
 CTATCTGACGTTATGCACAC

FIG. 16 Translation der DNA 8h

1 ProCysThrCysGlySerSerAspLeuTyrLeuValThrArgHisAlaAspValIlePro
 CTCCTGCACTTGGCGTCCCTCGGACCTTTACCTGGTCACGAGGCACGCCGATGTCATTTC
 GAGGGACGTGAACGCCGAGGAGCCTGGAAATGGACCAGTGCTCCGTGCGGCTACAGTAAG
 ValArgArgArgGlyAspSerArgGlySerLeuLeuSerProArgProIleSerTyrLeu
 61 CCGTGGCGCCGGCGGGTGATAGCAGGGGAGCCTGCTGTGCCCCGGGCCATTTCCTACT
 GGCACGCGGCGGCCCCACTATCGTCCCCGTGGACGACAGCGGGGCGGGTAAAGGATGA
 LysGlySerSerGlyGlyProLeuLeuCysProAlaGlyHisAlaValGlyIlePheArg
 121 TGAAGGCTCCTCGGGGCTCCGCTGTGTGCCCCGGCGGGGACGCCGTGGGCATATTTA
 ACTTCCGAGGAGCCCCCAGGCGACACACGGGGGCGGCGGTCGGCACCCGTATAAAT
 AlaAlaValCysThrArgGlyValAlaLysAlaValAspPheIleProValGluAsnLeu
 181 GGGCCGCGGTGTGCACCCGTGGAGTGGCTAAGGCGGTGGACTTATCCCTGTGGAGAACC
 CCGGCGGCCACAGTGGGCACCTCACCGATTCCGCCACCTGAAATAGGACACCTCTTGG
 33c
 GluThrThrMetArgSerProValPheThrAspAsnSer
 241 TAGAGACAACCATGAGGTCCCGGTGTTCAACGATAACTCCTC
 ATCTCTGTGGTACTCCAGGGGCCACAGTGCCATTTGAGGAG

Überlappung mit

FIG. 17 Translation der DNA 7e

1 GlyTrpArgLeuLeuAlaProIleThrAlaTyrAlaGlnGlnThrArgGlyLeuLeuGly
 GGGGTGGAGGTGCTGGCGCCCATCACGGCGTACGCCAGGCAGACAGGGGCTCCTAGG
 CCCCACCTCCACGACCGCGGGTAGTGCGCATGCGGGTCTGTCTGTTCCCGGAGGATCC
 CysIleIleThrSerLeuThrGlyArgAspLysAsnGlnValGluGlyGluValGlnIle
 61 GTGCATAATCACCAGCCTAACTGGCCGGGACAAAAACCAAGTGGAGGGTGAGCTCCAGAT
 CACGTATTAGTGGTGGGATTGACCGGCCCTGTTTTTGGTTACCTCCCACTCCAGGTCTA
 ValSerThrAlaAlaGlnThrPheLeuAlaThrCysIleAsnGlyValCysTrpThrVal
 121 TGTGTCAACTGCTGCCCAACCTTCCGTGGCAACGTGCATCATGGGGTGTGCTGGACTGT
 ACACAGTTGACGACGGGTTTGGAGGACCGTTGCACGTAGTTACCCACACGACCTGACA
 TyHisGlyAlaGlyThrArgThrIleAlaSerProLysGlyProValIleGlnMetTyr
 181 CTACCACGGGGCCGGAACGAGGACCATCGCGTCACCCAAGGGTCCGTGCATCCAGATGTA
 GATGGTGGCCCCGCTTGCCTCCTGGTAGCGCAGTGGGTCCCAAGGACAGTAGGTCTACAT
 ThrAsnValAspGlnAspLeuValGlyTrpProAlaProGlnGlySerArgSerLeuThr
 241 TACCAATGTAGACCAAGACCTTGTGGGCTGCCCCGCTCCCAAGGTAGCCGCTCATTTGAC
 ATGGTTACATCTGGTTCTTGAACACCCGACCGGGCGAGGCGTTCCATCGGCGAGTAACTG
 Überlappung mit 8h
 301 ProCysThrCysGlySerSerAspLeuTyrLeuValThrArgHis
 ACCCTGCACTTGGCGTCCCTCGGACCTTTACCTGGTCACGAGGCACG
 TGGGACGTGAACGCCGAGGAGCCTGGAAATGGACCAGTGCTCCGTGC

FIG. 18 Translation der DNA 14c

1 AsnMetTrpSerGlyThrPheProIleAsnAlaTyrThrThrGlyProCysThrProLeu
 GAACATGTGGAGTGGGACCTTCCCCATTAAATGCCTACACCACGGGCCCCCTGTACCCCCCT
 CTTGTACACCTCACCTCGAAGGGGTAATTACGGATGTGGTGCCCCGGGACATGGGGGA
 ----- Überlappung mit 25c -----
 61 ProAlaProAsnTyrThrPheAlaLeuTrpArgValSerAlaGluGluTyrValGluIle
 TCCTGCGCCGAACCTACACGTTCCGCTATGGAGGGTGTCTGCAGAGGAATACGTGGAGAT
 AGGACGCGGCTTGATGTGCAAGCGGATACCTCCACAGACGTCTCTTATGCACCTCTA

 121 ArgGlnValGlyAspPheHisTyrValThrGlyMetThrThrAspAsnLeuLysCysPro
 AAGGCAGGTGGGGACTTCCACTACGTGACGGGTATGACTACTGACIATCTTAAATGCCC
 TTCCGTCCACCCCCCTGAAGGTGATGCACTGCCCATACTGATGACTGTTAGAATTTACGGG

 181 CysGlnValProSerProGluPhePheThrGluLeuAspGlyValArgLeuHisArgPhe
 GTGCCAGGTCCCATCGCCCCGAATTTTTCACAGAATTGGACGGGGTGCGCCTACATAGGTT
 CACGGTCCAGGGTAGCGGGCTTAAAAAGTGTCTTAACCTGCCCCACGCGGATGTATCCAA

 241 AlaProProCysLysProLeuLeuArgGluGluValSerPheArgValGlyLeuHisGlu
 TGCGCCCCCTGCAAGCCCTTGCTGCGGGAGGAGGTATCATTGAGAGTAGGACTCCACGA
 ACGCGGGGGGACGTTGCGGAACGACGCCCTCCTCCATAGTAAGTCTCATCTGAGGTCTT

 301 TyrProValGlySerGlnLeuProCysGluProGluProAspValAlaValLeuThrSer
 ATACCCGGTAGGGTTCGCAATTACCTTGCGAGCCCCGAACCGGACGTGGCCCGTTGACGTC
 TATGGGCCATCCAGCGTTAATGGAACGCTCGGGCTTGGCCTGCACCGGCACAACTGCAG

 361 MetLeuThrAspProSerHisIleThrAlaGluAlaAlaGlyArgArgLeuAlaArgGly
 CATGCTCACTGATCCCTCCCATATAACAGCAGAGGCGGCCGGCGAAGGTTGGCGAGGGG
 GTACGAGTGACTAGGGAGGGTATATTGTCTCTCCGCCGGCCCCGCTTCCACCGCTCCCC

 421 SerProProSerValAlaSerSerSerAlaSerGlnLeuSerAlaProSerLeuLysAla
 ATCACCCCCCTCTGTGGCCAGCTCCTCGGCTAGCCAGCTATCCGCTCCATCTCTCAAGGC
 TAGTGGGGGGGAGACACCGGTCGAGGAGCCGATCGGTGATAGGCGAGGTAGAGAGTTCCG

 481 ThrCysThrAlaAsnHisAspSerProAsp
 AACTTGACCGCTAACCATGACTCCCCCTGAT
 TTGAACGTGGCGATTGGTACTGAGGGGACTA

FIG. 19 Translation der DNA 8f

Überlappung mit 14c

1 SerSerSerAlaSerGlnLeuSerAlaProSerLeuLysAlaThrCysThrAlaAsnHis
AGCTCCTCGGCTAGCCAGCTATCCGCTCCATCTCTCAAGGCAACTTGCACCGCTAACCAT
TCGAGGAGCCGATCGGTTCGATAGGCGAGGTAGAGAGTTCCGTTGAACGTGGCGATTGGTA

61 AspSerProAspAlaGluLeuIleGluAlaAsnLeuLeuTrpArgGlnGluMetGlyGly
GACTCCCCCTGATGCTGAGCTCATAGAGGCCAACCTCCTATGGAGGCAGGAGATGGGCGGC
CTGAGGGGACTACGACTCGAGTATCTCCGTTGGAGGATACCTCCGCTCCTCTACCCGCGC

121 AsnIleThrArgValGluSerGluAsnLysValValIleLeuAspSerPheAspProLeu
AACATCACCAGGGTTGAGTCAGAAAACAAAGTGCTGATTCTGGACTCCTTCGATCCGCTT
TTGTAGTGGTCCCAACTCAGTCTTTTGTTCACCACTAGACCTGAGGAAGCTAGGCGAA

181 ValAlaGluGluAspGluArgGluIleSerValProAlaGluIleLeuArgLysSerArg
GTGGCGGAGGAGGACGAGCGGGAGATCTCGGTACCCGCAGAAATCCTGCGGAAGTCTCGG
CACCGCCTCCTCCTGCTCGCCCTCTAGAGGCATGGGCGTCTTTAGGACGCCTTCAGAGCC

241 ArgPheAlaGlnAlaLeuProValTrpAlaArgProAspTyrAsnProProLeuValGlu
AGATTGCCCCAGGCCCTGCCCCGTTTGGGCGCGGCGGACTATAACCCCCCGCTAGTGGAG
TCTAAGCGGGTCCGGGACGGGCAACCCGCGCGGCTGATATTGGGGGCGATCACCTC

301 ThrTrpLysLysProAspTyrGluProProValValHisGlyCysProLeuProProPro
ACGTGGAAAAAGCCCGACTACGAACCACTGTGGTCCATGGCTGTCCGCTTCCACCTCCA
TGCACCTTTTTCGGGCTGATGCTTGGTGGACACCAGGTACCGACAGGCGAAGGTGGAGGT

361 LysSerProProValPro
AAGTCCCCCTCCTGTGCCG
TTCAGGGGAGGACACGGC

FIG. 20 Translation der DNA 33f

Überlappung mit 8f

1 ValTrpAlaArgProAspTyrAsnProProLeuValGluThrTrpLysLysProAspTyr
CGTTTGGGCGCGGCGGACTATAACCCCCCGCTAGTGGAGACGTGGAAAAACCCGACTA
GCAAACCCGCGCGGCGCTGATATTGGGGGCGATCACCTCTGCACCTTTTTCGGCTGAT

61 GluProProValValHisGlyCysProLeuProProProLysSerProProValProPro
CGAACCACTGTGGTCCATGGCTGCCCCGCTTCCACCTCCAAAGTCCCCCTCCTGTGCCCTCC
GCTTGGTGGACACCAGGTACCGACGGGCGAAGGTGGAGGTTTCAGGGGAGGACACGGAGG

121 ProArgLysLysArgThrValValLeuThrGluSerThrLeuSerThrAlaLeuAlaGlu
GCCTCGGAAGAAGCGGACGGTGGTCCCTCACTGAATCAACCTATCTACTGCCTTGGCCGA
CGGAGCCTTCTTCGCTGCCACCAAGAGTGACTTAGTTGGGATAGATGACGGAACCGGCT

181 LeuAlaThrArgSerPheGlySerSerSerThrSerGlyIleThrGlyAspAsnThrThr
GCTCGCCACCAAGCTTTGGCAGCTCCTCAACTTCCGGCATTACGGGCGACAATACGAC
CGAGCGGTGGTCTTCGAAACCGTCCAGGAGTTGAAGGCCGTAATGCCCGCTGTTATGCTG

241 ThrSerSerGluProAlaProSerGlyCysProProAspSerAspAlaGluSerPhe
AACATCCTCTGAGCCCCCCCCCTCTGGCTGCCCCCGACTCCGACGCTGAGTCCCTTGC
TTGTAGGAGACTCGGGCGGGGAAGACCGAGCGGGGGCTGAGGCTGCGACTCAGGAAACG

FIG. 21 Translation der DNA 33g

AlaSerArgSerPheGlySerSerSerThrSerGlyIleThrGlyAspAsnThrThrThr
 1 GCTCCAGAAAGCTTTGGCAGCTCCCTCAACTTCCGGCATACGGGGGACAAACGACAAACA
 CCGAGGTCTTCGAAACCGTCGAGGAGTTGAAGGCCGTAATGCCCGCTGTATGCTGTGTG
 ----- Überlappung mit 33f -----
 SerSerGluProAlaProSerGlyCysProProAspSerAspAlaGluSerTyrSerSer
 61 TCCTCTGAGCCCGCCCCCTCTGGCTGCCCGCCGACTCCGACGCTGAGTCTATTCTCTCC
 AGGAGACTCGGGCGGGGAAGACCGACGGGGGGGCTGAGGCTCGGACTCAGGATAAGGAGG
 MetProProLeuGluGlyGluProGlyAspProAspLeuSerAspGlySerTrpSerThr
 121 ATGCCCCCCTGGAGGGGGAGCCTGGGGATCCGGATCTTAGCGACGGGTCTGGTCAACG
 TACGGGGGGGACCTCCCCCTCGGACCCCTAGCCCTAGAAATCGCTGCCAGTACCACTTGC
 ValSerSerGluAlaAsnAlaGluAspValValCysCysSerMetSerTyrSerTrpThr
 181 GTCAGTAGTGAGGCCAAGCGGAGGATGTCTGTGTCTGTCTCAAGTCTTACTCTGGACA
 CAGTCATCACTCCGGTTCCCTCTCAGCAGCAGGACGATTACAGATGAGAACCCTGT
 GlyAlaLeuValThrProCysAlaAlaGluGluGlnLysLeuProIleAsnAlaLeuSer
 241 GCGGCTCTCTACCCCGTGGCGCGGGAAGAACAGAACTGCCCATCATCTCACTAGC
 CCGCGTGAGCAGTGGGGCAGCGGGGCGCTTCTGTCTTTGACGGGTAGTTACGTGATTCC
 AsnSerLeuLeuArgHisHisAsnLeuValTyrSerThrThrSerArgSer
 301 AACTCGTTGCTACGTCAACCAATTGGGTATTCCACCACTCAGCGAGTG
 TTGAGCAACGATGCAGTGGTGTAAACCAACATAAGGTGGTGGAGTGGCTCAC

FIG. 22 Translation der DNA 7f

GlyThrTyrValTyrAsnHisLeuThrProLeuArgAspTrpAlaHisAsnGlyLeuArg
 1 GGCACCTATGTTTATAACCATCTCACTCCTCTTCGGGACTGGGCGCACAAACGGCTTGCGA
 CCGTGGATACAAATATTGGTAGAGTGAGGAGAAGCCCTGACCCGCGTGTGCCGAACGCT
 AspLeuAlaValAlaValGluProValValPheSerGlnMetGluThrLysLeuIleThr
 61 GATCTGGCCGTGGCTGTAGAGCCAGTCTCTCTCCCAAATGGAGACCAAGCTCATCAGC
 CTAGACCGGCACCGACATCTCGGTCAAGAGAAGAGGGTTTACCTCTGGTTCCAGTAGTGC
 TrpGlyAlaAspThrAlaAlaCysGlyAspIleIleAsnGlyLeuProValSerAlaArg
 121 TGGGGGGCAGATACCGCCGCTGCGGTGACATCATCAACGGCTTGCTGTTTCCGCCCCG
 ACCCCCCCTCTATGGCGGCGCAGCCACTGTAGTAGTTGCCGAACCGACAAAGGCGGGCG
 ArgGlyArgGluIleLeuLeuGlyProAlaAspGlyMetValSerLysGlyTrpArgLeu
 181 AGGGGCGGGGAGATACTGCTCGGGCCAGCCGATGGAATGGTCTCCAAGGGTTGGAGGTTG
 TCCCCGGCCCTCTATGACGAGCCCGGTGGCTACCTTACCAGAGGTTCCCAACCTCCAAC
 LeuAlaProIleThrAlaTyrAlaGlnGlnThrArgGlyLeuLeuGlyCysIleIleThr
 241 CTGGCGCCCATCACGGCGTACGCCCAGCAGACAAGGGGCTCCTAGGGTGCATAATCACC
 GACCGCGGGTAGTGCCGATGCGGGTCTGTCTTCCCCGGAGGATCCACGTTATTAGTGG
 ----- Überlappung mit 7e -----
 SerLeuThrGlyArgAspLysAsnGlnValGluGlyGluValGlnIleValSerThrAla
 301 AGCCTAACTGGCCGGGACAAAACCAAGTGGAGGGTGAGGTCCAGATTGTGTCAACTGCT
 TCGGATTGACCGGCCCTGTTTTTGGTTCACTCCCACTCCAGGTCTAACACAGTTGACGA
 AlaGlnThrPheLeuAlaThrCysIleAsnGlyValCysTrp
 361 GCCCAAACCTTCCTGGCAACGTGCATCAATGGGGTGTGCTGG
 CGGGTTTGAAGGACCGTTGCAGTAGTTACCCCAACGACC

FIG. 23 Translation der DNA 11b

1 GlyGlyValValLeuValGlyLeuMetAlaLeuThrLeuSerProTyrTyrLysArgTyr
 GGCGGTGTTGTTCTCGTCGGGTTGATGGCGCTGACTCTGTCACCATATTACAAGCGCTAT
 CCGCCACAACAAGAGCAGCCCACTACCGCGACTGAGACAGTGGTATAATGTTCCGGATA
 61 IleSerTrpCysLeuTrpTrpLeuGlnTyrPheLeuThrArgValGluAlaGlnLeuHis
 ATCAGCTGGTGCTTGTGGTGGCTTCAGTATTTTCTGACCAGAGTGGAAAGCGCAACTGCAC
 TAGTCGACCACGAACACCACCGAAGTCATAAAAGACTGGTCTCACCTTCGCGTTGACGTG
 121 ValTrpIleProProLeuAsnValArgGlyGlyArgAspAlaValIleLeuLeuMetCys
 GTGTGGATTCCCCCCTCAACGTCCGAGGGGGCGCGACGCCGTCTTACTCATGTGT
 CACACCTAAGGGGGGAGTTGCAGGCTCCCCCGCGCTGCGGCAGTAGAATGAGTACACA
 181 AlaValHisProThrLeuValPheAspIleThrLysLeuLeuLeuAlaValPheGlyPro
 GCTGTACACCCGACTCTGGTATTTGACATCACCAAATTGCTGCTGGCCGTCTTCGGACCC
 CGACATGTGGGCTGAGACCATAAACTGTAGTGGTTTAAACGACGACCGGCAGAAGCCTGGG
 241 LeuTrpIleLeuGlnAlaSerLeuLeuLysValProTyrPheValArgValGlnGlyLeu
 CTTTGGATTCTTCAAGCCAGTTTGCTTAAAGTACCCTACTTTGTGCGCGTCCAAGGCCTT
 GAAACCTAAGAAGTTCGGTCAAACGAATTTTCATGGGATGAAACACGCGCAGGTTCCGGAA
 301 LeuArgPheCysAlaLeuAlaArgLysMetIleGlyGlyHisTyrValGlnMetValIle
 CTCCGGTTCTGCGCGTTAGCGCGGAAGATGATCGGAGGCCATTACGTGCAAATGGTCATC
 GAGGCCAAGACGCGCAATCGCGCCTTCTACTAGCCTCCGGTAATGCACGTTTACCAGTAG
 361 IleLysLeuGlyAlaLeuThrGlyThrTyrValTyrAsnHisLeuThrProLeuArgAsp
 ATTAAGTTAGGGGCGCTTACTGGCACCTATGTTTATAACCATCTCACTCCTCTTCGGGAC
 TAATTCAATCCCCGGAATGACCGTGGATACAAATATTGGTAGAGTGAGGAGAAGCCCTG
 Überlappung mit 7f
 421 TrpAlaHisAsnGlyLeuArgAspLeuAlaValAlaValGluProValValPheSerGln
 TGGGCGCACACGGCTTGGGAGATCTGGCCGTGGCTGTAGAGCCAGTCCGTCTTCTCCCAA
 ACCCGCGTGTGCCGAACGCTCTAGACCGGCACCGACATCTCGGTCAGCAGAAGAGGCTT
 481 MetGluThrLysLeuIleThrTrpGly
 ATGGAGACCAAGCTCATCAGTGGGGGGC
 TACCTCTGGTTCGAGTAGTGCACCCCCG

FIG. 24 Translation der DNA 14i

1 GluTyrValValLeuLeuPheLeuLeuAlaAspAlaArgValCysSerCysLeuTrp
 GGGAGTACGTCGTTCTCCTGTTCTCTGCTTGCAGACGCGCGCGTCTGCTCCTGCTTGT
 CCTCATGCAGCAAGAGGACAAGGAAGACGAACGTCTGCGCGCGCAGACGAGGACGAACA
 61 MetMetLeuLeuIleSerGlnAlaGluAlaAlaLeuGluAsnLeuValIleLeuAsnAla
 GGATGATGCTACTCATATCCCAAGCGGAGGCGGCTTTGGAGAACCTCGTAATACTTAATG
 CCTACTACGATGAGTATAGGGTTCCGCTCCGCGGAACCTCTTGAGCATTATGAATTAC
 121 AlaSerLeuAlaGlyThrHisGlyLeuValSerPheLeuValPhePheCysPheAlaTrp
 CAGCATCCCTGGCGGGACGCACGGTCTTGATCCTTCTCGTGTCTTCTGCTTTGCAAT
 GTCGTAGGGACCGGCCCTGCGTGCCAGAACATAGGAAGGAGCACAAGAAGACGAACCGTA
 181 TyrLeuLysGlyLysTrpValProGlyAlaValTyrThrPheTyrGlyMetTrpProLeu
 GGTATTGTAAGGTAAGTGGGTGCCCGGAGCGGTCTACACCTTCTACGGGATGTGGCCTC
 CCATAAACTTCCCATTCACCCACGGGCTCGCCAGATGTGGAAGATGCCCTACACCGGAG
 241 LeuLeuLeuLeuAlaLeuProGlnArgAlaTyrAlaLeuAspThrGluValAlaAla
 TCCTCCTGCTCCTGTTGGCGTTGCCCGAGCGGCGTACGCGCTGGACACGGAGGTGGCCG
 AGGAGGACGAGGACAACCGCAACGGGGTCCGCCCATGCGCGACCTGTGCCTCCACCGGC
 Überlappung mit 11b
 301 SerCysGlyGlyValValLeuValGlyLeuMetAlaLeuThrLeuSerProTyrTyrLys
 CGTCGTGTGGCGGTGTTGTTCTCGTCGGGTTGATGGCGCTGACTCTGTCAACATATTACA
 GCAGCACACCGCCACAACAAGAGCAGCCCACTACCGGACTGAGACAGTGGTATAATGT
 361 ArgTyrIleSerTrpCysLeuTrpTrpLeuGln
 AGCGCTATATCAGCTGGTGCTTGTGGTGGCTTCAGAA
 TCGCGATATAGTCGACACGACACACCGCAAGTCTT

FIG. 25 Translation der DNA 39c

1 ProAlaProSerGlyCysProProAspSerAspAlaGluSerTyrSerSerMetProPro
 CCAGCCCCCTCTGGGCTGCCCCCGGACTCCGACGCTGAGTCTTATCTCCATGCCCCCC
 GGTCCGGGAAGACCGACGGGGGGCTGAGGCTGCGACTCAGGATAAGGAGGTACGGGGG
 61 LeuGluGlyGluProGlyAspProAspLeuSerAspGlySerTrpSerThrValSerSer
 CTGGAGGGGGAGCCTGGGGATCCGATCTTAGCGACGGGTGATGTTCAACAGTCAGTAGT
 GACCTCCCCCTCGGACCCCTAGGCTAGAAATCGCTGCCAGTACCAGTTGTGAGTCATCA
 Überlappung mit 33g
 121 GluAlaAsnAlaGluAspValValCysCysSerMetSerTyrSerTrpThrGlyAlaLeu
 GAGGCCAACCGGAGGATGTCGTGCTGCTCAATGTCCTACTCTTGACAGGCGCACTC
 CTCCGGTTGCGCCTCTACAGCACACGACGAGTTACAGGATGAGAACCTGTCCGCGTGAG
 181 ValThrProCysAlaAlaGluGluGlnLysLeuProIleAsnAlaLeuSerAsnSerLeu
 GTCACCCCGTGCGCCGCGGAAGAAGCAAACTGCCCATCAATGCACTGAGCAACTCGTTG
 CAGTGGGGCAGCGGCGCCTTCTTGTCTTTGACGGGTAGTTACGTGACTCGTTGAGCAAC
 241 LeuArgHisHisAsnLeuValTyrSerThrThrSerArgSerAlaCysGlnArgGlnLys
 CTACGTCACCACAATTTGGTGTATTCCACCACCTCACGCAGTGCTTGCCAAAGGCAGAAG
 GATGCAGTGGTGTAAACACATAAGGTGGTGGAGTGCCTACGAACGGTTTCCGTCTTC
 301 LysValThrPheAspArgLeuGlnValLeuAspSerHisTyrGlnAspValLeuLysGlu
 AAAGTCACATTGACAGACTGCAAGTTCTGGACAGCCATTACCAGGACGTACTCAAGGAG
 TTTCAAGTGTAACTGTCTGACGTTCAAGACCTGTGCGTAATGGTCTTCATGAGTTCTTC
 361 ValLysAlaAlaAlaSerLysValLysAlaAsnPhe
 GTTAAAGCAGCGGCGTCAAAAGTGAAGGCTAACTTC
 CAATTTCTGCGCGCAGTTTTCACTTCCGATTGAAG

FIG. 26-1 Kombiniertes ORF der DNAs

141/11b/7f/7e/8h/33c/40b/37b/35/36/81/32/33b/25c/14c/8f/33f/33g/39c

1 GluTyrValValLeuLeuPheLeuLeuLeuAlaAspAlaArgValCysSerCysLeuTrp
 GGGAGTACGTCGTTCTCCTGTTCTTCTGCTTGCAGACGCGCGCTCTGCTCCTGCTTGT
 CCCTCATGCAGCAAGAGGACAAGGAAGACGAACGTCCTGCGCGCGCAGACGAGGACGAACA
 61 MetMetLeuLeuIleSerGlnAlaGluAlaAlaLeuGluAsnLeuValIleLeuAsnAla
 GGATGATGCTACTCATATCCCAAGCGGAGCGGCTTTGGAGAACCCTCGTAATACTTAATG
 CCTACTACGATGAGTATAGGGTTCGCTCCGCCGAAACCTCTTGGAGCATTATGAATTAC
 121 AlaSerLeuAlaGlyThrHisGlyLeuValSerPheLeuValPhePheCysPheAlaTrp
 CAGCATCCCTGGCCGGGACGCACGGTCTTGATCCTTCTCCTCGTGTCTTCTGCTTTGCAT
 GTCGTAGGGACCGCCCTGCGTGCCAGAACATAGGAAGGAGCACAAGAAGACGAAACGTA
 181 TyrLeuLysGlyLysTrpValProGlyAlaValTyrThrPheTyrGlyMetTrpProLeu
 GGTATTGAAGGCTAAGTGGGTGCCCGAGCGGTCTACACCTTCTACGGGATGTGGCCTC
 CCATAAACTTCCCATTCACCCACGGSCCTCGCCAGATGTGGAAGATGCCCTACACCGGAG
 241 LeuLeuLeuLeuLeuAlaLeuProGlnArgAlaTyrAlaLeuAspThrGluValAlaAla
 TCCTCCTGCTCCTGTGGCGTTGCCCGAGCGGCGTACGCGCTGGACACGGAGGTGGCCG
 AGGAGGACGAGGACAACCGCAACGGGTCGCCCCGATGCGCGACCTGTGCTCCACCGGC
 301 SerCysGlyGlyValValLeuValGlyLeuMetAlaLeuThrLeuSerProTyrTyrLys
 CGTCGTGTGGCGGTGTTGTTCTCGTGGGTGATGGCGCTGACTCTGTCAACATATTACA
 GCAGCACACCGCCACAACAAGAGCAGCCCAACTACCGCGACTGAGACAGTGGTATAATGT
 361 ArgTyrIleSerTrpCysLeuTrpTrpLeuGlnTyrPheLeuThrArgValGluAlaGln
 AGCGCTATATCAGCTGGTGTCTGTGGTGGCTTCAGTATTTTCTGACCAGAGTGGGAAGCGC
 TCGCGATATAGTCGACCACGAACACCCGAAGTCATAAAAGACTGGTCTCACCTTCGCG
 421 LeuHisValTrpIleProProLeuAsnValArgGlyGlyArgAspAlaValIleLeuLeu
 AACTGCACGTGTGGATTCCCCCCTCAACGTCCGAGGGGGCGCGACCGCTCATCTTAC
 TTGACGTGCACACCTAAGGGGGGAGTTGCAGGCTCCCCCGCGCTGCGGCAGTAGAATG
 481 MetCysAlaValHisProThrLeuValPheAspIleThrLysLeuLeuLeuAlaValPhe
 TCATGTGTGCTGTACACCGACTCTGGTATTGACATCACCAATTGCTGCTGGCCGTCT
 AGTACACACGACATGTGGGCTGAGACCATAAAGTGTAGTGGTTTACGACGACCGGACGA
 541 GlyProLeuTrpIleLeuGlnAlaSerLeuLeuLysValProTyrPheValArgValGln
 TCGGACCCCTTTGGATTCTTCAAGCCAGTTTGGTTAAAGTACCCTACTTTGTGCGCGTCC
 AGCCTGGGGAAACCTAAGAAGTTCGGTCAAACGAATTTCAAGGGATGAAACACGCGCAGG
 601 GlyLeuLeuArgPheCysAlaLeuAlaArgLysMetIleGlyGlyHisTyrValGlnMet
 AAGGCCTTCTCCGGTCTGCGCGTTAGCGCGGAAGATGATCGGAGGCCATTACGTGCAAA
 TTCCGGAAGAGGCCAAGACCGCAATCGCGCCTTCTACTAGCCTCCGGTAATGCACGTTT
 661 ValIleIleLysLeuGlyAlaLeuThrGlyThrTyrValTyrAsnHisLeuThrProLeu
 TGGTCATCATTAAAGTTAGGGCGCTTACTGGCACCTATGTTTATAACCATCTCACTCTC
 ACCAGTAGTAATTCAATCCCGCGAATGACCGTGGATACAAATATTGGTAGAGTGAGGAG
 721 ArgAspTrpAlaHisAsnGlyLeuArgAspLeuAlaValAlaValGluProValValPhe
 TTCGGGACTGGGCGCACACGGCTTGCAGATCTGGCCGTGGCTGTAGAGCCAGTCCGTCT
 AAGCCCTGACCCGCGTGTCCCGAACGCTCTAGACCGGCACCGACATCTCGGTACGACGA
 781 SerGlnMetGluThrLysLeuIleThrTrpGlyAlaAspThrAlaAlaCysGlyAspIle
 TCTCCCAATGGAGACCAAGCTCATCAGTGGGGGGCAGATACCGCCCGCTGCGGTGACA
 AGAGGGTTTACCTCTGGTTCGAGTAGTGACCCCCCGTCTATGGCGGCGCACGCCACTGT
 841 IleAsnGlyLeuProValSerAlaArgArgGlyArgGluIleLeuLeuGlyProAlaAsp
 TCATCAACGGCTTGCCTGTTTCCGCCCCGAGGGGGCGGAGATACTGCTCGGGGCCAGCG
 AGTAGTTGCCGAACGGACAAGGGCGGCGTCCCCGGCCCTCTATGACGAGCCCGGTGCGC
 GlyMetValSerLysGlyTrpArgLeuLeuAlaProIleThrAlaTyrAlaGlnGlnThr

901 ATGGAATGGTCTCCAAGGGGTGGAGGTTGCTGGCGCCCATCACGGCGTACGCCAGCAGA
 TACCTTACCAGAGGTTCCCCACCTCCAACGACCGCGGGTAGTGCCGCATGCCGGTCTGCT
 ArgGlyLeuLeuGlyCysIleIleThrSerLeuThrGlyArgAspLysAsnGlnValGlu
 961 CAAGGGGCCTCCTAGGGTGCATAATCACCAGCCTAACTGGCCGGGACAAAACCAAGTGG
 GTTCCCCGGAGGATCCACGTATTAGTGGTGGATTGACCGGCCCTGTTTTGGTTCCACC
 GlyGluValGlnIleValSerThrAlaAlaGlnThrPheLeuAlaThrCysIleAsnGly
 1021 AGGGTGAGGTCCAGATTGTGTCAACTGCTGCCCAAACCTTCCTGGCAACGTGCATCAATG
 TCCCACCTCCAGGTCTAACACAGTTGACGACGGGTTTGAAGGACCGTTGCACGTAGTTAC
 ValCysTrpThrValTyrHisGlyAlaGlyThrArgThrIleAlaSerProLysGlyPro
 1081 GGGTGTGCTGGACTGTCTACCACGGGGCCGGAACGAGGACCATCGCGTCACCCAAGGGTC
 CCCACACGACCTGACAGATGGTGGCCCGGCCCTTGCTCCTGGTAGCGCAGTGGGTTCACG
 ValIleGlnMetTyrThrAsnValAspGlnAspLeuValGlyTrpProAlaProGlnGly
 1141 CTGTTCATCCAGATGTATACCAATGTAGACCAAGACCTTGTTGGGCTGGCCCGCTCCGCAAG
 GACAGTAGGTCTACATATGGTTACATCTGTTCTGGAACACCCGACCGCGGAGGCGTTTC
 SerArgSerLeuThrProCysThrCysGlySerSerAspLeuTyrLeuValThrArgHis
 1201 GTAGCCGCTCATTGACACCCTGCACTTGGCGCTCCTCGGACCTTTACCTGGTCACGAGGC
 CATCGGCGAGTAAGTGTGGGACGTGAACGCGGAGGAGCCTGGAATGGACAGTGTCTCCG
 AlaAspValIleProValArgArgArgGlyAspSerArgGlySerLeuLeuSerProArg
 1261 ACGCCGATGTCTATTCCCGTGC CGCGCGGGGTGATAGCAGGGGACGCTGTGTGCCCCC
 TCGCGCTACAGTAAGGGCACGCGCGCGCCCACTATCGTCCCGTCCGACGACAGCGGGG
 ProIleSerTyrLeuLysGlySerSerGlyGlyProLeuLeuCysProAlaGlyHisAla
 1321 GGCCCATTTCTACTTGAAAGGCTCCTCGGGGGTCCGCTGTTGTGCCCCGCGGGGCACG
 CCGGGTAAAGGATGAACCTTCCGAGGAGCCCCCAGGCGACAACACGGGGCGCCCCGTGC
 ValGlyIlePheArgAlaAlaValCysThrArgGlyValAlaLysAlaValAspPheIle
 1381 CCGTGGGCATATTTAGGGCCGCGGTGTGCACCCGTGGAGTGGCTAAGGCGGTGGACTTTA
 GGCACCCGTATAAATCCCGGCGCCACACGTGGGCACCTCACCGATTCCGCCACCTGAAAT
 ProValGluAsnLeuGluThrThrMetArgSerProValPheThrAspAsnSerSerPro
 1441 TCCCTGTGGAGAACCCTAGAGACAACCATGAGGTCCCCGGTGTTCACGGATAACTCCTCTC
 AGGGACACCTCTTGGATCTCTGTTGGTACTCCAGGGGCCACAAGTGCCCTATTGAGGAGAG
 ProValValProGlnSerPheGlnValAlaHisLeuHisAlaProThrGlySerGlyLys
 1501 CACCAGTAGTCCCCAGAGCTTCCAGGTGGCTCACCTCCATGTCTCCACAGGCAGCGGCA
 GTGGTCATCACGGGGTCTCGAAGGTCCACCGAGTGGAGGTACGAGGGTGTCCGTGCGCGT
 SerThrLysValProAlaAlaTyrAlaAlaGlnGlyTyrLysValLeuValLeuAsnPro
 1561 AAAGCACCAGAGTCCCGGCTGCATATGCAGCTCAGGGCTATAAGGTGCTAGTACTCAACC
 TTTCTGTGGTTCCAGGGCCGACGTATACGTCCGAGTCCCGATATTCCACGATCATGAGTTGG
 SerValAlaAlaThrLeuGlyPheGlyAlaTyrMetSerLysAlaHisGlyIleAspPro
 1621 CCTCTGTTGCTGCAACACTGGGCTTTGGTGTCTTACATGTCCAGGCTCATGGGATCGATC
 GGAGACAACGACGTGTGTGACCCGAAACCAAGATGTACAGGTTCCGAGTACCCTAGCTAG
 AsnIleArgThrGlyValArgThrIleThrThrGlySerProIleThrTyrSerThrTyr
 1681 CTAACATCAGGACCGGGGTGAGAACATTAACCTGGCAGCCCCATCACGTACTCCACCT
 GATTGTAGTCTTGGCCCCACTCTTGTAAATGGTGACCGTGGGGTAGTGCATGAGGTGGA
 GlyLysPheLeuAlaAspGlyGlyCysSerGlyGlyAlaTyrAspIleIleIleCysAsp
 1741 ACGGCAAGTTCCTTGGCCGACGGCGGGTGTCTCGGGGGCGCTTATGACATAATAATTTCG
 TGCCGTTCAAGGAACGGCTGCCGCCACGAGCCCCCGGAATACTGTATTATTAAACAC
 GluCysHisSerThrAspAlaThrSerIleLeuGlyIleGlyThrValLeuAspGlnAla
 1801 ACCAGTGCCACTCCACGGATGCCACATCCATCTTGGGCATCGGCACGTCTCTTGACCAAG
 TGCTCACGGTGAGGTGCCTACGGTGTAGGTAGAACCCGTAGCCGTGACAGGAACGTGTTTC
 GluThrAlaGlyAlaArgLeuValValLeuAlaThrAlaThrProProGlySerValThr
 1861 CAGAGACTCGGGGGCGAGACTGGTGTGCTCGCCACCGCCACCCCTCCGGGCTCCGTCA
 GTCTCTGACGCCCCCGCTCTGACCAACACGAGCGGTGGCGGTGGGGAGGCCCCGAGGCAGT

FIG. 26-2.

1921 ValProHisProAsnIleGluGluValAlaLeuSerThrThrGlyGluIleProPheTyr
 CTGTGCCCCATCCCAACATCGAGGAGGTGCTCTGTCCACCACCGGAGAGATCCCTTTTT
 GACACGGGGTAGGGTTGTAGCTCCTCCACGAGACAGGTGGTGGCTCTCTAGGGAAAAA
 1981 GlyLysAlaIleProLeuGluValIleLysGlyGlyArgHisLeuIlePheCysHisSer
 ACGGCAAGGCTATCCCCCTCGAAGTAATCAAGGGGGGAGACATCTCATCTTCTGTCTATT
 TGCCGTTCCGATAGGGGGAGCTTCATTAGTTCCCCCCTCTGTAGAGTAGAAGACAGTAA
 2041 LysLysLysCysAspGluLeuAlaAlaLysLeuValAlaLeuGlyIleAsnAlaValAla
 CAAAGAAGAAGTGCAGCAACTCGCCGCAAAGCTGGTTCGATTTGGGCATCAATGCCGTGG
 GTTCTTCTTCACGCTGCTTGAGCGCGCTTTCGACCAGCGTAACCCGTAGTTACGGCACC
 2101 TyrTyrArgGlyLeuAspValSerValIleProThrSerGlyAspValValValValAla
 CCTACTACCGCGGTCTTGACGTGTCCGTATCCCGACCAGCGCGATGTTGTCTGTCGTGG
 GGATGATGGCGCCAGAACTGCACAGGCAGTAGGGCTGGTCCCGCTACAACAGCAGCACC
 2161 ThrAspAlaLeuMetThrGlyTyrThrGlyAspPheAspSerValIleAspCysAsnThr
 CAACCGATGCCCTCATGACCGGCTATACCGGCGACTTCGACTCGGTGATAGACTGCAATA
 GTTGGCTACGGGAGTACTGGCCGATATGGCCGCTGAAGCTGAGCCACTATCTGACGTTAT
 2221 CysValThrGlnThrValAspPheSerLeuAspProThrPheThrIleGluThrIleThr
 CGTGTGTCACCCAGACAGTCGATTTTCAGCCTTGACCCTACCTTCACCATTGAGACAATCA
 GCACACAGTGGGTCTGTCTAGCTAAAGTCGGAACCTGGGATGGAAGTGGAACCTCTGTAGT
 2281 LeuProGlnAspAlaValSerArgThrGlnArgArgGlyArgThrGlyArgGlyLysPro
 CGCTCCCCCAGGATGCTGTCTCCCGCACTCAACGTCGGGGCAGGACTGGCAGGGGGAAGC
 GCGAGGGGGTCTACGACAGAGGGCGTGAGTTGCAGCCCCGCTCTGACCGTCCCCCTTCG
 2341 GlyIleTyrArgPheValAlaProGlyGluArgProSerGlyMetPheAspSerSerVal
 CAGGCATCTACAGATTTGTGGCACCAGGGGGAGCGCCCCCTCCGGCATGTTGACTCGTCCG
 GTCCGTAGATGTCTAAACACCGTGGCCCCCTCGCGGGGAGGCGGTACAAGCTGAGCAGGC
 2401 LeuCysGluCysTyrAspAlaGlyCysAlaTrpTyrGluLeuThrProAlaGluThrThr
 TCCTCTGTGAGTGCTATGACGACAGGCTGTGCTTGGTATGAGCTCACGCCCCGCGAGACTA
 AGGAGACACTCAGGATACTGCGTCCGACACGAACCATACTCGAGTGGGGCGGCTCTGAT
 2461 ValArgLeuArgAlaTyrMetAsnThrProGlyLeuProValCysGlnAspHisLeuGlu
 CAGTTAGGCTACGAGCGTACATGAACCCCCGGGGCTTCCCGTGTGCCAGGACCATCTTG
 GTCAATCCGATGCTCGCATGTACTTGTGGGGCCCCGAAGGGCACACGGTCTCTGGTAGAAC
 2521 PheTrpGluGlyValPheThrGlyLeuThrHisIleAspAlaHisPheLeuSerGlnThr
 AATTTTGGGAGGGCGTCTTTACAGGCCTCACTCATATAGATGCCACTTTCTATCCCAGA
 TTAAACCCCTCCCGCAGAAATGTCCGGAGTGAGTATATCTACGGGTGAAAGATAGGGTCT
 2581 LysGlnSerGlyGluAsnLeuProTyrLeuValAlaTyrGlnAlaThrValCysAlaArg
 CAAAGCAGAGTGGGAGAACCTTCCTTACCTGGTAGCGTACCAAGCCACCGTGTGCGCTA
 GTTTCGTCTCACCCCTCTTGAAGGAATGGACCATCGCATGGTTCCGTGGCACACGCGAT
 2641 AlaGlnAlaProProProSerTrpAspGlnMetTrpLysCysLeuIleArgLeuLysPro
 GGGCTCAAGCCCCCTCCCCATCGTGGGACCAGATGTGGAAGTGTGATTGCGCTCAAGC
 CCCGAGTTCCGGGAGGGGGTAGCACCCCTGGTCTACACCTTCAAACTAAGCGGAGTTCCG
 2701 ThrLeuHisGlyProThrProLeuLeuTyrArgLeuGlyAlaValGlnAsnGluIleThr
 CCACCCTCCATGGGCCAACACCCCTGCTATACAGACTGGGCGCTGTTGAGAATGAAATCA
 GGTGGGAGGTACCGGTTGTGGGGACGATATGTCTGACCCGCGACAAGTCTTACTTTAGT
 2761 LeuThrHisProValThrLysTyrIleMetThrCysMetSerAlaAspLeuGluValVal
 CCCTGACGCACCCAGTCACCAATACATCATGACATGATGTCGGCCGACCTGGAGGTCCG
 GGGACTGCGTGGGTCACTGGTTTATGTAGTACTGTACGTACAGCCGGCTGGACCTCCAGC
 2821 ThrSerThrTrpValLeuValGlyGlyValLeuAlaAlaLeuAlaAlaTyrCysLeuSer
 TCACGAGCACCTGGGTGCTCGTTGGGCGGCTCCTGGCTGCTTTGGCCGCGTATTGCTGT
 AGTGCTCGTGGACCCACGAGCAACCGCCGAGGACCGACGAAACCGGCGCATAACGGACA
 ThrGlyCysValValIleValGlyArgValValLeuSerGlyLysProAlaIleIlePro

FIG. 26-3

2881 CAACAGGCTGCGTGGTCATAGTGGGCAGGGTCGTCTTGTCCGGGAAGCCGGCAATCATAC
 GTTGTCCGACGCACAGTATCACCCGTCCCAGCAGAACAGGCCCTTCGGCCGTTAGTATG
 AspArgGluValLeuTyrArgGluPheAspGluMetGluGluCysSerGlnHisLeuPro
 2941 CTGACAGGGAAGTCCTCTACCGAGAGTTTCGATGAGATGGAAGAGTGTCTCAGCACTTAC
 GACTGTCCCTTCAGGAGATGGCTCTCAAGCTACTCTACCTTCTCAGGAGAGTCGTGAATG
 TyrIleGluGlnGlyMetMetLeuAlaGluGlnPheLysGlnLysAlaLeuGlyLeuLeu
 3001 CGTACATCGAGCAAGGGATGATGCTCGCCGAGCAGTTCAAGCAGAAGGCCCTCGGCCTCC
 GCATGTAGCTCGTTCCTTACTACGAGCGGCTCGTCAAGTTCGTCTTCCGGGAGCCGGAGG
 GlnThrAlaSerArgGlnAlaGluValIleAlaProAlaValGlnThrAsnTrpGlnLys
 3061 TGCAGACCGCGTCCCCTCAGGCAGAGGTTATCGCCCTGCTGTCCAGACCACTGGCAAA
 ACGTCTGGCGCAGGGCAGTCCGTCTCCAATAGCGGGACGACAGGTCTGGTTGACCGTTT
 LeuGluThrPheTrpAlaLysHisMetTrpAsnPheIleSerGlyIleGlnTyrLeuAla
 3121 AACTCGAGACCTTCTGGGCGAAGCATATGGAACCTTCATCAGTGGGATACATACTTGG
 TTGAGCTCTGGAAGACCCGCTTCGTATACACCTTGAAGTAGTCACCCATGTATGAACC
 GlyLeuSerThrLeuProGlyAsnProAlaIleAlaSerLeuMetAlaPheThrAlaAla
 3181 CGGGCTGTCAACGCTGCCTGGTAACCCCGCCATTGCTTCATTGATGGCTTTTACAGCTG
 GCCCGAACAGTTGCGACGGACCATTTGGGGCGGTAACGAAGTAACTACCGAAAATGTCGAC
 ValThrSerProLeuThrThrSerGlnThrLeuLeuPheAsnIleLeuGlyGlyTrpVal
 3241 CTGTCAACAGCCCACTAACCCTAGCCAAACCCCTCCTCTTCAACATATTTGGGGGGTGGG
 GACAGTGGTTCGGGTGATTGGTGATCGGTTTGGGAGGAGAAGTTGTATAACCCCCCACC
 AlaAlaGlnLeuAlaAlaProGlyAlaAlaThrAlaPheValGlyAlaGlyLeuAlaGly
 3301 TGGCTGCCAGCTCGCCGCCCCCGGTGCGGCTACTGCCTTTGTGGGCGCTGGCTTAGCTG
 ACCGACGGGTTCGAGCGGGGGGCCACGGCGATGACGGAACACCCCGCAGCGAATCGAC
 AlaAlaIleGlySerValGlyLeuGlyLysValLeuIleAspIleLeuAlaGlyTyrGly
 3361 GCGCCGCCATCGGCAGTGTGGACTGGGGAAGTCTCTCATAGACATCCTTGCAGGGTATG
 CGCGGCGGTAGCCGTCAACCTGACCCCTTCCAGGAGTATCTGTAGGAACGTCCCATAC
 AlaGlyValAlaGlyAlaLeuValAlaPheLysIleMetSerGlyGluValProSerThr
 3421 GCGCGGGCGTGGCGGGAGCTCTTGTGGCATTCAAGATCATGACGGGTGAGGTCCCTCCA
 CGCGCCCGCACCCGCCCTCGAGAACACCGTAAGTTCTAGTACTCGCCACTCCAGGGGAGGT
 GluAspLeuValAsnLeuLeuProAlaIleLeuSerProGlyAlaLeuValValGlyVal
 3481 CGGAGGACCTGGTCAATCTACTGCCCGCCATCCTCTCGCCCGGAGCCCTCGTAGTCGGCG
 GCCTCCTGGACAGTTAGATGACGGGCGGTAGGAGAGCGGGCTCGGGAGCATCAGCCGC
 ValCysAlaAlaIleLeuArgArgHisValGlyProGlyGluGlyAlaValGlnTrpMet
 3541 TGGTCTGTGCAGCAATACTGCGCCGGCACGTTGGCCCGGGCGAGGGGCGAGTGCAGTGA
 ACCAGACAGCTCGTTATGACGCGGCGGTGCAACCGGGCCCGCTCCCCCGTCACGTCACCT
 AsnArgLeuIleAlaPheAlaSerArgGlyAsnHisValSerProThrHisTyrValPro
 3601 TGAACCGGCTGATAGCCTTCGCCCTCCCGGGGAACCATGTTTCCCCCAGCACTACGTGC
 ACTTGGCCGACTATCGGAAGCGGAGGGCCCCCTTGGTACAAAGGGGTGCGTGTATGCACG
 GluSerAspAlaAlaAlaArgValThrAlaIleLeuSerSerLeuThrValThrGlnLeu
 3661 CGGAGAGCGATGCAGCTGCCCGGCTCACTGCCATACTCAGCAGCCTCACTGTAACCCAGC
 GCCTCTCGCTACGTCGACGGGCGCAGTGACGGTATGAGTCGTCCGAGTGACATTGGGTCCG
 LeuArgArgLeuHisGlnTrpIleSerSerGluCysThrThrProCysSerGlySerTrp
 3721 TCCTGAGGCGACTGCACCACTGGATAAGCTCGGAGTGTACCACTCCATGCTCCGGTTCTT
 AGGACTCCGCTGACGTGGTCACCTATTGAGCCTCACATGGTGAGGTACGAGGCCAAGGA
 LeuArgAspIleTrpAspTrpIleCysGluValLeuSerAspPheLysThrTrpLeuLys
 3781 GGCTAAGGGACATCTGGGACTGGATATGCGAGGTGTTGAGCGACTTTAAGACCTGGCTAA
 CCGATTCCCTGTAGACCTGACCTATACGCTCCACAACCTCGCTGAAATTCTGGACCGATT
 AlaLysLeuMetProGlnLeuProGlyIleProPheValSerCysGlnArgGlyTyrLys
 3841 AAGCTAAGCTCATGCCACAGCTGCCTGGGATCCCTTTGTGTCTGCCAGCGCGGGTATA
 TTCGATTTCGAGTACGGTGTGACCGGACCTAGGGGAAACACAGGACGGTCCGCCCATAT

FIG. 26-4

3901 GlyValTrpArgValAspGlyIleMethHisThrArgCysHisCysGlyAlaGluIleThr
 AGGGGGTCTGGCGAGTGGACGGCATCATGCACACTCGCTGCCACTGTGGAGCTGAGATCA
 TCCCCAGACCGCTCACCTGCCGTAGTACGTGTGAGCGACGGTGACACCTCGACTCTAGT
 3961 GlyHisValLysAsnGlyThrMetArgIleValGlyProArgThrCysArgAsnMetTrp
 CTGGACATGTCAAAAACGGGACGATGAGGATCGTCCGTCTAGGACCTGCAGGAACATGT
 GACCTGTACAGTTTTTGCCCTGCTACTCCTAGCAGCCAGGATCCTGGACGTCTTGTACA
 4021 SerGlyThrPheProIleAsnAlaTyrThrThrGlyProCysThrProLeuProAlaPro
 GGAGTGGGACCTTCCCCATTAATGCCTACACCACGGGCCCTGTACCCCCCTTCTGCGC
 CCTCACCCCTGGAAGGGTAATTACGGATGTGGTGCCCGGGACATGGGGGAAGGACGCG
 4081 AsnTyrThrPheAlaLeuTrpArgValSerAlaGluGluTyrValGluIleArgGlnVal
 CGAAGTACACGTTCCGCGCTATGGAGGGTGTCTGCAGAGGAATATGTGGAGATAAGGCAGG
 GCTTGATGTGCAAGCGCGATACCTCCACAGACGTCTCCTTATACACCTCTATTCCGTCC
 4141 GlyAspPheHisTyrValThrGlyMetThrThrAspAsnLeuLysCysProCysGlnVal
 TGGGGGACTTCCACTACGTGACGGGTATGACTACTGACAATCTCAAATGCCCGTGCCAGG
 ACCCCCTGAAGGTGATGCACTGCCATACGTGATGACTGTTAGAGTTTACGGGCACGGTCC
 4201 ProSerProGluPhePheThrGluLeuAspGlyValArgLeuHisArgPheAlaProPro
 TCCCATCGCCCGAATTTTTCACAGAATTGGACGGGGTGGCGCTACATAGGTTTGGCCCCC
 AGGGTAGCGGGCTTAAAAAGTGTCTTAACCTGCCCCACGGCGATGTATCCAAACGCGGGG
 4261 CysLysProLeuLeuArgGluGluValSerPheArgValGlyLeuHisGluTyrProVal
 CCTGCAAGCCCTTGCTGCGGAGGAGGTATCATTGAGAGTAGGACTCCACGAATACCCGG
 GGACGTTCCGGGAACGACGCCCTCCTCCATAGTAAGTCTCATCCTGAGGTGCTTATGGGCC
 4321 GlySerGlnLeuProCysGluProGluProAspValAlaValLeuThrSerMetLeuThr
 TAGGGTTCGCAATTACCTTGCGAGCCCGAACCGGACGTGGCCGTGTTGACGTCCATGCTCA
 ATCCACGCTTAATGGAACGCTCGGGCTTGGCCTGCACCGGCACAACCTGCAGGTACGAGT
 4381 AspProSerHisIleThrAlaGluAlaAlaGlyArgArgLeuAlaArgGlySerProPro
 CTGATCCCTCCCATATAACAGCAGAGGGCGGCCGGCGAAGGTTGGCGAGGGGATCACCCC
 GACTAGGGAGGGTATATTGTCGTCTCCGCCGGCCGCTTCCAACCGCTCCCCTAGTGGGG
 4441 SerValAlaSerSerSerAlaSerGlnLeuSerAlaProSerLeuLysAlaThrCysThr
 CCTCTGTGGCCAGCTCCTCGGCTAGCCAGCTATCCGCTCCATCTCTCAAGGCAACTGCA
 GGAGACACCGGTCGAGGAGCGGATCGGTGATAGGCGAGGTAGAGAGTTCCGTTGAACGT
 4501 AlaAsnHisAspSerProAspAlaGluLeuIleGluAlaAsnLeuLeuTrpArgGlnGlu
 CCGCTAACCATGACTCCCTGATGCTGAGCTCATAGAGGCCAACCTCCTATGGAGGCAGG
 GCGGATGGTACTGAGGGGACTACGACTCGAGTATCTCCGTTTGAGGATACCTCCGTCC
 4561 MetGlyGlyAsnIleThrArgValGluSerGluAsnLysValValIleLeuAspSerPhe
 AGATGGGCGGCAACATCACAGGGTTGAGTCAGAAAACAAAGTGGTGATTCTGGACTCCT
 TCTACCCGCGTGTAGTGGTCCCAACTCAGTCTTTTGTTCACCACTAAGACCTGAGGA
 4621 AspProLeuValAlaGluGluAspGluArgGluIleSerValProAlaGluIleLeuArg
 TCGATCCGCTTGTGGCGGAGGAGGACGAGCGGGAGATCTCCGTACCCGCAGAAATCCTGC
 AGCTAGGCGAACACCCCTCCTCCTGCTCGCCCTCTAGAGGCATGGGCGTCTTTAGGACG
 4681 LysSerArgArgPheAlaGlnAlaLeuProValTrpAlaArgProAspTyrAsnProPro
 GGAAGTCTCGGAGATTGCCCCAGGCCCTGCCCGTTTGGGCGCGGCCGACTATAACCCCC
 CCTTCAGAGCCTTAAGCGGGTCCGGGACGGGCAAACCCGCGCGGCCCTGATATGGGGG
 4741 LeuValGluThrTrpLysLysProAspTyrGluProProValValHisGlyCysProLeu
 CGCTAGTGGAGACGTGGAAAAAGCCCGACTACGAACCACTGTGGTCCATGGCTGTCCGC
 GCGATCACCTCTGCACCTTTTTCGGGCTGATGCTTGGTGGACACCGGTACCGACAGGCG
 4801 ProProProLysSerProProValProProProArgLysLysArgThrValValLeuThr
 TTCCACCTCCAAAGTCCCCTCTGTGCTCCGCTCGGAAGAAGCGGACGGTGGTCTCTCA
 AAGGTGGAGGTTTACGGGGAGGACAGGAGGCGGAGCCTTCTTCGCTGCCACAGGAGT
 GluSerThrLeuSerThrAlaLeuAlaGluLeuAlaThrArgSerPheGlySerSerSer

FIG. 26-5

4861 CTGAATCAACCCTATCTACTGCCTTGGCCGAGCTCGCCACCAGAAGCTTTGGCAGCTCCT
 GACTTAGTTGGGATAGATGACGGAACCGGCTCGAGCGGTGGTCTTCGAAACCGTCGAGGA
 ThrSerGlyIleThrGlyAspAsnThrThrThrSerSerGluProAlaProSerGlyCys
 4921 CAACTTCCGGCATTACGGGCGACAATACGACAACATCCTCTGAGCCCCCCCCCTTCTGGCT
 GTTGAAGGCCGTAATGCCCCGCTGTTATGCTGTTGTAGGAGACTCGGGCGGGGAAGACCGA
 ProProAspSerAspAlaGluSerTyrSerSerMetProProLeuGluGlyGluProGly
 4981 GCCCCCGGACTCCGACGCTGAGTCCTATTCCTCCATGCCCCCCTGGAGGGGGAGCCTG
 CGGGGGGGCTGAGGCTGCGACTCAGGATAAGGAGGTACGGGGGGGACCTCCCCCTCGGAC
 AspProAspLeuSerAspGlySerTrpSerThrValSerSerGluAlaAsnAlaGluAsp
 5041 GGGATCCGGATCTTAGCGACGGGTCATGGTCAACGGTCAGTAGTGAGGCCAACGCGGAGG
 CCCTAGGCCCTAGAATCGCTGCCAGTACCAGTTGCCAGTCATCACTCCGGTTGCGCCTCC
 ValValCysCysSerMetSerTyrSerTrpThrGlyAlaLeuValThrProCysAlaAla
 5101 ATGTCGTGTGCTGCTCAATGTCTTACTCTTGGACAGGCGCACTCGTCAACCCGTGCGCCG
 TACAGCACACGACGAGTTACAGAATGAGAACCCTGTCCGCGTGAGCAGTGGGGCACGCGGC
 GluGluGlnLysLeuProIleAsnAlaLeuSerAsnSerLeuLeuArgHisHisAsnLeu
 5161 CGGAAGAACAGAACTGCCCATCAATGCACTAAGCAACTCGTTGCTACGTCAACCAATT
 GCCTTCTGTCTTTGACGGGTAGTTACGTGATTGCTTGAGCAACGATGCAGTGGTGTAA
 ValTyrSerThrThrSerArgSerAlaCysGlnArgGlnLysLysValThrPheAspArg
 5221 TGGTGATTCCACCACCTCACGCAGTGTGTTGCCAAGGCAGAAGAAAGTCACATTTGACA
 ACCACATAAGGTGGTGGAGTGCCTCACGAACGGTTTCCGTCTTCTTCAGTGTAACCTGT
 LeuGlnValLeuAspSerHisTyrGlnAspValLeuLysGluValLysAlaAlaAlaSer
 5281 GACTGCAAGTTCTGGACAGCCATTACCAGGACGTACTCAAGGAGGTTAAAGCAGCGGCGT
 CTGACGTTCAAGACCTGTGGTAATGGTCTGTCATGAGTTCCTCCAATTTCTGCGCCGCA
 LysValLysAlaAsnLeu
 5341 CAAAAGTGAAGGCTAACTTG
 GTTTTCACTCCGATTGAAC

FIG. 26-6

FIG. 27 Translation der DNA 12f

1 IlePheLysIleArgMetTyrValGlyGlyValGluHisArgLeuGluAlaAlaCysAsn
 CCATATTTAAATCAGGATGTACGTGGGAGGGGTCGAACACAGGCTGGAAGCTGCCTGCA
 GGTATAAATTTTAGTCCTACATGCACCCTCCCCAGCTTGTGTCCGACCTTCGACGGACGT
 61 TrpThrArgGlyGluArgCysAspLeuGluAspArgAspArgSerGluLeuSerProLeu
 ACTGGACGCGGGGCGAACGTTGCGATCTGGAAGACAGGGACAGGTCCGAGCTCAGCCCGT
 TGACCTGCGCCCCGCTTGCAACGCTAGACCTTCTGTCCCTGTCCAGGCTCGAGTCGGGCA
 121 LeuLeuThrThrThrGlnTrpGlnValLeuProCysSerPheThrThrLeuProAlaLeu
 TACTGCTGACCACTACACAGTGGCAGGTCTCCCGTGTTCCTTCACAACCCCTACCAGCCT
 ATGACGACTGGTGATGTGTACCCGTCCAGGAGGGCACAAGGAAGTGTGGGATGGTCGGA
 181 SerThrGlyLeuIleHisLeuHisGlnAsnIleValAspValGlnTyrLeuTyrGlyVal
 TGTCCACCGGCCTCATCCACCTCCACCAGAACATTGTGGACGTGCAGTACTTGTACGGGG
 ACAGGTGGCCCGAGTAGGTGGAGGTGGTCTTGTAACACCTGCACGTCATGAACATGCCCC
 241 GlySerSerIleAlaSerTrpAlaIleLysTrpGluTyrValValLeuLeuPheLeuLeu
 TGGGGTCAAGCATCGCGTCCTGGGCCATTAAGTGGGAGTACGTCTGTTCTCCTGTTCTTCTC
 ACCCCAGTTCTGTAGCGCAGGACCCGGTAATTCACCCTCATGCAGCAAGAGGACAAGGAAG
 301 LeuAlaAspAlaArgValCysSerCysLeuTrpMetMetLeuLeuIleSerGlnAlaGlu
 TGCTTGACAGCGCGCGCTCTGCTCCTGCTTGTGGATGATGCTACTCATATCCCAAGCGG
 ACGAACGTCTGCGCGCGCAGACGAGGACGAACACCTACTACGATGAGTATAGGGTTCGGCC
 ----- Überlappung mit 14i -----
 361 AlaAlaLeuGluAsnLeuValIleLeuAsnAlaAlaSerLeuAlaGlyThrHisGlyLeu
 AGGCGGCTTTGGAGAACCTCGTAATACTTAATGCAGCATCCCTGGCCGGGACGCACGGTC
 TCCGCCGAAACCTCTTGGAGCATTATGAATTACGTCTAGGGACCGGCCCTGCGTGCCAG

 421 Val
 TTGTATC
 AACATAG

FIG. 28 Translation der DNA 35f

Überlappung mit 39c

1 LeuLysGluValLysAlaAlaAlaSerLysValLysAlaAsnLeuLeuSerValGluGlu
 TGCTCAAGGAGGTTAAAGCAGCGGCGTCAAAAGTGAAGGCTAACTTGCTATCCGTAGAGG
 ACGAGTTCCTCCAATTCGTCGCCGCAGTTTCACTTCCGATTGAACGATAGGCATCTCC
 61 AlaCysSerLeuThrProProHisSerAlaLysSerLysPheGlyTyrGlyAlaLysAsp
 AAGCTTGACGCTGACGCCCCCAGCTCAGCCAAATCCAAGTTTGGTTATGGGGCAAAG
 TTCGAACGTCGGACTGCGGGGGTGTGAGTCGGTTTAGGTTCAAACCAATACCCCGTTTTTC
 121 ValArgCysHisAlaArgLysAlaValThrHisIleAsnSerValTrpLysAspLeuLeu
 ACGTCCGTTGCCATGCCAGAAAGGCCGTAACCCACATCAACTCCGTGTGGAAAGACCTTC
 TGCAGGCAACGGTACGGTCTTTCCGGCATTGGGTGTAGTTGAGGCACACCTTTCTGGAAG
 181 GluAspAsnValThrProIleAspThrThrIleMetAlaLysAsnGluValPheCysVal
 TGGAAGACAATGTAACACCAATAGACACTACCATCATGGCTAAGAACGAGGTTTCTGCG
 ACCTTCTGTTACATTGTGGTTATCTGTGATGGTAGTACCGATTCTTGCTCCAAAAGACGC
 241 GlnProGluLysGlyGlyArgLysProAlaArgLeuIleValPheProAspLeuGlyVal
 TTCAGCCTGAGAAGGGGGGTGCGTAAGCCAGCTCGTCTCATCGTGTTCCTCCGATCTGGGCG
 AAGTCGGACTCTTCCCCCAGCATTCCGGTCGAGCAGAGTAGCACAAGGGGCTAGACCCGC
 301 ArgValCysGluLysMetAlaLeuTyrAspValValThrLysLeuProLeuAlaValMet
 TGCGCGTGTGCGAAAAGATGGCTTTGTACGACGTGGTTACAAAGCTCCCTTGGCCGTGA
 ACGCGCACACGCTTTTCTACCGAAACATGCTGCACCAATGTTTCGAGGGGAACCGGCACT
 361 GlySerSerTyrGlyPheGlnTyrSerProGlyGlnArgValGluPheLeuValGlnAla
 TGGAAGCTCCTACGGATTCCAATACTCACCAGGACAGCGGTTGAATTCTCGTGCAG
 ACCCTTCGAGGATGCCTAAGGTTATGAGTGGTCTGTGCGCCCACTTAAGGAGCACGTTT
 421 TrpLysSerLysLysThrProMetGlyPheSerTyrAspThrArgCysPheAspSerThr
 CGTGGAAGTCCAAGAAAACCCCAATGGGGTTCTCGTATGATACCCGCTGCTTTGACTCCA
 GCACCTTCAGGTTCTTTTGGGGTTACCCCAAGAGCATACTATGGGCGACGAACTGAGGT
 481 ValThrGluSerAspIleArgThrGluGluAla
 CAGTCACTGAGAGCGACATCCGTACGGAGGAGGCA
 GTCAGTGAATCTCGCTGTAGGCATGCCTCCTCCGT

FIG. 29 Translation der DNA 19g

1 GluPheLeuValGlnAlaTrpLysSerLysLysThrProMetGlyPheSerTyrAspThr
 GAATTCCTCGTGCAAGCGTGGAAGTCCAAGAAAACCCCAATGGGGTTCTCGTATGATACC
 CTTAAGGAGCACGTTTCGCACCTTCAGGTTCTTTTGGGGTTACCCCAAGAGCATACTATGG
 ----- Überlappung mit 35f -----
 61 ArgCysPheAspSerThrValThrGluSerAspIleArgThrGluGluAlaIleTyrGln
 CGCTGCTTTGACTCCACAGTCACTGAGAGCGACATCCGTACGGAGGAGGCAATCTACCAA
 GCGACGAAACTGAGGTGTCAGTGA CTCTCGCTGTAGGCATGCCTCCTCCGTTAGATGGTT
 121 CysCysAspLeuAspProGlnAlaArgValAlaIleLysSerLeuThrGluArgLeuTyr
 TGTGTGACCTCGACCCCCAAGCCCGCGTGGCCATCAAGTCCCTCACCAGAGGCTTTAT
 ACAACACTGGAGCTGGGGGTTCGGGCGCACCGGTAGTTCAGGGAGTGGCTCTCCGAAATA
 181 ValGlyGlyProLeuThrAsnSerArgGlyGluAsnCysGlyTyrArgArgCysArgAla
 GTTGGGGGCCCTCTTACCAATTCAAGGGGGGAGAACTGCGGCTATCGCAGGTGCCGCGCG
 CAACCCCGGGGAGAATGGTTAAGTTCCCCCTCTTGACCCGATAGCGTCCACGGCGCGC
 241 SerGlyValLeuThrThrSerCysGlyAsnThrLeuThrCysTyrIleLysAlaArgAla
 AGCGGCGTACTGACAACTAGCTGTGGTAACACCCTCACTTGCTACATCAAGGCCCGGGCA
 TCGCCGCATGACTGTTGATCGACACCATTGTGGGAGTGAACGATGTAGTTCCGGGCCCCGT
 301 AlaCysArgAlaAlaGlyLeuGlnAspCysThrMetLeuValCysGlyAspAspLeuVal
 GCCTGTGAGCCGCGAGGGCTCCAGGACTGCACCATGCTCGTGTGTGGCGAGCTTAGTC
 CGGACAGCTCGGCGTCCCGAGGTCTGACGTGGTACGAGCACACACCGCTGCTGAATCAG
 361 ValIleCysGluSerAlaGlyValGlnGluAspAlaAla
 GTTATCTGTGAAAGCGCGGGGTCCAGGAGGACGCGGCGAG
 CAATAGACACTTTCGCGCCCCCAGGTCTCTCGCGCGCTC

FIG. 30 Translation der DNA 26g

1 GlyGlyGluAsnCysGlyTyrArgArgCysArgAlaSerGlyValLeuThrThrSerCys
 GGGGGGAGAACTGCGGCTATCGCAGGTGCCGCGCAAGCGGCTACTGACAACTAGCTGT
 CCCCCCTCTTGACGCCGATAGCGTCCACGGCGCTTCGCGCGCATGACTGTTGATCGACA
 61 GlyAsnThrLeuThrCysTyrIleLysAlaArgAlaAlaCysArgAlaAlaGlyLeuGln
 GGTAACACCCTCACTTGTTACATCAAGGCCGAGCAGCCTGTGCGAGCCGCGAGGCTCCAG
 CCATTGTGGGAGTGAACAATGTAGTTCCGGGCTCGTCCGACAGCTCGGCGTCCCGAGGTC
 Überlappung mit 19g
 121 AspCysThrMetLeuValCysGlyAspAspLeuValValIleCysGluSerAlaGlyVal
 GACTGCACCATGCTCGTGTGTGGCGACGACTTAGTCGTTATCTGTGAAAGCGCGGGGTC
 CTGACGTGGTACGAGCACACACCGCTGCTGAATCAGCAATAGACACTTTTCGCGCCCCCAG
 181 GlnGluAspAlaAlaSerLeuArgAlaPheThrGluAlaMetThrArgTyrSerAlaPro
 CAGGAGGACGCGCGGAGCCTGAGAGCCTTCACGGAGGCTATGACCAGGTACTCCGCCCCC
 GTCTCTCTGCGCGCTCGGACTCTCGGAAGTGCTCCGATACTGGTCCATGAGGCGGGG
 241 ProGlyAspProProGlnProGluTyrAspLeuGluLeuIleThrSerCysSerSerAsn
 CCTGGGGACCCCCACAACCAGAATACGACTTGGAGCTCATAACATCATGCTCTCTCCAAC
 GGACCCCTGGGGGGTGTGGTCTTATGCTGAACCTCGAGTATTGTAGTACGAGGAGGTTG
 301 ValSerValAlaHisAspGlyAlaGlyLysArgValTyrTyrLeuThrArgAspProThr
 GTGTCAGTCGCCCCACGACGGCGCTGGAAAGAGGGTCTACTACCTCACCCGTGACCCTACA
 CACAGTCAGCGGGTGCTGCCGCGACCTTTCTCCAGATGATGGAGTGGGCACTGGGATGT
 361 ThrProLeuAlaArgAlaAlaTrpGluThrAlaArgHisThrProValAsnSerTrpLeu
 ACCCCCTCGCGAGAGCTGCGTGGGAGACAGCAAGACACACTCCAGTCAATTCTGGCTA
 TGGGGGGAGCGCTCTCGACGCAACCTCTGTCTGTGTGAGGTGAGTTAAGGACCGAT
 421 GlyAsnIleIleMetPheAlaProThrLeuTrpAla
 GGCAACATAATCATGTTTGGCCCCACACTGTGGGCG
 CCGTTGTATTAGTACAAACGGGGGTGTGACACCCGC

FIG. 31 Translation der DNA 15e

1 GlyAlaGlyLysArgValTyrTyrLeuThrArgAspProThrThrProLeuAlaArgAla
 CGGCGCTGGAAAGAGGGTCTACTACCTCACCCGTGACCCTACAACCCCTCGCGAGAGC
 GCCGCGACCTTTCTCCAGATGATGGAGTGGGCACTGGGATGTTGGGGGAGCGCTCTCG
 Überlappung mit 26g
 61 AlaTrpGluThrAlaArgHisThrProValAsnSerTrpLeuGlyAsnIleIleMetPhe
 TGCGTGGGAGACAGCAAGACACACTCCAGTCAATTCCTGGCTAGGCAACATAATCATGTT
 ACGCACCTCTGTCTGTTCTGTGTGAGGTCAGTTAAGGACCGATCCGTTGTATTAGTACAA
 121 AlaProThrLeuTrpAlaArgMetIleLeuMetThrHisPhePheSerValLeuIleAla
 TGCCCCCACACTGTGGGCGAGGATGATACTGATGACCCATTTCTTTAGCGTCTCTATAGC
 ACGGGGGTGTGACACCCGCTCTACTATGACTACTGGGTAAAGAAATCGCAGGAATATCG
 181 ArgAspGlnLeuGluGlnAlaLeuAspCysGluIleTyrGlyAlaCysTyrSerIleGlu
 CAGGGACAGCTTGAACAGGCCCTCGATTGCGAGATCTACGGGGCCTGCTACTCCATAGA
 GTCCCTGGTCAACTTGTCCGGGAGCTAACGCTCTAGATGCCCCGGACGATGAGGTATCT
 241 ProLeuAspLeuProProIleIleGlnArgLeu
 ACCACTTGATCTACCTCCAATCATTCAAAGACTC
 TGGTGAAGTAGATGAGGTTAGTAAGTTTCTGAG

FIG. 32-1 Kombiniertes ORF der DNAs 12f bis 15e

1 IlePheLysIleArgMetTyrValGlyGlyValGluHisArgLeuGluAlaAlaCysAsn
 CCATATTTAAATCAGGATGTACGTGGGAGGGGTGGAACACAGGCTGGAAGCTGCCTGCA
 GGTATAAATTTTAGTCCTACATGCACCCTCCCCAGCTTGTGTCCGACCTTCGACGGACGT
 61 TrpThrArgGlyGluArgCysAspLeuGluAspArgAspArgSerGluLeuSerProLeu
 ACTGGACGCGGGGCGAACGTTGCGATCTGGAAGACAGGGACAGGTCCGAGCTCAGCCCGT
 TGACCTGCGCCCCGCTTGCAACGCTAGACCTTCTGTCCCTGTCCAGGCTCGAGTCGGGCA
 121 LeuLeuThrThrThrGlnTrpGlnValLeuProCysSerPheThrThrLeuProAlaLeu
 TACTGCTGACCACTACACAGTGGCAGGTCTCCCGTGTTCCTTCACAACCTTACCAGCCT
 ATGACGACTGGTGATGTGTCACCGTCCAGGAGGGCACAAGGAAGTGTGGGATGGTCCGGA
 181 SerThrGlyLeuIleHisLeuHisGlnAsnIleValAspValGlnTyrLeuTyrGlyVal
 TGTCACCGGCTCATCCACCTCCACCAGAACATTGTGGACGTGCAGTACTGTACGGGG
 ACAGGTGGCGGAGTAGGTGGAGGTGGTCTTGTAAACCTGCACGTCAATGAACATGCCCC
 241 GlySerSerIleAlaSerTrpAlaIleLysTrpGluTyrValValLeuLeuPheLeuLeu
 TGGGGTCAAGCATCGCTCCTGGGCCATTAAAGTGGGAGTACGTCTGTTCTCTGTTCTCTTC
 ACCCCAGTTCTGTAGCGCAGGACCCGGTAATTCACCTCATGCAGCAAGAGGACAAGGAAG
 301 LeuAlaAspAlaArgValCysSerCysLeuTrpMetMetLeuLeuIleSerGlnAlaGlu
 TGCTTGACAGCGCGCGCTCTGCTCCTGCTTGTGGATGATGCTACTCATATCCCAAGCGG
 ACGAACGTCTGCGCGCGCAGACGAGGACGAACACCTACTACGATGAGTATAGGGTTCGCCC
 361 AlaAlaLeuGluAsnLeuValIleLeuAsnAlaAlaSerLeuAlaGlyThrHisGlyLeu
 AGGCGGCTTTGGAGAACCCTCGTAATACTTAATGCAGCATCCCTGGCCGGGACGCACGGTTC
 TCCGCCGAAACCTCTTGGAGCATTATGAATTACGTCTGAGGGACCGGCCCTGCGTGCCAG
 421 ValSerPheLeuValPhePheCysPheAlaTrpTyrLeuLysGlyLysTrpValProGly
 TTGTATCCTTCCTCGTGTCTCTCTGCTTTGCATGGTATTTGAAGGGTAAGTGGGTGCCCC
 AACATAGGAAGGAGCACAAGAAGACGAACGTACCATAAACTTCCCATTACCCACGGGGC
 481 AlaValTyrThrPheTyrGlyMetTrpProLeuLeuLeuLeuLeuAlaLeuProGln
 GAGCGGTCTACACCTTCTACGGGATGTGGCCTCTCCTCCTGCTCCTGTTGGCGTTGCCCC
 CTCGCCAGATGTGGAAGATGCCCTACACCGGAGAGGAGGACGAGGACAACCGCAACGGGG
 541 ArgAlaTyrAlaLeuAspThrGluValAlaAlaSerCysGlyGlyValValLeuValGly
 AGCGGGCGTACGCGCTGGACACGGAGGTGGCCGCTGCTGTGGCGGTGTGTCTCTCGTCG
 TCGCCCGCATGCGCGACCTGTGCCTCCACCGGCGCAGCACACCGCCACAACAAGAGCAGC
 601 LeuMetAlaLeuThrLeuSerProTyrTyrLysArgTyrIleSerTrpCysLeuTrpTrp
 GGTGATGGCGCTGACTCTGTACCATATTACAAGCGCTATATCAGCTGGTGTGTGGT
 CCAACTACCGGACTGAGACAGTGGTATAATGTTCCGATATAGTCGACCACGAACACCA
 661 LeuGlnTyrPheLeuThrArgValGluAlaGlnLeuHisValTrpIleProProLeuAsn
 GGCTTCAGTATTTTCTGACCAGAGTGGGAAGCGCAACTGCACGTGTGGATTCCCCCCTCA
 CCGAAGTCATAAAAGACTGGTCTCACCTTCGCGTTGACGTGCACACCTAAGGGGGGAGT
 721 ValArgGlyGlyArgAspAlaValIleLeuLeuMetCysAlaValHisProThrLeuVal
 ACGTCCGAGGGGGGCGGACGCGCTACTTACTCATGTGTGCTGTACACCGACTCTGG
 TGCAGGCTCCCCCGCGCTGCGGCAGTAGAATGAGTACACACGACATGTGGGCTGAGACC
 781 PheAspIleThrLysLeuLeuLeuAlaValPheGlyProLeuTrpIleLeuGlnAlaSer
 TATTTGACATCACCAAATTGCTGCTGGCCGCTCTTCGGACCCCTTTGGATTCTTCAAGCCA
 ATAACTGTAGTGGTTTAAACGACGACCGGCAGAGCCTGGGGAAACCTAAGAAGTTCGGT
 841 LeuLeuLysValProTyrPheValArgValGlnGlyLeuLeuArgPheCysAlaLeuAla
 GTTTGCTTAAAGTACCCTACTTGTGCGCGTCCAAGGCCTTCTCCGGTTCTGCGGCTTAG
 CAAACGAATTCATGGGATGAAACACGCGCAGGTTCCGGAAGAGGCCAAGACGCGCAATC
 901 ArgLysMetIleGlyGlyHisTyrValGlnMetValIleIleLysLeuGlyAlaLeuThr
 CGCGGAAGATGATCGGAGGCCATTACGTGCAATGGTCATCATTAAGTTAGGGGCGCTTA
 GCGCCTTCTACTAGCCTCCGGTAATGCACGTTTACCAGTAGTAATTCATCCCCGCGAAT

961 GlyThrTyrValTyrAsnHisLeuThrProLeuArgAspTrpAlaHisAsnGlyLeuArg
 CTGGCACCTATGTTTATAACCATCTCACTCCTCTTCGGGACTGGGCGCACACGGCTTGC
 GACCGTGGATACAAATATTGGTAGAGTGAGGAGAAGCCCTGACCCGCTGTTGCCGAACG
 1021 AspLeuAlaValAlaValGluProValValPheSerGlnMetGluThrLysLeuIleThr
 GAGATCTGGCCGTGGCTGTAGAGCCAGTCGTCTTCTCCCAAATGGAGACCAAGCTCATCA
 CTCTAGACCGGCACCGACATCTCGGTCAGCAGAAGAGGGTTTACCTCTGGTTCGAGTAGT
 1081 TrpGlyAlaAspThrAlaAlaCysGlyAspIleIleAsnGlyLeuProValSerAlaArg
 CGTGGGGGGCAGATACCGCCGCGTGGGTGACATCATCAACGGCTTGCCTGTTCCGCCCC
 GCACCCCCGCTCTATGGCGGCGCACGCCACTGTAGTAGTTGCCGAACGGACAAAGGCGGG
 1141 ArgGlyArgGluIleLeuLeuGlyProAlaAspGlyMetValSerLysGlyTrpArgLeu
 GCAGGGCCCGGAGATACTGCTCGGGCCAGCCGATGGAATGGTCTCCNAGGGGTGGAGGT
 CGTCCCCGGCCCTCTATGACGAGCCCCGCTCGGCTACCTTACCAGAGGTTCCCCACCTCCA
 1201 LeuAlaProIleThrAlaTyrAlaGlnGlnThrArgGlyLeuLeuGlyCysIleIleThr
 TGCTGGCGCCCATCACGGCGTACGCCCCAGCAGACAAGGGGCTCTAGGGTGCATAATCA
 ACGACCGCGGGTAGTCCCGCATGCGGGTCTGTCTTCCCGGAGGATCCACGTATTAGT
 1261 SerLeuThrGlyArgAspLysAsnGlnValGluGlyGluValGlnIleValSerThrAla
 CCAGCCTAACTGGCCGGGACAAAACCAAGTGGAGGGTGAGGTCCAGATTGTGTCAACTG
 GGTCCGATTGACCGGCCCTGTTTTTGGTTTCACTCCACTCCAGGTCTAACACAGTTGAC
 1321 AlaGlnThrPheLeuAlaThrCysIleAsnGlyValCysTrpThrValTyrHisGlyAla
 CTGCCCAAACCTTCCTGGCAACGTGCATCAATGGGGTGTGCTGGACTGTCTACACGGGG
 GACGGGTTTGAAGGACCGTTGCACGTAGTTACCCACACGACCTGACAGATGGTGCCCC
 1381 GlyThrArgThrIleAlaSerProLysGlyProValIleGlnMetTyrThrAsnValAsp
 CCGGAACGAGGACCATCGCGTACCCCAAGGGTCTGTATCCAGATGTATACCAATGTAG
 GGCCTTGCTCCTGCTAGCGCAGTGGGTTCAGGACAGTAGGTCTACATATGGTTACATC
 1441 GlnAspLeuValGlyTrpProAlaProGlnGlySerArgSerLeuThrProCysThrCys
 ACCAAGACCTTGTGGGCTGGCCCGCTCCGCAAGGTAGCCGCTCATTGACACCCCTGCACCT
 TGGTCTCGAACACCCGACCGGGCGAGGCGTTCCATCGGCGAGTAACTGTGGGACGTGAA
 1501 GlySerSerAspLeuTyrLeuValThrArgHisAlaAspValIleProValArgArgArg
 GCGGCTCCTCGGACCTTTACCTGGTCACGAGGCAGCCGATGTCATTCCCGTGGCGCCGC
 CGCCGAGGACCTGGAAATGGACAGTGTCTCGTGGGCTACAGTAAGGGCACGCGGCCG
 1561 GlyAspSerArgGlySerLeuLeuSerProArgProIleSerTyrLeuLysGlySerSer
 GGGGTGATAGCAGGGGACGCTGCTGTGCCCCCGGCCATTTCCTACTTGAAAGGCTCCT
 CCCCCTATCTGCCCCGTCGGACGACAGCGGGGCGGGTAAAGGATGAACCTTCCGAGGA
 1621 GlyGlyProLeuLeuCysProAlaGlyHisAlaValGlyIlePheArgAlaAlaValCys
 CGGGGGTCCGCTGTTGTGCCCCGCGGGGACGCGGTGGGCATATTTAGGGCCGCGGTGT
 GCCCCCAGGCGACAACAGGGGCGCCCCGTGCGGCACCCGTATAAATCCCGCGCCACA
 1681 ThrArgGlyValAlaLysAlaValAspPheIleProValGluAsnLeuGluThrThrMet
 GCACCCGTGGAGTGGCTAAGGCGGTGGACTTTATCCCTGTGGAGAACCCTAGAGACAACCA
 CGTGGGCACCTCACCGATTCCGCCACCTGAAATAGGGACACCTCTTGATCTCTGTTGGT
 1741 ArgSerProValPheThrAspAsnSerSerProProValValProGlnSerPheGlnVal
 TGAGGTCCCCGGTGTTCACGGATAACTCCTCTCCACAGTAGTGCCCCAGAGCTTCCAGG
 ACTCCAGGGGCCACAAGTGCCTATTGAGGAGAGGTGGTTCATCACGGGGTCTCGAAGGTCC
 1801 AlaHisLeuHisAlaProThrGlySerGlyLysSerThrLysValProAlaAlaTyrAla
 TGGCTCACCTCCATGCTCCACAGGCAGCGGCAAAAGCACCAAGGTCCCGGCTGCATATG
 ACCGAGTGGAGGTACGAGGGTGTCCGTGCGCGTTTTCGTGGTTCCAGGGCCGACGTATAC
 1861 AlaGlnGlyTyrLysValLeuValLeuAsnProSerValAlaAlaThrLeuGlyPheGly
 CAGCTCAGGGCTATAAGGTGCTAGTACTCAACCCCTCTGTGCTGCAACACTGGGCTTTG
 GTCGAGTCCCGATATCCACGATCATGAGTTGGGGAGACAACGACGTTGTGACCCGAAAC
 AlaTyrMetSerLysAlaHisGlyIleAspProAsnIleArgThrGlyValArgThrIle

FIG. 32-2

1921 GTGCTTACATGTCCAAGGCTCATGGGATCGATCCTAACATCAGGACCGGGGTGAGAACA
 CACGAATGTACAGGTTCCGAGTACCCTAGCTAGGATTGTAGTCTGGCCCCACTCTTGTT
 ThrThrGlySerProIleThrTyrSerThrTyrGlyLysPheLeuAlaAspGlyGlyCys
 1981 TTACCACTGGCAGCCCCATCAGTACTCCACCTACGGCAAGTTCCTTGCCGACGGCGGGT
 AATGGTGACCGTCGGGGTAGTGATGAGGTGGATGCCGTTCAAGGAACGGCTGCCGCCCA
 SerGlyGlyAlaTyrAspIleIleIleCysAspGluCysHisSerThrAspAlaThrSer
 2041 GCTCGGGGGCGCTTATGACATAATAATTTGTGACGAGTGCCACTCCACGGATGCCACAT
 CGAGCCCCCGGAATACTGTATTATTAAACACTGCTCACGGTGAGGTGCCTACGGTGTA
 IleLeuGlyIleGlyThrValLeuAspGlnAlaGluThrAlaGlyAlaArgLeuValVal
 2101 CCATCTTGGGCATCGGCACTGTCTTGACCAAGCAGAGACTGCGGGGCGAGACTGGTTG
 GGTAGAACCCGTAGCCGTGACAGGAAGTGGTTCGTCTCTGACGCCCCGCTCTGACCAAC
 LeuAlaThrAlaThrProProGlySerValThrValProHisProAsnIleGluGluVal
 2161 TGCTCGCCACCGCCACCCCTCCGGGCTCCGTCAGTGTGCCCCATCCCAACATCGAGGAGG
 ACGAGCGGTGGCGGTGGGGAGGCCGAGGCAGTGACACGGGTAGGGTTGTAGCTCTCTCC
 AlaLeuSerThrThrGlyGluIleProPheTyrGlyLysAlaIleProLeuGluValIle
 2221 TTGCTCTGTCCACCGGAGAGATCCCTTTTACGGCAAGGCTATCCCCCTCGAAGTAA
 AACGAGACAGGTGGTGGCCTCTCTAGGGAAAAATGCCGTTCCGATAGGGGGAGCTTCATT
 LysGlyGlyArgHisLeuIlePheCysHisSerLysLysLysCysAspGluLeuAlaAla
 2281 TCAAGGGGGGAGACATCTCATCTTCTGTCAATTCAAAGAAGAAGTGCGACGAACTCGCCG
 AGTTCCCCCTCTGTAGAGTAGAAGACAGTAAGTTTCTTCTCACGCTGCTTGAGCGGC
 LysLeuValAlaLeuGlyIleAsnAlaValAlaTyrTyrArgGlyLeuAspValSerVal
 2341 CAAAGCTGTCGCAATTGGGCATCAATGCCGTGGCCTACTACCGCGGTCTTGACGTGTCCG
 GTTTCGACCAGCGTAACCCGTAGTTACGGCACCGGATGATGGCGCCAGAACTGCACAGGC
 IleProThrSerGlyAspValValValAlaThrAspAlaLeuMetThrGlyTyrThr
 2401 TCATCCCGACCGAGCGGATGTTGTCTGTCGTGGCAACCGATGCCCTCATGACCGGCTATA
 AGTAGGGCTGGTCCCGCTACAACAGCAGCACCGTTGGCTACGGGAGTACTGGCCGATAT
 GlyAspPheAspSerValIleAspCysAsnThrCysValThrGlnThrValAspPheSer
 2461 CCGGCGACTTCGACTCGGTGATAGACTGCAATACGTGTGTACCCAGACAGTCGATTCA
 GGCCGCTGAAGCTGAGCCACTATCTGACGTTATGCACACAGTGGGTCTGTACGCTAAAGT
 LeuAspProThrPheThrIleGluThrIleThrLeuProGlnAspAlaValSerArgThr
 2521 GCCTTGACCCTACCTTCACCATTTAGACAATCACGCTCCCCAGGATGCTGTCTCCCGCA
 CGGAAGTGGGATGGAAGTGGTAACCTCTGTTAGTGCGAGGGGGTCCACGACAGGGCGT
 GlnArgArgGlyArgThrGlyArgGlyLysProGlyIleTyrArgPheValAlaProGly
 2581 CTCAACGTCGGGCGAGGACTGGCAGGGGGAAGCCAGGCATCTACAGATTGTGGCACCGG
 GAGTTGCAGCCCCGCTCTGACCGTCCCCCTTCGGTCCGTAGATGTCTAAACACCGTGGCC
 GluArgProSerGlyMetPheAspSerSerValLeuCysGluCysTyrAspAlaGlyCys
 2641 GGGAGCGCCCCCTCCGGCATGTTGACTCGTCCGTCCTCTGTGAGTGCTATGACGCAGGCT
 CCTCGCGGGGAGGCCGTACAAGCTGAGCAGGCAGGAGACACTCACGATACTGCGTCCGA
 AlaTrpTyrGluLeuThrProAlaGluThrThrValArgLeuArgAlaTyrMetAsnThr
 2701 GTGCTTGATGAGCTCACGCCCCGAGACTACAGTTAGGCTACGAGCGTACATGAACA
 CACGAACCATACTCGAGTGCGGGCGGCTCTGATGTCAATCCGATGCTCGCATGTACTTGT
 ProGlyLeuProValCysGlnAspHisLeuGluPheTrpGluGlyValPheThrGlyLeu
 2761 CCCCCGGGCTTCCCGTGTGCCAGGACCATCTTGAATTTGGGAGGGCGTCTTACAGGCC
 GGGGCCCCGAAGGGCACACGGTCTGTAGAACTTAAACCCCTCCCGCAGAAATGTCCGG
 ThrHisIleAspAlaHisPheLeuSerGlnThrLysGlnSerGlyGluAsnLeuProTyr
 2821 TCACTCATATAGATGCCCACTTCTATCCAGACAAAGCAGAGTGGGAGAACCTTCCTT
 AGTGAGTATATCTACGGGTGAAAGATAGGGTCTGTTTCGTCTACCCCTCTTGAAGGAA
 LeuValAlaTyrGlnAlaThrValCysAlaArgAlaGlnAlaProProProSerTrpAsp
 2881 ACCTGGTAGCGTACCAAGCCACCGTGTGCGCTAGGGCTCAAGCCCTCCCCATCGTGGG
 TGGACCATCGCATGGTTCGGTGGCACACGCGATCCCGAGTTCGGGGAGGGGTAGCACCC

FIG. 32-3

2941 GlnMetTrpLysCysLeuIleArgLeuLysProThrLeuHisGlyProThrProLeuLeu
 ACCAGATGTGGAAGTGTGTTGATTGCGCTCAAGCCACCCCTCCATGGGCCAACACCCCTGC
 TGGTCTACACCTTCACAACTAAGCGGAGTTCGGGTGGGAGGTACCCGGTTGTGGGGACG
 3001 TyrArgLeuGlyAlaValGlnAsnGluIleThrLeuThrHisProValThrLysTyrIle
 TATACAGACTGGGCGCTGTTTCAAGATGAAATCACCCCTGACGCACCCAGTCACCAAATACA
 ATATGTCTGACCCGCGACAAGTCTTACTTTAGTGGGACTGCGTGGGTCTAGTGGTTTATGT
 3061 MetThrCysMetSerAlaAspLeuGluValValThrSerThrTrpValLeuValGlyGly
 TCATGACATGCATGTCGGCCGACCTGGAGGTCTGTCACGAGCACCTGGGTGCTCGTTGGCG
 AGTACTGTACGTACAGCCGGCTGGACCTCCAGCAGTGTCTCGTGGACCCACGAGCAACCCG
 3121 ValLeuAlaAlaLeuAlaAlaTyrCysLeuSerThrGlyCysValValIleValGlyArg
 GCGTCCTGGCTGCTTTGGCCGCGTATTGCTGTCAACAGGCTGCGTGGTTCATAGTGGGCA
 CGCAGGACCGACGAAACCGGCGCATAACGGACAGTTGTCCGACGCACCGATATCACCCGT
 3181 ValValLeuSerGlyLysProAlaIleIleProAspArgGluValLeuTyrArgGluPhe
 GGGTCGTCTTGTCCGGGAAGCCGGCAATCATACCTGACAGGGAAGTCTCTACCGAGAGT
 CCCAGCAGAACAGGCCCTTCGGCCGTAGTATGGACTGTCCCTTCAGGAGATGGCTCTCA
 3241 AspGluMetGluGluCysSerGlnHisLeuProTyrIleGluGlnGlyMetMetLeuAla
 TCGATGAGATGGAAGAGTGTCTCTCAGCACTTACCGTACATCGAGCAAGGGATGATGCTCG
 AGCTACTCTACCTTCTCAGCAGAGTCTGTAATGGCATGTAGCTCGTTCCCTACTACGAGC
 3301 GluGlnPheLysGlnLysAlaLeuGlyLeuLeuGlnThrAlaSerArgGlnAlaGluVal
 CCGAGCAGTTCAAGCAGAAGGCCCTCGGCCTCTCTGCAGACCGCGTCCCGTCAGGCAGAGG
 GGCTCGTCAAGTTCGTCTTCGGGGAGCCGGAGGACGTCTGGCGCAGGGCAGTCCGTCTCC
 3361 IleAlaProAlaValGlnThrAsnTrpGlnLysLeuGluThrPheTrpAlaLysHisMet
 TTATCGCCCTGCTGTCCAGACCAACTGGCAAACTCGAGACCTTCTGGGCGAAGCATA
 AATAGCGGGGACGACAGGTCTGGTTGACCGTTTTTGGAGCTCTGGAAGACCCGCTTCGTAT
 3421 TrpAsnPheIleSerGlyIleGlnTyrLeuAlaGlyLeuSerThrLeuProGlyAsnPro
 TGTGGAACCTTCATCAGTGGGATACAATACTTGGCGGGCTTGTCAACGCTGCCTGGTAACC
 ACACCTTGAAGTAGTCAACCTATGTTATGAACCGCCCGAACAGTTCCGACGGACCATGG
 3481 AlaIleAlaSerLeuMetAlaPheThrAlaAlaValThrSerProLeuThrThrSerGln
 CCGCCATTGCTTCATTGATGGCTTTTACAGCTGCTGTACCCAGCCCACTAACCAGTAGCC
 GCGGTAACGAAGTAACCTACCGAAATGTTCGACGACAGTGGTGGGTGATTGGTGATCGG
 3541 ThrLeuLeuPheAsnIleLeuGlyGlyTrpValAlaAlaGlnLeuAlaAlaProGlyAla
 AAACCTCTCTTCAACATATTGGGGGGGTGGGTGGCTGCCAGCTCGCCGCCCGGGGTG
 TTTGGGAGGAGAAGTTGTATAACCCCCCACCCACCGACGGGTCCGAGCGGGGGGCCAC
 3601 AlaThrAlaPheValGlyAlaGlyLeuAlaGlyAlaAlaIleGlySerValGlyLeuGly
 CCGCTACTGCCTTTGTGGGCGCTGGCTTAGCTGGCGCGGCCATCGGCAGTGTGGACTGG
 GCGGATGACGGAACACCCGCGACCGAATCGACCGCGCGGTAGCCGTACAACTGACC
 3661 LysValLeuIleAspIleLeuAlaGlyTyrGlyAlaGlyValAlaGlyAlaLeuValAla
 GGAAGGTCTCTATAGACATCCTTGCAAGGTATGGCGGGCGTGGCGGGAGCTCTTGTGG
 CCTTCCAGGAGTATCTGTAGGAACGTCCCATACCGCGCCCGCACCGCCCTCGAGAACACC
 3721 PheLysIleMetSerGlyGluValProSerThrGluAspLeuValAsnLeuLeuProAla
 CATTCAGATCATGAGCGGTGAGGTCCCCTCCACGGAGGACCTGGTCAATCTACTGCCCC
 GTAAGTTCTAGTACTCGCCACTCCAGGGGAGGTGCCTCCTGGACAGTTAGATGACGGGC
 3781 IleLeuSerProGlyAlaLeuValValGlyValValCysAlaAlaIleLeuArgArgHis
 CCATCCTCTCGCCCGGAGCCCTCGTAGTCGGCGTGGTCTGTGCAGCAATACTGCGCCGGC
 GGTAGGAGAGCGGGCTCGGGAGCATCAGCCGCACCGACACGTCTTATGACGCGGGCCG
 3841 ValGlyProGlyGluGlyAlaValGlnTrpMetAsnArgLeuIleAlaPheAlaSerArg
 ACGTTGGCCCCGGCGAGGGGCGAGTGCAGTGGATGAACCGGCTGATAGCCTTCGCCTCCC
 TGCAACCGGGCCCGCTCCCCCGTCACGTACCTACTTGGCCGACTATCGGAAGCGGAGGG
 GlyAsnHisValSerProThrHisTyrValProGluSerAspAlaAlaAlaArgValThr

FIG. 32-4

3901 GGGGGAACCATGTTTCCCCCAGCACTACGTGCCGGAGAGCGATGCAGCTGCCCCGGTCA
 CCCCCTTGGTACAAAGGGGGTGCCTGATGCACGGCCTCTCGCTACGTGACGGGCGCAGT
 AlaIleLeuSerSerLeuThrValThrGlnLeuLeuArgArgLeuHisGlnTrpIleSer
 3961 CTGCCATACTCAGCAGCCTCACTGTAAACCCAGCTCCTGAGGCGACTGCACCACTGGATAA
 GACGGTATGAGTCGTGCGAGTGACATTGGGTGCGAGGACTCCGCTGACGTGGTCACCTATT
 SerGluCysThrThrProCysSerGlySerTrpLeuArgAspIleTrpAspTrpIleCys
 4021 GCTCGGAGTGTACCACTCCATGCTCCGGTTCCTGGCTAAGGGACATCTGGGACTGGATAT
 CGAGCCTCACATGGTGAGGTACGAGGCCAAGGACCGATTCCCTGTAGACCCTGACCTATA
 GluValLeuSerAspPheLysThrTrpLeuLysAlaLysLeuMetProGlnLeuProGly
 4081 GCGAGGTGTTGAGCGACTTTAAGACCTGGCTAAAGGCTAAGCTCATGCCACAGCTGCCTG
 CGCTCCCAACTCGCTGAAATTCTGACCGGATTTTCGATTTCGAGTACGGTGTGACCGGAC
 IleProPheValSerCysGlnArgGlyTyrLysGlyValTrpArgValAspGlyIleMet
 4141 GGATCCCCCTTTGTGTCTGCTCCAGCGCGGGTATAAGGGGGTCTGGCGAGTGGACGGCATCA
 CCTAGGGGAAACACAGGACGGTCCGCGCCCATATTTCCCCAGACCGCTCACCTGCCGTAGT
 HisThrArgCysHisCysGlyAlaGluIleThrGlyHisValLysAsnGlyThrMetArg
 4201 TGCACACTCGCTGCCACTGTGGAGCTGAGATCACTGGACATGTCAAAAACGGGACGATGA
 ACGTGTGAGCGACGGTGACACCTCGACTCTAGTGACCTGTACAGTTTTCGCCCTGCTACT
 IleValGlyProArgThrCysArgAsnMetTrpSerGlyThrPheProIleAsnAlaTyr
 4261 GGATCGTCCGTCCTAGGACCTGCAGGAACATGTGGAGTGGGACCTTCCCCATTAAATGCCT
 CCTAGCAGCCAGGATCCTGGACGTCCTTGTACACCTCACCTGGAAGGGTAATTACGGA
 ThrThrGlyProCysThrProLeuProAlaProAsnTyrThrPheAlaLeuTrpArgVal
 4321 ACACCACGGGCCCCCTGTACCCCCCTTCCTGCGCCGAACCTACACGTTCCGCGCTATGGAGGG
 TGTGGTGGCCGGGACATGGGGGGAAGGACGCGGCTTGATGTGCAAGCGCGATACCTCCC
 SerAlaGluGluTyrValGluIleArgGlnValGlyAspPheHisTyrValThrGlyMet
 4381 TGTCTGCAGAGGAATATGTGGAGATAAGGCAGGTGGGGGACTTCCACTACGTGACGGGTA
 ACAGACGTCTCCTTATACACCTCTATTCCGTCCACCCCTGAAGGTGATGCACTGCCCAT
 ThrThrAspAsnLeuLysCysProCysGlnValProSerProGluPhePheThrGluLeu
 4441 TGACTACTGACAATCTCAAATGCCGTGCCAGGTCCCATCGCCGAATTTTTACAGAAT
 ACTGATGACTGTTAGAGTTTACGGGCACGGTCCAGGGTAGCGGGCTTAAAAAGTGTCTTA
 AspGlyValArgLeuHisArgPheAlaProProCysLysProLeuLeuArgGluGluVal
 4501 TGGACGGGGTGGCGCTACATAGGTTTGGCCCCCTGCAAGCCCTTGCTGCGGGAGGAGG
 ACCTGCCCCACGGGATGTATCCAACGCGGGGGACGTTCCGGAACGACGCCCTCCTCC
 SerPheArgValGlyLeuHisGluTyrProValGlySerGlnLeuProCysGluProGlu
 4561 TATCATTGAGTAGGACTCCACGAATACCCGGTAGGGTCGCAATTACCTTGCAGCCCCG
 ATAGTAAGTCTCATCCTGAGGTGCTTATGGGCCATCCACGGTTAATGGAACGCTCGGGC
 ProAspValAlaValLeuThrSerMetLeuThrAspProSerHisIleThrAlaGluAla
 4621 AACCGGACGTGGCCGTGTTGACGTCCATGCTCACTGATCCCTCCCATATAACAGCAGAGG
 TTGGCCTGCACCGGCACAACCTGCAGGTACGAGTGACTAGGGAGGGTATATTGCTGCTCC
 AlaGlyArgArgLeuAlaArgGlySerProProSerValAlaSerSerSerAlaSerGln
 4681 CGGCCGGGCGAAGGTTGGCGAGGGGATCACCCCCCTCTGTGGCCAGCTCCTCGGCTAGCC
 GCCGGCCCCCTTCCAACCGCTCCCTAGTGGGGGGAGACACCGGTCGAGGAGCCGATCGG
 LeuSerAlaProSerLeuLysAlaThrCysThrAlaAsnHisAspSerProAspAlaGlu
 4741 AGCTATCCGCTCCATCTCTCAAGGCAACTTGCACCGCTAACCATGACTCCCTGATGCTG
 TCGATAGGCGAGGTAGAGAGTTCCGTTGAACGTGGCGATTGGTACTGAGGGGACTACGAC
 LeuIleGluAlaAsnLeuLeuTrpArgGlnGluMetGlyGlyAsnIleThrArgValGlu
 4801 AGCTCATAGAGGCCAACCTCCTATGGAGGCAGGAGATGGGCGGCAACATCACCAGGGTTG
 TCGAGTATCTCCGGTTGGAGGATACCTCCGTCTCTACCCGCCGTTGTAGTGGTCCCAAC
 SerGluAsnLysValValIleLeuAspSerPheAspProLeuValAlaGluGluAspGlu
 4861 AGTCAGAAAACAAAGTGGTGATTCTGGACTCCTTCGATCCGCTTGTGGCGGAGGAGGACG
 TCAGTCTTTTGTTCACCACTAAGACCTGAGGAAGCTAGGCGAACACCGCCTCCTCCTGC

FIG. 32-5

4921 ArgGluIleSerValProAlaGluIleLeuArgLysSerArgArgPheAlaGlnAlaLeu
 AGCGGGAGATCTCCGTACCCGCGAGAAATCCTGCGGAAGTCTCGGAGATTCCGCCAGGCC
 TCGCCCTCTAGAGGCATGGGCGTCTTTAGGACGCCTTCAGAGCCTCTAAGCGGGTCCGGG
 4981 ProValTrpAlaArgProAspTyrAsnProProLeuValGluThrTrpLysLysProAsp
 TGCCCGTTTGGGCGCGGCCGACTATAACCCCGCTAGTGGAGACGTGGAAAAAGCCCG
 ACGGGCAAACCCGCGCGGCTGATATTGGGGGGCGATCACCTCTGCACCTTTTTTCGGGG
 5041 TyrGluProProValValHisGlyCysProLeuProProProLysSerProProValPro
 ACTACGAACCACCTGTGGTCCATGGCTGTCCGCTTCCACCTCCAAAGTCCCTCCTGTGC
 TGATGCTTGGTGGACACCAGGTACCGACAGGCGAAGGTGGAGGTTTCAGGGGAGGACAGC
 5101 ProProArgLysLysArgThrValValLeuThrGluSerThrLeuSerThrAlaLeuAla
 CTCCGCCTCGGAAGAAGCGGACGGTGGTCTCCTCACTGAATCAACCCTATCTACTGCCTTGG
 GAGGCGGAGCCTTCTTCGCTGCCACCAGGAGTGACTTAGTTGGGATAGATGACCGAACC
 5161 GluLeuAlaThrArgSerPheGlySerSerSerThrSerGlyIleThrGlyAspAsnThr
 CCGAGCTCGCCACCAGAAGCTTTGGCAGCTCCTCAACTCCGGCATTACGGGCGACAATA
 GGCTCGAGCGGTGGTCTTCGAAACCGTCGAGGAGTTGAAGGCCGTAATGCCCGCTGTTAT
 5221 ThrThrSerSerGluProAlaProSerGlyCysProProAspSerAspAlaGluSerTyr
 CGACAACATCCTCTGAGCCCGCCCTTCTGGCTGCCCCCGACTCCGACGCTGAGTCTCT
 GCTGTTGTAGGAGACTCGGGCGGGGAAGACCGACGGGGGGGCTGAGGCTCGCAGTCCAGGA
 5281 SerSerMetProProLeuGluGlyGluProGlyAspProAspLeuSerAspGlySerTrp
 ATTCCCTCCATGCCCGCCCTGGAGGGGGAGCCTGGGGATCCGGATCTTAGCGACGGGTCTAT
 TAAGGAGGTACGGGGGGACCTCCCCCTCGGACCCCTAGGCCTAGAATCGCTGCCAGTA
 5341 SerThrValSerSerGluAlaAsnAlaGluAspValValCysCysSerMetSerTyrSer
 GGTCAACGGTCTAGTAGTGAGGCCAACGCGGAGGATGTCTGTGTCTGCTCAATGTCTTACT
 CCAGTTGCCAGTCACTACTCCGGTTGCGCTCCTACAGCACACGACGAGTTACAGAATGA
 5401 TrpThrGlyAlaLeuValThrProCysAlaAlaGluGluGlnLysLeuProIleAsnAla
 CTGGACAGGCGCACTCGTCAACCCGTCGCGCGCGGAAGAACAGAACTGCCCATCAATG
 GAACCTGTCCGCGTGAGCAGTGGGGCACGCGGCGCTTCTTCTCTTTGACGGGTAGTTAC
 5461 LeuSerAsnSerLeuLeuArgHisHisAsnLeuValTyrSerThrThrSerArgSerAla
 CACTAAGCAACTCGTTGCTACGTCAACCAATTTGGTGTATTCCACCACCTCACGCAGTG
 GTGATTCTTGAGCAACGATGCAGTGGTGTAAACCACATAAGGTGGTGGAGTGCCTCAC
 5521 CysGlnArgGlnLysLysValThrPheAspArgLeuGlnValLeuAspSerHisTyrGln
 CTTGCCAAAGGCAGAAAGTCAATTTGACAGACTGCAAGTTCTGGACAGCCATTACC
 GAACGGTTTCCGTCTTCTTTCACTGTAAACTGTCTGACGTTCAAGACCTGTGGTAAATGG
 5581 AspValLeuLysGluValLysAlaAlaAlaSerLysValLysAlaAsnLeuLeuSerVal
 AGGACGTACTCAAGGAGGTTAAAGCAGCGCGCTCAAAGTGAAGGCTAACTTGCTATCCG
 TCCTGCATGAGTTCTTCAATTTCTGTCGCGCAGTTTTCACTTCCGATTGAACGATAGGC
 5641 GluGluAlaCysSerLeuThrProProHisSerAlaLysSerLysPheGlyTyrGlyAla
 TAGAGGAAGCTTGACGCTGACGCCCCCACTCAGCCAAATCCAAGTTTGGTTATGGGG
 ATCTCCTTCGAACGTCGGACTGCGGGGTGTGAGTCCGTTTAGGTTCAAACCAATACCCC
 5701 LysAspValArgCysHisAlaArgLysAlaValThrHisIleAsnSerValTrpLysAsp
 CAAAAGACGTCCGTTGCCATGCCAGAAAGGCCGTAAACCCACATCAACTCCGTGTGGAAAG
 GTTTTCTGCAGGCAACGGTACGGTCTTTCCGGCATTGGGTGTAGTTGAGGCACACCTTTC
 5761 LeuLeuGluAspAsnValThrProIleAspThrThrIleMetAlaLysAsnGluValPhe
 ACCTTCTGGAAGACAATGTAAACCAATAGACACTACCATCATGGCTAAGAACGAGGTTT
 TGAAGACCTTCTGTATACATTGTGGTTATCTGTGATGGTAGTACCGATTCTTGCTCCAAA
 5821 CysValGlnProGluLysGlyGlyArgLysProAlaArgLeuIleValPheProAspLeu
 TCTGCGTTTCAGCCTGAGAAGGGGGGTCTGAAGCCAGCTCGTCTCATCGTGTTCCTCGATC
 AGACSCAAGTCGGACTCTTCCCCCAGCATTCCGTCGAGCAGAGTAGCACAAGGGGCTAG
 GlyValArgValCysGluLysMetAlaLeuTyrAspValValThrLysLeuProLeuAla

FIG. 32-6

5881 TGGGCGTGCGCGTGTGCGAAAAGATGGCTTTGTACGACGTGGTTACAAAGCTCCCTTGG
 ACCCGCACGCGCACACGCTTTTCTACCGAAACATGCTGCACCAATGTTTCGAGGGGAACC
 ValMetGlySerSerTyrGlyPheGlnTyrSerProGlyGlnArgValGluPheLeuVal
 5941 CCGTGATGGGAAGCTCTACGGATTCCAATACTCACCAGGACAGCGGGTTGAATTCCTCG
 GGCCTACCTTCGAGGATGCCTAAGGTTATGAGTGGTCTGTCGCCCCAACTTAAGGAGC
 GlnAlaTrpLysSerLysLysThrProMetGlyPheSerTyrAspThrArgCysPheAsp
 6001 TGCAAGCGTGGAAGTCCAAGAAAACCCCAATGGGGTTCTCGTATGATAACCCGCTGCTTTG
 ACGTTCGCACCTCAGGTTCTTTTGGGGTTACCCCAAGAGCATACTATGGGCGACGAAAC
 SerThrValThrGluSerAspIleArgThrGluGluAlaIleTyrGlnCysCysAspLeu
 6061 ACTCCACAGTCACTGAGAGCGACATCCGTACGGAGGAGGCAATCTACCAATGTTGTGACC
 TGAGGTGTCAGTCACTCTCGCTGTAGGCATGCCTCCTCCGTTAGATGGTTACAACACTGG
 AspProGlnAlaArgValAlaIleLysSerLeuThrGluArgLeuTyrValGlyGlyPro
 6121 TCGACCCCAAGCCCGCGTGGCCATCAAGTCCCTCACCAGAGAGGCTTTATGTTGGGGGCC
 AGCTGGGGGTTCCGGCGCACCGGTAGTTCAGGGAGTGGCTCTCCGAAATACAACCCCGG
 LeuThrAsnSerArgGlyGluAsnCysGlyTyrArgArgCysArgAlaSerGlyValLeu
 6181 CTCTTACCAATTCAAGGGGGGAGAACTGCGGCTATCGCAGGTGCCGCGAGCGCGTAC
 GAGAATGGTTAAGTTCCCCCTCTTGACGCCGATAGCGTCCACGGCGCGCTCGCCGCATG
 ThrThrSerCysGlyAsnThrLeuThrCysTyrIleLysAlaArgAlaAlaCysArgAla
 6241 TGACAACCTAGCTGTGGTAACACCCCTCACTTGCTACATCAAGGCCGGCAGCCTGTCGAG
 ACTGTTGATCGACACCATGTGGGAGTGAACGATGTAGTTCCGGGCCCGTCCGGACAGCTC
 AlaGlyLeuGlnAspCysThrMetLeuValCysGlyAspAspLeuValValIleCysGlu
 6301 CCGCAGGGCTCCAGGACTGCACCATGCTCGTGTGTGGCGAGCTTAGTCTGTTATCTGTG
 GCGCTCCCGAGGTCTGACGTGGTACGAGCACACACCGCTGCTGAATCAGCAATAGACAC
 SerAlaGlyValGlnGluAspAlaAlaSerLeuArgAlaPheThrGluAlaMetThrArg
 6361 AAAGCGCGGGGTCCAGGAGGACGCGCGAGCCTGAGAGCCTTCACGGAGGCTATGACCA
 TTTCCGCGCCCCAGGTCTCTGCGCGCTCGGACTCTCGGAAGTGCCTCCGATACTGGT
 TyrSerAlaProProGlyAspProProGlnProGluTyrAspLeuGluLeuIleThrSer
 6421 GGTACTCCGCCCCCTGGGGACCCCCACAACAGAAATACGACTTGGAGCTCATAACAT
 CCATGAGGCGGGGGGACCCCTGGGGGTGTTGGTCTTATGCTGAACCTCGAGTATTGTA
 CysSerSerAsnValSerValAlaHisAspGlyAlaGlyLysArgValTyrTyrLeuThr
 6481 CATGCTCCTCCAACGTGTCACTCGCCACGACGGCGCTGGAAGAGGGTCTACTACCTCA
 GTACGAGGAGGTTGCACAGTCAGCGGGTGTGCGCGACCTTTCTCCAGATGATGGAGT
 ArgAspProThrThrProLeuAlaArgAlaAlaTrpGluThrAlaArgHisThrProVal
 6541 CCCGTGACCCCTACAACCCCTCGCGAGAGCTGCGTGGGAGACAGCAAGACACTCCAG
 GGGCACTGGGATGTTGGGGGAGCGCTCTCGACGCACCTCTGTGCTGTGTGAGGTC
 AsnSerTrpLeuGlyAsnIleIleMetPheAlaProThrLeuTrpAlaArgMetIleLeu
 6601 TCAATTCCTGGCTAGGCAACATAATCATGTTTGGCCCCCACTGTGGGCGAGGATGATAC
 AGTTAAGGACCGATCCGTTGTATTAGTACAAACGGGGGTGTGACACCCGCTCCTACTATG
 MetThrHisPhePheSerValLeuIleAlaArgAspGlnLeuGluGlnAlaLeuAspCys
 6661 TGATGACCCATTCTTTAGCGTCTTATAGCCAGGGACCGCTTGAACAGGCCCTCGATT
 ACTACTGGGTAAAGAAATCGCAGGAATATCGGTCCCTGGTCCAACCTGTCCGGGAGCTAA
 GluIleTyrGlyAlaCysTyrSerIleGluProLeuAspLeuProProIleIleGlnArg
 6721 GCGAGATCTACGGGGCTGCTACTCCATAGAACCACTTGATCTACCTCCATCATTCAA
 CGCTCTAGATGCCCCGACGATGAGGTATCTTGGTGAACCTAGATGGAGGTTAGTAAGTTT
 Leu
 6781 GACTC
 CTGAG

FIG. 32-7

FIG. 33

Legende

Bahn- nummer	Schimpanse Referenz- nummer	Art der Infektion	Proben- datum (Tage) (0=Tag der Inokulation)	ALT (Alanin- Aminotransferase)- Spiegel in den Seren (mμ/ml)
1	1	NANB	0	
2	1	NANB	76	9
3	1	NANB	118	71
4	1	NANB	154	19
5	2			N/A
6	2	NANB	0	
7	2	NANB	21	5
8	2	NANB	73	52
9	2	NANB	138	13
10	3			N/A
11	3	NANB	0	
12	3	NANB	43	8
13	3	NANB	53	205
14	3	NANB	159	14
15	4	NANB	-3	6
16	4	NANB	55	11
17	4	NANB	83	132
18	4	NANB	140	N/A
19	5			N/A
20	5	HAV	0	
21	5	HAV	25	4
22	5	HAV	40	147
23	5	HAV	268	18
24	6			5
25	6	HAV	-8	
26	6	HAV	15	N/A
27	6	HAV	41	106
28	6	HAV	129	10
29	7			N/A
30	7	HAV	0	
31	7	HAV	22	7
32	7	HAV	115	83
33	7	HAV	139	5
34	8			N/A
35	8	HAV	0	
36	8	HAV	26	15
37	8	HAV	74	130
38	8	HAV	205	8
39	9			5
40	9	HBV	-290	
41	9	HBV	379	N/A
42	9	HBV	435	9
43	10			6
44	10	HBV	0	
45	10	HBV	111-118 (Sammelprobe)	8
46	10	HBV	205	96-156 (Sammelprobe)
47	10	HBV	240	9
48	11			13
49	11	HBV	0	
50	11	HBV	28-56 (Sammelprobe)	11
51	11	HBV	169	8-100 (Sammelprobe)
52	11	HBV	223	9
53	11			10

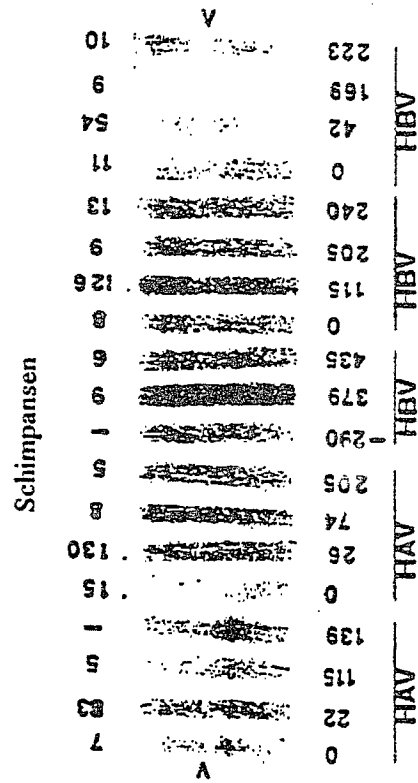
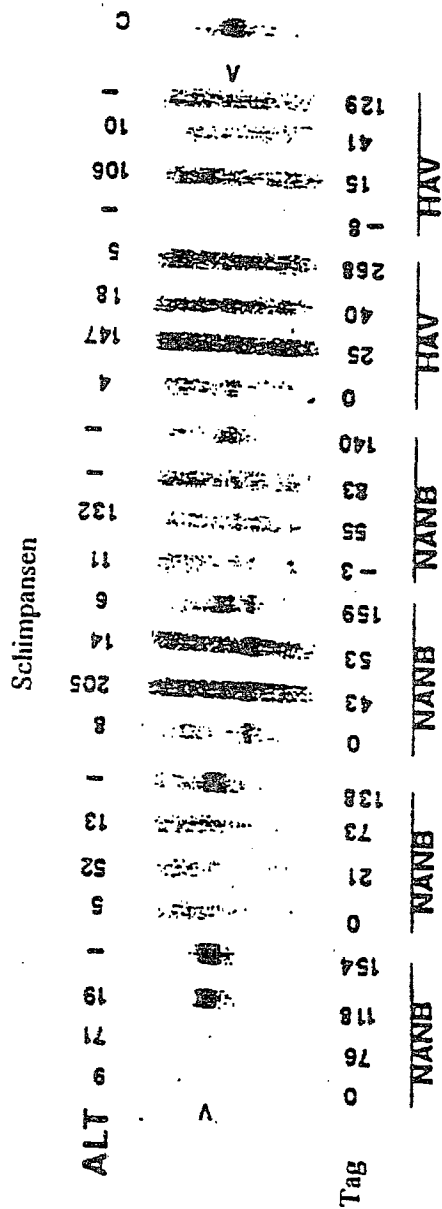


FIG. 34 Legende

Bahn- nummer	Patient Referenz- nummer	Diagnose	ALT-Spiegel (mU/ml)
1	1 ¹		
2	1 ¹	NANB	1354
3	2 ¹	NANB	31
4	2 ¹	NANB	14
5	2 ¹	NANB	79
6	3 ¹	NANB	26
7	3 ¹	NANB	78
8	3 ¹	NANB	87
9	4 ¹	NANB	25
10	4 ¹	NANB	60
11	5 ¹	NANB	13
12	5 ¹	NANB	298
13	6 ¹	NANB	101
14	6 ¹	NANB	474
15	7 ¹	NANB	318
16	7 ¹	NANB	20
17	8 ¹	NANB	163
18	8 ¹	NANB	44
19	9	NANB	50
20	10	NANB	N/A
21	11	NANB	N/A
22		NANB	N/A
23	12	Normal	N/A
24	13	Normal	N/A
	14	Normal	N/A
26	30174	Normal	N/A
27	30105	Normal	N/A
28	30072	Normal	N/A
29	30026	Normal	N/A
30	30146	Normal	N/A
31	30250	Normal	N/A
32	30071	Normal	N/A
33	15	Normal	N/A
34	16	AkutNAV	N/A
35	17	AkutNAV	N/A
36	18	AkutNAV	N/A
37	48088	AkutNAV	N/A
38	47288	AkutNAV	N/A
39	47050	AkutNAV	N/A
40	46997	AkutNAV	N/A
41	19	AkutNAV	N/A
42	20	Konvaleszent HBV (anti-HBSag+ve;	N/A
43	21	anti-HBCag+ve)	N/A
44	22	(anti-HBSag+ve;	N/A
45	23	anti-HBCag+ve)	N/A
46	24	(anti-HBSag+ve;	N/A
47	25	anti-HBCag+ve)	N/A
48	26	(anti-HBSag+ve;	N/A
49	27	anti-HBCag+ve)	N/A

¹ Aufeinanderfolgende Serumproben wurden von diesen Patienten getestet

FIG. 34-1

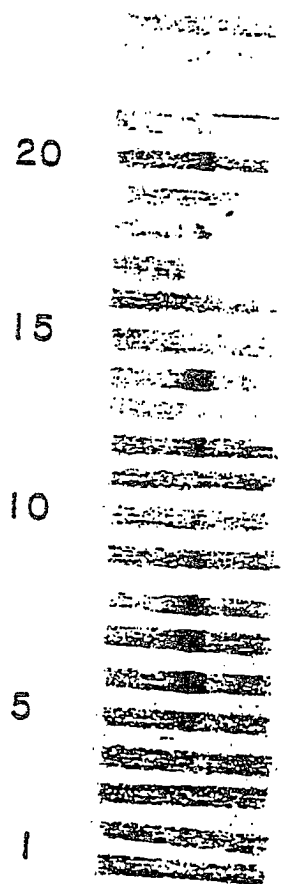


FIG. 34-2

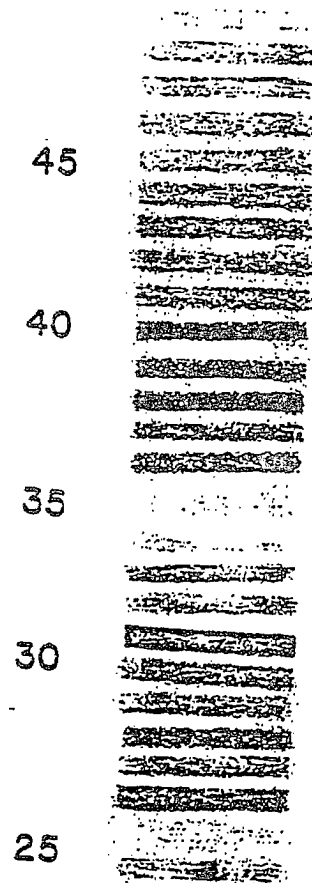


FIG. 35

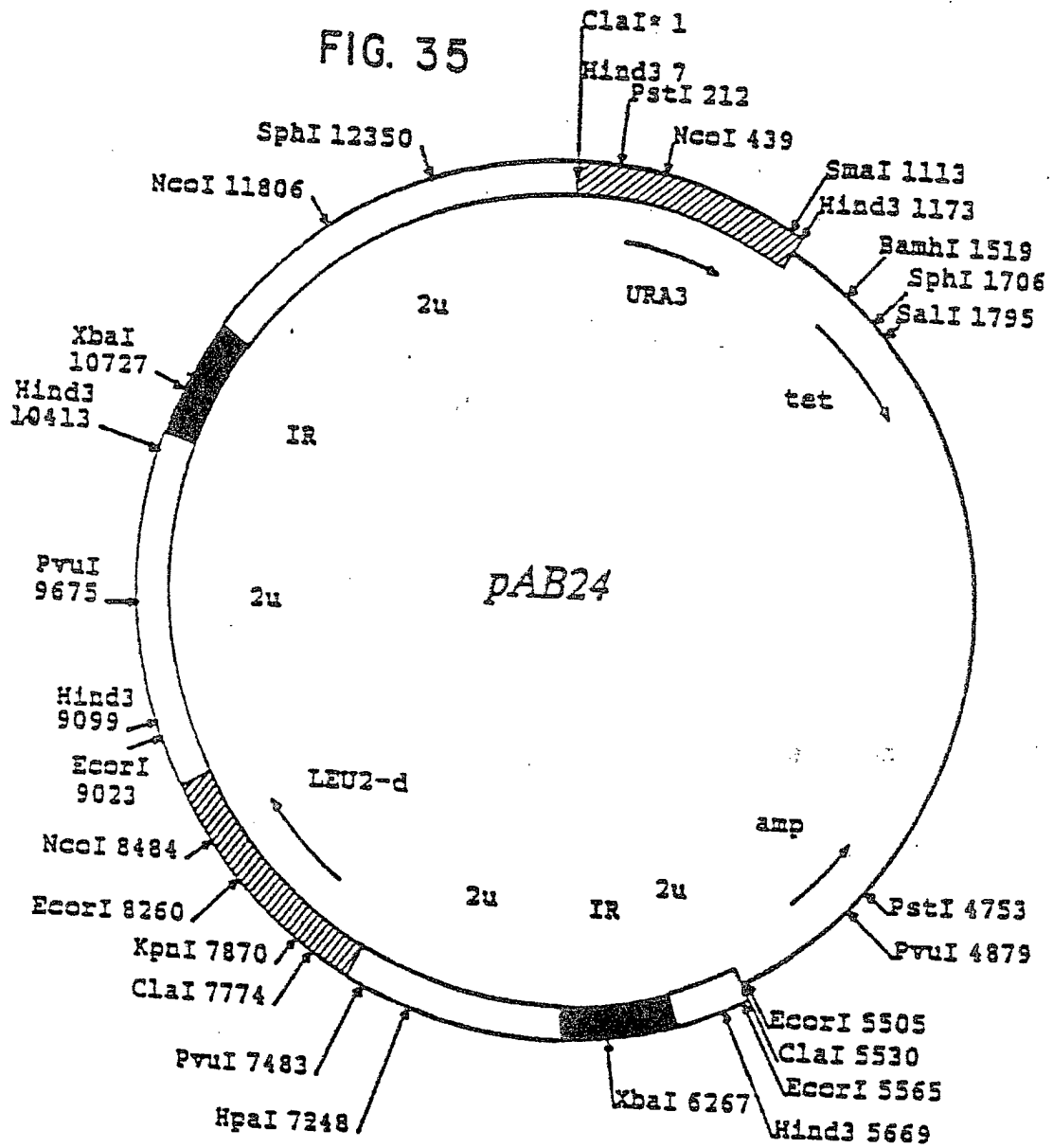


FIG. 36-1 COOH-Terminus des SOD-C100-Fusionspolypeptids

[illegible]

CGACCGCGGCGGTAGCCGTCACAACCTGACCCCTTCCAGGAGTATCTGTAGGAACGTCCC

901 TyrGlyAlaGlyValAlaGlyAlaLeuValAlaPheLysIleMetSerGlyGluValPro
TATGGCGCGGGCGTGGCGGGAGCTCTTGTGGCATTCAAGATCATGAGCGGTGAGGTCCCC
ATACCGCGCCCGCACCGCCCTCGAGAACACCGTAAGTTCTAGTACTCGCCACTCCAGCGG

961 SerThrGluAspLeuValAsnLeuLeuProAlaIleLeuSerProGlyAlaLeuValVal
TCCACGGAGGACCTGGTCAATCTACTGCCCGCCATCCTCTCGCCCGGAGCCCTCGTAGTC
AGGTGCCTCCTGGACCAAGTTAGATGACGGGCGGTAGGAGAGCGGGCCCTCGGGAGCATCAG

1021 GlyValValCysAlaAlaIleLeuArgArgHisValGlyProGlyGluGlyAlaValGln
GGCGTGGTCTGTGCAGCAATACTGCGCCGGCACGTTGGCCCGGGCGAGGGGGCAGTGCAAG
CCGCACCAGACACGTCGTTATGACGCGGCGGTGCAACCGGGCCCGCTCCCCCGTCACGTC

~

1081 TrpMetAsnArgLeuIleAlaPheAlaSerArgGlyAsnHisValSerProValHisHis
TGGATGAACCGGCTGATAGCCTTCGCCTCCCGGGGAACCATGTTTCCCCAGTCCATCAT
ACCTACTTGGCCGACTATCGGAAGCGGAGGGCCCCCTTGGTACAAAGGGGTCAGGTAGTA

-----}

1141 LysArgOP
AAGCGTTGACGCTCCCTACGGGTGGACTGTGGAGAGACAGGGCACTGCTAAGGCCCAAT
TTCGCAACTGCGAGGGATGCCACCTGACACCTCTCTGTCCCGTGACGATTCCGGGTTTA

1201 CTCAGCCATGTCATCGAGGGGTACAATCCGTATGGCCAACTAGCGCGTACGTAAAGTC
GAGTCGGTACGTAGCTCCCCATGTTAGGCATACCGGTTGTTGATCGCGCATGCATTTTCAG

1261 TCCTTTCTCGATGGTCCATACCTTAGATGCGTTAGCATTAATCCGAATTC
AGGAAAGAGCTACCAGGTATGGAATCTACGCAATCGTAATTAGGCTTAAG

FIG. 36-2



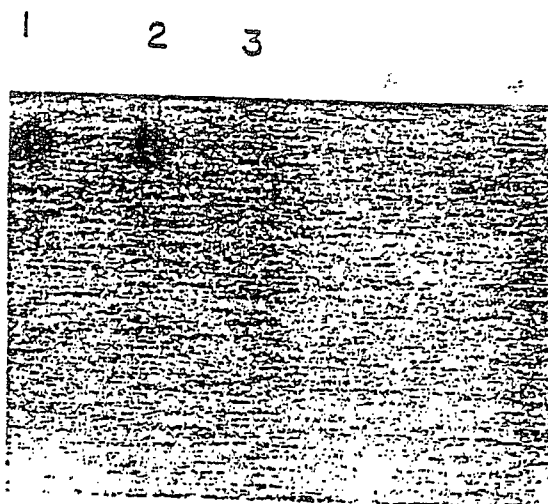
FIG. 37 a



FIG. 37 b

A

FIG. 39



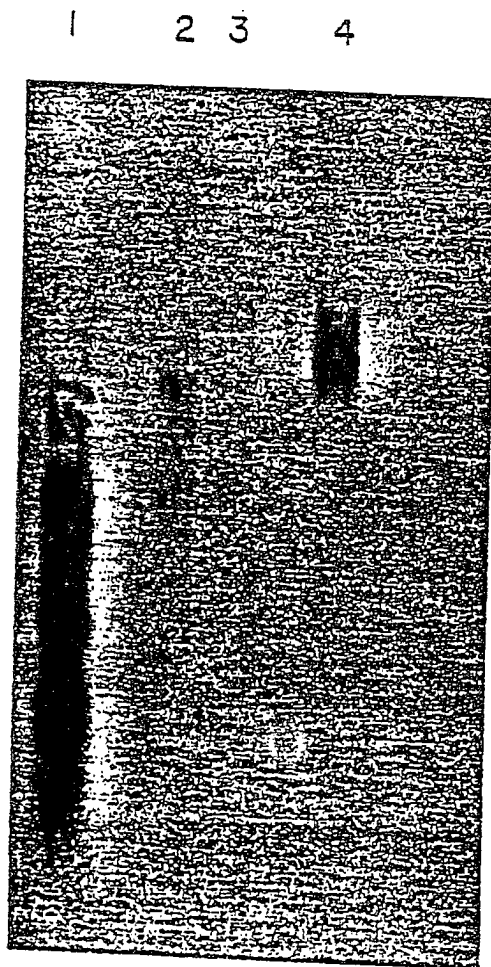


FIG. 38

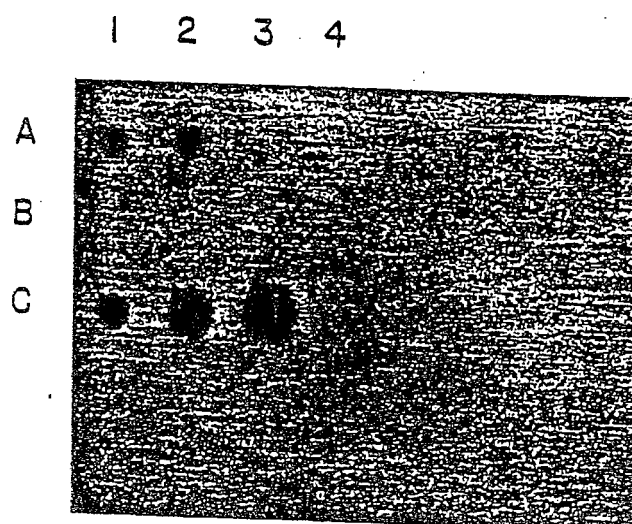


FIG. 40

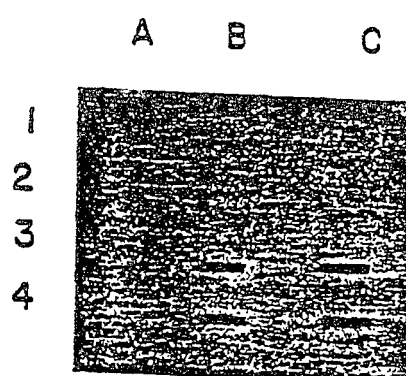


FIG. 41a

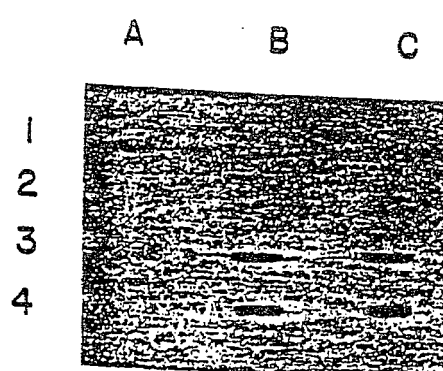


FIG. 41b

FIG. 41-1

Homologie zwischen dem HCV-Polypeptid, codiert vom kombinierten ORF
der Clone 14i bis 39c), und dem Nicht-Strukturprotein des Dengue-
Flavivirus (MNWVD1)

HCV	10	20	30	40	50
	EYVILLETLLADARVCSCLWMLLISQAEAALENLVILNAASLAGTHGLVSFLVFFCFE				
MNWVD1	130	140	150	160	170
	AVSEVTLITGNMSFRDLGRVMVMVGATMTDDIGMGVTYLALLAAFKVRPTFAAGLLLRKL				
HCV	60	70	80	90	100
	WYLKGGKWPFGAVYTFYGMWFLILLALLALPQRAYALDTEVAASCGGVVLVGLMALTSPYY				
MNWVD1	190	200	210	220	230
	TSKELMMTTIGIVLLSQSTIPETILELTDALALGMVLMVRKMEKYQLAVTIMAILCVF				
HCV	120	130	140	150	160
	KRYISWCLWWLQYFLTRVEAQLHVWIFPLNVRGGRDAVILLMCAVHPTLVFDITKLLAV				
MNWVD1	250	260	270	280	290
	NAVILQNAWKVSCITLAVVSVSPLELTSSQOKADWIPIALTIKGLNPTAIF-LTTLSTRTN				
HCV	180	190	200	210	220
	FGPLWILQASLLKVPYF-VRVQGLLR-CAIARKMIGGHYVQMVIKLGALTGTYYVYNHL				
MNWVD1	300	310	320	330	340
	KKRSWPLNEALMAVGMVSILASSLLKNDIPMTGPIVAGGLITVCYV-LTGRSADLELEPA				
HCV	240	250	260	270	280
	TPLRDWAHNGLRDLAVAVEPVVFSQMETKLITWGADTAACGDIINGLPVSARRGREILLG				
MNWVD1	360	370	380	390	400
	ADV-K-WEDQAEISGSSPILSITISE-DGSMSEIKNEEEQTLTILIRTGILLVISG-LFP				
HCV	300	310	320	330	340
	PADGMVSKGWRLLAPITAYAQQTRGLLGCIITSLTGRDKNOVEGEVOIVSTAAQTFLATC				
MNWVD1	420	430	440	450	460
	VSIPITAAAWYLWEVKKQKQAGVLWDVPSPPPVKGAELEDGAYRIKQKGLGYSQIGAGVY				
HCV	360	370	380	390	400
	INGVCWTYYHGAGTRTIIASPKGPVIQMYTNVDQDLV-GWPAPOGSRSLTPCTCGSSD				
MNWVD1	480	490	500	510	520
	KEGTFHTMWHVTRGAVLMHKGKRIEPSWADVKKDLVSCGGGWKLEGEWKEGEEVQVLALE				
HCV	420	430	440	450	460
	LYLVTRHADVIFVRRRGDSRGSLLSPRPISYLKGSSGGPILCPAGHAVGIFRAAVCTRGV				
MNWVD1	540	550	560	570	580
	PGKNPRAVQTKPGLFKN-AGTIGAVSLDFSPGTSGSPIIDKKGVVGLYNGGVVTRSG				
HCV	480	490	500	510	520
	AKAVDFIPVENLETTMRSPVFTDNSSPPVVPQSFOVAHLHAPTGSCKS-TKVPAAAYAAQ				
MNWVD1	600	610	620	630	640
	AYVSAIAQTEK-SIEDNPEIEDDIFRK-RKLTIIDLHPGAGKTKRYLPATVRGAIKR				
	540	550	560	570	580

123/136

FIG. 43

Verteilung der Zufallsproben

C100-3 Ag ELISA Preclinical Kit

416ng C100/Vertiefung, 2 h, 37°C, 20µl Probe

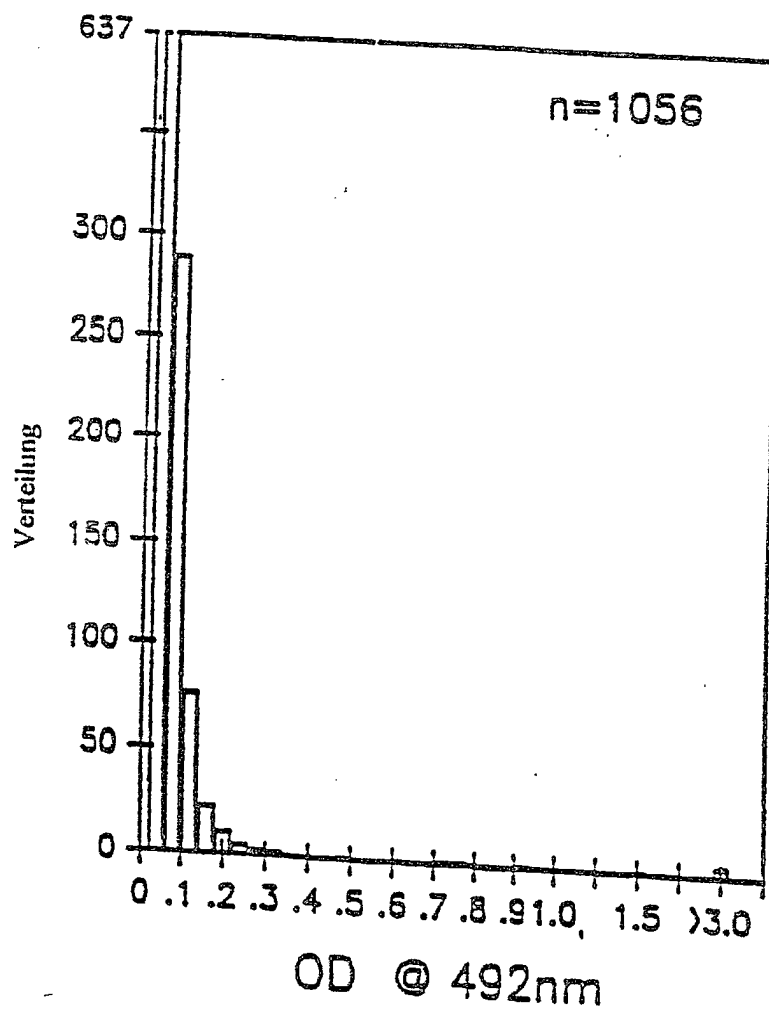


FIG. 44

Verteilung der OD-Werte für
Zufallsproben von Blutspendern, die mit zwei
ELISA-Konfigurationen getestet wurden
 C100-3Ag ELISA MoAB vs Polyclonal

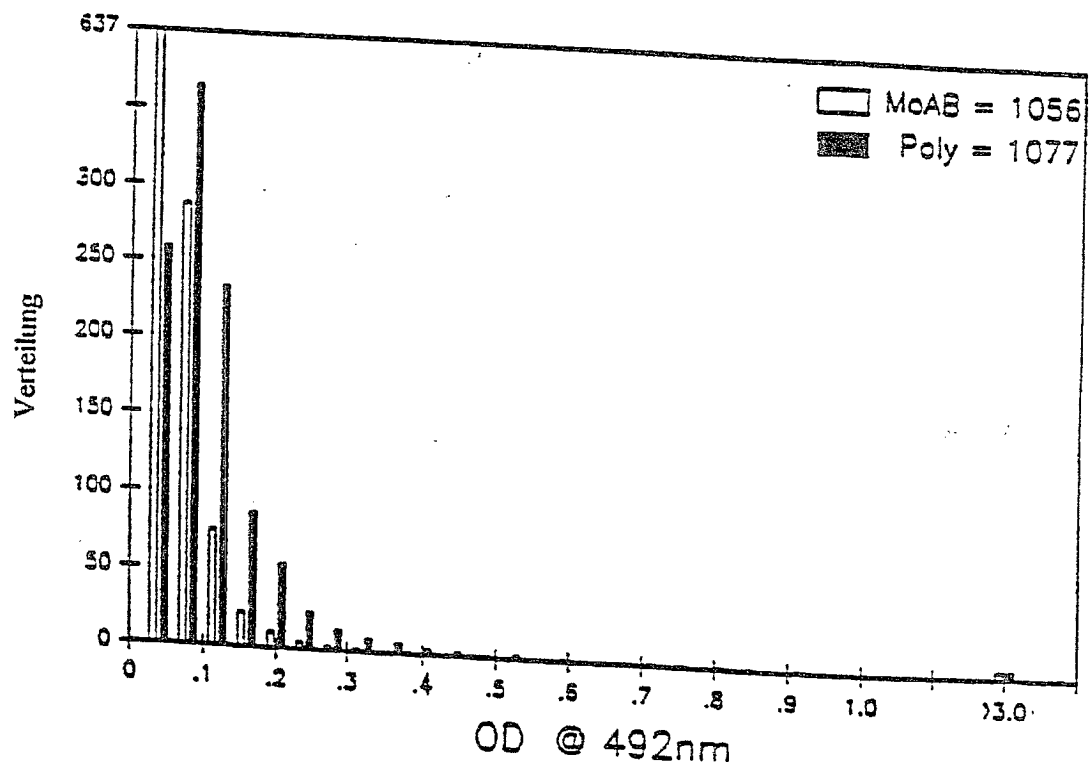


FIG. 45		
Name	Gemeinsame Sequenz	Variable Sequenz
5'-3-1	AAGCTTGATCGAATTC	
-2		CGATCTTGC
-3		CGATCCTGC
-4		CGATCATGC
-5		CGATCGTGC
-6		CGAAGTTGC
-7		CGAAGCTGC
-8		
-9		AGATCTTGC
-10		AGATCCTGC
-11		AGATCATGC
-12		AGATCGTGC
-13		AGAAGTTGC
-14		AGAAGCTGC
-15		
-16		CGATCTTGT
-17		CGATCCTGT
-18		CGATCATGT
-19		CGATCGTGT
-20		CGAAGTTGT
-21		CGAAGCTGT
-22		
-23		AGATCTTGT
-24		AGATCCTGT
-25		AGATCATGT
-26		AGATCGTGT
-27		AGAAGTTGT
-28		AGAAGCTGT
-29		
-30		CGCTCTTGC
-31		CGCTCCTGC
-32		CGCTCATGC
-33		CGCTCGTGC
-34		CGCAGTTGC
-35		CGCAGCTGC
-36		
		CGCTCTTGT
		CGCTCCTGT
		CGCTCATGT
		CGCTCGTGT
		CGCAGTTGT
		CGCAGCTGT

FIG. 46-1 Translation der DNA k9-1

1 GlyCysProGluArgLeuAlaSerCysArgProLeuThrAspPheAspGlnGlyTrpGly
CAGGCTGTCTCTGAGAGGCTAGCCAGCTGCCGACCCCTTACCGATTTTGACCAGGGCTGGG
GTCCGACAGGACTCTCCGATCGGTCGACGGCTGGGGAATGGCTAAAACTGGTCCCGACCC

61 ProIleSerTyrAlaAsnGlySerGlyProAspGlnArgProTyrCysTrpHisTyrPro
GCCCTATCAGTTATGCCAACGGAAGCGGCCCGACACGCGCCCTACTGCTGGCACTACC
CGGGATAGTCAATACGGTTGCCTTCGCCGGGGCTGGTTCGCGGGGATGACGACCGTGATGG

121 ProLysProCysGlyIleValProAlaLysSerValCysGlyProValTyrCysPheThr
CCCCAAAACCTTCCGGTATTGTGCCCCGCGAAGAGTGTGTGTGGTCCGGTATATTGCTTCA
GGGGTTTTTGAACGCCATAACACGGGCGCTTCTCACACACACCAGGCCATATAACGAGT

181 ProSerProValValValGlyThrThrAspArgSerGlyAlaProThrTyrSerTrpGly
CTCCACGCCCCGTGGTGGTGGGAACGACCGACAGGTCCGGGCGCGCCACCTACAGCTGGG
GAGGGTCGGGGCACCACACCCCTTGTCTGGCTGTCCAGCCCCGCGGGGTGGATGTCCGACCC

241 GluAsnAspThrAspValPheValLeuAsnAsnThrArgProProLeuGlyAsnTrpPhe
GTGAAATGATACGGACGTCTTCGTCTTAACAATACCAGGCCACCGCTGGGCAATTGGT
CACTTTTACTATGCCTGCAGAAGCAGGAATTGTTATGGTCCGGTGGCGACCCGTTAACCA

301 GlyCysThrTrpMetAsnSerThrGlyPheThrLysValCysGlyAlaProProCysVal
TCGGTTGTACCTGGATGAACCTCACTGATTACCAAAGTGTGCGGAGCGCCTCCTTGTG
AGCCACATGGACCTACTTGAGTTGACCTAAGTGGTTTCACACGCCCTCGCGGAGGAACAC

361 IleGlyGlyAlaGlyAsnAsnThrLeuHisCysProThrAspCysPheArgLysHisPro
TCATCGGAGGGGCGGGCAACAACACCCCTGCACTGCCCACTGATTGCTTCCGCAAGCATC
AGTAGCCTCCCCGCGCTTGTCTGGGACGTGACGGGGTGACTAACGAAGGCGTTCGTAG

421 AspAlaThrTyrSerArgCysGlySerGlyProTrpIleThrProArgCysLeuValAsp
CGGACGCCACATACTCTCGGTGCGGCTCCGGTCCCTGGATCACACCCAGGTGCCTGGTTCG
GCCTGCGGTGTATGAGAGCCACGCCGAGGCCAGGGACCTAGTGTGGGTCCACGGACCAGC

481 TyrProTyrArgLeuTrpHisTyrProCysThrIleAsnTyrThrIlePheLysIleArg
ACTACCCGTATAGGCTTTGGCATTATCCTTGTACCATCACTACATATATTTAAATCA
TGATGGGCATATCCGAAACCGTAATAGGAACATGGTAGTTGATGTATATAAATTTTAGT

541 MetTyrValGlyGlyValGluHisArgLeuGluAlaAlaCysAsnTrpThrArgGlyGlu
GGATGTACGTGGGAGGGGTCGAGCACAGGCTGGGAAGCTGCCTGCAACTGGACGCGGGGCG
CCTACATGCACCCCTCCCCAGCTCGTGTCCGACCTTCGACGGACGTTGACCTGCGCCCCCG

601 ArgCysAspLeuGluAspArgAspArgSerGluLeuSerProLeuLeuLeuThrThrThr
AACGTTGCGATCTGGAAGATAGGGACAGGTCCGAGCTCAGCCCGTTACTGCTGACCACTA
TTGCAACGCTAGACCTTCTATCCCTGTCCAGGCTCGAGTCCGGGCAATGACGACTGGTGAT

661 GlnTrpGlnValLeuProCysSerPheThrThrLeuProAlaLeuSerThrGlyLeuIle
CACAGTGGCAGGTCTCTCCCGTGTTCCTTCACAACCCCTGCCAGCCTTGTCCACCGGCCCTCA
GTGTACCCGTCCAGGAGGGGCACAAGGAAGTGTGGGACGGTCCGAACAGGTGGCCCGAGT

721 HisLeuHisGlnAsnIleValAlaAspValGlnTyrLeuTyrGlyValGlySerSerIleAla
TCCACCTCCACCAGAACATTGTGGACGTGCAGTACTTGTACGGGGTGGGGTCAAGCATCG
AGGTGGAGGTGCTTGTAAACCTGCACGTATGAACATGCCCCACCCAGTTCGTAGC

781 SerTrpAlaIleLysTrpGluTyrValValLeuLeuPheLeuLeuLeuAlaAspAlaArg
CGTCTGGGCCATTAAAGTGGGAGTACGTCTCTCTCTGTTCTTCTGCTTGCAGACGGCG
GCAGGACCCGTAATTCACCCCTCATGCAGCAGGAGGACAAGGAAGACGAACGTCTGCGCG

Überlappung mit dem kombinierten ORF der DNAs 12f bis 15e

841 ValCysSerCysLeuTrpMetMetLeuLeuIleSerGlnAlaGluAlaAlaLeuGluAsn
 GCGTCTGCTCCTGCTTGTGGATGATGCTACTCATATCCCAAGCGGAAGCGGCTTTGGAGA
 CGCAGACGAGGACGAACACCTACTACGATGAGTATAGGGTTGCGCTTCGCCGAAACCTCT

901 LeuValIleLeuAsnAlaAlaSerLeuAlaGlyThrHisGlyLeuValSerPheLeuVal
 ACCTCGTAATACTTAATGCAGCATCCCTGGCCGGGACGCACGGTCTTGTATCCTTCCTCG
 TGGAGCATTATGAATTACGTCGTAGGGACCGGCCCTGCGTGCCAGAACATAGGAAGGAGC

961 PhePheCysPheAlaTrpTyrLeuLysGlyLysTrpValProGlyAlaValTyrThrPhe
 TGTCTCTCTGCTTTGCATGGTATCTGAAGGGTAAGTGGGTGCCCCGAGCGGTCTACACCT
 ACAAGAAGACGAAACGTACCATAGACTTCCCATTACCCACGGGCCTCGCCAGATGTGGA

1021 TyrGlyMetTrpProLeuLeuLeuLeuLeuAlaLeuProGlnArgAlaTyrAlaLeu
 TCTACGGGATGTGGCCTCTCCTCCTGCTCCTGTTGGCGTTGCCCGAGCGGGCGTACGCGC
 AGATGCCCTACACCGGAGAGGAGGACGAGGACAACCGCAACGGGGTTCGCCCGCATGCGCG

1081 AspThrGluValAlaAlaSerCysGlyGlyValValLeuValGlyLeuMetAlaLeuThr
 TGGACACGGAGGTGGCCGCGTCTGTTGGCGGTGTTGTTCTCGTCGGGTTGATGGCGCTAA
 ACCTGTGCCTCCACCGGCGCAGCACACCGCCACAACAAGAGCAGCCCACTACCGCGATT

1141 LeuSerProTyrTyrLysArgTyrIleSerTrpCysLeuTrpTrpLeuGlnTyrPheLeu
 CTCTGTCACCATATTACAAGCGCTATATCAGCTGGTGCTTGTGGTGGCTTCAGTATTTTC
 GAGACAGTGGTATAATGTTCCGATATAGTCGACCACGAACACCACCGAAGTCATAAAAG

1201 ThrArgValGluAlaGlnLeuHisValTrpIleProProLeuAsnValArgGlyGlyArg
 TGACCAGAGTGGAAGCGCAACTGCACGTGTGGATTCCCCCCCCCAACGTCCGAGGGGGGC
 ACTGGTCTCACCTTCGCGTTGACGTGCACACCTAAGGGGGGAGTTGCAGGCTCCCCCG

1261 AspAlaValIleLeuLeuMetCysAlaValHisProThrLeuValPheAspIleThrLys
 GCGACGCTGTCATCTTACTCATGTGTGCTGTACACCCGACTCTGGTATTTGACATCACCA
 CGCTGCGACAGTAGAATGAGTACACACGACATGTGGGCTGAGACCATAAACTGTAGTGGT

1321 LeuLeuLeuAlaValPheGlyProLeuTrpIleLeuGlnAla
 AATTGCTGCTGGCCGTCTTCGGACCCCTTTGGATTCTTCAAGCCAG
 TTAACGACGACCGGCAGAAGCCTGGGGAAACCTAAGAAGTTCGGTC

FIG. 46-2

FIG. 47- | Kombiniertes ORF der DNAs K9-1 bis 15e

1 GlyCysProGluArgLeuAlaSerCysArgProLeuThrAspPheAspGlnGlyTrpGlu
 CAGGCTGTCCTGAGAGGCTAGCCAGCTGCCGACCCCTTACCGATTTTGACCAGGGCTGGG
 GTCCGACAGGACTCTCCGATCGGTTCGACGGCTGGGGAATGGCTAAACTGGTCCCGACCC
 61 ProIleSerTyrAlaAsnGlySerGlyProAspGlnArgProTyrCysTrpHisTyrPro
 GCCCTATCAGTTATGCCAACGGAAGCGGCCCGACCCAGCGCCCTACTGCTGGCACTACC
 CGGGATAGTCAATACGGTTGCCCTTCGCCGGGGCTGGTTCGGGGGATGACGACCGTGTATGG
 121 ProLysProCysGlyIleValProAlaLysSerValCysGlyProValTyrCysPheThr
 CCCCAAAACCTTGGCGTATTGTGCCCGGAAGAGTGTGTGTGGTCCGGTATATTGCTTCA
 GGGGTTTTTGGAAACCCATAACACGGGGCGTTCTCACACACACAGGCCATATAACGAAGT
 181 ProSerProValValValGlyThrThrAspArgSerGlyAlaProThrTyrSerTrpGly
 CTCCCAGCCCCGTGGTGGTGGGAACGACCGACAGGTTCGGGCGCGCCACCTACAGCTGGG
 GAGGGTCGGGGCACCACCCCTTGCTGGCTGTCCAGCCCCGCGGGTGGATGTCGACCC
 241 GluAsnAspThrAspValPheValLeuAsnAsnThrArgProProLeuGlyAsnTrpPhe
 GTGAAAATGATACGGACGTCTTCGTCTTAACAATACAGGCCACCGCTGGGCAATTGGT
 CACTTTTACTATGCCTGCAGAAGCAGGAATTGTTATGGTCCGGTGGCGACCCGTTAACCA
 301 GlyCysThrTrpMetAsnSerThrGlyPheThrLysValCysGlyAlaProProCysVal
 TCGGTTGTACCTGGATGAACCTCACTGGATTACCAAAAGTGTGCGGAGCGCCTCCTGTG
 AGCCAACATGGACCTACTTGAGTTGACCTAAGTGGTTTCACACGCCTCGCGGAGGAACAC
 361 IleGlyGlyAlaGlyAsnAsnThrLeuHisCysProThrAspCysPheArgLysHisPro
 TCATCGGAGGGGCGGGCAACAACACCCCTGCACTGCCCACTGATTGCTTCCCAAGCATC
 AGTAGCCTCCCCGCCGTTGTTGTGGGACGTGACGGGTGACTAACGAAGCGTTTCGTAG
 421 AspAlaThrTyrSerArgCysGlySerGlyProTrpIleThrProArgCysLeuValAsp
 CGGACGCCACATACTCTCGGTGCGGCTCCGGTCCCTGGATCACACCCAGGTGCCTGGTTCG
 GCCTGCGGTGTATGAGAGCCACGCCGAGGCCAGGGACCTAGTGTGGGTCCACGGACACG
 481 TyrProTyrArgLeuTrpHisTyrProCysThrIleAsnTyrThrIlePheLysIleArg
 ACTACCCGTATAGGCTTTGGCATTATCCTTGTACCATCAACTACCATATTTAAATCA
 TGATGGGCATATCCGAACCCGTAATAGGAACATGGTAGTTGATGTGGTATAAATTTTAGT
 541 MetTyrValGlyGlyValGluHisArgLeuGluAlaAlaCysAsnTrpThrArgGlyGlu
 GGATGTACGTGGGAGGGGTCGAACACAGGCTGGAAGCTGCCTGCAACTGGACGCGGGCG
 CCTACATGCACCCCTCCCGAGCTTGTGTCCGACCTTCGACGGACGTGACCTGCGCCCCG
 601 ArgCysAspLeuGluAspArgAspArgSerGluLeuSerProLeuLeuThrThrThr
 AACGTTGCGATCTGGAAGACAGGGACAGGTCCGAGCTCAGCCCGTTACTGCTGACCACTA
 TTGCAACGCTAGACCTTCTGTCCCTGTCCAGGCTCGAGTCGGGCAATGACGACTGGTGTAT
 661 GlnTrpGlnValLeuProCysSerPheThrThrLeuProAlaLeuSerThrGlyLeuIle
 CACAGTGGCAGGTCTCCCGTGTTCCTTCACAACCCCTACCAGCCTTGTCCACCGCCTCA
 GTGTACCGTCCAGGAGGGCACAAGGAAGTGTGGGATGGTCCGAACAGGTGGCCGGAGT
 721 HisLeuHisGlnAsnIleValAspValGlnTyrLeuTyrGlyValGlySerSerIleAla
 TCCACCTCCACCAGAACATTGTGGACGTGACGACTTGTACGGGGTGGGGTCAAGCATCG
 AGGTGGAGGTGGTCTTGTAAACACCTGCAGTCATGAACATGCCCCACCCAGTTCTGTAGC
 781 SerTrpAlaIleLysTrpGluTyrValValLeuLeuPheLeuLeuAlaAspAlaArg
 CGTCCTGGGCCATTAAAGTGGGAGTACGTCGTTCTCCTGTTCTTCTGCTTGACAGCGCG
 GCAGGACCCGTAATTCACCTCATGCAGCAAGAGGACAGGAAGACGAACGCTCTGCGCG
 841 ValCysSerCysLeuTrpMetMetLeuLeuIleSerGlnAlaGluAlaAlaLeuGluAsn
 GCGTCTGCTCCTGCTTGTGGATGATGCTACTCATATCCCAAGCGGAGGGCGCTTGGAGA
 CGCAGACGAGGACGAACACCTACTACGATGAGTATAGGGTTCGCCTCCGCCGAAACCTCT
 901 LeuValIleLeuAsnAlaAlaSerLeuAlaGlyThrHisGlyLeuValSerPheLeuVal
 ACCTCGTAATACTTAATGCAGCATCCCTGGCCGGGACGACGGTCTTGTATCCTTCTCG
 TGGAGCATTATGAATTACGTCGTAGGGACCGGCCCTGCGTGCCAGAACATAGGAAGGAGC

961 PhePheCysPheAlaTrpTyrLeuLysGlyLysTrpValProGlyAlaValTyrThrPhe
 TGTTCCTTCTGCTTTGTCATGGTATTTGAAGGGTAAGTGGGTGCCCCGAGCGGTCTACACCT
 ACAAGAAGACGAAACGTACCATAAACTTCCCATTACCCACGGGCTCGCCAGATGTGGA
 1021 TyrGlyMetTrpProLeuLeuLeuLeuAlaLeuProGlnArgAlaTyrAlaLeu
 TCTACGGGATGTGGCCTCTCCTCCTGCTCCTGTTGGCGTTGCCCCAGCGGGCGTACGCGC
 AGATGCCCTACACCGGAGAGGAGGACGAGGACAACCGCAACGGGGTCTGCCCCGATGCGCG
 1081 AspThrGluValAlaAlaSerCysGlyGlyValValLeuValGlyLeuMetAlaLeuThr
 TGGACACGGAGGTGGCCCGCTCGTGTGGCGGTGTTGTTCTCGTCTGGGTGATGGCGCTGA
 ACCTGTGCTCCACCGGCGCAGCACACCGCCACAACAAGAGCAGCCCACTACCGCGACT
 1141 LeuSerProTyrTyrLysArgTyrIleSerTrpCysLeuTrpTrpLeuGlnTyrPheLeu
 CTCTGTCAACATATTACAAGCGCTATATCAGCTGGTGTGTTGGTGGCTTCAGTATTTTC
 GAGACAGTGGTATAATGTTTCGGATATAGTCGACCACGAACACCACCGAAGTCATAAAAG
 1201 ThrArgValGluAlaGlnLeuHisValTrpIleProProLeuAsnValArgGlyGlyArg
 TGACCAGAGTGAAGCGCACTGCACGTGTGGATTCCCCCCCCCAACGTCCGAGGGGGC
 ACTGGTCTCACCTTCGCGTTGACGTGCACACCTAAGGGGGGAGTTGCAGGCTCCCCCG
 1261 AspAlaValIleLeuLeuMetCysAlaValHisProThrLeuValPheAspIleThrLys
 GCGACGCGCTCATCTTACTCATGTGTGCTGTACACCGACTCTGGTATTGACATCACC
 CGCTGCGGCAGTAGAATGAGTACACACGACATGTGGGCTGAGACCATAAACTGTAGTGGT
 1321 LeuLeuLeuAlaValPheGlyProLeuTrpIleLeuGlnAlaSerLeuLeuLysValPro
 AATTGCTGCTGGCGCTCTTCGGACCCCTTTGGATTCTTCAAGCCAGTTTCTTAAAGTAC
 TTAACGACGACCGCAGAAGCCTGGGGAAACCTAAGAAGTTCCGGTCAAACGAATTTTCATG
 1381 TyrPheValArgValGlnGlyLeuLeuArgPheCysAlaLeuAlaArgLysMetIleGly
 CCTACTTTGTGCGCTCCAAGGCCTTCTCCGGTTCTGCGCGTTAGCGCGGAAGATGATCG
 GGTGAAACACGCGCAGGTTCCGGAAGAGGCCAAGACGCGCAATCGCGCTTCTACTAGC
 1441 GlyHisTyrValGlnMetValIleIleLysLeuGlyAlaLeuThrGlyThrTyrValTyr
 GAGGCCATTACGTGCAATGGTCATCATTAAGTTAGGGGCGCTTACTGGCACCTATGTTT
 CTCGGTAATGCACGTTTACCAGTAGTAATTCAATCCCCCGCAATGACCGTGGATACAAA
 1501 AsnHisLeuThrProLeuArgAspTrpAlaHisAsnGlyLeuArgAspLeuAlaValAla
 ATAACCATCTCACTCCTCTTCGGGACTGGGCGCACAACGGCTTGCGAGATCTGGCCGCTGG
 TATTGGTAGAGTGAGGAGAAGCCCTGACCCGCGTGTGCGGAACGCTCTAGACCGGCACC
 1561 ValGluProValValPheSerGlnMetGluThrLysLeuIleThrTrpGlyAlaAspThr
 CTGTAGAGCCAGTCGTCTTCTCCCAATGGAGACCAAGCTCATCACGTGGGGGGCAGATA
 GACATCTCGGTGACGAGAAGAGGGTTTACCTCTGGTTCGAGTAGTGCACCCCCCGTCTAT
 1621 AlaAlaCysGlyAspIleIleAsnGlyLeuProValSerAlaArgArgGlyArgGluIle
 CCGCCGCGTGGGTTGACATCATCAACGGCTTGCTGTTTCCGCCCCGAGGGGGCGGAGAG
 GCGCGGCACGCCACTGTAGTAGTTGCCGAACGGACAAAGGCGGGCGTCCCCGGCCCTCT
 1681 LeuLeuGlyProAlaAspGlyMetValSerLysGlyTrpArgLeuLeuAlaProIleThr
 TACTGCTCGGGCCAGCCGATGGAATGGTCTCCAAGGGGTGGAGGTTGCTGGCGCCCATCA
 ATGACGAGCCCGGTCTGGCTACCTTACCAGAGGTTCCCCACCTCCAACGACCGCGGTAGT
 1741 AlaTyrAlaGlnGlnThrArgGlyLeuLeuGlyCysIleIleThrSerLeuThrGlyArg
 CGGCGTACGCCCAGCAGACAAGGGGCTCCTAGGGTGCATAATCACCAGCCTAACTGGCC
 GCGCATGCGGGTCTGTGTTCCCGGAGGATCCACGTATTAGTGGTGGATTGACCGG
 1801 AspLysAsnGlnValGluGlyGluValGlnIleValSerThrAlaAlaGlnThrPheLeu
 GGGACAAAACCAAGTGGAGGGTGAGGTCCAGATTGTGTCACTGCTGCCCAAACCTTCC
 CCTGTTTTTGGTTTACCTCCCACTCCAGGTCTAACACAGTTGACGACGGGTTTGAAGG
 1861 AlaThrCysIleAsnGlyValCysTrpThrValTyrHisGlyAlaGlyThrArgThrIle
 TGGCAACGTGCATCAATGGGGTGTGCTGGACTGTCTACCACGGGGCGGAACGAGACCA
 ACCGTTGCACGTAGTTACCCACACGACCTGACAGATGGTCCCCCGGCTTGTCTCTGGT
 AlaSerProLysGlyProValIleGlnMetTyrThrAsnValAspGlnAspLeuValGly

FIG. 47-2

1921 TCGCGTCACCCAAGGGTCTGTGTCATCCAGATGTATACCAATGTAGACCAAGACCTTGTGG
 AGCGCAGTGGGTTCCAGGACAGTAGGTCTACATATGGTTACATCTGGTTCTGGAACACC
 TrpProAlaProGlnGlySerArgSerLeuThrProCysThrCysGlySerSerAspLeu
 1981 GCTGGCCCCGCTCCGCAAGGTAGCCGCTCATTTGACACCCCTGCACTTGGCGCTCCTCGGACC
 CGACCGGCGGAGGCGTTCCATCGGCGAGTAAGTGTGGGACGTGAACGCCGAGGAGCCTGG
 TyrLeuValThrArgHisAlaAspValIleProValArgArgArgGlyAspSerArgGly
 2041 TTTACCTGGTCACGAGGCACGCCGATGTTCATTTCCCGTGGCGCGGGGTGATAGCAGGG
 AAATGGACAGTGTCTCCGTGCGGCTACAGTAAGGGCACGCGGCCGCCACTATCGTCCC
 SerLeuLeuSerProArgProIleSerTyrLeuLysGlySerSerGlyGlyProLeuLeu
 2101 GCAGCCTGTGTGCGCCCGGCCCATTTTCTTACTTGAAGGCTCCTCGGGGGGTTCGCTGT
 CGTCGGACGACAGCGGGCGGGGTAAAGGATGAAGTTCCTCGAGGAGCCCCCAGGCGACA
 CysProAlaGlyHisAlaValGlyIlePheArgAlaAlaValCysThrArgGlyValAla
 2161 TGTGCCCCGCGGGCACGCGGTGGGCATATTTAGGGCGCGGTGTGCACCCGTGGAGTGG
 ACACGGGGCGCCCCGTGCGGCACCCGTATAAATCCCGCGCCACAGTGGGCACCTCACC
 LysAlaValAspPheIleProValGluAsnLeuGluThrThrMetArgSerProValPhe -
 2221 CTAAGGCGGTGGACTTTATCCCTGTGGAGAACCTAGAGACAACCATGAGGTCCCCGGTGT
 GATTCCGCCACCTGAAATAGGGACACCTCTTGGATCTCTGTTGGTACTCCAGGGGCCACA
 ThrAspAsnSerSerProProValValProGlnSerPheGlnValAlaHisLeuHisAla
 2281 TCACGGATAACTCTCTCCACAGTAGTGCCCCAGAGCTTCCAGGTGGCTCACCTCCATG
 AGTGCCTATTGAGGAGAGGTGGTCATCAGGGGTCTCGAAGGTCCACCGAGTGGAGGTAC
 ProThrGlySerGlyLysSerThrLysValProAlaAlaTyrAlaAlaGlnGlyTyrLys
 2341 CTCCACAGGCAGCGGCAAAAGCACCAAGGTCCCGGCTGCATATGCAGCTCAGGGCTATA
 GAGGGTGTCCGTGCGCGTTTTCGTGGTTCCAGGGCGGACGTATACGTGCGAGTCCCGATAT
 ValLeuValLeuAsnProSerValAlaAlaThrLeuGlyPheGlyAlaTyrMetSerLys
 2401 AGGTGCTAGTACTCAACCCCTCTGTGCTGCAACACTGGGCTTGGTGTCTTACATGTCCA
 TCCACGATCATGAGTTGGGGAGACAACGACCTTGTGACCCGAAACCACGAATGTACAGGT
 AlaHisGlyIleAspProAsnIleArgThrGlyValArgThrIleThrThrGlySerPro
 2461 AGGCTCATGGGATCGATCCTAACATCAGGACCGGGGTGAGAACAATTACCACTGGCAGCC
 TCCGAGTACCCTAGCTAGGATTGTAGTCTGCCCCACTCTTGTATATGGTGACCGTCCG
 IleThrTyrSerThrTyrGlyLysPheLeuAlaAspGlyGlyCysSerGlyGlyAlaTyr
 2521 CCATCAGTACTCCACCTACGGCAAGTTCCCTTGCCGACGGCGGGTGCTCGGGGGCGCTT
 GGTAGTGCATGAGGTGGATGCCGTTCAAGGAACGGCTGCCGCCCCAGAGCCCCCGCGAA
 AspIleIleIleCysAspGluCysHisSerThrAspAlaThrSerIleLeuGlyIleGly
 2581 ATGACATAATAATTTGTGACGAGTGCCACTCCAGGATGCCACATCCATCTTGGGCATCG
 TACTGTATTATTAAACACTGCTCACGGTGAGGTGCCTACGGTGTAGGTAGAACCCTAGC
 ThrValLeuAspGlnAlaGluThrAlaGlyAlaArgLeuValValLeuAlaThrAlaThr
 2641 GCACTGTCTTGACCAAGCAGAGACTGCGGGGCGGAGACTGGTTGTCTCGCCACCGCCA
 CGTGACAGGAACCTGGTTCGTCTGTGACGCCCCGCTCTGACCAACAGAGCGGTGGCGGT
 ProProGlySerValThrValProHisProAsnIleGluGluValAlaLeuSerThrThr
 2701 CCCCTCCGGGCTCCGTCACTGTGCCCCATCCCAACATCGAGGAGGTTGCTCTGTCCACCA
 GGGGAGGGCCCCAGGCAGTGACAGGGGTAGGTTGTAGCTCCTCCAACGAGACAGGTGGT
 GlyGluIleProPheTyrGlyLysAlaIleProLeuGluValIleLysGlyGlyArgHis
 2761 CCGGAGAGATCCCTTTTACGGCAAGGCTATCCCCCTCGAAGTAATCAAGGGGGGAGAC
 GGCCTCTCTAGGGAATAATGCCGTTCCGATAGGGGGAGCTTCATTAGTTCCCCCTCTG
 LeuIlePheCysHisSerLysLysLysCysAspGluLeuAlaAlaLysLeuValAlaLeu
 2821 ATCTCATCTTCTGTCAATCAAGAAGAAGTGGACGAACTCGCCGCAAAGCTGGTCCGAT
 TAGAGTAGAAGACAGTAAGTTTCTTCTTACGCTGCTTGAGCGGCGTTTCGACAGCGTA
 GlyIleAsnAlaValAlaTyrTyrArgGlyLeuAspValSerValIleProThrSerGly
 2881 TGGGCATCAATGCCGTGGCCTACTACCGGGTCTTGACGTGTCCGTCAATCCGACAGCG
 ACCCGTAGTTACGGCACCGGATGATGGCGCCAGAAGTGCACAGGCAGTAGGGCTGGTCCG

FIG. 47-3

FIG. 47-4

3901 TCCAGACCAACTGGCAAACTCGAGACCTTCTGGGCGAAGCATATGTGGAACCTTCATCA
 AGGTCTGGTIGACCGTTTTTGTAGCTCTGGAAGACCCGCTTCGTATACACCTTGAAGTAGT
 GlyIleGlnTyrLeuAlaGlyLeuSerThrLeuProGlyAsnProAlaIleAlaSerLeu
 3961 GTGGGATACAATACTTGGCGGGCTTGTCAACGCTGCCTGGTAACCCCGCCATTGCTTCAT
 CACCCTATGTTATGAACCGCCCGAACAGTTGCGACGGACCATTGGGGCGGTAACGAAGTA
 MetAlaPheThrAlaAlaValThrSerProLeuThrThrSerGlnThrLeuLeuPheAsn
 4021 TGATGGCTTTTACAGCTGCTGTCAACAGCCACTAACCCTAGCCAAACCCCTCCTCTTCA
 ACTACCGAAAATGTCGACGACAGTGGTCCGGTGATTGGTGATCGGTTTGGGAGGAGAAGT
 IleLeuGlyGlyTrpValAlaAlaGlnLeuAlaAlaProGlyAlaAlaThrAlaPheVal
 4081 ACATATTGGGGGGTGGGTGGCTGCCCCAGCTCGCCGCCCCCGGTGCCGCTACTGCCTTTG
 TGTATAACCCCCCACCACCGACGGGTGAGCGCGGGGGGCCACGGCGATGACGGAAC
 GlyAlaGlyLeuAlaGlyAlaAlaIleGlySerValGlyLeuGlyLysValLeuIleAsp
 4141 TGGGCGCTGGCTTAGCTGGCGCCGCGCATCGGCAGTGTGGACTGGGGAAGGTCTCTCATAG
 ACCCGCGACCGAATCGACCGCGCGGTAGCCGTCACAACCTGACCCCTTCCAGGAGTATC
 IleLeuAlaGlyTyrGlyAlaGlyValAlaGlyAlaLeuValAlaPheLysIleMetSer
 4201 ACATCTTGCAGGGTATGGCGCGGGCTGGCGGGAGCTCTTGTGGCATTCAAGATCATGA
 TGTAGGAACGTCCCATACCGCGCCCGCACCGCCCTCGAGAACCCGTAAGTTCTAGTACT
 GlyGluValProSerThrGluAspLeuValAsnLeuLeuProAlaIleLeuSerProGly
 4261 GCGGTGAGGTCCCTCCACGGAGGACCTGGTCAATCTACTGCCCGCCATCCTCTCGCCCCG
 CGCCACTCCAGGGGAGGTGCCTCCTGGACAGTTAGATGACGGGCGGTAGGAGAGCGGGC
 AlaLeuValValGlyValValCysAlaAlaIleLeuArgArgHisValGlyProGlyGlu
 4321 GAGCCCTCGTAGTCGGCGTGGTCTGTGCAGCAATACTGCGCCGGCACGTTGGCCCGGGCG
 CTCGGGAGCATCAGCCGACAGACAGCTCGTTATGACGCGCGCGTGCACCGGGCCCCCGC
 GlyAlaValGlnTrpMetAsnArgLeuIleAlaPheAlaSerArgGlyAsnHisValSer
 4381 AGGGGGCAGTGCACTGGATGAACCGGCTGATAGCCTTCGCCCTCCCGGGGAACCATGTTT
 TCCCCGTCACGTCACCTACTTGGCCGACTATCGGAAGCGGAGGGCCCCCTTGGTACAAA
 ProThrHisTyrValProGluSerAspAlaAlaAlaArgValThrAlaIleLeuSerSer
 4441 CCCCCACGCACTACGTCCCGAGAGCGATGCACTGCCCCGCTCACTGCCATACTCAGCA
 GGGGTGCGTGATGACGGCCCTCTCGCTACGTGCGACGGGCGCAGTGACGGTATGAGTCGT
 LeuThrValThrGlnLeuLeuArgArgLeuHisGlnTrpIleSerSerGluCysThrThr
 4501 GCCTCACTGTAAACCCAGCTCCTGAGGCGACTGCACCAAGTGGATAAGCTCGGAGTGTACCA
 CGGAGTGACATTGGGTCCGAGGACTCCGCTGACGTGGTCACTTATTCGAGCCTCACATGGT
 ProCysSerGlySerTrpLeuArgAspIleTrpAspTrpIleCysGluValLeuSerAsp
 4561 CTCCATGCTCCGGTTCCTGGCTAAGGGACATCTGGGACTGGATATGCGAGGTGTTGAGCG
 GAGGTACGAGGCCAAGGACCGATTCCCTGTAGACCCTGACCTATACGCTCCACAACCTCGC
 PheLysThrTrpLeuLysAlaLysLeuMetProGlnLeuProGlyIleProPheValSer
 4621 ACTTTAAGACCTGGCTAAAAGCTAAGCTCATGCCACAGCTGCCTGGGATCCCCCTTGTGT
 TGAAATTCTGGACCGATTTTTCGATTGCGAGTACGGTGTGCGACGGACCCTAGGGGAAACACA
 CysGlnArgGlyTyrLysGlyValTrpArgValAspGlyIleMetHisThrArgCysHis
 4681 CCTGCCAGCGCGGGTATAAGGGGTCTGGCGAGTGGACGGCATCATGCACACTCGCTGCC
 GGACGGTCCGCGCCATATTTCCCCAGACCGCTCACCTGCCGTAGTACGTGTGAGCGACGG
 CysGlyAlaGluIleThrGlyHisValLysAsnGlyThrMetArgIleValGlyProArg
 4741 ACTGTGGAGCTGAGATCACTGGACATGTCAAAAACGGGACGATGAGGATCGTTCGGTCTTA
 TGACACCTCGACTCTAGTGACCTGTACAGTTTTTGGCCCTGCTACTCCTAGCAGCCAGGAT
 ThrCysArgAsnMetTrpSerGlyThrPheProIleAsnAlaTyrThrThrGlyProCys
 4801 GGACCTGCAGGAACATGTGGAGTGGGACCTTCCCAATTAATGCCATACCCACGGGCCCCCT
 CCTGGACGTCTTGTACACCTCACCTTGAAGGGTAATTACGGATGTGGTGGCCGGGGA
 ThrProLeuProAlaProAsnTyrThrPheAlaLeuTrpArgValSerAlaGluGluTyr
 4861 GTACCCCCCTTCTGCGCCGAACCTACAGTTCGCGCTATGGAGGGTGTCTGCAGAGGAAT
 CATGGGGGAAGGACCGGCTTGTATGTCAAGCGGATACCTCCACAGACGTCTCTCTTA

FIG. 47-5

ValGluIleArgGlnValGlyAspPheHisTyrValThrGlyMetThrThrAspAsnLeu
 4921 ATGTGGAGATAAGGCAGGTGGGGGACTTCCACTACGTGACGGGTATGACTACTGACAATC
 TACACCTCTATTCCGTCCACCCCTGAAGGTGATGCACTGCCCATCTGATGACTGTTAG
 LysCysProCysGlnValProSerProGluPhePheThrGluLeuAspGlyValArgLeu
 4981 TCAAATGCCCGTGCAGGTCCCATCGCCCGAATTTTTCACAGAATTGGACGGGGTGCGCC
 AGTTTACGGGCACGGTCCAGGGTAGCGGGCTTAAAAAGTGTCTTAACCTGCCCCACGCGG
 HisArgPheAlaProProCysLysProLeuLeuArgGluGluValSerPheArgValGly
 5041 TACATAGGTTTTCGCCCCCTGCAAGCCCTTGCTCGGGAGGAGGTATCATTGAGAGTAG
 ATGTATCCAAACGCGGGGGACGTTTCGGGAACGACGCCCTCCTCCATAGTAAGTCTCATC
 LeuHisGluTyrProValGlySerGlnLeuProCysGluProGluProAspValAlaVal
 5101 GACTCCACGAATACCCGGTAGGGTTCGCAATTACCTTTCGAGCCCGAACCGGACGTGGCCG
 CTGAGGTGCTTATGGGCCATCCAGCGTTAATGGAACGCTCGGGCTTGGCCTGCACCGCG
 LeuThrSerMetLeuThrAspProSerHisIleThrAlaGluAlaAlaGlyArgArgLeu
 5161 TGTGACGTCCATGCTCACTGATCCCTCCCATATAACAGCAGAGCGCGCGGGCGAAGGT
 ACAACTGCAGGTACGAGTGACTAGGGAGGGTATATTGTCGTCTCCGCGCGCGCTTCCA
 AlaArgGlySerProProSerValAlaSerSerSerAlaSerGlnLeuSerAlaProSer
 5221 TGGCGAGGGGATCACCCCTCTGTGGCCAGCTCCTCGGCTAGCCAGCTATCCGCTCCAT
 ACCGCTCCCTAGTGGGGGAGACACCGGTTCGAGGAGCCGATCGGTTCGATAGGCGAGSTA
 LeuLysAlaThrCysThrAlaAsnHisAspSerProAspAlaGluLeuIleGluAlaAsn
 5281 CTCTCAAGGCAACTTGCACCGCTAACCATGACTCCCTGATGCTGAGTTCATAGAGGCCA
 GAGAGTTCCGTTGAACGTGGCGATTGGTACTGAGGGGACTACGACTCGAGTATCTCCGGT
 LeuLeuTrpArgGlnGluMetGlyGlyAsnIleThrArgValGluSerGluAsnLysVal
 5341 ACCTCCTATGGAGGCAGGAGATGGGCGGCAACATCACCAGGGTTGAGTCAGAAAACAAAG
 TGGAGGATACCTCCGTCTCTACCCGCGCTTGTAGTGGTCCCAACTCAGTCTTTTGTTC
 ValIleLeuAspSerPheAspProLeuValAlaGluGluAspGluArgGluIleSerVal
 5401 TGGTGATTCTGGACTCCTTCGATCCGCTTGTGGCGGAGGAGGACGAGCGGGGAGATCTCCG
 ACCACTAAGACCTGAGGAAGCTAGGCGAACACCGCTCCTCTGCTCGCCCTCTAGAGGC
 ProAlaGluIleLeuArgLysSerArgArgPheAlaGlnAlaLeuProValTrpAlaArg
 5461 TACCCGCAGAAATCCTGCGGAAGTCTCGGAGATTGCCCCAGGCCCTGCCCCGTTGGGCGC
 ATGGGCGTCTTTAGGACGCTTCAGAGCCTTAAGCGGGTCCGGGACGGGCAAACCCGCG
 ProAspTyrAsnProProLeuValGluThrTrpLysLysProAspTyrGluProProVal
 5521 GGCCGGACTATAACCCCGCTAGTGGAGACGTGGAAAAAGCCGACTACGAACACCTG
 CCGGCTGATATTGGGGGCGATCACCTCTGCACCTTTTTCGGGCTGATGCTTGGTGGAC
 ValHisGlyCysProLeuProProProLysSerProProValProProProArgLysLys
 5581 TGGTCCATGGCTGTCCGCTTCCACCTCCAAAGTCCCTCCTGTGCCTCCGCTCGGAAGA
 ACCAGGTACCGACAGGCGAAGGTGGAGGTTTCAGGGGAGGACACGGAGGCGGAGCCTTCT
 ArgThrValValLeuThrGluSerThrLeuSerThrAlaLeuAlaGluLeuAlaThrArg
 5641 AGCGGACGGTGGTCTCACTGAATCAACCCTATCTACTGCCTTGGCCGAGCTCGCCACCA
 TCGCCTGCCACAGGAGTGACTTAGTTGGGATAGATGACGGAACCGGCTCGAGCGGTGGT
 SerPheGlySerSerSerThrSerGlyIleThrGlyAspAsnThrThrThrSerSerGlu
 5701 GAAGCTTTGGCAGCTCCTCAACTTCCGGCATTACGGGCGACAATACGACAACATCCTCTG
 CTTGAAACCGTTCGAGGAGTTGAAGGCCGTAATGCCCGCTGTTATGCTGTTGTAGGAGAC
 ProAlaProSerGlyCysProProAspSerAspAlaGluSerTyrSerSerMetProPro
 5761 AGCCCGCCCCCTTCTGGCTGCCCCCGGACTCCGACGCTGAGTCTTCTCCTCCATGCCCC
 TCGGGCGGGGAAGACCGACGGGGGGGCTGAGGCTGCGACTCAGGATAAGGAGGTACGGG
 LeuGluGlyGluProGlyAspProAspLeuSerAspGlySerTrpSerThrValSerSer
 5821 CCTTGGAGGGGAGCCTGGGGATCCGGATCTTAGCGACGGGTCATGGTCAACGGTCAGTA
 GGGACCTCCCCCTCGGACCCCTAGGCCTAGAATCGCTGCCAGTACCAGTTGCCAGTCAT
 GluAlaAsnAlaGluAspValValCysCysSerMetSerTyrSerTrpThrGlyAlaLeu

FIG. 47-6

5881 GTGAGGCCAACGCGGAGGATGTCGTGTGCTGCTCAATGTCTTACTCTTGGACAGGCGCAC
CACTCCGGTTGCGCCTCCTACAGCACACGACGAGTTACAGAATGAGAACCTGTCCGCGTG
ValThrProCysAlaAlaGluGluGlnLysLeuProIleAsnAlaLeuSerAsnSerLeu
5941 TCGTCACCCCGTGC GCGCGGGAAGAACAGAACTGCCCCATCAATGCACCTAAGCAACTCGT
AGCAGTGGGGCACGCGCGCCTTCTTGTCTTTGACGGGTAGTTACGTGATTCTGTTGAGCA
LeuArgHisHisAsnLeuValTyrSerThrThrSerArgSerAlaCysGlnArgGlnLys
6001 TGCTACGTCAACCAATTTGGTGTATTCCACCACCTCACGCAGTGCTTGCCAAAGGCAGA
ACGATGCAGTGGTGTAAACCACATAAGGTGGTGGAGTGCGTCACGAACGGTTTCCGTCT
LysValThrPheAspArgLeuGlnValLeuAspSerHisTyrGlnAspValLeuLysGlu
6061 AGAAAGTCACATTTGACAGACTGCAAGTTCTGGACAGCCATTACCAGGACGTACTCAAGG
TCTTTCAGTGTAACCTGTCTGACGTTCAAGACCTGTCCGTAATGGTCCTGCATGAGTTCC
ValLysAlaAlaAlaSerLysValLysAlaAsnLeuLeuSerValGluGluAlaCysSer
6121 AGGTTAAAGCAGCGCGGTCAAAGTGAAGGCTAACTTGCTATCCGTAGAGGAAGCTTGCA
TCCAATTTCTGTCGCGCAGTTTCACTTCCGATTGAACGATAGGCATCTCCTTCGAACGT
LeuThrProProHisSerAlaLysSerLysPheGlyTyrGlyAlaLysAspValArgCys
6181 GCCTGACGCCCCCACTCAGCCAAATCCAAGTTTGGTTATGGGGCAAAGACGTCCGTT
CGGACTGCGGGGTGTGAGTCGGTTTAGGTTCAAACCAATACCCCGTTTCTGTCAGGCAA
HisAlaArgLysAlaValThrHisIleAsnSerValTrpLysAspLeuLeuGluAspAsn
6241 GCCATGCCAGAAAGCGCGTAACCCACATCAACTCCGTGTGGAAAGACCTTCTGGAAGACA
CGGTACGGTCTTTCGGCATTTGGGTGTAGTTGAGGCACACCTTCTGGAAGACCTTCTGT
ValThrProIleAspThrThrIleMetAlaLysAsnGluValPheCysValGlnProGlu
6301 ATGTAACACCAATAGACACTACCATCATGGCTAAGAACGAGGTTTTCTGCGTTTCAGCCTG
TACATTGTGGTTATCTGTGATGGTAGTACCGATTCTTGCTCCAAAGACGCAAGTCGGAC
LysGlyGlyArgLysProAlaArgLeuIleValPheProAspLeuGlyValArgValCys
6361 AGAAGGGGGTTCGTAAGCCAGCTCGTCTCATCGTGTCCCCGATCTGGGCGTGCGCGTGT
TCTTCCCCCAGCATTCTGGTCGAGCAGTAGCACAAGGGGCTAGACCCGCACGCGCACA
GluLysMetAlaLeuTyrAspValValThrLysLeuProLeuAlaValMetGlySerSer
6421 GCGAAAAGATGGCTTTGTACGACGTGGTTACAAAGCTCCCTTGGCCCTGATGGGAAGCT
CGTTTTCTACCGAAACATGCTGCACCAATGTTTCGAGGGGAACCGGCACTACCCCTCGA
TyrGlyPheGlnTyrSerProGlyGlnArgValGluPheLeuValGlnAlaTrpLysSer
6481 CCTACGGATTCCAATACTCACCAGGACAGCGGGTTGAATTCCTCGTGCAAGCGTGGAAAGT
GGATGCCTAAGGTTATGAGTGGTCTCTGCGCCCACTTAAGGAGCAGGTTCCGACCTTCA
LysLysThrProMetGlyPheSerTyrAspThrArgCysPheAspSerThrValThrGlu
6541 CCAAGAAAACCCCAATGGGGTTCTCGTATGATAACCGCTGCTTTGACTCCACAGTCACTG
GGTTCTTTTGGGGTTACCCCAAGAGCATACTATGGGGCAGGAACTGAGGTGTCAGTGAC
SerAspIleArgThrGluGluAlaIleTyrGlnCysCysAspLeuAspProGlnAlaArg
6601 AGAGCGACATCCGTACGGAGGAGGCAATCTACCAATGTTGTGACCTCGACCCCCAAGCCC
TCTCGCTGTAGGCATGCCTCCTTAGATGGTTACAACACTGGAGCTGGGGGTTCCGGG
ValAlaIleLysSerLeuThrGluArgLeuTyrValGlyGlyProLeuThrAsnSerArg
6661 GCGTGGCCATCAAGTCCCTCACCGAGAGGCTTTATGTTGGGGGCCCTCTTACCAATTCAA
CGCACCGGTAGTTACAGGAGTGGCTCTCCGAAATACAACCCCGGAGAAATGGTTAAGTT
GlyGluAsnCysGlyTyrArgArgCysArgAlaSerGlyValLeuThrThrSerCysGly
6721 GGGGGGAGAACTGCGGCTATCGCAGGTGCCGCGAGCGGCTACTGACAACCTAGCTGTG
CCCCCTCTTGACGCCGATAGCGTCCACGGCGCGCTCGCCGATGACTGTTGATCGACAC
AsnThrLeuThrCysTyrIleLysAlaArgAlaAlaCysArgAlaAlaGlyLeuGlnAsp
6781 GTAACACCCTCACTTGCTACATCAAGGCCCGGCGAGCCTGTGAGCCGCGAGGGCTCCAGG
CATTGTGGGAGTGAACGATGTAGTTCCGGGCCCGTCCGACAGCTCGGCGTCCCGAGGTCC
CysThrMetLeuValCysGlyAspAspLeuValValIleCysGluSerAlaGlyValGln
6841 ACTGCACCATGCTCGTGTGTGGCGACGACTAGTCTGTTATCTGTGAAAGCGCGGGGTCC
TGACGTGGTACGAGCACACACCGCTGCTGAATCAGCAATAGACACTTTCGCGCCCCCAGG

FIG. 47-7

6901 GluAspAlaAlaSerLeuArgAlaPheThrGluAlaMetThrArgTyrSerAlaProPro -
 AGGAGGACGCGGCGAGCCTGAGAGCCTTCACGGAGGCTATGACCAGGTACTCCGCCCCC
 TCCTCCTGCGCCGCTCGGACTCTCGGAAGTGCCTCCGATACTGGTCCATGAGGCGGGGG
 6961 GlyAspProProGlnProGluTyrAspLeuGluLeuIleThrSerCysSerSerAsnVal
 CTGGGGACCCCCACAACCAGAATACGACTTGGAGCTCATAACATCATGCTCCTCCAACG
 GACCCCTGGGGGGTGTGGTCTTATGCTGAACCTCGAGTATTGTAGTACGAGGAGGTTGC
 7021 SerValAlaHisAspGlyAlaGlyLysArgValTyrTyrLeuThrArgAspProThrThr
 TGTCAGTCGCCCCACGACGGCGCTGGAAAGAGGGTCTACTACCTCACCCGTGACCCCTACAA
 ACAGTCAGCGGGTGCTGCCGCGACCTTCTCCAGATGATGGAGTGGGCACTGGGATGTT
 7081 ProLeuAlaArgAlaAlaTrpGluThrAlaArgHisThrProValAsnSerTrpLeuGly
 CCCCCCTCGCGAGAGCTGCGTGGGAGACAGCAAGACACACTCCAGTCAATTCCTGGCTAG
 GGGGGAGCGCTCTCGACGCACCCTCTGTCTGTGTGAGGTGAGTTAAGGACCGATC
 7141 AsnIleIleMetPheAlaProThrLeuTrpAlaArgMetIleLeuMetThrHisPhePhe
 GCAACATAATCATGTTTGGCCCCACACTGTGGGCGAGGATGATACTGATGACCCATTCT
 CGTTGTATTAGTACAAACGGGGGTGTGACACCCGCTCCTACTATGACTACTGGGTAAAGA
 7201 SerValLeuIleAlaArgAspGlnLeuGluGlnAlaLeuAspCysGluIleTyrGlyAla
 TTAGCGTCCCTTATAGCCAGGACCGAGCTTGAACAGGCCCTCGATTGCGAGATCTACGGGG
 AATCGCAGGAATATCGGTCCCTGGTGAACCTTGTCCGGGAGCTAACGCTCTAGATGCCCC
 7261 CysTyrSerIleGluProLeuAspLeuProProIleIleGlnArgLeu
 CCTGCTACTCCATAGAACCCTTGATCTACCTCCAATCATTCAAAGACTC
 GGACGATGAGGTATCTTGGTGAACCTAGATGGAGGTTAGTAAGTTTCTGAG

FIG. 47- 8