



(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.<sup>7</sup>: 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.  
 Cousins 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.  
 Hämmерling 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 epidemiische 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 viralen 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 rheumatischen 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 umfaßt, 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 monoklonale 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 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 Polynukleotid ist, das eine benachbarte Sequenz von Nukleotiden 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 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.

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

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

(a) Inkontaktbringen der Probe mit einer Sonde, unter Bedingungen, die die selektive Hybridisierung der Sonde mit einem HCV-Polynukleotid oder dem Komplement davon in der Probe ermöglichen, wobei die Sonde ein Polynukleotid umfaßt, das eine benachbarte Sequenz von Nukleotiden 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 Polyprotein codiert; und

(ii) 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, und

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

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

[0015] Wir beschreiben ferner ein gereinigtes HCV-Polynukleotid, ein rekombinantes HCV-Polynukleotid, ein rekombinantes Polynukleotid, umfassend eine Sequenz, die von einem HCV-Genom oder von HCV-cDNA abgeleitet ist, ein rekombinantes Polynukleotid, das ein HCV-Epitop codiert, einen rekombinanten Vektor, der irgendeines der vorstehenden rekombinanten Polynukleotide 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 erfindungsgemäßes Polypeptids binden, das

(a) ein gereinigtes Präparat polyclonaler Antikörper oder  
(b) eine Zusammensetzung monoklonaler 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 Polynukleotidsonde für HCV, wobei die Sonde ein erfindungsgemäßes Polynukleotid 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 Polynukleotid 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 Gewebskultur 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 Clone 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-

dierten 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-NANB<sub>5-1-1</sub>, mit Schimpan-senserum aus mit BB-NANB, HAV und HBV-infizierten Schimpansen.
- [0063] **Fig.** 34 zeigt eine Fotografie von Western-Blots eines Fusionsproteins, SOD-NANB<sub>5-1-1</sub>, 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 Carboxyterminus 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 iden-tifiziert, 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-NAN-BV-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 behan-delt 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-NANB<sub>5-1-1</sub> gewonnen worden waren und mit <sup>32</sup>P-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 <sup>32</sup>P-markierten plus- und minus-strängigen DNA-Sonden, abgeleitet von NANBV-cDNA in Clon 81, abge-sucht worden waren.
- [0072] **Fig.** 41-1 zeigt die Homologien zwischen einem Polypeptid, das von HCV-cDNA codiert wird, und ei-nem 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 über-lappt, 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 kontinuierliche 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 (ORP) umfaßt, das ein Polyprotein codiert; und dadurch, daß die Gesamtheit des codierten Polyproteins eine mindestens 40%-ige Homologie zu dem ge-samten 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 Hinterlegungsnum-mer 40394. Dieser Erreger wurde früher als NANBV und/oder BB-NANBV bezeichnet. Die Begriffe HCV, NAN-BV 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 Nucleatid (Fields & Knipe (1986)). Daher fallen diese multiplen Stämme unter die nachstehend beschriebenen HCV-Typen. Die hier beschriebe-nen Zusammensetzungen und Verfahren ermöglichen die Fortpflanzung, Identifizierung, den Nachweis und die Isolierung der verschiedenen verwandten Stämme. Ferner ermöglichen sie auch die Herstellung von Dia-

gnostika 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 Virustaxenomisten 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 eine 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 Radioimmunassay, 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 S<sub>1</sub>-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 Genebank, 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 keinen 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 Pclypeptids, 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 genetischen 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 Einzelstrangnuklease 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 Terminen 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 Translationsstopcodon 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 Genebank, 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 Antikörperfunktion 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, 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, Fitsch & 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.); Gere 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 genomicscher 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 Genebank 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 Cloven 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 Hybridisierungssonden 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 erhältene 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 Gewebskultursystemen, 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, selektiert. 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 cDNAs 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 ungefährlichen 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 Thymidin, wohingegen die anderen drei Clones 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 Clones erhalten, die zusätzlich stromaufwärts und stromabwärts HCV-cDNA-Sequenzen enthielten. Die Isolierung dieser Clones 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 Budapest 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 Polynukleotidbindungsproteine, Polynukleotidpolymerase(n) und anderer viralen 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. NANB<sub>5-1-1</sub>, NRNB<sub>81</sub> 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 Wirtsstysteme 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 Salzfraktionierung, 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 Gewebskultur 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 immuno-gen 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 (SPDF) 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 Kopp lungsmittel bilden einen Thioether anstelle einer Disulfidbindung. Viele dieser thioetherbildenden Mittel sind im Handel erhältlich und umfassen reaktive Ester von 6-Maleimidocapronsäure, 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, Cel lulosekugelchen und dgl., polymere Aminosäuren, wie Polyglutaminsäure, Polylysin und dgl., Aminosäurecopolymeren und inaktive Virusteilchen, vergleiche beispielsweise Abschnitt II.D. Besonders nützliche Proteinsubstrate sind Serumalbumine, Napfschneckenhämocyanin, 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 Monomerunt ereinheit 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 Sägerzellen, wie Ovarzellen des chinesischen Hamsters (CHO), unter Verwendung eines SV40-Dihydrofolat-Reduktasevektors (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 F, ebenso wie in zwei große Nicht-Strukturproteine, NV4 und NV5, und ein komplexes Set kleinerer Nicht-Strukturproteine translatiert wird. Es ist bekannt, daß die hauptsächlichen 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 Sägerzellen 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 Benetzungs- 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-Acetyl-muramyl-L-threonyl-D-isoglutamin (thr-MDP), N-Acetyl-normuramyl-L-alanyl-D-isoglutamin (CGP 11537, bezeichnet als nor-MDP), N-Acetyl-muramyl-L-alanyl-D-isoglutamyl-L-alanin-2-(1'-2'-dipalmitoyl-sn-glycero-3-hydroxyphosphoryl-axy)ethylamin (CGP 19835A, bezeichnet als MTP-PE) und RIBI, das drei Komponenten, die aus

Bakterien extrahiert wurden, Monophosphoryllipid A, Trehalosedimycarat 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 Excipienten, 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 verzögter 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 Impfzyklus 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 monoklonale 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 Immunaffinitätschromatographie 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] Monoklonale Antikörper gegen HCV-Epitope können auch leicht vor einem Fachmann erzeugt werden. Das allgemeine Verfahren zur Erzeugung monoklonaler 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 offenbarten 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 E bis 8 Nucleotide eine Länge ist, mit der man arbeiten kann, sind Sequenzen von 10 bis 12 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 erhaltenen Nucleinsäure aus der Probe kann einer Gelektrophorese 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, ansetzt 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 Seren 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 Polynukleotidsonden 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 stammten. 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 erfundungsgemäßen 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 geclont und sequenziert werden. So ist es anhand der hier angegebenen Information möglich, das (die) HCV-Genom(e) unabhängig von ihrer Art zu clonieren 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 Genebank, 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 Ultrazentifugation 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 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 monoklonal 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 Immunaffinitätschromatographie zu isolieren. Techniken für die Immunaffinitätschromatographie 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 Koppelungsmittel 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 eingefangenem 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 Clone 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 Nebenkomponenten 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 Tiermodellsysteme 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. MK<sub>2</sub>, VERO), Schweinenierenzelllinien (z.B. PS), Babyhamsternierenzelllinien (z.B. BHK), Maus-Makrophagenzelllinien (z.B. P388D1, MK1, Mm1), menschliche Makrophagenzelllinien (z.B. U-937), menschliche periphere Blut leukozyten, menschliche adhärente 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. Albepectus, Aedes aegypti, Cutex 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 Leber 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 Gewebskulturzellen 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 ID<sub>50</sub>-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 Gewebskultursysteme 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. Operator-Teile 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  $\beta$ -Lactamase (Penicillinase) und Lactosepromotorsysteme (Chang et al. (1977)), das Tryptophan (trp)-Promotorsystem (Goeddel et al. (1980)) und den  $\lambda$ -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 carlsberensis* 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- $\alpha$ -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 Beispielsteil 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 µg Plasmid oder DNA-Sequenz durch eine Enzymeinheit in etwa 20 µl 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 Agarosegelektrophoresetechniken 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 abgesucht.

### 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 <sup>32</sup>P durch Behandlung mit Polynucleotidkinase in Gegenwart von <sup>32</sup>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 stringenten 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 genetischen 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'-<sup>32</sup>P-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 Didesoxyverfahren 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 Plastikrörchen) 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 Antikonzentration bezogen.

## IV. Beispiele

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

dung 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<sub>3</sub>HgOH 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)<sub>12-18</sub> 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 Patientenserien nach den Verfahren von Huynh et al. (1985) abgesucht, ausgenommen, daß der gebundene menschliche Antikörper mit Schaf-Antimensch-Ig-Antiseren, die mit <sup>125</sup>I radioaktiv markiert worden waren, nachgewiesen wurde. Fünf positive Phagen wurden identifiziert und gereinigt. Die fünf positiven Phagen wurden auf Bindungsspezifität gegenüber Seren 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 Gelektrophorese isoliert. Die EcoRI-Restriktionsfragmente wurden in die M13-Vektoren mp18 und mp19 (Messing (1983)) subcloniert und unter Verwendung des Didesoxyketteterminationsverfahrens 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 Polynukleotid 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 überlappenden 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 × 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 carboxyterminalen 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 nummeriert.

#### 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 Clones 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.8. 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 Clones 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 Polynukleotid auf dem 5'-Bereich von Clon 35 beruhte. Die Sequenz des zum Absuchen verwendeten synthetischen Polynukleotids 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 Clones 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 cl-a 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 cl-a wurde ein anderes synthetisches Nucleotid synthetisiert, das die Sequenz

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

hatte. Das Absuchen der λ-gt11-Bank unter Verwendung der von Clon cl-a abgeleiteten Sequenz als Sonde er gab 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 Clones 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 33a (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 Clones 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 Clones 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 Clones 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) clonierte. 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 Nael und NarI gespalten, und das große Fragment ( $\approx$  2850 bp) wurde gereinigt und mit dem kleinen gereinigten Nael/NarI-Restriktionsfragment ( $\approx$  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  $\approx$  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. Uusammenesetzte 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 würden. Diese Heterogenität kann wichtige weitere Folgen hinsichtlich der Proteininfaltung 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-ct11</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 äußersten 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 Oligomerer 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<sup>+</sup>-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'
      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-NANB<sub>5-1-1</sub>-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-NANB<sub>81</sub>-Fusionspolypeptid exprimiert. Das Verfahren zur Herstellung des Vektors, der dieses Fusionspolypeptid codiert, war dem analog, das zur Bildung des Vektors, der SOD-NANB<sub>5-1-1</sub> 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-NANB<sub>81</sub>-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-NANB<sub>5-1-1</sub> 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-NANB<sub>5-1-1</sub>-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 <sup>125</sup>I-markiertem Schaf-Anti-Mensch-Ig, wie in Abschnitt IV.A.1. beschrieben, nachgewiesen.

[0322] Die Charakterisierung der Schimpansenserien, 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 NANB<sub>5-1-1</sub>-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-NANB<sub>5-1-1</sub>-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-NANB<sub>5-1-1</sub>-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 NANB<sub>5-1-1</sub>-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 Humanseren 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 NANB<sub>5-1-1</sub>-Einheit des Fusionspolypeptids. Seren von diesen Patienten mit NANBH enthielten diese Antikörper nicht. Es ist möglich, daß die Anti-NANB<sub>5-1-1</sub>-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-NANB<sub>5-1-1</sub>-Antikörper enthielten, und daß diese Antikörper auch in Seren von "normalen" Kontrollen nicht vorhanden waren. Obwohl ein HAV-Patient (Bahn 36) anscheinend Anti-NANB<sub>5-1-1</sub>-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 Hybridisierungsonde von Clon 5-1-1 oder von Clon 81 hybridisierte nicht mit "Southern"-Blots von zur Kontrolle verwendeter genomicscher DNA von Menschen und Schimpansen, die nicht infiziert waren, unter Bedingungen, unter denen einzigartige, in einer Kopie vorhandene Gene nachweisbar sind. Diese Sonden hybrisierten nicht mit Southern-Blots von zur Kontrolle verwendeter genomicscher 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 ≈ 1270bp 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-

Ielemente 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 Gln<sub>154</sub> der Superoxiddismutase eine Adaptorsequenz folgt, die eine EcoRI-Spaltstelle enthält. Die Sequenz des Adapters 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 188 gemäß den Bedingungen des Budapest 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<sub>C100</sub> mit BamHI herausgeschnitten, und ein Fragment von = 3400 bp, das die Kassette enthält, wurde isoliert und gereinigt. Dieses Fragment wurde dann in die BamHI-Spaltsstelle des Hefeektors 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<sup>2d</sup>-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 Clal linearisiert und mit dem vollständigen 2 μ-Plasmid, daß mit Clal linearisiert worden war, ligiert. Das so erhaltene Plasmid, pCBou, 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<sup>2d</sup>-Gen enthielt, ligiert. Das LEU<sup>2d</sup>-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-Expressionskassette 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 platziert. Die einzelnen Kolonien wurden in leu-selektive Medien inkuliert und bis zur Sättigung gezüchtet. Die Kultur wurde zur Expression des SOD-C110-Polypeptids (als C110-3 bezeichnet) durch Wachstum in 1% Glucose enthaltendem YEP induziert.

JSC 308 + C-peptides (die JSC 308 bezeichnet) durch Wachstum in 1% Glucose enthaltenden YE, 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 Budapest-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 Aminoterminus, 5 Aminosäurereste, abgeleitet von dem synthetischen Adaptor, der die EcoRI-Spaltstelle enthält, 363 Aminosäurreste, abgeleitet von der C100-cDNA und 5 carboxyterminalen 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 Carboxyterminus 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 pABC24C100-3 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 ( $10 \times 1$  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 Coomasie-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 Coomasie-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 Dithiothreit 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 Suspendervolumen 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 zweimal

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 Polyacrylamidgelektrophorese 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<sup>+</sup>- und Poly A<sup>-</sup>-Fraktionen beschriebenen Techniken aus einer Leberbiopsie des Schimpansen, von dem der hohe Plasmatischer stammte (vergleiche Abschnitt IV.A.1.), isoliert. Diese RNA-Fraktionen 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 <sup>32</sup>P 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) Dextranulfat, 50 (Gewicht/Volumen) entionisiertem Formamid, 750 mM NaCl, 75 mM Na-Citrat, 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 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 <sup>32</sup>P-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. Aliaqote (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 unmittelbaren 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 MgCl<sub>2</sub>, 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 <sup>32</sup>P durch Nick-Translation markiert worden war, hybridisiert. Die **Fig. 39** zeigt ein Autoradiogramm des Filters. Die Hybridisierungssignale 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-Oligonukleotide 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 durch das Amplifikationssystem zu untersuchenden HCV-Sequenzen enthielten,

wurden aus Leberbiopsieproben von drei Schimpansen mit NANBH und aus zwei Kontroll-Schimpansen iso-

liert. 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 ei-

nem 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, ver-

dünnt 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 Phenophase 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 glei-

chen 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 Zen-

trifugation 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 Gesamt-nucleinsäuren oder RNA), die, wie vorstehend beschrieben, hergestellt worden waren, abgeleitet. Nach Ethanolfällung 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 <sup>32</sup>P 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<sup>TM</sup>-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 <sup>125</sup>I-markiertem Schaf-Anti-Mensch-IgM 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-NANB<sub>5-1-1</sub>

[0373] Das Fusionspolypeptid SOD-NANB<sub>5-1-1</sub>, 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 pelleteierte 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-NANB<sub>5-1-1</sub>-Fusionsprotein enthielt, wurde in 5 ml 6 M Harnstoff in 0,02 M Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM Dithiotreit (Puffer A) aufgelöst und auf eine Säule aus Q-Sepharase-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 Polyacrylamidgelektrophorese in Gegenwart von SDS analysiert, um ihren SOD-NANB<sub>5-1-1</sub>-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 Dithiotreit (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 Polyacrylamidgelektrophorese auf das Vorhandensein von SOD-NANB<sub>5-1-1</sub> analysiert, und die geeigneten Fraktionen wurden vereinigt.

[0375] Das abschließende Präparat des SGD-NANB<sub>5-1-1</sub>-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-NANB<sub>81</sub>

[0376] Das Fusionspolypeptid SOD-NANB<sub>81</sub>, 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 SGD-NANB<sub>5-1-1</sub> beschriebenen Verfahrens (vergleiche Abschnitt IV.D.1.) gereinigt.

[0377] Das abschließend erhaltene Präparat des SOD-NANB<sub>81</sub>-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-NANB<sub>5-1-1</sub> und SOD-NANB<sub>81</sub> vorhanden waren, nachgewiesen wurden.

[0379] Mikrotiterplatten wurden mit SOD-NANB<sub>5-1-1</sub> oder SOD-NRNB<sub>81</sub>, 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-NANB<sub>5-1-1</sub> oder SOD-NANB<sub>81</sub> 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-NANB<sub>5-1-1</sub> und Anti-NANB<sub>81</sub>, die an die Fusionspolypeptide gebunden waren, wurden durch Bindung des <sup>125</sup>I-markierten

F'(ab)<sub>2</sub>-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-NANB<sub>5-1-1</sub> und Anti-NANB<sub>81</sub> 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.

Referenz-Nr. des Patienten	Diagnose	S/N	
		Anti-5-1-1	Anti-81
1. 28 <sup>1</sup>	Chronische NANB, IVD <sup>2</sup>	0,77	4,20
	Chronische NANB, IVD	1,14	5,14
	Chronische NANB, IVD	2,11	4,05
2. 29 <sup>1</sup>	AVH <sup>3</sup> , NANB, sporadisch	1,09	1,05
	Chronische NANB	33,89	11,39
	Chronische NANB	36,22	13,67
3. 30 <sup>1</sup>	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 <sup>4</sup>	16,09	8,05
5. 32 <sup>1</sup>	späte AVH NANB, IVD	0,69	0,94
	späte AVH NANB, IVD	0,73	0,68
6. 33 <sup>1</sup>	AVH, NANB, IVD	1,66	1,96
	AVH, NANB, IVD	1,53	0,56
7. 34 <sup>1</sup>	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 <sup>1</sup>	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-S-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 nichtpersistierende AVH, Typ A	0,68 0,80	0,64 0,65
25. 52	nichtpersistierende kürzliche AVH TYP A nichtpersistierende kürzliche AVH TYP A	1,38 0,80	1,04 0,65
26. 53	AVH, Typ A nichtpersistierende kürzliche AVH Typ A	1,85 1,02	1,16 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 <sup>1</sup>	AVH, HBV geheilte AVH, HBV	0,73 0,43	0,60 0,44
33. 60 <sup>1</sup>	AVH, HBV geheilte AVH, HBV	1,06 0,75	0,92 0,68

Referenz-Nr.

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

<sup>1</sup>Aufeinanderfolgende Serenproben, verfügbar von diesen Patienten<sup>2</sup>IVD = intravenöse Anwendung von Medikamenten<sup>3</sup>AVH = Akute virale Hepatitis<sup>4</sup>PT = 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-NANB<sub>5-1-1</sub> und SOD-NANB<sub>81</sub> vorhandenen HCV-Epitope positiv.

[0383] Jedoch zeigten die Serumproben, die positiv waren, nicht in gleicher Weise eine immunologische Reaktion mit SOD-NANB<sub>5-1-1</sub> und SOD-NANB<sub>81</sub>. Serumproben von dem Patienten Nr. 1 waren für SOD-NANB<sub>81</sub>, aber nicht für SOD-NANB<sub>5-1-1</sub> positiv. Serumproben von den Patienten Nr. 10, 15 und 17 waren für SOD-NANB<sub>5-1-1</sub>, aber nicht für SOD-NANB<sub>81</sub> 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-NANB<sub>5-1-1</sub> als gegen SOD-NANB<sub>81</sub> zeigten. Diese Ergebnisse legen nahe, daß NANB<sub>5-1-1</sub> und NANB<sub>81</sub> 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-NANB<sub>5-1-1</sub> und SOD-NANB<sub>81</sub> 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 NANB<sub>5-1-1</sub>-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 NANB<sub>5-1-1</sub> im Verlauf der NANBH-Infektion

[0386] Das Vorhandensein von Anti-NANB<sub>5-1-1</sub>-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-NANB<sub>5-1-1</sub>-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-NANB<sub>5-1-1</sub>-Antikörper nach dem Einsetzen der akuten Phase der NANBH-Infektion nachgewiesen wurden. Anti-NANB<sub>5-1-1</sub>-Antikörper wurden in Serumproben von Schimpansen, die mit entweder HAV oder HBV infiziert worden waren, nicht nachgewiesen. So dienen Anti-NANB<sub>5-1-1</sub>-Antikörper als Marker für die Exposition eines Individuums gegen HCV.

Tabelle 2

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

Patient/ Schimpanse	Probendatum (Tage) ○=Inokulationstag	Hepatitis- viren	Anti-5-1-1 (S/N)	ALT (μu/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	Probendatum (Tage) o=Inokulationstag	Hepatitis- viren	Anti-5-1-1 (S/N)	ALT (mu/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 NANB<sub>5-1-1</sub>

[0388] Auf der Basis der spezifischen immunologisch Reaktivität des SOD-NANB<sub>5-1-1</sub>-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 NANB<sub>5-1-1</sub> reagieren. Bei diesem Verfahren wird die Affinitätschromatographie verwendet. Das gereinigte SOD-NANB<sub>5-1-1</sub>-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 NANB<sub>5-1-1</sub> 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 chaotrop Reagentien, beispielsweise Harnstoff, freigesetzt. Nitrocellulosemembranen, die gebundenes SOD-NANB<sub>5-1-1</sub> 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-NANB<sub>5-1-1</sub> 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-NANB<sub>5-1-1</sub>-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-NANB<sub>5-1-1</sub>-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 polyclonalen Anti-HCV-Antikörper, die an Polystyrolkugeln gebunden waren, isoliert.

[0392] Polyclonale Anti-NANB<sub>5-1-1</sub>-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. beschrieben.

[0393] Die gereinigten Anti-NANB<sub>5-1-1</sub>-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-NANB<sub>5-1-1</sub>-Antikörper durch Gesamthumanimmunglobulin ersetzt wurden.

[0395] Das Einfangen von HCV aus mit NANBH infiziertem Schimpansenplasma unter Verwendung von an die Kugeln gebundenen Anti-NANB<sub>5-1-1</sub>-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-NANB<sub>5-1-1</sub>-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-NANB<sub>5-1-1</sub>-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-NANB<sub>5-1-1</sub>-Antikörpern beschichteten Kugeln und von Kontrollkugeln, die das Gesamthumanimmunglobulin enthielten, erhalten wurden, wurden auf Nitrocellulosefilter filtriert. Die Filter wurden mit einer <sup>32</sup>P 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-NANB<sub>5-1-1</sub>-Antikörper enthaltenden Kugeln eingefangenen Teilchen enthielten, sind in Fig. 40 gezeigt. Der unter Verwendung des Anti-NANB<sub>5-1-1</sub>-Antikörpers (A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>) erhaltene Extrakt ergab klare Hybridisierungssignale bezogen auf den Extrakt des Kontroll-Antikörpers (A<sub>3</sub>, A<sub>4</sub>) und auf die Kontroll-RNA der Hefe (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>). 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-NANB<sub>5-1-1</sub>-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-NANB<sub>5-1-1</sub>-Antikörpern

[0400] Die immunologische Reaktivität des C100-3-Fusionspolypeptids mit Anti-NANB<sub>5-1-1</sub>-Antikörpern wurde mittels eines Radioimmunassays bestimmt, indem die Antigene an eine feste Phase, gebunden wurden und mit gereinigten Anti-NANB<sub>5-1-1</sub>-Antikörpern stimuliert wurden, und der Antigen-Antikörper-Komplex mit <sup>125</sup>I-markierten Schaf-Anti-Mensch-Antikörpern nachgewiesen wurde. Die immunologische Reaktivität des C100-3-Polypeptids wurde mit der des SOD-NANB<sub>5-1-1</sub>-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-NANB<sub>5-1-1</sub> wurde, wie in Abschnitt IV.B.1. bzw. in Abschnitt IV.D.1. beschrieben, synthetisiert und gereinigt. Gereinigte Anti-NANB<sub>5-1-1</sub>-Antikörper wurden, wie in Abschnitt IV.E. beschrieben, erhalten.

[0402] 100 µl Aliquots, 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 Immunolon 2 Removawell Strips) zugesetzt. Die Platte wurde bei 4°C über Nacht in einer Feuchtkammer inkubiert, danach wurde die Proteinfällung 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-NANB<sub>5-1-1</sub>-Antikörpern umgesetzt. Nach der Inkubation wurde die überschüssige Lösung durch Aspiration entfernt, und die Vertiefungen wurden fünfmal mit EBST gewaschen. Anti-NANB<sub>5-1-1</sub>, das an die Fusionspolypeptide gebunden war, wurde durch die Bindung vor <sup>125</sup>I-markiertem F(ab')<sub>2</sub>-Schaf-Anti-Mensch-IgG an die beschichteten Vertiefungen bestimmt. Aliquots von 100 µl der markierten Sande (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-NANB<sub>5-1-1</sub> im Vergleich zu der von NANB<sub>5-1-1</sub> mit den gereinigten Antikörpern sind in der Tabelle 3 gezeigt.

Tabelle 3  
Immunologische Reaktivität von C100-3 im Vergleich zu NANB<sub>5-1-1</sub> mittels Radioimmunoassay

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

[0403] Die Ergebnisse in Tabelle 3 zeigen, daß Anti-NANB<sub>5-1-1</sub> ein Epitop bzw. Epitope in der C100-Einheit des C100-3-Polypeptids erkennt. So besitzen NANB<sub>5-1-1</sub> 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-NANB<sub>5-1-1</sub>-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-NANB<sub>5-1-1</sub>-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. Aliquots der isolierten genetischen Nucleinsäure, die 3 ml eines Plasmas mit hohem Titer äquivalent waren, wurden auf Nitrocellulosefilter geblottet. Als Kontrollen wurden Aliquots der denaturierten HCV-cDNA aus Clon 81 (2 pg) ebenfalls auf die gleichen Filter geblottet. Die Filter wurden mit einem <sup>32</sup>P-markierten Gemisch aus Plus- oder einem Gemisch aus Minussträngen der einzisträngigen 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 Didesoxykettenminisationsverfahren von Sanger et al. (1977) durchgeführt.

[0407] Jedes einer Reihe von doppelten Filtern, die Aliquots 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

Bahn	A	B
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 Eigenarten 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. Zudem 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  $^{32}\text{P}$ -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  $\beta$ -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 HinclI (12  $\mu\text{g}$ ) 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 ( $3 \times 10^6 \text{ cpm/ml}$  Hybridisierungsgemisch) hybridisiert. Die DNA aus der Leber infizierter Schimpansen und aus normaler Leber wurde mit  $^{32}\text{P}$ -markierter HCV-cDNA aus den Clonen 36 plus 81 hybridisiert. Die DNA aus menschlicher Placenta wurde mit  $^{32}\text{P}$ -markierter DNA aus dem  $\beta$ -Interferongen hybridisiert. Nach der Hybridisierung wurden die Blots unter stringenten Bedingungen, d.h. mit einer Lösung aus  $0,1 \times \text{SSC}$ , 0,1% SDS bei  $65^\circ\text{C}$ , gewaschen.

[0416] Die DNA des  $\beta$ -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-Nachweistechnik unter Verwendung von Primern und Sondenpolynukleotiden, die von der HCV-cDNA von Clon 81 abgeleitet waren, unterworfen. Die negativen Kontrollen waren DNA-Proben, die aus nichtinfizierten HepG2-Gewebekulturzellen 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-Fraktionen, 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  $\mu\text{g}$  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  $\mu\text{g}$  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 waren, vorhanden waren, wurden Proben, die 0,4  $\mu\text{g}$  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-Immilon-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 Probenverdünnung (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<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 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-Phenyldiamindihydrochlorid 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. 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	Immunoglobulin 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

$$\begin{aligned}
 \bar{N} &= 1051 \\
 x &= 0,049^* \\
 SD &= \pm 0,074
 \end{aligned}$$

Endpunkt:  $x + 5SD = 0,419$  (0,400 + negative Kontrolle)

<u>Proben</u>	<u>Anfänglich</u>	<u>Wiederholt</u>		
	<u>reakтив</u>	<u>reakтив</u>	<u>Anti-</u>	<u>HBc***</u>
	<u>OD</u>	<u>OD</u>	<u>ALT**</u>	<u>(IE/l)</u>
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

$$10/1056 = 0,95\% \quad 5/1056 = 0,47\%$$

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

\*\*ALT  $\geq$  68 IE/l ist über den Normalwerten

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

\*\*\*\*WNL: in den normalen Grenzen

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

# DE 38 86 363 T3 2004.09.09

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.I.4. Versuchsgruppe 2: Spender/Empfänger-NANBH

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

ons-assozierter 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/Emnfänger NANB-Versuchsgruppe  
H Alter Spender/Emnfänger NANB-Versuchsgruppe

Fall	Spender		Empfänger-				Post-Tx			
			Vorblut		3 Monate		6 Monate		12 Monate	
	00	S/CO	00	S/CO	00	S/CO	00	S/CO	00	S/CO
1.	---	---	,032	0,07	,112	0,26	>3,000	>6,96	>3,000	>6,96
2.	---	---	,059	0,14	,050	0,12	1,581	3,90	>3,000	>6,96
3.	,903	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

<u>Proben</u>		<u>Anti-ALT*</u>	<u>HBc**</u>
<u>Spender</u>			
Fall 3		normal	negativ
Fall 5		erhöht	positiv
Fall 6		erhöht	positiv
Fall 7		nicht vergübar	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  $\geq$  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>	Verteilung			
	N	N	OD	% Reaktiv
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	0,467		
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 monoklonalen Anti-IgG allein oder in Kombination mit einem monoklonalen Anti-IgM oder unter Verwendung eines polyclonalen Antiserums untersucht. Die 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 monoklonalen 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 monoklonalen 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 monoklonale Anti-IgM-Konjugat getestet wurden, betragen 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 monoklonalen 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 monoklonalen 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-HBe	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	89,3	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	12,0	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	0,3	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-Ergebnisse, erhalten unter Verwendung eines monoklonalen Anti-IgG-Konjuats

<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	,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

<u>Probe</u>	<u>Datum</u>	<u>ALT</u>	<u>NANB ELISAs</u>					
			Monoklonale		Monoklonale		Monoklonale	
			IgG 1:10K	IgG 1:10K	IgG 1:10K	IgM 1:30K	IgM 1:50K	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		,085	
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	06/19/82	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

<u>Probe</u>	<u>Datum</u>	<u>ALT</u>	NANB ELISAs					
			MONOCLONAL		TAGO		JACKSON	
			<u>OD</u>	<u>S/CO</u>	<u>OD</u>	<u>S/CO</u>	<u>OD</u>	<u>S/CO</u>
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	,227	,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	,85	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	1,88	>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.I.6.b. Proben von Zufallsblutspendern

[0447] Proben von Zufallsblutspendern (vergleiche Abschnitt IV.I.1.) wurden auf eine HCV-Infektion abgesucht 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 abgesuchten 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>	<u>Monoklonales Anti-IgG</u>
	(Jackson)	
Anzahl der Proben	1073	1051
Mittelwert ( $\bar{x}$ )	0,0931	0,04926
Standardabweichung (SD)	0,0933	0,07427
5 SD	0,4666	0,3714
Endpunkt (5 SD + $\bar{x}$ )	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>
<u>Untersuchte</u>			
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 Harvard 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-	Anzahl	der Anti-HCV	Abnormalität	
	Serokonvers	Spenden/Spe	positive	des	
	ion in dem	nder	Spender	Ersatzmarkers	
	Patienten				
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-aspN 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 aneliert, 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 Clone 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 hyrophoben 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 Isolaten mit den nachstehend beschriebenen cDNAs durchgeführt werden. Die davon oder von dem viralen Genom codierten Polypeptide können auf immunologische Kreuzreakтивität 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 Gewebskultursystemen 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 sei-nerseits könnte zur Isolierung und Charakterisierung dieser Erreger und zu diagnostischen Reagenzien 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

## Anhängende Zeichnungen

FIG. 1 Translation der DNA 5-1-1

1 AlaSerCysLeuAsnCysSerAlaSerIleIleProAspArgGluValLeuTyrArgGlu  
 GGCCTCCTGCTGAACTGCTCGCGAGCATCACACGGAGTCCTCTACCGAGA  
 CCGGAGGACGAACCTGACGAGCCGCTCGTAGTATGGACTGTCCCTCAGGAGATGGCTCT  
  
 61 PheAspGluMetGluGluCysSerGlnHisLeuProTyrIleGluGlnGlyMetMetLeu  
 GTTCGATGAGATGGAAGAGTGCTCTCAGCACTTACCGTACATCGAGCAAGGGATGATGCT  
 CAAGCTACTCTACCTCTCACGAGAGTCGTGAATGGCATGTAGCTCGTTCCCTACTACGA  
  
 121 AlaGluGlnPheLysGlnLysAlaLeuGlyLeu  
 CGCCGAGCAGTTCAAGCAGAAGGCCCTCGGCCCTCC  
 GCGCCTCGTCAAGTTGTCTCCGGAGCCGGAGG

FIG. 3 Translation der DNA 5-1-1, 81, 91 &amp; 1-2

1 GlyCysValValIleValGlyArgValValLeuSerGlyLysProAlaIleIleProAsp  
 CTGGCTGCCTGGTCATAGTGGGCAGGGTCTGTCTGTCCGGAAAGCCGGCAATCACCTG  
 GACCGACGCACCAGTATCACCGTCCCAGCAGAACAGGCCCTCGGCCGTTAGTGGAC  
  
 61 ArgGluValLeuTyrArgGluPheAspGluMetGluGluCysSerGlnHisLeuProTyr  
 ACAGGGAAAGTCCTCTACCGAGAGTTGATGAGATGGAAGAGTGCTCTCAGCACTTACCGT  
 TGTCCCTTCAGGAGATGGCTCTCAAGCTACTCTACCTCTCACGAGAGTCGTGAATGGCA  
 A  
  
 121 IleGluGlnGlyMetMetLeuAlaGluGlnPheLysGlnLysAlaLeuGlyLeuLeuGln  
 ACATCGAGCAAGGGATGATGCTCGCCGAGCAGTTCAAGCAGAAGGCCCTCGGCCCTCCIGC  
 TAGCTCGTTCCCTACTACGAGCGGCTCGTCAAGTTGTCTCCGGAGCCGGAGGGACG  
  
 181 ThrAlaSerArgGlnAlaGluValIleAlaProAlaValGlnThrAsnTrpGlnLysLeu  
 AGACCGCGTCCCGTCAGGCAGAGGTTATCGCCCTGCTGTCCAGACCAACTGGCAAAAAC  
 TCTGGCGCAGGGCAGTCCGTCTCCAATAGCGGGGACGACAGGTCTGGTTGACCGTTTTTG  
  
 241 GluThrPheTrpAlaLysHisMetTrpAsnPheIleSerGlyIleGlnTyrLeuAlaGly  
 TCGAGACCTTCTGGCGAAGCATATGTGGAACTTCATCAGTGGGATACAATACTTGGCGG  
 AGCTCTGGAAGACCCGCTCGTATACACCTTGAAGTAGTCACCCATGTTATGAACCGCC  
  
 301 LeuSerThrLeuProGlyAsnProAlaIleAlaSerLeuMetAlaPheThrAlaAlaVal  
 GCTTGTCACGCTGCCCTGGTAACCCCGCCATTGCTTCATTGATGGCTTTACAGCTGCTG  
 CGAACAGTTGCGACGGACCATTGGGGCGTAACGAAAGTAACCTACCGAAAATGTCGACGAC  
  
 361 ThrSerProLeuThrThrSerGln  
 TCACCAAGCCCCACTAACCACTAGCCAAA  
 AGTGGTCGGGTGATTGGTGATCGGTTT

၃၅

FIG. 4 Translation der DNA 81

1 SerGlyLysPrcAlaIleIleProAspArgGluValLeuTyrArgGluPheAspGluMet  
 GTCCGGGAAGCCCGCAATCATACCTGACAGGGAAAGTCCTCTACCGAGAGTTGATGAGAT  
 CAGGCCCTCGGCCGTTAGTAGATGGACTGTCCCTCAGGAGATGGCTCTCAAGCTACTCTA  
 61 GluGluCysSerGlnHisLeuProTyrIleGluGlnGlyMetMetLeuAlaGluGlnPhe  
 GGAAGAGTGTCTCAGCACTTACCGTACATCGAGCAAGGGATGATGCTCGCCGAGCAGTT  
 CCTTCTCACGAGAGTCGTGAATGGCATGTAGCTCGTCCCTACTACGAGCGGCTCGTCAA  
 121 LysGlnLysAlaLeuGlyLeuLeuGlnThrAlaSerArgGlnAlaGluValIleAlaPro  
 CAAGCAGAAGGCCCTCGGCCCTGCAGACCGCGTCCCGTCAGGAGGGTTATGCC  
 GTTCGTCTCCGGAGCCGGAGGACGTCTGGCGCAGGGCAGTCCGTCTCCAATAGCGGGG  
 181 AlaValGlnThrAsnTrpGlnLysLeuGluThrPheTrpAlaLysHisMetTrpAsnPhe  
 TGCTGTCCAGACCAACTGGCAAAAACTCGAGACCTCTGGCGAAGCATAATGTGAACTT  
 ACGACAGGTCTGGTTGACCGTTTGAGCTCTGGAAGACCCGCTTCGTATACACCTTGAA  
 241 IleSerGlyIleGlnTyrLeuAlaGlyLeuSerThrLeuProGlyAsnProAlaIleAla  
 CATCAGTGGGATACAATACTTGGCGGGCTTGTCAACGCTGCCGGTAACCCGGCATTGC  
 GTAGTCACCTATGTTATGAACCGCCCCAACAGTGGCACGGACCATTGGGGCGTAACG  
 301 SerLeuMetAlaPheThrAlaAlaValThrSerProLeuThrThrSerGln  
 TTCAATTGATGGCTTTACAGCTGCTGCAACAGCCCCTAACCACTAGCCAAA  
 AAGTAACCTACCGAAAATGTCGACGACAGTGGTGGGTGATTGGTGTACGGTTT

FIG. 5 Translation der DNA 36

1 AspAlaHisPheLeuSerGlnThrLysGlnSerGlyGlnAsnLeuProTyrLeuValAla  
 GATGCCCACTTCTATCCCAGACAAAGCAGAGTGGGAGAACCTCTTACCTGGTAGCG  
 CTACGGGTGAAAGATAGGGTCTGTTCTGTCACCCCTCTGGAGGAATGGACCATTGCG  
 61 TyrGlnAlaThrValCysAlaArgAlaGlnAlaProProProSerTrpAspGlnMetTrp  
 TACCAAGCCACCGTGTGGCTAGGGCTCAAGCCCTCCCCATCGTGGGACAGATGTGG  
 ATGGTTGGTGGCACACCGCATTCCGAGCTGGGAGGGTAGCACCCCTGGTCTACACC  
 121 LysCysLeuIleArgLeuLysProThrLeuHisGlyProThrProLeuLeuTyrArgLeu  
 AAGTGGTTGATTCGCTCAAGCCCACCTCCATGGGCCAACACCCCTGCTATACAGACTG  
 TTCACAAACTAACGGAGTTGGGTGGGAGGTACCCGGTTGTGGGACGATATGCTGAC  
 181 GlyAlaValGlnAsnGluIleThrLeuThrHisProValThrLysTyrIleMetThrCys  
 GGCCTGTTCAAGAAATCACCCCTGACGCACCCAGTCACCAAATACATCATGACATGC  
 CCGCGACAAGTCTTACTTAGTGGGACTGCGTGGGTCACTGGTTATGTAGTACTGTACG  
 241 MetSerAlaAspLeuGluValValThrSerThrTrpValLeuValGlyGlyValLeuAla  
 ATGTCGGCCGACTGGAGGTGTCAGCAGGACCTGGGTGCTGTTGGGGCGTCTGGCT  
 TACAGCCGGCTGGACCTCCAGCAGTGTGTCGGACCCACGAGCAACCGCCGAGGACCGA  
 301 AlaLeuAlaAlaTyrCysLeuSerThrGlyCysValValIleValGlyArgValLeu  
 GCTTTGGCCGCGTATTGCTGTCAACAGGCTGGTGGTCATAGTGGCAGGGTCGTCTG  
 CGAAACCGGGCATAACGGACAGTTGTCCGACGCACCAAGTACCCGTCCCAGCAGAAC  
 Überlappung mit 81  
 361 SerGlyLysPraAlaIleIleProAspArgGluValLeuTyrArg  
 TCCGGGAAGCCCGCAATCATACCTGACAGGGAAAGTCCTCTACCGAG  
 AGGCCCTCGGCCGTTAGTAGATGGACTGTCCCTCAGGAGATGGCTC

**FIG. 6** Kombinierter ORF der DNAs 36 und 81

1 AspAlaHisPheLeuSerGlnThrLysGlnSerGlyGluAsnLeuProTyrLeuValAla  
 GATGCCACTTCTATCCCAGACAAAGCAGAGGGAGAACCTCTTACCTGGTAGCG  
 CTACGGGTGAAAGATAGGGCTGTTCTCACCCCTCTGGAGGAATGGACCATCGC  
 TyrGlnAlaThrValCysAlaArgAlaGlnAlaProProProSerTyrAspGlnMetTrp  
 61 TACCAAGCCACCGTGTGGCTAGGGCTCAAGCCCCCTCCCCATCGTGGGACCAAGATGTGG  
 ATGGTCGGTGGCACACCGATCCGAGTTGGGGAGGGTAGCACCCCTGGCTACACC  
 LysCysLeuIleArgLeuLysProThrLeuHisGlyProThrProLeuLeuTyrArgLeu  
 121 AAGTGTGATTCGCTCAAGCCCACCCCATGGGCCAACACCCCTGCTATACAGACTG  
 TTCACAAACTAAGCGGAGTTGGGGAGGTACCCGGTTGTGGGGACGATATGTCIGAC  
 GlyAlaValGlnAsnGluIleThrLeuThrHisProValThrLysTyrIleMetThrCys  
 181 GGCCTGTCAGAACATGAAATCACCCCTGACGCACCCAGTCACCAAATACATCATGACATGC  
 CCGCGACAAGTCTTACTTAGTGGACTGCGTGGTCAGTGGTTATGTAGTACTGTACG  
 MetSerAlaAspLeuGluValValThrSerThrTrpValLeuValGlyGlyValLeuAla  
 241 ATGTCGGCCGACCTGGAGGTCTCACGAGCACCTGGTGGTCGTTGGCGCGTCTGGCT  
 TACAGCCGGCTGGACCTCCAGCAGTGCTCGTGGACCCACGAGCAACGCCGAGGACCGA  
 AlaLeuAlaAlaTyrCysLeuSerThrGlyCysValValIleValGlyArgValValLeu  
 301 GCTTGGCCGCGTATTGCTCTGTCACACAGGCTGGTGGTCATAGTGGCAGGGTCGCTTG  
 CGAAACCGGCCATAACGGACAGTTGTCGGACGCCACAGTATCACCCGCTCCRGCGAAC  
 SerGlyLysProAlaIleIleProAspArgGluValLeuTyrArgGluPheAspGluMet  
 361 TCCGGGAAGCCGGCAATCATACCTGACACAGGAAAGTCCTCACCGAGAGTTCGATGAGATG  
 AGGCCCTCGGCCGTTAGTATGGACTGTCCTCAGGAGATGGCTCTCAAGCTACTCTAC  
 GluGluCysSerGlnHisLeuProTyrIleGluGlnGlyMetMetLeuAlaGluGlnPhe  
 421 GAACTGCTCTCAGCACTACCGTACATCGAGCAAGGGATGATGCTCGCCGAGCAGTTC  
 CCTTCACGAGAGTCGTGAATGGCATGTTAGCTCGTCCCTACTACGAGCGGCTCGTCAAG  
 LysGlnLysAlaLeuGlyLeuLeuGlnThrAlaSerArgGlnAlaGluValIleAlaPro  
 481 AAGCAGAAGGCCCTGGCCCTCTGAGACCCGCTCCGTAGGAGAGGTTATGCCCT  
 TTGCTCTCCGGAGCCGGAGCGCTCTGGCGCAGGGCAGTCCGTCTCCAATAGCGGGGA  
 AlaValGlnThrAsnTrpGlnLysLeuGluThrPheTrpAlaLysHisMetTrpAsnPhe  
 541 GCTGTCAGACCAACTGGCAAAAACCTCGAGACCTCTGGCGAAGCATATGTGGAACTTC  
 CGACAGGTCTGGTTGACCGTTTGAGCTCTGGAAAGACCCGCTCGTATACACCTTGAAG  
 IleSerGlyIleGlnTyrLeuAlaGlyLeuSerThrLeuProGlyAspProAlaIleAla  
 601 ATCAGTGGGATACAATACTTGGCGGGCTTGTCAACGCTGCCGTAAACCCGCCATTGCT  
 TAGTCACCCATGTTATGAACCGCCGAAACAGTTGCGACGGACCATTGGGGCGGTAAACGA  
 SerLeuMetAlaPheThrAlaAlaValThrSerProLeuThrThrSerGln  
 661 TCATTGATGGCTTTACAGCTGCTGTCACCAGCCCCTAACCAACTAGCCAAA  
 AGTAACCTACCGAAAAATGTCGACGACAGTGGTGGGTGATTGGTGATCGGTTT

**FIG. 7** Translation der DNA 32

Überlappung mit 81

1	PheThrAlaAlaValThrSerProLeuThrThrSerGlnThrLeuLeuPheAsnIleLeu CTTTTACAGCTGTCACCAGCCCCACTAACCACTAGCCAAACCCTCTCTTCAACATAT GAAAATGTCGACGACAGTGGTCTGGTGATTGGTGTACGGTTGGGAGGAAGTTGTATA
61	GlyGlyTrpValAlaAlaGlnLeuAlaAlaProGlyAlaAlaThrAlaPheValGlyAla TGGGGGGGTGGGTGGCTGCCAGCTCGCCGCCGGTGCCTACTGCCTTGTTGGCG ACCCCCCCCACCCACCGACGGGTCGAGCGGGGGGCCACGGCAGTACGGAAACACCCGC
121	GlyLeuAlaGlyAlaAlaIleGlySerValGlyLeuGlyLysValLeuIleAspIleLeu CTGGCTTAGCTGGCGCCGCATCGGCAGTGTGGACTGGGAAGGTCTCATAGACATCC GACCGAATCGACCGCGGGTAGCCGTACAACCTGACCCCTTCAGGAGTATCTGTAGG
181	AlaGlyTyrGlyAlaGlyValAlaGlyAlaLeuValAlaPheLysIleMetSerGlyGlu TTGCAGGGTATGGCGCGGGGTGGCGGGAGCTCTGTGGCATTCAAGATCATGAGCGGTG AACGTCCCATAACCGCGCCCGACCGCCCTCGAGAACACCGTAAGTTCTAGTACTCGCAC
241	ValProSerThrGluAspLeuValAsnLeuLeuProAlaIleLeuSerProGlyAlaLeu AGGTCCCCCTCCACGGAGGACTGGTCAATCTACTGCCGCATCCTCTGCCCGGAGCCC TCCAGGGGAGGTGCCCTCGGACCAGTTAGATGACGGCGGTAGGAGAGCGGGCTCGGG
301	ValValGlyValValCysAlaAlaIleLeuArgArgHisValGlyProGlyGlyAla TCGTAGTCGGCGTGGTCTGTGCAGCAATACTGCGCCGGCAGTTGGCCCGGGCGAGGGGG AGCATCAGCCGCACCAGACACGTCTGTTATGACGGGGCGTGCACCGGGCCGCTCCCCC
361	ValGlnTrpMetAsnArgLeuIleAlaPheAlaSerArgGlyAsnHisValSer CAGTGCAGTGGATGAACCGGGCTGATAGCCTTCGCCCTCCGGGGAACCATGTTCCCC GTCACGTCACCTACTTGGCCGACTATCGGAAGCGGAGGGCCCCCTGGTACAAAGGGG

**FIG. 8** Translation der DNA 35

1 SerIleGluThrIleThrLeuProGlnAspAlaValSerArgThrGlnArgArgGlyArg  
 TCCATTGAGACAATCACGCTCCCCCAGGATGCTGTCTCCGCACTCACAGTCGGGCAGG  
 AGGTAACCTGTAGTGCGAGGGGTCTACGACAGAGGGCGTGAGTTGCAGCCCCGTCC  
 61 ThrGlyArgGlyLysProGlyIleTyrArgPheValAlaProGlyGluArgProSerGly  
 ACTGGCAGGGGGAAAGCCAGGCATCTACAGATTGTGGCACCGGGGAGCGCCCTCCGGC  
 TGACCGTCCCCCTCGGTCCTAGATGTCTAACACCGTGGCCCCCTCGCGGGAGGCCG  
 121 MetPheAspSerSerValLeuCysGluCystyrAspAlaGlyCysAlaTrpTyrGluLeu  
 ATGTCGACTCGTCCGTCTCTGTGAGTGCTATGACGCAGGCTGTGCTTGATGAGCTC  
 TACAAGCTGAGCAGGCAGGAGACACTCACGATACTGCGTCCGACACGAACCATACTCGAG  
 181 ThrProAlaGluThrThrValArgLeuArgAlaTyrMetAsnThrProGlyLeuProVal  
 ACGCCCAGCGAGACTACAGTTAGGCTACGAGCGTACATGAAACACCCGGGCTTCCCGTG  
 TGCGGGCGGCTCTGATGTCAATCCGATGCTCGCATGTACTTGCGGGCCCCGAAGGGCAC  
 241 CysGlnAspHisLeuGluPheTrpGluGlyValPheThrGlyLeuThrHisIleAspAla  
 TGCCAGGACCATTTGAATTTGGGAGGGCGTCTTACAGGCCTCACTCATATAAGATGCC  
 ACGGTCTGGTAGAACTTAAACCTCCCGCAGAAATGTCCGGAGTGAGTATATCTACGG  
 301 HisPheLeuSerGlnThrLysGlnSerGlyGluAsnLeuProTyrLeuValAlaTyrGln  
 CACTTCTATCCAGACAAAGCAGAGTGGGAGAACCTCTTACCTGGTAGCGTACCAA  
 GTGAAAGATAAGGTCTGTTCTGCTCACCCCTTTGAAGGAATGGACCATCGCATGGTT  
 Überlappung mit 36.  
 361 AlaThrValCysAlaArgAlaGinAlaProProProSerTrpAspGlnMetTrpLysCys  
 GCCACCGTGTGCGCTAGGGCTCAAGCCCCTCCCCATCGTGGGACCAGATGTGGAAGTGT  
 CGGTGGCACACCGCGATCCCGAGTTGGGGAGGGGGTAGCACCTGGTCTACACCTTCACA  
 421 LeuIleArgLeuLysProThrLeuHisGlyProThrProLeuLeuTyrArgLeuGlyAla  
 TTGATTGCGCTCAAGCCCACCCCTCCATGGGCCAACACCCCTGCTATACAGACTGGCGCT  
 AACTAAGCGGAGTTCGGGTGGGAGGTACCCGGTTGTGGGGACGATATGTCTGACCCCGCA

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

1 SerIleGluThrIleThrLeuProGlnAspAlaValSerArgThrGlnArgArgGlyArg  
TCCATTGAGACAAATCACGCTCCCCCAGGATGCTGTCTCCCGCACTCAACGTGGGGCAGG  
AGGTAACCTCTGTTAGTGGCAGGGGGTCCTACGACAGAGGGCTGAGTTGCAGCCCCGTCC

61 ThrGlyArgGlyLysProGlyIleTyrArgPheValAlaProGlyGluArgProSerGly  
ACTGGCAGGGGGAAAGCCAGGCATCTACAGATTGTGGCACCCGGAGCGCCCTCCGGC  
TGACCGTCCCCCTTCGGTCCGTAGATGTCTAACACCGTGGCCCCCTCGCGGGAGGCCG

121 MetPheAspSerSerValLeuCysGluCysTyrAspAlaGlyCysAlaTrpTyrGluLeu  
ATGTCGACTCGTCCGTCCCTGTGAGTGCTATGACCGAGGCTGTGCTTGGT/TGAGCTC  
TACAAGCTGAGCAGGCAAGGAGACACTCACGATACTCGTCCGACACGAACCATACTCGAG

181 ThrProAlaGluThrThrValArgLeuArgAlaTyrMetAsnThrProGlyLeuProVal  
ACGCCCGCCGAGACTACAGTTAGGCTACGAGCGTACATGAACACCCCCGGGCTTCCCCTG  
TGCAGGGCGGCTCTGATGTCATCCGATGCTCGCATGTACTTGTGGGCCCCGAGGGCAC

241 CysGlnAspHisLeuGluPheTrpGluGlyValPheThrGlyLeuThrHisIleAspAla  
TGCCAGGACCATCTGAATTGGGGAGGGCGCTTTACAGGCCTCACTCATATAGATGCC  
ACGGTCCCTGGTAGAACTTAAACCTCCCGCAGAAATGTCCGGAGTAGAGTATATCTACGG

301 HisPheLeuSerGlnThrLysGlnSerGlyGluAsnLeuProTyrLeuValAlaTyrGln  
CACTTCTATCCCAGACAAAGCAGAGTGGGGAGAACCTTCTTACCTGGTAGCGTACCAA  
GTGAAAGATAGGGCTCTGTTCTGTCACCCCTCTGGAGGAATGGACCATCGCATGGTT

361 AlaThrValCysAlaArgAlaGlnAlaProProProSerTrpAspGlnMetTrpLysCys  
GCCACCGTGTGCGCTAGGGCTCAAGCCCCCTCCCCATCGTGGGACCAAGATGTGGAAAGTGT  
CGGTCGCAACCGCGATCCCGAGTTCTGGGAGGGTAGCACCCTGGCTACACCTTCACA

421 LeuIleArgLeuLysProThrLeuHisGlyProThrProLeuLeuTyrArgLeuGlyAla  
TTGATTCGCCTCAAGCCCACCCCTCCATGGCCACACCCCCCTGCTATAACAGACTGGGGCT  
AACTAACGGGAGTTCTGGGAGGTACCCGGTTGTGGGAGCATATGTCTGACCCCGCA

481 ValGlnAsnGluIleThrLeuThrHisProValThrLysTyrIleMetThrCysMetSer  
GTTCAGAATGAAATCACCCCTGACGCACCCAGTCACCAAATACATCATGACATGCTGTG  
CTACTTACTTACTGTGGGACTGGCTGGGTCACTGGTTATGTAGTACTGTACGTACAGC

541 AlaAspLeuGluValValThrSerThrTrpValLeuValGlyGlyValLeuAlaAlaLeu  
GCCGACCTGGAGGTGTCAGCAGCACCTGGGTGCTTGGGGCGTCTGGCTGCTTGG  
CGGCTGGACCTCCAGCAGTGTGCTGGACCCACGAGCAACCGCCCGAGGACCGACGAAAC

601 AlaAlaTyrCysLeuSerThrGlyCysValValIleValGlyArgValValLeuSerGly  
GCCCGGTATTGCCTGTCAACAGGCTGGTCAAGTGGGAGGGTGTCTTGTCCGGG  
CGGGCGATAACGGACAGTTGTCCGACGCACCAAGTATCACCGTCCAGCAGAACAGGGCCC

661 LysProAlaIleIleProAspArgGluValLeuTyrArgGluPheAspGluMetGluGlu  
AAGCCGGCAATCATACCTGACAGGGAACTCCTACCGAGAGTTGCTGATGAGATGGAAGAG  
TTCTGGCCGTTAGTATGGACTGTCCCTCAGGAGATGGCTCAAGCTACTCACCTTC

721 CysSerGlnHisLeuProTyrIleGluGlnGlyMetMetLeuAlaGluGlnPheLysGln  
TGCTCTCAGCACTTACCGTACATCGACCAAGGGATGATGCTGGCGAGCAGTTCAAGCAG  
ACGAGAGTCGTGAATGGCATGTAGCTCGTCCCTACTACGAGCGCTGTCAAGTTGTC

781 LysAlaLeuGlyLeuLeuGlnThrAlaSerArgGlnAlaGluValIleAlaProAlaVal  
AAGGCCCTCGGCTCTGCAGACCGCGTCCCGTCAAGGAGGTTATGCCCTGCTGTC  
TTCTGGGAGCCGGAGGACGTCTGGCGAGGGCACTCCGTCCTCAATAGGGGGACGACAG

841 GlnThrAsnTrpGlnLysLeuGluThrPheTrpAlaLysHisMetTrpAsnPheIleSer  
 CAGACCAACTGGCAAAAACCTCGAGACCTTCTGGGCGAAGCATATGTGGAACCTTCATCAGT  
 GTCTGGTTGACCGTTTGAGCTCTGGAAAGACCCGTTCTGTATAACACCTTGAAGTAGTCA  
 GlyIleGlnTyrLeuAlaGlyLeuSerThrLeuProGlyAsnProAlaIleAlaSerLeu  
 901 GGGATACAATACTTGGCGGGCTTGTCAACGCTGCCTGGTAACCCCCGCCATTGCTTCATTG  
 CCCTATGTTATGAAACCGCCCGAACAGTGGCAGGGACCATTGGGCGGTAAACGAAGTAAC  
 MetAlaPheThrAlaAlaValThrSerProLeuThrSerGlnThrLeuLeuPheAsn  
 961 ATGGCTTTTACAGCTGCTGTCAACAGCCCACTAACCACTAGCCAAACCCCTCTTCAC  
 TACCGAAAATGTCGACGACAGTGGTCGGGTGATTGGTATGGTTGGGAGGAGAAGTTG  
 IleLeuGlyGlyTrpValAlaAlaGlnLeuAlaAlaProGlyAlaAlaThrAlaPheVal  
 1021 ATATTGGGGGGGTGGGTGGCTGCCAGCTGCCGCCCCGGTGCCGCTACTGCCCTTG  
 TATAACCCCCCACCCACCGACGGTCGAGCGGGGGCACGGCGATGACGGAAACAC  
 GlyAlaGlyLeuAlaGlyAlaAlaIleGlySerValGlyLeuGlyLysValLeuIleAsp  
 1081 GGCGCTGGCTTAGCTGGCGCCCATCGGCAGTGGACTGGGAAGGTCTCATAGAC  
 CCGCGACCGAATCGACCGCGGGCGGTAGCGTCACAACCTGACCCCTCCAGGAGTATCTG  
 IleLeuAlaGlyTyrGlyAlaGlyValAlaGlyAlaLeuValAlaPheLysIleMetSer  
 1141 ATCCTTGCAGGGTATGGCGGGCGTGGCGGGAGCTTGTGGATTCAAGATCATGAGC  
 TAGGAACGTCCCATAACCGCGCCCGCACCGCCCTCGAGAACACCGTAAGTTCTAGTACTCG  
 GlyGluValProSerThrGluAspLeuValAsnLeuLeuProAlaIleLeuSerProGly  
 1201 GGTGAGGTCCCCCTCCACGGAGGACCTGGTCAACTACTGCCGCCATCCTCTGGCGGAG  
 CCACTCCAGGGGAGGTGCCTCTGGACCAGTTAGATGACGGCGGTAGGAGAGCGGGCCT  
 AlaLeuValValGlyValValCysAlaAlaIleLeuArgArgHisValGlyProGlyGlu  
 1261 GCCCTCGTAGTCGGCGTGGCTGTGCAGCAATACTGCGCCGGCACGTTGGCCCGGGCGAG  
 CGGGAGCATCAGCCGCACCAAGACACGTCGTTATGACGCGGGCGTGCACCGGGCCCCGCTC  
 GlyAlaValGlnTrpMetAsnArgLeuIleAlaPheAlaSerArgGlyAsnHisValSer  
 1321 GGGGCAGTGCAGTGGATGAACCGGCTGATAGCCTTCGCCTCCGGGGAACCATGTTCCCC  
 CCCCGTCACGTACCTACTTGGCCGACTATCGGAAGCGGAGGGCCCCCTGGTACAAAGGGG

FIG. 9-2

**FIG. 10** Translation der DNA 37b

1 LeuAlaAlaLysLeuValAlaLeuGlyIleAsnAlaValAlaTyrTyrArgGlyLeuAsp  
 CTCGGCGCAAAGCTGGTCGCATTGGCATCAATGCCGTGCCCTACTACCGCGGTCTTGAC  
 GAGCGCGTTTCGACCAGCGTAACCGTAGTTACGGCACCGGATGATGGCGCCAGAACTG  
  
 61 ValSerValIleProThrSerGlyAspValValValValAlaThrAspAlaLeuMetThr  
 GTGTCCGTCTACCCGACCAGCGGCGATGTTGTCGTGCGCAACCGATGCCCTCATGACC  
 CACAGGCACTAGGGCTGGTCGCCCTACAACAGCAGCACCGTTGGCTACGGGACTACTGG  
  
 121 GlyTyrThrGlyAspPheAspSerValIleAspTyrAsnThrCysValThrGlnThrVal  
 GGCTATAACCGGCAGCTTCGACTCGGTGATAGACTACAATACGTGTGTCACCCAGACAGTC  
 CCGATAATGGCCGCTGAAGCTGAGCCACTATCTGAIGTTATGCACACAGTGGGCTGTCAG  
  
 181 AspPheSerLeuAspProThrPheThrIleGluThrIleThrLeuProGlnAspAlaVal  
 GATTTCAGCCTTGACCCCTACCTCACCAATTGAGACAATCACGCTCCCCCAGGATGCTGTC  
 CTAAAGTCGAACTGGGATGGAAGTGGTAACCTGTTAGTGCAGGGGGTCTACGACAG  
 Clon 35 \_\_\_\_\_ Überlappung mit  
 241 SerArgThrGlnArgArgGlyArgThr  
 ~ AGGGCGTGAGTTGCAGCCCCGTCCTGAC

**FIG. 11** Translation der DNA 33b

Überlappung mit 32 \_\_\_\_\_

1 MetAsnArgLeuIleAlaPheAlaSerArgGlyAsnHisValSerProThrHisTyrVal  
 GATGAACCGGCTGATAGCCCTGCCCTCCGGGGAAACATGTTCCCCCACGCACTACGT  
 CTACTTGGCGACTATCGGAGCGGGCCCCCTTGATACAAAGGGGTGCGTGATGCA  
  
 61 ProGluSerAspAlaAlaAlaArgValThrAlaIleLeuSerSerLeuThrValThrGln  
 GCCGGAGAGCGATGCAGCTGCCCGCTACTGCCATACTCAGCAGCCTCACTGTAACCCA  
 CGGCCTCTGCTACGTCGACGGCGCAGTGACGGTATGAGTCGTCGGAGTGACATTGGGT  
  
 121 LeuLeuArgArgLeuHisGlnTrpIleSerSerGluCysThrThrProCysSerGlySer  
 GCTCCTGAGGCGACTGCACCAAGTGGATAAGCTGGAGTGTACCACTCCATGCTCCGGITC  
 CGAGGACTCCGCTGACGTGGTACCTATTGAGCCTCACATGGTGAGGTACGAGGCCAAG  
  
 181 TrpLeuArgAspIleTrpAspTrpIleCysGluValLeuSerAspPheLysThrTrpLeu  
 CTGGCTAACGGGACATCTGGACTGGATAATGCGAGGTGTTGAGCGACTTTAAGACCTGGCT  
 GACCGATTCCCTGTAGACCCCTGACCTATAACGCTCCACAACTCGCTGAAATTCTGGACCGA  
  
 241 LysAlaLysLeuMetProGlnLeuProGlyIleProPheValSerCysGlnArgGlyTyr  
 AAAAGCTAACGCTCATGCCACAGCTGCCCTGGGATCCCCTTGTGTCCTGCCAGCGCGGGTA  
 TTTTCGATTGAGTACGGTGTGACGGACCCCTAGGGGAAACACAGGACGGTGCAGGCCAT  
  
 301 LysGlyValTrpArgVal  
 TAAGGGGGTCTGGCGAGTG  
 ATTCCCCCAGACCGCTCAC

**FIG. 12** Translation der DNA 40b

1 AlaTyrMetSerLysAlaHisGlyIleAspProAsnIleArgThrGlyValArgThrIle  
 GGCTTACATGTCCAAGGCTCATGGATCGATCCTAACATCAGGACCAGGGTGAGAACAT  
 CCGAATGTACAGGTTCCGAGTACCCTAGCTAGGATTGTAGTCCTGGCCCCACTT TTGTTA  
 61 ThrThrGlySerProIleThrTyrSerThrTyrGlyLysPheLeuAlaAspGlyGlyCys  
 TACCACTGGCAGCCCCATCACGTACTCCACCTACGGCAAGTTCCCTGCCGACGGCGGGTG  
 ATGGTGAACCGTGGGGTAGTGCATGAGGTGGATGCCGTTCAAGGAACGGCTGCCGCCAC  
 121 SerGlyGlyAlaTyrAspIleIleIleCysAspGluCysHisSerThrAspAlaThrSer  
 CTCGGGGGGCGCTTATGACATAATAATTGTGACCGAGTGCCACTCCACGGATGCCACATC  
 GAGCCCCCGCGAACTACTGTATTATAAACACTGCTCACGGTGAGGTGCCCTACGGTAG  
 ~ 181 IleLeuGlyIleGlyThrValLeuAspGlnAlaGluThrAlaGlyAlaArgLeuValVal  
 CATCTGGGCATCGGCACTGTCCCTGACCAAGCAGAGACTGCGGGGGCGAGACTGGTTGT  
 GTAGAACCCGTAGCCGTGACAGGACTGGTCTCTGACGCCCGCTCTGACCAACA  
 241 LeuAlaThrAlaThrProProGlySerValThrValProHisProAsnIleGluGluVal  
 GCTCGCCACCGCACCCCTCCGGCTCGTCACTGTGCCCATCCAACATCGAGGAGGT  
 CGAGCGGTGGCGGTGGGAGGCCCGAGGCAGTGACACGGGTAGGGTTGTAGCTCCTCCA  
 301 AlaLeuSerThrThrGlyGluIleProPheTyrGlyLysAlaIleProLeuGluValIle  
 TGCTCTGTCCACCACCGGAGAGATCCCCTTTACGGCAAGGCTATCCCCCTCGAAGTAAT  
 ACGAGACAGGTGGTGGCCTCTAGGGAAAAATGCCGTTCCGATAGGGGAGCTTCATTA  
 361 LysGlyGlyArgHisLeuIlePheCysHisSerLysLysCysAspGluLeuAlaAla  
 CAAGGGGGGGAGACATCTCATCTTCTGTCAATTCAAAGAAGATGCGACGAACCTGCCGC  
 GTTCCCCCCCTCTGTAGAGTAGAACAGTAAGTTCTTCACGCTGCTTGAGCGCG  
 \_\_\_\_\_ Überlappung mit 37b \_\_\_\_\_  
 421 LysLeuValAlaLeuGlyIleAsnAlaValAlaTyrTyrArgGlyLeuAspValSerVal  
 AAAGCTGGTCGCATTGGGCATCAATGCCGTGGCCTACTACCGCGGTCTGACGTGCCGT  
 TTTCGACCAGCGTAACCGTAGTTACGGCACCGGATGAGGGCCAGAACACTGCACAGGCA  
 481 IleProThr  
 CATCCCGACCAG  
 GTAGGGCTGGTC

**FIG. 13** Translation der DNA 25c

1 CysSerLeuThrValThrGlnLeuLeuArgArgLeuHisGlnTrpIleSerSerGluCys  
 ACTGCAGCCTCACTGTAACCCAGCTCCTGAGGCAGTGCACCAGTGGATAAGCTCGGAGT  
 TGACGTCGGAGTGACATTGGGTGAGGACTCCGCTGACGTGGTCACCTATTCGAGCCTCA

---

61 ThrThrProCysSerGlySerTrpLeuArgAspIleTrpAspTrpIleCysGluValLeu  
 GTACCACTCCATGCTCCGGTCCCTGGCTAAGGGACATCTGGGACTGGATATGCGAGGGTGT  
 CATGGTGAGGTACGAGGCCAAGGACCGATTCCCTGTAGACCTATACGCTCCACA

Überlappung mit 33b

---

121 SerAspPheLysThrTrpLeuLysAlaLysLeuMetProGlnLeuProGlyIleProPhe  
 TTGAGCGACTTTAACACCTGGCTAAAGCTAACGCTCATGCCACAGCTGCCTGGATCCCCT  
 ACTCGCTGAAATTCTGGACCGATTTCGATTGACTACGGTGTGACGGACCCCTAGGGGA

---

181 ValSerCysGlnArgGlyTyrLysGlyValTrpArgGlyAspGlyIleMetHisThrArg  
 TTGTGTCCTGCCAGCGCGGGTATAAGGGGGTCTGGCGAGGGACGGCATCATGCACACTC  
 AACACAGGACGGTCGCGCCCATATTCCCCCAGACCGCTCCCTGCCGTAGTACGTGTGAG

241 CysHisCysGlyAlaGluIleThrGlyHisValLysAsnGlyThrMetArgIleValGly  
 GCTGCCACTGTGGAGCTGAGATCACTGGACATGTCAAAACGGGACGATGAGGATCGTCG  
 CGACGGTGACACCTCGACTCTAGTGACCTGTACAGTTTGCCCTGCTACTCCTAGCAGC

301 ProArgThrCysArgAsnMetTrpSerGlyThrPheProIleAsnAlaTyrThrThrGly  
 GTCCTAGGACCTGCAGGAACATGTGGAGTGGGACCTTCCCCATTAAATGCCAACCACCG  
 CAGGATCCTGGACGTCCTGTACACCTCACCCCTGGAAGGGGTAAATTACGGATGTGGTGCC

361 ProCysThrProLeuProAlaProAsnTyrThrPheAlaLeuTrpArgValSerAlaGlu  
 GCCCTGTACCCCCCTTCCTGCGCGAACTACACGTTGCCGTATGGAGGGTGTCTGCAG  
 CGGGGACATGGGGGGAAAGGACGCGGCTGTGATGTGCAAGCGCGATACCTCCACAGACGTC

421 GluTyrValGluIleArgGlnValGlyAspPheHisTyrValThrGlyMetThrThrAsp  
 AGGAATATGTGGAGATAAGGCAGGTGGGGACTTCCACTACGTGACGGGTATGACTACTG  
 TCCTTATACACCTCTATTCCGTCCACCCCTGAAGGTGATGCACTGCCATACTGATGAC

481 AsnLeuLysCysProCysGlnValProSerProGluPhePheThrGlu  
 ACAATCTCAAATGCCGTGCGCAGGTCCCCTACGCCGAATTTCACAGAAT  
 TGTTAGAGTTACGGGCACGGTCCAGGGTAGCGGGCTTAAAAAGTGTCTTA

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

1 AlaTyrMetSerLysAlaHisGlyIleAspProAsnIleArgThrGlyValArgThrIle  
 1 TGCTTACATGTCCAAGGCTCATGGGATCGATCCTAACATCAGGACCAGGGTGAGAACAAAT  
 ACGAATGTACAGGTTCCGAGTACCCTAGCTAGGATTGTAGTCCTGGCCCCACTCTGTTA  
 61 ThrThrGlySerProIleThrTyrSerThrTyrGlyLysPheLeuAlaAspGlyGlyCys  
 61 TACCACTGGCAGCCCCATCACGTACTCCACCTACGGCAAGTCCCTGCCGACGGGGGTG  
 ATGGTGACCGTCGGGTAGTGCATGAGGTGGATGCCGTTCAAGGAACGGCTGCCGCCCCAC  
 121 SerGlyGlyAlaTyrAspIleIleIleCysAspGluCysHisSerThrAspAlaThrSer  
 121 CTCGGGGGGCGCTTATGACATAATAATTGTGACGAGTGCACACTCCACGGATGCCACATC  
 GAGCCCCCGCGAATACTGTATTATAAACACTGCTCACGGTGAGGTGCCTACGGTGTAG  
 181 IleLeuGlyIleGlyThrValLeuAspGlnAlaGluThrAlaGlyAlaArgLeuValVal  
 181 CATCTGGGCATCGGCACTGTCCCTGACCAAGCAGAGACTGCGGGGGCGAGACTGTTGT  
 GTAGAACCCGTAGCCGTGACAGGAACTGGTCTCTGACGCCCGCTCTGACCAACA  
 241 LeuAlaThrAlaThrProProGlySerValThrValProHisProAsnIleGluGluVal  
 241 GCTCGCCACCGCCACCCCTCCGGGCTCCGTACTGTGCCCCATCCAAACATCGAGGAGGT  
 CGAGCGGTGGCGGTGGGAGGCCCCGAGGCAGTGACACGGGTAGGGTTGTAGCTCTCCA  
 301 AlaLeuSerThrThrGlyGluIleProPheTyrGlyLysAlaIleProLeuGluValile  
 301 TGCTCTGTCACCACCGGAGAGATCCCTTTACGGCAAGGCTATCCCCCTCGAAGTAAT  
 ACGAGACAGGTGGTGGCCTCTAGGGAAAATGCCGTTCCGATAGGGGAGCTTCATTA  
 ~ LysGlyGlyArgHisLeuIlePheCysHisSerLysLysLysCysAspGluLeuAlaAla  
 361 CAAGGGGGGAGACATCTCATCTCTGTCAATTCAAAGAAGAAGTGCAGCACTGCCGC  
 GTTCCCCCCCTGTAGAGTAGAAGACAGTAAGTTCTTCACGCTGCTGAGCGCG  
 421 LysLeuValAlaLeuGlyIleAsnAlaValAlaTyrTyrArgGlyLeuAspValSerVal  
 421 AAAGCTGGTCGCATTGGGCATCAATGCCGTGGCTACTACCGCGGTCTTGACGTGCGT  
 TTCGACCAGCGTAACCGTAGTTACGGCACCGGATGATGGCGCCAGAACATGACAGGCA  
 481 IleProThrSerGlyAspValValValAlaThrAspAlaLeuMetThrGlyTyrThr  
 481 CATCCCGACCAGCGGCATGTTGTCGTGGCAACCGATGCCCTCATGACCGGCTATAC  
 GTAGGGCTGGTCGCCGCTACAACAGCAGCACCGTTGGCTACGGGAGTACTGGCCGATATG  
 541 GlyAspPheAspSerValIleAspTyrAsnThrCysValThrGlnThrValAspPheSer  
 541 CGCGCACTTCGACTCGGTGATAGACTACAATACGTGTCACCCAGACAGTCGATTTCAG  
 GCCGCTGAAGCTGAGCCACTATCTGATGTTATGACACAGTGGGTCTGTCAGCTAAAGTC  
 601 LeuAspProThrPheThrIleGluThrIleThrLeuProGlnAspAlaValSerArgThr  
 601 CCTTGACCTACCTCACCATGGAGACAATCACGCTCCCCCAGGATGCTCTCCCGCAC  
 GGAATGGGATGGAAGTGTAACTCTGTTAGTGGCAGGGGGCTACGGACAGAGGGCTG  
 661 GlnArgArgGlyArgThrGlyArgGlyLysProGlyIleTyrArgPheValAlaProGly  
 661 TCAACGTCGGGGCAGGACTGGCAGGGGGAAAGCCAGGCATCTACAGATTGTCGGCACCGGG  
 AGTTGCAGCCCCGCTCTGACCGTCCCCCTCGGTCCGTAGATGTCTAACACCGTGGCCC  
 721 GluArgProSerGlyMetPheAspSerSerValLeuCysGluCysTyrAspAlaGlyCys  
 721 GGAGCGCCCTCCGGCATGTTGACTCGTCGTCCCTGTGAGTGTATGACGCAGGCTG  
 CCTCGCGGGGAGGCCGTACAAGCTGAGCAGGCAGGAGACACTCACGATACTGCGTCCGAC  
 781 AlaTrpTyrGluLeuThrProAlaGluThrThrValArgLeuArgAlaTyrMetAsnThr  
 781 TGCTTGGTATGAGCTCACGCCCGAGACTACAGTTAGGCTACGAGCGTACATGAACAC  
 ACCAACATACTCGAGTGCAGGCCCTCTGATGTCATCGATGCTCGCATGTACTTGTG  
 841 ProGlyLeuProValCysGlnAspHisLeuGluPheTrpGluGlyValPheThrGlyLeu  
 841 CCCGGGGCTTCCCGTGTGCCAGGACCATCTTGAATTGGGAGGGCGTCTTACAGGCCT  
 GGGCCCCGAAGGGCACACGGTCTGTAGAACTAAAACCTCCGGAGAAATGTCCGGA  
 901 ThrHisIleAspAlaHisPheLeuSerGlnSerGlyGluAsnLeuProTyr  
 901 CACTCATATAAGATGCCCATTTCTATCCCAGACAAAGCAGAGTGGGAGAACCTCCCTTA  
 GTGAGTATATCTACGGGTGAAAGATAGGGTCTGTTCTGCTCACCCCTCTTGGAAAGGAAT

961 LeuValAlaTyrGlnAlaThrValCysAlaArgAlaGlnAlaProProProSerTrpAsp  
 CCTGGTAGCGTACCAAGCCACCGTGTGCGCTAGGGCTCAAGCCCCCTCCCCATCGTGGGA  
 GGACCATCGCATGGTTCGGTGGCACACGGCATCCCAGTTGGGGAGGGGGTAGCACCCCT  
 1021 GlnMetTrpLysCysLeuIleArgLeuLysProThrLeuHisGlyProThrProLeuLeu  
 CCAGATGTGGAAGTGTGATTGCCCTCAAGCCCACCCCTCCATGGGCCAACACCCCTGCT  
 GGTCTACACCTTCACAAACTAAAGCGGAGTTCGGGTGGAGGTACCCGGTTGGGGACGGA  
 1081 TyrArgLeuGlyAlaValGlnAsnGluIleThrLeuThrHisProValThrLysTyrIle  
 ATACAGACTGGCGCTGTTCAAGAAATCACCCCTGACGCACCCAGTCACCAAATACAT  
 TATGTCTGACCCCGCGACAAGTCTTACTTTAGTGGGACTGCGTGGGTCACTGGGTTATGTA  
 1141 MetThrCysMetSerAlaAspLeuGluValValThrSerThrTrpValLeuValGlyGly  
 CATGACATGATGTCGGCCGACTGGAGGTCGTACGAGCACCTGGGTGCTCGTGGCGG  
 GTACTGTACGTACAGCCGGCTGGACCTCCAGCAGTGCTCGTGGACCCACGAGCAACCGCC  
 1201 ValLeuAlaAlaLeuAlaAlaTyrCysLeuSerThrGlyCysValValIleValGlyArg  
 CGTCCTGGCTGCTTGGCCCGTATTGCCIGTCACAGGCTGCGTGGTCATAGTGGCAG  
 GCAGGACCGACGAAACCGCGCATAACGGACAGTTGTCGACGCACCAGTATCACCCGTC  
 1261 ValValLeuSerGlyLysProAlaIleIleProAspArgGluValLeuTyrArgGluPhe  
 GGTCGTCTGTCCGGAAAGCCGCAATCATACCTGACACAGGAAGTCTCTACCGAGAGTT  
 CCAGCAGAACAGGCCCTCGGCCGTTAGTATGGACTGTCCTCAGGAGATGGCTCTCRA  
 1321 AspGluMetGluGluCysSerGlnHisLeuProTyrIleGluGlnGlyMetMetLeuAla  
 CGATGAGATGGAAGAGTGTCTCAGCACTTACCGTACATCGAGCAAGGGATGATGCTCGC  
 GCTACTCTACCTCTACGAGAGTCGTGAATGGCATGTAGCTCGTCCCTACTACGAGCG  
 1381 GluGlnPheLysGlnLysAlaLeuGlyLeuLeuGlnThrAlaSerArgGlnAlaGluVal  
 CGAGCAGTCAAGCAGAAGGCCCTCGGCCCTCGCAGACCGCGTCCGTCAGGCAGAGGT  
 GCTCGTCAAGTTCGTCCTCCGGGAGCCGGAGGTCTGGCGCAGGGCAGTCGGCTCTCCA  
 1441 IleAlaProAlaValGlnThrAsnTrpGlnLysLeuGluThrPheTrpAlaLysHisMet  
 TATGCCCTCTGCTGTCCAGACCAACTGGCAAAACTCGAGACCTCTGGCGAAGCATAT  
 ATAGCGGGACGACAGGTCTGGTTGACCGTTTTGAGCTCTGGAAAGACCCGCTTCGTATA  
 1501 TrpAsnPheIleSerGlyIleGlnTyrLeuAlaGlyLeuSerThrLeuProGlyAsnPro  
 GTGGAACCTCATCAGTGGGATAACAATACTTGGCGGGCTGTCAACGCTGCCTGGTAACCC  
 CACCTTGAAGTAGTCACCCCTATGTTATGAACGCCGAACAGTTGGCAGGGACCAATTGGG  
 1561 AlaIleAlaSerLeuMetAlaPheThrAlaAlaValThrSerProLeuThrThrSerGln  
 CGCCATTGCTTCATTGATGGCTTTACAGCTGCTGTCACCAGCCCACTAACCACTAGCCA  
 CGGGTAACGAAGTAACCTACCGAAAAATGTCGACGACAGTGGTGGGTGATTGGTGAATCGGT  
 1621 ThrLeuLeuPheAsnIleLeuGlyGlyTrpValAlaAlaGlnLeuAlaAlaProGlyAla  
 AACCCCTCCCTTCACACATATTGGGGGGGTGGCTGCCAGCTCGCCGCCCGGTGTC  
 TTGGGAGGAGAAGTTGTATAACCCCCCCCACCCACCGACGGGTGAGCGGGCGGGGCCACG  
 1681 AlaThrAlaPheValGlyAlaGlyLeuAlaGlyAlaAlaIleGlySerValGlyLeuGly  
 CGCTACTGCCCTTGTGGCGCTGGCTTAGCTGGCGCCGCATCGCAGTGGACTGGG  
 GCGATGACGGAAACACCCCGCGACCCGATCGACCGCGCGGTAGCCGTACAACCTGACCC  
 1741 LysValLeuIleAspIleLeuAlaGlyTyrGlyAlaGlyValAlaGlyAlaLeuValAla  
 GAAGGTCTCATAGACATCCTGCAAGGTATGGCGGGCGTGGCAGGAGCTTGTGGC  
 CTTCCAGGAGTATCTGTAGGAACGTCCTACCGCGCCCGACCCGCTCGAGAACACCG  
 1801 PheLysIleMetSerGlyGluValProSerThrGluAspLeuValAsnLeuLeuProAla  
 ATTCAAGATCATGAGCGGTGAGGTCCCCCTCCACGGAGGACTGGTCAATCTACTGCCCGC  
 TAAGTTCTAGTACTGCCACTCCAGGGGAGGTGGCTCTGGACCAGTTAGATGACGGGGCG  
 1861 IleLeuSerProGlyAlaLeuValValGlyValValCysAlaAlaIleLeuArgArgHis  
 CATCCTCTGCCCGAGCCCTCGTAGTCGGCGTGGTCTGTGAGCAATACTGCGCCGGCA  
 GTAGGAGAGCGGGCCTCGGGAGCATCAGCCGACCCAGACACGTGTTATGACGGGGCGT

**FIG. 14-2** ValGlyProGlyGluGlyAlaValGlnTrpMetAsnArgLeuIleAlaPheAlaSerArg

1921 CGTTGGCCGGCGAGGGGGCAGTGCAGTGGATGAACCGGCTGATAGCCTTCGCCCTCCG  
 GCAACCGGGCCCGCTCCCCCGTCACGTACCTACTTGGCCGACTATCGGAAGCGGAGGGC  
 GlyAsnHisValSerProThrHisTyrValProGluSerAspAlaAlaAlaArgValThr  
 1981 GGGGAACCAATGTTCCCCCAGCACTACGTGCCGGAGAGCGATGCAGCTGCCCGCGTCAC  
 CCCCTGGTACAAAGGGGTGCGTGATGCACGGCCTCTCGCTACGTGACGGGCGCACTG  
 AlaIleLeuSerSerLeuThrValThrGlnLeuLeuArgArgLeuHisGlnTrpIleSer  
 2041 TGCCATACTCAGCAGCCTCACTGTAACCAGCTCCTGAGGCGACTGCACCAAGTGGATAAG  
 ACGGTATGAGTCGTGGAGTGACATTGGTCGAGGACTCCGCTGACGTGGTCACCTATTC  
 SerGluCysThrThrProCysSerGlySerTrpLeuArgAspIleTrpAspTrpIleCys  
 2101 CTCGGAGTGTACCACTCCATGCTCCGGTCTGGCTAAGGGACATCTGGACTGGATAAG  
 GAGCCTCACATGGTGAGGTACCGAGGCCAAGGACCGATTCCCTGTAGACCCTGACCTATAC  
 GluValLeuSerAspPheLysThrTrpLeuLysAlaLysLeuMetProGlnLeuProGly  
 2161 CGAGGTGTTGAGCGACTTTAACGCTGGCTAAAGCTAAGCTCATGCCACAGCTGCCCTGG  
 GCTCCACAACTCGCTGAAATTCTGGACCGATTTCGATTGAGTACCGGTGTCACGGGAC  
 IleProPheValSerCysGlnArgGlyTyrLysGlyValTrpArgValAspGlyIleMet  
 2221 GATCCCCTTGTGTCCTGCCAGCGCGGGTATAAGGGGGCTGGCGAGTGGACGGCATCAT  
 CTAGGGGAAACACAGGACGGTCGCCCTATTTCCCCAGACCGCTCACCTGCCGTAGTA  
 HisThrArgCysHisCysGlyAlaGluIleThrGlyHisValLysAsnGlyThrMetArg  
 2281 GCACACTCGCTGCCACTGTGGAGCTGAGATCACTGGACATGTCAAAAACGGGACGATGAG  
 CGTGTGAGCGACGGTGACACCTCGACTCTAGTGACCTGTACAGTTTGCCCTGCTACTC  
 IleValGlyProArgThrCysArgAsnMetTrpSerGlyThrPheProIleAsnAlaTyr  
 2341 GATCGTCGGTCCTAGGACCTGCAAGGAACATGTGGAGTGGACCTTCCCCATTAAATGCC  
 TAGCAGCCAGGATCTGGACGTCCTGTACACCTCACCTGAAAGGGTAATTACGGAT  
 ThrThrGlyProCysThrProLeuProAlaProAsnTyrThrPheAlaLeuTrpArgVal  
 2401 CACCAACGGGCCCCGTACCCCCCTTCCTGCCCGAACACTACACGTTGCCGTATGGAGGGT  
 GTGGTGCCGGGGACATGGGGGAAGGACGCCGGCTTGATGTGCAAGCGCGATACTCCCC  
 SerAlaGluGluTyrValGluIleArgGlnValGlyAspPheHisTyrValThrGlyMet  
 2461 GTCTGCAGAGGAATATGTGGAGATAAGGCAGGTGGGGACTTCAACTACGTGACGGGTAT  
 CAGACGTCTCCTTATACACCTTATTCCGTCCACCCCTGAAGGTGATGCACGTGCCCCATA  
 ThrThrAspAsnLeuLysCysProCysGlnValProSerProGluPhePheThrGlu 855??  
 2521 GACTACTGACAATCTCAAATGCCGTGCCAGGTCCCCTCGCCCGAATTTCACAGAAAT  
 CTGATGACTGTTAGAGTTACGGGCACGGTCCAGGGTAGCGGGCTTAAAAAGTGTCTTA

FIG. 14-3

**FIG. 15** Translation der DNA 33c

1 AlaValAspPheLeProValGluAsnLeuGluThr-ThrMetArgSerProValPheThr  
 1 GCGGTGGACTTTCCTCTGGAGAACCTAGAGACAAACCATGAGGCCCCGGTGTTCAC  
 CCCCACCTGAATAGGGACACCTCTGGATCTCTGGTACTCCAGGGCCAGAGTC  
 AspAsnSerSerProProValValProGlnSerPheGlnValAlaHisLeuHisAlaPro  
 61 GGATAACTCCCTCACCAGTAGTGCCCCAGAGCTTCAGGTGGCTCACCTCCATGCC  
 CCTATTGAGGAGGGGGTGTACCGGGGAGCTCGAAGGTCCACCGAGTGGAGGTACGAGG  
 ThrGlySerGlyLysSerThrLysValPheAlaAlaAlaAlaAlaGlyTyrLysVal  
 121 CACAGGCAGGGCAAAGCACCHAGGTCCCCGGCTGCATATGCAAGCTCAGGGCTTAAGGT  
 GTGTCCTGCCTTTCTGGTTCAGGGCCACGTATACGTCAGTCCCAGTAACTCC  
 LeuValLeuAsnProSerValAlaAlaAlaAlaAlaAlaAlaGlyTyrLysVal  
 181 GCTACTTACTCAACCCCTCTGGCTGCAACACTGGCTTGGTGTACAGTCAGGG  
 CGATCATGAGTGGGAGACGACGAGTGTGACCCGAAACCAACGAAAGTACAGGGTCC  
 Überlappung mit 40b  
 HisGlyIleAspPheAsnIleAspArgThrGlyValAlaAlaAlaAlaAlaAlaAla  
 241 TCATGGATCCATCTTACATCAGGACCGGGTGAGAACAAATTACCACTGGCAGCCCCAT  
 AGTACCCCTGGCTGGATTGTAGTCCTGGCCCTCTCTGTAAAGGTGACCGTCGGGCTA  
 ThrTyrSerThrTyrGlyLysPheLeuAlaAspGlyGlyCysSerGlyGlyAlaTyrAsp  
 301 CACGTACTCCACCTACGGCAAGTTCTTGGCGACGGGGTGCTCGGGGGGGCTTAAGA  
 GTGCAATGAGGTGGATGCEGTTCAAGGAACGGCTCCGGCCACCGAGCCCCCCCCAAATCT  
 IleIleIleCysAspGluCysHisSerThrAspAlaAlaAlaAlaAlaAlaLeuGlyIleGlyThe  
 361 CATAATAATTGTGACGAGTGGCACTCCACGGCATCCATCTGGGATTGGCAG  
 GATTTAAACCTCTCACGGTGACGGTGCCTACGGTGTAGGAGAACCCGTAACCGTG  
 ValLeuAspGlnAlaGluThrAlaGlyAlaArgLeuValValAlaAlaAlaAlaAlaAla  
 421 TGTCCTTGACCAAGCAGAGACTGGGGGGCGAGACTGGTGTGCTCGCCACGGCACCC  
 ACAGGAACGGTCTGCTCTGACGGCCCCCTCTGACCAACGGAGGGGGGGGGGGGG  
 ProGlySerValThrValProHisPheAsnIleGluGluValAlaAlaLeuSerThrTheGly  
 481 TCCGGGCTCGTCACTGCCCCATCCAAACATCGAGGAGGTGCTCTGCTACCCACGG  
 AGGGCCCGAGGCACTGACACGGGGTAGGGTTGCTCCTCCACGGAGAACGGTGGGG  
 GluIleProPheTyrGlyLysAlaIleProLeuGluValIleLysGlyGlyArgHisLeu  
 541 AGAGATCCCTTTTACGGCAAGGCTATCCCCCTCGAAGTAATCAAGGGGGGGAGAACATCT  
 TCTCTGGAAAATGGCGTTCCGATAGGGGAGCTTCATTAGTCTCCCCCTCTCTGAGA  
 IlePheCysHisSerLysLysLysCysAspGluLeuAlaAlaLysLeuValAlaLeuGly  
 601 CATCTCTGTCATCAAAGAAGAAGTGCAGCGAACCTGGCCAAAGCTGGTCGCATTGG  
 GTAGAAGACAGTAAAGTTCTCTTCAGCTGCTGAGCGGCTTCTGACCGAGCGTAACCC  
 IleAsnAlaValAlaAlaTyrTyrArgGlyLeuAspValSerValIleProThrSerGlyAsp  
 661 CATCAATGCCGTGGCTACTACCGCGGCTTGTACGGTCCGTCATCCGACCGGGCGA  
 GTAGTTACGGCACCCGATGATGGCGCCAGAACCTGACACGGAGTAGGGCTGGTCGGGGCT  
 ValValValValAlaAlaAlaLeuMetThrGlyTyrThrGlyAspPheAspSerVal  
 721 TGTTGTCGTCGGGCAACCGATGCCCTCATGACCCGCTATACGGGGACTTCGACTCGGT  
 ACACAGGAGCACCGTTCGGCTACGGGAGTACTGGCCGATATGGGGCTGAAAGCTGACCA  
 IleAspCysAsnThrCys  
 781 GATAGACTGCAAAACGGTGTG  
 CTATCTGACGTATGGCACAC

FIG. 16 Translation der DNA 8h

1 ProCysThrCysGlySerSerAspLeuTyrLeuValThrArgHisAlaAspValIlePro  
 1 CTCCCTGGCACTTGCGGCTCTCGGACCTTACCTGGTCAGGAGGCACGCCGATGTCATTG  
 GAGGGACGTGAACGCCGAGGCCCTGAAATGGACCGTGCTCCGTGCGGCTACAGTAAG  
 61 ValArgArgArgGlyAspSerArgGlySerLeuLeuSerProArgProIleSerTyrLeu  
 61 CGCTGCGCCGGCGGGGTGATAAGCAGGGCAGCCCTGCTGTCGCCCCGGGCCATTCTACT  
 GGCACGCCGCCGCCACTATCGTCCCCCTGGACGLCAGGGGGGGGGTAAAGGAATGA  
 121 LysGlySerSerGlyGlyProLeuCysProAlaGlyHisAlaValGlyIlePheArg  
 121 TGAAAGGCTCTCGGGGGTCCGCTGTTGTGCCCGCGGGCACGCCGTGGCATATTAA  
 ACTTTCCGAGGAGCCCCCAGGGCACACCGGGCGCCCCGTGCGCACCCGTATAAAT  
 181 AlaAlaValCysThrArgGlyValAlaLysAlaValAspPhenIleProValGluAsnLeu  
 181 GGGCCGGGTGTGCAACCGTGGAGTGGCTAAGGGGGTGGACTTATCCCTGTGGAGAAC  
 CCCGGCCACACGTGGCACCTCACCGAATTCCGCCACCTGAAATAGGGCACACCTCTTGG  
 33c Überlappung mit  
 241 GluThrThrMetArgSerProValPheThrAspAsaSer  
 241 TAGAGACAACCATGAGGTCCCCGGTGTCAACGGATAACTCC  
 ATCTCTGTGGTACTCCAGGGCCACAGTCCATTGAGGAG

FIG. 17 Translation der DNA 7e

1 GlyTyrArgLeuLeuAlaProIleThrAlaTyrAlaGlnGlnThrArgGlyLeuLeuGly  
 1 GGGGTGGAGGTGCTGGGCCCTACGGCGTAACGCCAGACAAAGGGCTCTTACG  
 CCCCACCTCCACGGACGCCGGTAGTGGCGATGGGGTCGTGTGTCCTGGAGGATCC  
 61 CysIleIleThrSerLeuThrGlyArgAspLysAsnGlnValGluGlyGluValGlnIle  
 61 GTGCATAATCACCAAGCCTAACCTGGGGGACAAACCAAGTGGAGGGTGAGGTCCAGAT  
 CACGTATTAGTGGTCGGATTGACCGGCCCTGTTTGTTGTTCACCTCCACTCCAGGTCTA  
 121 ValSerThrAlaAlaGlnThrPheLeuAlaThrCysIleAsnGlyValCysTyrThrVal  
 121 TGTTGCAACTGCTGCCAAACCTTCTGGCAACGTGCATCAATGGGGTGTGGACTGT  
 ACACAGTTGACGACGGGTTGGAAAGGACCCTGGCACGTAGTTACCCACGGACCTGACA  
 181 TyrHisGlyAlaGlyThrArgThrIleAlaSerProLysGlyProValIleGlnMetTyr  
 181 CTACCAACGGGGCGGAACGAGGACCATCGCGTCACCAAGGGCTCTGTCACTCCAGATGTA  
 GATGGTGCCCCGGCTTGTCTGGTAGCGCAGTGGGTTCCAGGACAGTAGGTCTACAT  
 241 ThrAsnValAspGlnAspLeuValGlyTyrProAlaProGlnGlySerArgSerLeuThr  
 241 TACCAATGTAGACCAAGACCTTGTGGCTGGCCGCTCCGCAAGGTAGCCGCTCATGAC  
 ATGGTTACATCTGGTCTGGAACACCCGACCGGGCGAGGCGTCCATCGCGACTAATG  
 Überlappung mit 8h  
 301 ProCysThrCysGlySerSerAspLeuTyrLeuValThrArgHis  
 301 ACCCTGCACTTGCGGCTCTCGGACCTTACCTGGTCAGGAGGCACG  
 TGGGACGTGAACGCCGAGGAGGCCCTGGAAATGGACCAAGTGTCCCGTGC

**FIG. 18** Translation der DNA 14c

1 AsnMetTyrSerGlyThrPheProIleAsnAlaTyrThrThrGlyProCysThrProLeu  
 GAACATGTGGAGTGGGACCTTCCCCATTAAATGCCTACACCACGGGCCCGTACCCCCCT  
 CTTGTACACCTCACCCCTGGAAGGGGTAAATTACGGATGTGGTGCCCCGGGACAJGGGGGA -  
 Überlappung mit 25c  
 61 ProAlaProAsnTyrThrPheAlaLeuTyrArgValSerAlaGluGluTyrValGluile  
 TCCTGCGCCGAACTACACGTTCGCGCTATGGAGGGTGTCTGCAGAGGAATACGTGGAGAT  
 AGGACGCGGTTGATGTGCAAGCGCGATACTCCCCACAGACGTCTCCTTATGCACCTCTA  
 121 ArgGlnValGlyAspPheHistYrValThrGlyMetThrThrAspAsnLeuLysCysPro  
 AAGGCAGGTGGGGACTTCACTACGTGACGGTATGACTACTGACAACTTAAATGCC  
 TTCCGTCCACCCCTGAAGGTGATGCACTGCCACTGTGACTGTAGAATTACGGG  
 181 CysGlnValProSerProGluPhePheThrGluLeuAspGlyValArgLeuHisArgPhe  
 GTGCCAGGTCCCATCGCCCGAATTTTACAGAATTGGACGGGTGCGCTACATAGGT  
 CACGGTCCAGGGTAGGGCTTAAAAGTGTCTAACCTGCCCCACGGGATGTATCCA  
 241 AlaProProCysLysProLeuLeuArgGluGluValSerPheArgValGlyLeuHisGlu  
 TGCGCCCCCTCGCAAGGCCCTGCTCGGGAGGGAGGTATCATCAGAGTAGGACTCCACCA  
 ACGCGGGGGGACGTTGGAAACGACGCCCTCCATAGTAACTCTCTGAGGTGCT  
 301 TyrProValGlySerGlnLeuProCysGluProGluProAspValAlaValLeuThrSer  
 ATACCCGGTAGGGTCGCAATTACCTTGGAGCCCGAACGGACGTGGCCGTTGACGTC  
 TATGGCCATCCCAGCGTTATGAAACGCTCGGGCTGGCCTGCCACCGGAACTGCCAG  
 361 MetLeuThrAspProSerHisIleThrAlaGluAlaAlaGlyArgArgLeuAlaArgGly  
 CATGCTCACTGATCCCTCCCATATAACAGCAGAGGCGGCCGGCGAAGGTTGGCGAGGG  
 GTACGAGTGACTAGGGAGGGTATATTGTCGTCTCCGGCCGGCGCTTCCAACCGCTCCC  
 421 SerProProSerValAlaSerSerAlaSerGlnLeuSerAlaProSerLeuLysAla  
 ATCACCCCCCTCTGTGGCCAGCTCCTCGGCTAGCCAGCTATCCGCTCCATCTCTCAAGGC  
 TAGTGGGGGGAGACACCGGTGAGGAGCCGATCGGTGAGGGAGGTAGAGAGTTCCG  
 481 ThrCysThrAlaAsnHisAspSerProAsp  
 AACTTGCACCGCTAACCATGACTCCCCCTGAT  
 TTGAACGTGGCGATTGGTACTGAGGGGACTA

FIG. 19 Translation der DNA 8f

Überlappung mit 14c

1 SerSerSerAlaSerGlnLeuSerAlaProSerLeuLysAlaThrCysteAlaAsnHis  
AGCTCCCTCGCTAGCCAGCTATCCGCTCCATCTCAAGGCAACTTGACCGCTAACCAT  
TCGAGGAGGCCATCGGTGGTAGGGAGAGTTCCGTGAACTGTCGGCATTCGTA

61 AspSerProAspAlaGluLeuIleGluAlaAsnLeuLeuTyrArgGlnGluMetGlyGly  
GACTCCCCCTGATGCTGAGCTCATAGAGGCCAACCTCTATGGAGGCAGGAGATGGCGGCG  
CTGAGGGGACTACGACTCGAGTATCTCCGTTGGAGGATACCTCCCTCTAACCCGCCG

121 AsnIleThrArgValGluSerGluAsnLysValValIleLeuAspSerPheAspProLeu  
AACATCACCAAGGGTTGAGTCAGAAAACAAAGTGGTATTCTGGACTTCGATCCGCTT  
TTGTAAGTGGTCCCRACTCTGCTTTGTTTACCACTAACACCTGAGGAAGCTGGCGAA

181 ValAlaGluGluAspGluIleArgGluIleSerValProAlaGluIleLeuArgLysSerArg  
GTGGCGGAGGGAGGACGACGGGAGATCTCGTACCCGCAGAAATCTGCGGAAGTCCTCG  
CACCGCCTCTCCTGCTCGCCCTCTAGAGGCATGGCCCTTTCGGACGCCCTCAGAGGCC

241 ArgPheAlaGlnAlaLeuProValTyrAlaArgProAspTyrAsnProProLeuValGlu  
AGATTGCCCTGGCCCTGCCGTTGGCGCCGGACTATAACCCCCCGCTAGTGGAG  
TCTIAGCGGGTCCGGGACGGGCAIACCCGCSCGGCCCTGATATTGGGGCGATCACCCTC

301 ThrTyrLysSerProAspTyrGluProProValValHisGlyCysProLeuProProPro  
ACGTGGAAAAAGCCCACCGAACCCACTCTGTGGTCCATGGCTGTCGGCTTCACCTCCA  
TGCACCTTTTCCGGCTGATGCTGGTGGACACCAGTACCGAACGGCAAGGTGGAGGT

361 LysSerProProValPro  
AAGTCCCCCTCTGTCGG  
TTCAGGGGAGGAACGGC

FIG. 20 Translation der DNA 33f

1 ValTyrAlaArgProAspTyrAsnProProLeuValGluThrTyrLysSerProAspTyr  
CGTTTGGCGCGCCGGACTATAACCCCCCGCTAGTGGAGACGTCGGAAAAACCCGACTA  
GCAAACCCCGCGCCGGCTGATATTGGGGCGATCACCTCTGCACTTTTTCGGCTGAT

Überlappung mit 8f

61 GluProProValValHisGlyCysProLeuProProProLysSerProProProValProPro  
CGAACCACTGTTGGTCCATGGCTGCCGCTTCCACCTCCAAGTCCCCTCTGTCCTCC  
GCTTGGTGGACACCCAGTACCGACGGCGAAGGTGGAGGTTTCAGGGGAGGAACGGAGG

121 ProArgLysLysArgThrValValLeuThrGluSerThrLeuSerThrAlaLeuAlaGlu  
GCCTCGGAAGAACGGACGGTGGTCCACTGAAATCAACCTATCTACTGCTTGGCGA  
CGGAGCCTTCTTCGCTGCCACCAAGGAGTGACTTAGTTGGATAGATGACGGAACCGGAG

181 LeuAlaThrArgSerPheGlySerSerSerThrSerGlyIleThrGlyAspAsnThrThr  
GCTCGCCACCAAGCTTTCGGCAGCTCTCAACTTCCGGCAATTACGGCGACAATACGAC  
CGAGCGGTGGTCTTCGAAACCGTCGAGGAGTTGAAGGCCGTAATGCCCGCTGTTAGCTG

241 ThrSerSerGluProAlaProSerGlyCysProProAspSerAspAlaGluSerPhe  
AACATCCTCTGAGCCCCCCCCTCTGGCTGCCCCCCCAGCTCCGACGGCTGAGTCCTTTC  
TTGTAAGGAGACTCGGGGGAGACCGAACGGGGCTGAGGCTGCCACTCAGGAACG

FIG. 21 Translation der DNA 33g

1 AlaSerArgSerPheGlySerSerSerThrSerGlyIleThrGlyAspAsnThrThrThr  
 GCGTCCGAGAACGTTGGCAGCTCTCACTTCGGCATTAACGGGCGACAATACGACAA  
 CGGAGGTCTTCGAAACCGTCGAGGAGTTGAAGGCCGTAAAGCCGCTGTTAGCTGTGT  
 \_\_\_\_\_ Überlappung mit 33f \_\_\_\_\_  
 61 SerSerGluProAlaProSerGlyCysProProAspSerAspAlaGluSerTyrSerSer  
 TCCCTTGAGCCCCGCCCCCTCTGGCTGCCCCCGACTCCGACGCGAGTCCATTCCCG  
 AGCGAGCTCGAGGGGGAGACCGACGGGCGGGGGCTGAGGCTCGACTCCGAGGAGG  
 121 MetProProLeuGluGlyGluProGlyAspProAspLeuSerAspGlySerIleSerThr  
 ATGCCCGCCCGCTGGAGGGGGAGCCCTGGATCTTACGGTACGGCTAAGGTCAACG  
 TACGGGGGAGACCTCCCCCTCGAGGCGCTTACGGTACGGCTAAGGTCAACG  
 181 ValSerSerGluAlaAsnAlaGluAspValValCysCysSerMetSerTyrSerIleThr  
 GTCAAGTAGTGAGGCCAACGGGAGGTGCGTGTGCTCATGTCATGTCATGTCATG  
 CAGTCATCACTCCGGTCTGGCTTACGGCAGCGACGAGTACAGATGAGAACCTGT  
 241 GlyAlaLeuValThrProCysAlaAlaGluGluIleLysLeuProAlaAlaLeuSer  
 GGCGCAGCTGCTAACCCCGTGGAGCCGGAGAAACGAAACTTCCACGACGCTAACG  
 CGCGTGAAGCTGGGAGCCGGCGCTTCTGGCTTACGGTACGGTAGTGCCTGCTTCC  
 301 AsnSerLeuLeuIleArgHisHisAsnLeuValTyrSerThrSerIleSerArgSer  
 AACTCGTTGCTACGTCAACCAATTGGTAGGTGAGGAGAAGCCCTGACCCCGTGTGCCGAAACGCT  
 TTGAGCAACGATGCGGTAAACCAATAAGGTGGTGGAGTGCCTGCTTCC  
 \_\_\_\_\_

FIG. 22 Translation der DNA 7f

1 GlyThrTyrValTyrAsnHisLeuThrProLeuArgAspTrpAlaHisAsnGlyLeuArg  
 GGCACCTATGTTTATAACCATCTCACTCCTCTTCGGGACTGGGCGCACAAACGGCTTGGCGA  
 CCGTGGATACAAATATTGGTAGGTGAGGAGAAGCCCTGACCCCGTGTGCCGAAACGCT  
 61 AspLeuAlaValAlaValGluProValValPheSerGlnMetGluThrLysLeuIleThr  
 GATCTGGCCGTTGGCTGTAGAGCCAGTCGTTCTCCCAAATGGAGACCAAGCTCATCACG  
 CTAGACGGCACCGACATCTGGTCAGCAGAAGAGGGTTAACCTCTGGTTCGAGTAGTGC  
 121 TrpGlyAlaAspThrAlaAlaCysGlyAspIleMeAsnGlyLeuProValSerAlaArg  
 TGGGGGGCAGATAACGCCCGTGCCTGACATCATCAACGGCTTGCCTGTTCCGCCCG  
 ACCCCCCGTCTATGGCGCCGACCCACTGTAGTAGTTGCCGAACGGACAAAGGCCCG  
 181 ArgGlyArgGluIleLeuLeuGlyProAlaAspGlyMetValSerLysGlyTrpArgLeu  
 AGGGGCCGGGAGATACTGCTGGCCAGCCGATGGAATGGCTTCCAAAGGGTTGGAGGTG  
 TCCCCGGCCCTCTATGACGAGCCCCTGGCTACCTTACCAAGAGGTCCAAACCTCCAAC  
 241 LeuAlaProIleThrAlaTyrAlaGlnGlnThrArgGlyLeuLeuGlyCysIleIleThr  
 CTGGCGCCCATCAGGGCTACGCCAGCAGACAAGGGCTCCTAGGGTGCATAATCACC  
 GACCGCGGGTAGTGCCTGACGGTCTGTTCCCGGAGGATCCCACGTATTAGTGG  
 \_\_\_\_\_ Überlappung mit 7e \_\_\_\_\_  
 301 SerLeuThrGlyArgAspLysAsnGlnValGluGlyGluValGlnIleValSerThrAla  
 AGCCTRACTGGCCGGGACAAAACCAAGTGGAGGGTGAGGTCCAGATTGTGTCAACTGCT  
 TCGGATTGACCGGCCCTGTTGGTCAACCTCCACTCCAGGTCTAACACAGTTGACGA  
 361 AlaGlnThrPheLeuAlaThrCysIleAsnGlyValCysTrp  
 GCCCAAACCTCTGGCAACGTCGATCAATGGGGTGTGCTGG  
 CGGGTTGGAGGACCGTTGCACTGAGTTACCCACACGACC  
 \_\_\_\_\_

**FIG. 23** Translation der DNA 11b

1 GlyGlyValValLeuValGlyLeuMetAlaLeuThrLeuSerProTyrTyrLysArgTyr  
 1 GGCGGTGTTGTCGTGGGTTGATGGCGCTGACTCTGTCACCATTACAAGCGCTAT  
 CCGCCACAAACAGAGCAGCCCCACTACCGCGACTGAGACAGTGGTATAATGTTCGCGATA  
 61 IleSerTrpCysLeuTrpTrpLeuGlnTyrPheLeuThrArgValGluAlaGlnLeuHis  
 61 ATCAGCTGGTGGTGGTGGCTTCAGTATTTCTGACCAAGAGTGGAAAGCGCAACTGCAC  
 TAGTCGACCACGAACACCACCGAAGTCATAAAAGACTGGTCTCACCTCGCGTTGACGTG  
 121 ValTrpIleProProLeuAsnValArgGlyArgAspAlaValIleLeuLeuMetCys  
 121 GTGTGGATTCCCCCCCCTAACGTCCGAGGGGGCGCGACGCCGTACCTTACTCATGTGT  
 CACACCTAACGGGGGGAGTTGCAGGCTCCCCCGCGCTCGGGCAGTAGAACATGAGTACACA  
 181 AlaValHisProThrLeuValPheAspIleThrLysLeuLeuLeuAlaValPheGlyPro  
 181 GCTGTACACCCGACTCTGGTATTTGACATCACCAAATTGCTGCTGGCCGTCTCGGACCC  
 CGACATGTGGGCTGAGACCATAAACTGTAGTGGTTAACGACGACCGGCAGAACGCTGGG  
 241 LeuTrpIleLeuGlnAlaSerLeuLeuLysValProTyrPheValArgValGlnGlyLeu  
 241 CTTTGATTCTCAAGCCAGTTGCTAAAGTACCCCTACTTTGTGCGCGTCCAAGGCCTT  
 GAAACCTAACGAAATTGATGAAACACGCGCAGGTTCCGGAA  
 301 LeuArgPheCysAlaLeuAlaArgLysMetIleGlyGlyHisTyrValGlnMetValIle  
 301 CTCCGGTTCTGCGCGTTAGCGCGGAAGATGATCGGAGGCCATTACGTGCAAATGGTCATC  
 GAGGCCAAGACCGCAATCGCGCTTACTAGCCTCCGGTAATGCACGTTACCACTAG  
 361 IleLysLeuGlyAlaLeuThrGlyThrTyrValTyrAsnHisLeuThrProLeuArgAsp  
 361 ATTAAGTTAGGGCGCTTACTGGCACCTATGTTATAACCACTCACTCCTCTCGGGAC  
 TAATTCAATCCCCCGCAATGACCGTGGATAACAAATTGGTAGAGTGAGGAGAACGCCCTG  
 \_\_\_\_\_ Überlappung mit 7f \_\_\_\_\_  
 421 TrpAlaHisAsnGlyLeuArgAspLeuAlaValAlaValGluProValValPheSerGln  
 421 TGGGCGCACAAACGGCTTGCGAGATCTGGCCGTGGCTGTAGAGGCCAGTCGTCTTCTCCAA  
 ACCCGCGTGTGCCGAACGCTCTAGACCGGGACCCGACATCTCGGTCAAGCAGAACAGAGGGTT  
 481 MetGluThrLysLeuIleThrTrpGly  
 481 ATGGAGACCAAGCTCATCACGTGGGGGGC  
 TACCTCTGGTTCGAGTAGTGCACCCCCCG

**FIG. 24** Translation der DNA 14i

1 GluTyrValValLeuLeuPheLeuLeuAlaAspAlaArgValCysSerCysLeuTrp  
 GGGAGTACGTCTGTTCTCTGTTGCGAGACGCCGGCTGCTCCTGCTTG  
 CCCTCATGCAGCAAGAGGAACAGAACGCTGCGCCAGACGAGGACGAACA  
  
 61 MetMetLeuLeuIleSerGlnAlaGluAlaAlaLeuGluAsnLeuValIleLeuAsnAla  
 GGATGATGCTACTCATATCCAAGCGGAGGCGGCTTGGAGAACCTCGTAATACCTTAATG  
 CCTACTACGATGAGTATAGGGTTCGCGCCGAAACCTCTGGAGCATTATGAATTAC  
  
 121 AlaSerLeuAlaGlyThrHisGlyLeuValSerPheLeuValPhePheCysPheAlaTrp  
 CAGCATCCCTGGCCGGGACGCACGGCTCTGTATCCCTCTCGTGTCTCTGCTTTGCAT  
 GTCTAGGGACCGGCCCTGCGTGCAGAACATAGGAAGGAGCACAGAACGAAACGTA  
  
 181 TyrLeuLysGlyLysTrpValProGlyAlaValTyrThrPheTyrGlyMetTrpProLeu  
 GGTATTGAGGGTAAGTGGTGGCCCGAGCGGGCTCACCTCTACGGGATGTGGCCTC  
 CCATAAACTTCCCATTACCCACGGGCCTCGCCAGATGTGGAAGATGCCCTACACGGAG  
  
 241 LeuLeuLeuLeuAlaLeuProGlnArgAlaTyrAlaLeuAspThrGluValAlaAla  
 TCCTCTGCTCTGTTGGCGTGGCCCGGGCTACGCGCTGGACACGGAGGTGGCCG  
 AGGAGGACGAGGACACCGAACGGGTCGCCATGCGCACCTGCGCTCCACCGGC  
  
 301 SerCysGlyGlyValValLeuValGlyLeuMetAlaLeuThrLeuSerProTyrTyrLys  
 CGTCGTGTGGCGGTGTTCTCGTGGGTTGATGGCGCTGACTCTGTCACCATAATTACA  
 GCAGCACACCGCCACACAGAGCAGCCAACTACCGCGACTGAGACAGIGGTATAATGT  
  
 361 ArgTyrIleSerTrpCysLeuTrpTrpLeuGln  
 AGCGCTATATCAGCTGGTGCTTGTTGGCTCAGAA  
 TCGCGATATAGTCGACCAACGAAACACCACCGAAGTCTT

---

Überlappung mit 11b

**FIG. 25** Translation der DNA 39c

1 ProAlaProSerGlyCysProProAspSerAspAlaGluSerTyrSerSerMetProPro  
 CCAGCCCCCTCTGCTGCCCGGGGGGACTCCGACGCTGAGTCCTATTCCCTCATGCCCGGG  
 GGTGGGGAGACCGACGGGGGGCTGAGGCTGCAGTCAGGATAAGGAGGTACGGGGGG  
  
 61 LeuGluGlyGluProGlyAspProAspLeuSerAspGlySerTrpSerThrValSerSer  
 CTGGAGGGGGAGCCTGGGATCCGGATCTTAGCGACGGGTCAAGTCAGTAGT  
 GACCTCCCCCTCGGACCCCTAGGCCTAGAATCGCTGCCAGTACCAAGTTGTCAGTCATCA  
  
 121 GluAlaAsnAlaGluAspValValCysCysSerMetSerTyrSerTrpThrGlyAlaLeu  
 GAGGCCAACCGCGAGGATGTCGTGCTGCTCAATGCTCTACTCTGGACAGGCGCACTC  
 CTCCGGTTGCGCCTACAGCACACGACGAGTTACAGGATGAGAACCTGTCCCGTGAG  
  
 181 ValThrProCysAlaAlaGluGluGlnLysLeuProIleAsnAlaLeuSerAsnSerLeu  
 GTCACCCCGTGCAGCGGCGGAAGAACAGAAAATGCCATCAATGCACTGAGCAACTCGTTG  
 CAGTGGGGCACCGCGGCCCTCTTGTCTTGACGGTAGTTACGTGACTCGTTGAGCAAC  
  
 241 LeuArgHisHisAsnLeuValTyrSerThrThrSerArgSerAlaCysGlnArgGlnLys  
 CTACGTCAACACAAATTGGGTATTCCACCCACTCACGCACTGCTTGCCAAAGGCAGAAC  
 GATGCAGTGGGTGTTAACACACATAAGGTGGAGTGGCTACGAACGGTTCCCGTCTTC  
  
 301 LysValThrPheAspArgLeuGlnValLeuAspSerHisTyrGlnAspValLeuLysGlu  
 AAAGTCACATTTGACAGACTGCAAGTTCTGGACAGGCCATTACCAAGGACGTACTCAAGGAG  
 TTTCAGTGTAAACTGTCTGACGTTCAAGACCTGTGGTAAATGGCCTGCTGAGTTCC  
  
 361 ValLysAlaAlaAlaSerLysValLysAlaAsnPhe  
 GTTAAAGCAGCGGGTCAAAGTGAAGGCTAACTTC  
 CAATTTCGTCGCGCCAGTTTCACTTCCGATTGAG

**FIG. 26-1** Kombinierter ORF der DNAs  
 141/11b/7f/7e/8h/33c/40b/37b/35/36/81/32/33b/25c/14c/8f/33f/33g/39c

1 GluTyrValValLeuLeuPheLeuLeuLeuAlaAspAlaArgValCysSerCysLeuTrp  
 GGGAGTACGTCGTTCTCTGTTGAGACGGCGCGTCGCTCCTGCTTG  
 CCTCATGCAGCAAGAGGACAAGGAGAACGTCGCGCGCAGACGAGGACGAACA  
  
 61 MetMetLeuLeuIleSerGlnAlaGluAlaAlaLeuGluAsnLeuValIleLeuAsnAla  
 GGATGATGCTACTCATATCCCCAAGCGGAGGCGGCTTGGAGAACCTCGTAATACTTAATG  
 CCTACTACGATGAGTATAGGGTTCGCGCTCCGCCAACCTCTTGGAGCATTAATGAATTAC  
  
 121 AlaSerLeuAlaGlyThrHisGlyLeuValSerPheLeuValPhePheCysPheAlaTrp  
 CAGCATCCCTGGCCGGACGCACGGTCTTGTATCCTCCTCGTGTCTGCTTGCAT  
 GTCGTAGGGACCAGGCCCTGCGTGCAGAACATAGGAAGGAGCACAAAGAGACGAAACGTA  
  
 181 TyrLeuLysGlyLySTrpValProGlyAlaValTyrThrPheTyrGlyMetTrpProLeu  
 GGTATTTGAAGGGTAAGTGGGTGCCCGGAGCGGTCTACACCTCTACGGGATGGCCTC  
 CCATAAACCTCCCATTACCCACGGGCTCGCCAGATGTGGAAGATGCCCTACACGGGAG  
  
 241 LeuLeuLeuLeuLeuAlaLeuProGlnArgAlaTyrAlaLeuAspThrGluValAlaAla  
 TCCTCCTGCTCCTGTTGGCGTTGCCCCAGCGGGCGTACGCCTGGACACGGAGGTGGCG  
 AGGAGGACGAGGACAACGCCAACGGGTCGCCCCGATGCGCACCTGTGCCTCCACGGG  
  
 301 SerCysGlyGlyValValLeuValGlyLeuMetAlaLeuThrLeuSerProTyrTyrLys  
 CGTCGTTGGCGGTGTTGTTCTCGTCGGGTTGATGGCGCTGACTCTGTACCCATATTACA  
 GCAGCACACCGCCAACAAGAGCAGCCCAACTACCGCGACTGAGACAGTGGTATAATGT  
  
 361 ArgTyrIleSerTrpCysLeuTrpTrpLeuGlnTyrPheLeuThrArgValGluAlaGln  
 AGCGCTATATCAGCTGGTCTGTTGCGCTTCAGTATTTCTGACCAGAGTGGAGCGC  
 TCGCGATATAGTCGACCACGAAACCCACCGAAGTCATAAAAGACTGGTCTCACCTCGCG  
  
 421 LeuHisValTrpIleProLeuAsnValArgGlyGlyArgAspAlaValIleLeuLeu  
 AACTGCACGTGTTGATTCCCCCCCCTCACAGTCGGAGGGGGCGCGACGCCGTACCTTAC  
 TTGACGTGTCACACCTAAGGGGGGAGTTGAGGCTCCTCCCGTGCAGGAGTGGAGAATG  
  
 481 MetCysAlaValHisProThrLeuValPheAspIleThrLysLeuLeuLeuAlaValPhe  
 TCATGTGCTGTAACCCGACTCTGGTATTTGACATCACCAAAATTGCTGCTGGCGTCT  
 AGTACACACGACAATGTGGGCTGAGACCATAAAACTGTAGTGGTTAACGACGACCGGAGA  
  
 541 GlyProLeuTrpIleLeuGlnAlaSerLeuLeuLysValProTyrPheValArgValGln  
 TCGGACCCCTTGGATTCTCAAGCCAGTTCTAAAGTACCCACTTGTGCGCGTCC  
 AGCCTGGGAAACCTAAGAAGTTCGGTCAAACGAAATTTCATGGGATGAAACACGCGCAGG  
  
 601 GlyLeuLeuArgPheCysAlaLeuAlaArgLysMetIleGlyGlyHistYrValGlnMet  
 AAGGCCTCTCCGGTTCTGCGCGTTAGCGCGGAAGATGATCGGAGGCCATTACGTGCAAA  
 TTCCGGAAAGAGGCCAACGCGCAATCGCCCTCTACTAGCCTCCGGTAATGACAGTT  
  
 661 ValIleIleLysLeuGlyAlaLeuThrGlyThrTyrValTyrAsnHisLeuThrProLeu  
 TGGTCATCTTAAGTTAGGGCGCTTACTGGCACCTATGTTATAACCATCTCCTCCTC  
 ACCAGTAGTAACTCAATCCCCCGCAATGACCGTGGATAACAAATATTGGTAGAGTGAGGAG  
  
 721 ArgAspTrpAlaHisAsnGlyLeuArgAspLeuAlaValAlaValGluProValValPhe  
 TTGGGGACTGGGCGACAACGGCTTGGCGAGATCTGGCGTGGCTGTAGAGCAGTCGTCT  
 AAGCCCTGACCCCGCGTGTGGCCGAAACGCTCTAGACCCGACCGAACATTCGGTCAGCAGA  
  
 781 SerGlnMetGluThrLysLeuIleThrTrpGlyAlaAspThrAlaAlaCysGlyAspIle  
 TCTCCCAAATGGAGACCAAGCTCATCRCGTGGGGGGCAGATACCCCGCGTGCAGGTGACA  
 AGAGGGTTAACCTCTGGTTCGAGTAGTGCACCCCCCGTCTATGGCGCGCACGCCACTGT  
  
 841 IleAsnGlyLeuProValSerAlaArgArgGlyArgGluIleLeuLeuGlyProAlaAsp  
 TCATCAACGGCTTGGCTTTCGCGCCCGAGGGGGGGAGATACTGCTCGGCCAGCC  
 AGTAGTTGCCAACGGACAAAGCGGGCGTCCCCGGCCCTATGACGAGCCCCGGTGGC  
  
 GlyMetValSerLysGlyTrpArgLeuLeuAlaProIleThrAlaTyrAlaGlnGlnThr

901 ATGGAATGGCTCCAAGGGTGGAGGTGCTGGGCCCATCACGGCGTACGCCAGCAGA  
 TACCTTACCAAGGGTTCCCCACCTCCAACGACCGGGTAGTGCCGATGCGGTCT  
 ArgGlyLeuLeuGlyCysIleIleThrSerLeuThrGlyArgAspLysAsnGlnValGlu  
 961 CAAGGGGCCTCTAGGGTGCATAATCACCAAGCTTAACGGCCGGACAAAACCAAGTGG  
 GTTCCCCGGAGGATCCCACGTATTAGTGGTCGGATTGACCGGCCCTGTTTGGTTAAC  
 GlyGluValGlnIleValSerThrAlaAlaGlnThrPheLeuAlaThrCysIleAsnGly  
 1021 AGGGTGAGGTCCAGATTGTGTCACACTGCTGCCAACCTTCTGGCAACGTGCATCAATG  
 TCCCACACTCCAGGTCTAACACAGTTGACGACGGGTTGGAAAGGACCGTTGCACGTAGTTAC  
 ValCysTrpThrValTyrHisGlyAlaGlyThrArgThrIleAlaSerProLysGlyPro  
 1081 GGGTGTCTGGACTGTCTACCACGGGCCGGAACGGGACCATCGCGTCACCCAAGGGTC  
 CCCACACGACCTGACAGATGGTCCCCGGCTTGTCTGGTAGCGCAGTGGGTTCCAG  
 ValIleGlnMetTyrThrAsnValAspGlnAspLeuValGlyTrpProAlaProGlnGly  
 1141 CTGTCATCCAGATGTATACCAATGTAGACCAAGACCTTGTGGCTGGCCGCTCCGCAAG  
 GACAGTAGGTCTACATATGGTTACATCTGGTTCTGGAACACCCGACCGGGCAEGCGTTC  
 SerArgSerLeuThrProCysThrCysGlySerSerAspLeuTyrLeuValThrArgHis  
 1201 GTAGCCGCTCATGACACCCCTGCACTTGGCTCTCGGACCTTACCTGGTCACGAGGC  
 CATCGGGAGTAACTGTGGGACGTGACGCCGAGGAGCCTGAAATGGACCAAGTGTCTCCG  
 AlaAspValIleProValArgArgArgGlyAspSerArgGlySerLeuLeuSerProArg  
 1261 ACGCCGATGTCAATTCCCGTGCGCCGGGGTGATAGCAGGGCAGCCTGTCGGCCCC  
 TGCGGCTACAGTAAGGCACGCCGGCCCCACTATCGTCCCCGTCGGACGGACAGCGGGG  
 ProIleSerTyrLeuLysGlySerSerGlyGlyProLeuLeuCysProAlaGlyHisAla  
 1321 GGCCCATTTCTACTTGAAAGGCTCCTCGGGGGTCCGCTGGTGTGCCCCGGGGCACG  
 CCGGTAAGGATGAACTTCCGAGGAGCCCCCAGGGCACAAACACGGGGCGCCCCGTGC  
 ValGlyIlePheArgAlaAlaValCysThrArgGlyValAlaLysAlaValAspPheIle  
 1381 CCGTGGGCATATTAGGGCCGGTGTGCACCCGTGGAGTGGCTAAGGGGGTGGACTTAA  
 GGCAACCGTATAATCCGGGCCACAGTGGCACCTCACCGATTCCGCCACCTGAAAT  
 ProValGluAsnLeuGluThrThrMetArgSerProValPheThrAspAsnSerSerPro  
 1441 TCCCTGTGGAGAACCTAGAGACAACCATGAGGTCCCCGGTGTTCACGGATAACTCTCTC  
 AGGGACACCTCTGGATCTCTGGTACTCCAGGGCCACAGTGGCCTATTGAGGAGAG  
 ProValValProGlnSerPheGlnValAlaHisLeuHisAlaProThrGlySerGlyLys  
 1501 CACCACTAGTGCCTCAGACTTCAGGTGGCTACCTCCATGCTCCCACAGGCAGGGCA  
 GTGGTCATCACGGGGCTCGAAGGTCCACCGAGTGGAGGTACGAGGGTGTCCGTCGG  
 SerThrLysValProAlaAlaTyrAlaAlaGlnGlyTyrLysValLeuValLeuAsnPro  
 1561 AAAGCACCAAGGTCCCAGCTGCATATGCAAGCTCAGGGCTATAAGGTGCTAGTACTCAACC  
 TTTCGTGGTCCAGGGCCACGTATACGTCAGTCCCCATATCCACGATCATGAGTGG  
 SerValAlaAlaThrLeuGlyPheGlyAlaTyrMetSerLysAlaHisGlyIleAspPro  
 1621 CCTCTGTGCTGCAACACTGGGCTTGGTGTACATGTCAAGGCTCATGGGATCCGATC  
 GGAGACAACGACGTTGTGACCCGAAACCGAATGTACAGGTTCCGAGTACCCCTAGCTAG  
 AsnIleArgThrGlyValArgThrIleThrThrGlySerProIleThrTyrSerThrTyr  
 1681 CTAACATCAGGACCGGGGTGAGAACAAATTACCACTGGCAGCCCCATCAGTACTCCACCT  
 GATTGTAGTCCTGGCCCCACTTGTAAATGGTGAACCGTGGGGTAGTGCATGAGGTGG  
 GlyLysPheLeuAlaAspGlyGlyCysSerGlyGlyAlaTyrAspIleIleCysAsp  
 1741 ACGGCAAGTCCCTGCCGACGGCGGGTGTCTGGGGGGCGCTATGACATAATAATTCTG  
 TGCGGTTCAAGGAACGGCTGCCGCCACGAGCCCCCGCGAAACTGTATTATTAAACAC  
 GluCysHisSerThrAspAlaThrSerIleLeuGlyIleGlyThrValLeuAspGlnAla  
 1801 ACGAGTGCACACTCCACGGATGCCACATCCATCTGGGCATCGGCACTGTCCCTGACCAAG  
 TGCTCACGGTGAGGTGCCTACGGTGTAGGTAGAACCCGTAGCCGTGACAGGAACCTGG  
 GluThrAlaGlyAlaArgLeuValLeuAlaThrAlaThrProProGlySerValThr  
 1861 CAGAGACTGCCGGGGCGAGACTGGTGTGCTCGCACCAGCACCCTCCGGCTCCGTC  
 GTCTGACGCCCGCTCTGACCAACGAGCGGTGGCGGTGGGGAGGCCCCGAGGCACT

FIG. 26-2.

1921 ValProHisProAsnIleGluGluValAlaLeuSerThrThrGlyGluIleProPheTyr  
 CTGTGCCCATCCAACATCGAGGAGGTGCTCTGTCCACCACCGGAGAGATCCCCTTTT  
 GACACGGGGTAGGGTTGTAGCTCTCCAACGAGACAGGTGGTGGCCTCTCTAGGGAAAAAA  
 1981 GlyLysAlaIleProLeuGluValIleLysGlyGlyArgHisLeuIlePheCysHisSer  
 ACGGCAAGGCTATCCCCCTCGAAGTAATCAAGGGGGGAGACATCTCATCTTCATT  
 TGCCGTTCCGATAGGGGGAGCTTCATTAGTTCCCCCTCTGTAGAGTAGAAGACAGTAA  
 2041 LysLysLysCysAspGluLeuAlaAlaLysLeuValAlaLeuGlyIleAsnAlaValAla  
 CAAAGAAGAAGTGCAGCAACTCGCCGAAAGCTGGTCGATTGGGCATCAATGCCGTGG  
 GTTCTTCTCACGCTGCTTGAGCGCGTTCGACCAGCGTAACCGTAGTTACGGCACC  
 2101 TyrTyrArgGlyLeuAspValSerValIleProThrSerGlyAspValValValAla  
 CCTACTACCGGGTCTTGACGTGTCGTATCCCGACCAGCGCGATGTTGTCGTCGTGG  
 GGATGATGGCGCCAGAACCTGCACAGGCACTAGGGCTGGTCGCCGCTAACACAGCAGCACC  
 2161 ThrAspAlaLeuMetThrGlyTyrThrGlyAspPheAspSerValIleAspCysAsnThr  
 CAACCGATGCCCTCATGACCGGCTATACCGGCACTTCGACTCGGTGATAGACTGCAATA  
 GTTGGCTACGGAGTACTGGCCGATATGGCCGCTGAAGCTGAGCCACTATCTGACGTTAT  
 2221 CysValThrGlnThrValAspPheSerLeuAspProThrPheThrIleGluThrIleThr  
 CGTGTGTCACCCAGACAGTCGATTTCAGCCTTGACCCCTACCTTCACCATGAGACAAATCA  
 GCACACAGTGGTCTGTCAGCTAAAGTCGGAACIGGGATGGAAGTGGTAACCTGTTAGT  
 2281 LeuProGlnAspAlaValSerArgThrGlnArgArgGlyArgThrGlyArgGlyLysPro  
 CGCTCCCCCAGGATGCTGTCCTCCGCACTCAACGTCGGGGCAGGACTGGCAGGGGGAAAGC  
 GCGAGGGGGTCCTACGACAGAGGGCGTGAGTTGCAGCCCCGTCCTGACCGTCCCCCTCG  
 2341 GlyIleTyrArgPheValAlaProGlyGluArgProSerGlyMetPheAspSerSerVal  
 CAGGCATCTACAGATTGTCGGCACCGGGGAGCGCCCTCCGGCATGTTGACTCGTCGG  
 GTCCGTAGATGTCATAACACCGTGGCCCCCTCGCGGGGAGGCCGTACAAGCTGAGCAGC  
 2401 LeuCysGluCysTyrAspAlaGlyCysAlaTrpTyrGluLeuThrProAlaGluThrThr  
 TCCTCTGTGAGTGTCTATGACGCAGGCTGTGCTTGGTATGAGCTCACGCCGCCAGACTA  
 AGGAGACACTCACGATACTGCGTCCGACAGAACCTACTCGAGTGCAGGCGGCTCTGAT  
 2461 ValArgLeuArgAlaTyrMetAsnThrProGlyLeuProValCysGlnAspHisLeuGlu  
 CAGTAGGCTACGAGCGTACATGAACACCCGGGGCTTCCCGTGTGCCAGGACCATCTTG  
 GTCAATCCGATGCTCGCATGTAATTGAGTGGGGCCCCGAAAGGCACACGGTCTGGTAGAAC  
 2521 PheTrpGluGlyValPheThrGlyLeuThrHisIleAspAlaHisPheLeuSerGlnThr  
 AATTGGGAGGGCGTCTTACAGGCCTCACTCATATAGATGCCCACCTCTATCCAGA  
 TTAAAACCTCCCGCAGAAATGTCGGAGTGTAGTATCTACGGGTGAAAGATAGGGTCT  
 2581 LysGlnSerGlyGluAsnLeuProTyrLeuValAlaTyrGlnAlaThrValCysAlaArg  
 CAAAGCAGAGTGGGAGAACCTTCTTACCTGGTAGCGTACCAAGCCACCGTGTGGCTA  
 GTTTCGTCTCACCCCTTTGGAAAGGAAGGACCATCGCATGGTGGCACACGGAT  
 2641 AlaGlnAlaProProProSerTrpAspGlnMetTrpLysCysLeuIleArgLeuLysPro  
 GGGCTCAAGCCCCCTCCCCCATCGTGGGACCAGATGTTGAGTGTGATTGCCCTCAAGC  
 CCCGAGTTGGGGAGGGGGTAGCACCCGGTCTACACCTTCACAACAACTAACGGAGTTCG  
 2701 ThrLeuHisGlyProThrProLeuLeuTyrArgLeuGlyAlaValGlnAsnGluIleThr  
 CCACCCCTCCATGGGCCAACACCCCTGGTATACAGACTGGCGTGTTCAGAATGAAATCA  
 GGTGGGAGGTACCCGGTTGTGGGGACGATATGTCGACCCGGCACAAGTCTTACTTAGT  
 2761 LeuThrHisProValThrLysTyrIleMetThrCysMetSerAlaAspLeuGluValVal  
 CCCTGACGCACCCAGTCACCAAATACATGACATGCACTGGCGCAGCTGGAGGTGCG  
 GGGACTGCGTGGGTCACTGGTTATGTAGTACTGTACGTACAGCCGGCTGGACCTCCAGC  
 2821 ThrSerThrTrpValLeuValGlyGlyValLeuAlaAlaLeuAlaAlaTyrCysLeuSer  
 TCACGAGCACCTGGGTGCTCGTGGCGCTCGCTGGCTTGGCCCGTATTGCCCTGT  
 AGTGCCTGGACCCACGAGCAACCGCCGAGGACCGACGAAACCGGGCATAACGGACA  
 ThrGlyCysValValIleValGlyArgValValLeuSerGlyLysProAlaIleIlePro

FIG. 26-3

2881 CAACAGGCTCGTGGTCATAGTGGGCAGGGTCGTCTGTCGGGAAGCCGGCAATCATAC  
 GTTGTCCGACGCACCAGTATCACCGTCCCAGCAGAACAGGCCCTCGGCCGTTAGTATG  
 AspArgGluValLeuTyrArgGluPheAspGluMetGluGluCysSerGlnHisLeuPro  
 2941 CTGACAGGGAAAGTCCTCTACCGAGAGTTCGATGAGATGGAAGAGTGCTCTCAGCACTTAC  
 GACTGTCCCTTCAGGAGATGGCTCTAAGCTACTCTACCTCTCACGAGAGTCGTGAATG  
 TyrIleGluGlnGlyMetMetLeuAlaGluGlnLysAlaLeuGlyLeuLeu  
 3001 CGTACATCGAGCAAGGGATGATGCTCGCCGAGCAGTTCAAGCAGAACGGCCCTCGGCCCTCC  
 GCATGTAGCTCGTCCCTACTACGAGCGCTCGTCAGTTCTCCGGAGGCCGGAGG  
 GlnThrAlaSerArgGlnAlaGluValIleAlaProAlaValGlnThrAsnTrpGlnLys  
 3061 TGCAGACCGCGTCCCGTCAGGAGGGTTATGCCCTGCTGTCCAGACCAACTGGCAA  
 ACAGTCTGGCGCAGGGCAGTCGTCCTCAATAGCGGGGACGACAGGTCGGTTGACCGTT  
 LeuGluThrPheTrpAlaLysHisMetTrpAsnPheIleSerGlyIleGlnTyrLeuAla  
 3121 AACTCGAGACCTCTGGCGAAGCATAATGTTGAACTTCATCAGTGGGATACAATACTTGG  
 TTGAGCTCTGGAAGACCCGCTTCTGTATACACCTTGAAGTAGTCACCCATGTTAIGAAC  
 GlyLeuSerThrLeuProGlyAsnProAlaIleAlaSerLeuMetAlaPheThrAlaAla  
 3181 CGGGCTGTCAACGCTGCTGGTAACCCCGCCATTGCTTCATGATGGCTTTACAGCTG  
 GCCCGAACAGTTGCGACGGACCATTGGGGCGTAACGAAAGTAACACCGAAAATGTCGAC  
 ValThrSerProLeuThrThrSerGlnThrLeuLeuPheAsnIleLeuGlyGlyTrpVal  
 3241 CTGTCACCAGCCCCACTAACACTAGCCAACCCCTCTTCAACATATTGGGGGGGGGG  
 GACAGTGGTGGGTGATTGGTGTAGCGTTGGGAGGAGAAGTTGTATAACCCCCCCCACCC  
 AlaAlaGlnLeuAlaAlaProGlyAlaAlaThrAlaPheValGlyAlaGlyLeuAlaGly  
 3301 TGGCTGCCAGCTGCCGCCCCCGTGGCTACTGCCCTTGTTGGCGCTGGCTTAGCTG  
 ACCGACGGGTCGAGCGGGGGGCCACGGCGATGACGGAAACACCCCGCACCGAAC  
 AlaAlaIleGlySerValGlyLeuGlyLysValLeuIleAspIleLeuAlaGlyTyrGly  
 3361 GCGCCGCATCGGCAGTGTGGACTGGGGAAAGTCCTCATAGACATCCITGCAGGGTATG  
 CGCGCCGTAGCGTCACCTGACCCCTCCAGGAGTCTGTAGGAACGTCCCAC  
 AlaGlyValAlaGlyAlaLeuValAlaPheLysIleMetSerGlyGluValProSerThr  
 3421 GCGCGGGCGTGGCGGGAGCTCTTGTCATTGCATTCAAGATCATGAGCGGTGAGGTCCCCCTCA  
 CGCGCCCGCACCCCTCGAGAACACCGTAAGTTCTAGTACTGCCACTCCAGGGGAGGT  
 GluAspLeuValAsnLeuLeuProAlaIleLeuSerProGlyAlaLeuValValGlyVal  
 3481 CGGAGGACCTGGTCAATCTACTGCCGCCATCCTCTGCCCGGAGCCCTCGTAGTCGGCG  
 GCCTCTGGACCAGTTAGATGACGGGGGTAGGAGAGCGGGGCTCGGGAGCATCAGCCG  
 ValCysAlaAlaIleLeuArgArgHisValGlyProGlyGluGlyAlaValGlnTrpMet  
 3541 TGGCTGTGCAAGCAATACTGCGCCGGCACGTGGCCCGGGGAGGGGGCAGTGCAGTGG  
 ACCAGACAGTCGTTATGACGCGCCGTGCAACCGGGCCCGTCCCCCGTCACGTACCT  
 AsnArgLeuIleAlaPheAlaSerArgGlyAsnHisValSerProThrHisTyrValPro  
 3601 TGAACCGGCTGATAGCCTCGCCTCCGGGGAAACATGTTCCCCACGCACTACGTGC  
 ACTTGGCCGACTATCGGAAGCGGAGGGCCCCCTGGTACAAAGGGGTGCGTGTGACCG  
 GluSerAspAlaAlaAlaArgValThrAlaIleLeuSerSerLeuThrValThrGlnLeu  
 3661 CGGAGAGCGTAGCTGCCCGCGTCACTGCCATACTCAGCAGCCTCACTGTAACCCAGC  
 GCCTCTCGCTACCTGACGGCGCAGTGACGGTATGAGTCGTCGGAGTGACATTGGGTG  
 LeuArgArgLeuHisGlnTrpIleSerSerGluCysThrThrProCysSerGlySerTrp  
 3721 TCCTGAGGCGACTGCAACAGTGGATAAGCTGGAGTGTACCATGCTCCGGTTCT  
 AGGACTCCGCTGACGGTGTACCTATTGAGCCTCACATGGTAGGTACGAGGCCAAGGA  
 LeuArgAspIleTrpAspTrpIleCysGluValLeuSerAspPheLysThrTrpLeuLys  
 3781 GGCTAAGGGACATCTGGGACTGGATATGCGAGGTGTTGAGCGACTTTAACCTGGCTAA  
 CCGATTCCTGTAGACCCCTGACCTATACTGCTCCACAACTCGCTGAAATTCTGGACCGATT  
 AlalysLeuMetProGlnLeuProGlyIleProPheValSerCysGlnArgGlyTyrLys  
 3841 AAGCTAAGCTCATGCCACAGCTGCCCTGGATCCCTTGTGTCTGCCAGCGCGGGTATA  
 TTCGATTGGTACGGTGTGGACGGACCCCTAGGGGAAACACAGGACGGTCCGCCATAT

FIG. 26-4

3901 GlyValTrpArgValAspGlyIleMetHisThrArgCysHisCysGlyAlaGluIleThr  
 AGGGGGCTGGCGAGTGGACGGCATCATGCACACTCGTGCCTGAGCTGAGATCA  
 TCCCCCAGACCGCTCACCTGCCGTAGTACGTGTGAGCCACGGTGACACCTCGACTCTAGT  
  
 3961 GlyHisValLysAsnGlyThrMetArgIleValGlyProArgThrCysArgAsnMetTrp  
 CTGGACATGTCAAAAACGGGACGATGAGGATCGTCGGCTCTAGGACCTGCAGGAACATGT  
 GACCTGTACAGTTTGTGCCCTGCTACTCCTAGCAGCCAGGATCCTGGACGTCTGTACA  
  
 4021 SerGlyThrPheProIleAsnAlaTyrThrGlyProCysThrProLeuProAlaPro  
 GGAGTGGGACTTCCCATTAAATGCTACACCACGGGCCCTGTACCCCCCTCTGCC  
 CCTCACCCCTGGAAGGGTAATTACGGATGTGGTGGCCGGGACATGGGGGAAGGACGCG  
  
 4081 AsnTyrThrPheAlaLeuTrpArgValSerAlaGluGluTyrValGluIleArgGlnVal  
 CGAACTACACGTTCGCGCTATGGAGGGTGTGAGAGGAAATATGTGGAGATAAGGCAGG  
 GCTTGATGTGCAAGCGCGATACTCCCACAGACGTCTCCTATAACACTCTIATTCGTCC  
  
 4141 GlyAspPheHisTyrValThrGlyMetThrThrAspAsnLeuLysCysProCysGlnVal  
 TGGGGACTTCACTACGTGACGGGTATGACTACTGACAATCTCAAATGCCGTGCCAGG  
 ACCCCCTGAAGGTGATGCACTGCCATACTGATGACTGTTAGAGTTACGGCAGGGTCC  
  
 4201 ProSerProGluPhePheThrGluLeuAspGlyValArgLeuHisArgPheAlaProPro  
 TCCCCTCGCCCCAATTTCACAGAAATTGGACGGGGTGCCTACATAGGTTGGCCCCC  
 AGGGTAGCGGGCTTAAAAGTGTCTAACCTGCCACGGGATGTATCCAACGCGGGGG  
  
 4261 CysLysProLeuLeuArgGluGluValSerPheArgValGlyLeuHisGLUTyrProVal  
 CCTGCAAGCCCTGCTGCCGGAGGAGGTATCATTAGACTCCACGAATAACCCGG  
 GGACGTTGCCAACGACCCCTCCATAGTAAGTCTCATCCTGAGGTGCTTATGGGCC  
  
 4321 GlySerGlnLeuProCysGluProGluProAspValAlaValLeuThrSerMetLeuThr  
 TAGGGTCGCAATTACCTTCGAGGCCGAACCGGACGTGGCCGTGTTGACGTCCATGCTCA  
 ATCCCTCGCTTAATGGAACGCTCGGGCTTGGCCTGACCGSCACAACGCTCCCTAGTGGGG  
  
 4381 AspProSerHisIleThrAlaGluAlaAlaGlyArgArgLeuAlaArgGlySerProPro  
 CTGATCCCTCCCATATAACAGCAGAGGGCGGCCGGCGAAGGGTTGGCGAGGGGATGCC  
 GACTAGGGAGGGTATATTGTCGCTCCGCCGGCCGCTTCCAAACCGCTCCCTAGTGGGG  
  
 4441 SerValAlaSerSerSerAlaSerGlnLeuSerAlaProSerLeuLysAlaThrCysThr  
 CCTCTGTGGCCAGCTCTCGGCTAGCCAGCTATCCGCTCCATCTCAAGGCAACTGCA  
 GGAGACACCGGTGAGGAGCCATCGGTGAGGAGGTAGAGAGTTCCGTGAACGT  
  
 4501 AlaAsnHisAspSerProAspAlaGluIleGluAlaAsnLeuLeuTrpArgGlnGlu  
 CCGCTAACCATGACTCCCCCTGATGCTGAGCTCATAGAGGCCAACCTCCATGGAGGCAGG  
 GGCGATGGTACTGAGGGACTACGACTCGAGTATCTCCGTTGGAGGATACCTCCGTCC  
  
 4561 MetGlyGlyAsnIleThrArgValGluSerGluAsnLysValValIleLeuAspSerPhe  
 AGATGGCGGCAACATCACCAGGGTTGAGTCAGAAAACAAAGGGTGTCTGGACTCCT  
 TCTACCCGCCGTGTTGAGTGGTCCCAACTCAGTCTTTGTTCAACCACTAACGACTGAGGA  
  
 4621 AspProLeuValAlaGluGluAspGluArgGluIleSerValProAlaGluIleLeuArg  
 TCGATCCGCTTGTGGCGGAGGAGCGAGCGGGAGATCTCGTACCCGAGAAATCC  
 AGCTAGGCGAACACCGCCTCCTCTGCTGCCCTAGAGGCATGGCGTCTTGTGGAC  
  
 4681 LysSerArgArgPheAlaGlnAlaLeuProValTrpAlaArgProAspTyrAsnProPro  
 GGAAGTCTCGGAGATTGCCAGGCCCTGCCGTTGGCGCGCCGACTATAACCC  
 CCTTCAGAGCCTCTAACGGGTCCGGACGGCAAACCCGCGCCGCGCTGATATTGGGG  
  
 4741 LeuValGluThrTrpLysLysProAspTyrGluProProValValHisGlyCysProLeu  
 CGCTAGTGGAGACGTGGAAAAGCCCGACTACGAACCACTGTGGTCCATGGCTGTCC  
 GCGATCACCTCTGACCTTTTCGGGCTGATGCTTGGTGGACACCAGGTACCGACAGGCG  
  
 4801 ProProProLysSerProProValProProProArgLysLysArgThrValValLeuThr  
 TTCCACCTCCAAAGTCCCCCTCTGCGCTCCGCTCGGAAGAAGCGGACGGTGGTCC  
 AAGGTGGAGGTTCAAGGGAGGACCGGAGGCGGAGCCTCTCGCCTGCCACCAAGGAGT

FIG. 26-5

4861 CTGAATCAACCTATCTACTGCCCTGGCCAGCTGCCACCAGAAGCTTGGCAGCTCCT  
 GACTTAGTTGGATAGATGACGGAACCGGCTCGAGCGGTGGCTTCGAAACCGTCGAGGA  
 ThrSerGlyIleThrGlyAspAsnThrThrSerSerGluProAlaProSerGlyCys  
 4921 CAACTTCCGGCATTACGGCGACAATACGACAACTCCTCTGAGGCCGCCCTCTGGCT  
 GTTGAAGGCCGTAATGCCCGCTGTTATGCTGTTAGGAGACTCGGGGGGGAGACCGA  
 ProProAspSerAspAlaGluSerTyrSerSerMetProProLeuGluGlyGluProGly  
 4981 GCCCCCCCGACTCCGACGCTGAGTCCTATTCCCTCATGCCCGCCCTGGAGGGGAGCCTG  
 CGGGGGGGCTGAGGCTGCGACTCAGGATAAGGAGGTACGGGGGGACCTCCCCCTCGGAC  
 AspProAspLeuSerAspGlySerTrpSerThrValSerSerGluAlaAsnAlaGluAsp  
 5041 GGGATCCGGATCTTAGCGACGGGTCAACGGTCAGTAGTGAGGCCAACGGGAGG  
 CCCTAGGCCTAGAACGCTGCCAGTACAGTGGCCAGTCATCACTCCGGTTGCGCCTCC  
 ValValCysCysSerMetSerTyrSerTrpThrGlyAlaLeuValThrProCysAlaAla  
 5101 ATGTCGTGTGCTGCTCAATGCTTACTCTTGGACAGGCGACTCGTACCGTACCCCGTGGCCG  
 TACAGCACACGACGAGTTACAGAACCTGTCGGTGAAGCAGTGGGGCACGGC  
 GluGluGlnLysLeuProIleAsnAlaLeuSerAsnSerLeuLeuArgHisHisAsnLeu  
 5161 CGGAAGAACAGAAACTGCCATCAATGCACTAAGCAACTCGTTGCTACGTACCCAAATT  
 GCCTTCTTGTCTTGACGGTAGTTACGTGATTGAGCAACCGATGCAAGTGGTGTAA  
 ValTyrSerThrThrSerArgSerAlaCysGlnArgGlnLysLysValThrPheAspArg  
 5221 TGGTGTATTCCACCACCTCACGCACTGCTTGCCTAAAGGCAGAAGAAAGTCACATTGACA  
 ACCACATAAGGTGGTGGAGTGCCTCACGAAACGGTTCCGTCTTCAGTGTAACTGT  
 LeuGlnValLeuAspSerHisTyrGlnAspValLeuLysGluValLysAlaAlaAlaSer  
 5281 GACTGCAAGTTCTGGACAGCCATTACCAAGGACGTACTCAAGGAGGTTAAAGCAGCGCGT  
 CTGACGTTCAAGACCTGCGTAATGGCTCTGAGTTCCCTCCAATTCTCGTCGCCGCA  
 LysValLysAlaAsnLeu  
 5341 CAAAAGTGAAGGCTAACTTG  
 GTTTCACTCCGATTGAAC

FIG. 26-6

**FIG. 27** Translation der DNA 12f

1 IlePheLysIleArgMetTyrValGlyGlyValGluHisArgLeuGluAlaAlaCysAsn  
 CCATATTTAAAATCAGGATGTACGTGGAGGGTCGAACACAGGCTGGAAGCTGCCTGCA  
 GGTATAAATTAGTCCTACATGCACCCCTCCCCAGCTTGTCGCCACCTCGACGGACGT  
  
 61 TrpThrArgGlyGluArgCysAspLeuGluAspArgAspArgSerGluLeuSerProLeu  
 ACTGGACGCGGGCGAACGTTGCGATCTGGAAAGACAGGGACAGGTCCGAGCTCAGCCCGT  
 TGACCTGCGCCCCGCTTGCAACGCTAGACCTCTGTCCCTGTCCAGGCTCGAGTCGGCA  
  
 121 LeuLeuThrThrThrGlnTrpGlnValLeuProCysSerPheThrThrLeuProAlaLeu  
 TACTGCTGACCACATCACAGTGGCAGGTCCCTCCGTGTTCCCTCACAAACCTACCGCT  
 ATGACGACTGGTGTACCGTCCAGGAGGGACAAGGAAGTGTGGATGGTCGGA  
  
 181 SerThrGlyLeuIleHisLeuHisGlnAsnIleValAspValGlnTyrLeuTyrGlyVal  
 TGTCCACCGGCCTCATCCACCTCCACCAAGAACATTGTGGACGTGCAGTACTTGTACGGGG  
 ACAGGTGGCCGGAGTAGGTGGAGGTGGTCTTGTACACCTGCACGTACATGAAACATGCC  
  
 241 GlySerSerIlaAlaSerTrpAlaIleLysTrpGluTyrValValLeuLeuPheLeuLeu  
 TGGGGTCAAGCATCGCTGGGCCATTAAAGTGGAGTACGTCGTTCTGTTCCCTTC  
 ACCCCAGTTCGTAGCGCAGGACCCGGTAATTACCCCTCATGCAGCAAGAGGACAAGGAAG  
  
 301 LeuAlaAspAlaArgValCysSerCysLeuTrpMetMetLeuLeuIleSerGlnAlaGlu  
 TGCTTGAGACGCCGCGTCTGCTCTGCTTGTGGATGATGCTACTCATATCCCAGCGG  
 ACGAACGTCTGCGCGCGCAGACGAGGACGAACACCTACTACCGATGAGTATAGGGTTC  
  
 Überlappung mit 14i  
 361 AlaAlaLeuGluAsnLeuValIleLeuAsnAlaAlaSerLeuAlaGlyThrHisGlyLeu  
 AGGCAGGCTTGGAGAACCTCGTAATACTTAATGCAAGCATCCCTGGCGGGACGCACGGTC  
 TCCGCCAACCTCTGGAGCATTATGAATTACGTCTGTAGGGACCGGCCCTGCGTGCCAG  
  
 421 Val  
 TTGTATC  
 AACATAG

**FIG. 28** Translation der DNA 35fÜberlappung mit 39c

1 LeuLysGluValLysAlaAlaAlaSerLysValLysAlaAsnLeuLeuSerValGluGlu  
 TGCTCAAGGAGGTAAAGCAGCGCGTAAAAGTGAAGGCTAACCTGCTATCCGTAGAGG  
 ACGAGTTCTCCAATTCTCGTCGCCGAGTTTCACTTCCGATTGAACGATAGGCATCTCC  
 AlaCysSerLeuThrProProHisSerAlaLysSerLysPheGlyTyrGlyAlaLysAsp  
 61 AAGCTTGAGCCCTGACGCCACACTCAGCCAAATCCAAGTTGGTTATGGGGCAAAAG  
 TTCGAACGTCGGACTGCGGGGGTGTGAGTCGGTTAGGTTCAAACCAATACCCGTTTC  
 ValArgCysHisAlaArgLysAlaValThrHisIleAsnSerValTrpLysAspLeuLeu  
 121 ACGTCCGTTGCCATGCCAGAAAGGCCGTAAACCACATCAACTCCGTGTGGAAAGACCTTC  
 TGCAGGCAACGGTACGGTCTTCCGGCATTGGGTAGTTGAGGACACCTTCTGGAAG  
 GluAspAsnValThrProIleAspThrThrIleMetAlaLysAsnGluValPheCysVal  
 181 TGGAAAGACAATGTAACACCAATAGACACTACCATCATGGCTAAAGAACGAGGTTTCTGCG  
 ACCTTCTGTTACATTGTGGTTATCTGTGATGGTAGTACCGATTCTGCTCCAAAAGACGC  
 GlnProGluLysGlyGlyArgLysProAlaArgLeuIleValPheProAspLeuGlyVal  
 241 TTCAAGCCTGAGAAGGGGGTCGTAAGCCAGCTCGTCTCATCGTGTCCCCGATCTGGCG  
 AAGTCGGACTCTCCCCCAGCATTGCGAGCAGTAGCACAGGGCTAGACCCGC  
 ArgValCysGluLysMetAlaLeuTyrAspValValThrLysLeuProLeuAlaValMet  
 301 TGCAGCGTGTGCGAAAAGATGGCTTGTACGACGTGGTTACAAAGCTCCCCCTGGCCGTGA  
 ACGCGCACACGTTTCTACCGAACATGCTGCACCAATGTTCGAGGGAAACCGGCACT  
 GlySerSerTyrGlyPheGlnTyrSerProGlyGlnArgValGluPheLeuValGlnAla  
 361 TGGGAAGCTCCTACGGATTCCAATACTCACCAGGACAGCGGGTTGAATTCTCGTGCAG  
 ACCCTTCGAGGATGCCTAAGGTTATGAGTGGTCTGCCCCACTTAAGGAGCACGTT  
 TrpLysSerLysThrProMetGlyPheSerTyrAspThrArgCysPheAspSerThr  
 421 CGTGGAAAGTCCAAGAAAACCCAATGGGGTCTCGTATGATAACCGCTGCTTGACTCCA  
 GCACCTTCAGGTTCTTGGGGTACCCCAAGAGGATACTATGGCGACGAAACTGAGGT  
 ValThrGluSerAspIleArgThrGluGluAla  
 481 CAGTCACTGAGAGCGACATCCGTACGGAGGAGGCA  
 GTCAGTGAECTCGCTGTAGGCATGCCTCCCGT

**FIG. 29** Translatiion der DNA 19g

1 GluPheLeuValGlnAlaTrpLysSerLysLysThrProMetGlyPheSerTyrAspThr  
 GAATTCCCTCGTGCAGCGTGAAAGTCCAAGAAAACCCCAATGGGGTTCTCGTATGATACC  
 CTTAAGGAGCACGTTCGCACCTCAGGTCTTTGGGGTTACCCAAAGAGCATACTATGG  
 Überlappung mit 35f  
 61 ArgCysPheAspSerThrValThrGluSerAspIleArgThrGluGluAlaIleTyrGln  
 CGCTGCTTGACTCCACAGTCAGTGAGAGCGACATCCGTACGGAGGAGGCAATCTACCAA  
 GCGACGAAACTGAGGTGTAGTACTCTCGCTGTAGGCATGCCCTCCGTTAGATGGTT  
 121 CysCysAspLeuAspPrcGlnAlaArgValAlaIleLysSerLeuThrGluArgLeuTyr  
 TGTTGTGACCTCGACCCCCAAGCCCGCGTGGCCATCAAGTCCCTCACCGAGAGGCTTAT  
 ACAACACTGGAGCTGGGGTTCGGGCCACCGTAGTTCAAGGGAGTGGCTCTCCGAAATA  
 181 ValGlyGlyProLeuThrAsnSerArgGlyGluAsnCysGlyTyrArgArgCysArgAla  
 GTTGGGGGCCCTCTTACCAATTCAAGGGGGGAGAACTGCGGCTATCGCAGGTGCCCGCG  
 CAACCCCCGGGAGAACGGTTAAGTCCCCCTCTGACGCCGATAGCGTCCACGGCGCG  
 241 SerGlyValLeuThrThrSerCysGlyAsnThrLeuThrCysTyrileLysAlaArgAla  
 AGCGGCGTACTGACAACCTAGCTGTGGTAACACCCCTCACTTGCTACATCAAGGCCCCGGCA  
 TCGCCCGCATGACTGTTGATCGACACCATTGTGGAGTGAACGATGTAGTTCCGGGGCCGT  
 301 AlaCysArgAlaAlaGlyLeuGlnAspCysThrMetLeuValCysGlyAspAspLeuVal  
 GCCTGTCGAGCCGCAGGGCTCCAGGACTGCAACCATGCTCGTGTGGCGACGACTTAGTC  
 CGGACAGCTCGGCGTCCCGAGGTCTGACGTGGTACGAGCACACACCGCTGCTGAATCAG  
 361 ValIleCysGluSerAlaGlyValGlnGluAspAlaAla  
 GTTATCTGTGAAAGCGCGGGGGTCCAGGAGGACGCGGCGAG  
 CAATAGACACTTTCGCGCCCCCAGGTCCCTGCGCCGCTC

FIG. 30 Translation der DNA 26g

1 GlyGlyGluAsnCysGlyTyrArgArgCysArgAlaSerGlyValLeuThrThrSerCys  
 GGGGGGGAGAACTCGGGCTATCGCAGGTGCCGCAGCGCGTACTGACAACTAGCTGT  
 CCCCCCTCTTGACGCCGATAGCGTCACGGCGCGTCCGCGCATGACTGTTGATCGACA

61 GlyAsnThrLeuThrCysTyrIleLysAlaArgAlaAlaCysArgAlaAlaGlyLeuGln  
 GGTAACACCCCTCACTTGTACATCAAGGCCGAGCAGCCTGTCAGGCCAGGGCTCCAG  
 CCATTGTGGGAGTGAACAATGTTAGTCCGGCTCGGACAGCTCGCGTCCCAGGGTC  
 Überlappung mit 19g

121 AspCysThrMetLeuValCysGlyAspAspLeuValValIleCysGluSerAlaGlyVal  
 GACTGCACCAGCTCGTGTGGCAGCAGCTAGTCGTTATCTGTGAAAGCGCGGGGGTC  
 CTGACGTGGTACGAGCACACACCGCTGCTGAATCAGCAATAGACACTTCGCGCCCCAG

181 GluGluAspAlaAlaAlaSerLeuArgAlaPheThrGluAlaMetThrArgTyrSerAlaPro  
 CAGGAGGACGCCGAGCCTGAGAGCCTTCACGGAGGCTATGACCAGGTACTCCGCCCC  
 GTCCCTCTGCCGCTCGACTCTCGAACAGTGCCTCCGATACTGGTCCATGAGGCGGGGG

241 ProGlyAspProProGlnProGluTyrAspLeuGluIleThrSerCysSerSerAsn  
 CCTGGGGACCCCCCACAACCAGAATACGACTTGGAGCTCATAACATCATGCTCCTCCAAC  
 GGACCCCTGGGGGTGTTGGTCTATGCTGAACCTCGAGTATTGTTAGTACGAGGAGGTG

301 ValSerValAlaHisAspGlyAlaGlyLysArgValTyrTyrLeuThrArgAspProThr  
 GTGTCACTCGCCACGACGGCCTGGAAAGAGGGCTACTACCTCACCCGTGACCCCTACA  
 ~ CACAGTCAGCGGGTGCTGCCGCGACCTTCTCCAGATGATGGAGTGGGCACTGGATGT

361 ThrProLeuAlaArgAlaAlaTrpGluThrAlaArgHisThrProValAsnSerTrpLeu  
 ACCCCCCCTCGCGAGAGCTCGTGGGAGACAGCAAGACACACTCCAGTCATAATTCTGGCTA  
 TGGGGGGAGCGCTCTGACCCCTCTGTCGTTCTGTGAGGTCAAGTAAGGACCGAT

421 GlyAsnIleIleMetPheAlaProThrLeuTrpAla  
 GGCAACATAATCATGTTGCCACACTGTGGCG  
 CGTTGTTAGTACAAACGGGGGTGTCAGCACCCCG

FIG. 31 Translation der DNA 15e

1 GlyAlaGlyLysArgValTyrTyrLeuThrArgAspProThrProLeuAlaArgAla  
 CGGGCTGGAAAGAGGGCTACTACCTCACCCGTGACCCCTACAACCCCCCTCGCGAGAGC  
 GCGCGACCTTCTCCAGATGATGGAGTGGGACTGGGATGTTGGGGAGCGCTCTCG  
 Überlappung mit 26g

61 AlaTrpGluThrAlaArgHisThrProValAsnSerTrpLeuGlyAsnIleIleMetPhe  
 TGCCTGGGAGAGACAGCAAGACACACTCCAGTCATAATTCTGGCTAGGCAACATAATCATGTT  
 ACGCACCCCTCTGTCGTTCTGTGAGGTCAAGTAAGGACCGATCCGTTGTTAGTACAA

121 AlaProThrLeuTrpAlaArgMetIleLeuMetThrHisPhePheSerValLeuIleAla  
 TGCCCCCACACTGTGGCGAGGATGATACTGATGACCCATTCTTTAGCGTCCTTATAGC  
 ACGGGGGTGTGACACCCGCTCCTACTATGACTACTGGTAAAGAAATCGCAGGAATATCG

181 ArgAspGlnLeuGluGlnAlaLeuAspCysGluIleTyrGlyAlaCysTyrSerIleGlu  
 CAGGGACCAAGCTGAAACAGGCCCTCGAATGCGAGATCTACGGGGCTGCTACTCCATAGA  
 GTCCCTGGTCGAACCTGTCGGGAGCTAACGCTCTAGATGCCCGGACGATGAGGTATCT

241 ProLeuAspLeuProProIleIleGlnArgLeu  
 ACCACTTGATCTACCTCCAATCATTCAAAGACTC  
 TGGTGAACTAGATGGAGGTAGTAAGTTCTGAG

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

1 IlePheLysIleArgMetTyrValGlyValGluHisArgLeuGluAlaAlaCysAsn  
 1 CCATATTAAATCAGGATGTACGTGGGAGGGTCGAACACAGGCTGGAAAGCTGCCTGCA  
 GGTATAAATTTAGTCCTACATGCACCCCTCCCCAGCTGTGTCGCCACCTCGACGGACGT  
 TrpThrArgGlyGluArgCysAspLeuGluAspArgAspArgSerGluLeuSerProLeu  
 61 ACTGGACGCGGGCGAACGGTGCATCTGGAAAGACAGGGACAGGTCCGAGCTCAGCCCGT  
 TGACCTGCGCCCCGCTTGCAACGCTAGACCTCTGTCCCTGTCCAGGCTCGAGTCGGCA  
 LeuLeuThrThrThrGlnTrpGlnValLeuProCysSerPheThrThrLeuProAlaLeu  
 121 TACTGCTGACCACATCACAGTGGCAGGTGCCTCCGTTGTCACAAACCTACCAGCCT  
 ATGACGACTGGTGATGTGTCACCGTCAGGAGGCACAAGGAAGTGTGGGATGGTCGGA  
 SerThrGlyLeuIleHisLeuHisGlnAsnIleValAspValGlnTyrLeuTyrGlyVal  
 181 TGTCACCAGGCTCATCCACCTCCACAGAACATTGTCGGACGTGCAGTACTTGTACGGGG  
 ACAGGTGGCCGAGTAGGTGGAGGTGTTGTAACACCTGCACGTATGAACATGCC  
 GlySerSerIleAlaSerTrpAlaIleLysTrpGluTyrValValLeuLeuPheLeuLeu  
 241 TGGGGTCAAGCATCGCTCTGGGCCATTAAAGTGGGAGTACGTCGTTCTCTGTTCTTC  
 ACCCCAGTCGTAGCGCAGGACCCGGTAATTCAACCTCATGCAGCAAGAGGACAAGGAAG  
 LeuAlaAspAlaArgValCysSerCysLeuTrpMetMetLeuLeuIleSerGlnAlaGlu  
 301 TGCTTGAGACGCGCGCTGCTCTGCTCTGTTGGATGATGCTACTCATATCCCAAGCGG  
 ACGAACGTCGCGCGCAGACGAGGACGAACACCTACTACGATGAGTATAGGGTTCGCC  
 AlaAlaLeuGluAsnLeuValIleLeuAsnAlaAlaSerLeuAlaGlyThrHisGlyLeu  
 361 AGGCGGCTTGGAGAACCTCGTAATACTTAATGAGCATCCCTGGCCGGACGCACGGTC  
 TCCGCCGAAACCTTGGAGCATTAATGAGCATGGGACCGGCCCTGCGTGGCAG  
 ~ ValSerPheLeuValPhePheCysPheAlaTrpTyrLeuLysGlyLysTrpValProGly  
 421 TTGTATCCTTCTCGTGTCTCTGCTTTGCATGGTATTTGAAGGGTAAGTGGGTGCCCC  
 AACATAGGAAGGAGCACAAGAACGAAACGTAACATAAACTTCCCATTCAACCCACGGGC  
 AlaValTyrThrPheTyrGlyMetTrpProLeuLeuLeuLeuAlaLeuProGln  
 481 GAGCGGTCTACACCTCTACGGGATGTGGCCTCTCCTCTGCTCTGTTGGCGTTGGCC  
 CTGCCAGATGTGGAGATGCCCTACACCGGAGAGGAGGACGAGGACMACCGCAACGGGG  
 ArgAlaTyrAlaLeuAspThrGluValAlaAlaAlaSerCysGlyGlyValValLeuValGly  
 541 AGCGGGCGTACCGCCTGGACACGGAGGTGGCCCGCGTCGTTGGCGGTGTGCTCG  
 TCGCCCGCATGCGCAGCTGCGCTCACCGCGCAGCACCCGCCACAACAAGAGCAGC  
 LeuMetAlaLeuThrLeuSerProTyrTyrLysArgTyrIleSerTrpCysLeuTrpTrp  
 601 GGTGATGGCGCTGACTCTGTCACCATATTACAAGCGCTATATCAGCTGGCTGCTGGT  
 CCAACTACCGCAGCTGAGACAGTGGTATAATGTCGCGATATAGTCGACCAACGAACACCA  
 LeuGlnTyrPheLeuThrArgValGluAlaGlnLeuHisValTrpIleProProLeuAsn  
 661 GGCTTCAGTATTTCTGACCAAGAGTGGCTCAGCTGCACTGTGTTGGATCCCCCCTCA  
 CCGAAGTCATAAAAGACTGGCTCACCTCGCGTTGACGTGACACCTAACGGGGAGGT  
 ValArgGlyGlyArgAspAlaValIleLeuLeuMetCysAlaValHisProThrLeuVal  
 721 ACGTCCGAGGGGGCGCGACGCCGTACCTTACTCATGTTGCTGTGCTGTACACCCGACTCTGG  
 TGCAGGCTCCCCCGCGCTGCGGAGTAGAATGAGTACACACGACATGTGGGCTGAGACC  
 PheAspIleThrLysLeuLeuLeuAlaValPheGlyProLeuTrpIleLeuGlnAlaSer  
 781 TATTTGACATCACCAAAATTGCTGCTGGCGTCTCGGACCCCTTGGATTCTTCAGCCA  
 ATAAACTGTAGTGGTTAACGACGACCGCAGAACCTGGGAAACCTAACGAAGTTGGT  
 LeuLeuLysValProTyrPheValArgValGlnGlyLeuLeuArgPheCysAlaLeuAla  
 841 GTTTCCTAAAGTACCCACTTGTGCGCGTCAAGGGCTTCTCCGGTTCTGCGCGTTAG  
 CAAACGAATTCTCATGGGATGAAACACGCGCAGGTTCCGGAAGAGGCCAGACCGCAATC  
 ArgLysMetIleGlyGlyHisTyrValGlnMetValIleIleLysLeuGlyAlaLeuThr  
 901 CGCGGAAGATGATCGGAGGCCATTACGTGCAAATGGTCATCAATTAGTTAGGGGGCGCTTA  
 GCGCCTCTACTAGCCTCCGGTAATGCACTGTTACCAAGTAGTAATTCAATCCCCGGAT

961 GlyThrTyrValTyrAsnHisLeuThrProLeuArgAspTrpAlaHisAsnGlyLeuArg  
 CTGGCACCTATGTTTATAACCATCTCACTCCTTCGGACTGGCGCACACGGCTTGC  
 GACCGTGGATACAAATATTGGTAGAGTGAGGAGAAGCCCTGACCCGCGTGGTGC  
 CGAAC  
 1021 AspLeuAlaValAlaValGluProValValPheSerGlnMetGluThrLysLeuIleThr  
 GAGATCTGGCGTGGCTGTAGAGCCAGTCGTCTCTCCCAAATGGAGACCAAGCTCATCA  
 CTCTAGACCGGCACCGACATCTCGGTCAAGCAGAAGAGGGTTAACCTCTGGTGCAGTAGT  
 1081 TrpGlyAlaAspThrAlaAlaCysGlyAspIleIleAsnGlyLeuProValSerAlaArg  
 CGTGGGGGGCAGATACGCCCGTGGCTGACATCATCAACGGCTTGCCTGTTCCGG  
 GCACCCCCCGTCTATGGCGCGCACGCCACTGTAGTAGTGGCCAACGGACAAAGGCC  
 1141 ArgGlyArgGluIleLeuLeuGlyProAlaAspGlyMetValSerLysGlyTrpArgLeu  
 GCAGGGGCCGGAGATACTGCTCGGCCAGCCATGGAATGGTCTCCAAGGGTGGAGGT  
 CGTCCCCGGCCCTCTATGACGAGCCGGTGGCTACCTTACCAAGAGGTCCCCACCTCCA  
 1201 LeuAlaProIleThrAlaTyrAlaGlnGlnThrArgGlyLeuLeuGlyCysIleIleThr  
 TGCTGGCGCCCATCACGGCGTACGCCAGCAGACAAGGGGCTCCTAGGGTGCATAATCA  
 ACGACCGCGGGTAGTGCCTGCGGTCTGTGTTCCCGAGGATCCCACGTATTAGT  
 1261 SerLeuThrGlyArgAspLysAsnGlnValGluGlyGluValGlnIleValSerThrAla  
 CCAGCCTAACTGGCCGGACAAAACCAAGTGGAGGGTGAGGTCCAGATTGTGTCAACTG  
 GGTGGATTGACCGGCCCTGTTTGGTACCTCCACTCCAGGTCTAACACAGTTGAC  
 1321 AlaGlnThrPheLeuAlaThrCysIleAsnGlyValCysTrpThrValTyrHisGlyAla  
 CTGGCCCAAACCTTCCTGGCAACGTGCATCAATGGGGTGTGGACTGTCTACCACGGG  
 GACGGGTTTGGAGGACCGTTGCACGTAGTTACCCCACACGACCTGACAGATGGTGC  
 1381 GlyThrArgThrIleAlaSerProLysGlyProValIleGlnMetTyrThrAsnValAsp  
 CCGAACGAGGACCATCGCGTCACCCAAAGGGTCTGTCTCAGATGTATACCAATGTAG  
 GGCTTGCTCTGGTAGCGCAGTGGTTCCAGGACAGTAGGTCTACATAIGGTTACATC  
 1441 GlnAspLeuValGlyTrpProAlaProGlnGlySerArgSerLeuThrProCysThrCys  
 ACCAAGACCTTGTGGCTGCCGCTCCGCAAGGTAGCCGCTATTGACACCCCTGCACCT  
 TGGTCTGGAACACCCGACCGGGCGAGGCGTTCCATGGCAGTAACTGTGGGACGTGAA  
 1501 GlySerSerAspLeuTyrLeuValThrArgHisAlaAspValIleProValArgArgArg  
 GCGGCTCTCGGACCTTACCTGGTCAGGACGCCGCGATGTCATTCCGTGCGCCGGC  
 CGCCGAGGAGCCTGGAAATGGACCGTAGTGTCTCGTGGCTACAGTAAGGGCACGCC  
 1561 GlyAspSerArgGlySerLeuLeuSerProArgProIleSerTyrLeuLysGlySerSer  
 GGGGTGATAGQAGGGCAGCCTGCTGTGCCCCGCCATTCTACTTGAAAGGCTCCT  
 CCCCACTATCGTCCCCGTGGACGACAGCAGGGCCGGTAAAGGTTGAACCTTCGAGGA  
 1621 GlyGlyProLeuLeuCysProAlaGlyHisAlaValGlyIlePheArgAlaAlaValCys  
 CGGGGGTCCGTGTTGCCCCGGGGCACGCCGTGGCATATTAGGGCCGGTGT  
 GCCCCCCAGGCGACAACACGGGGCGCCCCGTGGCACCCGTATAAACCCGGCGCACA  
 1681 ThrArgGlyValAlaLysAlaValAspPheIleProValGluAsnLeuGluThrThrMet  
 GCACCCGTGGAGTGGCTAAGGCGGTGGACTTTATCCCTGTGGAGAACCTAGAGACAA  
 CGTGGGCACCTCACCGATTCCGCCACCTGAAATAGGGACACCTCTGGATCTGTGGT  
 1741 ArgSerProValPheThrAspAsnSerSerProProValValProGlnSerPheGlnVal  
 TGAGGTCCCCGGTGTTCACGGATAACTCCTCTCCACCAAGTAGTGCCTCAGAGCTTCC  
 ACTCAGGGGCCACAAGTGCCTATTGAGGAGAGGTGGTCATACGGGTCTCGAAGGT  
 1801 AlaHisLeuHisAlaProThrGlySerGlyLysSerThrLysValProAlaAlaTyrAla  
 TGGCTCACCTCATGCTCCCACAGGCAGCGGAAAGCACCAAGGTCCGGCTGCATATG  
 ACCGAGTGGAGGTACGAGGGTGTCCGTGGCTTGTGGTCCAGGGCCACGTATAC  
 1861 AlaGlnGlyTyrLysValLeuValLeuAsnProSerValAlaAlaThrLeuGlyPheGly  
 CAGCTCAGGGCTATAAGGTGCTAGTACTCAACCCCTCTGGTGTGCAACACTGGCTTG  
 GTCGAGTCCCAGTATTCCACGATCATGAGTTGGGGAGACACGACGTTGTGACCC  
 AAC  
 AlaTyrMetSerLysAlaHisGlyIleAspProAsnIleArgThrGlyValArgThrIle

FIG. 32-2

1921 GTGCTTACATGTCCAAGGCTCATGGGAAAGATCTAACATCAGGACCGGGGTGAGAACAA  
 CACGAATGTACAGGTTCCGAGTACCCTAGCTAGGATTGTAGTCCTGGCCCCACTCTTGT  
 1981 ThrThrGlySerProIleThrTyrSerThrTyrGlyLysPheLeuAlaAspGlyGlyCys  
 TTACCACTGGCAGCCCCATCACGTACTCCACCTACGGCAAGTTCCCTGCCGACGGCGGGT  
 AATGGTGACCGTCGGGGTAGTGCATGAGGTGGATGCCGTTCAAGGAAACGGCTGCCGCCC  
 2041 SerGlyGlyAlaTyrAspIleIleIleCysAspGluCysHisSerThrAspAlaThrSer  
 GCTCGGGGGCGCTTATGACATAATAATTGTGACGAGTGCCACTCCACGGATGCCACAT  
 CGAGCCCCCGCGAATACTGTATTAAACACTGCTCACGGTGAGGTGCTACGGTGA  
 2101 IleLeuGlyIleGlyThrValLeuAspGlnAlaGluthrAlaGlyAlaArgLeuValVal  
 CCATCTGGGCATCGGCACTGTCTTGACCAAGCAGAGACTGCCGGAGACTGGTTG  
 GGTAGAACCGTAGCCGTACAGGAACGGACTGGTCTCTGACGCCCGCTCGACCAAC  
 2161 LeuAlaThrAlaThrProProGlySerValThrValProHisProAsnIleGluGluVal  
 TGCTCGCCACCGCCACCCCTCCGGCTCCGTCACTGTGCCCATCCACATCGAGGAGG  
 ACGAGCGGTGGCGGTGGGAGGCCGAGGCACTGACACGGGTAGGGTTGTAGCTCCCTCC  
 2221 AlaLeuSerThrThrGlyGluIleProPheTyrGlyLysAlaIleProLeuGluValIle  
 TTGCTCTGTCCACCACCGGAGAGATCCCTTTTACGGCAAGGCTATCCCTCGAAGTAA  
 AACGAGACAGGTTGGCTCTAGGGAAAAATGCCCTCCGATAGGGGAGGCTTCATT  
 2281 LysGlyGlyArgHisLeuIlePheCysHisSerLysLysCysAspGluLeuAlaAla  
 TCAAGGGGGGAGACATCTCATCTGTCAATTCAAAGAAGTGCACGAACTGCCG  
 AGTCCCCCCCCTCTGTAGAGTAGAAGACAGTAAGTTCTTCACGCTGCTTGAGCGGC  
 2341 LysLeuValAlaLeuGlyIleAsnAlaValAlaTyrTyrArgGlyLeuAspValSerVal  
 CAAAGCTGGTCCATTGGCATCAATGCCGTGGCTACTACCGGGCTTGACGTGTCG  
 GTTGCACCACCGTAACCGTAGTTACGGCACCGGATGATGGCAGAACACTGCCAGAGC  
 ~ 2401 IleProThrSerGlyAspValValValAlaThrAspAlaLeuMetThrGlyTyrThr  
 TCATCCCGACCAGCGGCATGTTGTCGTGGCAACCGATGCCCTCATGACCGGCTATA  
 AGTAGGGCTGGTCGCCGCTACAACAGCAGCACCGTTGGCTACGGGAGTACTGCCGATAT  
 2461 GlyAspPheAspSerValIleAspCysAsnThrCysValThrGlnThrValAspPheSer  
 CGGGCGACTTCGACTCGGTGATAGACTGCAATACGTGTCACCCAGACAGTCGATTCA  
 GGCGCTGAAGCTGAGCCACTATCTGACGTTATGACACAGTGGCTGTCACTAAAGT  
 2521 LeuAspProThrPheThrIleGluThrileThrLeuProGlnAspAlaValSerArgThr  
 GCCTGACCTACCTTCACATTGAGAGACAATCAGCCTCCCCCAGGATGCTGTCTCCCGCA  
 CGGAACGTGGATGGAAGTGTAACTCTGTTAGTGCAGGGGGCTACGACAGAGGGCGT  
 2581 GlnArgArgGlyArgThrGlyArgGlyLysProGlyIleTyrArgTheValAlaProGly  
 CTCAACGTGGGGCAGGACTGGCAGGGGGAGGCCAGGCATCTACAGATTGTCGGCACCG  
 GAGTGCAGCCCCGTCCTGACCGTCCCCCTCGTCCGTAGATGTCTAAACACCGTGCC  
 2641 GluArgProSerGlyMetPheAspSerSerValIleLeuCysGluCystyrAspAlaGlyCys  
 GGGAGCGCCCCCTCCGGCATGTTGCACTCGTCCGTCTGTGAGTGTATGACGCAGGCT  
 CCCTCGGGGGAGGCCGTACAAGCTGAGCAGGCAGGAGACACTCACGATACTGCGTCCGA  
 2701 AlaTrpTyrGluLeuThrProAlaGluThrThrValArgLeuArgAlaTyrMetAsnThr  
 GTGCTTGGTATGAGCTCACGCCCGCCGAGACTACAGTTAGGCTACGAGCGTACATGAACA  
 CACGAACCATACTCGAGTGCAGGGCGCTGTAGTCAATCCGATGCTCGCATGTACTTGT  
 2761 ProGlyLeuProValCysGlnAspHisLeuGluPheTrpGluGlyValPheThrGlyLeu  
 CCCGGGGCTTCCGTGTGCCAGGACCATCTGAATTGGGAGGGCGTCTTACAGGCC  
 GGGGCCCCGAAGGGCACACGGTCTGGTAGAACTTAAACCCCTCCCCAGAAATGTCCGG  
 2821 ThrHisIleAspAlaHisPheLeuSerGlnThrLysGlnSerGlyGluAsnLeuProTyr  
 TCACTCATATAGATGCCACTTCTATCCCAGACAAAGCAGAGTGGGAGAACCTTCCCT  
 AGTGAGTATATCTACGGGTGAAAGATAAGGGTCTGTTCGTCAACCCCTTGGAAAGGAA  
 2881 LeuValAlaTyrGlnAlaThrValCysAlaArgAlaGlnAlaProProProSerTyrAsp  
 ACCTGGTAGCGTACCAAGCCACCGTGTGCGTAGGGCTCAAGCCCCCTCCCCATGTGGG  
 TGGACCATCGCATGGTTGGCACACCGGATCCGAGTCCGGAGGGGGTAGCACCC

FIG. 32-3

2941 GlnMetTrpLysCysLeuIleArgLeuIlysProThrLeuHisGlyProThrProLeuLeu  
 ACCAGATGTGGAAGTGTGATTGCCCTCAAGCCCACCCCTCATGGGCCAACACCCCTGC  
 TGGTCTACACCTTCACAAACTAAGCGGAGTTCGGGGAGGTACCCGGTTGGGGAGCG  
  
 3001 TyrArgLeuGlyAlaValGlnAsnGluIleThrLeuThrHisProValThrLysTyrIle  
 TATAACAGACTGGCGCTGTTAGAATGAAATCACCCCTGACGCACCCAGTCACCAAATACA  
 ATATGTCGACCCGCGACAAGTCTTACTTAGTGGACTGCGTGGCTAGTGGTTATGT  
  
 3061 MetThrCysMetSerAlaAspLeuGluValValThrSerThrTrpValLeuValGlyGly  
 TCATGACATGCATGTCGGCCGACCTGGAGGTGTCACGAGCACCTGGGTGCTCGTGGCG  
 AGTACTGTACGTACAGCCGGCTGGACCTCCAGCAGTGCTCGTGGACCCACGAGCAACCGC  
  
 3121 ValLeuAlaAlaLeuAlaAlaAlaTyrCysLeuSerThrGlyCysValValIleValGlyArg  
 GCGCTCTGGCTGCTTGGCCGCGTATTGCTGTCACAGGGCTGCGTGGTCATAGTGGCA  
 CGCAGGACCGACGAAACCGGCGATAACGGACAGTTGTCCGACGCACCAGTATCACCGT  
  
 3181 ValValLeuSerGlyLysProAlaIleIleProAspArgGluValLeuTyrArgGluPhe  
 GGGTCGCTTGTCGGGAAGCCGCAATCATACCTGACAGGGAAAGTCCTCTACCGAGAGT  
 CCCAGCAGAACAGGCCCTCGGCCGTAGTATGGACTGTCCTTCAGGAGATGGCTCTCA  
  
 3241 AspGluMetGluGluCysSerGlnHisLeuProTyriIleGluGlnGlyMetMetLeuAla  
 TCGATGAGATGAAAGAGTGTCTCAGCACTTACCGTACATCGAGCAAGGGATGATGCTCG  
 AGCTACTCTACCTCTCACGAGAGTGTGAATGGCATGTAGCTCGTCCCTACTAGGAGC  
  
 3301 GluGlnPhalysGlnLysAlaLeuGlyLeuLeuGlnThrAlaSerArgGlnAlaGluVal  
 CCGAGCAGTCAAAGCAGAAGGCCCTCGGCCCTCCTGCAAGACCGCGTCCCGTCAGGCAGAGG  
 GGCTCGTCAAGTTCGTCTTCCGGAGGCCGAGGACGTCTGGCGCAGGGCAGTCCGTCTCC  
  
 3361 IleAlaProAlaValGlnThrAsnTrpGlnLysLeuGluThrPheTrpAlaLysHisMet  
 TTATCGCCCTGCTGTCCAGACCAACTGGAAAAACTCGAGACCTCTGGCGAAGCATA  
 AATAGCGGGGACGACAGGTCTGGTTGACCGTTTGAGCTCTGGAAGACCCGCTTCGTAT  
  
 3421 TrpAsnPheIleSerGlyIleGlnTyrLeuAlaGlyLeuSerThrLeuProGlyAsnPro  
 TGTGGAACCTTCATCAGTGGATACAATACTTGGCGGGCTTGTCAACGCTGCCTGGTAACC  
 ACACCTGAAAGTAGTCACCTATGTTATGAACCAGCCGAAACAGTTGCGACGGACCATTGG  
  
 3481 AlaIleAlaSerLeuMetAlaPheThrAlaAlaIleValThrSerProLeuThrThrSerGln  
 CCGCATTGCTTCATTGATGGCTTTACAGCTGTCACCAGCCCCACTAACCAACTAGCC  
 GGCGTAACGAAGTAACTACCGAAAATGTCGACGACAGTGGTCGGGTGATTGGTGTACGG  
  
 3541 ThrLeuLeuPheAsnIleLeuGlyGlyTrpValAlaAlaIleGlnLeuAlaAlaProGlyAla  
 AAACCCCTCTCTCAACATATTGGGGGGTGGCTGGCTGCCAGCTGCCGCCGGTG  
 TTTGGGAGGAGAAGTGTATAACCCCCCACCACCGACGGTCGAGCGGGGGCCAC  
  
 3601 AlaThrAlaPheValGlyAlaGlyLeuAlaGlyAlaAlaIleGlySerValGlyLeuGly  
 CCGCTACTGCCTTGTGGCGCTGGCTAGCTGGCGCCATCGGAGTGTGGACTGG  
 GGCGATGACGAAACACCCGGACCGAATCGACCGCGGCGTAGCGTACAACCTGACC  
  
 3661 LysValLeuIleAspIleLeuAlaGlyTyrGlyAlaGlyValAlaGlyAlaLeuValAla  
 GGAAGGTCTCATAGACATCTTGCAGGGTATGGCGGGCGTGGCGGGAGCTCTGTGG  
 CCTTCCAGGAGTATCTGTAGGAACGTCCATACCGCGCCCGACCGCCCTCGAGAACACC  
  
 3721 PheLysIleMetSerGlyGluValProSerThrGluAspLeuValAsnLeuLeuProAla  
 CATTCAAGATCATGAGCGGTGAGGTCCCTCCACGGAGGACCTGGTCAATCTACTGCCCG  
 GTAAGTTCTAGTACTGCCACTCCAGGGGAGGTGCGTCCCTGGACCAAGTGTAGATGACGGGC  
  
 3781 IleLeuSerProGlyAlaLeuValValGlyValValCysAlaAlaIleLeuArgArgHis  
 CCATCTCTGCCGGAGCCCTCGTAGTCCGGCTGGTCTGTGAGCAATACTGCCCG  
 GGTAGGAGAGCGGGCCTCGGAGCAGCCGACACAGTCGTTATGACGCCGGCG  
  
 3841 ValGlyProGlyGluGlyAlaValGlnTrpMetAsnArgLeuIleAlaPheAlaSerArg  
 ACGTTGGCCCGGGCGAGGGGGCAGTGCAGTGGATGAAACGGCTGATAGCCCTCGCCCTCCC  
 TGCAACCGGGCCCGCTCCCCGTACGTACCTACTTGGCGACTATCGGAAGCGGAGGG  
 GlyAsnHisValSerProThrHisTyrValProGluSerAspAlaAlaArgValThr

FIG. 32-4

3901 GGGGAAACCAGTTCCCCAACGCACACTACGTGCCGGAGAGCGATGCAGCTGCCCGTCA  
 CCCCCTGGTACAAAGGGGTGCCGTATGCACGCCCTCGCTACGTGACGGGCGCAGT  
 AlaIleLeuSerSerLeuThrValThrGlnLeuLeuArgArgLeuHisGlnTrpIleSer  
 3961 CTGCCATACTCAGCAGCCTCACTGTAACCCAGCTCCTGAGGCGACTGCACCACTGGATAA  
 GACGGTATGAGTCGGAGTGACATTGGTCGAGGACTCCGCTGACGTGGTCACCTATT  
 SerGluCysThrThrProCysSerGlySerTrpLeuArgAspIleTrpAspTrpIleCys  
 4021 GCTCGGAGTGTACCACTCCATGCTCCGGTCTGGCTAAAGGACATCTGGACTGGATAT  
 CGAGCCTCACATGGTGAGGTACGAGGCAAGGACCGATTCCCTGACGACCTGACCTATA  
 GluValLeuSerAspPheLysThrTrpLeuLysAlaLysLeuMetProGlnLeuProGly  
 4081 GCGAGGTGTTGAGCGACTTTAACCTGGCTAAAGACCTGGCTAAAGCTAACGCTCATGCCACAGCTGCC  
 CGCTCCACAACCTGCTGAAATTCTGGACCGATTTCGATTGAGTACGGTGTCGACGGAC  
 IleProPheValSerCysGlnArgGlyTyrLysGlyValTrpArgValAspGlyIleMet  
 4141 GGATCCCCTTGTGCTGCCAGCAGCAGGCTGCGCCCCATATTCCCCCAGACCGTCACTGCCGTAGT  
 CCTAGGGAAACACAGGACGGTCGCGCCCCATATTCCCCCAGACCGTCACTGCCGTAGT  
 HisThrArgCysHisCysGlyAlaGluIleThrGlyHisValLysAsnGlyThrMetArg  
 4201 TGCAACACTCGCTGCCACTGTGGAGCTGAGATCACTGGACATGTCAAACACGGGACGATGA  
 ACGTGTGAGCGACGGTGACACCTCGACTCTAGTGAACCTGTACAGTTTGCCCTGCTACT  
 IleValGlyProArgThrCysArgAsnMetTrpSerGlyThrPheProIleAsnAlaTyr  
 4261 GGATCGTCGGTCTCTAGGACTCTGAGGAACATGTGGAGTGGACCTCCCCATTAAATGCCT  
 CCTAGCAGCCAGGATCTGGACGTCTTGACACCTCACCCCTGGAAGGGTAATTACGGA  
 ThrThrGlyProCysThrProLeuProAlaProAsnTyrThrPheAlaLeuTrpArgVal  
 4321 ACACCACGGGCCCTGTACCCCCCTTCTGCGCCGAACCTACAGTTCGCGCTATGGAGGG  
 TGTGGTGGCCGGGGACATGGGGGAAGGACGCGGCTTGATGTGCAAGCGCGATACCTCCC  
 SerAlaGluGluTyrValGluIleArgGlnValGlyAspPheHisTyrValThrGlyMet  
 ~4381 TGTCTGCAGAGGAATATGTGGAGATAAGGCAGGTGGGGACTTCCACTACGTGACGGGTA  
 ACAGACGTCTCTTATACACCTCTATTCCGTCCACCCCTGAAAGGTGATGCACGTGCCCC  
 ThrThrAspAsnLeuLysCysProCysGlnValProSerProGluPhePheThrGluLeu  
 4441 TGACTACTGACAATCTCAAATGCCGTGCCAGGTCCCCTGCCGAATTTCACAGAAT  
 ACTGATGACTGTTAGAGTTACGGGCACGGTCCAGGGTAGCGGGCTTAAAAAGTGTCTTA  
 AspGlyValArgLeuHisArgPheAlaProProCysLysProLeuLeuArgGluGluVal  
 4501 TGGACGGGGTGCCTACATAGGTTGCGCCCCCTGCAAGCCCTGCTGGGGAGGAGG  
 ACCTGCCCCACCGGGATGTATCAAACCGGGGGACGTTGGAAACGACGCCCTCC  
 SerPheArgValGlyLeuHisGluTyrProValGlySerGlnLeuProCysGluProGlu  
 4561 TATCATTCAAGAGTAGGACTCCACGAATAACCGGTAGGGTCGCAATTACCTTGCGAGCCG  
 ATAGTAAGTCTCATCTGAGGTGCTTATGGGCCATCCCAGCGTTATGGAACGCTCGGG  
 ProAspValAlaValLeuThrSerMetLeuThrAspProSerHisIleThrAlaGluAla  
 4621 AACCGGACGTGGCGTGTGACGTCCATGCTACTGATCCCTCCATATAAACAGCAGAGG  
 TTGGCCTGCACCGGCACAACGCAAGGTACGAGTACTAGGGAGGGTATATTGTCGTCTCC  
 AlaGlyArgArgLeuAlaArgGlySerProProSerValAlaSerSerAlaSerGln  
 4681 CGGCCGGCGAAGGTTGGCGAGGGGATCACCCCTCTGTCAGCTCCTCGGCTAGCC  
 GCCGGCCCGCTTCCAACCGCTCCCTAGTGGGGGGAGACACCGGTCGAGGAGCCGATCGG  
 LeuSerAlaProSerLeuLysAlaThrCysThrAlaAsnHisAspSerProAspAlaGlu  
 4741 AGCTATCCGCTCCATCTCAAGCAACTGCAACCGCTAACCATGACTCCCTGATGCTG  
 TCGATAGGCGAGGTAGAGAGTTCCGTTAACGTGGCATTGGTACTGAGGGACTACGAC  
 LeuIleGluAlaAsnLeuLeuTrpArgGlnGluMetGlyGlyAsnIleThrArgValGlu  
 4801 AGCTCATAGAGGCCAACCTCTATGGAGGCAGGAGATGGCGGCAACATCACCAAGGGTTG  
 TCGAGTATCTCCGGTTGGAGGATACCTCGTCTACCCGCGCTTGATGGTACGAGGGACTACGAC  
 SerGluAsnLysValValIleLeuAspSerPheAspProLeuValAlaGluGluAspGlu  
 4861 AGTCAGAAAACAAAGTGGTGATTCTGGACTCCCTCGATCCGCTTGTCGGGAGGAGGAGC  
 TCAGTCTTTGTTTACCAACTAACGACCTGAGGAAGCTAGGCGAACACCGCCTCCCTG  
**FIG. 32-5**

4921 ArgGluIleSerValProAlaGluIleLeuArgLysSerArgArgPheAlaGlnAlaLeu  
 AGCGGGAGATCTCCGTACCGCAGAAATCCTGCGGAAGTCTCGGAGATTGCCAGGGCC  
 TCGCCCTCTAGAGGCATGGCGTCTTTAGGACGCCCTCAGAGCCTCTAACGGTCCGGG  
 4981 ProValTrpAlaArgProAspTyrAsnProProLeuValGluThrTrpLysLysProAsp  
 TGCCCGTTGGCGCGCCGGACTATAACCCCCGCTAGTGGAGACGTGGAAAAAGCCCG  
 ACGGGCAAACCCCGGCCGCTGATAATTGGGGCGATCACCTCTGCACCTTTTCGGGC  
 5041 TyrGluProProValValHisGlyCysProLeuProProProLysSerProProValPro  
 ACTACGAACCACCTGTGGCATGGCTGTCCACCTCAAAGTCCCCTCTGTGC  
 TGATGCTTGGTGGACACCAGGTACCGACAGGCAAGGTGGAGGTTCAAGGGAGGACAG  
 5101 ProProArgLysLysArgThrValValLeuThrGluSerThrLeuSerThrAlaLeuAla  
 CTCCGCCTCGGAAGAAGCGGACGGTGCTCCTACIGAATCAACCTATCTACTGCCCTGG  
 GAGGCGGAGCCTCTCGCCTGCCACCAAGGAGTGACTTAGTGGATAGATGACGGAACC  
 5161 GluLeuAlaThrArgSerPheGlySerSerSerThrSerGlyIleThrGlyAspAsnThr  
 CCGAGCTGCCACCAAGCTTGGCAGCTCTCAACTTCCGGATTACGGCGACAATA  
 GGCTCGAGCGGTGGCTTCGAAACCGTCGAGGAGTTGAAGGCCGTAATGCCCTGTTAT  
 5221 ThrThrSerSerGluProAlaProSerGlyCysProProAspSerAspAlaGluSerTyr  
 CGACAAATCCTCTGAGCCGCCCTCTGGCTGCCCCCCCGACTCCGACGCTGAGTCCT  
 GCTGTTGAGGAGACTCGGGGGGGAGACCGACGGGGGGCTGAGGCTGCACTCAGGA  
 5281 SerSerMetProProLeuGluGlyGluProGlyAspProAspLeuSerAspGlySerTrp  
 ATTCCCTCATGCCCTCTGGAGGGGGAGCCTGGGATCCGATCTTAGCGACGGTCAT  
 TAAGGAGGTACGGGGGGACCTCCCCCTCGGACCCCTAGGCCTAGAATCGCTGCCAGTA  
 5341 SerThrValSerSerGluAlaAsnAlaGluAspValValCysCysSerMetSerTyrSer  
 GGTCACCGTCAGTAGTGAGGGCAACGCCGAGGAATGTCGTGCTGCTCAATGTCTACT  
 CCAGTIGCCAGTCATCACTCCGGTTGCGCCTCCTACAGCACACGACGAGTTACAGAATGA  
 5401 TrpThrGlyAlaLeuValThrProCysAlaAlaGluGluGlnLysLeuProIleAsnAla  
 CTTGGACAGGCCACTCGTCACCCCGTGCAGCGGAGGAACAGAAAATGCCATCAATG  
 GAACCTGTCGGCGTGAGCAGTGGGACGCGGCGCCTTCTTGCTTTGACGGGTAGTTAC  
 5461 LeuSerAsnSerLeuLeuArgHisHisAsnLeuValTyrSerThrSerArgSerAla  
 CACTAAGCAACTCGTTGCTACGTACCCACAATTGGTGTATTCCACCACCTACGGCAGTG  
 GTGATTGTTGAGCAACGATGCACTGGTAAACCACATAAGGTGGTGGAGTGCCTCAC  
 5521 CysGlnArgGlnLysLysValThrPheAspArgLeuGlnValLeuAspSerHistYrgln  
 CTTGCCAAAGGCGAGAAGAAAGTCACATTGACAGACTGCAAGTTCTGGACAGCCATTAC  
 GAACGGTTCCGCTCTTCAGTGTAAACTGTCAGTCAAGACCTGTCGGTAATGG  
 5581 AspValLeuLysGluValLysAlaAlaAlaSerLysValLysAlaAsnLeuLeuSerVal  
 AGGACGTACTCAAGGAGGTTAAAGCAGCGCGTCAAAAGTGAAGGCTAACITGCTATCCG  
 TCCTGCATGAGTCTCCAATTCTCGCGCCGAGTTTCACTCCGATTGAACGATAAGGC  
 5641 GluGluAlaCysSerLeuThrProProHisSerAlaLysSerLysPheGlyTyrGlyAla  
 TAGAGGAAGCTTGAGCCCTGACGCCAACACTCAGCAAATCCAAGTTGGTTATGGGG  
 ATCTCTTCGACGTCGGACTGCGGGGGTGTGAGTCGGTTAGGTTCAAACCAATACCC  
 5701 LysAspValArgCysHisAlaArgLysAlaValThrHisIleAsnSerValTrpLysAsp  
 CAAAAGACGTCCGTGCCATGCCAGAAAGGCCGTAACCCACATCAACTCCGTGTGGAAAG  
 GTTTCTGCAGGCAACGGTACGGTCTTCCGGCATGGTGTAGTTGAGGCACACCTTC  
 5761 LeuLeuGluAspAsnValThrProIleAspThrThrIleMetAlaLysAsnGluValPhe  
 ACCTCTGGAAAGACAATGTAACACCAATAGACACTACCATCATGGCTAAGAACGAGGTTT  
 TGGAAAGACCTCTGTTACATTGTGGTTATCTGTGATGGTAGTACCGATTCTGCTCCAAA  
 5821 CysValGlnProGluLysGlyGlyArgLysProAlaArgLeuIleValPheProAspLeu  
 TCTGGCTTCAGCCCTGAGAAGGGGGTGTAAAGCCAGCTCGTCTCATCGTGTCCCCGATC  
 AGACCGAAGTCGGACTCTCCCCCAGCATTGGTCAAGCAGAGTAGCACAAGGGCTAG  
 GlyValArgValCysGluLysMetAlaLeuTyrAspValValThrLysLeuProLeuAla

FIG. 32-6

5881 TGGCGTGC CGTGTGCGAAAAGATGGCTTGACGAC GTGGTTACAAAGCTCCCTGG  
 ACCCGCACGCCACACGCTTCTACCGAACATGCTGACCAATGTTCGAGGGAAACC  
 ValMetGlySerSerTyrGlyPheGlnTyrSerProGlyGlnArgValGluPheLeuVal  
 5941 CCGTGATGGGAAGCTCCTACGGATTCCAATACTCACCAGGACAGCGGGTTGAATTCTCG  
 GGC ACTACCCCTCGAGGATGCC TAAGGTTATGAGTGGTCTGTCGCCA ACTTAAGGAGC  
 GlnAlaTrpLysSerLysLysThrProMetGlyPheSerTyrAspThrArgCysPheAsp  
 6001 TGCAAGCGTGGAAAGTCCAAGAAAACCCAAATGGGTTCTCGTATGATAACCGCTGCTTIG  
 ACGTTCGCACCTTCAGGTCTTTGGGTTACCCAAAGAGCATACTATGGCGACGAAAC  
 SerThrValThrGluSerAspIleArgThrGluGluAlaIleTyrGlnCysCysAspLeu  
 6061 ACTCCACAGTCACTGAGAGCGACATCCGTACGGAGGAGGCAATCTACCAATGTTGTGACC  
 TGAGGTGTCAGTGA CTCTCGCTGTAGGCATGCC CTC CGTAGATGGTTACAACACTGG  
 AspProGlnAlaArgValAlaIleLysSerLeuThrGluArgLeuTyrValGlyGlyPro  
 6121 TCGACCCCCAAGCCCGGTGGCCATCAAGTCCCTCACCGAGAGGCTTATGTTGGGGCC  
 AGCTGGGGTTCGGGCGCACCGTAGTTCAAGGAGTGGCTCTCGAAATACAACCCCCGG  
 LeuThrAsnSerArgGlyGluAsnCysGlyTyrArgArgCysArgAlaSerGlyValLeu  
 6181 CTCTTACCAATTCAAGGGGGAGAACCTGCGGCTATCGCAGGTGCCGCGAGCGGGCGTAC  
 GAGAATGGTTAAGTCCCCCTCTGACGCCATAGCGTCCACGGCGCGCTGCCGCATG  
 ThrThrSerCysGlyAsnThrLeuThrCysTyrIleLysAlaArgAlaAlaCysArgAla  
 6241 TGACAACTAGCTGTGGTAAACACCCTCACTTGCTACATCAAGGCCGGCAGCCTGTCGAG  
 ACTGTTGATCGACACCATTGTGGAGTGAACGATGTAGTTCCGGCCCTCGGACAGCTC  
 AlaGlyLeuGlnAspCysThrMetLeuValCysGlyAspAspLeuValValIleCysGlu  
 6301 CCGCAGGGCTCAGGACTGCACCATGCTCGTGTGGAGACGACTTAGTCGTTATCTGTG  
 GGCGTCCCAGGGTCTGACGTGGTACGAGCACACACCGCTGCTGAATCAGCAATAGACAC  
 SerAlaGlyValGlnGluAspAlaAlaSerLeuArgAlaPheThrGluAlaMetThrArg  
 6361 AAAGCGGGGGTCCAGGAGGACCGCGAGCCTGAGAGCCTTCACGGAGGCTATGACCA  
 TTTCGCGCCCCCAGGTCTCTGCCGCTCGGACTCTCGGAAGTGCCTCCGATACTGGT  
 TyrSerAlaProProGlyAspProProGlnProGluTyrAspLeuGluLeuIleThrSer  
 6421 GGTACTCCGCCCCCTGGGACCCCCCACAACCAGAACATGACTTGGAGCTCATACAT  
 CCATGAGGCGGGGGGACCCCTGGGGGTGTGGTCTTATGCTGAACCTCGAGTATTGTA  
 CysSerSerAsnValSerValAlaHisAspGlyAlaGlyLysArgValTyrTyrLeuThr  
 6481 CATGCTCCTCCAACGTGTCAGTCGCCACGACGGCGTGGAAAGAGGGTCTACTACCTCA  
 GTACGAGGAGGTGACAGTCAGCGGTGCTGCCGCGACCTTCTCCAGATGATGGAGT  
 ArgAspProThrThrProLeuAlaArgAlaAlaTrpGluThrAlaArgHisThrProVal  
 6541 CCCGTGACCCCTACAACCCCCCTCGCGAGAGCTGCGTGGAGACAGCAAGACACACTCCAG  
 GGGCACTGGGATTTGGGGGGAGCGCTCTCGACGCACCCCTCTGCTGTGAGGTC  
 AsnSerTrpLeuGlyAsnIleIleMetPheAlaProThrLeuTrpAlaArgMetIleLeu  
 6601 TCAATTCTGGCTAGGCAACATAATCATGTTGCCCCACACTGTTGGCGAGGATGATAC  
 AGTTAAGGACCGATCCGTTGATTAGTACAAACGGGGTGTGACACCCGCTCCTACTATG  
 MetThrHisPhePheSerValLeuIleAlaArgAspGlnLeuGluGlnAlaLeuAspCys  
 6661 TGATGACCCATTCTTTAGCGTCTTATAGCCAGGGACCAGCTGAAACAGGCCCTCGATT  
 ACTACTGGTAAAGAAATCGCAGGAATATCGGTCCCTGGTCGAACCTGTCCGGGAGCTAA  
 GluIleTyrGlyAlaCystTyrSerIleGluProLeuAspLeuProProIleIleGlnArg  
 6721 GCGAGATCTACGGGGCTGCTACTCCATAGAACCACTTGATCTACCTCAAATCATTCAA  
 CGCTCTAGATGCCCGGACGATGAGGTATCTGGTGAACTAGATGGAGGTTAGTAAGTTT  
 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 ( $\mu$ /ml)
1	1	NANB		
2	1	NANB	0	9
3	1	NANB	76	71
4	1	NANB	118	19
5	2	NANB	154	N/A
6	2	NANB	0	
7	2	NANB	21	5
8	2	NANB	73	52
		NANB	138	13
9	3	NANB		N/A
10	3	NANB	0	
11	3	NANB	43	8
12	3	NANB	53	205
		NANB	159	14
13	4	NANB		6
~14	4	NANB	-3	
15	4	NANB	55	11
16	4	NANB	83	132
		NANB	140	N/A
17	5	HAV		N/A
18	5	HAV	0	
19	5	HAV	25	4
20	5	HAV	40	147
		HAV	268	18
21	6	HAV		5
22	6	HAV	-8	
23	6	HAV	15	N/A
24	6	HAV	41	106
		HAV	129	10
26	7	HAV		N/A
27	7	HAV	0	
28	7	HAV	22	7
29	7	HAV	115	83
		HAV	139	5
30	8	HAV		N/A
31	8	HAV	0	
32	8	HAV	26	15
33	8	HAV	74	130
		HAV	205	8
34	9	HBV		5
35	9	HBV	-290	
36	9	HBV	379	N/A
		HBV	435	9
37	10	HBV		6
38	10	HBV	0	
39	10	HBV	111-118 (Sammelprobe)	8
40	10	HBV	205	96-156 (Sammelprobe)
		HBV	240	9
41	11	HBV		13
42	11	HBV	0	
43	11	HBV	20-56 (Sammelprobe)	11
44	11	HBV	169	8-100 (Sammelprobe)
		HBV	223	9
				10

Schimpansen	ALT	Tag	NAME		NAME		NAME		NAME	
			HAV	NANB	HAV	NANB	HAV	NANB	HAV	NANB
C	1	1	129	1	106	1	10	1	1	1
A	1	1	41	1	15	1	10	1	1	1
V	1	1	268	1	5	1	5	1	5	1
A	1	1	147	1	18	1	18	1	18	1
V	1	1	40	1	4	1	4	1	4	1
C	1	1	25	1	3	1	3	1	3	1
A	1	1	140	1	1	1	1	1	1	1
V	1	1	83	1	2	1	2	1	2	1
C	1	1	83	1	3	1	3	1	3	1
A	1	1	159	1	6	1	6	1	6	1
V	1	1	53	1	8	1	8	1	8	1
C	1	1	43	1	8	1	8	1	8	1
A	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1
V	1	1	73	1	2	1	2	1	2	1
C	1	1	73	1	2	1	2	1	2	1
A	1	1	154	1	2	1	2	1	2	1
V	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1
C	1	1	76	1	2	1	2	1	2	1
A	1	1	28	1	2	1	2	1	2	1
V	1	1	154	1	2	1	2	1	2	1

FIG. 33-1

NAME	AGE	SEX	REMARKS
John	22	M	
John	115	M	
John	139	M	
John	0	M	
John	26	M	
John	74	M	
John	205	M	
John	379	M	
John	435	M	
John	0	M	
John	115	M	
John	126	M	
John	205	M	
John	9	M	
John	13	M	
John	11	M	
John	0	M	
John	42	M	
John	169	M	
John	223	M	
John	10	M	

FIG. 33-2

FIG. 34 Legende

Bahn-nummer	Patient Referenz-nummer	Diagnose	ALT-Spiegel ( $\mu$ /ml)
1	1	NANB	
2	11	NANB	1354
3	21	NANB	31
4	21	NANB	14
5	21	NANB	79
6	31	NANB	26
7	31	NANB	78
8	31	NANB	87
9	41	NANB	25
10	41	NANB	60
11	51	NANB	13
12	51	NANB	298
13	61	NANB	101
14	61	NANB	474
15	71	NANB	318
16	71	NANB	20
17	81	NANB	163
18	81	NANB	44
19	9	NANB	50
20	10	NANB	N/A
21	11	NANB	N/A
22	12	Normal	N/A
23	13	Normal	N/A
24	14	Normal	N/A
26	30174	Normal	
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 HSV (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

<sup>1</sup> Aufeinanderfolgende Serumproben wurden von diesen Patienten getestet

FIG. 34-1

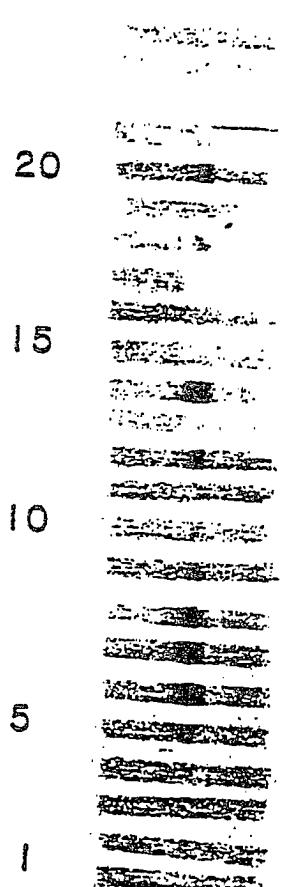


FIG. 34-2

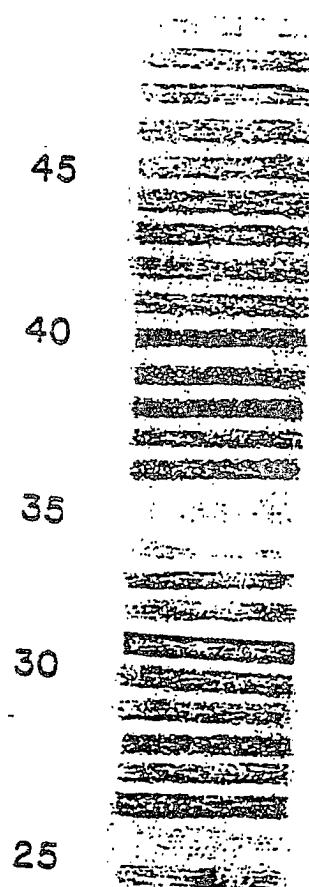
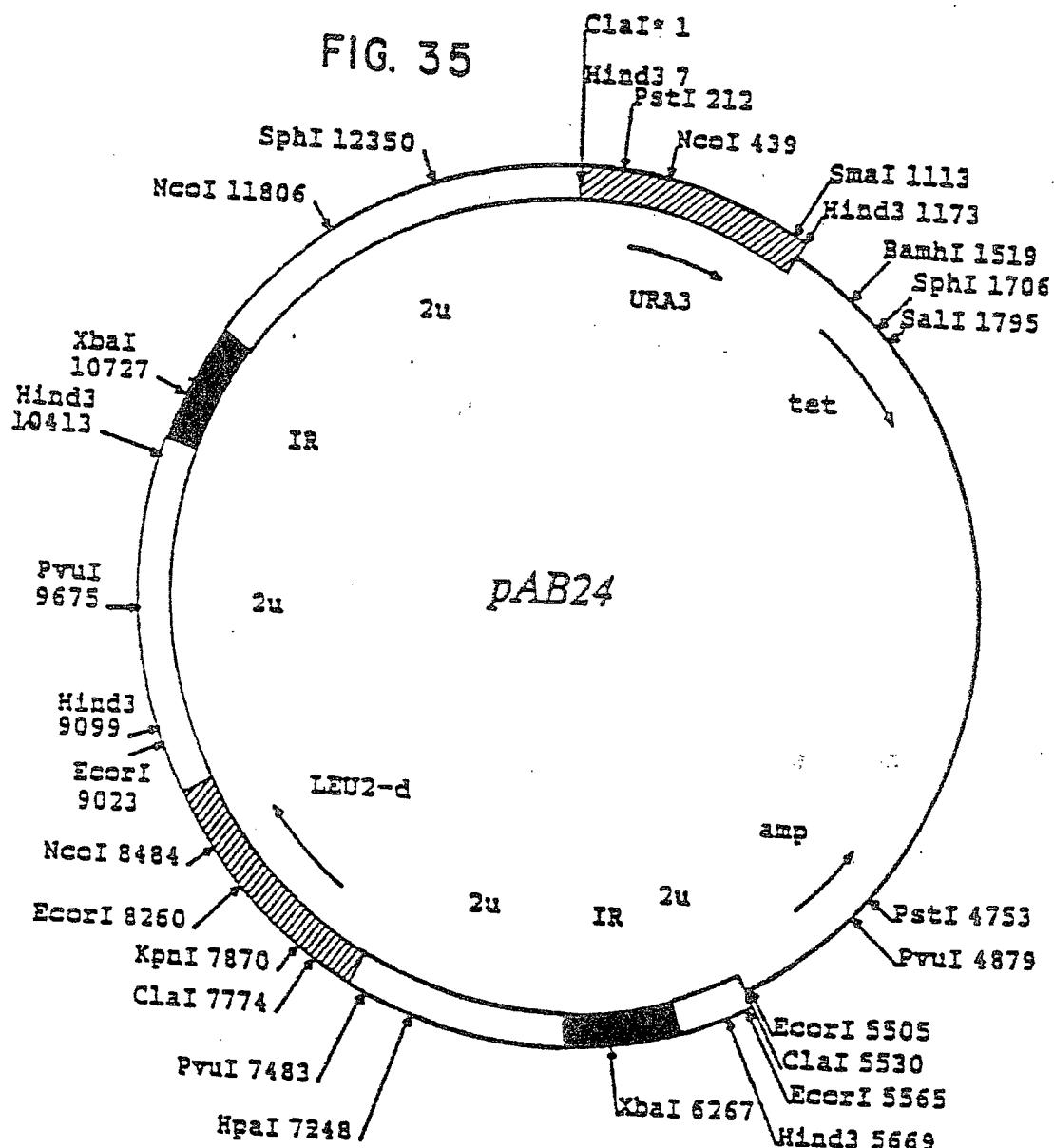


FIG. 35



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

SOD ————— COOH] [—adaptor—] [NANBHpolypeptid >

1 AlaCysGlyValIleGlyIleAlaGlnAsnLeuGlyIleArgAspAlaHisPheLeuSer  
GCTTGTTGGTGTAAATTGGGATCGCCCAGAATTGGGAATTGGGATGCCACTTCTATCC  
CGAACACCACATTAACCTAGCGGGTCTTAAACCTTAAGCCCTACGGGTGAAAGATAGG  
>>>>>>>>>>>>>  
61 GlnThrLysGlnSerGlyGluAsnLeuProTyrLeuValAlaTyrGlnAlaThrValCys  
CAGACAAAGCAGAGTGGGAGAACCTTCCTTACCTGGTAGCGTACCAAGCCACCGTGTGC  
GTCTGTTTCGTCCTCACCCCTCTGGAGGAATGGACCATCGCATGGTTCGGTGGCACACG  
121 AlaArgAlaGlnAlaProProProSerTrpAspGlnMetTrpLysCysLeuIleArgLeu  
GCTAGGGCTCAAGCCCTCCCCATGTTGGGACCAAGATGGAAAGTGGTTGATTGGCCTC  
CGATCCCGAGTTCGGGAGGGTAGCACCCTGGTCTACACCTCACAAACTAACGGAG  
181 LysProThrLeuHisGlyProThrProLeuLeuTyrArgLeuGlyAlaValGlnAsnGlu  
AAGCCCACCCCTCCATGGGCCAACACCCCTGCTATACAGACTGGCGCTTCAAGAATGAA  
TTCGGGTGGGAGGTACCCGGTGTGGGGACGATATGTCTGACCCGCGACAAGTCTTACTT  
241 IleThrLeuThrHisProValThrLysTyrIleMetThrCysMetSerAlaAspLeuGlu  
ATCACCTGACGCACCCAGTCACCAAATACATCATGACATGCACTGGCCGACCTGGAG  
TAGTGGGACTGGGTGGGTCAGTGGTTATGTAGTACTGTACGTACAGCCGGCTGGACCTC  
301 ValValThrSerThrTrpValLeuValGlyGlyValLeuAlaAlaLeuAlaAlaTyrCys  
GTCGTACAGGACCTGGGTGCTCGTGGCGCGTCTGGTGTCTTGGCCCGTATTGCG  
CAGCAGTGTCTGGACCCACGCAACGCCGAGGACCGACGAAACCGCGCATAACG  
361 LeuSerThrGlyCysValValIleValGlyArgValLeuSerGlyLysProAlaIle  
CTGTCAACAGGGCTGCGTGGTCATAGTGGCAGGGTGTCTTGTCCGGAAAGCCCGCAATC  
GACAGTTGTCCGACGCACCACTATCACCGTCCAGCAGAACAGGCCCTCGGCCGTTAG  
421 IleProAspArgGluValLeuTyrArgGluPheAspGluMetGluGluCysSerGlnHis  
ATACCTGACAGGGAAAGTCCTCTACCGAGAGTTCGATGAGATGGAAGAGTGTCTCAGCAC  
TATGGACTGTCCCTTCAGGAGATGGCTCTCAAGCTACTCACCTCTCACGAGAGTCGTG  
481 LeuProTyrIleGluGlnGlyMetMetLeuAlaGluGlnPheLysGlnLysAlaLeuGly  
TTACCGTACATCGAGCAAGGGATGATGCTCGCCGAGCAGTCAAGCAGAAGGCCCTCGGC  
AATGGCATGTAGCTCGTCCCTACTACGAGCGGCTGTCAAGTTCGTCCTCCGGAGCCG  
541 LeuLeuGlnThrAlaSerArgGlnIleGluValIleAlaProAlaValGlnThrAsnTrp  
CTCCTGCAGACCGCGTCCCGTCAGGAGAGGGTATCGCCCTGCTGTCCAGACCAACTGG  
GAGGACGTCTGGCGCAGGGCAGTCCGTCTCCAATAGCGGGGACGACAGGTCTGGTTGACC  
601 GlnLysLeuGluThrPheTrpAlaLysHisMetTrpAsnPhenSerGlyIleGlnTyr  
CAAAAATCCGAGACCTCTGGCGAAGCATATGTGGAACTTCATCAGTGGATAACAATAC  
GTTTTGAGCTCTGGAGACCCGCTCTGTATACACCTTGAAGTAGTCACCTATGTTATG  
661 LeuAlaGlyLeuSerThrLeuProGlyAsnProAlaIleAlaSerLeuMetAlaPheThr  
TTGGCGGGCTTGTCAACGCTGCTGGTAACCCGCCATTGCTTCAATTGATGGCTTTIACA  
AACCGCCCGAACAGTTGGACGGACCATTGGGGCGTAACGAAGTAACACCGAAAATGT  
721 AlaAlaValThrSerProLeuThrThrSerGlnThrLeuLeuPheAsnIleLeuGlyGly  
GCTGCTGTCACCAGCCCACTAACCACTAGCCAAACCCCTCTTCACATATGGGGGGG  
CGACGACAGTGGTGGTGGATGGTGTGGTACGGTTGGGAGGAGAAGTTGTATAACCCCCCCC  
781 TrpValAlaAlaGlnLeuAlaAlaProGlyAlaAlaThrAlaPheValGlyAlaGlyLeu  
TGGGTGGCTGCCAGCTCGCCGCCCCCGGTGCCGCTACTGCTTGTGGCGCTGGCTTA  
ACCCACCGACGGTCCAGCGGCGGGGGCGCGCGATGACGGAAACACCCGCGACCGAAT  
841 AlaGlyAlaAlaIleGlySerValGlyLeuGlyLysValLeuIleAspIleLeuAlaGly  
GCTGGCGCCGCCATGGCAGTGGACTGGGAAAGGTCTCATAGACATCCCTGAGGG

CGACCGCGCGGTAGCCGTACAACCTGACCCCTTCCAGGAGTATCTGTAGGAACGTCCC  
 TyrGlyAlaGlyValAlaGlyAlaLeuValAlaPheLysIleMetSerGlyGluValPro  
 901 TATGGCGCGGGCGTGGCGGGAGCTCTGTGGCATTCAAGATCATGAGCGGTGAGGTCCCC  
 ATACC CGGCCCGCACCGCCCTCGAGAACACCGTAAGTTCTAGTACTCGCCACTCCAGGGG  
 SerThrGluAspLeuValAsnLeuLeuProAlaIleLeuSerProGlyAlaLeuValVal  
 961 TCCACGGAGGACCTGGTCATCTACTGCCGCCATCCTCTCGCCCCGAGGCCCTCGTAGTC  
 AGGTGCCTCTGGACCAGTTAGATGACGGCGGTAGGAGAGCGGGCCTCGGGAGGCATCAG  
 GlyValValCysAlaAlaIleLeuArgArgHisValGlyProGlyGluGlyAlaValGln  
 1021 GGUGTGGTCTGTGCAGCAATACTGCCGCCACGTTGGCCCGGGCGAGGGGGCAGTGCAG  
 ~ CCCGACACAGACACGTGTTATGACGCCGGCGTGCACCCGGCCCGCTCCCCGTACGTC  
 <<<<<<<<<<<< NANBH ] [ ---- extra  
 1081 TriMetAsnArgLeuIleAlaPheAlaSerArgGlyAsnHisValSerProValHisHis  
 TGGATGAAACCGGCTGATAGCCTTCGCGCTCCGGGGAAACATGTTTCCCCAGTCCATCAT  
 ACCTACTTGGCCGACTATCGGAAGCGGAGGGCCCCCTTGGTACAAAGGGTCAGGTAGTA  
 -----]  
 LysArgOP  
 1141 AAGCGTTGACGCTCCCTACGGGTGGACTGTGGAGAGACAGGGCACTGCTAAGGCCRAAT  
 TTGCGCAACTGCGAGGGATGCCACCTGACACCTCTGTCCCGTGACGATTGGGTTTA  
 1201 CTCAGCCATGCAATCGAGGGGTACAATCCGTATGGCAACAACATAGCGCGTACGTAAAGTC  
 GAGTCGGTACGTAGCTCCCATGTTAGGCATACCGGTTGTTGATCGCGCATGCAATTTCAG  
 1261 TCCTTTCTCGATGGTCCATACCTTAGATGCGTTAGCATTAAATCCGAATT  
 AGGAAAGAGCTACCAAGGTATGGAATCTACGCAATCGTAATTAGGCTTAAG

FIG. 36-2



FIG. 37 a



FIG. 37 b

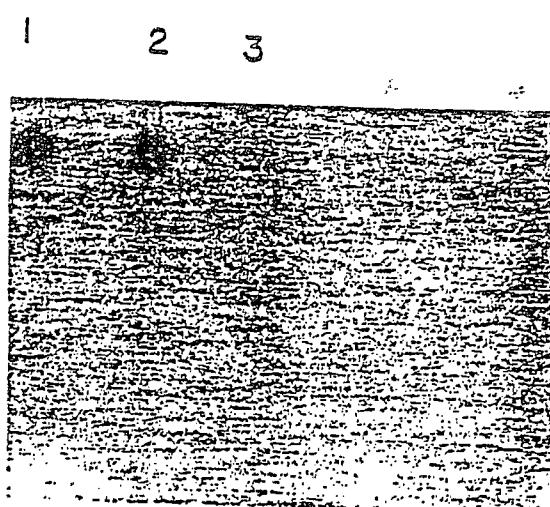


FIG. 39

1 2 3 4

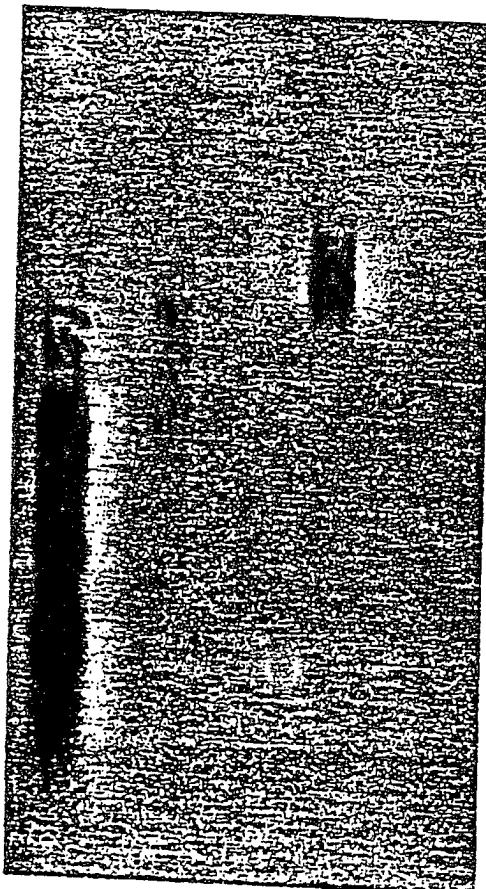


FIG. 38

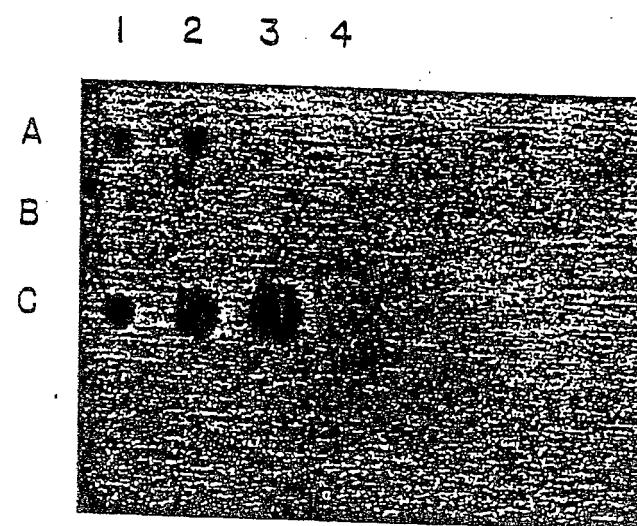


FIG. 40

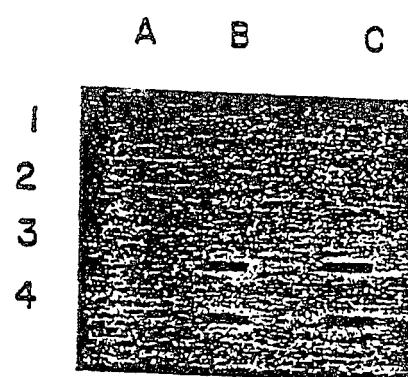


FIG. 41a

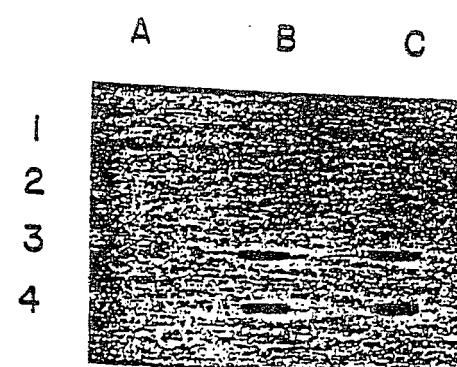


FIG. 41b

FIG. 41-1

Homologie zwischen dem HCV-Polypeptid, codiert vom kombinierten ORF der Clone 14i bis 39c), und dem Nicht-Strukturprotein des Dengue-Flavivirus (MNWBD1)

HCV	10	20	30	40	50
	EYVVLFLILLADARVCSCLWMMILLISQAEAALENLVILNAASLAGTHGLVSFLVFFCFA				
MNWVD1	AVSFVTLITGNMSFRDLGRVMVMGATMTDDIGMGVTYLALLAAFKVRPTFAAGLLLRLK				
	130	140	150	160	170
HCV	60	70	80	90	100
	WYLKGKWWPGAVYTIFYGMWPLLLLLALPQRAYALDTEVAASC GGVVLVGLMALTLSPPY				
MNWVD1	TSKELMMTTIGIVLLSQSTIPEFILETDALALGMMVILMVRKMEKYQLAVTIMAILCVP				
	190	200	210	220	230
HCV	120	130	140	150	160
	KRYISWCLWWLQYFLTRVEAQLHWWIPPLNVRGGRDAVILLMCNAVHPTLVFDITKLILLAV				
MNWVD1	NAVILQNAWKVSCTILAVVSVSPFLTSSQOKADWIPIALTIKGINPTAIF-LTILSRTN				
	250	260	270	280	290
HCV	180	190	200	210	220
	FGPLWILQASLLKVPYF-VRVQGILRF-CALARAKMIGGHYVQMVIKLGALITGYVYNHL				
MNWVD1	KKRSWPLNEAIMAVGMVSILASSILKNDIPMTGPLVAGGILTVCYV-LTGRSADLELERA				
	300	310	320	330	340
HCV	240	250	260	270	280
	TPLRDWAHNGLRLDLAVAVEPVVFQSOMETKLIWGADTAACGDIINGLPVSARRGREILLG				
MNWVD1	ADVW-WEDQAEISGSSPILSITISE-DGSMSIKNEEEQTLTILIRTGLLVISG--LFP				
	360	370	380	390	400
HCV	300	310	320	330	340
	PADGMVSKGWLLAPITAYAQQTGRGLLGCIITSLTGRDKNQVEGEVQIVSTAATFLATC				
MNWVD1	VSIPIATAAWYLWEVKKQRAGVLWDVPSPPPVGKAELLEDGAYRIKQKGILGYSQIGAGVY				
	420	430	440	450	460
HCV	360	370	380	390	400
	INGVCWTYYHGAGTRTLASP KGPVIQMYTNVDQDLV-GWPAPQGSRSLTPCTCGSSD				
MNWVD1	KEGTFHITMWHVTRGAVLMHKGKRIPSWADVKKDLVSCGGGWKLEGWKEGEEVQVLALE				
	480	490	500	510	520
HCV	420	430	440	450	460
	LYIYTRHADVIFVRRGDSRGSSLSPRPISYLKGGSSGGPLLCPAGHAVGIFRAAVCTRGV				
MNWVD1	PGKNPRAVQT KPGLFKTN--AGTIGAVSLDFSPGTSGSPPIIDKKGVVGLYNGNVVTRSG				
	540	550	560	570	580
HCV	480	490	500	510	520
	AKAVDFIPVENLETTMRSPVFTDNSSPPVVPOSQVAHLHAPTSGSGKS-TKVPAAYAAQ				
MNWVD1	AYVSIAIAQTEK-SIEDNPEIEDDIFRK-RKLTIMDLHPGAGKTKRYLPAIVRGAIKR				
	600	610	620	630	640
HCV	540	550	560	570	580

HCV	GYKVLVLNPS--VAATLGF <sup>590</sup> GAYMSKAHGIDPNIRTGVR <sup>600</sup> RTIT <sup>610</sup> GSPITYSTY <sup>620</sup> GKFLADGGC						
MNWVD1	GLRTL <sup>630</sup> LAPTRV <sup>640</sup> AAEMEEALRGLP <sup>650</sup> IRYOTPAIRA <sup>660</sup> EHTGREI <sup>670</sup> V <sup>680</sup> DLMCHATFTM <sup>690</sup> LL-SPV <sup>700</sup>						
HCV	590	600	610	620	630	640	
MNWVD1	SGGAYD <sup>650</sup> IICDECHSTD <sup>660</sup> ATSILGIGT <sup>670</sup> VLDQAETAGARL <sup>680</sup> VLATATPPGS <sup>690</sup> V <sup>700</sup> V <sup>710</sup> PKPNIEEV <sup>720</sup> RVP <sup>730</sup> NYNL <sup>740</sup> IMDEAHFTDPASIAARGY <sup>750</sup> ISTRVE-MGEAAGIFMTATPPGS <sup>760</sup> RD-PF <sup>770</sup> PQSNAP						
HCV	650	660	670	680	690	700	
MNWVD1	ALS <sup>710</sup> TTGEIPFY <sup>720</sup> GKAIP <sup>730</sup> LEV <sup>740</sup> IKGGRH <sup>750</sup> LIF <sup>760</sup> CHSKKK <sup>770</sup> CDEL <sup>780</sup> A <sup>790</sup> AKLVALG <sup>800</sup> INA <sup>810</sup> V <sup>820</sup> YRGLDV <sup>830</sup> S <sup>840</sup> V <sup>850</sup> TFD						
HCV	710	720	730	740	750	760	
MNWVD1	IPTSGD <sup>780</sup> VVVVA <sup>790</sup> TDALMTG <sup>800</sup> YTGDFDS <sup>810</sup> VIDC <sup>820</sup> NCTCV <sup>830</sup> TQ <sup>840</sup> YDF <sup>850</sup> SLDPT <sup>860</sup> FTIET <sup>870</sup> TL <sup>880</sup> LPQDAVSRT <sup>890</sup>						
HCV	770	780	790	800	810	820	
MNWVD1	SEYVK <sup>830</sup> KTR <sup>840</sup> NDWNF <sup>850</sup> V <sup>860</sup> TTD <sup>870</sup> ISEMGAN <sup>880</sup> FAER <sup>890</sup> VIDP <sup>890</sup> RRCMKP <sup>890</sup> V <sup>890</sup> IL <sup>890</sup> T <sup>890</sup> D <sup>890</sup> G <sup>890</sup> E <sup>890</sup> R <sup>890</sup> V <sup>890</sup> I <sup>890</sup> L <sup>890</sup> A <sup>890</sup> G <sup>890</sup> P <sup>890</sup> M <sup>890</sup> P <sup>890</sup> V <sup>890</sup> TH						

FIG. 41-2

FIG. 43  
Verteilung der Zufallsproben

C100-3 Ag ELISA Preclinical Kit  
416ng C100/Vertiefung, 2 h, 37°C, 20µl Probe

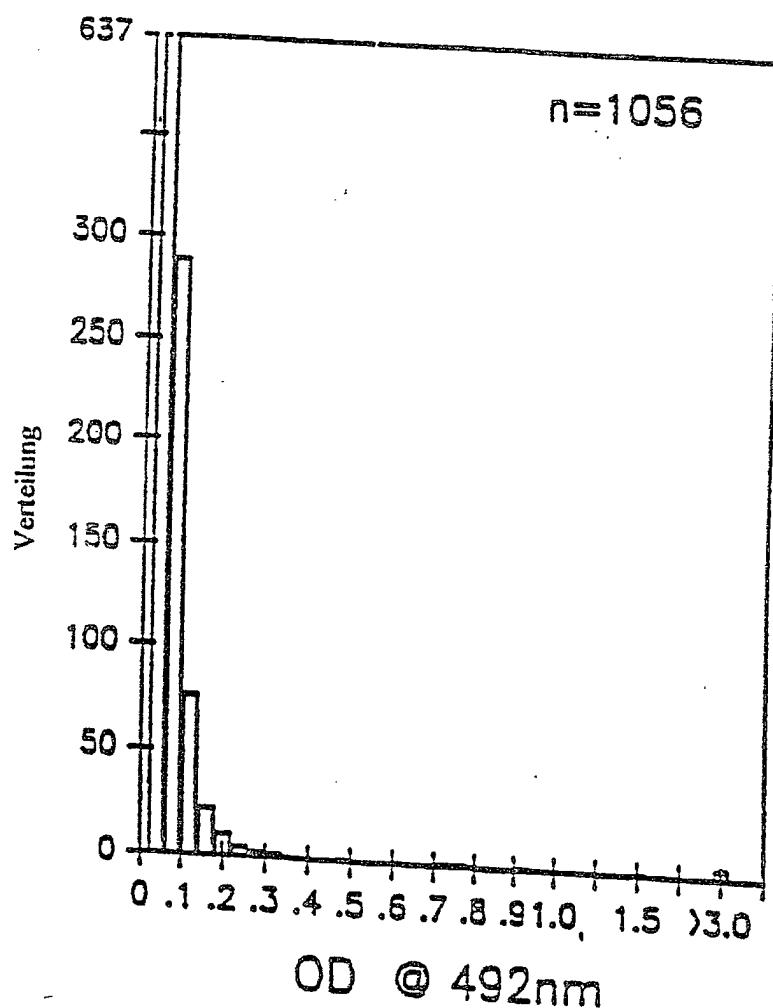


FIG. 44

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

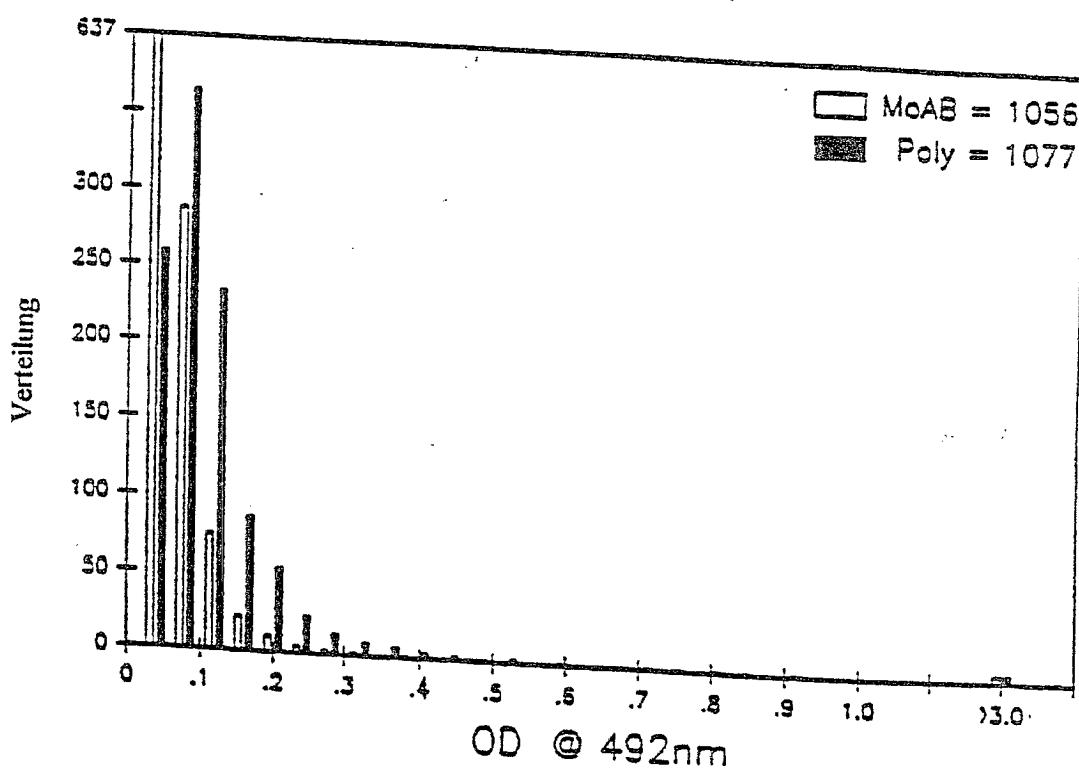


FIG. 45

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

## FIG. 46 -| Translation der DNA k9-1

1 GlyCysProGluArgLeuAlaSerCysArgProLeuThrAspPheAspGlnGlyTrpGly  
 1 CAGGCCTGTCCTGAGAGGCTAGCCAGCTGCCAACCCCTTACCGATTTGACCAGGGCTGGG  
 GTCCGACAGGACTCTCCGATCGGTGACGGCTGGGAATGGCTAAACTGGTCCCACCC

51 ProIleSerTyrAlaAsnGlySerGlyProAspGlnArgProTyrCysTrpHisTyrPro  
 51 GGCCTATCAGTTATGCCAACCGAAGCGGCCGACCGCGCCCTACTGCTGGCACTACC  
 CGGGATAGTCATAACGGTTGCCCTCGCCGGGCTGGTCGCGGGGAATGACGACCGTGATGG

121 ProLysProCysGlyIleValProAlaLysSerValCysGlyProValTytCysPheThr  
 121 CCCCAAAACCTTGGTATTGTGCCCGCGAAGAGTGTGTGGTCCGGTATATTGCTTCA  
 GGGGTTTTGGAACGCCATAACACGGGCCTCTCACACACACCAGGCCATAACGAAGT

181 ProSerProValValValGlyThrThrAspArgSerGlyAlaProThrTyrSerTrpGly  
 181 CTCCCCAGCCCCGTGGTGGGGAACGACCGACAGTCGGCGGCCACCTACAGCTGGG  
 GAGGGTCTGGGGCACCAACCCCTGCTGGCTGTCAAGCCCAGCGGGTGGATGTCGACCC

241 GluAsnAspThrAspValPheValLeuAsnAsnThrArgProProLeuGlyAsnTrpPhe  
 241 GTGAAATGATAACGGACGTCTCGTCTTAACAATACCAAGGCCACCGCTGGCAATTGGT  
 CACTTTTACTATGCCCTGCAGAAGCAGGAATTGTTATGGTCCGGTGGCGACCCGTTACCA

301 GlyCysThrTrpMetAsnSerThrGlyPheThrLysValCysGlyAlaProProCysVal  
 301 TCGGTGTACCTGGATGAACCTCAACTGGATTACCAAAGTGTGCGGAGCGCCTCTGTG  
 AGCCAACATGGACCTACTTGAGTTGACTTAAGTGGTTCACACGCCCTCGCGGAGGAACAC

361 IleGlyGlyAlaGlyAsnAsnThrLeuHisCysProThrAspCysPheArgLysHisPro  
 361 TCATCGGAGGGGGGGCAACAAACCCCTGCACTGGCCCACTGATTGCTTCCGCAAGCATC  
 AGTAGCCTCCCCGCCCCGTTGTTGGGACGTGACGGGGTGACTAACGAAGGCCTCGTAG

421 AspAlaThrTyrSerArgCysGlySerGlyProTrpIleThrProArgCysLeuValAsp  
 421 CGGACGCCACATACTCTCGGTCGGCTCCGTCCTGGATCACACCCAGGTGCGCTGGTGC  
 GCCTCGGGTGTATGAGAGGCCACGCCAGGGCAGGGACCTAGTGTGGGTCCACGGACCGC

---

481 TyrProTyrArgLeuTrpHisTyrProCysThrIleAsnTyrThrilePheLysIleArg  
 481 ACTACCCGATATAGCCTTGGCATTATCCTGTACCATCAACTACACTATATTTAAAATCA  
 TGATGGGCATATCCGAAACCGTAATAGGAACATGGTAGTTGATGTGATATAAAATTTAGT

---

541 MetTyrValGlyGlyValGluHisArgLeuGluAlaAlaCysAsnTrpThrArgGlyGlu  
 541 GGATGTACGTGGGAGGGGTGAGCACAGGCTGGAAAGCTGCGCTGCAACTGGACGCCGGCG  
 CCTACATGCCCTCCCCAGCTGTCGACGGACCTTCGACGGACGTGACCTGGCGCCCGC

---

601 ArgCysAspLeuGluAspArgAspArgSerGluLeuSerProLeuLeuLeuThrThrThr  
 601 AACGTTGCGATCTGGAAAGATAGGGACAGGTCCGAGCTCAGCCCGTTACTGCTGACCACTA  
 TTGCAACGCTAGACCTCTATCCCTGTCCAGGCTCGAGTCGGCAATGACGACTGGTGT

---

661 GlnTrpGlnValLeuProCysSerPheThrThrLeuProAlaLeuSerThrGlyLeuIle  
 661 CACAGTGGCAGGTCTCCCGTGTTCCTTCACAACCCCTGCCAGCCTGTCCACCGGCCCTCA  
 GTGTCAACCGTCCAGGAGGGCACAAGGAGTGTGGACGGCTCGGAACAGGTGGCCGGAGT

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

721 HisLeuHisGlnAsnIleValAspValGlnTyrLeuTyrGlyValGlySerSerIleAla  
 721 TCCACCTCCACCAGAACATTGTGGACGTGCAGTACTTGTACGGGGTGGGTCAAGCATCG  
 AGGTGGAGGTGGCTTGTAAACACCTGCACTGAACATGCCCAACCCAGTCGTAGC

---

781 SerTrpAlaIleLysTrpGluTyrValValLeuLeuPheLeuLeuAlaAspAlaArg  
 781 CGTCCTGGGCCATTAAAGTGGGAGTACGTGTCCTCTGTTCCTCTGCTTGCAGACGCC  
 GCAGGACCCGGTAATTCACCTCATGCAGCAGGAGGACAAGGAAGACGAACGTCIGCGCG

841 ValCysSerCysLeuTrpMetMetLeuLeuIleSerGlnAlaGluAlaAlaLeuGluAsn  
 GCGTCTGCTCCTGTTGGATGATGCTACTCATATCCAAAGCGGAAGCGGCTTGGAGA  
 CGCAGACGAGGACAACCTACTACGATGAGTATAGGGTCGCCCTCGCCGAAACCTCT

---

901 LeuValIleLeuAsnAlaAlaSerLeuAlaGlyThrHisGlyLeuValSerPheLeuVal  
 ACCTCGTAATACTTAATGCAGCATCCTGGCCGGGACGCACGGTCTTGTATCCTTCCTCG  
 TGGAGCATTATGAATTACGTGTAGGGACCGGCCCTGCGTGCCAGAACATAGGAAGGAGC

---

961 PhePheCysPheAlaTrpTyrLeuLysGlyLysTrpValProGlyAlaValTyrThrPhe  
 TGTTCTCTGCTTGCATGGTATCTGAAGGGTAAGTGGGTGCCCGGAGCGGGTCTACACCT  
 ACAAGAACGAAACGTACCATAGACTTCCCATTCACCCACGGGCCTGCCAGATGTGGA

---

1021 TyrGlyMetTrpProLeuLeuLeuLeuLeuAlaLeuProGlnArgAlaTyrAlaLeu  
 TCTACGGGATGTGGCCTCTCCTCTGCTCTGTTGGCGTGGCCCCAGCGGGCGTACGCGC  
 AGATGCCCTACACCGGAGAGGAGGACGAGAACCGCACACGGGGTGCCTGCAGATGCGCG

---

1081 AspThrGluValAlaAlaSerCysGlyGlyValValLeuValGlyLeuMetAlaLeuThr  
 TGGACACGGAGGTGGCCGCGTCGTGTTGGCGGTGTTCTCGTCGGGTGATGGCGCTAA  
 ACCTGTGCCCTCACCGGCGCAGCACACCGCCACAACAGAGCAGCCAACTACCGCGATT

---

1141 LeuSerProTyrTyrLysArgTyrIleSerTrpCysLeuTrpTrpLeuGlnTyrPheLeu  
 CTCTGTCACCATATTACAAGCGCTATATCAGCTGGTGTGTTGGCTTCAGTATTTTC  
 GAGACAGTGGTATAATGTCGCGATATAGTCGACCACGAACACCACCGAAGTCATAAAAG

---

1201 ThrArgValGluAlaGlnLeuHisValTrpIleProProLeuAsnValArgGlyGlyArg  
 TGACCAAGAGTGGAAAGCGCAACTGCACGTGTGGATTCCCCCCTCAACGTCCGAGGGGGC  
 ACTGGTCTCACCTCGCGTTGACGTGCACACCAAGGGGGGAGTTGCAGGCTCCCCCG

---

1261 AspAlaValIleLeuLeuMetCysAlaValHisProThrLeuValPheAspIleThrLys  
 GCGACGCTGTCATCTTACTCATGTGTGCTGTACACCCGACTCTGGTATTGACATCACCA  
 CGCTGCCACAGTAGAACGACATGTGGCTGAGACCATAACTGTAGTGGT

---

1321 LeuLeuLeuAlaValPheGlyProLeuTrpIleLeuGlnAla  
 AATTGCTGCTGGCCGTCTCGGACCCCTTGGATTCTTCAGGCCAG  
 TTAACGACGACCGGCAGAACCTAAGAACGTCGGTC

FIG. 46-2

**FIG. 47-1** Kombinierter ORF der DNAs K9-1 bis 15e

1 GlyCysProGluArgLeuAlaSerCysArgProLeuThrAspPheAspGlnGlyTrpGln;  
 CAGGCTGTCTGAGAGGCTAGCCAGCTGCCGACCCCTTACCGATTTGACCAGGGCTGGG  
 GTCCGACAGGACTCTCCATCGGTGACGGCTGGGAATGGCTAAAATGGTCCCCGACCC  
 61 ProIleSerTyrAlaAsnGlySerGlyProAspGlnArgProTyrCysTrpHisTyrPro  
 GCCCTATCAGTTATGCCAACGGAAAGCGGCCCGACCAGGCCCTACTGCTGGCACTACC  
 CGGGATAGTCATAACGGTTGCCCTGCCGGGCTGGTCGCCGGGATGACGACCGTGATGG  
 121 ProLysProCysGlyIleValProAlaLysSerValCysGlyProValTyrCysPheThr  
 CCCAAAAACCTTGCCTGAGTGTGTTCCGGTATATTGCTTCA  
 GGGGTTTGGAACGCCATAACACAGGGCCTCTCACACACACCAGGCCATAACAGGAAGT  
 181 ProSerProValValValGlyThrThrAspArgSerGlyAlaProThrTyrSerTrpGly  
 CTCCCAGCCCCGTGGTGGGACCGACAGGTGCGGCCACCTACAGCTGGG  
 GAGGGTCGGGCCACCACCAACCCCTGCTGGCTGCCAGCCCGCGGGTGGATGTCGACCC  
 241 GluAsnAspThrAspValPheValLeuAsnAsnThrArgProProLeuGlyAsnTrpPhe  
 GTGAAAATGATACGGACGTCTCGTCTTAACAATACCAGGCCACCGCTGGCAATTGGT  
 CACTTTTACTATGCCTGCGAAGCAGGAATTGTTATGGTCCGGTGGCAGCCGTTAACCA  
 301 GlyCysThrTrpMetAsnSerThrGlyPheThrLysValCysGlyAlaProProCysVal  
 TCGGTGTACCTGGATGAACTCAACTGGATTCAACAAAGTGTGCGGAGCGCCTCTGTG  
 AGCCACATGGACCTACTTGAGTTGACCTAACGGCTCGCGGAGGAACAC  
 361 IleGlyGlyAlaGlyAsnAsnThrLeuHisCysProThrAspCysPheArgLysHisPro  
 TCATCGGAGGGCGGGCAACAACACCCCTGCACTGCCCCACTGATTGCTTCCGCAAGCATC  
 AGTAGCCTCCCCGCCGTTGTTGTTGACGTGACGGGTGACTAACGAAGGCGTTCTGAG  
 421 AspAlaThrTyrSerArgCysGlySerGlyProTrpIleThrProArgCysLeuValAsp  
 CGGACGCCACATACTCTCGGTGCGGCTCCGGTCCCTGGATCACACCCAGGTGCCTGGTCG  
 GCCTGCGGTGATGAGAGGCCACGCCAGGGACCTAGTGTGGTCCACGGACCCAGC  
 481 TyrProTyrArgLeuTrpHistYrProCysThrIleAsnTyrThrIlePheLysIleArg  
 ACTACCCGTATAGGCCTTGGCAATTACCTTGTACCATCAACTACACCATATTTAAATCA  
 TGATGGGCATATCCGAAACCGTAATAGGAACATGGTAGTTGATGTTGATAAAATTAGT  
 541 MetTyrValGlyGlyValGluHisArgLeuGluAlaAlaCysAsnTrpThrArgGlyGlu  
 GGATGTACGTGGGAGGGGTGAAACACAGGCTGGAGCTGCCCTGCAACTGGACGGGGCG  
 CCTACATGCACCCCTCCCCAGCTGTGTCCGACCTTCGACGGACGTTGACACTGC  
 601 ArgCysAspLeuGluAspArgAspArgSerGluLeuSerProLeuLeuLeuThrThrThr  
 AACGTTGCGATCTGGAAAGACAGGGACAGGTCCGAGCTCAGCCGTTACTGCTGACCACTA  
 TTGCAACGCTAGACCTCTGTCCCTGTCAGGCTCGAGTCGGCAATGACGACTGGTGAT  
 651 GluTrpGlnValLeuProCysSerPheThrThrLeuProAlaLeuSerThrGlyLeuIle  
 CACAGTGGCAGGTCTCCCGTGTCCCTCACAAACCTACCGCTTGTCACCGGCCCTCA  
 GTGTACCGTCAGGAGGGACAAGGAAGTGTGGATGGTCCGAAACAGGTGGCCGGAGT  
 721 HisLeuHisGlnAsnIleValAspValGlnTyrLeuTyrGlyValGlySerSerIleAla  
 TCCACCTCCACAGAACATTGTGGACGTGCACTTGACGGGTGGGGTCAAGCATCG  
 AGGTGGAGGTGGCTTGTAAACACCTGCGACGTCAATGACATGCCCAACCCAGTTCTGAG  
 781 SerTrpAlaIleLysTrpGluTyrValValLeuLeuPheLeuLeuLeuAlaAspAlaArg  
 CGTCCTGGGCCATTAAGTGGGAGTACGTCGTTCTCTGTTCTCTGCTTGACGACGCC  
 GCAGGACCCGGTAATTCAACCTCATGGCAGCAAGAGGACAAGGAAGACGAACTGCTGCG  
 841 ValCysSerCysLeuTrpMetMetIleLeuLeuLeuSerGlnAlaGluAlaAlaLeuGluAsn  
 GCGCTGCTCCCTGCTGTGGATGATGCTACTCATATCCAAGCGGAGGGGGCTTGAGA  
 CGCAGACGAGGACGAACACCTACTACGAIGAGTATAGGGTTCCCTCCGCCGAAACCTCT  
 901 LeuValIleLeuAsnAlaAlaSerLeuAlaGlyThrHisGlyLeuValSerPheLeuVal  
 ACCTCGTAATACTTAATGCAGCATCCCTGGCCGGACGCACGGCTTGATATCCTTCCTCG  
 TGGAGCATTATGAATTACGTCGTAGGGACGGCCCTGCGTGCAGAACATAGGAAGGAGC

961 PhePheCysPheAlaTrpTyrLeuLysGlyLysTrpValProGlyAlaValTyrThrPhe  
 TGGTCTCTGCCTTGATGGTATTGAAAGGGTAAGTGGGTGCCCGAGCGGTCTACACCT  
 ACAAGAACGAAACGTACCATAAACTTCCCATTCAACCCACGGGCTGCCAGATGTGGA  
 1021 TyrGlyMetTrpProLeuLeuLeuLeuLeuLeuLeuLeuLeuLeuLeuLeuLeuLeu  
 TCTACGGGATGTGGCCTCCTCCTGTCCTGTTGGCGTTGCCCGAGCGGGCTACGCC  
 AGATGCCCTACACCGGAGAGGAGGACGAGGACAACCGCAACGGGTGCCCGCATGCC  
 1081 AspThrGluValAlaAlaSerCysGlyGlyValValLeuValGlyLeuMetAlaLeuThr  
 TGGACACGGAGGTGGCCGCGTCGTGTTGGCGGTGCTCGTCGGGTGATGGCGCTGA  
 ACCTGTGCCTCCACCGGCGCAGCACACCACGCCACAAAGAGCAGCCAACTACCGGACT  
 1141 LeuSerProTyrTyrLysArgTyrIleSerTrpCysLeuTrpTrpLeuGlnTyrPheLeu  
 CTCTGTCACCATATTACAAGCGCTATATCAGCTGGTGCTTGTGGCTTCAGTATTTTC  
 GAGACAGTGGTATAATGTCGCGATATAGTCGACCACGAAACACCACCGAAGTCATAAAAG  
 1201 ThrArgValGluAlaGlnLeuHisValTrpIleProProLeuAsnValArgGlyGlyArg  
 TGACCAAGAGTGGAAAGCGCAACTGCACGTGTGGATTCCCCCCTCAACGTCCGAGGGGGC  
 ACTGGTCTCACCTTCGCGTTGACGTGACACCTRAGGGGGGAGTTGCAAGGCTCCCCCG  
 1251 AspAlaValIleLeuLeuMetCysAlaValHisProThrLeuValPheAspIleThrLys  
 GCGACGCCGTCATCTTACTCATGTGTGCTGTACACCCGACTCTGGTATTGACATACCA  
 CGCTGCGGCAGTAGAACATGAGTACACACGACATGTGGCTGAGACCATAACTGTAGTGGT  
 1321 LeuLeuLeuAlaValPheGlyProLeuTrpIleLeuGlnAlaSerLeuLeuLysValPro  
 AATTGCTGCTGGCCGTCTTCGGACCCCTTGGATTCTTCAAGCCAGTTGCTTAAAGTAC  
 TTAACGACGACCAGCAGGCTGGGAAACCTAAGAACGTTGGTCAAACGAATTTCATG  
 1381 TyrPheValArgValGlnGlyLeuLeuArgPheCysAlaLeuAlaArgLysMetIleGly  
 CCTACTTTGCGCGTCCAAGGCCCTCTCGGTTCTGCGCGTTAGCGCGGAAGATGATCG  
 ~ CGATGAAACACGCGCAGGTTCCGGAAAGAGGCCAGACGCSAACTCGGCCTTCTACTAGC  
 1441 GlyHisTyrValGinMetValIleIleLysLeuGlyAlaLeuThrGlyThrTyrValTyr  
 GAGGCCATTACGTGCAAATGGTCATCATTAAAGTTAGGGCGCTTACTGGCACCTATGTT  
 CTCCGGTAATGCACTGTTACCAAGTAGTAATTCAATCCCCCGCAATGACCGTGGATAACAA  
 1501 AsnHisLeuThrProLeuArgAspTrpAlaHisAsnGlyLeuArgAspLeuAlaValAla  
 ATAACCATCTCCTCTTCCGGACTGGCGCACACGGCTGCGAGATCTGGCGTGG  
 TATTGTTAGAGTGAGGAGAACGCCCTGACCCCGTGTGCGCAACGCTCTAGACCGGCACC  
 1561 ValGluProValValPheSerGlnMetGluThrLysLeuIleThrTrpGlyAlaAspThr  
 CTGTAGAGCCAGTCGTCTTCTCCAAATGGAGACCAAGCTCATCAGTGGGGGGCAGATA  
 GACATCTCGGTCTGCAGAACGGTTAACCTCTGGTCAAGTAGTGCACCCCCCGTCTAT  
 1621 AlaAlaCysGlyAspIleIleAsnGlyLeuProValSerAlaArgArgGlyArgGlut  
 CCGCCCGTGCCTGACATCATCAACGGCTTGCGCTGTTCCGCCCGCAGGGGCCGGAGA  
 GCGGGCGACGCCACTGTAGTAGTTGCCAACGGACAAAGGCGGGCGTCCCCGGCCCTCT  
 1681 LeuLeuGlyProAlaAspGlyMetValSerLysGlyTrpArgLeuLeuAlaProIleThr  
 TACTGCTCGGGCCAGCCGATGGAATGGCTTCCAAGGGGTGGAGGTGCTGGCGCCATCA  
 ATGACGAGCCCCGGTGGCTACCTTACCAAGAGGITCCCCACCTCAACGACCCGGGTAGT  
 1741 AlaTyrAlaGlnGlnThrArgGlyLeuLeuGlyCysIleIleThrSerLeuThrGlyArg  
 CGCGTACGCCAGCAGACAAGGGGCCTCTAGGGTGCATAATCACCAGCCTAACTGGCC  
 GCCGCATGCGGGTGGCTGTTCCCGGAGGATCCCACGTATTAGTGGTCGGATTGACCGG  
 1801 AspLysAsnGlnValGluGlyGluValGlnIleValSerThrAlaAlaGlnThrPheLeu  
 GGGACAAAAACCAAGTGGAGGGTGGAGGTCCAGATTGTCAGACTGCTGCCCAAACCTCC  
 CCCTGTTTGGTTCACCTCCACTCCAGGTCTAACACAGTGTGACGACGGGTTGGAAAGG  
 1861 AlaThrCysIleAsnGlyValCysTrpThrValTyrHisGlyAlaGlyThrArgThrIle  
 TGGCAACGTGCATCAATGGGGTGTGCTGGACTGTCTACCAACGGGCCGGAACGAGGACCA  
 ACCGTTGACAGTAGTTACCCACACGACCTGACAGATGGTGCCTGGCTCCTGGT  
 AlaSerProLysGlyProValIleGlnMetTyrThrAsnValAspGlnAspLeuValGly

FIG. 47-2

1921 TCGCGTCACCCAGGGTCTGTCAATCAGATGTTAACAAATGTAGACCAAGACCTTGTGG  
 AGCGCAGTGGGTCCCAGGACAGTAGGTCTACATATGGTACATCTGGTCTGGAACACC  
 TIPProAlaProGlnGlySerArgSerLeuThrProCysThrCysGlySerSerAspLeu  
 1981 GCTGGCCCGCTCCGCAGGTAGCCGCTATTGACACCCCTGCACTTGCAGGCTCCTCGGACC  
 CGACCGGGCGAGGCCTCCATCGCGAGTAACTGTGGGACGTGAACGCCAGGGAGCCTGG  
 TyrLeuValThrArgHisAlaAspValIleProValArgArgArgGlyAspSerArgGly  
 2041 TTACCTGGTCAAGGAGCACGCCGATGTCATTCCGTGCGCCGGCGGGTGATAGCAGGG  
 AAATGGACCAGTGCTCCGTGGCTACAGTAAGGGCACGCCGCCGCCCCACTATCGTCCC  
 SerLeuLeuSerProArgProIleSerTyrLeuLysGlySerSerGlyGlyProLeuLeu  
 2101 GCAGCCTGCTGTCGCCCCGGCCATTTCCTACTTGAAAGGCTCTCGGGGGTCCGCTGT  
 CGTCGGACGACAGCGGGGCCGGTAAAGGATGAACCTTCCAGGAGCCCCCAGGCCACA  
 CysProAlaGlyHisAlaValGlyIlePheArgAlaAlaValCysThrArgGlyValAla  
 2161 TGTGCCCCGGGGCACGCCGTTGGCATATTTCGGCCGGTGTGCAACCGTGGAGTGG  
 ACACGGGGCGCCCGTGGCACCCGTATAAACCCGGCCACAGTGGGCACCTCAC  
 LysAlaValAspPheIleProValGluAsnLeuGluThrThrMetArgSerProValPhe -  
 2221 CTAAAGGCGGTGGACTTTATCCCTGTGGAGAACCTAGAGACAACCATGAGGTCCCCGGTGT  
 GATTCCGCCACCTGAAATAGGGACACCTCTGGATCTGTGGTACTCCAGGGCCACA  
 ThrAspAsnSerSerProProValValProGlnSerPheGlnValAlaHisLeuHisAla  
 2281 TCACGGATAACTCCCTCACCAGTAGTGCCCCAGAGCTTCAGGTGGCTCACCTCCATG  
 AGTGCCTATTGAGGAGAGGTGGTCATCACGGGTCTCGAAGGTCCACCGAGTGGAGGTAC  
 ProThrGlySerGlyLysSerThrLysValProAlaAlaTyrAlaAlaGlnGlyTyrLys  
 2341 CTCCCCACAGGCAGCGGCAAAGCACCAAGGTCCGGCTGCATATGCAGCTCAGGGCTATA  
 GAGGGTGTCCCGTGCCTGGTTCTGGACAGGGCAGTATACTGTCAGTGGAGTCCCAGT  
 ~ ValLeuValLeuAsnProSerValAlaAlaThrLeuGlyPheGlyAlaTyrMetSerLys  
 2401 AGGTGCTAGTACTCAACCCCTCTGTTGCTGCAACACTGGGCTTTGGTGCTTACATGTC  
 TCCACGGATCATGAGTTGGGGAGACAACGACGTTGTGACCCGAAACCACGAAATGTACAGGT  
 AlaHisGlyIleAspProAsnIleArgThrGlyValArgThrIleThrThrGlySerPro  
 2461 AGGCTCATGGGATCGATCTAACATCAGGACCGGGGTGAGAACAAATTACACTGGCAGCC  
 TCCGAGTAGCCCTAGCTAGGATTGTAGTCTGGCCCCACTCTTGTAAATGGTGACCGTCGG  
 IleThrTyrSerThrTyrGlyLysPheLeuAlaAspGlyGlyCysSerGlyGlyAlaTyr  
 2521 CCATCACGTACTCCACCTACGGCAAGTTCTGCGCACGGGGTGTGGGGGGCGCTT  
 GGTAGTGCATGAGGTGGATGCCGTTCAAGAACGGCTGCCACGAGCCCCCGCGAA  
 AspIleIleIleCysAspGluCysHisSerThrAspAlaThrSerIleLeuGlyIleGly  
 2581 ATGACAAATAATTGTGACCGAGTGCCACTCCACGGATGCCACATCCCATCTGGCATCG  
 TACTGTATTAAACACTGCTCACGGTGAGGTGCCAACGGTGTAGGTAGAACCCGTAGC  
 ThrValLeuAspGlnAlaGluThrAlaGlyAlaArgLeuValValLeuAlaThrAlaThr  
 2641 GCACTGTCCCTGACCAAGCAGAGACTGGGGGGGAGACTGGTTGTGCTCGCCACCGCCA  
 CGTGACAGGAACGGTTCTCTGACGCCCGCTCTGACCAACACGAGCGGTGGCGGT  
 ProProGlySerValThrValProHisProAsnIleGluGluValAlaLeuSerThrThr  
 2701 CCCCTCCGGGCTCCGTCACTGTGCCCCATCCAAACATCGAGGAGGTGCTCTGTCCACCA  
 GGGGAGGGCCCGAGGCAGTGACACGGGGTAGGGTTGTAGCTCCTCCAACGAGACAGGTGGT  
 GlyGluIleProPheTyrGlyLysAlaIleProLeuGluValIleLysGlyGlyArgHis  
 2761 CCGGAGAGATCCCTTTACGGCAAGGCTATCCCCCTCGAAGTAATCAAGGGGGGAGAC  
 GGCCTCTCTAGGGAAAAATGCCGTTCCGATAGGGGAGCTTCATTAGTICCCCCCTCTG  
 LeuIlePheCysHisSerLysLysLysCysAspGluLeuAlaAlaLysLeuValAlaLeu  
 2821 ATCTCATCTCTGTCATTCAAAGAAGAAGTGCAGAACACTGCCGCAAAGCTGGTCG  
 TAGAGTAGAACAGTAAGTTCTTCTCACGCTGCTTGAGCGGGTTCGACCGCGTA  
 GlyIleAsnAlaValAlaTyrTyrArgGlyLeuAspValSerValIleProThrSerGly  
 2881 TGGGCATCAATGCCGTGGCCTACTACCGGGCTTGACGTGTCCGTACCCGACCGCG  
 ACCCGTAGTTACGGCACCGGATGATGGGCCAGAACGTGCAAGGCAGTAGGGCTGGTCGC

FIG. 47-3

2941 AspValValValValAlaThrAspAlaLeuMetThrGlyTyrThrGlyAspPheAspSer  
 GCGATGTTGTCGTGGCAACCGATGCCCTCATGACCGGCTATACCGGCAGCTTCGACT  
 CGCTACAACAGCAGCACCGTTGGTACGGGAGTACTGGCCATATGGCCGCTGAAGCTGA  
 ValIleAspCysAsnThrCysValThrGlnThrValAspPheSerLeuAspProThrPhe  
 3001 CCGTGATAGACTGCAATACTGTCACCCAGACAGTCGATTTCAGCCTGACCCTACCT  
 GCCACTATCTGACGTTATGCACACAGTGGGCTGTCAGCTAAAGTCGAACTGGGATGGA  
 ThrIleGluThrIleThrLeuProGlnAspAlaValSerArgThrGlnArgArgGlyArg  
 3061 TCACCAATTGAGACAATCACGCTCCCCCAGGATGCTGTCCTCCGACTCAACGTCGGGCA  
 AGTGGTAACTCTGTTAGTGCAGGGGCTACGACAGAGGGCTGAGTTGCAGCCCCGT  
 ThrGlyArgGlyLysProGlyIleTyrArgPheValAlaProGlyGluArgProSerGly  
 3121 GGACTGGCAGGGGAAGCAGGCATCTACAGATTGTCGGCACCGGGGAGCGCCCTCCG  
 CCTGACCGTCCCCCTCGTCCGTAGATGCTAAACACCGTGGCCCCCTCGCGGGAGGC  
 MetPheAspSerSerValLeuCysGluCysTyrAspAlaGlyCysAlaTrpTyrGluLeu  
 3181 GCATGTTGCACTCGTCCGCTCTGTGAGTGCTATGACGCAGGCTGTGCTTGGTATGAGC  
 CGTACAAGCTGAGCAGGAGACACTCACGATACTGCGTCCGACAGAACATACTCG  
 ThrProAlaGluThrThrValArgLeuArgAlaTyrMetAsnThrProGlyLeuProVal  
 3241 TCACGCCGCCGAGACTACAGTTAGGCTACGAGCTACATGAAACACCCGGGCTTCCG  
 AGTGCAGGGCTCTGATGTCATCGCATGTACTTGTGGGCCCCGAAAGGC  
 CysGlnAspHisLeuGluPheTrpGluGlyValPheThrGlyLeuThrHisIleAspAla  
 3301 TGTGCCAGGACATCTTGAATTGGAGGGCGCTTACAGGCCTCACTCATATAGATG  
 ACACGGTCTGGTAGAACTTAAACCTCCGAGAAATGTCGGAGTGAAGTATCTAC  
 HisPheLeuSerGlnThrLysGlnSerGlyGluAsnLeuProTyrLeuValAlaTyrGln  
 3361 CCCACTTCTATCCCAGACAAAGCAGAGTGGGAGAACCTCCTTACCTGGTAGCGTACC  
 GGGTAGAAAGATAAGGTCTGTTCGTCTCACCCCTTGGAGGAATGGACCATCGCATGG  
 AlaThrValCysAlaArgAlaGlnAlaProProProSerTrpAspGlnMetTrpLysCys  
 3421 AAGCCACCGTGCGCTAGGCTCAAGCCCCCTCCCCATCGTGGGACCAGATGTGGAAAGT  
 TTGGTGGCACACGCGATCCGAGTTGGGGAGGGTAGCACCCCTGGTCTACACCTTC  
 LeuIleArgLeuLysProThrLeuHisGlyProThrProLeuLeuTyrArgLeuGlyAla  
 3481 GTTGATTGCGCTCAAGCCACCCCTCATGGCCAACACCCCTGCTATACAGACTGGCG  
 CAAACTAAGCGGAGTTGGGGAGGTACCCGGTTGTGGGACGATAATGTCGACCCCG  
 ValGlnAsnGluIleThrLeuThrHisProValThrLysTyrIleMetThrCysMetSer  
 3541 CTGTCAGAACATGAAATCACCTGACGCCACCAAGTCACCAAATACATCATGACATGCA  
 GACAGTCTTACTTAGTGGACTGCGTGGGTCACTGGTTATGTAGTACTGTACGTACA  
 AlaAspLeuGluValValThrSerThrTrpValLeuValGlyGlyValLeuAlaAlaLeu  
 3601 CGGCCGACCTGGAGGTGTCACGAGCACCTGGGTCTCGTTGCCGGCTGGCTGCTT  
 GCCGGCTGGACCTCCAGCAGTGCTGGACCCACGAGCAACGCCAGGACCGACGAA  
 AlaAlaTyrCysLeuSerThrGlyCysValValIleValGlyArgValValLeuSerGly  
 3661 TGGCCCGTATTGCGCTGTCAACAGGCTGCGTGGTCACTAGTGGCAGGGTCTGTCCG  
 ACCGGCCATAACGGACAGTTGTCGACGCACCAGTACCCGTCCAGCAGAACAGGC  
 LysProAlaIleIleProAspArgGluValLeuTyrArgGluPheAspGluMetGluGlu  
 3721 GGAAGGCCGCAATCATACTGACAGGGAGTCCTCTACCGAGAGTTGAGATGGAAG  
 CCTTCGGCCGTTAGTATGGACTGTCCTCAGGAGATGGCTCTAACGCTACTCACCTTC  
 CysSerGlnHisLeuProTyrIleGluGlnGlyMetMetLeuAlaGluGlnPheLysGln  
 3781 AGTGCTCTCAGCACTTACCGTACATCGAGCAAGGGATGATGCTCGCCGAGCAGTTCAAGC  
 TCACGAGAGTCGTAATGGCATGTCAGCTGTTCCCTACTACGAGCGGCTCGTCAAGTCG  
 LysAlaLeuGlyLeuLeuGlnThrAlaSerArgGlnAlaGluValIleAlaProAlaVal  
 3841 AGAAGGCCCTCGGCCCTGAGACCGCGTCCCGTCAGGCAGAGGTATGCCCTGCTG  
 CCTTCGGGAGCCGGAGGACGCTCGGCGAGGGCAGTCCGTCCTAACAGCAGGGACGAC  
 GlnThrAsnTrpGlnLysLeuGluThrPheTrpAlaLysHisMetTrpAsnPheIleSer

FIG. 47-4

3901 TCCAGACCAACTGGC<sub>AAA</sub>ACTCGAGACCTCTGGCGAAGCATATGTGGAACTCATCA  
 AGGTCTGGT<sub>1</sub>GACCGTTTGAGCTCTGGAAAGACCCGCTCGTATACACCTTGAAAGTAGT  
 3961 GlyIleGlnTyrLeuAlaGlyLeuSerThrLeuProGlyAsnProAlaIleAlaSerLeu  
 GTGGGATACAATACCTGGCGGGCTTGTCAACGCTGCCTGGTAACCCCGCCATTGCTTCAT  
 CACCTATGTTATGAACC<sub>GG</sub>GGAAACAGTTGCACGGACCATGGGGCGGTAAACGAAGTA  
 4021 MetAlaPheThrAlaAlaValThrSerProLeuThrThrSerGlnThrLeuLeuPheAsn  
 TGATGGCTTTACAGCTGCTGTCAACGCCACTAACCAACTAGCCAAACCCTCCTTCATCA  
 ACTACCGAAAATGTCGACGACAGTGGTGGGTGATTGGTGATGGTTGGGAGGAGAAGT  
 4081 IleLeuGlyGlyTrpValAlaAlaGlnLeuAlaAlaProGlyAlaAlaThrAlaPheVal  
 ACATATTGGGGGGGTGGGTGGCTGCCAGCTGCCGCCGGTGCCGCTACTGCCTTG  
 TGTATAACCCCCCCCACCCACCGACGGGTGAGC<sub>GG</sub>GGGCCACGGGATGACGGAAAC  
 4141 GlyAlaGlyLeuAlaGlyAlaAlaIleGlySerValGlyLeuGlyLysValLeuIleAsp  
 TGGCGCTGGCTTAGCTGGCGCCGCATCGGCAGTGGACTGGGGAAAGGTCCCTCATAG  
 ACCCGCAGCGAACATGACCGCGCGGTAGCGTCACAACCTGACCCCTCCAGGAGTATC  
 4201 IleLeuAlaGlyTyrGlyAlaGlyValAlaGlyAlaLeuValAlaPheLysIleMetSer  
 ACATCCTTGCAAGGGTATGGCGGGCGTGGCGGGAGCTCTTGTGGCATCAAGATCAIGA  
 TGTAGGAACGTCCCATA<sub>CC</sub>CGGCCACC<sub>CC</sub>CTCGAGAACACCGTAAGTTCTAGTACT  
 4261 GlyGluValProSerThrGluAspLeuValAsnLeuLeuProAlaIleLeuSerProGly  
 CGCGTGAGGTCCCCTCCACGGAGGACCTGGTCAATCTACTGCCGCATCCCTCGCCCG  
 CGCCACTCCAGGGGAGGTGCTCTGGACCAGTTAGATGACGGGCGGTAGGAGAGCGGGC  
 4321 AlaLeuValIleGlyValValCysAlaAlaIleLeuArgArgHisValGlyProGlyGlu  
 GAGCCCTCGTAGTCGGCTGGCTGTGCAGCAAATCTACTGCCGCACGTTGGCCGGCG  
 CTCGGGAGCATCAGCCGACCAGACACGTCGTTATGACGCGCCGTGCAACCGGGCCCG  
 4381 GlyAlaValGlnTrpMetAsnArgLeuIleAlaPheAlaSerArgGlyAsnHisValser  
 AGGGGGCAGTGCAGTGGATGAACCGGCTGATAGCCCTCGCTCCCGGGGAACCATGTTT  
 TCCCCCGTCACGTCACCTACTTGGCCGACTATCGGAAGCGGAGGGCCCTTGGTACAAA  
 4441 ProThrHistYrValProGluSerAspAlaAlaAlaArgValThrAlaIleLeuSerSer  
 CCCCCACGCAC<sub>TC</sub>GTGCGGGAGAGCGATGCA<sub>GC</sub>TGCCCCGUGTCACTGCCATACTCAGCA  
 GGGGGTGC<sub>GT</sub>GATGCA<sub>CG</sub>GGCTCTCGCTACGTCGACGGCGCAGTGACGGTATGAGTCGT  
 4501 LeuThrValThrGlnLeuLeuArgArgLeuHisGlnTrpIleSerSerGluCysThrThr  
 GCCTCACTGTAACCCAGCTCTGAGGGCAGTGGATAAGCTCGGAGTGTACCA  
 CGGAGTGCACATTGGGTGAGGACTCCGCTGACGTGGTCACCTATTGAGCCTCACAI<sub>GGT</sub>  
 4561 ProCysSerGlySerTrpLeuArgAspIleTrpAspTrpIleCysGluValLeuSerAsp  
 CCTCATGCTCCGGITCTGGCTAAGGGACATCTGGACTGGATAAGCTCGGAGTGTACCA  
 GAGGTACGAGGCCAAGGACCGATTCCCTGAGACCTGACCTATA<sub>CG</sub>CTCCACAAC<sub>TC</sub>CG  
 4621 PheLysThrTrpLeuLysAlaLysLeuMetProGlnLeuProGlyIleProPheValSer  
 ACTTTAACCTGGCTAAAGCTAACGCTCATGCCACAGCTGCTGGATCCCCTTGTGT  
 TGAAATTCTGGACC<sub>AT</sub>TCGATTGACGTACGGTGTGACGGACCC<sub>CT</sub>AGGGAAACACA  
 4681 CysGlnArgGlyTyrLysGlyValTrpArgValAspGlyIleMetHisThrArgCysHis  
 CCTGCCAGCGGGGTATAAGGGGTCTGGCGAGTGGACGGCATGCACACTCGCTGCC  
 GGACGGTCGCGCCCATA<sub>TT</sub>CCCCCAGACCGCTCAC<sub>CT</sub>GGTAGTACGTGTGAGCGACGG  
 4741 CysGlyAlaGluIleThrGlyHisValLysAsnGlyThrMetArgIleValGlyProArg  
 ACTGTGGAGCTGAGATCACTGGACATGCA<sub>AA</sub>ACGGGACGATGAGGATCGTCGGTCCTA  
 TGACACCTCGACTCTAGTGACCTGTACAGTTTGCCTGCTACTCCTAGCAGCCAGGAT  
 4801 ThrCysArgAsnMetTrpSerGlyThrPheProIleAsnAlaTyrThrThrGlyProCys  
 GGACCTGCA<sub>GG</sub>ACATGTGGAGTGGGACCTTCCCCTTAATGCC<sub>AC</sub>CACCCACGGGCCCCCT  
 CCTGGACGTCC<sub>TT</sub>GTACACCTCAC<sub>CC</sub>TGGAAAGGGTAATTACGGATGTGGTGGCCCGGGGA  
 4861 Th<sub>1</sub>ProLeuProAlaProAsnTyrThrPheAlaLeuTrpArgValSerAlaGluGluTyr  
 GTACCCCCCTCCTGCGCCGAACTACACGTTGC<sub>GT</sub>TATGGAGGGTGTGCAAGAGGAAT  
 CATGGGGGAAGGACGCGGCTTGTATGCAAGCGC<sub>GT</sub>A<sub>AC</sub>CTCCCACAGACGTC<sub>CT</sub>CTTA

FIG. 47-5

4921 ValGluIleArgGlnValGlyAspPheHisTyrValThrGlyMetThrThrAspAsnLeu  
 ATGTGGAGATAAGGCAGGTGGGGACTTCCACTACGTGACGGGTATGACTACTGACAATC  
 TACACCTCTATTCCGCCACCCCTGAAGGTGATGCAGTCCCCATACTGATGACTGTTAG  
 LysCysProCysGlnValProSerProGluPhePheThrGluLeuAspGlyValArgLeu  
 4981 TCAAATGCCCGTGCCAGGTCCCATGCCGAATTTTACAGAATTGGACGGGTGCGCC  
 AGTTTACGGGCACGGTCCAGGGTAGCGGGCTAAAAAGTGTCTAACCTGCCACGCCGG  
 HisArgPheAlaProProCysLysProLeuLeuArgGluGluValSerPheArgValGly  
 5041 TACATAGGTTTGCGCCCCCTGCAAGCCCTGCTGCGGGAGGGTATCATTAGAGTAG  
 ATGTATCCAACGCCGGGGACGTTGGAACGACGCCCTCCATAGTAAGTCTCATC  
 LeuHisGluTyrProValGlySerGlnLeuProCysGluProGluProAspValAlaVal  
 5101 GACTCCACGAATACCCGGTAGGGTCGCAATTACCTTGCGAGCCGAACCGGACGTGGCCG  
 CTGAGGTGCTTATGGGCATCCCAGCCTTAATGGAACGCTCGGGCTTGGCCTGCACCGGC  
 LeuThrSerMetLeuThrAspProSerHisIleThrAlaGluAlaAlaGlyArgArgLeu  
 5161 TGTGACGTCCATGCTCACTGATCCCTCCATATAACAGCAGAGGCGCCGGCGAAGGT  
 ACAACTGCAAGGTACGAGTGAATAGGGAGGGTATATTGTCGTCCTCGCCGGCCCCGTTCCA  
 AlaArgGlySerProProSerValAlaSerSerAlaSerGlnLeuSerAlaProSer  
 5221 TGGCGAGGGGATCACCCCCCTCTGGGCCAGCTCCTCGCTAGCCAGCTATCGCTCCAT  
 ACCGCTCCCCTAGTGGGGGAGACACGGTCGAGGAGCCATGGTCGATAGGCGAGGTA  
 LeuLysAlaThrCysThrAlaAsnHisAspSerProAspAlaGluLeuIleGluAlaAsn  
 5281 CTCTCAAGGCAACTGACCGCTAACCATGACTCCCTGATGCTGAGCTCATAGAGGCCA  
 GAGAGTTCCGTTGAACTGTCGAGGACTACGACTCGAGTATCTCCGGT  
 LeuLeuTrpArgGlnGluMetGlyGlyAsnIleThrArgValGluSerGluAsnLysVal  
 5341 ACCT CCTATGGAGG CAGGAGATGGGCGG CAACATCACCAGGGTTGAGTCAGAAAACAAAG  
 TGGAGGATAACCTCCGCTCTACCCGGCGTTGATGGTACTGAGGGACTACGACTCGAGTATCTCCGGT  
 ValIleLeuAspSerPheAspProLeuValAlaGluGluAspGluArgGluIleSerVal  
 5401 TGGT GATTCTGGACTCCTCGATCCGCTTGTGGCGAGGAGGACGAGCGGGAGATCTCCG  
 ACCACTAAGACCTGAGGAAGCTAGGCGAACACGCCCTCTGCTCGCCCTCTAGAGGC  
 ProAlaGluIleLeuArgLysSerArgArgPheAlaGlnAlaLeuProValTrpAlaArg  
 5461 TACCCG CAGAAATCCTGCGGAAGTCTCGGAGATTGCCCAGGCCCTGCCGTTGGCGC  
 ATGGCGCTTTAGGACGCTCTAACGGGGTCCGGGACGGCAAACCCCG  
 ProAspTyrAsnProProLeuValGluthrTrpLysLysProAspTyrGluProProVal  
 5521 GGCGGACTATAACCCCCCGCTAGTGGAGACGTGAAAAAGCCGACTACGAACCACCTG  
 CGGGCTGATATTGGGGGGCGATCACCTCTGCACCTTTCGGGCTGATGCTTGGTGGAC  
 ValHisGlyCysProLeuProProLysSerProProValProProProArgLysLys  
 5581 TGGTCATGGCTGTCCCTCACCTCAAAGTCCCCTCTGCTGCCCTCGGACAGAAGA  
 ACCAGGTACCGACAGGCGAAGGTGGAGGTTCAAGGGAGGACACGGAGGCGGAGCCTTCT  
 ArgThrValValLeuThrGluSerThrLeuSerThrAlaLeuAlaGluLeuAlaThrArg  
 5641 AGCGGACGGTGGCTCTCACTGAATCACCCCTATCTACTGCCCTGGCCGAGCTGCCACCA  
 TCGCCTGCCACCAGGAGTGAATTGGGGATAGATGACGGAACCGGCTCGAGCGGTGGT  
 SerPheGlySerSerSerThrSerGlyIleThrGlyAspAsnThrThrSerSerGlu  
 5701 GAAGCTTGGCAGCTCCTCACTTCCGGCATTACGGGCGACAATACGACAACATCCTCTG  
 CTTCGAAACCGTGGAGGTGAAGGCCGTAATGCCGCTGTTATGCTGTTAGGAGAC  
 ProAlaProSerGlyCysProProAspSerAspAlaGluSerTyrSerSerMetProPro  
 5761 AGCCCGCCCCCTCTGGCTGCCCTCGACTCCGACGCTGAGTCTTACCTCCATGCC  
 TCGGGGGGGAAGACCGACGGGGGCTGAGGCTGCCACTCAGGATAAGGAGGTACGGGG  
 LeuGluGlyGluProGlyAspProAspLeuSerAspGlySerTrpSerThrValSerSer  
 5821 CCCTGGAGGGGGAGCCTGGGATCCGGATCTTAGCGACGGGTATGGTCAACGGTCAGTA  
 GGGACCTCCCCCTGGACCCCTAGGCCTAGAATCGCTGCCAGTACCAAGTTGCCAGTCAT  
 GluAlaAsnAlaGluAspValValCysCysSerMetSerTyrSerTrpThrGlyAlaLeu

5881 GTGAGGCCAACGGGAGGAATGTCGTGCTGCTCAATGTTACTCTGGACAGGGCAC  
 CACTCCGGTGTGCGCCTCTACAGCACACGAGTTACAGAATGAGAACCTGTCCGCCTG  
 ValThrProCysAlaAlaGluGluGlnLysLeuProIleAsnAlaLeuSerAsnSerLe:  
 5941 TCGTCACCCCGTGCAGCGCGGAAAGAACAGAAAATGCCCATCAATGCACTAAGCAACTCGT  
 AGCAGTGGGCACCGCGCCCTCTGTCTTGACGGTAGTTACGTGATTGTTGAGCA  
 LeuArgHisHisAsnLeuValTyrSerThrThrSerArgSerAlaCysGlnArgGlnLys  
 6001 TGCTACGTACCACAATTGGTATTCCACACCTCACGAGTGCTTGCAAAGGCAGA  
 ACGATGCAGTGGTGTAAACCACATAAGGTGGAGTGCACGACGGTTCCGTCT  
 LysValThrPheAspArgLeuGlnValLeuAspSerHisTyrGlnAspValLeuLysGlu  
 6061 AGAAAAGTCACATTTGACAGACTGCAAGTCTGGACAGCCATTACCAAGGACGTACTCAAGG  
 TCTTTCAGTGTAAACTGTCTGACGTTCAAGACCTGTCGGTAATGGTCCTGCATGAGTTCC  
 LysValAlaAlaAlaSerLysValLysAlaAsnLeuLeuSerValGluGluAlaCysSer  
 6121 AGGTTAAAGCAGCGCGTCAAAAGTGAAGGCTAACTTGCTATCCGTAGAGGAAGCTTGCA  
 TCCAATTTCGTCGCCAGTTTCACTTCCGATTGAACGATAGGCATCTCCTTCGAAACGT  
 LeuThrProProHisSerAlaLysSerLysPheGlyTyrGlyAlaLysAspValArgCys  
 6181 GCCTGACGCCCCCACACTCAGCAAATCCAAGTTGGTTATGGGGCAAAGACGTCCGTT  
 CGGACTGCGGGGTGTGAGTCGGTTAGGTCAAACCAATACCCGTTTCTGCAGGCAA  
 HisAlaArgLysAlaValThr-HisIleAsnSerValTrpLysAspLeuLeuGluAspAsn  
 6241 GGCATGCCAGAAAGGCCGTAAACCCACATCAACTCCGTGTGAAAGACCTCTGGAAAGACA  
 CGGTACGGTCTTCCGGCATTGGGTGTAGTTGAGGCACACCTTCTGGAAAGACCTCTGT  
 ValThrProIleAspThrThrIleMetAlaLysAsnGluValPheCysValGlnProGlu  
 6301 ATGTAACACCAATAGACACTACCATCATGGCTAAGAACGAGGTTCTGCGTTCAAGCCTG  
 TACATTGTGGTTATCTGTGATGGTAGTACCGATTCTGCTCAAAGACGCAAGTCGGAC  
 LysGlyGlyArgLysProAlaArgLeuIleValPheProAspLeuGlyValArgValCys  
 6361 AGAAGGGGGTCTGTAAGCCAGCTCGTCTCATCGTGTGTTCCCGATCTGGCGTGCCTGT  
 TCTTCCCCCAGCATTGGTCGAGCAGAGTAGACAAGGGCTAGACCCGACGCCACA  
 GluLysMetAlaLeuTyrAspValValThrLysLeuProLeuAlaValMetGlySerSer  
 6421 GCGAAAAGATGGCTTGTACGACGTGGTTACAAGCTCCCCCTGGCGTGTAGGGAAAGCT  
 CGCTTTCTACCGAAACATGCTGCACCAATGTTGAGGGAAACCGGACTACCCCTCGA  
 TyrGlyPheGlnTyrSerProGlyGlnArgValGluPheLeuValGlnAlaTrpLysSer  
 6481 CCTACGGATTCCAATACTCACCAGGACAGCGGGTGAATTCTCGTGCAGCGTGGAAAGT  
 GGATGCCTAAGTTATGAGTGGTCTCGTGCACCAACTTAAGGAGCACGTTCGCACCTCA  
 LysLysThrProMetGlyPheSerTyrAspThrArgCysPheAspSerThrValThrGlu  
 6541 CCAAGAAAACCCAATGGGGTCTCGTATGATAACCGCTGCTTGACTCACAGTCACIG  
 GGTTCTTGGGGTTACCCAAAGAGCATACTATGGCGACGAAACTGAGGTGTCACTGAC  
 SerAspIleArgThrGluGluAlaIleTyrGlnCysCysAspLeuAspProGlnAlaArg  
 6601 AGAGCGACATCGTACGGAGGGAGGCAACTACCAATGTTGTGACCTCGACCCCCAACCCC  
 TCTCGCTGTAGGCATGCCCTCTCCGTTAGATGGTACAACACTGGAGCTGGGGTTCGGG  
 ValAlaIleLysSerLeuThrGluArgLeuTyrValGlyGlyProLeuThrAsnSerArg  
 6661 GCGTGGCCATCAAGTCCCTCACCGAGAGGCTTATGTTGGGGCCCTCTTACCAATTCAA  
 CGCACCGGTAGTTCAAGGGAGTGGCTCTCCGAAATACAACCCCCGGAGAACGGTTAAGTT  
 GlyGluAsnCysGlyTyrArgArgCysArgAlaSerGlyValLeuThrThrSerCysGly  
 6721 GGGGGGAGAACATCGGGCTATCGCAGGTGCGCGCGAGCGCGTACTGACAACTAGCTGTG  
 CCCCCCTCTTGACGCCGATAGCGTCCACGGCGCGCTGCCGATGACTGTGATCGACAC  
 AsnThrLeuThrCysTyrIleLysAlaArgAlaAlaCysArgAlaAlaGlyLeuGlnAsp  
 6781 GTAACACCCCTCACTTGCTACATCAAGGCCGGCAGCCTGTCGAGCCGAGGGCTCCAGG  
 CATTGTGGGAGTGAACGATGTAGTTCCGGCCCGTCGGACAGCTCGCGTCCGGAGGTCC  
 CysThrMetLeuValCysGlyAspAspLeuValValIleCysGluSerAlaGlyValGln  
 6841 ACTGCACCATGCTCGTGTGGCGACGACTTAGTCGTTATCTGTGAAAGCCGGGGGTCC  
 TGACGTGGTACGAGCACACACCGCTGCTGAATCAGCAATAGACACTTTCGCCCCCCAAGG

6901 GluAspAlaAlaSerLeuArgAlaPheThrGluAlaMetThrArgTyrSerAlaProPro -  
 AGGAGGGACGCGGGCGAGCCTGAGAGCCTTCACGGAGGCTATGACCAGGTACTCCCCCCCC  
 TCCTCCTGCGCCGCTCGGACTCTCGGAAGTGCCCTCCGATACTGGTCCATGAGGCGGGGGG  
  
 6961 GlyAspProProGlnProGlutyrAspLeuGluLeuIleThrSerCysSerSerAsnVal  
 CTGGGGACCCCCCACAAACCAGAACATAGACTTGGAGCTCATAACATCATGCTCCTCAACG  
 GACCCCTGGGGGGTGTGGTCTTATGCTGAACCTCGAGTATIGTAGTACGAGGAGGGTTGC  
  
 7021 SerValAlaHisAspGlyAlaGlyLysArgValTyrrLeuThrArgAspProThrThr  
 TGTCAGTCGCCACGACGGCGCTGGAAAGAGGGTCTACTACCTCACCCGTGACCCCTACAA  
 ACAGTCAGCGGGTGCTGCCCGACCTTCTCCCAGATGATGGAGTGGGCACTGGGAIGTT  
  
 7081 ProLeuAlaArgAlaAlaTrpGluthrAlaArgHisThrProValAsnSerTrpLeuGly  
 CCCCCCTCGCGAGAGAGCTGCGTGGGAGACAGCAAGACACACTCCAGTCATTCCCTGGCTAG  
 GGGGGAGCGCTCGACGCACCCCTCTGCGTTCTGTGAGGTCAGTTAAGGACCGATC  
  
 7141 AsnIleIleMetPheAlaProThrLeuTrpAlaArgMetIleLeuMetThrHisPhePhe  
 GCAACATAATCATGTTGCCACACTGTGGGCGAGGATGATACTGATGACCCATTCT  
 CGTTGTATTAGTACAACGGGGGTGTGACACCCGCTCCTACTATGACTACTGGGTAAAGA  
  
 7201 SerValLeuIleAlaArgAspGlnLeuGluGlnAlaLeuAspCysGluIleTyrGlyAla  
 TTAGCGTCCTTATAGCCAGGGACCAGCTGAAACAGGCCCTCGATTGCGAGATCTACGGGG  
 AATCGCAGGAATATCGGTCCCTGGTCGAACCTGTCCGGAGCTAACGCTCTAGATGGGG  
  
 7261 CysTyrSerIleGluProLeuAspLeuProProIleIleGlnArgLeu  
 CCTGCTACTCCATAGAACCACTTGATCTACCTCCAATCATTCAAAGACTC  
 GGACGATGAGGTATCTGGTGAACTAGAGATGGAGGTTAGTAAGTTCTGAG

FIG. 47-8