

(12)

# PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 9013/92 KR92/00022

(51) Int.Cl.<sup>6</sup> : C12N 15/51  
C12N 5/12, C07K 16/08, C12P 21/08,  
G01N 33/577, A61K 39/29

(22) Anmeldetag: 8. 6.1992

(42) Beginn der Patentdauer: 15. 9.1998

(45) Ausgabetag: 25. 5.1999

(30) Priorität:

10. 6.1991 KR 91-9510 beansprucht.  
6. 8.1991 KR 91-13601 beansprucht.

(73) Patentinhaber:

LUCKY LIMITED  
SEOUL (KR).

(56) Entgegenhaltungen:

EP 0318216A1 EP 0388232A1 EP 0419182A1

## (54) HEPATITIS-C-DIAGNOSEMITTEL UND -IMPFSTOFFE

(57) Die vorliegende Erfindung sieht Polynukleotide vor, die von der cDNA eines neuen Typs Hepatitis-C-Virus mit dem Namen KHCV abgeleitet sind, die darin kodierten Polypeptide, Antikörper, die gegen die Polypeptide gerichtet sind, und sieht auch Diagnosemittel und Impfstoffe vor, die die zuvor genannten Stoffe als aktive Bestandteile enthalten oder anwenden.

AT 405 053 B

Die vorliegende Erfindung betrifft Polynucleotide, abgeleitet von der cDNA einer neuen Type des Hepatitis C Virus (KHCV), sowie zugehörige Vektoren und Wirtszellen, Polypeptide, die darin codiert sind und Antikörper, die gegen die Polypeptide gerichtet sind; und weiters Diagnosemittel und Impfstoffe, bei denen diese Stoffe nämlich die Polynucleotide, Polypeptide und Antikörper als aktive Bestandteile angewendet werden.

Im allgemeinen ist bekannt, daß virusinduzierte Hepatitis durch verschiedene Hepatitisviren einschließlich dem Hepatitis A Virus, Hepatitis B Virus und Hepatitis Delta Virus sowie Hepatitis E Virus, Cytomegalovirus und Epstein-Barr Virus verursacht werden kann. Die Genotypen der Viren werden seit 1980 entdeckt, wodurch die Entwicklung von Diagnosemitteln, Impfstoffen und therapeutischen Mitteln erleichtert wurde.

Weiters wurde entdeckt, daß ein neuer Hepatistyp, allgemein gennant non-A, non-B oder C Hepatitis für 80 bis 90% der Hepatitis verantwortlich ist, die durch Bluttransfusion verursacht wird (Lancet, 2, 838-841 (1975)). Solche Hepatitis nach Transfusionen führen häufig zu Zirrhose oder hepatozellularem Carzinom bis zu etwa 50%.

Die Zahl an Hepatitis C Virus (HCV) im Blut des Patienten ist üblicherweise sehr klein und die Identität oder Spezifität des Antigen- und Antikörpersystems in Verbindung mit HCV wird noch nicht völlig verstanden. Aus diesem Grund gibt es viele Schwierigkeiten bei der Entwicklung therapeutischer oder diagnostischer Agentien.

Demzufolge wurde dem Studium von HCV großes Augermerk zahlreicher Forscher zugewendet (siehe z.B. Alter, H. J. et al., Lancet, 459-463 (1978); Tabor, E. et al., Lancet, 463-466 (1978); Hollinger, F. B. et al., Intervirology, 10 60-68 (1978); Wyke, R. J. et al., Lancet, 520-524 (1979); Bradley, D. W. et al., J. Med. Virol., 9, 253-269 (1979)).

Bradley et al., wie in Gastroenterology 88, 773-779 (1985) beschrieben, konnte die biochemischen und biophysikalischen Merkmale von HCV folgendermaßen bestimmen: Infektion eines Schimpansen mit dem Serum eines Hepatitis C Patienten; die Abnahme von bestimmten Mengen eines Serums daraus; Extraktion von HCV aus dem Serum; und Analyse und Studium des HCV.

Danach wurden viele Studien mit den HCV Viren gemacht, die unter Anwendung der Bradley Methode isoliert worden waren, um Mittel für die Diagnose, zur Vorbeugung und zur Behandlung von Hepatitis C zu entwickeln.

Choo et al. klonte ein partielles cDNA Fragment von HCV, das aus dem Serum eines Schimpansen extrahiert worden war, der mit dem Serum eines Hepatitis C Patienten infiziert worden war. Er wies nach, daß das Protein, das durch Expression des cDNA Fragmentes in *E. coli* und Hefezellen hergestellt worden war, immunologisch reaktiv mit den Antikörpern war, die aus dem Serum des Hepatitis C Patienten gewonnen wurden (Science 244, 359-362 (1989)).

Kuo et al. offenbarte in Science 244, 362-364 (1989) daß C100-3 Protein, hergestellt durch Expression eines partiellen HCV cDNA Fragmentes, welches von Chiron Co. in dem USA identifiziert worden war, und mit Superoxid Dismutase (SOD) Gen in Hefe fusionierte, mit dem Serum des Hepatitis C Patienten immunoreaktiv war und mit 70% des Serums von jenen Patienten, die eine Hepatitis im Gefolge einer Transfusion hatten.

Weiters beschrieb Houghton et al. die Nützlichkeit von HCV Antigenen, insbesondere C100-3, die in HCV Genomsequenzen kodiert sind, die von einem Schimpansen isoliert worden waren, der mit Hepatitis C (im folgenden als "Amerikanische HCV" bezeichnet) infiziert worden war, für die Herstellung von Impfstoffen und diagnostischen Mitteln, die fähig sind, anti-HCV Antikörper zu entdecken (PCT WO 89/04669; WO 90/11089). Weiters wurde ein Diagnoseverfahren entwickelt, bei dem eine Enzym-Immunreaktion mit den genannten Antigenen i. e. C100-3 angewendet wurde.

Auf Basis der oben genannten Erfindung entwickelte und vertrieb Ortho Diagnostic Systems Inc., USA, Diagnoseagentien zum Aufspüren von Anti-HCV Antikörper im Jahre 1990. Allerdings reagiert dieses C100-3 Antigen als aktiver Bestandteil für die Diagnosemittel nur mit den Antikörpern von Patienten mit chronischer Hepatitis C, nicht aber mit jenen von Patienten mit akuter Hepatitis C, insbesondere während eines frühen Stadium der Krankheit. Weiters zeigte es oft falsche positive Resultate infolge Reaktion des fusionierten Proteins SOD (Shimizu Y. K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 6441 (1990)).

Andererseits wurden partielle HCV cDNA Klone hergestellt, in denen das gleiche Verfahren wie bei Houghton et al. angewendet wurde, wobei von HCV ausgegangen wurde, die von einem Serum herstammten, das von einem japanischen Hepatitis C Patienten gewonnen wurde, einschließlich 5' - Terminalabschnitt und strukturelle Gene, die das Kernprotein und das Hüllprotein kodieren. Die Nucleotidsequenz der cDNA Klone wurde bestimmt, wobei entdeckt wurde, daß die Sequenz um etwa 10 - 15% verschieden von jener der HCV der amerikanischen Type ist, wodurch die Existenz einer neuen Type HCV unter Beweis gestellt war, die als japanische Type bezeichnet wird (Kubo Y. et al., Nucl. Acid. Res., 17, 10367-10372 (1989); Kato, N. et al., Proc. Japan. Acad., 65, 219-223 (1990); Kaneko, S. et al., Lancet, 335 976 (1990); Takeuchi,

K. et al., Gene, 91, 287-291 (1990); Takamuzawa; A. et al., J. Virol., 65, 1105-1113 (1991)). Die Spezifität des Antigens, welches von HCV der japanischen Type zur Herstellung von Impfstoffen und diagnostischen Mitteln abgeleitet war, gegenüber dem HCV der japanischen Type wurde von Okamoto, H. et al. in Japan. J. Exp. Med., 60, 167-177 (1990) beschrieben.

5 Harada et al. berichtete weiters in J. Virol. 65, 3015 (1991), daß dann, wenn das Kernprotein, das im 5'-terminalen Abschnitt des strukturellen Gens kodiert ist, als Antigen verwendet wurde, um anti-HCV Antikörper zu diagnostizieren, die in Proben enthalten sein können, die von mutmaßlichen Patienten stammten, konnten die Antikörper 6 bis 8 Wochen früher entdeckt werden, als im Falle der Verwendung von C100-3 Protein, bezogen auf die Infektionszeit.

10 Lesniewski et al. veröffentlichte ein verbessertes Diagnoseverfahren unter Verwendung multipler Antigene, wobei dieses Verfahren sensitiver und spezifischer war als das Verfahren mit der Verwendung von C100-3 Antigenen allein. Wang beschrieb in der EP-Nr. 442394 (1991) ein anderes Diagnoseverfahren, wobei Polypeptide, die aus 15 - 65 Aminosäuren mit Epitop(en) bestanden, die aus 10 verschiedenen HCV Epitopen ausgewählt waren, als Antigene zur Entdeckung der anti-HCV Antikörper angewendet worden wa

15 Die genannten Offenbarungen zeigen, daß die Diagnose von HCV verbessert werden kann, indem eine Mischung aus Polypeptiden mit verschiedenen Epitopen angewendet wird, anstatt der Verwendung nur einer Art von Antigen.

Weiters sind Hüllproteine, die an der Oberfläche von Viren in Form von Glycoproteinen vorkommen, 20 oberflächlich behandelt worden, um als mögliches Mittel für die Entwicklung von Impfstoffen wie auch als Diagnosemittel zu dienen. Im Fall des Flavivirus, der sehr ähnlich zu HCV ist, ist es bekannt geworden, daß Hüllproteine und nicht strukturelle Proteine 1 (NS 1) eine wichtige Rolle bei der Induktion einer Immunreaktion einer Wirtzelle und beim Anbinden an die Rezeptoren der Wirtzelle spielen (F. Preugschart, J. Virol., 65, 4749-4758 (1991)). Zusätzlich wurde berichtet, daß die Bildung von Antikörpern gegen Hüllproteine eng mit der Heilung von Hepatitis C verbunden ist (Lesniewski, R. et al., p59, Watanabe et al., p82, The 3rd International HCV Symposium, Strasbourg, France (1991)).

Weiters schlug Houghton et al. die Möglichkeit vor, daß das Hüllprotein 2 (E2) ein wichtiges Antigen für die Herstellung von Hepatitis C Impfstoffen deswegen sein könnte, weil beim genannten E2 Protein angenommen wird, daß es eine nahe Verwandtschaft mit Immunoreaktionsmechanismen haben könne, da die endständige Aminoregion des E2 Proteins eine auffallende Heterogenität in der Spezies ausübt (The 30 3rd International HCV Symposium, p20, Strasbourg, France, 1991). Ein Vergleich der Nucleotidsequenzen zwischen dem HCV Genom der japanischen Type und des HCV Genoms der amerikanischen Type hat ergeben, daß diese kodierenden Hüllproteine eine Homologie von etwa 74% aufweisen, wohingegen die Nucleotidsequenzen, die die Kernproteine kodieren, eine Homologie von etwa 91% aufweisen (Takeuchi, K. et al., J. Gen. Vir., 71, 3027-3033 (1990)).

35 Wie oben gezeigt können HCVs, die in verschiedenen Ländern entdeckt wurden, Heterogenitäten in verschiedenen Bereichen ausüben. Und diese Heterogenität kann ein kritischer Faktor bei der Wirksamkeit von Impfstoffen und bei der Sensitivität und Genauigkeit von Diagnosemitteln

Daher betrifft die vorliegende Erfindung die Isolierung und Charakterisierung einer neuen HCV Type, die von koreanischen Hepatitis C Patienten (KHCV) isoliert wurden und die verschieden von den bereits 40 entdeckten HCVs sind einschließlich der amerikanischen und der japani

Spezieller werden demäß vorliegender Erfindung eine voll sequenzierte cDNA des KHCV und partiell sequenzierte cDNAs verschiedener HCV Varianten vorgesehen. Abschnitte der vom KHCV abgeleiteten cDNA Sequenzen sind als Sonden oder Primer nützlich, um die Gegenwart des Virus in verdächtigen Proben zu diagnostizieren. Diagnosekits und Verfahren unter Verwendung solcher Nucleotidsequenzen 45 bilden einen weiteren Aspekt der Erfindung.

Zusätzlich sieht die vorliegende Erfindung Polypeptide vor, die in der oben genannten cDNA kodiert sind und die als Reagenzien für Diagnosetests und/oder als Bestandteile von Impfstoffen nützlich sind.

Die genannten Polypeptide umfassen verschiedene Polypeptide, die KHCV Epitope umfassen einschließlich rekombinante Polypeptide wie z. B. fusionierte Polypeptide mit einem nicht-HCV Protein und 50 gereinigte Formen daraus.

Ein zusätzlicher Aspekt der Erfindung liegt in einem rekombinanten Expressionsvektor, der einen offenen Leseraster (ORF) der KHCV cDNA umfaßt, wobei der genannte ORF (open reading frame) wirksam mit einer Regulationssequenz verbunden ist, die mit einen gewünschten Wirtsorganismus verträglich ist und dieser Vektor kann umfassen: eine Nucleotidsequenz, die ein nicht-KHCV Protein kodiert, für die Herstellung eines fusionierten Polypeptides eines Polypeptides, welches von KHCV und anderen Typen des Proteins oder Polypeptides abgeleitet ist; eine Wirtszelle, die mit einem rekombinanten Expressionsvektor transformiert ist; und ein daraus hergestelltes Polypeptid.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung liegt im Verfahren zur Herstellung eines Polypeptides, das KHCV Epitope enthält und folgendes umfaßt: Kultivierung von Wirtszellen, die mit einem Expressionsvektor transformiert sind, der eine Sequenz enthält, der ein Polypeptid kodiert, welches ein KHCV Epitop enthält; und ein Polypeptid, welches ein dadurch erzeugte KHCV Epitop enthält.

5 Ein anderer Aspekt der Erfindung umfaßt einen monoklonalen Antikörper, der gegen ein KHCV Epitop gerichtet ist.

Noch ein zusätzlicher Aspekt der Erfindung betrifft eine Hybridoma-Zelle, die einen solchen monoklonalen Antikörper erzeugt.

10 Noch weitere Aspekt der Erfindung liegen in einem Diagnosemittel, das ein oder mehrere Polypeptide enthält, die ein oder mehrere KHCV Epitope als (eine) aktive Komponente(n) enthält, um anti-KHCV Antiboden in verdächtigen Proben zu entdecken; und einen Diagnosekit, der ein solches Mittel enthält.

Noch andere Aspekte der Erfindung liegen in einem Diagnosemittel mit ein oder mehreren monoklonalen gegen das KHCV Antigen gerichteten Antikörpern, als (eine) aktive Komponente(n), um HCV Antigene in verdächtigen Proben zu entdecken; und ein Diagnosekit, der solches Mittel enthält.

15 Weiters liegt ein Aspekt der Erfindung in einem Impfstoff für die Behandlung und/oder zur Vorbeugung vor HCV Infektion, der ein Polypeptid enthält, das ein KHCV Epitop aufweist, und eine inaktivierter oder attenuierte HCV umfaßt.

Die Erfindung kann durch Bezugnahme auf die beiliegenden Zeichnungen leichter verstanden werden:

Fig. 1 zeigt die relativen Stellungen der verschiedenen KHCV cDNA Klonen auf KHCV-LBC 1.  
20 Fig. 2-1 bis 2-16 zeigen die Nucleotidsequenzen von KHCV-LBC1 und die Aminosäuresequenzen der darin kodierten Polypeptide.

Fig. 3 zeigt für jeden cDNA Klon auf KHCV-LBC1 die Nucleotidstartzahl und die Nucleotidendzahl.

Fig. 4 zeigt die vergleichende Analyse der Nucleotidsequenzen von KHCV-LBC1 und von Genomen des HCV vom amerikanischen Typ und HCV vom

25 Fig. 5 zeigt die vergleichende Analyse der Aminosäuresequenzen kodiert durch die KHCV-LBC1, den HCV vom amerikanischen Typ und HCV vom japanischen Typ.

Fig. 6 zeigt die vergleichende Analyse der Nucleotidsequenzen der 5'-terminalen Region des KHCV-LBC1 und Genome der HCV vom amerikanischen Typ und HCV vom japanischen Typ.

30 Fig. 7 zeigt die Nucleotidsequenz der cDNA Fragmente NS2-LBC2 und die Aminosäuresequenzen der dadurch kodierten Polypeptide.

Fig. 8 zeigt die Nucleotidsequenz der cDNA Fragmente NS2-LBC3 und die Aminosäuresequenzen der Polypeptide, die darin kodiert sind.

Fig. 9 zeigt die Nucleotidsequenz des cDNA Fragmentes NS2-LBC20 und die Aminosäuresequenzen des darin kodierten Polypeptides.

35 Fig. 10 zeigt die Nucleotidsequenz des cDNA Fragmentes NS2-LBC21 und die dadurch kodierten Aminosäuresequenzen des Polypeptides.

Fig. 11 zeigt die Nucleotidsequenz des cDNA Fragmentes NS2-LBC23 und die dadurch kodierten Aminosäuresequenzen des Polypeptides.

40 Fig. 12 zeigt die Nucleotidsequenz des cDNA Fragmentes NS2-LBC25 und die dadurch kodierten Aminosäuresequenzen des Polypeptides.

Fig. 13 zeigt die Nucleotidsequenz des cDNA Fragmentes NS2-LBC26 und die dadurch kodierten Aminosäuresequenzen des Polypeptides.

Fig. 14 zeigt die Nucleotidsequenz des cDNA Fragmentes NS2-LBC27 und die dadurch kodierten Aminosäuresequenzen des Polypeptides.

45 Fig. 15 zeigt die Nucleotidsequenz des cDNA Fragmentes NS2-LBC28 und die dadurch kodierten Aminosäuresequenzen des Polypeptides.

Fig. 16 zeigt die Nucleotidsequenz des cDNA Fragmentes NS2-LBC29 und die dadurch kodierten Aminosäuresequenzen des Polypeptides.

50 Fig. 17 zeigt die Nucleotidsequenz des cDNA Fragmentes NS2-LBC30 und die dadurch kodierten Aminosäuresequenzen des Polypeptides.

Fig. 18 zeigt die Nucleotidsequenz des cDNA Fragmentes NS2-LBC31 und die dadurch kodierten Aminosäuresequenzen des Polypeptides.

Fig. 19 zeigt die Nucleotidsequenz des cDNA Fragmentes NS2-LBC32 und die dadurch kodierten Aminosäuresequenzen des Polypeptides.

55 Fig. 20 zeigt die Nucleotidsequenz des cDNA Fragmentes NS5-LBC20 und die dadurch kodierten Aminosäuresequenzen des Polypeptides.

Fig. 21 zeigt die Nucleotidsequenz des cDNA Fragmentes NS5-LBC21 und die dadurch kodierten Aminosäuresequenzen des Polypeptides.

- Fig. 22 zeigt die Nucleotidsequenz des cDNA Fragmentes NS5-LBC23 und die dadurch kodierten Aminosäurensequenzen des Polypeptides.
- Fig. 23 zeigt die Nucleotidsequenz des cDNA Fragmentes NS5-LBC25 und die dadurch kodierten Aminosäurensequenzen des Polypeptides.
- 5 Fig. 24 zeigt die Nucleotidsequenz des cDNA Fragmentes NS5-LBC27 und die dadurch kodierten Aminosäurensequenzen des Polypeptides.
- Fig. 25 zeigt die Nucleotidsequenz des cDNA Fragmentes NS5-LBC28 und die dadurch kodierten Aminosäurensequenzen des Polypeptides.
- 10 Fig. 26 zeigt die vergleichende Analyse der Aminosäurensequenzen von Polypeptiden, die in der NS2 Region der cDNA von KHCV Varianten kodiert sind, die von den Subtypen KHCV-L1 oder KHCV-L2 umfaßt sind.
- Fig. 27 zeigt die vergleichende Analyse der Nucleotidsequenzen der NS2 Region der cDNA von KHCV Varianten, die in der Subtype KHCV-L1 enthalten sind.
- 15 Fig. 28 zeigt die verleichende Analyse der Nucleotidsequenzen der NS2 Region der cDNA von KHCV Varianten, die in der Subtype KHCV-L2 enthalten sind.
- Fig. 29 zeigt die vergleichende Studie der Nucleotidsequenzen der NS5 Region der cDNA von KHCV Varianten, die in der Subtype KHCV-L1 bzw. KHCV-L2 enthalten sind.
- 20 Fig. 30 zeigt einen Expressionvektor, der für den Zweck der Expression eines KHCV cDNA Fragmentes in Hefezellen gebildet wurde.
- Fig. 31 A zeigt das Resultat der SDS Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) nach der Expression eines KHCV cDNA Fragmentes in Hefezellen und Fig. 31 B zeigt das Resultat der Western Blotting Analyse mit dem Gel der Fig. 31 A.
- Fig. 32 zeigt die Ergebnisse der SDS-PAGE (Fig. 31 A) und der Western Blotting Analyse (Fig. 31B), wobei die Erzeugung der KHCV E2N und E2C Polypeptide in Hefezellen vorgenommen wurde.
- 25 Fig. 33 zeigt die Nucleotidsequenz eines chemisch synthetisierten ubiquitin Genes.
- Fig. 34 zeigt den Expressionsvektor, der einen Trp Promotor für die Expression eines KHCV cDNA Fragmentes in *E. coli* Zellen aufweist.
- Fig. 35 zeigt den Expressionsvektor, der den Tac Promotor für die Expression eines KHCV cDNA Fragmentes in *E. coli* Zellen aufweist.
- 30 Die Fig. 36 bis 38 zeigen die Resultate von SDS-PAGE nach der Expression eines KHCV cDNA Fragmentes in *E. coli* Zellen.
- Die Fig. 39 bis 41 zeigen die Resultate der Western Blotting Analysen mit den Gelen der Fig. 36 bis 38.
- Fig. 42 zeigt das Resultat der SDS-PAGE nach der Expression eines KHCV cDNA Fragmentes, welches mit einem MBP Gen unter Steuerung durch den Tac Promotor in *E. coli* Zellen fusioniert wurde.
- 35 Fig. 43 zeigt das Resultat der Western Blotting Analyse mit dem Gel gemäß Fig. 42.
- Fig. 44 zeigt Standardkurven für eine Enzymimmunoprobe (EIA), variiert mit der Konzentration des (der) KHCV Antingen(s), verwendet für das Aufspüren der anti-HCV Antikörper in den Proben, und
- Fig. 45 zeigt eine Standardkurve für EIA mit monoklonalen Antikörpern als Funktion der Konzentration von KHCV Antigen in den Proben.
- 40 Alle hier angeführten Referenzen gehören in ihrer Gesamtheit zur Offenbarung.
- Die nachstehenden Ausdrücke haben hier folgende Bedeutungen:
- Der Ausdruck "Hepatitis C Virus" bezeichnet einen Virus, der eine nicht-A, nicht-B Hepatitis oder C Hepatitis verursacht. Die Ausdrücke HCV und NANBV und die Ausdrücke NANB Hepatitis (NANBH) und Hepatitis C werden hier austauschbar verwendet.
- 45 Der Ausdruck "Hepatitis C Virus vom koreanischen Typ" oder "KHCV" bezieht sich auf eine neue Type des HCV, die von koreanischen Hepatitis C Patienten isoliert wurde und deren cDNA ein offenes Leseraster einer Nucleotidsequenz aufweist, die die Aminosäuresequenz kodiert, wobei die Aminosäuren mit den Nummern 842, 849 und 853 Phenylalanin, Leucin und Threonin bedeuten, oder jeweils Leucin, Phenylalanin und Alanin.
- 50 Der Ausdruck "Epitop" bedeutet einen antigenen Determinanten eines Polypeptides, der fähig ist, eine Immunantwort in einem immunologisch kompetenten Wirtsorganismus hervorzurufen und/oder befähigt ist, sich selbst an einen komplementären Antikörper zu binden. Ein Epitop der vorliegenden Erfindung besteht generell aus wenigstens 6 Aminosäuren, bevorzugt aus 7 oder 8 Aminosäuren.
- Der Ausdruck "Fragment" bedeutet ein Polynucleotid oder Polypeptid, welches eine Subsequenz einer 55 der cDNAs oder Proteine gemäß Erfundung umfaßt. Solche Fragmente können durch enzymatische Spaltung größerer Moleküle hergestellt werden, wo Restriktionsendonukleasen für die DNA und Proteasen für die Proteine verwendet werden. Die erfundungsgemäßen Fragmente sind jedoch nicht auf Produkte beschränkt, die von irgendeiner besonderen Form der enzymatischen Spaltung herstammen und können

Subsequenzen umfassen, deren Termini nicht irgendeinem enzymatischen Spaltungspunkt entsprechen. Solche Fragmente können z. B. durch chemische Synthesen unter Verwendung der hier vorgelegten Sequenzdaten hergestellt werden. Proteinfragmente können auch durch die Expression von DNA Fragmenten hergestellt werden, die die Proteinfragmente kodieren. Solche Proteinfragmente können bei der vorliegenden Erfindung nützlich sein, wenn sie eine genügende Anzahl an Aminosäureresten enthalten, um eine immunoreaktive und/oder antingene Determinante bilden.

Der Ausdruck "Offenes Leseraster" (open reading frame) bezieht sich auf eine Region einer Polynucleotidsequenz, in der aufeinanderfolgende NucleotidTriplets als Kodons gelesen werden können, die Aminosäure zur Kodierung eines Polypeptides spezifizieren.

10 Der Ausdruck "Expressionsvektor" bezeichnet ein Hilfsmittel zum Klo-nen, das dazu bestimmt ist, die Expression von Polynucleotidinserts zu fördern.

Der Ausdruck "Regulatorsequenz" bedeutet eine DNA Sequenz, die damit befaßt ist, die Expression einer Polynucleotidsequenz zu steuern und umfaßt beispielsweise den Promotor, den ribosomalen Bindungsplatz und den Terminator.

15 Der Ausdruck "rekombinantes KHCV Polypeptid" bezeichnet ein Polypeptid, welches zumindest eine Sequenz aus 6 Aminosäuren enthält die in KHCV cDNAs der Fig. 2-1 bis 2-16 und den Fig. 7 bis 25 kodiert sind, und ist an (eine) Aminosäure(n) gebunden, die verschieden von jenen ist (sind), die mit den Polypeptiden verbunden sind, die in den KHCV cDNAs kodiert sind.

Der Ausdruck "gereinigtes KHCV Polypeptid" bezeichnet ein KHCV Polypeptid oder ein Fragment davon, welches im wesentlichen rein und homogen ist und von zellulären Komponenten getrennt ist, die von Natur aus vorhanden sind. Generell umfaßt ein gereinigtes KHCV Polypeptide über etwa 70 bis 90% Polypeptide und insbesondere wenigstens 95% Polypeptide.

Die anderen hier verwendeten Ausdrücke sind in der üblichen und konventionellen Bedeutung gemäß Stand der Technik verwendet.

25 Im folgenden wird die vorliegende Erfindung spezieller ausgeführt.

#### Klonierung von KHCV cDNA

Eine KHCV cDNA Bibliothek wird wie folgt hergestellt:

30 HCV Partikel werden aus Seren koreanischer Hepatitis C Patienten durch deren Abscheidung mittels einer Ultrazentrifuge isoliert. Die HCV RNA wird von den HCV Partikeln extrahiert. Von der HCV RNA werden doppelsträngige cDNAs mit einem Random Primer oder Oligo d(T) Primer und umgekehrter Transcriptase synthetisiert. Die cDNA Fragmente werden entweder nach Vermehrung durch Anwendung von PCR oder direkt an einem UNI-ZAPXR Vektor kloniert (Stratagene Co. 11099 N. Torrey, Pines Road., 35 CA, USA), nachdem daran ein Eco RI Adaptor angehängt worden war, und der Vektor wird in Viruspartikeln eingeführt, um eine cDNA Bibliothek herzustellen (Saiki, P. K. et al., Science, 230, 1350 (1985)).

Generell können Hepatitis Viruspartikel aus dem Serum oder der Leber von Patienten oder von Schimpansen isoliert werden, die mit Hepatitis infiziert sind. Bei der vorliegenden Erfindung werden die HCV Partikel aus Seren von Hepatitis C Patienten isoliert, und die gesamte RNA des HCV wird von den HCV Partikeln extrahiert, die mittels Ultrazentrifugation abgeschieden wurden, gefolgt von einer Phenolextraktion und einer Ethanolfällung.

Danach wird die gesamte RNA des HCV als Matrize für die Herstellung von cDNA in der Reaktion verwendet, bei der ein Zap-cDNA Synthese Kit verwendet wird (Cat. No. 200400, Strategene Co., 11099 N. Torrey Pines Rd., La Jolla, CA 92037, USA).

45 Diese cDNA wird durch Reaktion von Reverser Transcriptase unter Verwendung der gesamten RNA und eines Random Primer RANPSHCV oder eines Oligo d(T) Primer synthetisiert, wobei der Primer RANPSHCV (5'-TTTTTCATGATTGGTGGAACTGGACOGTCTOGAGNNNN-3'; N bezeichnet A, G, T oder C) und der Oligo d(T) Primer (5-GAGAGAGAGAGAGAGAGAACTAGTCTOGAG(T)18-3') 6 Random Nucleotide (Primer RANPSHCV) oder 18 T (Oligo d(T) Primer) in jeder 3'-Endregion und einen Erkennungs-ort der Restrictionsendonuclease Xho I umfassen.

Für die Einführung eines Erkennungsortes des Eco RI (5'-GAATTC-3') in die synthetisierte cDNA zum Zwecke der Klonierung wird ein Eco RI Adaptor (5'-CCCCCGAATTCGGCACGAG-3')  
(3'-GGGGGGCTTAAGCCGTGCTC-5')

55 an die synthetisierten cDNA Fragmente angelagert. Und danach werden die cDNA Fragmente mittels PCR mit dem Primer PSHCV (5'-TTTTTCATGATTGGTGGTGG-3') und den Rco RI Primer (dem oberen Strang des Eco RI Adaptors) vermehrt. Die cDNA Fragmente werden partiell mittels Restrictionsendonucleasen Eco RI und Xho I abgebaut. Die abgebauten cDNA wird an einen UNI-ZAPXR Vektor gehängt, einer Variante des

Lambda gt 11, abgebaut mit Eco RI und Xho I, und die sich ergebende DNA wird in Vitro intro in Teilchen des Lambda Phagen mit einem Gigapack II Gold Packaging Kit (Cat. No. 200214, Stratagene Co., USA) eingeführt, gefolgt von einer Verstärkung mittels Infektion der Partikel in E. coli Zellen, um die cDNA Bibliothek herzustellen.

5 Die cDNA Bibliothek ist auf den E. coli Zellen aufgelagert, um Phagenuflagen zu bilden, die dann mittels einer immunologischen Methode, wie von Huynh (DNA Kloning: A Practical Approach, Vol. 1, pp.49-78, IRL Press, UK (1985)) beschrieben, durchsucht werden, um die klonierten Phagen auszuwählen, die mit dem Antikörper in dem Serum der Hepatitis C Patienten zu reagieren und von denen man annimmt, daß sie von der KHCV cDNA abgeleitete Polypeptide erzeugen können.

10 Andererseits kann der UNI-ZAPXR Vektor in E. coli ausgeführt werden, um ein Phagemid pBluescript herzustellen, das KHCV cDNA Fragmente enthält (Short et al., Nucl. Acid. Res., 16, 7583-7600 (1988)) welches leichter zu behandeln ist, als ein normales Plasmid. Weiters kann pBluescript wahlweise entweder als Einzelstrang oder als Doppelstrang erhalten werden, da es entweder von einer f1 Replikation oder aber von Col E1 abstammen kann.

15 Dollepstrang pBluescript DNA, isoliert von E. coli, infiziert mit positiver Plaque, wird mittels Restriktionsendonucleaseen Eco RI und Xho I aufgespalten, um die Existenz und die Länge des KHCV cDNA Fragmentes, das zwischen den Eco RI und dem Xho I Erkennungsorten eingesetzt ist, mittels Gelelektrophorese zu bestätigen. Die Nucleotidsequenz des cDNA Fragmentes wird unter Anwendung der Sanger's Methode bestimmt (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463 (1977)).

20 Danach werden neue Oligonucleotidproben auf Basis der bestimmten Nucleotidsequenz des cDNA Klons synthetisiert, um die cDNA Bibliothek zu durchsuchen, um die verbleibende Region einer vollen KHCV cDNA zu erhalten. Daraufhin werden die neuen so erhaltenen cDNA Klone wieder zum Durchsuchen verwendet, um weiters KHCV cDNA zu erhalten. Es kann auch mittels PCR ein Teil KHCV cDNA erhalten werden, indem die Primers verwendet werden, die auf Basis der vorher bestimmten Nucleotidsequenzen der KHCV cDNA synthetisiert werden.

25 Die Überlappendenden cDNA Fragmente Können verbunden werden, um die volle Sequenz der KHCV cDNA zu bestimmen, und ein offenes Leseraster ist daraus abzuleiten.

Eine KHCV cDNA, die die so erhaltene volle cDNA Sequenz besitzt, wird als KHCV-LBC1 bezeichnet, der bei der American Type Culture Collection (ATCC) am 14. Mai 1991 mit der Zugriffsnummer ATCC

30 75008 unter den Bestimmungen des Budapest Vertrages über die Internationale Anerkennung der Hinterlegung von Mikroorganismen für die Zwecke von Patentverfahren hinterlegt worden war.

Die volle Nucleotidsequenz des KHCV-LBC1 und die Aminosäuresequenz, die darin kodiert ist, sind in den Figuren 2-1 bis 2-11 dargestellt. Die Position jedes cDNA Klons auf der KHCV-LBC1 Sequenz ist in den Fig. 1 und 3 geoffenbart. Der KHCV-LBC1 besitzt einen langen offenen Leseraster, der aus 9030

35 Nucleotiden besteht und vom 343igten Nucleotid (A) bis zum 9372igten Nucleotid (G) reicht, gezählt vom 5'-Ende.

Die Identifikationsnummer einer gegebenen Aminosäure wird im folgenden in Abhängigkeit von der Position der Aminosäure in dem Polypeptid zugeordnet, das durch die obigen 9030 Nucleotide, in Richtung vom 5'-zum 3'-Ende kodiert ist.

40 In der 5'-Endregion des KHCV-LBC1, welches nach der vorliegenden Erfindung hergestellt ist, existieren 13 Nucleotide mehr als beim HCV vom japanischen Typ (Kato, N. etla., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 95224 (1990)). Wie in Fig. 6 beschrieben, wurde im Vergleich zum HCV vom amerikanischen Typ ein Nucleotid mehr entdeckt und 3 Nucleotide unter den 22 Nucleotiden, die eine Haarnadelstruktur der 5'-Endregion bilden, wurden als verschieden gefunden. Die 5'- Endregion spielt generell eine wichtige Rolle 45 bei der Expression eines viralen Gens und dessen Regulierung. Eine Haarnadelstruktur, die aus 22 Nucleotiden besteht, wird für einen Erkennungsort für Replikase und Kernprotein gehalten. Daher kann sogar eine kleine strukturelle Differenz in dieser Region signifikante und beträchtliche Unterschiede in seiner Rolle oder Spezifität hervorrufen.

50 Gleicherweise werden die volle Nucleotidsequenz des KHCV-LBC1 und der darin kodierten Aminosäuresequenz verglichen mit jenen der HCV vom amerikanischen Typ und der HCV vom japanischen Typ mit folgendem Resultat: Im Fall des amerikanischen Types ist die Nucleotidsequenz des KHCV-LBC1 homolog bis zu einem Niveau von etwa 78,3% und die darin kodierte Aminosäuresequenz weist eine Homologie von etwa 84,2% auf. Im Fall des japanischen Types besitzt die Nucleotidsequenz eine Homologie von 90,9% und die Aminosäuresequenz eine von 93% (siehe Fig. 4 bis 6). Die obigen Resultate zeigen deutlich, daß 55 die KHCV-LBC1 eine cDNA eines neuen Typs von HCV ist, die deutlich unterschiedlich von den bereits identifizierten HCVs ist.

Herstellung von partiellen cDNA Fragmenten von KHCV Varianten

KHCV RNA wird von dem genannten KHCV extrahiert, der von Seren von Hepatitis C Patienten jeweils isoliert wurde. Und mittels PCR wird von jeder KHCV RNA die cDNA synthetisiert, um cDNA Fragmente entsprechend der NS2 Region oder NS5 Region zu erhalten. Die Länge jedes so erhaltenen cDNA Fragmentes liegt bei 340 bp bei NS2 und 320 bp bei NS5.

Die cDNA Fragmente werden in M13mp18 und M13mp19 eingeführt (New England Biolabs, 32 Tozer Road Beverly, MA 01915-5599, USA) um ihre Nucleotidsequenzen zu bestimmen (siehe Fig. 7 bis 25).

Die Nucleotidsequenzen der NS2 Region weisen eine Homologie von 91 bis 94% auf (siehe Fig. 27 und 28). Die NS5 Region Zeigt eine Homologie von 96 bis 99% (Fig. 29) während die in den NS2 und NS5 Regionen kodierten Aminosäurensequenzen jeweils eine Homologie von 90 bis 94% bzw. 93 bis 99% aufweisen (siehe Fig. 26).

Überdies wurde auch entdeckt, daß die KHCVs in zwei Subtypen, nämlich KHCV-L1 und KHCV-L2 unterteilt werden können, abhängig von den Aminosäuren mit den jeweiligen Nummern 842, 849 und 853, die in der NS2 Region kodiert sind. Die cDNAs der KHCV, die im KHCV-L1 enthalten sind, kodieren Phenylalanin, Leucin und Threonin als Aminosäuren mit ihren jeweiligen Identifikationsnummern 842, 849 und 853. Die von KHCV-L2 umfaßten cDNAs kodieren hingegen Leucin, Phenylalanin und Alanin. Als Subtype KHCV-L1 sind umfaßt: KHCV-LBC1, KHCV-LBC20, KHCV-LBC23, KHCV-LBC26 und KHCV-LBC32. Demgegenüber umfaßt die Subtype KHCV-L2: KHCV-LBC2, KHCV-LBC3, KHCV-LBC21, KHCV-LBC25, KHCV-LBC27, KHCV-LBC28, KHCV-LBC29, KHCV-LBC30 und KHCV-LBC31.

Es ist zu bemerken, daß die obigen Merkmale im Fall des HCV vom amerikanischen Typ nicht gefunden werden können, bei dem die Aminosäuren Cystein, Phenylalamin und Valin sind. Andererseits hat der japanische Typ die gleichen Merkmale wie KHCV-L2, d. h. nämlich die Aminosäuren in den obigen Positionen sind Leucin, Phenylalanin und Alanin.

Die M13 Phagengruppe (M13mp18-NS2L1), die die M13mp18 Phage enthält, und jede der cDNAs umfaßt, die in KHCV-L1 enthaltend ist, ausgenommen KHCV-LBC1, nämlich KHCV-LBC20, KHCV-LBC23, KHCV-LBC26 und KHCV-LBC32, wurde bei der American Type Culture Collection am 13. März 1992 unter der Zugriffssnummer ATCC 75211 hinterlegt und die M13 Phagengruppe (M13mp18-NS2L2), die M13mp Phagen enthält, welch jeweils cDNAs umfassen, die in KHCV-L2 enthalten sind, nämlich KHCV-LBC2, KHCV-LBC3, KHCV-LBC21, KHCV-LBC25, KHCV-LBC27, KHCV-LBC28, KHCV-LBC29, KHCV-LBC30 und KHCV-LBC31 wurden bei der ATCC am gleichen Tag unter der Zugriffssnummer ATCC 75212 hinterlegt.

Die erfindungsgemäßen cDNAs können zusätzlich zu den in den obigen Beispielen genannten Methoden chemisch synthetisiert werden, wobei die Nucleotidsequenz Informationen demäß den Fig. 2-1 bis 2-16 und den Fig. 7 bis 25 verwendet werden. Solche chemischen Synthesen können mittels bekannter Verfahren durchgeführt werden wie die Phosphoamidite Solin Support Methode von Matteucci et al. (J. Am. Chem. Soc., 103, 3185 (1981)).

Weiters ist zu beachten, daß infolge der Entartung des genetischen Codes viele potentielle Nucleotidsequenzen existieren, die für die in den Fig. 2-1 bis 2-16 und den Fig. 7 bis 25 gezeigten Aminosäuresequenz kodieren können.

Aufbau eines Expressionsvektors und Herstellung des Proteins damit

Verschiedene Expressionssysteme können verwendet werden, um einen Expressionsvektor herzustellen, der ein KHCV cDNA Fragment gemäß vorliegender Erfindung enthält, einschließlich einen Vektor, der fähig ist, die Produktion eines fusionierten Proteins mit anderen Polypeptiden zu steuern, als das eine, welches vom KHCV stammt.

Zum Beispiel kann ein solches Vektorsystem durch Anwendung eines ubiquitinären Expressionssystems ausgebildet werden. In Hefe kann Ubiquitin mittels Ubiquitinase am exakten Sitz unmittelbar neben Arg-Gly-Gly herausgeschnitten werden (Ozkaynak et al., Nature, 312, 663-666 (1987)). Bachmair berichtete in Science, 234, 178-186 (1986), daß ein mit Ubiquitin fusioniertes fremdes Protein ebenfalls am Ort neben ArgGly-Gly des Ubiquitins herausgeschnitten werden kann.

Demgemäß kann ein gewünschtes KHCV Protein erhalten werden, indem ein fusioniertes Polynukleotid eines KHCV cDNA Fragmentes und ein ubiquitinäres Gen in Hefe exprimiert wird, da dann das fusionierte Protein herausgeschnitten werden, um das Ubiquitin mittels Ubiquitinase einer Hefezelle zu entfernen, sodaß als Resultat das KHCV Protein alleine übrigbleibt.

Weiters würde das fusionierte Protein, welches Ubiquitin enthält, erhalten werden, wenn das fusionierte Polynukleotid, welches ein KHCV cDNA Fragment und ein Ubiquitin-Gen enthält, in E. coli exprimiert wird. Jedoch kann das Ubiquitin in vitro mittels Ubiquitinase herausgeschnitten werden und das, von Ubiquitinase

freie KHCV Protein kann erhalten werden. Das fusionierte Protein per se kann natürlich für den erfindungsgemäßen Zweck verwendet werden. Und dies gilt auch für das KHCV Protein per se, so lange es die notwendigen Merkmale des KHCV Proteins behält, nämlich die Antigenizität des KHCV.

Das obige Expressionssystem kann wirksam angewendet werden, wo das gewünschte Protein unstabil ist und leicht mittels Protease in einer Wirtszelle abgebaut werden kann, da das Ubiquitin das gewünschte Protein gegenüber dem Proteaseangriff schützen oder es stabilisieren kann.

Ein Expressionsvektor, der das Ubiquitinsystem verwendet, kann durch Einführung eines KHCV cDNA Fragmentes in einen Expressionsvector hergestellt werden, der ein Ubiquitin-Gen enthält. Andererseits kann ein fusionierter Expressionsvektor, der ein Malto-

sebindungsprotein (MBP) system als erfindungsgemäßer Expressionsvektor verwendet werden. In diesem System wird das KHCV cDNA Fragment nach dem Mal E1 Gen angehängt, das MBP kodiert. Dadurch wird das fusionierte Protein von MBP und KHCV Protein hergestellt (Guam et al., Gene, 67, 21-30 (1987); Maina et al., Gene 74, 369-373 (1988); Amann et al., Gene 40, 183-190 (1985); Duplay et al., J. Biol. Chem., 259, 10606-10613 (1984)).

Das obige MBP Expressionssystem ist deshalb geeignet, da das fusionierte Protein, welches MBP enthält, leicht unter Ausnutzung der Affinität des MBP zu Maltose gereinigt werden kann. Weiters hat MBP einen herausschneidbaren Sitz durch den Protease faktor Xa in der C-terminalen Region, wodurch das KHCV Protein von dem MBP befreit werden kann.

Um ein gewünschtes KHCV Protein zu erhalten wird eine kompatible Wirtszelle mit einem Expressionsvektor transformiert, der ein KHCV cDNA Fragment enthält. Die transformierte Zelle wird unter Bedingungen, die die Expression erlauben, kultiviert.

Ein zu exprimierendes KHCV cDNA Fragment kann durch Anwendung einer Restriktionsendonuclease oder einer Nuclease mit einem größeren Fragment oder KHCV-LBC1, und durch Ausführung von PCR mit Primern und KHCV-LBC1 oder deren Fragmente als Matrize hergestellt werden. Die Länge und die Nucleotidsequenz jedes Primers kann nach der Stellung und Länge des KHCV cDNA Fragmentes, das exprimiert werden soll, bestimmt werden. Der Primer kann komplett oder partiell komplementär zu jedem Strang der doppelstrangigen KHCV cDNA sein.

Sobald es hergestellt und isoliert ist, wird das KHCV cDNA Fragment gemäß Erfindung in ein entsprechendes Expressionswerkzeug eingefügt, welches die notwendigen Elemente zur Transkription und Translation der eingefügten Gensequenzen aufweist. Nützliche Klonierungswerkzeuge können aus Segmenten anderer nicht-KHCV Polynukleotide bestehen, einschließlich synthetischer DNA Sequenzen wie z. B. verschiedene bekannte bakterielle Plasmide, Phagen DNA, Kombinationen von Plasmiden, die zur Verwendung von Phagen DNA modifiziert wurden, oder andere Expressionskontrollsequenzen oder Hefeplasmide.

Die Auswahl eines geeigneten Wirtsorganismus wird von einer Anzahl von Faktoren bestimmt, wie es Stand der Technik ist. Diese Faktoren umfassen beispielsweise Kompatibilität mit dem gewählten Vektor, Toxizität des Proteins, welches vom rekombinanten Plasmid Kodiert wird, leichte Gewinnung des gewünschten Proteins, Proteinmerkmale, biologische Sicherheit und Kosten. Es muß eine Ausgewogenheit dieser Faktoren bedacht werden und man muß verstehen, daß nicht alle Werte gleich wirksam in der Expression eines bestimmten rekombinanten DNA Moleküles sind.

Passende Wirtsorganismen, die gemäß vorliegender Erfindung verwendet werden, können ohne eine Einschränkung zu geben, beispielsweise Pflanzen-, Säugetier- und Insektenzellen oder Hefezellen und Bakterien wie z. B. Escherichia coli umfassen.

Die von der KHCV cDNA abgeleiteten Polypeptide umfassen alle Kernproteine, nicht strukturelle Proteine und Hüllproteine und einen Abschnitt davon, der für die Herstellung diagnostischer Mittel oder von Impfstoffen in Form von Mischungen daraus oder alleine verwendet werden könnte. Die in einer Wirtszelle hergestellten Polypeptide können durch kombinierte Verwendung herkömmlicher Methoden isoliert und gereinigt werden, z. B. durch Zellauflösung, Zentrifugation, Dialyse, Aussalzen, Chromatographie, Gelfiltration, Elektrophorese und Elektroelution.

Die erfindungsgemäßen Polypeptide können auch aus KHCV Partikeln isoliert oder chemisch synthetisiert werden, wobei entsprechende Methoden Angewandt werden wie z. B. exklusive Solid Phase Synthese, partielle Solid Phase Methode, Fragmentkondensation oder klassische Lösungssynthese. Solid Phase Synthesen werden bevorzugt, wie von Merrifield (j. Am. Chem. Soc., 85, 2149 (1963)) beschrieben.

Andererseits können Aminosäuresubstitutionen in Proteinen auftreten, die die biologischen und immunologischen Aktivitäten nicht stark verändern, und z. B. beschrieben wurden von Neurath et al., in "The Proteins", Academic Press, New York (1979), insbesondere gemäß Fig. 6 auf Seite 14. Die am häufigsten beobachteten Aminosäuresubstitutionen sind Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly, und umgekehrt.

Solche funktionell äquivalenten Aminosäuresubstitutionen der beispielsweise Ausführungen dieser Erfindung liegen innerhalb des Bereiches der Erfindung, solange die resultierenden Proteine ein oder mehrere antigene Determinanten der KHCV behalten.

In dieser Beschreibung werden standartgemäße Einzelbuchstaben- oder Dreibuchstaben-Abkürzungen verwendet, um Nucleotide und Aminosäuren zu bezeichnen. Die Bedeutungen dieser Abkürzungen können in den standardgemäßen Biochemiebüchern gefunden werden wie z. B. Lehninger, Principles of Biochemistry, Worth Publishers Inc., New York, pp 96, 798 (1984).

10 In vitro Diagnoseverfahren für Hepatitis C unter Verwendung von KHCV Antigenpolypeptiden für die Bestimmung von KHCV Antikörpern

Die vorliegende Erfindung betrifft auch ein Diagnoseverfahren, bei dem ein Diagnosemittel mit Gehalt an KHCV Polypeptiden mit einem oder mehreren KHCV Epitopen Verwendung finden. Das Diagnoseverfahren unter Verwendung von KHCV Polypeptid(en) ist spezifisch und genau für das Bestimmen von KHCV Antikörpern im Serum von Hepatitis C Patienten verglichen mit irgendeiner der existierenden Methoden.

Das neue Diagnoseverfahren umfaßt die folgenden Schritte:

Zuerst wird ein Diagnosemittel mit Gehalt an einem oder mehreren KHCV Polypeptiden auf einen festen Träger gegeben z. B. in die Öffnung (well) einer Microtiterplatte, sodaß dieses KHCV Antigen von der Oberfläche der Öffnung adsorbiert wird.

20 Zweitens wird eine verdächtige Probe, die mit einem Verdünnungsmittel verdünnt wurde, in die mit Antigen bedeckte Öffnung gegeben, wo der Antigen-Antikörperkomplex gebildet wird, wenn anti-KHCV Antikörper im Serum vorliegen.

Drittens, ein Enzym wie z. B. HRP (horseradish peroxidase) konjugiertes anti-human-IgG wird der Öffnung zugegeben, sodaß das anti-human IgG-HRP die Antikörper des gemäß Stufe zwei gebildeten Komplexes binden kann und

Schließlich werden Substrate für das Enzym z. B. O-Phenyldiamindihydrochloräure (OPD) und Wasserstoffperoxyd zur Peroxydase der Öffnung zugegeben, um eine Farbreaktion hervorzurufen. Wenn das verdächtige Serum anti-KHCV Antikörper enthält, entsteht als Resultat der Reaktion des Enzyms mit den Substraten eine Farbe. Die Farbreaktion wird durch Zugabe verdünnter schwefeliger Säure gestoppt.

30 Die Farbintensität kann mit einem Mikroöffnungslesegerät (microwell reader) gemessen werden. Die Existenz von anti-HCV Antikörpern kann auf Basis des Ergebnisses bestimmt werden. Der feste Träger für diese Diagnosemethode kann ein Polystyrolband oder ein Nitrozellulosestreifen sein.

Weiters sieht die vorliegende Erfindung einen Hepatitis C Diagnosekit vor, der die notwendigen Mittel enthält, um das obige Verfahren auszuführen, und im wesentlichen aus einem Diagnosemittel besteht, das die KHCV Polypeptide(e) enthält, die ein oder mehrere KHCV Epitope tragen.

Herstellung der Antikörper

Die vorliegende Erfindung sieht Antikörper vor, die gegen Polypeptid(e) gerichtet sind, die von der KHCV cDNA abgeleitet sind. Kurz gesagt werden geeignete Tiere ausgewählt und es wird dem gewünschten Immunisierungsprotokoll gefolgt. Nach einer entsprechenden Zeitperiode munisierungsprotokoll gefolgt. Nach einer entsprechenden Zeitperiode wurde die Milz dieser Tiere herausgenommen und einzelne Milzzellen wurden typischerweise mit Myelomezellen unter geeigneten Selektionsbedingungen fusioniert (fused). Danach wurden die Zellen klonisch separiert und der Überschuß jedes Klons wurde auf seine 45 Herstellung eines geeigneten Antikörpers getestet, der für die gewünschte Region des Angeeigneten Antikörpers getestet, der für die gewünschte Region des Antigens spezifisch ist.

Ein Tier, wie z. B. eine Maus, kann immunisiert werden, indem eine herkömmliche Methode angewendet wird, wie folgt:

Ein im wesentlichen gereinigtes Antigen wird der Maus intramuskulär, intraperitoneal, intradermal oder 50 intravenös injiziert und zwar mehrfach mit Intervallen von 14 bis 21 Tagen mit einer Gesamtmenge von 100 bis 200 $\mu$ g pro Maus. Notwendigenfalls kann ein herkömmliches Adjuvans wie z. B. ein Freund'sches Komplettadjuvans oder ein unvollständiger Adjuvans zusammen verwendet werden. Drei Tage nach der letzten Injektion werden Milzzellen der Maus entnommen um sie mit Myelomezellen von Mäusen zu fusionieren, deren Überlebensrate über 95% liegen und sich

55 Die Fusion der Zellen kann mittels einer herkömmlichen Methode durchgeführt werden wie sie z. B. von Lovberg in Monoclonal antibodies: Production & Maintenance, William Heinemann, Medical Books Ltd. (1982) beschrieben ist.

Die so erhaltenen fusionierten Zellen werden seriell verdünnt, gemäß Stand der Technik wie z. B. in Current Protocols in Immunology, Wiley Interscience (1991) beschrieben, um einen Klon zu entdecken, der die gewünschten Antikörper enthält.

- Ein gewünschter Klon kann nach bekannter Methode herausgesucht werden wie z. B. durch Enzym 5 Immuno Assay, Plaque Methode, Spot Methode, Ouchterlony Methode und Radioimmunoassay, wie beschrieben in Hybridoma Methods & Monoclonal Antibodies, Research and Development Press, pp30-53 (1982).

Die gewünschten monoklonalen Antikörper können vom Fachmann leicht erhalten werden, wobei die klonierte Antikörper-produzierende Zelllinie verwendet wird. Weiters erfolgt eine Reinigung durch Anwendung einer konventionellen Methode wie z. B. der Affinitätschromatographie.

Die Antikörper sind für die Reinigung von KHCV Antigenen und für die Entwicklung einer verbesserten Diagnosemethode zur Entdeckung von KHCV Antigenen in verdächtigen Proben nützlich.

#### Herstellung der diagnostischen Oligonucleotidsonde und Kit

- 15 Auf Basis der determinierten Nucleotidsequenz der KHCV cDNAs gemäß den Fig. 2-1 bis 2-11 und den Fig. 7 bis 25 können wenigstens 8 Nucleotide komplementär zu einem der KHCV cDNA Stränge mittels Ausschneiden oder synthetisch hergestellt werden. Die Oligonucleotide können als Sonden für die Hybridisierung nach dem Markieren z. B. mit radioaktiven Markern oder als Primer für PCR mit KHCV cDNAs als 20 Matrize für das Aufspüren von KHCV in Serumproben verwendet werden.

Die Oligonucleotide können entweder vollständig oder partiell zu einem KHCV cDNA Strang komplementär sein, in Abhängigkeit von den Umständen.

Die Oligonucleotide sollen wenigstens 8 Nucleotide bevorzugt 10 bis 12 Nucleotide und noch bevorzugter etwa 20 Nucleotide enthalten.

#### Herstellung von Impfstoffen und deren Anwendung

Inaktivierte oder attenuierte KHCV, hergestellt durch Anwendung einer bekannten Methode wie auch eine oder mehrere der Polypeptide die in den KHCV cDNA Fragmenten gemäß Erfindung kodiert sind,

- 30 können gemeinsam mit physiologisch akzeptablen Trägern als Impfstoffe formuliert

Passende Träger umfassen z. B. 0,01 bis 0,1 M Phosphatpuffer mit pH-neutraler oder physiologischer Salzlösung.

Eine verstärkte Immunität gegen HCV kann hervorgerufen werden, indem der Impflösung ein Adjuvans oder ein Immunopotentiator zugegeben wird oder indem die Polypeptide in einer größeren Form vorgesessen werden, entweder als quervernetzter (cross-linked) Komplex oder mit einer Trägerform konjugiert.

Geeignete Adjuvansien für das Impfen können zum Beispiel und ohne Einschränkung enthalten: Adjuvans 65 (enthaltend Erdnußöl, Mannidmonooleat und Aluminiummonostearat), Mineralgele wie Aluminiumhydroxyd, Aluminiumphosphat und Alauin, Oberflächermittel wie Hexadecylamin, Octadecylamin, Lysolecithin, Dimethyldioctadecylammoniumbromid, N,N-Dioctadecyl-N',N'-bis(2-Hydroxymethyl) Propandiamin, 40 Methoxyhexadecylglycerol und Pluronicpolyole; Polyanionen wie Pyran, Dextransulfat, Poly IC, Polyacrylsäure und Carbopol; Peptide wie Muramyldipeptid, Dimethylglycin und Tuftsin; und Ölemulsionen. Die Proteine gemäß vorliegender Erfindung können auch nach ihrer Inkorporierung in Liposome oder anderen Mikroträgern angewendet werden.

Die Immunogenität der erfundungsgemäßen Proteine und insbesondere ihrer kleineren Fragmente 45 kann mittels Cross-linking oder durch Kopplung an ein immunogenes Trägermolekül verstärkt werden (d. h. ein Makromolekül, das die Eigenschaft hat, unabhängig eine immunologische Antwort in einem Wirtstier hervorzurufen und mit dem die Proteine und die Proteinfragmente gemäß Erfindung kovalent gebunden werden können).

Cross-linking oder eine Konjugation mit einem Trägermolekül kann erforderlich sein, da kleine Proteinfragmente manchmal als Haptens agieren können (Moleküle, die sich spezifisch an einen Antikörper binden können aber nicht fähig sind, eine Antikörper-Produktion hervorzurufen, d.h. die nicht immunogen sind). Die Konjugation solcher Fragmente mit einem immungenen Trägermolekül macht die Fragmente immunogen, und zwar durch das, was man allgemein den "Carrier Effekt" (Trägereffekt) nennt.

Geeignete Trägermoleküle umfassen z. B. Proteine und natürlich oder synthetische Polymerverbindungen wie Polypeptide, Polysaccharide, Lipopolysaccharide, etc. Einer der nützlichen Träger ist ein Glycosid mit dem Namen Quil A, geoffenbart von Morein et al. (Nature, 308, 457 (1984)). Proteinträgermoleküle sind besonders bevorzugt, einschließlich aber nicht beschränkt auf Säugetierseroproteine, wie z. B. als Keyhole Limpet Hemocyanin, menschliches Gammaglobulin oder Rinder gammaglobulin, Albumin von Human-,

Rinder- oder Hasenserum, oder methylierte oder andere Abwandlungen solcher Proteine. Andere nützliche Proteinträger werden dem Fachmann geläufig sein.

Das kovalente Koppeln mit einem Trägermolekül kann unter Verwendung verschiedener Verfahren, die bekannt sind, durchgeführt werden. Die genaue Auswahl kann z. B. durch die Natur des verwendeten Trägermoleküls vorgeschrieben sein. Wenn das immunogene Trägermolekül ein Protein ist, können die Proteine oder Fragmente gemäß der Erfindung mit diesem Trägerprotein durch wasserlösliche Carbodiimide wie z. B. Dicyclohexylcarbodiimid oder Glutaraldehyd gekoppelt werden.

Koppler wie diese können auch verwendet werden, um die Proteine und deren Fragmente mit sich selbst querzuvernetzen, um so die Verwendung eines getrennten Trägermoleküls zu vermeiden. Solches Cross-linking zwischen den Proteinen oder ihren Fragmentaggregaten kann ebenfalls die Immunogenität erhöhen.

Das Inkorporieren in Liposome oder andere Mikroträger kann den Effekt mit sich bringen, daß die Impfstoffe über eine verlängerte Zeitspanne abgegeben werden.

Die Impfstoffe können als Einzeldosis verabreicht werden oder bevorzugter Weise als Mehrfachdosis.

Eine wirksame Dosis der im Impfstoff gegenwärtigen Polypeptide kann in einem Bereich zwischen 5 bis etwa 200µg liegen, abhängig vom Körpergewicht des zu immunisierenden Subjektes, der Kapazität des Immunsystems des Subjektes bei der Bildung der Antikörper und abhängig vom gewünschten Immunitätsgrad. Erstmalige Impfungen werden bevorzugt von Booster Impfungen gefolgt, die ein oder mehrere Monate später verabreicht werden. Vielfache Boosters können verabreicht werden.

Für die Verabreichung können die herkömmlichen Wege beschritten werden wie subkutan, intradermal, intramuskulär oder intravenös.

Die folgenden Beispiele sollen die vorliegende Erfindung näher erläutern, ohne den Schutzbereich einzuschränken. Die experimentellen Methoden, die in den Beispielen angewendet wurden, wurden gemäß den nachfolgenden Referenzbeispielen durchgeführt, soferne es nicht anders beschrieben ist.

Weiters sind, soferne nicht anders ausgeführt, die Prozentsätze für Mischungen Feststoff/Feststoff, Flüssigkeiten/Flüssigkeiten und Feststoffe in Flüssigkeiten jeweils auf der Basis Gewicht/Gewicht, Volumen/Volumen und Gewicht/Volumen angegeben.

#### Referenzbeispiel 1: Abbau der DNA mittels Restriktionsendonuclease

Die Restriktionsenzyme und Reaktionspuffer wurden von NEB (New England Biolabs, Jolla, MA USA) gekauft.

Die Reaktion wurde generell in einer sterilisierten Eppendorf Röhre mit einem Reaktionsvolumen durchgeführt, das zwischen 50 und 100µl betrug, und bei einer Temperatur von 37°C für 1 bis 2 Stunden.

Danach wurde die Reaktionsmischung mit 65°C für 15 Minuten hitzebehandelt (oder mit Phenol extrahiert und mit Ethanol ausgefällt im Falle einer hitzebeständigen Endonuclease) um die Restriktionsendonuclease zu deaktivieren.

10 x Reaktionspuffer für die Reaktion einer Restriktionsendonuclease weist die folgende Zusammensetzung auf:

10 x NEB Reaktionspuffer 1: 100mM Trispropan HCl, 100mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM Dithiothreitol (DTT), pH 7,0

10 x NEB Reaktionspuffer 2: 100mM Tris-HCl, 100mM MgCl<sub>2</sub>, 500mM NaCl, 10mM DTT, pH 7,0

10 x NEB Reaktionspuffer 3: 100mM Tris-HCl, 100mM MgCl<sub>2</sub>, 1000mM NaCl, 10 mM DTT, pH 7,0

10 x NEB Reaktionspuffer 4: 200mM Trisacetat, 100mM Magnesiumacetat, 50mM Calciumacetat, 10mM DTT, pH 7,0.

#### Referenzbeispiel 2: Phenolextraktion und Fällung mit Ethanol

Nach dem Ablauf der Enzymreaktion wurde die Reaktionsmischung mit Phenol extrahiert, um die Enzyme zu deaktivieren oder die DNA in der Reaktionsmischung zu gewinnen, wobei Phenol, vorher in Gleichgewicht gebracht mit einem Puffer, der 10mM Tris-HCl (pH 8,0) und 1mM EDTA enthielt, verwendet wurde. Die Phenolextraktion wurde durchgeführt, indem gleiche Volumina der Probe und des Phenols unter heftigem Schütteln vermischt wurden. Die Mischung wurde bei 15.000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Die wässrige Schicht wurde in ein neues Röhrchen transferiert. Die beschriebene Prozedur wurde 2 oder 3 mal wiederholt.

Dann wurde die wässrige Schicht mit gleichem Volumen Chloroform (Chloroform: Isoamylalkohol = 24:1) extrahiert und die wässrige Schicht wurde wiederrum abgetrennt. 0,1 Volumenteile 3M Natriumacetat und 2,5 Volumenteile Ethanol wurden zugegeben. Darauf wurde die Mischung bei 15.000 rpm und 4°C für

20 Minuten zentrifugiert, nachdem sie bei -70 °C für 30 Minuten oder bei -20 °C für 12 Stunden stehengelassen wurde, um die Nucleinsäure zu gewinnen.

Referenzbeispiel 3: Ligationsreaktion

5 Die Ligationsreaktion der DNA wurde durchgeführt, indem T<sub>4</sub> DNA Ligase und 10x Ligationsreaktionspuffer (0,5M Tris-HCl, 0,1M MgCl<sub>2</sub>, 0,2 M DTT, 10mM ATP, 0,5mg/ml Rinderserumalbumin (BSA)) gekauft von NEB, angewendet wurde. Das Reaktionsvolumen betrug generell 20µl und 10 Units der T<sub>4</sub> Ligase wurden zur Ligation der klebrigen Enden der DNA verwendet, während 100 Einheiten für die Ligation der 10 glatten Enden von DNAs verwendet wurden.

10 Die Reaktion wurde bei 16 °C für 5 Stunden durchgeführt oder bei 4 °C für über 14 Stunden. Nach Ablauf der Reaktion wurde die Reaktionsmischung erhitzt auf 65 °C für 15 Minuten, um die T<sub>4</sub> DNA Ligase zu deaktivieren.

15 Referenzbeispiel 4: Transformation von E. coli

Die für die folgenden Beispiele verwendeten E.coli Stämme umfaßten E.coli HB101 (ATCC 33694), E. coli W3110 (ATCC 27325), E. coli JM101 (ATCC 33876) und E. coli JM105 (ATCC 47016). Die Transformation der E. coli wurde durchgeführt, indem eine bekannte Methode angewendet wurde, nämlich wie von 20 Maniatis et al., in Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, N.Y. (1982) oder von Cohen in Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972) beschrieben wurde.

Referenzbeispiel 5: Transformation von Hefe

25 Die Hefetransformation wurde nach einer Methode durchgeführt, die von Beggs in Nature, 275, 104 (1978) oder von Hinnen et al., in Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978) beschrieben worden war.

Referenzbeispiel 6: Synthese der Oligonucleotide

30 Die Oligonucleotide wurden synthetisiert, indem ein DNA Synthesizer (Applied Biosystems Inc.m 380B, USA) unter Anwendung der Automatic Solid Phase Phosphoamidite-Chemie angewendet wurde.

35 Die synthetisierten Oligonucleotide wurden unter Verwendung von denaturierendem Polyacrylamidgel (2M Harnstoff, 12% Acrylamid und Bis (29:1), 50mM Tris, 50mM Broic Acid, 1mM EDTA) Elektrophorese und SEP-PAK (Waters Inc., USA) Säulenchromatographie gereinigt. Die Menge wurde mittels Messung O.D. bis 260nm bestimmt.

Referenzbeispiel 7: Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zu einer Mischung von bis 100ng einer Matrizen DNA, 10µl 10x Taq Polymerasereaktionspuffer (10mM 40 Tris-HCl, 500 mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1%(w/v) Gelatine, pH 8,3), 10µl einer Mischung aus dNTP's (jeweils 2mM von dGTP, dATH, dTTP und dCTP), 2µg jedes Primers (generell wurden für die Reaktion zwei Primer verwendet, und im Fall von drei Primern wurde der mittlere Primer in einer Menge von 0,02 µg verwendet) und 0,5µl Ampli Taq DNA Polymerase (Perkin Elmer Cetus, USA) wurde destilliertes Wasser in einer Menge zugegeben, daß ein Gesamtvolume von 100µl erhalten wurde. Weiters wurden 50µl Mineralöl 45 hinzugefügt, um die Reaktionsmischung vor dem Verdampfen zu schützen.

Die PCR wurde in einem thermal cycler (Perkin Elmer Cetus, USA) durchgeführt. Der thermische Zyklus wurde so programmiert, daß er 25mal oder öfters den folgenden Zyklus wiederholte: 95 °C für eine Minute - 55 °C für eine Minute - 72 °C für zwei Minuten, und letztendlich wurde die Reaktion bei 72 °C für 10 Minuten ausgeführt.

50 Nach Beendigung der Reaktion wurde die Mischung mit Phenol extrahiert, und die PCR-Produkte wurden mittels Äthanolfällung gewonnen. Das Precipitat wurde in 20µl einer TE-Pufferlösung gelöst (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 7,5).

Beispiel 1: Herstellung von KHCV cDNA KHCV-LBC1(1-A): Isolierung des HCV vom Serum von koreanischen Hepatitis C-Patienten und Extraktion der viralen genomischen RNA daraus

5

50 $\mu$ l Serum von koreanischen Patienten mit chronischer Hepatitis, die als Nicht-A-, Nicht-B-Hepatitis diagnostiziert worden war (ALT < 60IU: Das Serum wurde vom Korea University Hospital und dem Catholic University Hospital in Korea geliefert), wurden ultrazentrifugiert, um die HCV-Partikel nach einer Methode zu fällen, die von Bradley, D.W. et al in Gastroenterology, 88, 773(1985) vorgeschlagen worden war. 50ml des Serum wurde 6-fach mit einer TENB-Pufferlösung verdünnt (0,05M Tris, pH 8,0, 0,001M EDTA (Äthylendiamintetraessigsäure), 0,1M NaCl) und bei 28 000 rpm, Raumtemperatur für 6 Stunden ultrazentrifugiert, wobei ein Beckman Rotor SW28 verwendet wurde (Beckman Inc., Model L8-80M).

10

Die Extraktion der viralen genomischen RNA von den gefällten viralen Partikeln wurde durchgeführt, indem die Methode nach Cholozynski, P. und Sacchi, N. in Anal. Biochem. 162, S. 156-159 (1987) angewendet wurde. Die gefällten viralen Partikel wurden in 8ml einer RNA-Extraktionslösung suspendiert (4M Guanidinthiocyanat, 24mM Nacitrat, pH 7,0, 0,5% Sarcosyl, 0,1M 2-Mercaptoäthanol). 0,8ml 2M-Natriumacetat (pH 4,0), 8ml Phenol (BRL Inc. USA; gesättigt mit destilliertem Wasser) und 1,6ml Chloroform-Isoamylalkohol (49:1, v/v) wurden zugegeben und die resultierende Mischung dann bei 12 000 x g, 4°C und 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Teströhrchen gegossen. Das gleiche Volumen Isopropanol und Glycogen (2 $\mu$ g/ml Überstand) als Träger wurden hinzugefügt. Die Mischung wurde in einem Kühlern bei - 20°C für eine Stunde gehalten und dann bei 12 000 x g, 4°C für 20 Minuten zentrifugiert, um den RNA-Niederschlag zu erhalten. Der Niederschlag wurde in 75% Ethanol suspendiert, wie zuvor zentrifugiert und dann 10 Minuten im Vakuum getrocknet. Der virale RNA-Niederschlag wurde in 400 $\mu$ l TE-Pufferlösung (10mM Tris, pH 7,5, 1mM EDTA) gelöst und in der nächsten Stufe verwendet. Die virale RNA-Lösung kann für eine spätere Verwendung bei -70°C gehalten werden.

15

20

25

(1-B): Herstellung der KHCV cDNA Bibliothek(1-B-1): Herstellung der KHCV cDNA

30

Für die Herstellung der cDNA, wurde ein Zap-cDNA-Synthesekit (Stratagene Inc. USA) verwendet. Die in Beispiel (1-A) herstellte Hepatitis C virale RNA wurde als Matrize für die reverse Transkriptase verwendet. Es wurden ein Oligo-d(T)-Primer mit der Nucleotidsequenz 5'-GAGAGAGAGAGAGAGAACTAGTCTCGAG(T)<sub>18</sub>-3' und ein Randomprimer mit der Nucleotidsequenz 5'-TTTTTCATGATTGGTGGACTGGACCGTCTCGAGNNNNNN-3' verwendet, wobei Ns gleich oder verschieden sein können und jeweils A,T,C oder G ist (im nachfolgenden jeweils als "RANPSHCV" bezeichnet) und wobei die Synthesierung unter Verwendung eines DNA-Synthesizers erfolgte (Applied Biosystems Inc., USA, Modell 380 B).

35

40

45

50

55

Die Reaktionslösung wurde einer Extraktion mit gleichem Volumen Phenolchloroform unterzogen (1:1-v/v), wobei das Phenol bereits mit 0,5M Tris-HCl (pH 7,5) und 0,1% (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol gesättigt war, und dies erfolgte dreimal. Die obere wäßrige Phase wurde abgenommen und mit 0,1 Volumsteil 3M Natriumacetat und dem zweifachen Volumsteil 100% Ethanol vermischt. Die Mischung wurde bei -20°C über Nacht stehengelassen und bei 12 000 x g, 4°C für 20 Minuten zentrifugiert, um den cDNA-Niederschlag zu erhalten.

#### 1-B-2: Herstellung der cDNA Bibliothek

Um die in Beispiel 1-B-1 hergestellte doppelsträngige cDNA in eine stumpfendige umzuwandeln, wurde der cDNA Niederschlag in 43,5 $\mu$ l destilliertem Wasser gelöst. 39 $\mu$ l der cDNA Lösung wurden genommen und mit 5,0 $\mu$ l T4 DNA Polymerasereaktionslösung (670 mM Tris-HCl, pH 8,8 166mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 67mM MgCl<sub>2</sub>, 100mM  $\beta$ -mercaptopropanol, 67  $\mu$ M EDTA), 2,5 $\mu$ l einer 2,5mM dNTP's Mischung und 3,5 $\mu$ l T4 DNA Polymerase (2,9 units/ $\mu$ l) vermischt. Die Reaktionsmischung wurde 30 Minuten bei 37°C stehengelassen und das resultierende Produkt wurde mit Phenolchloroform extrahiert und mit Ethanol auf die gleiche Weise ausgefällt, wie im Beispiel 1-B-1.

Um für das Restriktionsenzym Eco RI beim 5'-Ende eine Erkennungsstelle einzuführen, wurde die stumpfendige doppelsträngige cDNA wie folgt behandelt: Zu der stumpfenden cDNA wurden 7,0 $\mu$ l Eco RI Adaptor (Stratagene Inc., Zap-cDNA Synthesis Kit Cat. No. 200400, CA, USA), 1,0 $\mu$ l 10 x Ligationspufferlösung, 1,0 $\mu$ l T4 DNA Ligase (1000 units/ $\mu$ l) und 1,0 $\mu$ l 10mM ATP gegeben und über Nacht bei 4°C stehengelassen. Die sich ergebende Mischung wurde dann auf 70°C für 10 Minuten erhitzt, um die Ligase zu deaktivieren.

Die so erhaltene cDNA kann direkt der Klonierung unterworfen werden. Im vorliegenden Fall jedoch wurde die cDNA amplifiziert und dann im Klonierungsvorgang verwendet.

Für die Amplifikation der cDNA wurde deren PCR wie folgt durchgeführt: Zu der zuvor hergestellten cDNA Lösung wurden 10 $\mu$ l 10 x PCR Pufferlösung (200mM Tris-HCl, pH 8,3, 15mM MgCl<sub>2</sub>, 250mM KCl, 0,5 % Tween 20, 1mg/ml Gelatine), 10 $\mu$ l 2mM dNTP's Mischung, 5 $\mu$ l Primer, PSHCV mit der Nucleotidsequenz 5'-TTTTTCATGATTGGTGGTGGGA-3' und 5 $\mu$ l des oberen Stranges (5'-CCCCCCGAATTCGGCAC-GAG-3') des Eco RI Adaptors, 1 $\mu$ l (2,5 units) der Taq DNA Polymerase (Perkin Elmer-Cetus Inc., 761 Main Avenue, Norwalk, CT 06859-0010, USA) und 69 $\mu$ l destilliertes Wasser gegeben. Darauf wurde die PCR unter Verwendung eines thermal cycler (Perkin Elmer-Cetus Inc., USA) durchgeführt, der so programmiert war, daß er folgenden Zyklus 25 mal wiederholte: 95°C für 30 Sekunden - 55°C für 30 Sekunden - 72°C für 2 Minuten. Nach Ablauf der Reaktion wurden die überzähligen Primers und dNTPs unter Verwendung von Centricon 100 (Amicon Inc., Cat. No. 4200, P.O. Box 91954, Chicago, IL 60693, USA) entfernt. Das so erhaltene Produkt wurde mit Phenol-Chloroform extrahiert und wie zuvor mit Ethanol gefällt und dann in 16 $\mu$ l TE Pufferlösung aufgelöst.

Zu der resultierenden Lösung wurden 2 $\mu$ l 10 x Pufferlösung (0,5M NaCl, 0,5M Tris-HCl, 50mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM DTT, pH 7,9) und je 1 $\mu$ l Eco RI und Xho I hinzugefügt (New England Biolabs Inc., 30 Tozer Rd., Beverly, MA, USA). Dann wurde die Reaktionsmischung für 10 Minuten bei 37°C stehengelassen, um die cDNA partiell abzubauen. Die cDNA Fragmente wurden wie zuvor mit Phenol-Chloroform extrahiert und mit Ethanol gefällt und dann mit 10 $\mu$ l TE Pufferlösung aufgelöst.

Das somit erhaltene cDNA Fragment wurde folgendermaßen in den Vektor UNI-ZAPXR geklont. Zu 10 $\mu$ l der mittels Eco RI-Xho I abgebauten cDNA Fragmentlösung, wie zuvor erhalten, wurden 2,0 $\mu$ l 10 x Ligationspufferlösung, 2,0 $\mu$ l 10mM ATP, 4,0 $\mu$ l der Vektor UNI-ZAPXR Lösung (1 $\mu$ g/ $\mu$ l), bereits behandelt mit Eco RI/Xho I und 2,0 $\mu$ l T4 DNA Ligase (4 Weiss units/ $\mu$ l) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde dann für 10 Stunden bei 16°C inkubiert.

#### 1-B-3: In vitro Verpacken des die cDNA enthaltenden Vektors in Phagen und Amplifizierung der cDNA Bibliothek

Um die ligierte DNA gemäß Beispiel 1-B-2 in Phagen zu verpacken, wurden 10 $\mu$ l der zuletzt in Beispiel 1-B-2 erhaltenen Lösung zu einem Gigapack II Gold Packaging Extract (Stratagene Inc., USA) gegeben und die Reaktionsmischung wurde für 2 Stunden bei Raumtemperatur stehengelassen.

Zu der resultierenden Mischung wurden 500 $\mu$ l einer phagenverdünnenden Lösung (5,8g NaCl, 2,0g MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O, 50ml 1M Tris-HCl, pH 7,5, 5ml einer 2%igen Gelatine pro Liter) und 20 $\mu$ l Chloroform gegeben (siehe Kretz et al., Nucl. Acid. Res., 17, 5409 (1989)).

Die Infektion und Amplifizierung wurden wie folgt durchgeführt. PLK-F' (Stratagene Inc., Zap-cDNA Synthesis Kit Cat. No. 200400) und E. coli merA-, merB- Stamm wurden in einem LB Medium kultiviert (10g

- Bactotrypton, 5g Hefeextrakte, 10g NaCL pro Liter) bis O.D.600 (Optische Dichte bei 600nm) den Wert 0,5 erreichte. Die kultivierten Zellen wurden ausgefällt und in 10mM MgSO<sub>4</sub> gelöst, wobei die O.D.600 auf 1,0 eingestellt wurde. 600µl der Lösung wurden mit 200µl der Packungsmischung gemischt. Die Reaktionsmischung wurde dann für 15 Minuten bei 37 °C stehengelassen, um den Phagen die Infektion der E. coli zu erlauben. Zu den daraus entstehenden E. coli wurden 6,5ml 0,7% NZY Agar (7g NZ Amine, 5g NaCl, 2g MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O, 5g Hefeextrakte, 7g Bactoagar pro Liter) hinzugefügt, geschmolzen und auf 48 °C gehalten. Die Mischung wurde auf eine 150mm Durchmesser NZY Agar Platte aufgetragen (7g NZ Amine, 5g NaCl, 2g MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O, 5g Hefeextrakte, 16g Bacto agar pro Liter) und dann für 5 bis 8 Stunden bei 37 °C inkubiert, um Phagenplaques auszubilden.
- 10ml einer phagen-verdünnenden Lösung wurden auf die Platte gegossen. Die Platte wurde leicht während 15 Stunden bei 4 °C geschüttelt, um die Phagen aufzulösen. Die daraus resultierende Mischung wurde bei 4.000 x g zentrifugiert, um die E. coli Zellen abzuscheiden, die dann entfernt wurden. Zu der so erhaltenen HCV cDNA Bibliothekslösung wurden 0,3% Volumen Chloroform zugegeben. Der Titer der cDNA Bibliothek wurde mit etwa 10<sup>10</sup> bis 10<sup>13</sup> PFU (plaque forming units) /ml bestimmt. Es wurde 100%ige DMSO (Dimethyl Sulfoxid) hinzugefügt, um eine Konzentration von 7% (v/v) herzustellen. Die cDNA Bibliothek wurde bei -70 °C gehalten.

#### 1-C: Durchsuchen der cDNA Bibliothek mittels Immunoassay und Bestimmung der cDNA Sequenz

- 20 Die cDNA Bibliothek wurde mittels der Immunoscreeningmethode durchsucht, die von Huynh, T. V. et al., DNA Cloning Techniques: A Practical Approach (D. M. Glover, ed.), pp 49-78, IRL Press, Oxford (1985) geoffenbart wurde, wobei die HCV Antikörper verwendet wurden, die vom Übersuch nach dem Zentrifugieren des 6-fach verdünnten Serums, hergestellt in Beispiel 1-A, mittels Protein G Affinitäts-Säulenchromatographie gereinigt worden waren (Genex Inc., USA).
- 25 Die cDNA Bibliothekslösung, hergestellt in Beispiel 1-B-3, wurde auf 50.000 PFU pro 150mm-Durchmesser der Platte verdünnt. Die verdünnte cDNA Bibliothekslösung wurde mit 600µl E. coli XL-1 blue (Strategene Inc., USA, Zap-cDNA Synthesis Kit Cat. No. 200400), der Kultur (O.D.600 = 0,5) hergestellt, nach der gleichen Methode wie in Beispiel 1-B-2 vermischt, und 6,5ml eines 0,7% NZY Agars wurden zugegeben. Jede Mischung wurde auf eine 40 NZY Agarplatte aufgetragen und für 12 Stunden bei 37 °C kultiviert, um 2 x 10<sup>6</sup> Phagenplaques herzustellen.
- 30 Danach wurden Membrane zum Abheben der Plaques aus Nylonfiltern (Bio-Rad Ind., Cat. No. 162-163, USA) mit einem Durchmesser von 137mm mit 10mM IPTG (isogropyl-β-D-thiogalactopyranoside) Lösung imprägniert und auf einem Whatman 3MM Filter getrocknet (blot-dried). Jeder Filter wurde auf dem Agar in einer Platte angeordnet und für 3,5 Stunden bei 37 °C inkubiert. Jeder der Filter, die die Flecken aus Phageplaques aufwiesen, wurde dann mit 15ml einer Waschlösung (10mM Tris-HCl, pH 8,0, 150mM NaCl, 0,05% Tween 20) gewaschen. Zu den Filtern wurde 15ml einer Blockierungslösung (1% Rinderserumalbumin, 20mM Tris-HCl, pH 7,5, 150mM NaCl) hinzugefügt. Unter leichtem Schütteln wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurde jeder der Filter 5 mal gewaschen, indem er mit 15ml einer TBST Pufferlösung (20mM Tris-HCl, pH 7,5, 150mM NaCl, 0,05% (v/v) Tween-20) für 5 Minuten bei Raumtemperatur leicht geschwenkt wurde. Die Filter wurden in 15ml der Lösung gegeben, die durch Verdünnen des gereinigten HCV Antikörpers (Proteinendkonzentration: 8,2mg/ml) auf den Wert 1:200 mit TBS Pufferlösung (20mM Tris-HCl, pH 7,5, 150mM NaCl), die 1% (w/v) FBS (fetal bovine serum) enthielt, wobei für 1 Stunde bei Raumtemperatur leicht geschüttelt wurde. Dann wurde 5 mal unter leichtem Schütteln in TBST Pufferlösung für 5 Minuten bei Raumtemperatur jeweils gewaschen. Jeder der Filter wurde in eine 15ml Lösung gegeben, die durch Verdünnung eines biotinylierten-goat antihuman IgG und avidin konjugiert-alkalische Phosphatase (Pierce Inc., USA. Cat. Nos. 31770C, 21321C) auf den Wert 1:2000 mit einer TBS Pufferlösung, die 1% (w/v) FBS enthielt hergestellt worden war, wobei für eine Stunde bei Raumtemperatur leicht geschüttelt wurde. Und dann wurde unter leichtem Schwenken 5 x in 15ml TBST Pufferlösung für 5 Minuten bei Raumtemperatur gewaschen. Jeder der Filter wurde dann auf einem Whatman 3MM Filter getrocknet (blot-dried).

55 Für die Färbereaktion wurde jeder der Filter in 15ml einer Färbelösung (100mM Tris-HCL, pH 9,5, 100mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 5mg Nitro-blue-tetrazolium, 2,5mg 5-Brom-4-chlor-3-indolyl phosphat) in einem dunklen Raum bei Raumtemperatur für 30 Minuten zur Reaktion gebracht. Die purpurfarbigen positiven Phageplaques wurden mit den Augen festgestellt, von denen erwartet werden konnte, daß sie die cDNA ausdrücken, die ein rekombinantes HCV Antigen kodieren. Jeder der Filter wurde mit einer TBS Pufferlösung einmal gewaschen. Eine Färbestopplösung (20mM Tris-HCl, pH 2,9, 1mM EDTA) wurde zugegeben, um den Färbeprozess zu stoppen. Jeder der Filter wurde bei Raumtemperatur getrocknet und dann mittels Polaroidfilm aufgezeichnet.

Positive Plaques wurden isoliert und in 1ml einer phagenverdünnenden Lösung (10mM Tris-HCL, pH 7,5, 10mM MgCl<sub>2</sub>) für 1 bis 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Der zuvor beschriebene Immunoscreeningassay wurde wiederholt, um die Klone einer einzelnen Phageplaqué zu erhalten.

- Jeder der Phageplaques, bei dem bestätigt werden konnte, daß er das rekombinante HCV Gen enthält,
- 5 wurde in eine sterilisierte Microfuge-Röhre gegeben, die 500µl einer SM Pufferlösung (5,8g NaCl, 2,0g MgSO<sub>4</sub>, 50µl 1M Tris-HCl, pH 7,5, 5ml einer 2%igen Gelatine pro Liter) enthält 20µl Chloroform wurden zugegeben. Dann wurden die Inhalte der Röhrchen unter Schütteln für 1 bis 2 Stunden bei Raumtemperatur kultiviert. 200µl (> 1 x 10<sup>5</sup> Phagenpartikelchen) der so erhaltenen Lösung, 1µl Helfer-phagen R408 (> 1 x 10<sup>6</sup> PFU/ml, Stratagene Inc., USA) und 20µl E. coli XL-1 Zellsuspension (O.D.600 = 1,0) wurden 10 miteinander vermischt und dann wurde die Mischung bei 37°C für 15 Minuten inkubiert. Zu der resultierenden Kultur wurden 5ml 2 x YT Medium (10g NaCl, 10g Hefeextrakt, 16g Bacto-tryptone pro Liter) hinzugefügt, wonach sie mit Schütteln während 3 Stunden bei 37°C kultiviert und dann auf 70°C für 20 Minuten erhitzt wurde. Die resultierende Kultur wurde auf 1:100 verdünnt und 200µl der verdünnten Kultur wurden mit 200µl E. coli XL1-Blue cell (O.D.600 0 1,0) vermischt. Nach Inkubation bei 37°C für 1 Stunde 15 wurden 100µl der resultierenden Kultur auf LB Platten aufgetragen, die Ampicillin (50µg/ml) enthielten. Daraufhin wurde bei 37°C für 10 Stunden inkubiert, um pBluescript-phagemid Kolonien zu erhalten, die doppelsträngige cDNA umfassen.

Um einzelsträngige DNA herzustellen, wurden die zuvor erhaltenen pBluescriptkolonien in einem LB Agar Medium inkubiert, welches das antibiotische Tetracycline (12,5µg/ml) enthielt, und durchsucht (screened), um wieder die positiven Kolonien zu erhalten. Die positiven Einzelkolonien, die erhalten wurden, wurden in Tetracycline<sup>+</sup> LB broth Medium (2 bis 3ml) über Nacht inkubiert. Die Kultur wurde dann in 0,3ml eines super liquid Mediums (35g Bacto-tryptone, 20g Hefeextrakt, 5g NaCl, eingestellt auf pH 7,5 mit NaOH) inkubiert und unter Schütteln bei 37°C kultiviert. Die Kultur wurde mit den Helferphagen R408 infiziert und die Kultivierung wurde für 8 Stunden durchgeführt, bis die O.D.600 den Wert 0,3 erreichte.

25 Bei der Durchführung der Infektion hängt das Verhältnis Phage:Zelle weitgehend von der Type der cDNA ab, die in pBluescript vorhanden ist, und kann 20:1, 10:1, 1:1 oder 1:10 betragen. Die einzelsträngigen DNAs wurden aus dem überschüssigen Teil der oben erhaltenen Kultur extrahiert.

Die Isolierung und Reinigung doppelsträngiger Phagemide und einzelsträngiger Phagemide wurde nach einer Methode durchgeführt, die von Sambrook, J. et al. in Molecular Cloning, 1, 2.73-2.81, Cold Spring 30 Habor, N.Y. (1989) vorgeschlagen worden war.

Die Länge des in jedem Klon enthaltenen cDNA Fragmentes wurde festgestellt, indem das doppelsträngige Phagemid mittels Restriktionsendonuclease Eco RI und Xho I abgebaut wurde. 3 Klone mit cDNA Fragmenten verschiedener Länge wurden erhalten.

Die Nucleotidsequenzen der 3 rekombinanten cDNAs wurden bestimmt, wobei ein gereinigtes einzelsträngiges rekombinantes pBluescript Phagemid oder das doppelsträngige pBluescript-Phagemid als Matritze eingesetzt wurde und M13-20mer, Primer T7, Primer KS, Primer SK oder Prime T3 (Stratagene Inc., USA) in Übereinstimmung mit der Sanger'schen Methode (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5405 (1977)) verwendet wurde, wobei die sich ergebenden cDNA Fragmente die Namen KHCV 426, KHCV 652 und KHCV 403 erhalten haben (siehe Fig. 1 bis 3).

40 1-D: Durchsuchen der rekombinanten Phagen, die KHCV cDNA enthalten, wobei Oligonucleotidsonden verwendet werden, und Bestimmung der Nucleinsäuresequenz

1-D-1: Isolierung der cDNA Klone, die mit KHCV 652 überlappen

45 Um jene rekombinanten Phagen mit Gehalt an HCV cDNA zu durchsuchen, die nicht durch die oben stehende Immunoscreening Methode durchsucht worden waren wurde eine Plaque Hybridisierung nach einer Methode durchgeführt, die von Benton, W. D. et al., Science, 196, 180 (1977); Connor, B. J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 278 (1983) und Jacob, K. et al., Nature, 313, 805 (1985) beschrieben wurde.

50 Als Sonden wurden Oligonucleotide P652a (5'-TTCATACCGTTGAGTCTATGGAAACTACT-3') und P652b (5'-GCCATTCCAAGAAGTGTGACGAACCTCG-3') verwendet, deren Nucleotidsequenzen aus der Nucleotidsequenz des cDNA KHCV 652 ausgewählt wurde, die in Beispiel 1-C bestimmt worden war.

Die cDNA Bibliotheklösung, die in Beispiel 1-B in einer Menge enthaltend 50.000 PFU hergestellt worden war, wurde aufgenommen und dann mit 600µl E. coli XL1-blue (verdünnt auf O.D.600 = 0,5) vermischt, gemäß Herstellung in Beispiel 1-B-3 und weiters mit 0,7 NZY Agar vermischt. Die Mischung wurde auf eine 150mm NZY Platte gegossen und bei 37°C für 12 Stunden inkubiert. Von insgesamt 30 Platten wurden 1,5 X 10<sup>6</sup> Phagenplaques erhalten.

Danach wurden 137mm Durchmesser Nylonfilter jeweils sorgfältig auf die Platten aufgelegt, um die Plaques auf die Filter aufzutragen. Die Nylonfilter wurden dann entfernt und an Luft getrocknet.

Jeder der getrockneten Filter wurde für 1 bis 2 Minuten auf Whatman 3MM Papier gelegt, welches mit 0,2M Na OH/1,5m NaCl gesättigt war. Weiters wurden die Filter für 1 bis 2 Minuten auf Whatman 3MM Papier gelegt, welches mit 0,4M Tris-HCl, pH 7,6 und 2 x SSC (SSC: 17,53g NaCl, 8,82g Natriumcitrat, pH 7,0 pro Liter) gesättigt war. Dann wurde in einem Vakuumofen bei 80 °C für 2 Stunden getrocknet.

Nach dem Trocknen wurden die Filter mit 500ml 3 x SSC/0,1% SDS Lösung bei Raumtemperatur 3 bis 4 x gewaschen. Mit der gleichen Lösung wurde bei 65 °C 2 Stunden lang gewaschen. Jeder der Filter wurde in 500ml Prehybridisierungslösung prehybridisiert (6 x SSC, 5X Denhardt Lösung (0,2g Ficoll, 0,2g Polyvinylpyrrolidon, 0,2g BSA pro Liter), 0,05% Natriumpyrophosphat, 100µg/ml DNA aus gekochtem Heringsperma, 0,5% SDS) für 1 Stunde bei 37 °C. Die Filter wurden in eine Hyridisierungslösung (6 x SSC, Denhart Lösung, 100µg/ml Hefe tRNA, 0,05% Natriumpyrophosphat) gegeben und 30ng von jeweils P652a und P652b, markiert mit <sup>32</sup>P, wurden zugegeben. Die Hybridisierungsreaktion wurde für 24 Stunden bei 48 °C durchgeführt.

Die oben eingesetzten Sonden wurden wie folgt markiert. Zu einer Mischung von 32ng Sonde, 7,5µl 10 x T4 Kination-buffer-Lösung (0,5M Tris-HCl, pH 7,5, 0,1M MgCl<sub>2</sub>, 50mM DTT, 0,5mg/ml BSA), 100µCi (gamma- <sup>32</sup>P) ATP und 50 units T4 Nucleotidkinase wurde destilliertes Wasser auf ein Gesamtvolumen von 75µl zugefügt. Die Kination-Reaktion wurde für 30 Minuten bei 37 °C durchgeführt.

Nach Vervollständigung der Hybridisierung wurden die Filter 5x mit 6 x SSC/0,05% Natriumpyrophosphatlösung für 10 Minuten bei Raumtemperatur gewaschen und noch einmal mit der gleichen Lösung für 30 Minuten bei 60 °C. Das Waschen wurde weiterdurchgeführt, während die Temperatur um 2 °C über 15 Minuten angehoben wurde, bis der Filter komplett ausgewaschen war, was mit einem Geigerzähler (Ludlum Model 13) überprüft wurde. Die gewaschenen Filter wurden auf einen Röntgenstrahlfilm (Kodak X-Omat AR) für 24 bis 48 Stunden bei -70 °C gelegt.

Die Plaques, die sich als positiv bestätigten, wurden ausgetestet wie oben beschrieben, um die Plaques als Plaques einer einzigen Phage zu erhalten.

Von den so erhaltenen positiven Plaques wurden das doppelsträngige Phagemid und das einzelsträngige Phagemid hergestellt und die Nucleotidsequenz wurde nach der gleichen Methode bestimmt, wie in Beispiel 1-C beschrieben.

Die cDNA Klone, die mit KHCV 652 überlappen, wurden als KHCV 752 und KHCV 675 bezeichnet. Ihre Länge, Stellung, Nucleotidsequenz und Aminosäuresequenz, die dadurch kodiert ist, sind in den Fig. 1 bis 3 dargestellt.

#### 1-D-2: Isolierung der cDNA die mit KHCV 426 überlappt

Es wurden Oligonucleotide P426a (5'-ACGAGACCTCCGGGGCACTCGCAAGCACC-3') und P426b (5'-CGTAATTGGGTAAAGGTATCGACACCCCTC-3'), die auf Basis der Nucleotidsequenz der in Beispiel 1-C erhaltenen KHCV 426 cDNA modelliert worden waren, synthetisiert. Unter Verwendung der Oligonucleotide P426a und P426b als Sonden wurde die Plaquehybridisierung in der gleichen Weise ausgeführt wie in Beispiel 1-D-1. Der cDNA Klon, der mit KHCV 426 überlappt wurde auf die gleichen Methode aufgespürt wie in Beispiel 1-C beschrieben, und als KHCV 240 bezeichnet. Die Länge, Stellung und Nucleotidsequenz sowie die darin kodierte Aminosäuresequenz sind in den Fig. 1 bis 3 dargestellt.

#### 1-D-3: Isolierung der cDNA, die mit KHCV 240 überlappt

Es wurde das Oligonucleotid P240b (5'-GTCCGGGTGCTGGAGGACGGCGTGAACTA-3'), welches auf Basis der Nucleotidsequenz der KHCV 240 gemäß Beispiel 1-D-2 modelliert worden war, hergestellt. Unter Verwendung des Oligonucleotids P240b als Sonde wurde die cDNA Bibliothek gemäß Beispiel 1-B auf die gleiche Weise durchsucht wie in Beispiel 1-D-1. Der so erhaltene cDNA Klon, der etwa 110 Nucleotide enthielt, die mit KHCV 240 überlappten wurde als KHCV 513 bezeichnet. Deren Nucleotidsequenz wurde nach der Sanger'schen Methode bestimmt. Die Länge, Stellung und Nucleotidsequenz des KHCV 513 und die darin kodierte Aminosäuresequenz sind in den Fig. 1 bis 3 dargestellt.

#### 1-D-4: Isolierung der cDNA, die mit KHCV 513 überlappt

Es wurde das Oligonucleotid P513b (5'-CGCATGGCCTGGATATGATGACTGG3'), welches auf Basis der Nucleotidsequenz der KHCV 513 gemäß Beispiel 1-D-3 modelliert worden war, hergestellt. Unter Verwendung des Oligonucleotids P513b als Sonde wurde die cDNA Bibliothek gemäß Beispiel 1-B auf die

gleiche Weise durchsucht wie in Beispiel 1-D-1. Der cDNA Klon mit 810bp, der etwa 130bp Nucleotide enthielt, die mit KHCV 513 überlappten, wurde als KHCV 810 bezeichnet und die Nucleotidsequenz wurde nach der Sanger'schen Methode bestimmt. Die Länge, Stellung und Nucleotidsequenz des KHCV 810 und die darin kodierte Aminosäuresequenz sind in den Fig. 1 bis 3 dargestellt.

5

1-D-5: Isolierung der cDNA, die mit KHCV 810 überlappt

Es wurde das Oligonucleotid P810b (5'-AAATGAGACGGACGTGCTGCTCCTAAC-3'), welches auf Basis der Nucleotidsequenz der KHCV 810 gemäß Beispiel 1-D-4 modelliert worden war, hergestellt. Unter Verwendung des Oligonucleotids P810b als Sonde wurde die cDNA Bibliothek gemäß Beispiel 1-B auf die gleiche Weise durchsucht wie in Beispiel 1-D-1. Der so erhaltene cDNA Klon, der etwa 65bp Nucleotide enthielt, die mit KHCV 810 überlappten, wurde als KHCV 798 bezeichnet. Deren Nucleotidsequenz wurde nach der Sanger'schen Methode bestimmt. Die Länge, Stellung und Nucleotidsequenz des KHCV 798 und die darin kodierte Aminosäuresequenz des KHCV 798 sind in den Fig. 1 bis 3 dargestellt.

10

1-D-6: Isolierung der cDNA die mit KHCV 403 überlappt

Es wurden Oligonucleotide P403A (5'-GTGAAGAATTGGGGGCCGGAACCTGGCAT-3') und P403B (5'-GCTGACCTCATTGAGGCCAACCTCTTGT-3'), welche auf Basis der Nucleotidsequenz der KHCV 403 gemäß Beispiel 1-D-5 modelliert worden waren, hergestellt. Unter Verwendung der Oligonucleotide P403A und P403B als Sonde wurde die cDNA Bibliothek gemäß Beispiel 1-B auf die gleiche Weise durchsucht wie in Beispiel 1-D-1. Der so erhaltene cDNA Klon, der etwa 160bp Nucleotide enthielt, die mit KHCV 403 überlappten, wurde als KHCV 932 bezeichnet. Deren Nucleotidsequenz wurde nach der Sanger'schen Methode bestimmt. Die Länge, Stellung und Nucleotidsequenz des KHCV 932 und die darin kodierte Aminosäuresequenz des KHCV 932 sind in den Fig. 1 bis 3 dargestellt.

20

1-D-7: Isolierung der cDNA, die mit KHCV 932 überlappt

Es wurde das Oligonucleotid P932b (5'-CCGGGACGTGCTTAAGGAGATGAAGGCGAA-3'), welches auf Basis der Nucleotidsequenz der KHCV 932 gemäß Beispiel 1-D-6 modelliert worden war, hergestellt. Unter Verwendung des Oligonucleotides P932b als Sonde wurde die cDNA Bibliothek gemäß Beispiel 1-B auf die gleiche Weise durchsucht wie in Beispiel 1-D-1. Der so erhaltene cDNA Klon, der etwa 185bp Nucleotide enthielt, die mit KHCV 932 überlappten, wurde als KHCV 496 bezeichnet. Deren Nucleotidsequenz wurde nach der Sanger'schen Methode bestimmt. Die Länge, Stellung und Nucleotidsequenz des KHCV 496 und die darin kodierte Aminosäuresequenz des KHCV 496 sind in den Fig. 1 bis 3 dargestellt.

25

1-D-8: Isolierung der cDNA, die mit KHCV 496 überlappt

Es wurde das Oligonucleotid P496b (5'-CGTGTATGCGAGAAGATGGCCCTTATGAC-3'), welches auf Basis der Nucleotidsequenz der KHCV 496 gemäß Beispiel 1-D-7 modelliert worden war, hergestellt. Unter Verwendung des Oligonucleotides P496b als Sonde wurde die cDNA Bibliothek gemäß Beispiel 1-B auf die gleiche Weise durchsucht wie in Beispiel 1-D-1. Der so erhaltene cDNA Klon von 847bp, der etwa 160bp Nucleotide enthielt, die mit KHCV 496 überlappten, wurde als KHCV 847 bezeichnet. Deren Nucleotidsequenz wurde nach der Sanger'schen Methode bestimmt. Die Länge, Stellung und Nucleotidsequenz des KHCV 847 und die darin kodierte Aminosäuresequenz des KHCV 847 sind in den Fig. 1 bis 3 dargestellt.

30

1-D-9: Isolierung der cDNA, die mit KHCV 847 überlappt

Es wurde das Oligonucleotid P847b (5'-TGCCTGGGAGACAGCTAGACACACTCCAG-3'), welches auf Basis der Nucleotidsequenz am 3'-Ende des KHCV 847 gemäß Beispiel 1-D-8 modelliert worden war, hergestellt. Unter Verwendung des Oligonucleotides P847b als Sonde wurde die cDNA Bibliothek gemäß Beispiel 1-B auf die gleiche Weise durchsucht wie in Beispiel 1-D-1. Der so erhaltene cDNA Klon von 494bp, der etwa 94bp Nucleotide enthielt, die mit KHCV 847 überlappten, wurde als KHCV 494 bezeichnet. Deren Nucleotidsequenz wurde nach der Sanger'schen Methode bestimmt.

Die Länge, Stellung und Nucleotidsequenz des KHCV 494 und die darin kodierte Aminosäuresequenz des KHCV 494 sind in den Fig. 1 bis 3 dargestellt.

1-E: Herstellung von cDNA mittels PCR1-E-1: Herstellung der KHCV cDNA zwischen KHCV 798 und KHCV 752

5 Um die HCV cDNA zwischen dem 3'-Ende des KHCV 798 und 5'-Ende des KHCV 752 zu klonieren, wurden die Primer P798b (5'-CTGGTTCCCGGAGCAGCGCATAC-3'), ausgebildet auf Basis der Nucleotidsequenz am 3'-Ende der KHCV 798, und P752a (5'-CCAGGTGATGACTTGGTCTCCAT-3'), ausgebildet auf Basis der Nucleotidsequenz am 5'-Ende des KHCV 752, synthetisiert. Unter Verwendung des Primers P798b und P752a und der cDNA Bibliothek gemäß Beispiel 1-B-1 und unter Verwendung des Primers von RANPSHCV, wurde die Polymerasekettenreaktion gemäß Referenzbeispiel 7 ausgeführt. Nach Vollendung der Reaktion wurde eine Menge der sich ergebenden Mischung 5% Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE) unterworfen, um die Amplifizierung der cDNA zu bestätigen. Zur verbleibenden Mischung wurden 10 units eines Klenow Fragmentes hinzugefügt, eine DNA Polymerase. Die Reaktionsmischung wurde für 30 Minuten bei 37°C inkubiert, um beide Enden stumpf zu machen. Die Reaktionsmischung wurde der PAGE unterworfen und die DNA wurde elektrisch eluiert, um die reine DNA zu isolieren. Das gereinigte DNA Fragment wurde in eine Phage-M13mp18 kloniert und dessen Nucleotidsequenz wurde bestimmt. Die so erhaltene DNA wurde als KHCV 570 bezeichnet. Deren Nucleotidsequenz und die darin kodierte Aminosäurensequenz sind in den Fig. 1 bis 3 dargestellt.

Das in Beispiel 1-D-2 hergestellte KHCV 240 und in Beispiel 1-D-3 hergestellte KHCV 513, in Beispiel 20 1-D-4 hergestellte KHCV 810, in Beispiel 1-D-5 hergestellte KHCV 798 und das zuvor beschriebene KHCV 570 überlappen einander teilweise. Somit wurden sie in einen langen offenen Leseraster miteinander verbunden, der KHCV 2661 genannt wurde.

1-E-2: Herstellung der KHCV cDNA zwischen KHCV 403 und KHCV 675

Um das HCV cDNA Fragment zu klonieren, welches zwischen dem KHCV 403 gemäß Beispiel 1-C und dem KHCV 675 gemäß Beispiel 1-D-1 liegt, wurden die Primer P675b (5'-TCGATTCTCGGTCTGTG-GAGTGT-3') und P675b<sub>2</sub> (5'-AAAAAGAACCTGGATCCATGACGCCGGTTGCGTGGTAC-3') auf Basis der Nucleotidsequenz auf der Seite des 3'-Endes des KHCV 675 ausgebildet, und P403a<sub>2</sub> (5'-CCCCCTCA-GAGTCGACTCACTTCACGTTGTCAGTGGTCAT-3'), ausgebildet auf Basis der Nucleotidsequenz auf des Seite des 5'-Endes der KHCV 403 synthetisiert. Unter Verwendung der Primer P675b, P675b<sub>2</sub> und P403a<sub>2</sub>, wie zuvor hergestellt, und P403a gemäß Beispiel 1-D-6 wurde die PCR wie folgt durchgeführt.

Zur einer Mischung von 0,2µg P674b, 0,2µg von P403a, 2µl von cDNA gemäß Beispiel 1-B-1 unter Verwendung des Random Primers RANPSHCV, 10µl 10 x PCR Pufferlösung, 10µl von 2mM dNTP's 35 Mischung und 2,5 units der Taq Polymerase wurde destilliertes Wasser hinzugefügt, um das Gesamtvolume auf 100 µl einzustellen. Die Mischung wurde einer ersten PCR unterworfen, indem der folgende Zyklus 10x wiederholt wurde: 95° für 2 Minuten - 55°C für 2 Minuten - 72°C für 3 Minuten. Nach Zugabe von 2µg P675b<sub>2</sub> und 2µg P403a<sub>2</sub> zur resultierenden Mischung, wurde die zweite PCR ausgeführt, indem der obige thermische Zyklus 20x wiederholt wurde.

Nach Vervollständigung der Reaktion wurde die Amplifizierung der cDNA bestätigt. Die Sequenz der cDNA wurde in gleicher Weise wie in Beispiel 1-E-1 bestimmt. Die so erhaltene cDNA wurde KHCV 1774 genannt und deren Nucleotidsequenz und die darin kodierte Aminosäurensequenz sind in den Fig. 1 bis 3 dargestellt.

45 1-E-3: Klonierung des 3'-Endbereiches der KHCV cDNA und Bestimmung der entsprechenden Nucleotidsequenz

Um die cDNA entsprechend der 3'-Endregion des HCV Genoms zu klonieren, wurde die PCR unter Verwendung der Primers RANPSHCV und DA17PSHCV (5'-TGGTGGTGGAACTGGACCGTA<sub>1,3</sub>' ) wie folgt 50 durchgeführt.

Der Primer PSHCVSL, 5'-AAAAGTCGACTGGTGGAACTGGACCGT-3' enthält 21 fixe Nucleotide des Primers RANPSHCV oder DA17PSHCV des Beispiels 1-B-1 und eine Sal I Erkennungsstelle (5'-GTCGAC-3'). Demgegenüber enthält der KHCVR60 Primer 5'-GTGTCCGCGCTAAGCTACTGTCC-3', jene Nucleotide, die von der Nucleotidsequenz der 3'-Endregion der KHCV 494 gemäß Beispiel 1-D-9 vorgezeichnet ist. Unter Verwendung der Primers PSHCV und KHCVR60 wurde eine erste PCR auf gleiche Weise ausgeführt, wie in Referenzbeispiel 7.

In einer zweiten PCR wurde der Primer KHCVR61 (5'-TGTGGCAAGTACCTCTTCAACTGG-3') synthetisiert. KHCVR61 besteht aus einer Sequenz komplementär zur Nucleotidsequenz der 3'-Endregion der

KHCV 494 und liegt näher zum 3'-Ende als KHCVR60.

10  $\mu$ l der KHCVR61 wurden der Mischung zugefügt, die der ersten PCR entstammte und dann wurde die zweite PCR nach dem gleichen Verfahren durchgeführt, wie in Referenzbeispiel 7.

Nach Vervollständigung der Reaktion wurde die Amplifizierung der cDNA bestätigt und deren Nucleotidsequenz wurde auf gleiche Weise wie in Beispiel 1-E-1 bestimmt. Die so erhaltene cDNA mit 266 Nucleotiden wurde KHCV 266 genannt. Die Lage und Nucleotidsequenz der KHCV 266 und der darin kodierten Aminosäurensequenz sind in den Fig. 1 bis 3 dargestellt. In der Nucleotidsequenz der KHCV 266 wurden 2 Terminatorcodons gefunden, obwohl ein Poly (A)<sup>+</sup> tail nicht gefunden wurde.

10 1-E-4: Klonierung der 5'-Endregion der KHCV cDNA und Bestimmung der Nucleotidsequenz

Unter Verwendung des Primers KHCVL69 (5'-GTCCTGTGGCGGCCGGTTGGTACG-3') ausgebildet auf Basis des Nucleotides an der 5'-endigen Seite der KHCV 426 gemäß Beispiel 1-C, wurde eine einzelsträngige cDNA in gleicher Weise hergestellt, wie in Beispiel 1-B-1. 50 $\mu$ l der oben erhaltenen Mischung wurden mit 1ml TE Pufferlösung (10mM Tris-HCl, pH 7,5, 1mm EDTA) verdünnt. Die verdünnte Mischung wurde auf 10 $\mu$ l unter Verwendung eines Zentrikon 100 konzentriert (Amicon Inc., USA, # 4200), um die restlichen Primer und dNTPs zu entfernen.

Um eine Poly d(t) tailed cDNA oder Poly d(g) tailed cDNA herzustellen, wurden 10 $\mu$ l des so erhaltenen cDNA Lösung 4 $\mu$ l einer 5 x tailing Pufferlösung (0,5M Kaliumkakodylate, pH 7,2, 10mM CoCl<sub>2</sub>, 1mM DTT), 20 4 $\mu$ l 1mM dTTP (oder 4 $\mu$ l 1mM dGTP) und 10 units der terminalen Deoxynucleotidtransferase (BRL Inc., USA, # 80085B) hinzugefügt. Destilliertes Wasser wurde zugegeben, um das Gesamtvolumen auf 50 $\mu$ l einzustellen. Die Reaktionsmischung wurde für 30 Minuten bei 37 °C stehengelassen und dann auf 65 °C für 5 Minuten erhitzt.

Die so erhaltene Poly d(T)<sub>n</sub> tailed cDNA (oder die Poly d(G) tailed cDNA) wurde mittels PCR unter Verwendung der Primers KHCVL70 (5'-TTGAGGTTAGGATTGCTCAT-3') (oder dC12R1RO; 25 5'-AAGGATCCGTCGACATCGATAATACGACTCACTAGGG(A)<sub>12</sub>-3'), dT17R1RP (5'-AAGGATCCGTCGACATCGATAATACGACTCACTATAGGG(A)<sub>17</sub>-3'), RO (5'-AAGGATCCGTCGACATC-3') und R1 (5'-GACATCGATAATACGACTCAC-3') erhalten aus der Nucleotidsequenz der KHCV 426 gemäß Beispiel 1-C mittels PCR amplifiziert.

Zu 2 $\mu$ l der cDNA Lösung wurden 5 $\mu$ l 10 x Taq Polymerase Pufferlösung (100mM Tris-HCl, pH 8,3, 30 500mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1% Gelatin) 5 $\mu$ l einer 1,5mM dNTPS Mischung, 2,2 $\mu$ g KHCVL69 und 2,0 $\mu$ g dT17R1RO hinzugefügt. Destilliertes Wasser wurde zugegeben, um das Gesamtvolumen auf 50 $\mu$ l einzustellen. Die Mischung wurde auf 95 °C für 7 Minuten erhitzt und dann auf 75 °C abgekühlt. 2,5 unts der Taq DNA Polymerase wurden zugegeben. 30 $\mu$ l Mineralöl wurden dann zugegeben, um die Verdampfung zu verhindern. Die Reaktionsmischung wurde auf 45 °C für 2 Minuten gekühlt, um es den Primers zu gestatten, die einzelsträngige cDNA komplementär zu binden, und dann wurde die Reaktion bei 72 °C für 22 Minuten weitergeführt. Eine erste PCR wurde durchgeführt, indem 30x der folgende Zyklus wiederholt wurde: 95 °C für 45 Sekunden - 50 °C für 25 Sedunden - 72 °C für 2 Minuten; und endlich bei 72 °C für 15 Minuten.

2 $\mu$ g des Primers RO (oder R1) und 2 $\mu$ g KHCVL70 wurden zu 10 $\mu$ l der Mischung gegeben, die sich aus dem Obenstehenden ergab. Eine zweite PCR wurde ausgeführt, indem 30x der gleiche Zyklus wie zuvor wiederholt wurde. Nach Vervollständigung der Reaktion wurde die Amplifizierung der cDNA, die 380bp aufwies, bestätigt und deren Nucleotidsequenz wurde auf gleiche Weise bestimmt, wie in Beispiel 1-E-1. Der so erhaltene cDNA Klon wurde KHCV 366 genannt und die Lage und Nucleotidsequenz der KHCV 366 und der darin kodierten Aminosäurensequenz sind in den Fig. 1 bis 3 dargestellt.

45 Die gemäß Beispiel 1 erhaltenen KHCV cDNA Klone, verbunden zu einer KHCV cDNA mit voller Länge mit 9372 Nucleotiden, wobei die cDNA mit voller Länge genannt wurde KHCV-LBC1, wurde bei der ATCC am 14. Mai 1991 unter der Zugriffssnummer 75008 hinterlegt.

Beispiel 2: Herstellung der HCV Subtype cDNA

50 2-A: Extraktion der RNA

Zu 100 $\mu$ l jeden Serums, gesammelt von 13 koeranischen Hepatitis C Patienten (Proben #2, #3, #20, #21, #23, #25, #26, #27, #28, #29, #30, #31 und #32) wurden 300 $\mu$ l eines die Zellerände aufbrechenden Mittels mit der Bezeichnung RNAzol B (Cinna/Biotecx, P.O. Box 1421, Friendwood, Texas, USA) hinzugefügt. Dann wurden die KHCV RNAs auf gleiche Weise extrahiert, wie in Beispiel 1-A. Die aus diesen 13 Proben extrahierten KHCV RNAs erhielten die Namen LBC2, LBC3, LBC20, LBC21, LBC23, LBC25, LBC26, LBC27, LBC28, LBC29, LBC30, LBC31 und LBC32.

2-B: Herstellung der cDNA

Unter Verwendung der HCV RNAs gemäß Beispiel 2-A als Masken und Random Primers (5'-NNNNNN-3', wobei Ns gleich oder verschieden sein und G, A, T oder C mit dem gleichen Verhältnis sein können) als 5 Primer für die reverse Transcriptase, wurden die HCV cDNAs in der gleichen Weise hergestellt, wie in Beispiel 1-B-1. Die so erhaltenen cDNAs wurden wie folgt bezeichnet: KHCV-LBC2 cDNA, KHCV-LBC3 cDNA, KHCV-LBC20 cDNA, KHCV-LBC21 cDNA, KHCV-LBC23 cDNA, KHCV-LBC25 cDNA, KHCV-LBC26 cDNA, KHCV-LBC27 cDNA, KHCV-LBC28 cDNA, KHCV-LBC29 cDNA, KHCV-LBC30 cDNA, KHCV-LBC31 cDNA, KHCV-LBC31 cDNA und KHCV-LBC32 cDNA.

10

2-C: Amplifizierung der KHCV cDNA mittels PCR2-C-1: Design der Primer

15 Die Primer für die Amplifizierung der NS2 und NS5 Regionen der HCV cDNAs wurden nach den Gebieten ausgebildet, die relativ allgemein in den Nucleotidsequenzen des japanischen Typs vorhanden sind, über den Kato et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 9524-9528 (1990) und Takamizawa et al., J. Virol., 65, 1105-1113 (1991) berichtete. Weiters vom amerikanischen Typ, berichtet in Choo et al., Sience, 244, 359-363 (1989) und von der KHCV-LBC1 gemäß Beispiel 1. Die Stellungen der Nucleotidsequenzen, die 20 zuvor hergestellt worden waren, wurden auf Basis der Nucleotidsequenzen der KHCV-LBC1 nummeriert.

Primer für die Amplifizierung der NS2 Region der HCV cDNA

25 NS2S1 (5'-CGGGAGATGGCCGCATCGTG-3') korrespondierte mit dem Strang des Fragmentes vom 2776igsten bis zum 2795igsten Nucleotid in KHCV-LBC1. NS2N1 (5'-ACCTGCTAGTGCAGGCCAGCTTCAT-3') korrespondierte mit dem komplementären Strang des Fragmentes vom 3180igsten bis zum 3157igsten Nucleotid der KHCV-LBC1, der dazu verwendet wurde, die erste PCR für die Amplifizierung der NS2 Region der HCV cDNA auszuführen. NS2S2 (5'-TTTGGATCCCGCGGTTTGAGGTCTGGT-3') korrespondierte mit dem Strang des Fragmentes von dem 2803 zum 2822 Nucleotid im KHCV-LBC1, der eine BamH I Erkennungsstelle für die Angemessenheit der Klonierung aufwies. Und NS2N2 (5'-AAAGTCGACATGAA-GACCATTGGAC-3') korrespondierte mit dem komplementären Strang vom 3159igsten bis zum 3142igsten Nucleotid im KHCV-LBC1, der eine Sal I Erkennungsstelle bei seinem 5'-Ende für die Angemessenheit der Klonierung aufwies. NS2S2 und NSS2N2 wurden für das Durchführen der zweiten PCR verwendet.

35 Primer für die Amplifizierung der NS5 Region der HCV cDNA

NS5S1 (5'-ATGGGGATCCATATGACACCCGCTG(T/C)TTTGA-3', worin T/C Thymin und Cytosin bedeutet, gemischt im Verhältnis 1:1) die Nucleotidsequenz vom 10 Nucleotid (gezählt vom 5'-Ende der NS5S1) bis zum 3'-Ende, korrespondierte mit der Nucleotidsequenz des Fragmentes vom 8252igsten bis zum 40 8273igsten Nucleotid in KHCV-LBC1. Im NS5N1 (5'-CCCCGTCGACCTAGTCATAGCCTCCGTGAA-3') korrespondierte die Nucleotidsequenz vom 9 Nucleotid zum 3'-Ende mit dem Komplementärstrang des Fragmentes vom 8635igsten bis zum 8614 Nucleotid im KHCV-LBC1. Der Primer NS5N1 wurde dazu verwendet, eine erste PCR für die Amplifizierung der NS5 Region durchzuführen.

In NS5S2 (5'-TTTGAGGATCCACGGTCACTGAGAA(T/C)GACAT-3', wobei T/C die gleiche Bedeutung 45 wie oben hatte), korrespondierte die Nucleotidsequenz vom 12 Nucleotid bis zum 3'-Ende mit dem Strang des Fragmentes vom 8278igsten bis zum 8297igsten Nucleotid im KHCV-LBC1, und NS5S2 hatte eine BamH I Erkennungsstelle am 5'-Ende. Der Primer NS5S2 wurde beim Ausführen der zweiten PCR verwendet.

Die obigen Primer wurden synthetisiert, indem DNA Synthesizer (Applied Biosystems Inc., Model 380 B, USA) verwendet wurden, bei dem automated solid phase phosphoamidite chemistry Verwendung fand. Die synthetisierten Primer wurden mittels Elektrophoresis isoliert, wobei denaturierendes Polyacrylamidgel 50 Verwendung fand (2M Harnstoff, 12% Acrylamid und bis-Acrylamid (29:1, w/w) in 50mM Tris, 50mM Borsäure, 1mM EDTA-Na<sub>2</sub>), und gereinigt wurde durch C18 Chromatographiersäulen, (SE-PAK; WATERS INC., USA), wobei eine Mischung aus Acetonitril-Wasser (50:50, v/v) als Elutionsmittel verwendet wurde. 55 Die Konzentration jedes Primers wurde durch einen O.D. Wert bei 260nm bestimmt.

2-C-2: PCR für die Amplifizierung der NS2 Region von KHCV cDNA

Eine erste PCR wurde wie folgt durchgeführt. Zu 5µl jeder KHCV-LBC2 cDNA, KHCV-LBC3 cDNA, KHCV-LBC20 cDNA, KHCV-LBC21 cDNA, KHCV-LBC23 cDNA, KHCV-LBC25 cDNA, KHCV-LBC26 cDNA,  
 5 KHCV-LBC27 cDNA, KHCV-LBC28 cDNA, KHCV-LBC29 cDNA, KHCV-LBC30 cDNA, KHCV-LBC31 cDNA, KHCV-LBC32 cDNA, hergestellt in Beispiel 2-B, wurden 10µl 10 x Taq Polymerase Pufferlösung (10mM Tris-HCl, pH 8,3, 500mM HCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1% (w/v) Gelatine), 10µl einer 2mM dNTP's Mischung, 0,2µg NS2S1, 0,2µg NS2N1 und 0,5µl AmpliTaq DNA Polymerase (Perkin elmer-Cetus, USA) zugegeben. Destilliertes Wasser wurde hinzugefügt, um das Gesamtvolumen auf 100µl einzustellen. Zu jeder dieser  
 10 Lösungen wurden 50µl Mineralöl zugegeben, um die Verdampfung zu vermeiden. Die erste PCR wurde ausgeführt, indem der folgende Termozyklus 40x wiederholt wurde: 95 °C für 2 Minuten - 55 °C für 2 Minuten - 72 °C für 3 Minuten. Die zweite PCR wurde ausgeführt, indem 1ml des ersten PCR Produktes und 2µg des NS2S2/NS2N2 Primer sets verwendet und 25x wiederholt wurde.

Jede der resultierenden Mischungen wurde mit einem gleichen Volumen Phenol/Chloroform gemischt  
 15 und dann zentrifugiert, um die übrigen Enzyme zu entfernen. Zu jedem der Rückstände wurden 0,1 Volumen 3M Natriumacetat und das 2,5fache Volumen absoluten Ethanols hinzugefügt. Die resulterende Mischung wurde dann zentrifugiert, wobei 340bp einer doppelsträngigen DNA vorlagen.

Die DNA Fragmente von den 13 verschiedenen Masken wurden folgendermaßen genannt: NS2-LBC2,  
 20 NS2-LBC3, NS2-LBC20, NS2-LBC21, NS2-LBC23, NS2-LBC25, NS2-LBC26, NS2-LBC27, NS2-LBC28, NS2-LBC29, NS2-LBC30, NS2-LBC31 und NS2-LBC32.

2-C-3: PCR für die Amplifizierung der NS5 Region der HCV cDNA

Die Primer NS5S1 und NS5N1 wurden verwendet, um eine erste PCR auszuführen und die Primer NS5S2 und NS5N1 fanden für die Durchführung einer zweiten PCR auf die gleiche Weise Verwendung, wie in Beispiel 2-C-2, um 320bp der DNA Segmente zu erhalten.

Die resultierenden DNA Fragmente, amplifiziert von KHCV-LBC20 cDNA, KHCV-LBC21 cDNA, KHCV-LBC23 cDNA, KHCV-LBC25 cDNA, KHCV-LBC26 cDNA, KHCV-LBC27 cDNA, KHCV-LBC28 cDNA, KHCV-LBC29 cDNA, KHCV-LBC30 cDNA, KHCV-LBC31 cDNA, KHCV-LBC32 cDNA wurden wie folgt genannt:  
 30 NS5-LBC20, NS5-LBC21, NS5-LBC23, NS5-LBC25, NS5-LBC27, NS5-LBC28, NS5-LBC29, NS5-LBC30, NS5-LBC31 und NS5-LBC32.

Jedes der Fragmente wurde mit Sal I und BamH I abgebaut. Die abgebauten Fragmente wurden in M13mp19 kloniert. Deren Nucleotidsequenzen wurden unter Verwendung der Sanger'schen Methode bestimmt. Jede der Nucleotidsequenzen ist in den Fig. 7 bis 26 dargestellt.

35 Beispiel 3: Herstellung des Vektors für die Expression des KHCV cDNA Fragmentes in Hefe

3-A: Amplifizierung der KHCV cDNA Fragmente

40 3-A-1: Herstellung der Fragmente K384, K510, K573, K897, K403, und K590

<Stufe 1>

Um an jedes der KHCV cDNA Fragmente, die in den Beispielen 1-C, 1-D und 1-E geklont worden  
 45 waren, ein ubiquitines Gen anzuhängen (im folgenden werden die Gene, hergestellt durch Anhängen oder Verbinden des ubiquitin Gens an die KHCV cDNA Fragmente als UB-KHCV bezeichnet) und um das UB-KHCV in einen Expressionsvektor für Hefen zu klonieren, wurden die folgenden Primers synthetisiert.

Primer PCOREUBI (5'-CTTGGTGTTGAGACTCCGCGGTGGTATGAGCACGAATCTAAACC-3') enthält  
 25 Nucleotide in der 5'-Endregion, überlappend mit der 3'-Endregion des Ubiquitingens und die anderen  
 50 Nucleotide korrespondieren mit der Region vom 343igsten bis zum 360igsten Nucleotid der KHCV-LBC1.

Der Primer PSALCORE14 (5'-GGGGTCGACTATTAGCATGTGAGGGTGTGGATGAC-3') enthält ein stop codon, um die Translation genau nach dem 726igsten Nucleotid zu stoppen, und eine Erkennungsstelle von Sal I.

Der Primer PSALCORE17 (5'-GGGGTCGACTATTAGGGCAGATTCCCTGTTGCATA-3') enthält ein stop  
 55 codon zur Beendigung der Translation direkt nach dem 852igsten Nucleotid und eine Erkennungsstelle von Sal I.

Der Primer PSALCORE22 (5'-GGGGTCGACTATTAAGCGGAATGGGGATGGCAA-3') enthält ein stop codon für das Stoppen der Translation direkt nach dem 915 Nucleotid und eine Erkennungsstelle von Sal I.

Der Primer PK403UBI (5'-CTTGGTGTTGAGACTCCGGTGGTACGGGCATGACCACTGACAA-3') enthält 25 Nucleotide an der 5'-Endregion, die die gleiche ist wie jene von PCOREUBI. Die anderen Nucleotide sind dafür bestimmt, die Translation vom 6649igsten Nucleotid der KHCV-LBC1 einzuleiten.

5 Der Primer PK573UBI (5'-CTTGGTGTTGAGACTCCGGTGGTACGGACAGGCGCCCTGA-3') enthält 25 Nucleotide in der 5'-Endregion, die gleich ist mit jener der POOREUBI. Die anderen Nucleotide sind dafür bestimmt, die Translation vom 7612 Nucleotid der KHCV-LBC1 einzuleiten.

Der Primer PK403SAL (5'-GACTGGTCGACTATTACTCTTGCAGGCCACAAGAGGTT-3') ist dafür bestimmt, die Translation direkt nach dem 7050igsten Nucleotid der KHCV-LBC1 zu stoppen und besitzt eine Erkennungsstelle des Sal I und 2 stop codons (TAATAG).

10 Der Primer PK897UBI (5'-CTTGGTGTTGAGACTCCGGTGGTGGATTCATACCCG-3') enthält 25 Nucleotide in der 5'-Endregion, die gleich ist mit jener des PCOREUBI und die anderen Nucleotide sind dazu ausgebildet, die Translation vom 3916 Nucleotid des KHCV-LBC1 einzuleiten.

15 Der Primer PK897SAL (5'-GACTGGTCGACTATTACACGTATTACAGTCGATCAC-3') ist dazu bestimmt, die Translation direkt nach dem 4713. Nucleotid der KHCV-LBC1 zu stoppen und weist eine Erkennungsstelle des Sal I und 2 stop codons (TAATAG) auf.

Der Primer PK573SAL (5'-GACTGGTCGACTATTAGTACTGGAATCCGTATGAGGAG-3') ist dazu ausgebildet, die Translation direkt nach dem 8184igsten Nucleotid der KHCV-LBC1 zu stoppen und weist eine Erkennungsstelle von Sal I und 2 stop codons (TAATAG) an der 3'-Endstelle auf.

20 Der Primer P426B (5'-GGGTGGGCAGGATGGCTCCTG-3') besteht aus der Region vom 616 bis zum 636igsten Nucleotid der KHCV-LBC1.

Der Primer P240B (5'-CCTGTTGCATAGTTACGCCGT-3') besteht aus der Region vom 842igsten bis zum 821igsten Nucleotid der KHCV-LBC1.

Der Primer P652B (5'-GTCATTCCAAGAAGAAATGTGACGAGCTCGCTGCAAAG-3') besteht aus der Region vom 4523igsten bis zum 4560igsten Nucleotid der KHCV-LBC1.

25 Der Primer P403B (5'-GCTGACCTCATTGAGGCCAACCTTTGT-3') besteht aus der Region vom 7012. bis zum 7039igsten Nucleotid der KHCV-LBC1.

<Stufe 2>

30 Ein einzelnes cDNA Fragment wurde aus 3 Klonen hergeteilt, nämlich aus KHCV426, KHCV240 und KHCV513, die einander überlappen, wie folgt. Zu einer Mischung von 2,0 $\mu$ g PCOREUBI, 0,02 $\mu$ g P426B, 2 $\mu$ g P240B und 50ng KHCV-LBC1 NA wurden 10 $\mu$ l 10 x Taq Polymerase-Pufferlösung, 10 $\mu$ l 10mM dNTP's Mischung und 2,5 units der Taq Polymerase zugegeben. Destilliertes Wasser wurde hinzugefügt, um das Gesamtvolumen auf 100 $\mu$ l einzustellen. Eine erste PCR wurde dann durchgeführt, indem 25x der thermische Zyklus des Referenzbeispiels 7 wiederholt wurde. Die resultierende Mischung wurde einer 5% Polyacrylamidgelektrophorese unterworfen, um 500bp des PCR Produktes zu isolieren (im folgenden als PCR Produkt A bezeichnet). Danach wurde unter Verwendung von 50ng des PCR Produktes A und 50ng der KHCV-LBC1 DNA als Matritzen und 2 $\mu$ g PCOREUBI und 2 $\mu$ g PSALCORE22 als Primer eine zweite PCR durchgeführt, wobei die gleichen Bedingungen herrschten wie bei der ersten PCR. Die resultierende 35 Mischung wurde einer 5% Polyacrylamidgelektrophorese unterworfen, um 580bp des Endproduktes zu isolieren (im folgenden als PCR Produkt B bezeichnet), welches sodann in 50 $\mu$ l der TE Pufferlösung gelöst wurde.

40

<Stufe 3>

45 Um weitere PCRs durchzuführen, bei denen das PCR Produkt B gemäß Stufe 2 als Matritze verwendet wurden, wurden 3 verschiedene Teströhren vorbereitet, nämlich Röhrchen A enthaltend 2 $\mu$ g PCOREUBI und 2 $\mu$ g PSALCORE14, Röhrchen B enthaltend 2 $\mu$ g PCOREUBI und 2 $\mu$ g PSALCORE17 und Röhrchen C enthaltend 2 $\mu$ g PCOREUBI und 2 $\mu$ g PSALCORE22, die zusätzlich zu 50ng des PCR Produktes B zu jedem 50 der Röhrchen hinzugefügt wurden.

Andererseits wurden für PCRs, bei denen KHCV-LBC1 DNA als Matritze verwendet wurden, 3 andere verschiedene Teströhren vorbereitet, nämlich Röhrchen D enthaltend 2 $\mu$ g PK897SAL, 0,02 $\mu$ g P652B und 2 $\mu$ g PK897UBI, Röhrchen E enthaltend 2 $\mu$ g PK403SAL und 2 $\mu$ g PK403UBI und Röhrchen F enthaltend 2 $\mu$ g PK573SAL und 0,022 $\mu$ g P403Bb und 2 $\mu$ g PK573UBI, zu denen jeweils 50ng des KHCV-LBC1 zugefügt 55 wurden.

Danach wurden zu jedem der Röhrchen A bis F 10 $\mu$ l 10 x Taq Polymerase-Pufferlösung, 10 $\mu$ l 10mM dNTP's Mischung und 25 units der Taq Polymerase zugegeben. Destilliertes Wasser wurde auf ein Gesamtvolumen von jeweils 100 $\mu$ l hinzugefügt. Die PCRs wurden unter den gleichen Bedingungen

durchgeführt, wie in Stufe 2.

<Stufe 4>

- 5 Die in Stufe 3 erhaltenen PCR Produkte wurden einer 5% Polyacrylamidgelektrophorese unterworfen. Als Resultat wurde bestätigt, daß 384bp der DNA Fragment in Röhrchen A hergestellt wurde, 510bp der DNA in Röhrchen B, 573bp der DNA in Röhrchen C, 798bp der DNA in Röhrchen D, 402bp der DNA in Röhrchen E und 573bp der DNA in Röhrchen F amplifiziert wurden. Die DNA Fragmente wurden mittels der gleichen Polyacrylamidgelektrophorese gereinigt wie zuvor. Die erhielten die Namen Fragment K384, 10 Fragment K510, Fragment K573, Fragment K897, Fragment K403 und Fragment K590.

3-A-2: Herstellung des cDNA Fragmentes, welches das KHCV Hüllprotein kodiert

<Stufe 1>

- 15 Um das synthetisierte ubiquitine Gen mit jedem der E 2N Gene und E 2C Gene, die mit der Region vom 1510 bis zum 2010 Nucleotid und der Region vom 2011 bis 2529igsten Nucleotid der KHCV-LBC1 korrespondiert, zu verbinden, und um jedes zu einem Expressionsvektor von Hefen zu klonieren, wurden die folgenden Primer synthetisiert.
- 20 Der Primer PE2NUBI (5'-CTTGGTGTTGAGACTCCGC GG TG GT GGG CG CA AG GT CG GG CG CT-3') enthält 25 Nucleotide in der 5'-Endregion, die mit der 3'-Endregion des ubiquitininen Gens überlappt. Die anderen Nucleotide entsprechen der Region vom 1510 bis zum 1530igsten Nucleotid der KHCV-LBC1.
- Der Primer PE2NSAL (5'-GACTGGACTATTAAATT CATCCAGGTACAACCGAACCA-3') enthält ein stop codon, um die Translation direkt nach dem 2010 Nucleotid der KHCV-LBC1 zu stoppen, und eine Erkennungsstelle der Sal I.
- 25 Der Primer PE2CUBI (5'-CTTGGTGTTGAGACTCCGC GG TG GT GGG CACTGGG TT CACCAAGACA-3') enthält 25 Nucleotide in der 5'-Region, die Mit den 25 Nucleotiden der 3'-Endregion des Ubiquitingens überlappen. Die anderen Nucleotide entsprechen der Region vom 2011 bis zum 2031igsten Nucleotid der KHCV-LBC1.
- 30 Der Primer PE2CSAL (5'-GACTGGACTATTACCGCTCCGCCAGAAGAAGGAAGAG-3') enthält ein stop codon, um die Translation direkt nach dem 2529igsten Nucleotid des KHCV-LBC1 zu stoppen, und eine Erkennungsstelle der Sal I.

<Stufe 2>

- 35 Das Röhrchen A wurde mit je 2 $\mu$ g PE2NUBI und PE2NSAL und das Röhrchen B jeweils mit 2 $\mu$ g PE2CUBI und PE2CSAL versehen. Zu jedem der Röhrchen A und B wurden 50 $\mu$ g KHCV-LBC1, 10 $\mu$ l 10 x Polymerase Pufferlösung, 10 $\mu$ l 10mM dNTP's Mischung und 2,5 units Taq Polymerase zugegeben. Destilliertes Wasser wurde hinzugefügt, um ein Gesamtvolumen von 100ml einzustellen. Die PCRs wurden 40 durchgeführt, indem 15x der gleich thermische Zyklus durchgeführt wurde, wie in Referenzbeispiel 7.

<Stufe 3>

- 45 Die in Stufe 2 erhaltenen PCR Produkt wurden einer 5% Polyacrylamidgelektrophorese unterzogen. Als Reslat wurde bestätigt, daß 501bp der DNA in Röhrchen A und 519bp der DNA in Röhrchen B amplifiziert worden waren. Die DNAs wurden durch die gleich Polyacrylamidgelektrophorese wie zuvor gereinigt und als Segment E2N und E2C bezeichnet.

3-B: Herstellung des Expressionsvektors für Hefe

- 50 3-B-1: Herstellung von pYLBC-A/G-UB-CORE14, pULBC-A/G-UB-CORE17, pYLBC-A/G-UB-CORE22, pYLBC-A/G-UB-KHCV897, pYLBC-A/G-UB-KHCV403 und pYLBC-A/G-UB-KHCV573

- 55 2 $\mu$ g des Plamides pYLBC-A/G-UB-HGH (ATCC74071) wurden mit Pst I und Sal I in NEB Pufferlösung 3 komplett abgebaut, während 2 $\mu$ g des gleichen Plasmides mit PstI und Sac II in NEB Pufferlösung 4 komplett abgebaut wurden, auf die in Referenzbeispiel 1 hingewiesen ist. Die resultierenden Mischungen wurden einer 0,7% Agarosegelektrophorese unterworfen, um ein 9,8kb Fragment und ein 3,4kb Fragment zu isolieren, welches Fragment PL2 und PT2 genannt wurden.

Unter den Fragmenten der K384, K510, K573, K987, K403 und K590, die in Beispiel 3-A-1 hergestellt worden waren, wurden die Fragmente K897, K403 und K590 mit Sal I und Sac II in einer NEB Pufferlösung 3 vollständig abgebaut. Die Fragmente K384, K510 und K573 wurden mit Sal I in NEB Pufferlösung 3 vollständig abgebaut. Die Produkte wurden mit Phenol/Chloroform extrahiert und mit Ethanol gefällt. Die 5 Auflösung erfolgte mit 20µl TE Pufferlösung. Die Fragmente K384, K510 und K573 wurden weiters partiell abgebaut mit Sac II in NBE Pufferlösung 4 für 10 Minuten. Die Produkte wurden mit Phenol/Chloroform extrahiert und mit Ethanol gefällt. Mit 20µl TE Pufferlösung wurden die Produkte aufgelöst.

Die obigen Fragmente wurden wie folgt zur Ligation verwendet. Das Ligationsröhren A wurde mit 100ng des Fragmentes K384 versehen. Das Ligationsröhren B wurde mit 100ng des Fragmentes K510 10 versehen. Das Ligationsröhren C wurde mit 100ng des Fragmentes K573 versehen. Das Ligationsröhren D wurde mit 100ng des Fragmentes K897 versehen. Das Ligationsröhren E wurde mit 100ng des Fragmentes K403 und das Ligationsröhren F mit 100ng des Fragmentes K590 versehen. Zu jedem der Röhren wurden 100ng des Fragmentes PL2, 100ng des Fragmentes PT2, 2µl 10 x Ligationspufferlösung und 10 units der T4 DNA Ligase zugegeben. Mit destilliertem Wasser wurde ein Gesamtvolume von 20µl eingestellt. Die Ligation wurde für 12 Stunden bei 16 °C durchgeführt.

E. coli HB101 (ATCC 33694) wurde jeweils mit jedem der ligierten Vektoren transformiert.

Der das K384 enthaltende Vektor wurde isoliert und pYLBC-A/G-UB-CORE14 genannt. Der das K510 enthaltende Vektor wurde isoliert und pYLBC-A/G-UB-CORE17 genannt. Der das K573 enthaltende Vektor wurde isoliert und pYLBC-A/G-UB-CORE22 genannt. Der das K897 enthaltende Vektor wurde isoliert und pYLBC-A/G-UB-KHCV897 genannt. Der das K403 enthaltende Vektor wurde isoliert und pYLBC-A/G-UB-KHCV403 genannt. Und der das K590 enthaltende Vektor wurde isoliert und pYLBC-A/G-UB-KHCV573 genannt (siehe Fig. 30).

### 3-B-2: Herstellung von pYLBC-A/G-UB-E2N und pYLBC-A/G-UB-E2C

25 2µg des Plasmides pYLBC-A/G-UB-HGH (ATCC 74071) wurden mit Pst I und Sal I in NEB Pufferlösung 3 komplett abgebaut und 2µg des gleichen Plasmides wurden mit Pst I Sac II in NEB Pufferlösung 4 vollständig abgebaut. Die resultierenden Mischungen wurden einer 0,7% Agarosegelektrophorese unterworfen, um 9,8kb und 3,4kb Fragmente zu erhalten, die Fragment PL2 und Fragment PT2 genannt wurden.

30 Jedes der Fragmente E2N und E2C gemäß Beispiel 3-A-2 wurde vollständig mit Sac II in NEB Pufferlösung 4 und weiters partiell mit Sal I in NEB Pufferlösung 3 abgebaut (digested). Jedes der Produkte wurde mit Phenol/Chloroform abgebaut und mit Ethanol gefällt. Mit 20µl einer TE Pufferlösung wurde aufgelöst. Die Fragmente erhielten die Namen Fragment E2N-T2/L und Fragment E2C-T2/L.

35 Das Ligationsröhren G wurde mit 100ng der E2N-T2/L und das Ligationsröhren F mit 100ng der E2C-T2/L versehen. Zu jenem der Röhren wurden 100ng PL2, 100ng PT2, 2µl 10 x Ligationspufferlösung und 10 units der T4 DNA Ligase hinzugefügt. Mit destilliertem Wasser wurde das Gesamtvolume auf 20µl eingestellt. Die Reaktion wurde für 12 Stunden bei 16 °C ausgeführt. E. coli HB101 (ATCC 33694) wurde mit jedem der Ligationsvektoren transformiert. Der das Fragment E2N-T2/L enthaltende Vektor erhielt den Namen pYLBC-A/G-UB-E2N und der das Fragment E2C-T2/L enthaltende Vektor wurde pYLBC-A/G-UB-40 E2C genannt (siehe Fig. 30).

### 3-C: Transformation der Hefe und Proteinherstellung

45 Die Hefen wurden mit den in Beispiel 3-B-2 hergestellten Expressionsvektoren transformiert, und zwar nach der gleichen Methode wie in Referenzbeispiel 5. Von den transformierten Hefen wurde die mit pYLBC-A/G-UB-KHCV403 transformierte *Saccharomyces cerevisiae* DC 04 (*S. cerevisiae* pYLBC-A/G-UB-KHCV 403) unter der Zugriffsnummer ATCC 74079 am 27. Juni 1991 hinterlegt. Die mit pYLBC-A/G-UB-CORE14 transformierte *Saccharomyces cerevisiae* DC 04 (*S. cerevisiae* DC 04-UB-CORE 14) wurde unter der Zugriffsnummer ATCC 74081 am 1. Juli 1991 hinterlegt. Und die *Saccharomyces cerevisiae* DC 04, 50 transformiert mit pYLBC-A/G-UB-E2C (*S. cerevisiae* DC 04-UB-E2C) wurde unter der Zugriffsnummer TCC 74117 am 11. Dezember 1991 bei der American Type Culture Collection unter den Bestimmungen des Budapest Vertrages für die Internationale Anerkennung der Hinterlegung von Mikroorganismen für den Zweck der Patenterteilung hinterlegt.

Neben den transformierten Hefen wurde *Saccharomyces cerevisiae* DC 04-UB-KHCV403 in 3ml eines 55 leucin-defizienten Mediums (6,7g der HefeNitrogenbase ohne Aminosäuren (Difco Inc., USA), 2,5g Aminosäuremischung ohne Leucin pro Liter und 5% Glusose) bei 30 °C über Nacht kultiviert. Die Kultur wurde in 100ml YEPD Medium transferiert (2% Pepton, 1% Hefeextrakte, 2% Glucose) und bei 30 °C über Nacht kultiviert, um das KHCV Protein herzustellen. Die resultierende Kultur hatte einen O.D. Wert bei 650nm von

etwa 25. Die anderen transformierten Hefen wurden auf gleiche Weise kultiviert, um die KHCV Proteine zu erzeugen.

Jede der Kulturen wurde geerntet, wobei die Menge einem O.D. 650 Wert von 10 entsprach, und zentrifugiert. Jeder der Niederschläge wurde in 400 $\mu$ l einer Pufferlösung (10mM Tris-HCl, pH 7,5, 1mM EDTA, 2mM PMSF (Phenylmethylenesulfonyl-fluoride), 8M Harnstoff suspendiert. Dann wurden mit dem gleichen Volumen Glaskugeln (Durchmesser 0,4mm) stark geschüttelt, um die Zellwände zu zerstören. Die so erhaltenen Hefeextrakte wurden mit 15% Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) behandelt, wobei die Laemmli Methode angewandt wurde (Laemmli et al., Nature, 277, 680 (1970)). Das Gel wurde mit Coomassie brilliant blue R250 gefärbt, um die Bildung des KHCV Proteins zu bestätigen (siehe Fig. 31-A).

Die im Gel getrennten Proteine wurden auf einen Nitrozellulosefilter aufgetragen. Der Filter wurde in PBS (10mM Phosphat, pH 7,0, 0,15 M NaCl) mit einem Gehalt an 0,2% Tween 20 gegeben und für 2 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt, um die nicht spezifische Bindung von IgG an die Proteine zu blockieren. Der Filter wurde in eine IgG Lösung gegeben, die durch Verdünnen von IgG (8,2mg/ml), 15 affinitätsgereinigt von koreanischen HCV Patienten, mit dem 200fachen Volumen von PBS verdünnt hergestellt worden war, welches 0,5% Gelatine und 0,05% Tween 20 enthielt. Dann wurde 1 Stunde bei Raumtemperatur leicht geschüttelt, um das Protein und das IgG reagieren zu lassen. Der Filter wurde dann mit PBS enthaltend 0,2% Tween 20 für 5 Minuten gewaschen und dies 4x. Der Filter wurde in eine anti-human IgG Lösung gegeben, die durch Verdünnen von anti-human IgG-HRP, markiert mit horseradish-20 Peroxidase (Bio-Rad Lab., USA, goat anti-human IgG-HRP) mit dem 200 fachen Volumen PBS, enthaltend 0,5% Gelatin und 0,05% Tween 20, verdünnt wurde und für 1 Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt wurde. Der Filter wurde mit PBS enthaltend 0,2% Tween 20 für 5 Minuten 4x gewaschen und mit 50mM Tris Pufferlösung (pH 7,0) wurde 2x gewaschen.

Zu dem Filter wurden 50mM Tris Pufferlösung mit einem Gehalt von 400 $\mu$ g/ml 4-chlor-1-naphthol und 25 0,03% Hydrogenperoxid gegeben, um eine Farbreaktion zu entwickeln. Die Ergebnisse der obigen Western Blotting Reaktion sind in Fig. 31-B gezeigt. In Fig. 31-B zeigt die Strecke 2 das Resultat des Extraktes der Hefe, die mit pYLBC-A/G-UB-CORE 14 transformiert war. Die Strecke 3 zeigt das Ergebnis der Extrakte der Hefe, transformiert mit pYLBC-A/G-UB-KHCV 897. Die Strecke 5 zeigt das Resultat der Extrakte der mit pYLBC-A/G-UB-KHCV 403 transformierten Hefe. Die Strecke 6 zeigt das Resultat der Extrakte der mit pYLBC-A/G-UB-KHCV 573 transformierten Hefe. Die Strecken 1 und 4 zeigen die Resultate des Extraktes der Hefen ohne KHCV Expressionsvektor. Und die Strecke M representiert den standard protein molecular size marker (unit: kilodaton).

Die Fig. 32 zeigt SPS-PAGE und Western Blotting Resultate, um die Bildung der E2N und E2C Proteine zu bestätigen. In Fig. 32 zeigt die Strecke 1 die Extrakte der Hefe, transformiert mit einem Plasmid ohne KHCV-Gen. Die Strecke 2 zeigt die Extrakte der Hefe, transformiert mit pYLBC-A/G-UB-E2N, die Strecken 3 bis 5 zeigen die Extrakte der Hefe, transformiert mit pYLBC-A/G-UB-E2N und die Strecke 6 zeigt die standard molecular size markers, nämlich 200, 97, 72, 43, 29, 18 und 14 kilodaltons vom oberen Rand des Gels.

#### 40 Beispiel 4: Herstellung des Vektors, der in E. coli KHCV cDNA Fragmente exprimiert

##### 4-A: Herstellung des den trp Promotor enthaltenden Expressionsvektors

###### 4-A-1: Herstellung der KHCV cDNA Fragmente

45 Die Fragmente K384, K510, K573, K879, E2N und E2C, hergestellt in den Beispielen 3-A-1 und 3-A-2 wurden verwendet.

Das Hüllfragment 1(E1), welches vom 916 bis zum 1509 Nucleotid der KHCV-LBC1 angeordnet ist, wurde mittels PCR auf die gleiche Weise hergestellt, wie in Beispiel 3-A-1 und wobei die folgenden Primer verwendet wurden:

Primer PEIUBI (5'-CTTGGTGTTGAGACTCCGCGGTGGTTATGAAGTGGGCAACGCGTCC-3') enthaltend 25 Nucleotide in der 5'-Endregion, die mit dem Ubiquitin-Gen überlappen; Region des 916 bis zum 936igsten Nucleotides der KHCV-LBC1.

Primer PEISAL (5'-GACTGGACTATTACCCTGTCACGTGGGTGGTGGTCC-3') enthält ein codon um 55 die Translation nach dem 1509 Nucleotid des KHCV-LBC1 zu terminieren; und eine Erkennungsstelle der Sal I.

4-A-2: Herstellung des Ubiquitingens

&lt;Stufe 1&gt;

- 5 3 verschiedene Oligonucleotide wie unten geoffenbart wurden gemäß der Information auf dem Ubiquitingen hergestellt, wie von Ozkaynak et al., EMBO J. 6, 1429-1439 (1987) berichtet, wobei unter Verwendung eines DNA-Synthesizers folgendes synthetisiert wurde:

10 UBI1: 5`- CCCATAATGCAAATTTCGTCAAAACTCTAACAGGGAGACTATAACCT  
AGAGGTTGAATCTCCGACACTATTGACAACGTCAA-3'

15 UBI2: 5`-TAGTTGCCTTACCAAGCAAAAATCAATCTCTGCTGATCOGGAGGGATACCTT  
CTTTATCTTGAATTTCACTTTGACGTGTCATAGTC-3'

20 UBI3: 5`-ACCAACGGAGTCACACCCAAGTGAAGAGTAGATTCCCTTTGGATGT  
TGTAAGTCAGACAAGTTCTACCATCTCTAGTTGCCTTACCAACCAAAA-3'

Das UBI1 wurde so gebildet, daß es eine Erkennungsstelle Nde I (5'-CATATG-3') am 5'-Ende und etwa 20 Nucleotide aufweist, die mit UBI2 überlappen. Und UBI3 ist so ausgebildet, daß es eine Erkennungsstelle des Sac II (5'-CCGCGG-3') aufweist, ohne irgendeinen Wechsel in der darin kodierten Aminosäuresequenz (siehe Fig. 33).

&lt;Stufe 2&gt;

Zu einer Mischung von 2µg UBI1, 0,02µg UBI2 und 2µg UBI3 wurden 10µl 10 x PCR-Pufferlösung, 30 10µl 2mM dNTP's-Mischung und 0,5µl Taq-Polymerase zugegeben. Mit destilliertem Wasser wurde das Gesamtvolumen auf 100µl eingestellt. Die PCR wurde auf gleiche Weise durchgeführt wie im Referenzbeispiel 7. Die resultierende Mischung wurde einer 5% Polyacrylamidgelektrophorese unterworfen, um 240bp der DNA zu isolieren, die als Fragment Ub bezeichnet wird. Das isolierte Fragment wurde in 20µl TE-Pufferlösung aufgelöst.

35 (4-A-3): Ligation des Ubiquitin-Gens an die KHCV cDNA

Jedes der in Beispiel (4-A-1) hergestellten Fragmente wurde an das Fragment Ub mittels PCR folgt ligiert.

40 Als Primer für die PCR wurden jene Primers verwendet, die in Stufe 1 des Beispiels (3-A-1) und Stufe 1 des Beispiels (4-A-1) hergestellt worden waren.

7 verschiedene Teströhren wurden wie folgt vorbereitet:

Röhrchen A wurde mit 50ng Fragmentes K384, 50ng des Fragmentes Ub, 2µg des Primers UBI1 und 2µg Primers PSALCORE14 versehen. Röhrchen B wurde mit 50ng des Fragmentes K510, des Fragmentes Ub, 45 2µg des Primers UBI1 und 2µg des Primers PSALCORE17 versehen. Röhrchen C wurde mit 50ng des Fragmentes K573, 50ng des Fragmentes Ub, 2µg des Primers UBI1 und 2µg des Primers PSALCORE22 versehen. Röhrchen D wurde mit 50ng des Fragmentes K897, 50ng des Fragmentes Ub, 2µg des Primers UBI1 und 2µg des Primers PKHCV897SAL versehen. Röhrchen E wurde mit 50ng des Fragmentes E2N, 50ng des Fragmentes Ub, 2µg des Primers UBI1 und 2µg des Primers PE2NSAL versehen. Röhrchen F 50 wurde mit 50ng des Fragmentes E2C, 50ng des Fragmentes Ub, 2µg des Primers UBI1 und 2µg des Primers PE2CSAL versehen. Röhrchen G wurde mit 50ng des Fragmentes E1, 50ng des Fragmentes Ub, 2µg des Primers UBI1 und 2µg des Primers PE1SAL versehen.

Zu jedem der Röhrchen wurden 10µl der 10 x Polymerase-Reaktionspufferlösung, 10µl 2mM dNTP's-Mischung und 0,5µl der Taq-Polymerase hinzugefügt. Mit destilliertem Wasser wurde das Gesamtvolumen auf 100µl eingestellt. Die PCRs wurden unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wie in Referenzbeispiel 7. Jedes der PCR-Produkte wurde mit NdeI und SalI in NEB-Pufferlösung 3 abgebaut. Die in den Röhrchen A bis g erhaltenen Fragmente erhielten folgende Fragmentnamen: UBCORE14, UBCORE17, UBCORE22, UBKHCV897, UBE2N, UBE2C und UBE1.

(4-A-4): Herstellung des Expressionsvektors

&lt;Stufe 1&gt;

- 5 2 $\mu$ g des ptrp 332-HGH (siehe horeanische Patentveröffentlichung Nr. 91-457, KFCC-10667) wurden vollständig mit Pst I und Sal I abgebaut und 2 $\mu$ g des Plasmids wurden vollständig mit Pst I und Nde I in NEB-Pufferlösung 4 abgebaut. Die Produkte wurden mittels 0,7% Agarosegel getrennt, wovon 1,5kb und 0,8Kb Fragment isoliert wurden. Diese Fragmente erhielten die Namen Fragmente PB und PS.

10 &lt;Stufe 2&gt;

Unter Verwendung der in Stufe 1 und Beispiel (4-A-3) hergestellten Fragmente wurde die Ligation wie folgt durchgeführt:

- 15 Ligationsröhrenchen A wurde mit 100ng UBCORE14 versehen. Ligationsröhrenchen B wurde mit 100ng UBCORE17 versehen. Ligationsröhrenchen C wurde mit 100ng UBCORE22 versehen. Ligationsröhrenchen D wurde mit 100ng UBKHCV897 versehen. Ligationsröhrenchen E wurde mit 100ng UBE2N versehen. Ligationsröhrenchen F wurde mit 100ng UBE2C versehen. Ligationsröhrenchen G wurde mit 100ng UBE1 versehen. Zu jedem der Röhrchen wurden 100 ng PB, 100ng PS, 2 $\mu$ l 10 x Ligationspufferlösung und 10 unites T4 DNA Ligase hinzugefügt. Mit destilliertem Wasser wurde das Gesamtvolumen jeweils auf 20 $\mu$ l eingestellt. Die 20 Reaktion wurde für 12 Stunden bei 16°C durchgeführt. Jeder der ligierten Vektoren isoliert. Mit jedem der Vektoren wurde E. coli HB101 (ATCC 33694) transformiert. Der das Fragment UBCORE14 enthaltende Vektor wurde isoliert und ptrpH-UB-CORE14 benannt. Der das Fragment UBCORE17 enthaltende Vektor wurde isoliert und ptrpH-UB-CORE17 benannt. Der das Fragment UBCORE22 enthaltende Vektor wurde isoliert und ptrpH-UB-CORE22 benannt. Der das Fragment UBKHCV 897 enthaltende Vektor wurde isoliert 25 und ptrpH-UB-KHCV897 benannt. Der das Fragment UBE2N enthaltende Vektor wurde isoliert und ptrpH-UB-E2C benannt. Der das Fragment UBE2C enthaltende Vektor wurde isoliert und ptrpH-UB-E2C benannt. Der das Fragment UBE1 enthaltende Vektor wurde isoliert und ptrpH-UB-E1 benannt (siehe Fig. 34).

(4-B): Herstellung des Vektors pMAL-KHCV, der den Tac-Promotor enthält (4-B-1): Amplifizierung der KHCV cDNA Fragmente

&lt;Stufe 1&gt;

Um die KHCV cDNA Fragmente in die MBP-fusionierten Proteine in E. coli unter Verwendung des Tac-Promotors zu emprimieren, wurden unter Verwendung eines dNA-Synthesizers die im folgenden beschriebenen Primer synthetisiert:

Primer PK426R :	5'-CTCCGAATTGGTGCCTGCGAGTGCCCC-3'
Primer PK426X :	5'-CACGCTGAGGCATGTGAGGGTGTGATGAC-3'
Primer PSALCORE17 :	5'-GGGGTCGACTATTAGGGCAGATTCCCTGTTGC-3'
40 Primer P426B :	5'-GGGTGGGAGGGATGGCTCCTG-3'
Primer PK513R :	5'-CTCCGAATTGGCACGAGGCTGGAGGACGGCGTGAAC-3'
Primer PK513X :	5'-CACGCTGAGAGGCACCAAGTTCATCATCAT-3'
Primer PK810R :	5'-CTCCGAATTGGCACGAGGGTTCCAGCTGTTCACCTT-3'
Primer PK810X :	5'-CACGCTGAGATTAGCCATGTACAACCGAAC-3'
45 Primer PK798R :	5'-CTCCGAATTGGCACGAGGGACGTGCTGCTCCTAAC-3'
Primer PK798X :	5'-CACGCTGAGCAGAACGAGCGGCCATACGCC-3'
Primer PK754R :	5'-AAAAAGAATTGGCACGAGGCTGCGAGATTGGCTCACACG-3'
Primer PK754X :	5'-AAAAACTCGAGCCGATAGTAGTTCCATAGACTCAACGGG-TATGAATT-3'
50 Primer PK652R :	5'-AAAAAGAATTGGCACGAGGTTCATACCCGTTGAGTCTATG-GAA-3'
Primer PK652X :	5'-ATTATTGTCGACTATCTACTCGAGTCACAGCTTGC-AGCGAGCTCGT-3'
Primer PK403R :	5'-AAAAAGAATTACGGGCATGACCACTGAC-3'
Primer PK403X :	5'-ATTATTCTCGAGTACACTCTTGCCGCCACAAGAG-3'
55 Primer PK271R :	5'-AAAAAGAATTCACTAGCCTTACAGGCCGG-3'
Primer PK271X :	5'-CACGCTGAGTCACGTGACCAGGTAAAGGTC-3'
Primer PK495R :	5'-CCCCGAATTGGCACGAGCGCTGCGGAGGAAAGCAAGTT-3'
Primer PK495X :	5'-AAAAACTCGAGGACCACGTATAAGGCCA-3'

## AT 405 053 B

Primer PK494R : 5' -AAAAGAATTGGCACGAGCGATGCATCTGGTAAAAGGGT-3'  
Primer PK494X : 5'-AAACTCGAGATTGGAGTGAGTTGAGCTT-3'

### <Stufe 2>

5

11 verschiedene Teströßen wurden hergestellt, die die folgenden Primer enthielten (Tube = Röhrchen):

Tube A : Primer PK426R 2 $\mu$ g, Primer PK426X 2 $\mu$ g

Tube B : Primer PK426R 2 $\mu$ g, Primer PK426B 20ng, PSALCORE17 20 $\mu$ g

10

Tube C : Primer PK513R 2 $\mu$ g, Primer PK513X 2 $\mu$ g

Tube D : Primer PK810R 2 $\mu$ g, Primer PK810X 2 $\mu$ g

Tube E : Primer PK798R 2 $\mu$ g, Primer PK798X 2 $\mu$ g

Tube F : Primer PK754R 2 $\mu$ g, Primer PK754X 2 $\mu$ g

Tube G : Primer PK652R 2 $\mu$ g, Primer PK652X 2 $\mu$ g

15

Tube H : Primer PK403R 2 $\mu$ g, Primer PK403X 2 $\mu$ g

Tube I : Primer PK271R 2 $\mu$ g, Primer PK271X 2 $\mu$ g

Tube J : Primer PK495R 2 $\mu$ g, Primer PK495X 2 $\mu$ g

Tube K : Primer PK494R 2 $\mu$ g, Primer PK494X 2 $\mu$ g

20

Zu jedem der Röhrchen wurden 10ng KHCV-LCB1 (ATCC 75008), 10 $\mu$ l 10 x Polymerase-Pufferlösung,

10 $\mu$ l 10mM dNTP's-Mischung und 0,5 $\mu$ l (2 Units) der Taq-Polymerase hinzugefügt. Mit destilliertem Wasser wurde das Gesamtvolumen auf jeweils 100 $\mu$ l eingestellt.

Zu jeder der Peaktionsmisch wurden 50 $\mu$ l Mineralöl zur Verhinderung der Verdampfung hinzugefügt. Die PCRs wurden auf die gleiche Weise ausgeführt wie in Referenzbeispiel 7.

### 25 (4-B-2): Herstellung des Expressionsvektors

2 $\mu$ g des pMAL-CR1 (New England Biolabs Inc., Cat.No. 800, 11099 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA, USA) wurden vollständig mit Eco RI und Sal I in NEB-Pufferlösung 3 abgebaut. Das Produkt wurde mit Phenol/Chloroform extrahiert und mit Ethanol gefällt. Die Fällung wurde in 40 $\mu$ l TE-Pufferlösung aufgelöst.

Die PCR-Produkte gemäß stufe 2 des Beispiels (4-B-1) wurden mit Eco RI und Xho I wie folgt abgebaut:

1 $\mu$ g jedes PCR-Produktes in den Röhrchen A und C bis F, H und J bis M wurden mit Eco RI und Xho I komplett abgebaut. 3 $\mu$ g jedes der PCR-Produkte in den Röhrchen G und I wurden komplett mittels Xho I und dann partiell mittels Eco RI abgebaut. Und 1 $\mu$ g des Produktes in Röhrchen C wurde vollständig mit Eco RI und Sal I abgebaut. Die Eco RI-Xho I und Exo RI-Sal I Fragmente, die somit erhalten worden waren, wurden isoliert und in TE-Pufferlösung auf gleiche Weise aufgelöst wie im Referenzbeispiel 1.

Zu 5 $\mu$ l von jedem der oben genannten cDNA-Fragmente, die mit Eco RI-Xho I und Eco RI und Sal I abgebaut worden waren, wurden 2 $\mu$ l 10 x Ligationspufferlösung, 1 $\mu$ l (50ng) pMAL-CRI, behandelt mit Eco RI und Sal I, und 10 Units T4 DNA Ligase hinzugefügt. Mit destilliertem Wasser wurde das Gesamtvolumen auf 20 $\mu$ l eingestellt. Die Reaktion wurde für 12 Stunden bei 16 °C durchgeführt.

Jeder der ligierten Vektoren wurde isoliert. E. coli HB101 (ATCC 33694) wurde mit jeder der rekombinanten Vektoren transformiert. Die Vektoren in den Röhrchen A bis K wurden folgendermaßen benannt: pMAL-KHCV426, pMAL-KHCV555, pMAL-KHCV513, pMAL-KHCV810, pMAL-KHCV798, pMAL-KHCV754, pMAL-KHCV652, pMAL-KHCV403, pMAL-KHCV271, pMAL-KHCV495 und pMAL-KHCV494.

Der für den oben genannten rekombinanten Vektor verwendete Vektor pMAL-CR1 ist in Fig. 35 beschrieben.

### (4-C): Expression der KHCV cDNA Fragmente in E. coli

50

#### (4-C-1): Expression der KHCV cDNA Fragmente durch einen Vektor, der trp-Promotor enthält

### <Stufe 1>

55

E. coli W3110(ATCC 38335) wurde mit jedem der Plasmide aus dem Beispiel (4-A) transformiert. Davon wurde E. coli W3110, transformiert mit ptrpH-UB-KHCV897 (E.coli W3110 ptrpH-UB-KHCV 897), unter der Zugriffsnummer ATCC 69640 am 27. Juni 1991 hinterlegt. E. coli W3110, transformiert mit ptrpH-UB-CORE17 (E. coli W3110 ptrpH-UB-COR 17), wurde unter der Zugriffsnummer ATCC 68641 am 27. Juni

1991 hinterlegt. E. coli W3119, transformiert mit ptrpH-UB-CORE14 (E.coli W3110 ptrpH-UB-CORE 14), wurde unter der Zugriffsnummer ATCC 686442 am 1. Juli 1991 hinterlegt. E. coli W3119, transformiert mit ptrpH-UB-E1 (E.coli W3110 ptrpH-UB-E 1), wurde unter der Zugriffsnummer ATCC 68878 am 11. Dezember 1991 hinterlegt. E. coli W3110, transformiert mit ptrpH-UB-E2N (E. coli W3110 ptrpH-UB-E2N), wurde unter der Zugriffsnummer ATCC 68966 am 22. April 1992 hinterlegt, wobei die Hinterlegung bei der American Type Culture Collection unter den Bestimmungen des Budapest Vertrages für die internationale Anerkennung der Hinterlegung von Mikroorganismen für den Zweck der Patenterteilung erfolgte.

Der mit ptrpH-UB-CORE14 transformierte E. coli wurde unter Schütteln in liquid LB-Medium kultiviert (1% Bacto-Trypton, 0,5% Hefeextrakte, 1% NaCl), welches 50µg/ml Ampicillin enthielt, bei 37° für 12 Stunden. 5ml der Kultur wurden in 11 M9-Medium transferiert (40mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 22mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8,5mM NaCl, 18,7mM NH<sub>4</sub>Cl, 1% Glukose, 0,1mM MgSO<sub>4</sub>, 0,01mM CaCl<sub>2</sub>, 0,4% Casaminosäure, 1µl/ml Vit. B<sub>1</sub>, 40µg/ml Ampicillin). Es wurde unter Schütteln für 3 bis 4 Stunden bei 37°C kultiviert. Sobald dessen O.D.-Wert bei 650nm den Wert 0,5 erreichte, wurde Indolacrylsäure (IAA) der Kultur zugegeben, um die Endkonzentration auf 1,4mM einzustellen. Nach 5 Stunden wurde die resultierende Kultur bei 3000 rpm für 25 Minuten zentrifugiert, um den E. coli Zellniederschlag zu sammeln.

Die anderen rekombinanten E. coli-Zellen wurden auf die gleiche Weise kultiviert, um die KHCV-Proteine herzustellen.

#### <Stufe 2>

Jede der Zellen wurde in der Pufferlösung suspendiert und dann einer 15% SDS-PAGE unter Anwendung der Laemmli's Methode unterworfen (Nature 227, 680 (1970)), um die Expression des Ubiquitin-KHCV Proteins zu bestätigen. Die Resultate sind in den Fig. 36 bis 38 gezeigt.

In Fig. 36 stellt die Strecke M den Standard Molecular Size Marker dar, nämlich 72, 43, 29 und 18 Kilodaltons vom oberen Rand her. Die Strecke 1 zeigt die Produkte von E. coli mit Plasmid ohne KHCV-Gen. Die Strecke 2 zeigt die Produkte von E. coli, transformiert mit ptrpH-UB-CORE14, wobei 23kd Protein gebildet worden war. Die Strecke 3 zeigt die Produkte des E. coli, transformiert mit ptrpH-UB-CORE17, wobei 27kd Protein gebildet worden war. Die Strecke 4 zeigt die Produkte des E. coli, transformiert mit ptrpH-UB-CORE22, wobei 29kd Protein gebildet worden war. Die Strecke 5 zeigt die Produkte des E. coli, transformiert mit ptrpH-UB-KHCV 897, wobei 40kd Protein gebildet worden war und die Strecke 6 zeigt das gereinigte KHCV 897 Protein.

In Fig. 37 zeigt die Strecke 1 die Produkte von E. coli mit Plasmid ohne KHCV-Gen. Die Strecken 2 bis 5 zeigen die Produkte von E. coli, transformiert mit ptrpH-UB-E1, geerntet jeweils nach 2, 4, 6 und 12 Stunden nach der Zugabezeit von IAA und die Strecke 6 stellt die Standard Molecular Size Markers dar, nämlich 72, 43, 29, 18 und 14 Kilodaltons vom oberen Rand her.

In Fig. 38 zeigt die Strecke 1 die Produkte von E. coli mit Plasmid ohne KHCV-Gen. Die Strecke 2 zeigt die Produkte von E. coli, transformiert mit ptrpH-UB-E2C und die Strecke 3 zeigt die Produkte von E. coli, transformiert mit ptrpH-UB-E2N.

Western Blotting wurde auf die gleiche Weise durchgeführt, wie in Beispiel 3-C, um zu bestätigen, daß die in rekombinanten E. coli gebildeten Proteine spezifisch an den KHCV-Antikörper gebunden sind. Die Resultate sind in den Fig. 39 bis 41 dargestellt.

#### 4-C-2: Expression der KHCV cDNA mittels eines Vektors, der einen Tac-Promotor enthält

#### 45 <Stufe 1>

E. coli D1210 (ATCC 27325) wurde mit jedem der in Beispiel 4-B hergestellten Plasmide auf die gleiche Weise transformiert, wie in Referenzbeispiel 4. Unter diesen wurde das E. coli D1210 mit pMAL-KHCV 555 transformiert (E. coli D1210 pMAL-KHCV 555) und wurde unter der Zugriffsnummer 68639 am 27. Juni 50 1991 bei der American Type Culture Collection nach dem Budapest Vertrag hinterlegt.

Der transformierte E. coli wurde in flüssigem LB Medium kultiviert, welches 50µg/ml Ampicillin enthielt wobei für 12 Stunden geschüttelt wurde 5ml der Kultur wurden in 1l des M9 Mediums (6g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5g NaCl, 1g NH<sub>4</sub>Cl, 2µl 1M MgSO<sub>4</sub>, 100µl 20% Glucose, 0,1ml CaCl<sub>2</sub> pro Liter) transferiert und für 3 bis 4 Stunden bei 37°C unter Schütteln kultiviert. Sobald der O.D. Wert bei 650nm den Wert 0,5 erreichte, wurde IPTG zur Kultur hinzugefügt, um deren Konzentration auf 0,2mM einzustellen, Nach 5 Stunden wurde die resultierende Kultur bei 3000rpm für 25 Minuten zentrifugiert, um den E. coli Zellniederschlag zu sammeln.

## &lt;Stufe 2&gt;

Der Zellniederschlag wurde in einer Pufferlösung suspendiert und dann einer 15% SDS-PAGE unter Anwendung der Laemmli's Methode unterworfen (Nature 227, 680 (1970)), um die Expression des KHCV-Proteins zu bestätigen. Die Resultate sind in Fig. 40 dargestellt. In Fig. 42 bedeutet die Strecke M den Standard Molecular Size Marker. Die Strecke 1 zeigt die Produkte des E. coli, transformiert mit pMAL-CR1, wobei 40kd Protein hergestellt worden war. Die Strecke 2 zeigt die Produkte von E. coli, transformiert mit pMAL-KHCV 426, wobei 65kd Protein (MBP-KHCV 426 Protein) hergestellt worden war. Die Strecke 3 zeigt die Produkte von E. coli, transformiert mit pMAL-KHCV 555, wobei 70kd Protein (MBP-KHCV 555 Protein) hergestellt worden war. Die Strecke 4 zeigt die Produkte des E. coli, transformiert mit pMAL-KHCV 513, wobei 65kd Protein (MBP-KHCV 513 Protein) hergestellt worden war. Die Strecke 5 zeigt die Produkte des E. coli, transformiert mit pMAL-KHCV 810, wobei 75kd Protein (MBP-KHCV 810 Protein) hergestellt worden war. Die Strecke 6 zeigt die Produkte des E. coli, transformiert mit pMAL-KHCV798, wobei 72kd Protein (MBP-KHCV 798 Protein) hergestellt worden war. Die Strecke 7 zeigt die Produkte des E. coli, transformiert mit pMAL-KHCV 27, wobei 50kd Protein (MBP-KHCV 271 Protein) hergestellt worden war. Die Strecke 8 zeigt die Produkte des E. coli, transformiert mit pMAL-KHCV 754, wobei 72kd Protein (MBP-KHCV 754 Protein) hergestellt worden war.

Die Strecke 9 zeigt die Produkte des E. coli, transformiert mit pMAL-KHCV 652, wobei 70kd Protein (MBP-KHCV 652 Protein) hergestellt worden war. Die Strecke 10 zeigt die Produkte des E. coli, transformiert mit pMAL-KHCV 403, wobei 65kd Protein (MBP-KHCV 403 Protein) hergestellt worden war. Die Strecke 11 zeigt die Produkte des E. coli, transformiert mit pMAL-KHCV 495, wobei 70kd Protein (MBP-KHCV 495 Protein) hergestellt worden war. Die Strecke 12 zeigt die Produkte des E. coli, transformiert mit pMAL-KHCV 494, wobei 70kd Protein (MBP-KHCV 494 Protein) hergestellt worden war.

Western Blotting wurde auf die gleiche Weise ausgeführt wie in Beispiel 3-C, um zu bestätigen, daß die obigen Proteine spezifisch mit dem KHCV-Antikörper verbunden sind. Die Resultate sind in Fig. 43 dargestellt.

4-C-3: Abbau des MBP vom fusionierten Protein

Jedes der MBP-fusionierten Proteine wurde zu einer Faktor Xa Pufferlösung (20mM Tris-HCl, pH 8,0, 100mM NaCl, 2mM CaCl<sub>2</sub>, 1mM Azid) für 24 Stunden dialysiert. 0,2µg jedes dialysierten Proteins (1mg/ml) wurde dann mit 0,2µg des Faktor Xa vermischt (New England Biolabs Inc., Cat. #800-10L). Die Reaktionsmischung wurde für 24 Stunden bei Raumtemperatur stehengelassen.

Jede der resultierenden Mischungen wurde auf 100°C für 5 Minuten erhitzt. Die Produkte wurden der SDS-PAGE auf gleiche Weise unterworfen, wie in Beispiel 1-C, um zu bestätigen, daß die MBPs von ihren fusionierten Proteinen entfernt worden waren. Die MBP-entfernten Proteine wurden wie folgt bekannt: KHCV 426 Protein, KHCV 555 Protein, KHCV 513 Protein, KHCV 810 Protein, KHCV 798 Protein, KHCV 271 Protein, KHCV 754 Protein, KHCV 652 Protein, KHCV 403 Protein, KHCV 495 Protein und KHCV 494 Protein.

Wie oben beschrieben, könnten verschiedene Längen und Sequenzen der KHCV cDNAs für die Herstellung von Expressionsvektoren mittels PCR Methode unter Verwendung verschiedener Kombinationen der Primer hergestellt werden. Daher ist es offensichtlich, daß auf Basis der oben stehenden Offenbarung vom Fachmann andere ähnliche KHCV cDNA Fragmente leicht synthetisiert werden können. Es ist weiters offensichtlich, daß durch den Fachmann auf Basis der obigen Offenbarung andere KHCV-Antigen-Proteine leicht synthetisiert werden können, da solche KHCV-Antigen-Proteine von der KHCV cDNA abhängig sind. Weiters ist es offensichtlich, daß für die Herstellung der KHCV cDNAs und KHCV-Antigen-Proteine nicht nur die in den Beispielen verwendeten Enzyme, Linker und andere Materialien eingesetzt werden können, sondern auf deren Äquivalente.

50 Beispiel 5: Reinigung des KHCV-Proteins, exprimiert in Hefezellen5-A: Reinigung des KHCV 403 ProteinsStufe 1: Kultur rekombinanter Hefezellen

Saccharomyces cerevisiae DC04-UB-KHCV 403, transformiert mit einem Vektor (pYLBC-A/G-UB-KHCV 403), enthaltend ein KHCV 403 cDNA Fragment und ein Ubiquitin-Gen wurde in 10ml eines Mediums mit Mangel an Leucin (0,67% Hefestickstoffbase ohne Aminosäure, 5% Glucose und 0,25% einer Mischung von

- Aminosäuren ohne Leucin) bei 30 °C für 12 Stunden kultiviert. Dann wurde die Kultur in 100ml YEPD Medium transferiert, welches 5% Glucose (2% Pepton, 1% Hefeextrakt, 5% Glucose) enthielt und es wurde unter Schütteln bei einer Temperatur von 30 °C für etwa 6 Stunden kultiviert. Die Kultur wurde in 1l YEPD Medium transferiert, welches 5% Glucose enthielt, und bei 30 °C für 6 Stunden kultiviert, um eine Impfkultur für die Fermentation zu erhalten.
- 5 101 YEPD Medium, enthaltend 2% Glucose wurde in einen 14l Fermenter eingefüllt (Bench Top Fermentor: NBS Company, USA). Die Impfkultur wurde zugeführt und unter Schütteln bei einer Geschwindigkeit von 250rpm und bei 30 °C für etwa 48 Stunden kultiviert. Die Kultur wurde bei einer Geschwindigkeit von 2500rpm für 20 Minuten mit einer Zentrifuge (Beckman J-6B, Rotor JS 4.2) zentrifugiert, um einen
- 10 Schlamm mit rekombinannten Hefezellen zu erhalten.

Stufe 2: Aufbrechen der Hefezellen

Die in Stufe 1 erhaltenen rekombinannten Hefezellen wurden in 500ml Puffer suspendiert (50mM Tris, pH 8,5, 5mM EDTA, 10mM β-mercaptoethanol, 1mM Phenylmethysulfonylfluorid, 1µg/ml Pepstatin A) und Glasperlen mit einem Durchmesser von 0,4mm wurden in einer Menge zugegeben, die äquivalent 50% (v/v) zum totalen Volumen war. Das Ergebnis wurde bei 4 °C für 5 Minuten mit einem Homogenisator homogenisiert (Bead Beater, Biospec Product, USA), um die Zellmembranen aufzubrechen. Die aufgebrochenen Zellen wurden unter Verwendung eines Filters (Whatman, 3MM, USA) filtriert, um die Glasperlen zu entfernen und das Hefehomogenisat zu erhalten.

Stufe 3: Identifikation des spezifischen Antigen-Proteins

Eine kleine Menge des Hefehomogenisats der Stufe 2 wurde einer 15% SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese unterzogen. Das Resultat zeigte, daß die Ubiquitine in den Zellen ausgeschnitten (excised) waren und die von der KHCV 403 cDNA exprimierten Proteine (im folgenden bezeichnet als KHCV 403 Protein) wurden mit einem Molekulargewicht von etwa 17.000 Dalton hergestellt.

Die auf dem Gel getrennten Proteine wurden auf einen Nitrozellulosefilter übertragen (blotted). Dann wurde der Filter in eine phosphatgepufferte Salzlösung (PBS: 10mM Phosphat, 0,15M NaCl, pH 7,0) gegeben, die 0,5% Tween-20 in einer Schale enthielt, wobei bei Raumtemperatur für 2 Stunden leicht gerührt wurde, um die nichtspezifische Bindung des Immunoglobulins G zu blockieren. Daraufhin wurde Immunoglobulin G (8,2mg/ml), welches vom Serum eines Patienten mit koreanischer Hepatitis C affinitätsgereinigt worden war, in einem Verhältnis von 1/200 (v/v) mit PBS verdünnt, welches 0,5% Gelatine und 0,05% Tween 20 enthielt. 10ml des verdünnten IgG wurden dem Filter hinzugefügt. Die Schale wurde bei Raumtemperatur für 1 Stunde leicht geschüttelt. Der Filter wurde 4x für 5 Minuten jeweils mit PBS gewaschen, welches 0,05% Tween-20 enthielt. Ein anti-human Immunoglobulin G markiert mit horseradish Peroxidase (Bio Rad Lab, Goat Anti-Human IgG-HRP) wurde mit PBS, welches 0,5% Gelatine und 0,05% Tween-20 enthielt, in einem Verhältnis von 1/200 (V/V) verdünnt und dem Filter zugegeben. Der Filter wurde unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur für 1 Stunde reagieren gelassen. Der Filter wurde 4x für 5 Minuten jeweils mit PBS gewaschen welches 0,05% Tween-20 enthielt und dann 2x mit 50mM Tris Puffer (pH 7,0). Zu dem Filter wurde ein 50mM Tris Puffer (pH 7,0) hinzugefügt, der 400µg/ml 4-chlor-1-naphtol enthielt, und 0,03% Wasserstoffperoxyd zur Entwicklung der Farbreaktion. Das Resultat zeigte, daß das KHCV 403 Protein eines gesamten Hefehomogenisats alleine immunologisch mit dem Serum des Patienten mit Hepatitis C reagierte, um ein sichtbares Band auszubilden. Daher ist dieses KHCV 403 Protein alleine ein immunoreaktives Protein, welches sie mit Antikörpern gegen KHCV binden kann.

Stufe 4: Entfernung des gelösten Proteins

Das in Stufe 2 erhaltene Hefehomogenisat wurde bei 11.000rpm mit einer Zentrifuge (Beckman J2-21, Rotor JA 14) zentrifugiert, um den Überstand zu entfernen und den unlöslichen Niederschlag zu erhalten, der das KHCV 403 Protein enthält.

Stufe 5: Auflösung und Fraktionierung des Niederschlags mit Harnstoff

Der in Stufe 4 erhaltene Niederschlag wurde in 750ml eines Puffers (50mM Tris, pH 8,5, 5mM EDTA, 10mM β-mercaptoethanol, 1mM Phenylmethysulfonylfluorid, 1µg/ml Pepstatin A), der 8M Harnstoff enthielt, gelöst. Die Lösung wurde zentrifugiert, um die ungelösten Niederschläge zu entfernen und den Überstand zu sammeln. Der Überstand wurde mit einem Puffer (10mM Tris, pH 9,0, 2mM EDTA, 5mM β-mercaptoet-

## AT 405 053 B

hanol) mit einem Gehalt an 2M Harnstoff dialysiert und zentrifugiert, um die Niederschläge zu entfernen und einen Überstand zu erhalten, der das KHCV 403 Protein enthielt.

### Stufe 5: Auflösung und Fraktionierung des Niederschlages mit Harnstoff

5 Der in Stufe 4 erhaltene Niederschlag wurde in 750ml eines Puffers (50mM Tris, pH 8,5, 5mM EDTA, 10mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 1mM Phenylmethylsulfonylfluorid, 1 $\mu$ g/ml Pepstatin A), der 8M Harnstoff enthielt, gelöst. Die Lösung wurde zentrifugiert, um die ungelösten Niederschläge zu entfernen und den Überstand zu sammeln. Der Überstand wurde mit einem Puffer (10mM Tris, pH 9,0, 2mM EDTA, 5mM  $\beta$ -mercaptoethanol) mit einem Gehalt an 2M Harnstoff dialysiert und zentrifugiert, um die Niederschläge zu entfernen und ein Überstand zu erhalten, der das KHCV 403 Protein enthielt.  
10  
15

### Stufe 6: Erste DEAE Ionentausch-Chromatographie

15 Der in Stufe 5 erhaltene Überstand wurde über eine DEAE-Sepharosesäule (Pharmacia, FF, 5cm x 15cm, USA) geschickt, die mit einem Puffer (10mM Tris, pH 9,0, 2mM EDTA, 5mM  $\beta$ -mercaptoethanol) mit einem Gehalt von 2M Harnstoff äquilibriert worden war. Die gebundenen Proteine wurden eluiert, indem 750ml eines Puffers (10mM Tris, pH 9,0, 2mM EDTA, 5mM  $\beta$ -mercaptoethanol) mit einem Gehalt an 0,2M Natriumchlorid hinzugefügt wurden.  
20

### Stufe 7: Zweite DEAE Ionentausch-Chromatographie

25 Die Proteinfraktionen, die das KHCV 403 Protein enthielten, wurden gesammelt und mit einem Puffer (10mM Tris, pH 9,0, 2mM EDTA, 5mM  $\beta$ -mercaptoethanol) dialysiert, um den Harnstoff zu entfernen, und wurden dann über eine DEAE-Sepharosesäule geschickt, die mit diesem Puffer äquilibriert worden war. Ein Puffer (10mM Tris, pH 9,0, 2mM EDTA, 4mM  $\beta$ -mercaptoethanol) enthaltend 0,1M Natriumchlorid, wurde  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65  
70  
75  
80  
85  
90  
95  
100  
105  
110  
115  
120  
125  
130  
135  
140  
145  
150  
155  
160  
165  
170  
175  
180  
185  
190  
195  
200  
205  
210  
215  
220  
225  
230  
235  
240  
245  
250  
255  
260  
265  
270  
275  
280  
285  
290  
295  
300  
305  
310  
315  
320  
325  
330  
335  
340  
345  
350  
355  
360  
365  
370  
375  
380  
385  
390  
395  
400  
405  
410  
415  
420  
425  
430  
435  
440  
445  
450  
455  
460  
465  
470  
475  
480  
485  
490  
495  
500  
505  
510  
515  
520  
525  
530  
535  
540  
545  
550  
555  
560  
565  
570  
575  
580  
585  
590  
595  
600  
605  
610  
615  
620  
625  
630  
635  
640  
645  
650  
655  
660  
665  
670  
675  
680  
685  
690  
695  
700  
705  
710  
715  
720  
725  
730  
735  
740  
745  
750  
755  
760  
765  
770  
775  
780  
785  
790  
795  
800  
805  
810  
815  
820  
825  
830  
835  
840  
845  
850  
855  
860  
865  
870  
875  
880  
885  
890  
895  
900  
905  
910  
915  
920  
925  
930  
935  
940  
945  
950  
955  
960  
965  
970  
975  
980  
985  
990  
995  
1000  
1005  
1010  
1015  
1020  
1025  
1030  
1035  
1040  
1045  
1050  
1055  
1060  
1065  
1070  
1075  
1080  
1085  
1090  
1095  
1100  
1105  
1110  
1115  
1120  
1125  
1130  
1135  
1140  
1145  
1150  
1155  
1160  
1165  
1170  
1175  
1180  
1185  
1190  
1195  
1200  
1205  
1210  
1215  
1220  
1225  
1230  
1235  
1240  
1245  
1250  
1255  
1260  
1265  
1270  
1275  
1280  
1285  
1290  
1295  
1300  
1305  
1310  
1315  
1320  
1325  
1330  
1335  
1340  
1345  
1350  
1355  
1360  
1365  
1370  
1375  
1380  
1385  
1390  
1395  
1400  
1405  
1410  
1415  
1420  
1425  
1430  
1435  
1440  
1445  
1450  
1455  
1460  
1465  
1470  
1475  
1480  
1485  
1490  
1495  
1500  
1505  
1510  
1515  
1520  
1525  
1530  
1535  
1540  
1545  
1550  
1555  
1560  
1565  
1570  
1575  
1580  
1585  
1590  
1595  
1600  
1605  
1610  
1615  
1620  
1625  
1630  
1635  
1640  
1645  
1650  
1655  
1660  
1665  
1670  
1675  
1680  
1685  
1690  
1695  
1700  
1705  
1710  
1715  
1720  
1725  
1730  
1735  
1740  
1745  
1750  
1755  
1760  
1765  
1770  
1775  
1780  
1785  
1790  
1795  
1800  
1805  
1810  
1815  
1820  
1825  
1830  
1835  
1840  
1845  
1850  
1855  
1860  
1865  
1870  
1875  
1880  
1885  
1890  
1895  
1900  
1905  
1910  
1915  
1920  
1925  
1930  
1935  
1940  
1945  
1950  
1955  
1960  
1965  
1970  
1975  
1980  
1985  
1990  
1995  
2000  
2005  
2010  
2015  
2020  
2025  
2030  
2035  
2040  
2045  
2050  
2055  
2060  
2065  
2070  
2075  
2080  
2085  
2090  
2095  
2100  
2105  
2110  
2115  
2120  
2125  
2130  
2135  
2140  
2145  
2150  
2155  
2160  
2165  
2170  
2175  
2180  
2185  
2190  
2195  
2200  
2205  
2210  
2215  
2220  
2225  
2230  
2235  
2240  
2245  
2250  
2255  
2260  
2265  
2270  
2275  
2280  
2285  
2290  
2295  
2300  
2305  
2310  
2315  
2320  
2325  
2330  
2335  
2340  
2345  
2350  
2355  
2360  
2365  
2370  
2375  
2380  
2385  
2390  
2395  
2400  
2405  
2410  
2415  
2420  
2425  
2430  
2435  
2440  
2445  
2450  
2455  
2460  
2465  
2470  
2475  
2480  
2485  
2490  
2495  
2500  
2505  
2510  
2515  
2520  
2525  
2530  
2535  
2540  
2545  
2550  
2555  
2560  
2565  
2570  
2575  
2580  
2585  
2590  
2595  
2600  
2605  
2610  
2615  
2620  
2625  
2630  
2635  
2640  
2645  
2650  
2655  
2660  
2665  
2670  
2675  
2680  
2685  
2690  
2695  
2700  
2705  
2710  
2715  
2720  
2725  
2730  
2735  
2740  
2745  
2750  
2755  
2760  
2765  
2770  
2775  
2780  
2785  
2790  
2795  
2800  
2805  
2810  
2815  
2820  
2825  
2830  
2835  
2840  
2845  
2850  
2855  
2860  
2865  
2870  
2875  
2880  
2885  
2890  
2895  
2900  
2905  
2910  
2915  
2920  
2925  
2930  
2935  
2940  
2945  
2950  
2955  
2960  
2965  
2970  
2975  
2980  
2985  
2990  
2995  
3000  
3005  
3010  
3015  
3020  
3025  
3030  
3035  
3040  
3045  
3050  
3055  
3060  
3065  
3070  
3075  
3080  
3085  
3090  
3095  
3100  
3105  
3110  
3115  
3120  
3125  
3130  
3135  
3140  
3145  
3150  
3155  
3160  
3165  
3170  
3175  
3180  
3185  
3190  
3195  
3200  
3205  
3210  
3215  
3220  
3225  
3230  
3235  
3240  
3245  
3250  
3255  
3260  
3265  
3270  
3275  
3280  
3285  
3290  
3295  
3300  
3305  
3310  
3315  
3320  
3325  
3330  
3335  
3340  
3345  
3350  
3355  
3360  
3365  
3370  
3375  
3380  
3385  
3390  
3395  
3400  
3405  
3410  
3415  
3420  
3425  
3430  
3435  
3440  
3445  
3450  
3455  
3460  
3465  
3470  
3475  
3480  
3485  
3490  
3495  
3500  
3505  
3510  
3515  
3520  
3525  
3530  
3535  
3540  
3545  
3550  
3555  
3560  
3565  
3570  
3575  
3580  
3585  
3590  
3595  
3600  
3605  
3610  
3615  
3620  
3625  
3630  
3635  
3640  
3645  
3650  
3655  
3660  
3665  
3670  
3675  
3680  
3685  
3690  
3695  
3700  
3705  
3710  
3715  
3720  
3725  
3730  
3735  
3740  
3745  
3750  
3755  
3760  
3765  
3770  
3775  
3780  
3785  
3790  
3795  
3800  
3805  
3810  
3815  
3820  
3825  
3830  
3835  
3840  
3845  
3850  
3855  
3860  
3865  
3870  
3875  
3880  
3885  
3890  
3895  
3900  
3905  
3910  
3915  
3920  
3925  
3930  
3935  
3940  
3945  
3950  
3955  
3960  
3965  
3970  
3975  
3980  
3985  
3990  
3995  
4000  
4005  
4010  
4015  
4020  
4025  
4030  
4035  
4040  
4045  
4050  
4055  
4060  
4065  
4070  
4075  
4080  
4085  
4090  
4095  
4100  
4105  
4110  
4115  
4120  
4125  
4130  
4135  
4140  
4145  
4150  
4155  
4160  
4165  
4170  
4175  
4180  
4185  
4190  
4195  
4200  
4205  
4210  
4215  
4220  
4225  
4230  
4235  
4240  
4245  
4250  
4255  
4260  
4265  
4270  
4275  
4280  
4285  
4290  
4295  
4300  
4305  
4310  
4315  
4320  
4325  
4330  
4335  
4340  
4345  
4350  
4355  
4360  
4365  
4370  
4375  
4380  
4385  
4390  
4395  
4400  
4405  
4410  
4415  
4420  
4425  
4430  
4435  
4440  
4445  
4450  
4455  
4460  
4465  
4470  
4475  
4480  
4485  
4490  
4495  
4500  
4505  
4510  
4515  
4520  
4525  
4530  
4535  
4540  
4545  
4550  
4555  
4560  
4565  
4570  
4575  
4580  
4585  
4590  
4595  
4600  
4605  
4610  
4615  
4620  
4625  
4630  
4635  
4640  
4645  
4650  
4655  
4660  
4665  
4670  
4675  
4680  
4685  
4690  
4695  
4700  
4705  
4710  
4715  
4720  
4725  
4730  
4735  
4740  
4745  
4750  
4755  
4760  
4765  
4770  
4775  
4780  
4785  
4790  
4795  
4800  
4805  
4810  
4815  
4820  
4825  
4830  
4835  
4840  
4845  
4850  
4855  
4860  
4865  
4870  
4875  
4880  
4885  
4890  
4895  
4900  
4905  
4910  
4915  
4920  
4925  
4930  
4935  
4940  
4945  
4950  
4955  
4960  
4965  
4970  
4975  
4980  
4985  
4990  
4995  
5000  
5005  
5010  
5015  
5020  
5025  
5030  
5035  
5040  
5045  
5050  
5055  
5060  
5065  
5070  
5075  
5080  
5085  
5090  
5095  
5100  
5105  
5110  
5115  
5120  
5125  
5130  
5135  
5140  
5145  
5150  
5155  
5160  
5165  
5170  
5175  
5180  
5185  
5190  
5195  
5200  
5205  
5210  
5215  
5220  
5225  
5230  
5235  
5240  
5245  
5250  
5255  
5260  
5265  
5270  
5275  
5280  
5285  
5290  
5295  
5300  
5305  
5310  
5315  
5320  
5325  
5330  
5335  
5340  
5345  
5350  
5355  
5360  
5365  
5370  
5375  
5380  
5385  
5390  
5395  
5400  
5405  
5410  
5415  
5420  
5425  
5430  
5435  
5440  
5445  
5450  
5455  
5460  
5465  
5470  
5475  
5480  
5485  
5490  
5495  
5500  
5505  
5510  
5515  
5520  
5525  
5530  
5535  
5540  
5545  
5550  
5555  
5560  
5565  
5570  
5575  
5580  
5585  
5590  
5595  
5600  
5605  
5610  
5615  
5620  
5625  
5630  
5635  
5640  
5645  
5650  
5655  
5660  
5665  
5670  
5675  
5680  
5685  
5690  
5695  
5700  
5705  
5710  
5715  
5720  
5725  
5730  
5735  
5740  
5745  
5750  
5755  
5760  
5765  
5770  
5775  
5780  
5785  
5790  
5795  
5800  
5805  
5810  
5815  
5820  
5825  
5830  
5835  
5840  
5845  
5850  
5855  
5860  
5865  
5870  
5875  
5880  
5885  
5890  
5895  
5900  
5905  
5910  
5915  
5920  
5925  
5930  
5935  
5940  
5945  
5950  
5955  
5960  
5965  
5970  
5975  
5980  
5985  
5990  
5995  
6000  
6005  
6010  
6015  
6020  
6025  
6030  
6035  
6040  
6045  
6050  
6055  
6060  
6065  
6070  
6075  
6080  
6085  
6090  
6095  
6100  
6105  
6110  
6115  
6120  
6125  
6130  
6135  
6140  
6145  
6150  
6155  
6160  
6165  
6170  
6175  
6180  
6185  
6190  
6195  
6200  
6205  
6210  
6215  
6220  
6225  
6230  
6235  
6240  
6245  
6250  
6255  
6260  
6265  
6270  
6275  
6280  
6285  
6290  
6295  
6300  
6305  
6310  
6315  
6320  
6325  
6330  
6335  
6340  
6345  
6350  
6355  
6360  
6365  
6370  
6375  
6380  
6385  
6390  
6395  
6400  
6405  
6410  
6415  
6420  
6425  
6430  
6435  
6440  
6445  
6450  
6455  
6460  
6465  
6470  
6475  
6480  
6485  
6490  
6495  
6500  
6505  
6510  
6515  
6520  
6525  
6530  
6535  
6540  
6545  
6550  
6555  
6560  
6565  
6570  
6575  
6580  
6585  
6590  
6595  
6600  
6605  
6610  
6615  
6620  
6625  
6630  
6635  
6640  
6645  
6650  
6655  
6660  
6665  
6670  
6675  
6680  
6685  
6690  
6695  
6700  
6705  
6710  
6715  
6720  
6725  
6730  
6735  
6740  
6745  
6750  
6755  
6760  
6765  
6770  
6775  
6780  
6785  
6790  
6795  
6800  
6805  
6810  
6815  
6820  
6825  
6830  
6835  
6840  
6845  
6850  
6855  
6860  
6865  
6870  
6875  
6880  
6885  
6890  
6895  
6900  
6905  
6910  
6915  
6920  
6925  
6930  
6935  
6940  
6945  
6950  
6955  
6960  
6965  
6970  
6975  
6980  
6985  
6990  
6995  
7000  
7005  
7010  
7015  
7020  
7025  
7030  
7035  
7040  
7045  
7050  
7055  
7060  
7065  
7070  
7075  
7080  
7085  
7090  
7095  
7100  
7105  
7110  
7115  
7120  
7125  
7130  
7135  
7140  
7145  
7150  
7155  
7160  
7165  
7170  
7175  
7180  
7185  
7190  
7195  
7200  
7205  
7210  
7215  
7220  
7225  
7230  
7235  
7240  
7245  
7250  
7255  
7260  
7265  
7270  
7275  
7280  
7285  
7290  
7295  
7300  
7305  
7310  
7315  
7320  
7325  
7330  
7335  
7340  
7345  
7350  
7355  
7360  
7365  
7370  
7375  
7380  
7385  
7390  
7395  
7400  
7405  
7410  
7415  
7420  
7425  
7430  
7435  
7440  
7445  
7450  
7455  
7460  
7465  
7470  
7475  
7480  
7485  
7490  
7495  
7500  
7505  
7510  
7515  
7520  
7525  
7530  
7535  
7540  
7545  
7550  
7555  
7560  
7565  
7570  
7575  
7580  
7585  
7590  
7595  
7600  
7605  
7610  
7615  
7620  
7625  
7630  
7635  
7640  
7645  
7650  
7655  
7660  
7665  
7670  
7675  
7680  
7685  
7690  
7695  
7700  
7705  
7710  
7715  
7720  
7725  
7730  
7735  
7740  
7745  
7750  
7755  
7760  
7765  
7770  
7775  
7780  
7785  
7790  
7795  
7800  
7805  
7810  
7815  
7820  
7825  
7830  
7835  
7840  
7845  
7850  
7855  
7860  
7865  
7870  
7875  
7880  
7885  
7890  
7895  
7900  
7905  
7910  
7915  
7920  
7925  
7930  
7935  
7940  
7945  
7950  
7955  
7960  
7965  
7970  
7975  
7980  
7985  
7990  
7995  
8000  
8005  
8010  
8015  
8020  
8025  
8030  
8035  
8040  
8045  
8050  
8055  
8060  
8065  
8070  
8075  
8080  
8085  
8090  
8095  
8100  
8105  
8110  
8115  
8120  
8125  
8130  
8135  
8140  
8145  
8150  
8155  
8160  
8165  
8170  
8175  
8180  
8185  
8190  
8195  
8200  
8205  
8210  
8215  
8220  
8225  
8230  
8235  
8240  
8245  
8250  
8255  
8260  
8265  
8270  
8275  
8280  
8285  
8290  
8295  
8300  
8305  
8310  
8315  
8320  
8325  
8330  
8335  
8340  
8345  
8350  
8355  
8360  
8365  
8370  
8375  
8380  
8385  
8390  
8395  
8400  
8405  
8410  
8415  
8420  
8425  
8430  
8435  
8440  
8445  
8450  
8455  
8460  
8465  
8470  
8475  
8480  
8485  
8490  
8495  
8500  
8505  
8510  
8515  
8520  
8525  
8530  
8535  
8540  
8545  
8550  
8555  
8560  
8565  
8570  
8575  
8580  
8585  
8590  
8595  
8600  
8605  
8610  
8615  
8620  
8625  
8630  
8635  
8640  
8645  
8650  
8655  
8660  
8665  
8

50% des Gesamtvolumens war. Die resultierende Menge wurde für 5 Minuten bei 4°C mit einem Homogenisator (Bead Beater, Biospec Product, USA) 3x homogenisiert, um die Zellmembran aufzubrechen und ein Hefehomogenisat zu erhalten.

5 Stufe 3: Identifikation des spezifischen Antigen-Proteins

Eine kleine Menge des Hefehomogenisats der Stufe 2 wurde einer 15% SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese unterworfen und mit Coomassie brilliant blue gefärbt. Das Resultat zeigte, daß das Ubiquitin vom KHCV-Protein ausgeschnitten (excised) war, und das in der KHCV cDNA exprimierte Protein (im folgenden als KHCV CORE 14 Protein bezeichnet) wurde mit einem Molekulargewicht von etwa 16.000 Dalton gebildet.

Western Blotting wurde gemäß Stufe 3 des Beispiele 5-A durchgeführt. Das Resultat deutete darauf hin, daß das KHCV CORE 14 Protein alleine immunologisch reaktiv mit dem Serum des Patienten mit Hepatitis C war, um ein sichtbares Band zu zeigen.

15

Stufe 4: Entfernung des löslichen Proteins und Waschung des unlöslichen Niederschlages

Das in Stufe 2 erhaltene Hefehomogenisat wurde bei 11.000rpm mit einer Zentrifuge zentrifugiert (Beckman J2-21, Rotor JA-14), um die gelösten Proteine zu entfernen und den unlöslichen Niederschlag zu erhalten, der das KHCV CORE 14 Protein enthält. Der Niederschlag wurde in 0,5L PBS suspendiert, welches 1% Triton X-100, 1mM EDTA und 10mM  $\beta$ -mercaptoethanol enthielt, wobei für 10 Minuten gerührt und zentrifugiert wurde. Der Niederschlag wurde einmal mit 10mM Phosphatlösung (pH 6,5) gewaschen.

Stufe 5: Auflösung des Niederschlages mit 8M Harnstoff

25

Der in Stufe 4 erhaltene unlösliche Niederschlag wurde in 10mM Natriumphosphatlösung (pH 6,5) suspendiert, die 8M Harnstoff, 1mM EDTA und 10mM  $\beta$ -mercaptoethanol enthielt. Es wurde für 12 Stunden bei 4°C gerührt, um das KHCV CORE 14 Protein zu lösen. Die Lösung wurde für 20 Minuten bei 15.000rpm mit einer Zentrifuge (Beckman J2-21, Rotor JA20) zentrifugiert, um den Überstand zu erhalten.

30

Stufe 6: CM-Ionentausch-Harz-Chromatographie

Die in Stufe 5 erhaltene Lösung mit dem KHCV CORE 14 Protein wurde mit einer Flußrate von 1ml/min über eine Säule (2,5cm x 10cm) mit 25ml CM (carboxymethyl)-Sephadexharz (Pharmacia, Sweden) geschickt, die mit einem Puffer äquilibriert worden war (pH 6,5) der 6M Harnstoff, 1mM EDTA, 10mM  $\beta$ -mercaptoethanol und 10mM Phosphat enthielt. Die in der Säule in freier Form verbliebenen Materialien wurden mit der genannten äquilibrierenden Pufferlösung gründlich durchgewaschen. Die in der Säule adsorbierten Proteine wurden mit einer Flußrate von 3ml/min mit 500ml der genannten äquilibrierenden Pufferlösung mit einem Konzentrationsgradienten von 0 bis 0,5M Natriumchlorid eluiert. Das Eluat wurde einer SDS Polyacrylamidgel-Elektrophorese unterworfen, wobei sich zeigte, daß das KHCV CORE 14 Protein bei etwa 0,3M Natriumchlorid eluiert wurde. Die das KHCV CORE 14 Protein enthaltenden Fraktionen wurden zur weiteren Verwendung in der nächsten Stufe gesammelt.

Stufe 7: S-200 Gelpermeations-Chromatographie

45

Die in Stufe 6 gewonnenen Fraktionen wurden über eine YM5 Ultrafiltrationsmembran geschickt (Amicon, USA), um auf 10ml zu konzentrieren. Das Konzentrat wurde über eine S-200 Sephadex Säule geschickt (Pharmacia, Sweden, 2,5cm x 100cm), die mit einer PBS Lösung äquilibriert worden war, die 6M Harnstoff, 1mM EDTA und 10mM  $\beta$ -mercaptoethanol enthielt, wobei eine Flußrate von 0,5ml/min eingehalten wurde, um eine Auftrennung nach dem Molekulargewicht vorzunehmen. Die gesammelten Proteinfractionen wurden einer 15% SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese unterworfen. Fraktionen mit hochgereinigtem KHCV CORE 14 Protein wurden gesammelt und mit PBS Puffer bei 4°C dialysiert, um Harnstoff zu entfernen, wobei 4mg des hochreinen KHCV CORE 14 Proteins erzielt wurden.

Es muß verstanden werden, daß die in anderen KHCV cDNA Fragmenten kodierten Proteine, die in Hefe exprimiert werden, ebenso durch andere, ähnlich dem zuvor beschriebenem Verfahren gereinigt werden können.

Beispiel 6: Reinigung des KHCV-Proteins, exprimiert in E. coli

6-A: Reinigung des KHCV UB 897 Proteins

5 Stufe 1: Kultur rekombinanter E. coli

E. coli W3110 pptrH-KHCV 897 (ATCC 68640), transformiert mit einem Vektor (ptrpH-UB-KHCV 897) umfassend ein KHCV 897 cDNA Fragment mit Ubiquitin-Gen, wurde unter Schütteln für 12 Stunden in einem LB Medium (10g Bactotriptone, 5g Hefeextrakt, 10g NaCl pro Liter) enthaltend 50µg/ml Ampizillin 10 kultiviert. 5ml der Kultur wurden in 11 M9 Medium transferiert (40mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 22mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8,5mM NaCl, 18,7mM NH<sub>4</sub>Cl, 1% Glucose, 0,1mM MgSO<sub>4</sub>, 0,1mM CaCl<sub>2</sub>, 04% Casaminoäure, 10µg/ml von Vit. B<sub>1</sub>), welches 40µg/ml Ampizillin enthielt, und unter Schütteln für 3 bis 4 Stunden bei 37°C kultiviert. Indolacrylsäure (IAA) wurde zugegeben, um eine Endkonzentration von 0,14mM einzustellen und KHCV UB 897 Protein zu bilden, wenn der O.D. Wert der Kultur bei 650nm den Wert 0,5 erreichte. Etwa 5 Stunden 15 nach Zugabe der IAA wurde die Zellkultur bei 2.500rpm für 20 Minuten mit einer Zentrifuge (Beckman J-6B, Rotor JS 4,2) zentrifugiert, um einen Niederschlag von E. coli Zellen zu erhalten. Der Niederschlag wurde einmal mit Phosphat gepufferter Salzlösung (10mM Phosphat, pH 7,0, 0,15M Natriumchlorid) gewaschen.

Stufe 2: Aufbrechen der Zellen

20 3g des E. coli Zellniederschlages der Stufe 1 wurden in 40ml eines Puffers (50mM Tris, pH 8,5, 5mM EDTA, 2mM β-mercaptopropanol, 1mM Phenylmethylsulfonylfluorid, 1µg/ml Pepstatin A) suspendiert. 0,3ml einer 50mg/ml Lysozymlösung wurden der Suspension zugegeben, bei 37°C für 1 Stunde stehengelassen und auf Eis mit einem Ultraschallgerät (HEAT SYSTEMS-ULTRASONICS Inc., W225, USA) für 5 Minuten 25 bei einer Ausbeute von 70% Ultraschallwellen unterworfen, um die Zellen aufzubrechen und ein Homogenisat von E. coli Zellen zu erhalten.

Stufe 3: Identifizierung des spezifischen Antigen-Proteins

30 Eine kleine Menge des Homogenisates von E. coli Zellen der Stufe 2 wurde einer 12% SDS-PAGE unterworfen. Das Resultat zeigte an, daß das von diesem Vektor exprimierte KHCV-Protein (nachfolgen bezeichnet als KHCV UB 897 Protein) ein Molekulargewicht von 39.000 Dalton aufwies.

Danach wurden auf Gel getrennte Proteine auf einen Nitrozellulosefilter transferiert und Western-blotting 35 unterworfen, auf gleiche Art wie in der Stufe 3 des Beispiels 5-A. Das Resultat zeigte, daß nur das KHCV UB 897 Protein immunologisch mit dem Serum des Patienten mit Hepatitis C reagierte und ein sichtbares Band zeigte. Im Lichte dieses Resultates ist zu sehen, daß dieses exprimierte KHCV UB 897 Protein ein immunoreaktives Protein ist, welches sich an Antikörper gegen HCV binden kann.

Stufe 4: Entfernung des löslichen Proteins

40 Das in Stufe 2 erhaltenen Zellenhomogenisat wurden bei 11.000rpm für 25 Minuten mit einer Zentrifuge (Beckman J2-21, Rotor JA 14) zentrifugiert, um gelöste Proteine zu entfernen und unlöslichen Niederschlag zu erhalten.

45 Stufe 5: Waschen des unlöslichen Niederschlages mit Triton X-100 und Tris Puffer

Der in Stufe 4 erhaltene Niederschlag wurde in 50ml eines Puffers (50mM Tris, pH 8,5, 5mM EDTA 2mM β-mercaptopropanol) suspendiert, der 1% Triton X-100 enthielt. Die Suspension wurde bei Raumtemperatur für 30 Minuten gerührt und mit 11.000rpm für 25 Minuten mit einer Zentrifuge (Beckman J2-21, Rotor JA 14) zentrifugiert, um den Überstand zu entfernen und den unlöslichen Niederschlag zu erhalten. Darauffolgend wurde der Niederschlag in 50ml eines Puffers (50mM Tris, pH 8,5, 5mM EDTA 2mM β-mercaptopropanol) suspendiert. Die Suspension wurde gerührt und nochmals zentrifugiert, um den Überstand zu entfernen und den unlöslichen Niederschlag zu erhalten.

Nur durch die zuvor beschriebene einfache Waschprozedur wurde ein KHCV UB 897 Protein erhalten, 55 das zumindest eine Reinheit von 60% aufwies.

## AT 405 053 B

### Stufe 6: Auflösen des unlöslichen Niederschlages mit 8M Harnstoff

Der unlösliche Niederschlag, der das KHCV UB 897 Protein enthielt und in Stufe 5 erhalten worden war, wurde in 50ml eines Puffers suspendiert, der 8M Harnstoff enthielt (20mM Phosphat, pH 6,0, 2mM EDTA, 2mM  $\beta$ -mercaptoethanol). Die Suspension wurde bei Raumtemperatur für 1 Stunde gerührt und zentrifugiert, um den unlöslichen Niederschlag zu verwerfen und den Überstand zu erhalten.

### Stufe 7: S-Sepharose Ionentausch-Chromatographie

Der in Stufe 6 erhaltene Überstand wurde über eine S-Sepharosesäule geschickt (Pharmacia, FF, 2,5cm x 7cm, USA), die mit einem Puffer (20mM Phosphat, PH 6,0, 2mM EDTA, 2mM  $\beta$ -mercaptoethanol), der 4M Harnstoff enthielt, äquilibriert worden war und die Säule wurde mit 600ml des Puffers eluiert, der einen Konzentrationsgradienten von 0 bis 0,2M Natriumchlorid aufwies. Die Proteinfraktionen wurden der SDS-PAGE unterworfen, um die Fraktionen zu sammeln, die hochgereinigtes KHCV UB 897 Protein enthielten.

### Stufe 8: Entfernung des Harnstoffs und FPLC-Mono Q Ionentausch-Chromatographie

Die in Stufe 7 gesammelten Proteinfraktionen mit dem KHCV UB 897 Protein wurden gegen einen Puffer (10mM Tris, pH 8,5, 2mM EDTA, 2mM  $\beta$ -mercaptoethanol) dialysiert, um Harnstoff zu entfernen, über eine FPLC-Mono-Q-Ionentauschharzsäule (Pharmacia, HR 5/5) geschickt, die mit diesem Puffer äquilibriert worden war und mit 40ml des Puffers eluiert, der einen Konzentrationsgradienten von 0 bis 0,4M Natriumchlorid aufwies. Die Fraktionen mit hochgereinigtem KHCV UB 897 Protein wurden gesammelt, um ein KHCV UB 897 Protein mit einer Reinheit von wenigstens 90% zu erhalten.

### 25 6-B: Reinigung des KHCV UB CORE 17 Proteins

#### Stufe 1: Kultur des rekombinanten E. coli

E. coli W 3110 ptrpH-UB-CORE 17 (ATCC 68641), transformiert mit einem Vektor (ptrpH-UB-CORE 17) mit einer cDNA eines Hepatitis C Virus und Ubiquitin-Gen wurde in LB Medium kultiviert, welches 50 $\mu$ g/ml Ampicillin, 100 $\mu$ g/ml Tryptophan enthielt, wobei die Kultivierung bei 37 °C für 12 Stunden durchgeführt wurde. 50ml der Kultur wurden in 1l M9 Medium transferiert und bei 37 °C für 6 bis 8 Stunden kultiviert. Ein Zellniederschlag wurde gesammelt, wie in Stufe 1 des Beispiele 6-A beschrieben.

#### 35 Stufe 2: Aufbrechen der Zellen

3g des in Stufe 1 erhaltenen E. coli Zellniederschlages wurden in 20ml einer Pufferlösung (50mM Tris, pH 7,5, 5mM EDTA, 10mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 1mM Phenylmethylsulfonylfuorid, 1 $\mu$ g/ml Pepstatin) bei 4 °C suspendiert. Es wurden 3mg Lysozym zur Suspension zugegeben und für 5 Minuten gerührt. Das resultierende Produkt wurde einer Ultraschallbehandlung für 20 Minuten in einem Eisbad mit einem Ultraschallgerät (Heat Systemas-Ultrasonics, Inc., W225, USA) unterworfen, um die Zellen aufzubrechen und ein Zellhomogenisat zu erhalten.

#### Stufe 3: Identifizierung des spezifischen Antigen-Proteins

45 Dieses in Stufe 2 erhaltene E. coli Zellhomogenisat wurde einer 15% SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese unterzogen und mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt. Das Resultat zeigte an, daß das Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 27.000 Dalton hergestellt worden war (im folgenden bezeichnet als KHCV UB CORE 17 Protein).

50 Nachfolgend wurden die auf Gel getrennten Proteine auf einen Nitrozellulosefilter transferiert, der Western-Blotting unterworfen wurde, wie bei dem gleichen Prozeß in Stufe 3 des Beispiele 5-A. Das Resultat zeigte, daß nur KHCV UB CORE 17 Protein im gesamten E. coli Zellhomogenisat immunologisch reagierte mit dem Serum des Patienten mit Hepatitis C unter Ausbildung eines sichtbaren Bandes.

#### 55 Stufe 4: Behandlung mit Harnstoff

Das in Stufe 2 erhaltene Zellhomogenisat wurde mit 12.000rpm für 20 Minuten mit einer Zentrifuge (Beckman J2-21, Rotor JA2) zentrifugiert, um die unlöslichen Materialien zu entfernen und den Überstand

zu erhalten. Zu dem Überstand wurden 9M Harnstofflösung bis auf eine Endkonzentration von 6M gegeben und bei 4 °C für 12 Stunden gerührt.

Stufe 5: Behandlung mit Säure

5

Zu der in Stufe 4 erhaltenen Lösung wurden 1M Natriumacetat (pH 4,5) bis zu einer Konzentration von 10mM hinzugefügt und 1M Essigsäure bis zu einem pH 5,0. Die Mischung wurde für 1 Stunde gerührt und bei 11.000rpm mit einer Zentrifuge (Beckman J2-21, Rotor JA 14) zentrifugiert, um den Niederschlag zu entfernen und den Überstand zu erhalten.

10

Stufe 6: Mono-S Chromatographie

15

Der in Stufe 5 erhaltene Überstand wurde gereinigt, indem er durch eine FPLC Mono-S Säule (HR 5/5, Pharmacia, Sweden) geschickt wurde. Die UB-CORE 17 Proteinlösung wurde auf die Säule gegeben, die mit Puffer A (pH 5,0) äquilibriert worden war, der 8M Harnstoff, 1mM EDTA, 1mM  $\beta$ -mercaptoethanol und 10mM Essigsäure enthielt, wobei die Säule dann mit dem genannten Puffer A gewaschen wurde. Danach wurde ein Puffer B mit einem Gehalt an 8M Harnstoff, 1mM EDTA, 1mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 10mM Essigsäure und 1M Natriumchlorid schrittweise in einer Menge von 17,5% für die ersten 5 Minuten, 35% während der nächsten 55 Minuten und 100% für letzte 10 Minuten mit einer Flußrate von 0,8ml/min zugegeben, um das Protein zu eluieren. Das KHCV UB-CORE 17 Protein wurde eluiert, sobald die Menge des Puffers B 25% erreichte, das heißt, als die Konzentration des Natriumchlorides 0,25M betrug.

Stufe 7: S-200 Gel-Permeation-Chromatographie

25

Die in Stufe 6 erhaltene Proteinlösung wurde über eine S-200 Sephadryl Säule geschickt (Pharmacia, Sweden, 2,5cm x 100cm), äquilibriert mit einer PBS Lösung enthaltend 6M Harnstoff, 1mM EDTA und 1mM  $\beta$ -mercaptoethanol, wobei eine Flußrate von 0,5ml/min eingestellt war, um eine Trennung nach dem Molekulargewicht vorzunehmen. Es wurden Proteinfaktionen gesammelt und der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese unterworfen, um jene Fraktionen zu sammeln, die das KHCV UB-CORE 17 Protein enthielten. Die Fraktionen wurden gegen eine PBS Lösung bei 4 °C dialysiert um 4mg KHCV UB-CORE 17 Protein mit einer Reinheit von wenigstens 90% zu erhalten.

6-C: Reinigung des UB-E1 Proteins

35

Stufe 1: Kultur rekombinanter Bakterienzellen

E. coli W3110 ptrpH-UB-E1 (ATCC 68878), der fähig ist, ein fusioniertes Protein aus KHCV E1 Protein und Ubiquitin (UB) herzustellen, wurde kultiviert und gesammelt, gemäß dem gleichen Prozeß wie in Stufe 1 des Beispiele 6-A.

40

Stufe 2: Aufbrechen der Zellen

Der in Stufe 1 erhaltene Bakterienzellniederschlag wurde in 50ml eines Puffers 1 (20mM Tris, pH 7,5, 1mM EDTA, 2mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 1mM Phenylmethylsulfonylfluorid, 1 $\mu$ g/ml Pepstatin A) suspendiert. Eine Lysozymlösung wurde zur Suspension bis zu einer Endkonzentration von 0,2mg/ml zugegeben, bei 37 °C für 30 Minuten kultiviert und einer Ultraschallbehandlung auf Eis unterworfen. Die Behandlung erfolgte mit einem Ultraschallgerät mit einer Ausbeute von 70% für 5 Minuten, um die Zellen aufzubrechen und das Homogenisat zu erhalten.

50

Stufe 3: Identifizierung der Expression des spezifischen Antigens

Das in Stufe 2 erhaltene Homogenisat wurde einer 15% SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese unterzogen, wobei sich ergab, daß mit dem Vektor Proteine mit einem Molekulargewicht von etwa 27.000 Dalton exprimiert worden waren (im folgenden als UB-E1 Protein bezeichnet).

55

Die auf dem Gel getrennten Proteine wurden auf einen Immobilon P Filter abgedrückt (MILLIPORE. Cat. No. IPUH 00010, Porengröße 0,45 $\mu$ m) und auf die gleiche Weise wie in Stufe 3 des Beispiele 5-A dem Western-Blotting unterworfen.

## AT 405 053 B

Das Resultat zeigte, daß nur das UB-E1 Protein im gesamten Zellhomogenisat immunologisch mit dem Serum des Patienten mit Hepatitis C reagiert hatte, um ein sichtbares Band zu erzeugen.

### Stufe 4: Entfernung des löslichen Proteins

5 Das in Stufe 2 erhaltene Zellhomogenisat wurde bei 11.000rpm für 25 Minuten mit einer Zentrifuge (Beckman J2-21, Rotor JA14) zentrifugiert, um die löslichen Proteine zu entfernen und den unlöslichen Niederschlag zu erhalten.

### 10 Stufe 5: Waschen des unlöslichen Niederschlages

Der in Stufe 4 erhaltene Niederschlag wurde in 30ml eines Puffers 1 (20mM Tris, pH 7,5, 1mM EDTA, 2mM  $\beta$ -mercaptoethanol) suspendiert, der 1% Triton X-100 enthielt. Die Suspension wurde bei Raumtemperatur für 30 Minuten gerührt und mit 11.000rpm für 25 Minuten mit einer Zentrifuge (Beckman J2-21, Rotor 15 JA 14) zentrifugiert, um die in 1% Triton X-100 löslichen Proteine zu entfernen und die gefällten Proteine Zu erhalten. Der Niederschlag wurde in 30ml des Puffers 1 unter Rühren suspendiert und rezentrifugiert, um die unslöslichen Proteine zu er

Durch diese einfache Waschprozedur wurde das UB-E1 Protein mit einer Reinheit von wenigstens 60% erhalten.

### 20 Stufe 6: Auflösen und Fraktionieren des unlöslichen Niederschlages

Der in Stufe 5 erhaltene unlösliche Niederschlag mit den UB-E1 Proteinen wurde in 50ml eines Puffers 2 suspendiert, der 8M Guanidin HCl (50mM Tris, PH 9,0, 1mM EDTA, 2mM  $\beta$ -mercaptoethanol) enthielt. Die 25 Suspension wurde bei Raumtemperatur für 30 Minuten gerührt und mit 11.000rpm für 25 Minuten mit einer Zentrifuge zentrifugiert, um den unlöslichen Niederschlag zu entfernen und den Überstand zu erhalten. Der Überstand wurde mit Puffer 2 bis zu einer Endkonzentration von 0,5M Guanidin HCl verdünnt. Durch Zentrifugieren wurde der Überstand entfernt und ein Niederschlag erhalten, der das UB-E1 Protein enthielt.

### 30 Stufe 7: Auflösen des unlöslichen Niederschlages

Der in Stufe 6 erhaltene unlösliche Niederschlag mit dem UB-E1 Protein wurde in 20ml eines Puffers 3 (50Mm Natriumcarbonat, pH 9,5, 1mM EDTA, 2mM  $\beta$ -mercaptoethanol), der 8M Harnstoff enthielt, suspendiert. Die Suspension wurde bei Raumtemperatur für 1 Stunde gerührt, um den unlöslichen Niederschlag zu entfernen und mittels Zentrifugation bei 11.000rpm für 25 Minuten (Beckman J2-21, Rotor JA14) den Überstand zu erhalten.

### Stufe 8: Q-Sepharose Ionentausch-Chromatographie

40 Der in Stufe 7 erhaltene Überstand wurde durch eine Q-Sepharosesäule geschickt (Pharmacia, FF, 1,2cm x 7cm), die mit dem genannten Puffer 3 äquilibriert worden war. Es wurden 100ml des Puffers mit 45 einen Konzentrationsgradienten von 0 bis 0,4M Natriumchlorid zugegeben, um die gebundenen Proteine zu eluieren. Die Proteinfraktion wurde einer Elektrophorese auf 15% SDS-Polyacrylamidgel unterworfen, um eine Fraktion zu sammeln, die das UB-E1 Protein umfaßte, und man erhielt das UB-E1 Protein mit einer Reinheit von wenigstens 90%.

### 6-D: Reinigung des KHCV UB-CORE 14 Proteins

#### Stufe 1: Kultur der rekombinanten E. coli

50 E. coli W3110 ptrpH-UB-CORE 14 (ATCC 68642), transformiert mit einem Vektor (ptrpH-UB-CORE 14), enthaltend ein cDNA Fragment des KHCV und Ubiquitin-Gen, wurde in einem LM Medium kultiviert, welches 50 $\mu$ g/ml Ampicillin und 100 $\mu$ g/ml Tryptophan enthielt, und zwar bei 37°C für 12 Stunden. 50ml der Kultur wurden in 11 M9 Medium transferiert und bei 37°C für 6 bis 8 Stunden kultiviert. Der 55 Zellschlamm wurde gesammelt, wie im gleichen Prozeß der Stufe 1 des Beispiele 6-A.

Stufe 2: Aufbrechen der Zellen

4g E. coli Zellen gemäß Stufe 1 wurden in 20ml eines Puffers (50mM Tris, pH 7,5, 5mM EDTA, 10mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 1mM Phenylmethylsulfonylfluorid, 1 $\mu$ g/ml Pepstatin) bei 4 °C suspendiert. 4mg Lysozym wurden zur Suspension zugegeben, für 5 Minuten gerührt und einer Ultraschallbehandlung in einem Eisbad für 20 Minuten mittels eines Ultraschallgerätes unterworfen, um die Zellen aufzubrechen.

Stufe 3: Identifizierung des spezifischen Antigen-Proteins

10 Eine kleine Menge des in Stufe 2 erhaltenen Homogenisates wurde einer Elektrophorese auf 15% SDS-Polyacrylamidgel unterworfen, wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben, und mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt. Das Ergebnis zeigte, daß Proteine mit etwa 23.000 Dalton exprimiert worden waren (nachfolgend als KHCV UB-CORE 14 Protein beschrieben).

15 Nachfolgend wurden die in dem obigen SDS-PAGE getrennten Proteine auf einen Nitrozellulosefilter übertragen. Der Filter wurde Western-Blotting unterworfen, wie beim gleichen Prozeß in Stufe 3 des Beispiele 5-A. Das Resultat zeigte, daß das KHCV UB-CORE 14 Protein im gesamten E. coli Homogenisat immunologisch mit dem Serum eines Hepatitis C Patienten unter Ausbildung eines sichtbaren Bandes reagiert hatte.

20 Stufe 4: Behandlung mit Harnstoff

Das in Stufe 2 erhaltene Homogenisat wurde mit 12.000rpm für 20 Minuten mit einer Zentrifuge (Beckman J2-21, Rotor JA20) zentrifugiert, um das unlösliche Material zu entfernen und den Überstand zu gewinnen. Zu dem Überstand wurden 9M Harnstoff zugegeben, um die Endkonzentration 8M zu erreichen und für 12 Stunden wurde bei Raumtemperatur gerührt.

Stufe 5: Behandlung mit Säure

Zu der in Stufe 4 erhaltenen Lösung wurde 1M Natriumacetat (pH 4,5) bis zur Endkonzentration von 10mM hinzugefügt, gefolgt durch eine Zugabe von 1M Essigsäure bis zu einem pH = 5,0, wobei 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt wurde. Die Lösung wurde mit 11.000rpm mit einer Zentrifuge (Beckman J2-21, Rotor JA 14) zentrifugiert, um den Niederschlag zu entfernen und den Überstand zu gewinnen.

Stufe 6: CM-Ionentausch-Chromatographie

35 Die das KHCV UB-CORE 14 Protein enthaltende Lösung der Stufe 5 wurde in einer Flußrate von 1ml/min über eine Säule (2,5cm x 10cm) geschickt, die 25ml CM-Sepharoseharz enthielt (Pharmacia, Sweden), äquilibriert mit einem Puffer (pH 5,0) mit einem Gehalt an 8M Harnstoff, 1mM EDTA, 10mM  $\beta$ -mercaptoethanol und 10mM Acetat. Die in der Säule zurückbleibenden Materialien in freier Form wurden 40 sorgfältig mit der genannten äquilibrierenden Pufferlösung ausgewaschen. Die in der Säule gebundenen Proteine wurden in einer Flußrate von 3ml/min mit 500ml der genannten äquilibrierenden Pufferlösung, die einen Konzentrationsgradienten von 0 bis 0,5M Natriumchlorid aufwies, eluiert. Das Eluat wurde einer SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese unterworfen, wobei sich zeigte, daß das KHCV UB-CORE 14 Protein bei etwa 0,3M eluiert wurde. Die das KHCV UB-CORE 14 enthaltenden Fraktionen wurden für die Verwendung 45 in der nächsten Stufe gesammelt.

Stufe 7: S-200 Gel-Permeations-Chromatographie

Die in Stufe 6 gesammelten Fraktionen wurden über eine YM5 Ultrafiltrationsmembran geschickt 50 (Amicon, USA), um eine Konzentration auf ein Volumen von 10ml herbeizuführen. Das Konzentrat wurde über eine S-200 Sephadrylsäule geschickt (2,5cm x 100cm, Pharmacia, Sweden), die mit einer PBS Lösung äquilibriert worden war, die 6M Harnstoff, 1mM EDTA und 1mM  $\beta$ -mercaptoethanol enthielt, wobei eine Flußrate von 0,5ml/min eingehalten wurde, um die Proteine entsprechend ihres Molekulargewichtes aufzutrennen. Die Proteinfraktionen wurden der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese unterworfen. Die Fraktionen mit dem KHCV UB-CORE 14 Protein wurden gesammelt.

Stufe 8: Mono-S-Chromatographie

Die in Stufe 7 gewonnene Lösung des KHCV UB-CORE 14 Proteins wurde weiter gereinigt, indem sie über eine FPLC Mono-S-Säule geschickt wurde (HR 5/5, Pharmacia, Sweden). Die KHCV UB-CORE 14 Proteinlösung wurde mit dem gleichen Volumen Puffer A verdünnt und über die Säule geschickt, die mit Puffer A (pH 7) äquilibriert worden war, der 6M Harnstoff, 1mM EDTA, 1mM  $\beta$ -Mercaptoethanol und 10mM Phosphat enthielt, wobei die Säule dann mit dem genannten Puffer A gewaschen wurde. Danach wurde ein Puffer B, enthaltend 6M Harnstoff, 1mM EDTA, 1mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 10mM Phosphat und 0,5mM Natriumchlorid, schrittweise in einer Menge von 35% in den ersten 5 Minuten, 70% in den nächsten 55 Minuten und 100% in den letzten 10 Minuten mit einer Flußrate von 0,8ml/min zugegeben, um die gebundenen Proteine zu eluieren. Das KHCV UB-CORE 14 Protein war eluiert, wenn die Menge des Puffers B 60% erreichte, das heißt, wenn die Konzentration des Natriumchlorides 0,25M betrug.

Die Fraktion wurde gegen PBS Lösung bei 4 °C dialysiert, um 4mg des KHCV UB-CORE 14 Proteins mit einer Reinheit von wenigstens 90% zu erhalten.

15

(6-E): Reinigung des UB-E2N-ProteinsStufe 1: Kultur rekombinanter Bakterienzellen

20 E. coli W3110 ptrpH-UB-E2N(ATCC 68966), der befähigt ist, ein fusioniertes Protein aus KHCV E2N-Protein und Ubiquitin zu bilden, wurde unter Schütteln für 12 Stunden in einem LB-Medium kultiviert, welches 50 $\mu$ g/ml Ampicillin enthielt. 10ml der Kultur wurden in 1l M9-Medium transferiert, welches 2% Casaminosäure und 10 $\mu$ g/ml Tryptopan enthielt. Es wurde unter Schütteln bei 37 °C für etwa 3 Stunden kultiviert. Der Kultur wurde Indolacrylsäure (IAA) bis zu einer Endkonzentration von 50 $\mu$ g/ml zugegeben, 25 wenn deren O.D. Wert bei 650nm 0,2 betrug, um die Produktion des rekombinanten UB-E2N-Proteins zu induzieren. Etwa 5 Stunden nach der Zugabe des IAA wurde die Kultur mit 3500 rpm für 25 Minuten mit einer Zentrifuge (Beckman J-6B, Rotor JS4.2) zentrifugiert, um den Zellniederschlag zu sammeln. Der Niederschlag wurde einmal mit PBS gewaschen.

30 Stufe 2: Identifikation des spezifischen Antigens

Das Homeogenisat wurde der Elektrophorese auf 15% SDS-Polyacrylamidgel unterworfen. Das Resultat zeigte, daß das UB-E2N-Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 28000 Dalton exprimiert wurde.

Nachfolgend wurden die auf dem Gel getrennten Proteine auf einen Immobilone-P-Filter übertragen (Millipore, Cat.No. IPUH 00010, Porengröße 0,45 $\mu$ m). Der Filter wurde in PBS gegeben (10mM Phosphat, pH 7,0, 0,15M Natriumchlorid), welches 0,5% Tween 20 enthielt, und es wurde bei Raumtemperatur für 2 Stunden geschüttelt, um eine nichtspezifische Bindung des Immunoglobulins G zu verhindern. 10ml des Serums eines Hepatitis-C-Patienten wurden, wie zuvor beschrieben, mit PBS verdünnt, welches 0,5% Gelatine enthielt, und 0,05% Tween wurde in einem Verhältnis 1:20 zugegeben. Die Mischung wurde unter 40 mildem Schwenken bei Raumtemperatur für eine Stunde reagieren gelassen und 4mal je 5 Minuten mit PBS gewaschen welches 0,05% Tween 20 enthielt. Antihuman-Immunoglobulin G, markiert mit einer alkalischen Phosphatase (Boehringer Manheim. Cat.No. 605 415, Anti-Human IgG-ALP), wurde mit PBS verdünnt welches 0,5% Gelatine und 0,05% Tween 20 in einem Verhältnis von 1:1000 enthielt, und 10ml der verdünnten Lösung wurden dem Filter zugegeben. Das Ergebnis wurde bei Raumtemperatur unter 45 Schütteln für eine Stunde reagieren gelassen und 4mal für jeweils 5 Minuten mit PBS gewaschen, welches 0,05% Tween 20 enthielt, und 2mal mit 100mM Tris-Puffer (pH 9,5, 5mM Magnesiumchlorid, 100mM Natriumchlorid).

Dem Filter wurde 100mM Tris-Puffer zugegeben, der 125 $\mu$ g/ml Nitro-Blue-Tetrazorium (Pierce, NBT) und 25 $\mu$ g/ml Bromchlorindolphosphat (Pierce, BCIP) enthielt, um die Farbreaktion zu entwickeln. Als 50 Ergebnis zeigte sich, daß das UB-E2N-Protein im gesamten Zellhomogenisat immunologisch mit dem Serum des Hepatitis-C-Patienten reagiert hatte, um ein sichtbares Band zu erzeugen.

Stufe 3: Aufbrechen der Zellen und Entfernung des löslichen Proteins

55 Etwa 3g des in Stufe 1 erhaltenen Zellniederschlags wurde in 50ml Puffer 1 suspendiert (20mM Tris, pH 7,5, 1mM EDTA, 2mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 1mM Phenylmethylsulfonylfuorid, 1 $\mu$ g/ml Pepstatin A), und eine Lysozymlösung wurde bis zu einer Endkonzentration von 0,2mg/ml zugegeben. Die Reaktion wurde bei 37 °C für 30 Minuten durchgeführt, und es wurde eine Ultraschallbehandlung auf Eis mit einer Ausbeute

von 70% für 5 Minuten mittels eines Ultraschallgerätes durchgeführt, um die Zellen aufzubrechen und das Lysat zu erhalten. Das Homogenisat wurde mit 11000 rpm für 25 Minuten mit einer Zentrifuge (Beckman J2-21, Rotor JA 14) zentrifugiert, um die löslichen Proteine zu entfernen und den unlöslichen Niederschlag zu gewinnen.

5

Stufe 4: Waschen des unlöslichen Niederschlags mit Tensid und Tris-Puffer

Der in Stufe 3 erhaltene Niederschlag wurde in 30ml Puffer 1 suspendiert (20mM Tris, pH 7,5, 1mM EDTA, 2mM  $\beta$ -Mercaptoethanol), welcher 1% Tensid (Ethoxylat des 5-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)-phenols) der Bezeichnung Triton X-100 der Firma Rohm und Haas enthielt. Die Suspension wurde bei Raumtemperatur für 30 Minuten gerührt und mit 11000 rpm für 25 Minuten mit einer Zentrifuge (Beckman J2-21, Rotor JA14) zentrifugiert, um lösliche Proteine zu entfernen und den Proteinniederschlag zu erhalten. Der Niederschlag wurde in 30ml Puffer 1 suspendiert. Die Suspension wurde gerührt und nochmals zentrifugiert, um die unlöslichen Proteine zu erhalten.

10

Das UB-E2N-Protein wurde durch diese einfache Waschprozedur mit einer Reinheit von wenigstens 70% erhalten.

Stufe 5: Auflösen des unlöslichen Niederschlags mit 8M Harnstoff

20

Der aus Stufe 4 gewonnene unlösliche Niederschlag mit dem UB-E2N-Protein, wurde in 40ml Puffer 2 suspendiert (50mM Tris, pH 9,0, 1mM EDTA, 2mM  $\beta$ -Mercaptoethanol), der 8M Harnstoff enthielt. Die Suspension wurde bei Raumtemperatur für eine Stunde gerührt und zentrifugiert, um den unlöslichen Niederschlag zu entfernen und den Überstand zu erhalten.

25

Stufe 6: S-200-Gel-Permeationschromatographie

40ml einer 8M Harnstofflösung, die das in Stufe 5 erhaltene UB-E2N enthielt, wurden auf ein Volumen von 5ml mittels einer YM10 Ultrafiltrationsmembran (Amicon) konzentriert und in einer Flußrate von 40ml/h über eine S-200 Harzsäule geschickt (2,5cm x 90cm, Pharmacia, USA), die mit dem Puffer 2 mit einem Gehalt von 4M Harnstoff equilibriert worden war. Es wurden Fraktionen mit 2ml/Röhrchen gesammelt. Die Fraktionen wurden einer SDS Polyacrylamidgel-Elektrophorese unterworfen, um die Fraktionen mit dem UB-E2N-Protein zu sammeln.

Stufe 7: Q-Sepharose Ionenaustrauschchromatographie

35

Die das UB-E2N-Protein enthaltende Lösung gemäß Stufe 6 wurde über eine Q-Sepharose-Säule geschickt (FF, 1,2cm x 7cm, Pharmacia, USA), die mit Puffer 2 equilibriert worden war, der 4M Harnstoff enthielt. 150ml des Puffers mit einem Konzentrationsgradienten von 0 bis 1,0M Natriumchlorid wurde zugegeben, um die gebundenen Proteine zu eluieren. Die Fraktionen wurden der Elektrophorese auf SDS-Polyacrylamidgel unterworfen, um die Fraktionen des UB-E2N mit einer Reinheit von wenigstens 80% zu gewinnen.

Stufe 8: Entfernung des Harnstoffs und FPLC-Phenylchromatographie

45

4M Harnstofflösung mit UB-E2N-Protein, welches in Stufe 7 erhalten worden war, wurde auf ein Volumen von 8ml mittels YM 10 Ultrafiltrationsmembran (Amicon) konzentriert und gegen einen Puffer 3 dialysiert (20mM Tris, pH 9,0, 1mM EDTA, 2mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 0,2M Natriumchlorid), wobei eine Dialysemembran (Spectrum Medical Industries, Inc., M.W. cut off 6000-8000) verwendet wurde, um den Harnstoff zu entfernen. Der Lösung wurde Natriumchlorid bis zu einer Endkonzentration von 1M zugegeben. 50 Die Mischung wurde über eine FPLC-Phenylsepharose-Säule geschickt (Pharmacia, HR 5/5, 0,5cm x 5cm), und 40ml des Puffers mit einem Konzentrationsgradienten von 1,0M bis 0M Natriumchlorid wurde zugegeben, um die gebundenen Proteine zu eluieren. Die Fraktionen wurden einer Elektrophorese auf SDS-Polyacrylamidgel unterworfen, um die Fraktionen zu sammeln, die das UB-E2N-Protein mit einer Reinheit von wenigstens 90% enthielten.

55

(6-F): Reinigung des UB-E2C-Proteins

Stufe 1: Kultur rekombinanter Zellen

5      E. coli W3110, der befähigt ist ein fusioniertes Protein aus KHCV E2C-Protein und Ubiquitin zu bilden, wurde unter Schütteln für 12 Stunden in einem LB-Medium kultiviert, welches 50µg/ml Ampicillin enthielt. 20ml der Kultur wurden in 1l M9-Medium transferiert, welches 2% Casaminoäure und 10µg/ml Tryptopan enthielt. Es wurde unter Schütteln bei 37 °C für etwa 2 Stunden kultiviert. Der Kultur wurde Indolacrylsäure (IAA) bis zu einer Endkonzentration von 50µg/ml zugegeben, wenn deren O.D. Wert bei 650nm 0,3 betrug.  
10     um die Produktion des rekombinanten UB-E2C-Proteins zu induzieren. Etwa 3 Stunden nach der Zugabe des IAA wurde die Kultur mit 3500 rpm für 25 Minuten mit einer Zentrifuge (Beckman J6, Rotor HS4) zentrifugiert, um den Zellniederschlag zu sammeln. Der Niederschlag wurde einmal mit PBA gewaschen.

Stufe 2: Identifizierung des spezifischen Antigens

15     Der Niederschlag wurde einer Elektrophorese auf 15% SDS-Polyacrylamidgel unterworfen. Das Resultat zeigte an, daß das UB-E2C-Protein in einem Molekulargewicht von etwa 25000 Dalton exprimiert worden war.

Nachfolgend wurden die auf dem Gel getrennten Proteine auf einen Immobilon-P-Filter (MILLIPORE, cat.#. IPUH 00010, Porengröße 0,45µm) übertragen. Der Filter wurde in PBS gegeben, welches 0,5% Tween 20 enthielt, und bei Raumtemperatur für 2 Stunden geschüttelt, um eine nichtspezifische Bindung des Immunoglobulins G zu blockieren. 10ml des Serums eines Hepatitis-C-Patienten wurden mit PBS verdünnt, welches 0,5% Gelatine enthielt, und 0,05% Tween wurde in einem Verhältnis 1:20 zugefügt. Die Mischung wurde bei Raumtemperatur für 1 Stunde mild geschwenkt und 4mal je 5 Minuten mit PBS gewaschen, welches 0,05% Tween 20 enthielt. Anithuman-Immunoglobulin G, markiert mit Horseradish-Peroxidase (Bio-Rad Lab. Anti-Human IgG-HRP) wurde mit PBS verdünnt, welches 0,5% Gelatine und 0,05% Tween 20 in einem Verhältnis 1:500 enthielt. 10ml der verdünnten Lösung wurde dem Filter zugegeben. Das Ergebnis wurde unter Schütteln bei Raumtemperatur für 1 Stunde reagieren gelassen und 4mal mit PBS, welches 0,05% Tween 20 enthielt, und 2mal mit 50mM Tris-Puffer (ph 7,0) für jeweils 5 Minuten gewaschen.

Dem Filter wurden 50mM Tri-Puffer zugegeben, der 400µg/ml 4-Chlor-1-Naphtol und 0,03% Wasserstoffperoxid enthielt, um die Farbreaktion zu entwickeln. Als Resultat ergab sich, daß das UB-E2C-Protein im gesamten Zellhomogenisat immunologisch mit dem Serum eines Hepatitis-C-Patienten reagiert hatte, um ein sichtbares Band zu zeigen.

35     Stufe 3: Aufbrechen der Zellen und Entfernung des löslichen Proteins

Etwa 1g des in Stufe 1 erhaltenen Zellniederschlags wurde in 50ml Lysispuffer suspendiert (20mM Tris, pH 7,5, 1mM EDTA, 2mM β-Mercaptoethanol, 1mM Phenylmethylsulfonylfuorid und 1µg/ml Pepstatin A), und eine Lysozymlösung wurde bis zu einer Endkonzentration von 0,5mg/ml zugegeben. Die Reaktion wurde bei 37 °C für 30 Minuten durchgeführt, und es wurde eine Ultraschallbehandlung auf Eis mit einer Ausbeute von 70% für 5 Minuten mittels eines Ultraschallgerätes durchgeführt, um die Zellen aufzubrechen und ein Homogenisat zu erhalten. Das Homogenisat wurde mit 11000 rpm für 25 Minuten mit einer Zentrifuge (Beckman J2-21, Rotor JA 14) zentrifugiert, um die löslichen Proteine zu entfernen und den unlöslichen Niederschlag zu gewinnen.

Stufe 4: Waschen des unlöslichen Niederschlags mit Tensid und Tris-Puffer

Der in Stufe 3 erhaltene Niederschlag wurde in 20ml Puffer 1 suspendiert (20mM Tris, pH 7,5, 1mM EDTA, 2mM β-Mercaptoethanol), welcher 1% Triton X-100, wie zuvor definiert, enthielt. Die Suspension wurde bei Raumtemperatur für 30 Minuten gerührt und mit 11000 rpm für 25 Minuten mit einer Zentrifuge (Beckmann J2-21, Rotor JA14) zentrifugiert, um lösliche Proteine zu entfernen und den Proteinniederschlag zu erhalten. Der Niederschlag wurde in 30ml Puffer 1 suspendiert. Die Suspension wurde gerührt und nochmals zentrifugiert, um die unlöslichen Proteine zu erhalten.

## AT 405 053 B

### Stufe 5: Auflösen des unlöslichen Niederschlags mit 8M Harnstoff

Der unlösliche Niederschlag, der das UB-E2C-Protein der Stufe 4 enthielt, wurde in 20ml Puffer 2 suspendiert (50mM Carbonat, pH 9,5, 1mM EDTA, 2mM  $\beta$ -Mercaptoethanol), der 8M Harnstoff enthielt. Die Suspension wurde bei Raumtemperatur für eine Stunde gerührt und zentrifugiert, um den unlöslichen Niederschlag zu entfernen und den Überstand zu erhalten.

### Stufe 6: FPLC-Mono-Q-Ionentauschchromatographie

10 Der in Stufe 5 erhaltene Überstand wurde über eine FPLC-Mono-Q-Säule geschickt (Pharmacia, HR 5/5, 0,5cm x 5cm, USA), die mit Puffer 2 equilibriert worden war, der 0,1M Natriumchlorid enthielt. 40ml des Puffers mit einem Konzentrationsgradienten von 0,1 bis 1,4M Natriumchlorid wurde zugegeben, um die gebundenen Proteine zu eluieren. Die Fraktionen wurden der Elektrophorese auf SDS-Polyacrylamidgel unterworfen, um die Fraktionen mit einer Reinheit von wenigstens 80% zu gewinnen.

15

### Stufe 7: Entfernung des Harnstoffs und FPLC-Phenylchromatographie

20 8M Harnstofflösung mit UB-E2C-Protein, welches in Stufe 6 erhalten worden war, wurde auf ein Volumen von 14ml mittels YM 10 Ultrafiltrationsmembran konzentriert und gegen einen Puffer 3 dialysiert (20mM Tris, pH 9,0, 1mM EDTA, 2mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 0,2M Natriumchlorid), wobei eine Dialysemembran (Spectrum Medical Industries, Inc., M.W. cut off 6000-8000) verwendet wurde, um den Harnstoff zu entfernen. Der Lösung wurde Natriumchlorid bis zu einer Endkonzentration von 1M zugegeben. Die Mischung wurde über eine FPLC-Phenylsepharose-Säule geschickt (Pharmacia, HR 5/5, 0,5cm x 5cm), und 40ml des Puffers mit einem Konzentrationsgradienten von 1,0M bis 0M Natriumchlorid wurde zugegeben, 25 um die gebundenen Proteine zu eluieren. Die Fraktionen wurden einer Elektrophorese auf SDS-Polyacrylamidgel unterworfen, um die Fraktionen zu sammeln, die das UB-E2C-Protein mit einer Reinheit von wenigstens 90% enthielten.

### Beispiel 7: Ermittlung der anti-KHCV Antikörper gegenüber KHCV rekombinaten Proteinen

30

#### 7-A: Reaktivität gemischt positiver und negativer Serenproben gegenüber der Antigenkonzentration

35 Jedes KHCV 403, KHCV 897 und KHCV UB-CORE 14 Protein wurde seriell in 2 Stufen mit 50mM Natriumboratpuffer (pH 9,0) von einer Konzentration 0,25 $\mu$ g/ml, 2,0 $\mu$ g/ml und 2,0 $\mu$ g/ml verdünnt. Die verdünnten Proteinlösungen wurden in die Öffnungen einer Mikrontiterplatte (Dynatech, Immulon Typ 1 Mikrontiterplatte) in einer Menge von 200 $\mu$ l/Öffnung gegeben und bei 37°C für 2 Stunden inkubiert, wobei die Platte mit einem Para-Film abgedeckt wurde, um ein Verdampfen der Lösung möglichst gering zu halten.

40 Die für 2 Stunden bedeckte Platte wurde einmal mit PBS gewaschen, die 0,05% (v/v) Tween-20 (pH 7,4, nachfolgend als Waschlösung bezeichnet) enthielt. Die PBS mit einem Gehalt an 0,1% Gelatine (v/v) wurde den Öffnungen in einer Menge von 210 $\mu$ l/Öffnung zugegeben. Es wurde bei 37°C für 2 Stunden inkubiert. Die Öffnungen wurden 2x mit 300 $\mu$ l der genannten Waschlösung gewaschen. Es wurden 190 $\mu$ l PBS mit 0,25% Gelatine, 1mM EDTA, 1,0% (v/v) Triton X-100 und 0,02% Thimerosal sowie 10 $\mu$ l einer positiven Serumprobe eines HCV Patienten oder eine negative Serumprobe zu jeder Öffnung zugegeben 45 und für einige Sekunden gemischt. Es wurde bei 37°C für 1 Stunde inkubiert. Die positive Serumprobe eines HCV Patienten und die negative Probe wurden mittels eines Diagnosekits für Hepatitis C getestet, wobei ein C-100 Antigen Verwendung fand, das durch Ortho Diagnostic Systems, Raritan, N.J., 88869, USA hergestellt worden war. Der Test wurde vor der Verwendung durchgeführt. Die Serumproben wurden vom Severance Hospital geliefert, das der Yonsei University in Korea angeschlossen ist.

50 Die Öffnungen (wells) wurden nach einer Reaktionszeit von 1 Stunde bei 37°C 5x mit 300 $\mu$ l der Waschlösung gewaschen. Anti-human IgG gamma-Ketten Immunoglobulin, markiert mit Horseradish-Peroxidase (HRP) (Bio-Rad Company, Richmond, CA 94804, USA, 0,1mg Protein/ml) wurde 5000-fach mit PBS verdünnt, welches 10% fötales Rinderserum, 1% Ficoll (Sigma v/v), 0,02% Thimerosal und 0,05% Tween-20 enthielt. Die verdünnte Lösung wurde den Öffnungen in einer Menge von 200 $\mu$ l/Öffnung zugegeben. Das Ganze wurde bei 37°C für 1 Stunde inkubiert, und 5x mit der genannten Waschlösung gewaschen. Danach wurde zu jeder Öffnung 200 $\mu$ l O-Phenylendiamindihydrosäure (OPD, Sigma, 10mg/ml), die in 50mM Citratpuffer aufgelöst und durch Zugabe von Phosphat auf pH 5,5 eingestellt worden war, zugegeben und bei Raumtemperatur für 30 Minuten in Dunkelheit inkubiert. Zu der resultierenden Mischung wurden 50 $\mu$ l

4N schwefelige Säure pro Öffnung zugegeben, um die Farnbentwicklung zu stoppen. Die O.D. jeder Öffnungen wurden bei einer Wellenlänge von 492nm mit einem Dynatech Microtiter Plade Reader bestimmt (siehe Fig. 19).

5 7-B: Herstellung eines Diagnosekits

Die Antigene gereinigten KHCV UB-CORE 14, KHCV 897 und KHCV 403 Proteins wurden zur Herstellung eines Diagnosekits verwendet. Die Antigene können auf eine optimale Konzentration mit 10mM Natriumkarbonatpuffer (pH 9,5) oder 50mM Natriumboratpuffer (pH 9,0) verdünnt werden.

10 Eine Menge von 150 bis 200 $\mu$ l/Öffnung kann auf eine Immulon Typ 1 Microtiterplatte aufgetragen werden, die 96 Öffnungen aufweist (Dynatech). Das Inkubieren erfolgt bei einer Temperatur von 4 °C für 12 bis 18 Stunden, um dem Antigen die Adsorption an den Plattenwänden zu erlauben.

Die optimalen Konzentrationen für jedes Antigen liegen bei 0,18 bis 0,75 $\mu$ g/ml für das KHCV UB-CORE 14 Protein, 0,06 bis 0,3 $\mu$ g/ml für das KHCV 897 Protein und 0,12 bis 0,5 $\mu$ g/ml für das KHCV 403 Protein.

15 Bei diesem Beispiel wurden jeweils 0,3 $\mu$ g/ml jedes Antigens verwendet.

Der Inhalt jeder Öffnung nach dem Bedecken wurde mit einem Sauger entfernt. Die Platte wurde mit PBS gewaschen (PBS, pH 7,4) die 0,05% (v/v) Tween-20 enthielt, und mit PBS (210 $\mu$ g/Öffnung) (pH 7,4) mit einem Gehalt an 0,1% (w/v) Gelatine für 2 Stunden bei 37 °C blockiert und 3x mit der Waschlösung gewaschen. Die in den Öffnungen zurückbleibende Feuchtigkeit wurde mit einem Absorptionsapparat 20 entfernt.

Zu jeder Öffnung wurden 190 $\mu$ l eines Puffers (10mM Tris, pH 7,5, 150mM NaCl, 0,2% Triton X-100, 0,1mM EDTA, 0,02% Thimerosal) mit Gehalt an 1% (v/v) Rinderserum und 10 $\mu$ l der zu testenden Probe hinzugefügt und bei 37 °C für 1 Stunde inkubiert, um eine Bindungsreaktion des HCV Antikörpers in einer Probe mit dem in den Öffnungen adsorbierten Antigen zu induzieren. Die Platte wurde 5x mit PBS (pH 7,4)

25 gewaschen, die 0,05% (v/v) Tween-20 enthielt. Es wurden 200 $\mu$ l eines anti-human IgG-HRP (Goat anti-human IgG-HRP, Bio-Rad Lab., USA) hinzugefügt, welches mit einem Puffer (10mM Tris, pH 7,5, 150mM NaCl, 0,02% Thimerosal, 1% Ficoll) verdünnt worden war und 10% (v/v) Rinderserumalbumin enthielt. Es wurde bei 37 °C für 1 Stunde inkubiert und danach mit PBS (pH 7,4) und einem Gehalt an 0,05% (v/v) Tween 20 gewaschen. 200 $\mu$ l OPD Lösung wurden zugegeben, um bei Raumtemperatur für 30 Minuten eine 30 Farbreaktion zu entwickeln. Danach wurden pro Öffnung 50 $\mu$ l 4N schwefelige Säure zugegeben, um die Reaktion zu stoppen, worauf die O.D. bei einer Wellenlänge von 492nm bestimmt wurde. Der cut-off Wert, der ein Standardwert für die Bestimmung positiv oder negativ ist, wurde mit 0,4 plus der durchschnittlichen Absorption (O.D.) der negativen Probe festgestellt.

35 Die Resultate für jedes KHCV Protein und gemischte Antigen gemäß dem oben gesagten sind in Tabelle 1 dargestellt. Das Vergleichs HCV Diagnosereagenz war von Ortho Diagnostic Systems kommerziell erhältlich und nach den Herstelleranleitungen verdendet worden.

40

45

50

55

## AT 405 053 B

Tabelle 1

Reaktivität der KHCV Proteine zu den Antikörpern gegenüber KHCV, bestimmt mittels Enzymimmunoassay						
	Probe No.	Antigen KHCV 897 protein	Antigen KHCV UB-CORE 14 protein	Antigen KHCV 403 protein	Mixed Antigen (von drei Proteininen)	Ortho HCV Diagnostic Kit
5	1	++	+++	-	++++	-
10	2	++++	++++	++	++++	+
15	3	+	-	-	++	-
20	4	+	+	-	++	-
25	5	++++	++++	++++	++++	+
30	6	++	-	-	++	-
35	7	++++	+++	-	++++	+
40	8	-	++	-	++	-
45	9	-	-	+++	+++	-
50	10	-	+++	-	+++	-
55	11	++	+	-	++	-
60	12	++++	+++	+++	+++	+
65	13	++	-	-	++	-

## Bemerkung:

- 1) ++ + + : Cut off Wert + 1,5 ≤ Absorption (O.D.)  
 ++ + : Cut off Wert + 1,0 ≤ Absorption < Cut off Wert + 1,5  
 ++ : Cut off Wert + 0,5 ≤ Absorption < Cut Off Wert + 1,0  
 + : Cut off Wert ≤ Absorption < Cut off Wert + 0,5  
 -: Absorption < Cut off Wert

- 2) Der Cut off Wert war 0,32 für das KHCV 897 Protein, 0,27 für das KHCV UB-CORE 14 Protein, 0,35 für das KHCV 403 Protein, 0,483 für gemischte Antigene und 0,453 für den Ortho Diagnosekit.  
 3) Der Ortho HCV Diagnosekit war von Ortho Diagnose Systems, USA kommerziell erhältlich.

40

7-C: Genauigkeit der Diagnose

Um die Genauigkeit des Resultates der vorliegenden Diagnose zu demonstrieren, wurden 17 Serumproben, die bei Verwendung eines Diagnosekits für Hepatitis C, hergestellt und verkauft von Ortho Diagnostic Systems, als positiv diagnostiziert worden waren, nochmals einer Diagnose unterzogen, wobei der Diagnosekit der vorliegenden Erfindung angewendet wurde. Weiters wurde auch der Immunoblottingkit (Chiron RIBA HCV Test System, 2nd Generation, manufactured by Ortho Diagnostic Systems, USA, Product Code 933491) angewendet, der als Bestätigungstest empfohlen ist und 4 Antigene ausgenommen ein SOD Kontrollantigen umfaßt (siehe Van der Poel, C. L. et al., Lancet, 337, 317-319 (1991)). Diese Resultate sind in Tabelle 2 zusammengefaßt, die zeigen, daß das erfindungsgemäße Diagnoseverfahren eine niedrigere Fehlerrate aufweist, als Ortho's Diagnosekit für Hepatitis C der Seite 138.

55

Tabelle 2

Vergleich der Diagnosen mittels Ortho's 2nd Generation Immunoblotting-Kit und dem Diagnosekit gemäß Erfindung							
Proben No.	Antigene der Ortho 2nd Generation Immunoblotting Kit					Beurteilung*	Diagnostic Kit™(7-B)
	5-1-1	C100-3	C33c	C22-3	SOD		
1**	+-	+-	-	-	-	-	-
2	++++	++++	++++	++++	-	+	++++
3	+	+-	+++	+++	-	+	+++
4	+	++++	+++	+-	-	+	+++
5	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-
7	-	+-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-
9	-	+-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-
Positive Kontrolle	++	++++	+++	++	-	+	++++
Negative Kontrolle	-	-	-	-	-	-	-

\* Wenn bei einer Probe mehr als ein + gefunden wurden, das heißt, daß eine positive Reaktion bezüglich wenigstens 2 Antigenen ausgenommen das SOD Kontroll-Antigen vorlag, dann wurde die Probe als positiv beurteilt.

\*\* Als Reaktionsmittel wurde ein gemischtes Antigen eingesetzt, das aus Beispiel 7-B erhalten wurde.

30

#### Beispiel 8: Bestimmung der Gegenwart von Hepatitis C Viren mit einer Sonde unter Verwendung der Polymerase-Kettenreaktion

##### 8-A: Extraktion der RNA von Hepatitis C Viren

Zu 100µl eines zu untersuchenden Serum wurden 100µl einer TNE Lösung (100mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,2mM EDTA, 0,2M NaCl), 300µl einer RNAzol Lösung (TM Cinna Scientific, Inc., Texas 77546, USA) und 300µl Chloroform zugegeben, wonach mittels starkem Schütteln gemischt wurde. Die Mischung wurde mit 40 15.000rpm bei einer Temperatur von 4 °C für 5 Minuten mit einer Eppendorf Midronfuge zentrifugiert, um einen Niederschlag zu bilden. Der Überstand wurde gesammelt und mit 300µl Phenol und 300µl Chloroform extrahiert. Der Extrakt wurde ausgefällt und die Fällung in 10µl TE Puffer gelöst (10mM Tris HCl, pH 8,0, 0,1mM EDTA) und bei einer Temperatur von -70 °C gelagert.

##### 8-B: Bestimmung der Gegenwart von Hepatitis C Viren mit Polymerase Kettenreaktion

Die oben extrahierte RNA wurde mit 4µl destilliertem Wasser und 1µl 0,1M CH<sub>3</sub>HgOH gemischt und bei Raumtemperatur für 10 Minuten stehengelassen. 0,5µl 1M β-mercaptoproethanol, 10µl RNasin, 5µl 5X RT Puffer (BRL, Gaithersburg, MD 20877, USA), 1,25µl dNTP (10mM dGTP, dTTP, dCTP und dATP), 1µg Random Primer, 1,25µl (18 unit/µl) Superscript H-Reversetranskriptase (BRL, USA) wurden zugegeben. Dann wurde destilliertes Wasser auf ein Gesamtvolumen von 25µl zugegeben und bei einer Temperatur von 42 °C für 1 Stunde reagieren gelassen. Nach der Reaktion wurde das Gesamte auf eine Temperatur von 65 °C für 15 Minuten erhitzt, um die Enzyme zu inaktivieren, und für die Polymeraskettenreaktion verwendet.

55 Eine erste Polymerasekettenreaktion wurde wie folgt durchgeführt. 0,5µl AmpliTaq DNA Polymerase (Perkin Elmer Cetus, USA) wurde mit 10µl 10X Taq Polymerasepuffer (10mM Tris-HCl, pH 8,3, 500mM KCl, 155mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1% (w/v) Gelatine), 10µl einer Mischung von 1,25mM dNTPs, 2µg Primer A 5'-CATAGTGGTCTCGCGAACCG-3', 2µg Primer B 5'TTGAGGTTT-AGGATTCTGC-3' und 75µl destilliertem

Wasser vermischt. 50 $\mu$ l Mineralöl wurden zugegeben, um das Verdampfen der Lösung zu verhindern. Die erste PCR wurde ausgeführt, indem 40x der folgende thermische Zyklus durchlaufen wurde: 95 °C für 2 Minuten, 55 °C für 2 Minuten und 72 °C für 3 Minuten.

Eine zweite PCR wurde unter den gleichen Bedingungen wie die erste PCR durch 20-fache Wiederholung durchgeführt, nachdem 1 $\mu$ l des Produktes der ersten PCR mit 1 $\mu$ l des Primers C 5'-TACCCGGAATTGCCAGGAC-3' und 1 $\mu$ l des Primers D 5'-TCATGGTGCACGGTCTACGAG-3' vermischt worden waren.

Etwa 5 $\mu$ l des Produktes aus der zweiten PCR wurden einer 7% Polyacrylamidgel-Elektrophorese unterworfen, um die Gegenwart von Hepatitis C Viren zu bestimmen, wobei die positive Probe ein DNA Band von 182bp zeigte.

Beispiel 9: Herstellung eines spezifischen Antikörpers gegen Hepatitis C Antigen des KHCV Proteins

9-A: Immunisierung

Das KHCV 897 Protein, in Salzlösung gelöst, wurde mit einer äquivalenten Menge Freund's complete adjuvant vermischt. 0,2ml einer Mischung mit 50 $\mu$ g des Proteins wurden einer etwa 10 Wochen alten Balb/c Maus intraperitoneal injiziert. 30 $\mu$ g des Proteins vermischt mit Freund's incomplete adjuvant wurden in Intervallen von 2 bis 3 Wochen injiziert. 2 Wochen nach der zweiten Injektion wurde eine kleine Menge des Blutes vom Schwanz der Maus abgenommen und einer Enzym immunoassay unterworfen, um den Antikörper-Titer zu bestimmen. 50 bis 100 $\mu$ g des Proteins in 0,5ml Salzlösung wurden weiters injiziert, wenn der Titer 10.000 erreichte. Der Antikörper-Titer wurde arbeitsmäßig als jene Verdünnung des Serums definiert, die einen 0,2 absorbance units background im ELISA Verfahren ergab. Nach 3 bis 4 Tagen wurden Milzzellen der Maus für die Herstellung einer Zelle verwendet, die einen monokonalen Antikörper produziert.

9-B: Zellfusion

Immunisierte Milzzellen wurden mit P3 x 63 Ag8.653 (ATCC CRL 1580) fusioniert, die eine Myelomzelle der Maus ist. 5 x 10<sup>7</sup> Milzzellen der immunisierten Maus wurden mit 2 x 10<sup>7</sup> P3 x 63-Ag8.653 gemischt und bei 300 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Zellniederschlag wurde mit IMDM Medium (Gibco, USA) gewaschen und zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und 1ml 50% PEG (Kodak, Molekulargewicht 1450 Dalton) Lösung wurde tropfenweise während 1 Minute dem Zellniederschlag unter Rühren zugegeben. Weiters wurde bei 200 x 9 für 2 Minuten zentrifugiert. 5ml des IMDM Mediums wurden langsam über 3 Minuten zugegeben, gefolgt von der Zugabe von 5ml IMDM Medium, welches 10% fötales Rinderserum enthielt, über einen Zeitraum von 5 Minuten unter Rühren.

IMDM Medium mit einem Gehalt von 10% fötalem Rinderserum wurde weiter zugegeben, bis zu einem Gesamtvolumen von 50ml und für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen. Ein IMDM-HAT Medium, hergestellt durch Zugabe von 10% fötalem Rinderserum, 100 $\mu$ M Hypoxanthin, 0,4 $\mu$ M Aminopterin und 16 $\mu$ M Thymidin zu dem IMDM Medium, wurde hinzugefügt, um die Zellkonzentration auf 5 x 10<sup>5</sup> Zellen P3 x 63 Ag8.653 pro ml zu verdünnen. Das Produkt wurde auf eine Platte (95 Öffnungen) für Gewebskulturen in einer Menge von 0,1ml/Öffnung gegeben. Den Öffnungen wurden jeweils 0,1ml IMDM-HAT Medium mit 1 x 10<sup>5</sup> Zellen/ml intraperitoneale Makrophagen zugeführt und einen Tag vor der Fusion kultiviert. Die myelomatische Zelle und die nicht fusionierte Milzzelle können in dem HAT Medium nicht wachsen.

Demzufolge konnte von den in dem Medium gewachsenen Zellen angenommen werden, daß es sich um fusionierte Zellen handelt. Mit dem Überstand, von dem eine Probe gezogen worden war, wenn das Hybridoma auf einen Wert von 10 bis 50% gewachsen war, wurde ein Test auf Antikörperaktivität durchgeführt.

9-C: Untersuchung des Titers monoklonaler Antikörper

Eine Titration monoklonaler Antikörper, hergestellt in Stufe 9-B, wurde gemäß dem folgenden Enzymimmunotest (enzyme immunoassay) durchgeführt.

Stufe 1

KHCV 897 Protein wurde in 50mM Natriumboratpuffer (pH 9,0) gelöst, bis eine Konzentration von 2 $\mu$ g/ml vorlag. 100 $\mu$ l der Lösung wurden zu jeder Öffnung einer Immulon Typ I plate (Dynatech) zugegeben und es wurde bei einer Temperatur von 37°C für 2 Stunden inkubiert.

Stufe 2

Die Öffnungen wurden 1x mit PBS (pH 7,4) gewaschen, welche 0,05% Tween-20 (v/v) enthielt (im folgenden als Waschlösung bezeichnet). 200 $\mu$ l PBS mit einem Gehalt an 0,1% Gelatine (W/V) wurde zugegeben, um die Adsorptionsstellen des Proteins zu blockieren, welche in der Öffnung bei einer Temperatur von 37°C für 1 Stunde verblieben.

Stufe 3

15 Die Öffnungen der Stufe 2 wurden 2x mit der Waschlösung gewaschen. 50 $\mu$ l PBS mit einem Gehalt an 0,25% Gelatine (w/v), 1,0mM EDTA, 1% Triton X-100 (v/v) und 0,02% Thimerosal wurden zugegeben. 50 $\mu$ l des Überstandes, in dem fusionierte Zellen gewachsen waren, wurden zu jeder Öffnung zugegeben und bei einer Temperatur von 37°C für 1 Stunde inkubiert.

20 Stufe 4

Die in Stufe 3 behandelten Öffnungen wurden 5x mit der Waschlösung gewaschen. Anti-Maus IgG-HRP (Boehringer Manheim, Cat. No. 605-250), markiert mit Horseradish-Peroxide (HRP) wurde mit PBS verdünnt, due 10% (v/v) fötales Rinderserum, 1% (v/v) Ficoll, 0,2% (v/v) Thimerosal und 0,05% (v/v) Tween-20 in einem Verhältnis von 1:5000 enthielt. Die verdünnte Lösung wurde zu den Öffnungen in einer Menge von 100 $\mu$ l/Öffnungen zugegeben und bei einer Temperatur von 37°C für 1 Stunde inkubiert. Nach der Reaktion wurde die Platte 5x mit der Waschlösung gewaschen.

30 Stufe 5

100 $\mu$ l eines 50mM Citrat/Phosphatpuffers (pH 5,5) mit 10mg/5ml O.P.D. (Sigma Chemical Co.) wurden jeder Öffnung zugegeben und bei Raumtemperatur in Dunkeln für 30 Minuten reagieren gelassen. Um die Reaktion zu unterbrechen wurden 50 $\mu$ l 2N schwefelige Säure zugegeben. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 492nm bestimmt. Das Hybridoma, welches die gewünschte Antikörperaktivität aufwies, wurde in eine Platte mit 6 oder 24 Öffnungen transferiert und dort wachsen gelassen, wobei nötigenfalls die peritonealen Makrophagen der Maus als Nährschicht Verwendung finden können, um den für das Wachstum der fusionierten Zellen notwendigen Wachstumsfaktor vorzusehen.

40 9-D: Herstellung der Antikörper

Es wurden 4 Zelllinien, nämlich Lucky 1.1, 1.2, 1.3 und 1.4 erhalten, die die gewünschten monoklonalen Antikörper produzierten.

Die erfindungsgemäßen Antikörper waren entweder erhältlich vom Überstand, in welchem die Klone mittels herkömmlicher Methode kultiviert worden waren, oder von der Aszitesflüssigkeit, die die Klone enthielt, die im Peritoneum einer Balb/C Maus gewachsen waren.

2,5 x 10<sup>6</sup> fusionierte Zellen wurden intraperitoneal in eine Balb/c Maus injiziert, die 7 bis 14 Tage zuvor mit 0,5ml Pristane (Sigma) vorbehandelt worden war. Nach 1 bis 2 Wochen wurde eine Seroperitoneumflüssigkeit erhalten. Daraus wurden Antikörper nach einer konventionellen Methode isoliert.

50 9-E: Bestimmung der Merkmale des monoklonalen Antikörpers

Die Merkmale der Antikörper, die von jedem in Beispiel 9-D erhaltenen Klon hergestellt worden waren, wurden wie folgt bestimmt.

Stufe 1: Antikörper Subklasse

Die Subklasse der Maus-Antikörper wurde bestimmt, indem ein Hybridoma sub-Isotyping Kit (Calbiochem, USA) verwendet wurde. Die Resultate sind in Tabelle 3 dargestellt.

5

Stufe 2: Enzymimmunoassay

200 $\mu$ l KHCV 897 Protein, aufgelöst in 50mM Natriumboratpuffer in einer Konzentration von 2 $\mu$ g/ml

10 wurden jeder Öffnung einer Mikrotiterplatte (Dynatech Immunolon Typ 1) zugegeben und bei einer Temperatur von 37°C für 2 Stunden inkubiert. Die Platte wurde mit PBS gewaschen, die 0,05% Tween-20 (v/v) enthielt. Die von jedem Klon erhaltenen Antikörper wurden mittels herkömmlicher Methode gereinigt, auf eine Konzentration von 1mg/ml eingestellt und seriell in 2 Schritten mit PBS verdünnt, welches 0,25% Gelatine (v/v), 1,0% Triton X-100, 0,02% Thimerosal und 1mM EDTA enthielt. 210 $\mu$ l PBS mit einem Gehalt an 0,1% Gelatine wurden jeder Öffnung zugegeben und bei einer Temperatur von 37°C für 1 Stunde inkubiert. Die Platte wurde mit der Waschlösung gewaschen.

15 200 $\mu$ l der anti-Maus IgG (Boehringer Manheim, Cat. No. 605-250), markiert mit Horseradish-Peroxidase, gelöst in PBS mit 10% FBS (v/v), 1% Ficoll (v/v) und 0,05% (v/v) Tween-20, wurden zu jeder Öffnung zugegeben und bei einer Temperatur von 37°C für 1 Stunde inkubiert. Die Entwicklungsreaktion wurde auf die gleiche Weise ausgeführt, wie in Beispiel 9-C. Die EIA Wirksamkeit jedes Antikörpers wurde als reziproke Zahl des Verdünnungsfaktors bestimmt, wenn der O.D. Wert bei 495nm größer als 1,0 war. Die Resultate sind in Tabelle 3 angegeben.

Stufe 3: Bestimmung des Molekulargewichtes

25 Jede Klon wurde in einer Platte oder dem Peritoneum einer Maus kultiviert. Der Überstand oder die aszite Flüssigkeit, die davon erhalten worden waren, wurden einer Protein-G-Sepharosesäulenaffinitätschromatographie (Pharmacia) unterworfen, um IgG zu isolieren, welches dann einer SDS-PAGE unterworfen wurde, um das Molekulargewicht der schweren und der leichten Kette im zuvor erhaltenen Mäuse-Antikörper zu bestimmen. Die Resultate sind in Tabelle 3 dargestellt.

30

Stufe 4: Bestimmung des Epitops

Die Varianten, in denen ein Abschnitt der KHCV 897 cDNA verschieden ausgeschnitten wurde, wurden so ausgebildet, daß die folgenden Proteine kodiert waren. Die Reaktivität des Proteins zu jedem monoklonalen Antikörper wurde untersucht.

- 35 (1) KHCV 897 Protein: Ein Protein, welches aus den Aminosäuren 1192 bis 1457 der Aminosäuresequenz bestand, die in KHCV-LBC1 kodiert ist.  
 (2) KHCV 290 Protein: Ein Protein, welches aus den Aminosäuren 1192 bis 1289 der Aminosäuresequenz bestand, die in KHCV-LBC1 kodiert ist.  
 40 (3) KHCV 430 Protein: Ein Protein, welches aus den Aminosäuren 1192 bis 1335 der Aminosäuresequenz bestand, die in KHCV-LBC1 kodiert ist.  
 (4) KHCV 570 Protein: Ein Protein, welches aus den Aminosäuren 1192 bis 1382 der Aminosäuresequenz bestand, die in KHCV-LBC1 kodiert ist.  
 (5) KHCV 652 Protein: Ein Protein, welches aus den Aminosäuren 1192 bis 1407 der Aminosäuresequenz bestand, die in KHCV-LBC1 kodiert ist.  
 45 (6) KHCV 150 Protein: Ein Protein, welches aus den Aminosäuren 1408 bis 1457 der Aminosäuresequenz bestand, die in KHCV-LBC1 kodiert ist.  
 (7) KHCV 257 Protein: Ein Protein, welches aus den Aminosäuren 1371 bis 1457 der Aminosäuresequenz bestand, die in KHCV-LBC1 kodiert ist.  
 50 (8) KHCV 518 Protein: Ein Protein, welches aus den Aminosäuren 1285 bis 1457 der Aminosäuresequenz bestand, die in KHCV-LBC1 kodiert ist.

Für die SDS-PAGE wurde eine Probe hergestellt, indem ein Puffer (Laemmli, U.K., Nature 277, 680 (1970)) zu E. coli Zellen zugegeben wurde, die jedes KHCV cDNA Fragment exprimierten. Die Probe wurde bei einer Temperatur von 100°C 5 Minuten gekocht. Die Reaktivität der hergestellten Probe gegenüber dem Antikörper wurde mittels der Immunoblotting-Methode untersucht (Towbin, H., J. Immunol. Methods 72, 313-340 (1984)). Die Resultate sind in den Tabellen 3 und 4 angegeben.

Aus dem Ergebnis ersieht man, daß die von Lucky 1.1 erhaltenen Antikörper eine Erkennungsstelle für die Aminosäuren 1192 bis 1289 der Aminosäuresequenz der Hepatitis C besitzen. Lucky 1.2, 1.3 und 1.4

AT 405 053 B

besitzen eine Erkennungsstelle für die Aminosäuren 1371 bis 1407. Zwei monoklonale Antikörper, deren Epitope voneinander verschieden sind, können dazu verwendet werden, einen Kit herzustellen, wodurch die Antigene einer Serumprobe bestimmt werden können, indem ein Sandwich Enzym Immunoassay oder ähnliches verwendet wird.

5

Tabelle 3

Merkmale der erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper				
Monoklonaler Antikörper	Antikörper Subklasse	Molekular-Gewicht	EIA Wirksamkeit	Bindungsstelle Aminosäuresequenz
Lucky 1.1	IgG1	162.000	x 51.200	1192-1289
Lucky 1.2	IgG1	159.700	x 102.400	1371-1407
Lucky 1.3	IgG1	180.800	x 51.200	1371-1407
Lucky 1.4	IgG1	177.700	x 400	1371-1407

20

Tabelle 4

25

Immunoreaktivität ausgeschnittener (excised) Mutanten mit Antikörpern					
Antigen	Antikörper				
	Lucky 1.1	Lucky 1.2	Lucky 1.3	Lucky 1.4	
KHCV 897	+	+	+	+	+
KHCV 290	+	-	-	-	-
KHCV 430	+	-	-	-	-
KHCV 570	+	-	-	-	-
KHCV 652	+	-	-	-	-
KHCV 150	-	-	-	-	-
KHCV 257	-	+	+	+	+
KHCV 518	-	+	+	+	+
Negative	-	-	-	-	-
Kontrolle	-	-	-	-	-
Erkennungsstelle der Aminosäuresequenz	1192-1289	1371-1407	1371-1407	1371-1407	

40

Die Zelllinien Lucky 1.1 und Lucky 1.2 wurden am 18. Dezember 1991 nach den Bestimmungen des Budapest Vertrages bei der American Type Culture Collection (ATCC) hinterlegt und erhielten die Zugriffsnummer 10949 und 10950.

Beispiel 10: Diagnosemittel mit einem Antikörper gegen KHCV Antigen

45

Stufe 1: Markieren des monoklonalen Antikörpers von Lucky 1.1 mit Horseradish-Peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)

50

In einer ersten Stufe wurde die genannte Lucky 1.1 Zelllinie mit Horseradisch-Peroxidase markiert, indem die bekannte Periodate Method (Nakane et al., J. Histochemcytochem., 22, 1084 (1974)) wie folgt angewendet wurde. 0,3ml 0,1M Natriumperiodat in einem 10mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,0) wurde zu 1,2ml destilliertem Wasser zugegeben, in dem 5mg der Peroxidase gelöst war. Die Mischung wurde bei Raumtemperatur für 20 Minuten reagieren gelassen. Das Produkt wurde gegen 1mM Natriumacetatpuffer für 16 Stunden dialysiert. 1,5ml der Peroxidaselösung wurden mit 1ml des zu markierenden Antikörpers gemischt, der vorher durch Auflösen in 20mM Natriumkarbonat (pH 9,5) in einer Konzentration von 10mg/ml hergestellt worden war. Die Mischung wurde bei Raumtemperatur für 2 Stunden reagieren gelassen. Die überschüssige Schiff'sche Base wurde durch Addition von 100µl eines 4mg/ml Natriummonohydrids in destilliertem Wasser reduziert und damit entfernt. Das Produkt wurde gegen PBS (pH 7,4) über Nacht der Dialyse unterworfen und dann über eine Sephadryl S 300 Chromatographiersäule geschickt, um monoklonale Antikörper zu entfernen, die nicht markiert waren.

Stufe 2: Adsorption des monoklonalen Antikörpers von Lucky 1.2 an der Mikrotiterplatte

200 $\mu$ l der 5 $\mu$ g/ml Lucky 1.2, verdünnt mit PBS, wurden in jede Öffnung (well) gegeben, um dessen Adsorption an der Wand der Öffnung bei 37°C für 2 Stunden zu erlauben.

5

Stufe 3: Blockieren der nicht-spezifischen Bindung

Der in Stufe 2 vorbereitete Mikrotiter wurde einmal mit PBS gewaschen, das 0,05% Tween-20 und 0,02% Thimerosal enthielt (nachfolgend als Waschlösung bezeichnet). 200 $\mu$ l der PBS mit 0,1% Gelatine wurden jeder Öffnung zugeführt, um die Proteinadsorptionsstelle über eine Stunde abzudecken. Die Platte wurde 2x mit der Waschlösung gewaschen.

Stufe 4: Diagnose der Gegenwart des Antigens

200 $\mu$ l des KHCV 897 Antigens, das aufeinanderfolgend in zwei Schritten von 200ng/ml mit PBS verdünnt worden war, welches 0,25% (w/v) Gelatine, 1,0% (v/v) Triton X-100, 1mM EDTA und 0,02% Thimerosal enthielt, wurden zu jeder Öffnung zugegeben. Zum Vergleich wurde KHCV Protein einer normalen Blutprobe mit einer Konzentration von 400ng/ml zugesetzt. Die das KHCV Antigen enthaltende normale Blutprobe wurde aufeinanderfolgend in zwei Stufen verdünnt. 100 $\mu$ l des verdünnten Blutes wurden mit 100 $\mu$ l des genannten Puffers vermischt und zu jeder Öffnung zugegeben. Dies sollte zeigen, daß die Gegenwart eines Antigens von Hepatitis C in Blut mittels des Sandwich Enzym Immunoassay festgestellt werden kann, indem die erhaltenen Antikörper verwendet werden. Das normale Blut, dem das KHCV 897 Antigen nicht beigegeben worden war, wurde zur negativen Kontrolle verwendet. Die Platte wurde bei einer Temperatur von 37°C für 1 Stunde inkubiert und mit der Waschlösung 5x gewaschen.

25

Stufe 5: Untersuchung des Antigens mittels des mit Peroxidase markierten Lucky 1.1

200 $\mu$ l Lucky 1.1, das auf eine Konzentration von 5 $\mu$ g/ml mit PBS, enthaltend 10%(v/v) fötales Rinderserum, 1% Ficoll, 0,05% Tween 20 und 0,02% Thimerosal, verdünnt worden war, wurde zu jeder Öffnung zugegeben, und es wurde bei einer Temperatur von 37°C für eine Stunde inkubiert.

Stufe 6: Farbentwicklungsreaktion

Die in Stufe 5 behandelte Platte wurde 5mal mit der Waschlösung gewaschen. 200 $\mu$ l des O.P.D.-Entwicklungsreagens, welches durch Zugabe von O-Phenyldiamin(Sigma) zu 50mM Citrat/Phosphatpuffer (pH 5,5) auf eine Konzentration von 2mg/ml hergestellt worden war, wurde zu jeder Öffnung zugegeben und bei Raumtemperatur in Dunkelheit für 30 Minuten stehen gelassen, um eine Farbreaktion zu entwickeln. 50 $\mu$ l der 4N schwefeligen Säure wurden hinzugefügt, um die Reaktion zu stoppen. Deren Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 492 nm bestimmt. Die Ergebnisse sind in Fig. 43 dargestellt.

40

Beispiel 11: Untersuchung des Antigens im Serum eines Hepatitis-C-Patienten mittels Sandwich-Enzym-Immunoassay (Immunotest)

100 $\mu$ l eines zu analysierenden Serums, welches mit 100 $\mu$ l des in Stufe 4 des Beispiels 10 verwendeten Puffers vermischt worden war, wurden zu jeder Öffnung des Mikrotiters gegeben, der auf die gleiche Weise vorbereitet worden war, wie in Beispiel 10 beschrieben, und an dem der monoklonale Antikörper bereits adsorbiert worden war. Das Antigen in dem Serum wurde auf die gleiche Weise untersucht, wie in Beispiel 10. Die Resultate sind in Tabelle 5 angeführt.

220 von 231 Proben (220/231) zeigten den Absorptionswert (O.D.) bei 492nm von weniger als 0,15. Die anderen 11 Proben zeigten Werte zwischen 0,15 und 0,8, die ebenfalls als positiv beurteilt wurden. In Übereinstimmung mit der Halbert'schen Methode (Halbert, S.P. et al., Clin. Chim. Acta 127, 69(1983)) wurde eine Absorption von 0,15 als Cutoff-Wert angenommen.

Für 15 Proben wurde die gegen KHCV gerichteten Antikörper einschließlich der 11 positiven Proben untersucht, wie bei dem gleichen Verfahren in Beispiel 7. Die Resultate sind in Tabelle 6 dargestellt. Diese Resultate legen nahe, daß der Sandwich ELISA für die Entdeckung von KHCV 897-Antigenen wertvoll ist und zur frühen Entdeckung einer KHCV-Infektion herangezogen werden kann. Gemeinsam mit EIA für das Aufspüren der Antikörper sollte ELISA für die Antigenuntersuchung für die Pflege und den Schutz von HCV-Patienten verwendet werden.

Tabelle 5: Absorption von Proben, bestimmt mittels Sandwich-Enzym-  
Immunoassay

Absorption	Probennummer	Prozentsatz <sup>1)</sup>
$\geq 0.5$	1	0.43
0.3 - 0.5	3	1.30
0.2 - 0.3	4	1.73
0.15 - 0.2	3	1.30
< 0.15	220	95.24
Total	231	100.00

Bemerkung: <sup>1)</sup>Prozentsatz (%) =  $\frac{\text{Anzahl der untersuchten Proben}}{\text{Anzahl der gesamten Proben}}$

Tabelle 6

Test auf Hepatitis-C-Antikörper und Antigen		
Probe	Antikörper Hepatitis C	Antigen Hepatitis C
1	-	+
2	-	+
3	-	-
4	-	+
5	-	+
6	-	+
7	-	-
8	+	-
9	-	+
10	-	+
11	-	+
12	-	+
13	-	+
14	+	+
15	-	-

Bemerkung: <sup>1)</sup> Als Cutoff-Wert wurde ein Absorptionswert von 0,15 für die Antigendiagnose und 0,33 für die Antikörperdiagnose festgesetzt.

Demzufolge sind die erfindungsgemäßen KHCV-Proteine, insbesondere bei Verwendung des gemischten Antigens mit drei Proteinen, reaktiver gegenüber den Antikörpern gegen KHCV, als der kommerziell HCV-Diagnosekit, wie dies in Tabelle 1 gezeigt ist. Der erfindungsgemäße Diagnosekit erzeugt genauere Testresultate als der kommerziell erhältliche Kit. Weiters ist er besser brauchbar und ökonomischer als der Referenzuntersuchungskit, wie in Tabelle 2 gezeigt ist.

Während die Erfindung in Verbindung mit gewissen speziellen Ausführungsbeispielen beschrieben worden ist, muß bemerkt werden, daß der Fachmann verschiedene Modifikationen und Abänderungen innerhalb der gegebständlichen Erfindung vornehmen kann, ohne den Schutzbereich der Ansprüche zu verlassen.

10

### Patentansprüche

1. KHCV cDNA, dadurch gekennzeichnet, daß sie die folgende Nucleotidsequenz aufweist:

15	10            20            30            40            50            60						
	GCCAGCCCCGATTGGGGGGCACACTCCACCATAAGATCACTCCCCTGTGAGGAACACT						
	CGGTCGGGGCTAACCCCCGCTGTGAGGTGGTATCTAGTGAGGGACACTCCTTGATGA						
20	70            80            90            100          110          120						
	GTCTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTGCGAGCCTCCAGGA						
	CAGAAGTGCCTTTCGCAGATCGGTACCGCAATCATACTCACAGCACGTCGGAGGTCT						
25	130          140          150          160          170          180						
	CCCCCCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGCTCTGCCGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCCA						
	GGGGGGAGGGCCCTCTCGGTATCACCAGACGCCCTGGCACTCATGTGGCCTAACGGT						
30	190          200          210          220          230          240						
	GGACGACCGGGTCCTTCTGGATCAACCGCTCAATGCCCTGGAGATTGGCGTGCCTCC						
	CCTGCTGCCAGGAAACCTAGTTGGCGAGTTACGGACCTCTAAACCCGACGGGG						
35	250          260          270          280          290          300						
	CGCGAGACTGCTAGCCAGTAGTGTGGTCGCAGAACGGCTTGTGGTACTGCCTGATAG						
	GCCTCTGACGATCGCTCATCACAAACCCAGCGCTTCCGGAACACCATGACGGACTATC						
40	310          320          330          340          350          360						
	GGTGCTTGCAGTGCCTCCGGAGGTCTCGTAGACCGTGCACCATGAGCACGAATCCTAAA						
	CCACGAAACGCTCACGGGGCCCTCCAGAGCATCTGGCACGTGGTACTCGTGTAGGATTI						
	M S T N P K						
45	370          380          390          400          410          420						
	CCTCAAAGAAAAACCAACGTAACACCAACCGCCGCCACAGGATATTAAGTTCCCGGGC						
	GGAGTTCTTTGGTTGGCATGTGCTGGCGGGGTGTCTATAATTCAAGGGCCCG						
	P Q R K T R N T N R R P Q D I K F P G						
50	430          440          450          460          470          480						
	GGTGGTCAGATCGTTGGAGTTACTTGTGCGCGCACGGGCCCCAGGGTGGGTGTG						
	CCACCAAGTCTACCAACCACCTCAAATGAAACGGCGCGTCCCCGGGTCCAACCCACAC						
	G G Q I V G G V Y L L P R R G P R L G V						
55	490          500          510          520          530          540						
	CGCGCGACTAGGAAGACTTCCGAGCGGTGCAACCTCGTGGAGGGCACAGCCTATCCCC						
	CGCGCGCTGATCCTCTGAAGGCTGCCAGCGTTGGAGCACCTCCGCTGTGGATAGGGG						
	R A T R K T S E R S Q P T R G R R Q P I P						
	550          560          570          580          590          600						
	AAGGCTCGCCGGCCCGAGGGCAGGGCTGGGCTCAGCCCCGGTACCCCTGGCCCTCTAT						
	TTCCGAGCGGCCGGCTCCCGTCCCGAACCGAGTCGGGCCATGGAAACGGGGAGATA						
	K A R R P E G R A W A Q P G Y P W P L Y						

## AT 405 053 B

610            620            630            640            650            660  
 GGCAATGAGGGCTTGGGTGGGCAGGATGGCTCCTGTACCCCGCGGCTCCGGCTAGT  
 CCGTTACTCCGAACCCCCACCCGTCCATCCGAGGACAGTGGGGCGCCGAGGGCCGGATCA  
 G N E G L G W A G W L L S P R G S R P S  
 5

670            680            690            700            710            720  
 TGGGGCCCCACGGACCCCCGGCGTAAGTCGCGTAATTGGGTAAAGGTATCGACACCCCTC  
 ACCCCGGGTGCCCTGGGGCGCATTCAGCGATTAAACCCATTCCAGTAGCTGTGGGAG  
 W G P T D P R R K S R N L G K V I D T L  
 10

730            740            750            760            770            780  
 ACATGGGCTTCGCCGACCTCATGGGTACATTCCGCTCGTCGGGCCCTAGGGGGC  
 TGTAACGCCGAAGCGGCTGGAGTACCCCATGTAAGGCAGCAGCCGCGGGGGATCCCCCG  
 T C G F A D L M G Y I P L V G A P L G G

15

790            800            810            820            830            840  
 GTGCCAGGGCCCTGGCACATGGTGTCCGGGTGCTGGAGGACGGCGTGAACATATGCAACA  
 CAACGGTCCCAGGACCGTGTACACAGGCCACGACCTCCTGCCACTTGATACTGTTGT  
 V A R A L A E G V R V L E D G V N Y A T

20

850            860            870            880            890            900  
 GGGATCTGCCCGGTTGCTTTCTCTATCTTCCCTTTGGCTCTGCTGTCTGTTGACC  
 CCCTTAGACGGGCCAACGAGAAAGAGATAGAAGGAGAACCGAGACAGAACAAACTGG  
 G N L P G C S F S I F L L A L L S C L T

25

910            920            930            940            950            960  
 ACCCCAGTTCCGCTTATGAAGTGGTAACGGCTCCGGATGTACCATGTCACGAACCGAC  
 TGGGGTCAAAGGCQAATACTCACGCATTGCCAGGCCCTACATGGTACAGTGCTTGCTG  
 T P V S A Y E V R N A S G M Y E V T N D

30

970            980            990            1000          1010          1020  
 TGCTCCAACCTAACGCATTGTGTATGAGGCAGCGGACATGATCATGCACACTCCGGGTGC  
 ACCGAGGTTGAGTTCGTAACACATACTCCGTCGCCGTACTAGTACGTGTGAGGGCCACG  
 C S N S S I V Y E A A D M I M H T P G C

35

1030          1040          1050          1060          1070          1080  
 GTGCCCTGCGTTGGGAGGACAACTCCTCCGGTTGCTGGGTGGCACTTACTCCACGCTC  
 CACGGGACGCAAGCCCTCCTGTTGAGGAGGGCAACGACCCACCGTGAATGAGGGTGCAG  
 V P C V R E D N S S R C W V A L T P T L

40

1090          1100          1110          -1120         1130          1140  
 GGGGCCAGGAATGCCAGCGTCCCCACTACGACATTGCGACGCCATGTCGACTTGCTCGTT  
 CGCCGGTCTTACGGTCGCAGGGGTGATGCTGTAACGCTGCCGTACAGCTGAACGAGCAA  
 A A R N A S V P T T L R R E V D L L V

45

1150          1160          1170          1180          1190          1200  
 GGGGTAGCTGCTTCTGTTCCGCTATGTACGTGGGGGACCTCTGCGGATCTGTTCCCT  
 CCCCATCGACGAAAGACAAGGCAGATACATGCACCCCTGGAGACGCCCTAGACAAAAGGAA  
 G V A A F C S A M Y V G D L C G S V F L

50

55

## AT 405 053 B

1210        1220        1230        1240        1250        1260  
 GTTTCCCAGCTGTTCACCTTTGCCCTGCCGGCATGAGACGGTACAGGACTGCAACTGC  
 CAAAGGGTCGACAAGTGGAAAAGCGGAGCGGCCGTACTCTGCCATGCTGACGTTGACG  
 5            V S Q L F T F S P R R H E T V Q D C N C  
  
 1270        1280        1290        1300        1310        1320  
 TCAATCTATCCCGGCCGCGTATCAGGTACCGCATGGCCTGGGATATGATGATGAACTGG  
 AGTTAGATAGGGCCGGCGCATAGTCCAGTGGCGTACCGGACCCCTATACTACTACTTGACC  
 10            S I Y P G R V S G H R M A W D M M M N W  
  
 1330        1340        1350        1360        1370        1380  
 TCGCCTACAAACAGCCCTAGTGGTATCGCAGCTACTCCGGATCCCACAAGCTGTCGTGGAC  
 AGCGGATGTTGTCGGGATCACCATAGCGTCGATGAGGCCCTAGGGTGGTTCGACAGCACCTG  
 15            S P T T A L V V S Q L L R I P Q A V V D  
  
 1390        1400        1410        1420        1430        1440  
 ATGGTACAGGGTCCCACGGGGAAATCCTGGCGGGCTTGCCTACTATTCCATGGTGGGG  
 TACCACTGTCCCAGGGTAGCCCTAGGACCGCCGGAACGGATGATAAGGTACCAACCCC  
 20            H V T G S H W G I L A G L A Y Y S M V G  
  
 1450        1460        1470        1480        1490        1500  
 AACTGGGCTAAGGTCTTAATTGGCATGCTACTCTTGCCGGCGTTGACGGAACCACCCAC  
 TTGACCCGATTCCAGAATTAAACGCTACGATGAGAACGGCCGGAACTGCCCTGGTGGGTG  
 25            N W A K V L I A M L L F A G V D G T T E  
  
 1510        1520        1530        1540        1550        1560  
 GTGACAGGGGGGGCGCAAGGTGGGGCCGCTAGCTCGCTAACGTCCCTCTTAGGCCCTGGG  
 CACTGTCCCCCCCCCGCGTCCAGCCCGGGATCGAGCGATTGCAGGGAGAAATCGGGACCC  
 30            V T G G A Q G R A A S S L T S L F S P G  
  
 1570        1580        1590        1600        1610        1620  
 CCGGTTCAAGCACCTCCAGCTCATAAACACCAACGGCAGCTGGCATATCAACAGGACCGCC  
 GGCCAAAGTCGTGGAGGTGAGTATTGTTGCGCTGACCGTATAAGTTGTCCTGGCGGG  
 35            P V Q E L Q L I N T N G S W E I N R T A  
  
 1630        1640        1650        1660        1670        1680  
 CTGAGCTGCAATGACTCCCTCAACACTGGGTTTGTGCGCGCTGTTCTACAAATACAGG  
 GACTCGACGTTACTGAGGGAGTTGTGACCCAAACACGGCGCGACAAAGATGTTATGTC  
 40            L S C N D S L N T G F V A A L F Y X Y R  
  
 1690        1700        1710        1720        1730        1740  
 TTCAACCGCGTCCGGGTGCCCGGAGCGCTGGCCACGTGCCGCCCCATTGATACATTGCG  
 AAGTTGCGCAGGCCACGGGCTCGCGAACGGTAGTGCACGGGGGTAACTATGTAAGCGC  
 45            F N A S G C P E R L A T C R P I D T F A  
  
 1750        1760        1770        1780        1790        1800  
 CGGGGTGGGTCCCATCACTTACACTGAGCCTCATGATTGGATCAGAGGCCCTATTGC  
 GTCCCCACCCAGGGTAGTGAATGTGACTCGGAGTACTAAACCTAGTCTCCGGATAACG  
 50            Q G W G P I T Y T E P E D L D Q R P Y C

## AT 405 053 B

	1810	1820	1830	1840	1850	1860
	TGGCACTACGCGCCTCAACC GTGTGGTATTGTGCCACGTTGCAGGTGTGGCCCAGTA					
5	ACCGTGATGCGCGGAGTTGGCACACCATAACACGGGTGCAACGTCCACACACCGGGTCAT	W	H	Y	A	P
	CG	G	I	V	P	T
	L	Q	V	C	G	P
	V					
	1870	1880	1890	1900	1910	1920
	TA CTGCTTCACCCCCAGTCCTGTTGCCGGTGGGACTACCGATCGTTCGGTGCCCTACA					
10	ATGACGAAGTGGGGCTCAGGACAACGCCACCCCTGATGGCTAGCAAAGCCACGGGGATGT	Y	C	F	T	P
	S	P	V	A	V	G
	T	T	D	R	F	G
	1930	1940	1950	1960	1970	1980
	TACAGATGGGGGGCAATGAGACGGACGTGCTGCCCTAACAAACGCCGGGCCGCCCAA	Y	R	W	G	A
15	ATGTCTACCCCCCGTTACTCTGCCTGCACGACGGAGGAATTGTTGCCGCCGGCGTT	N	E	T	D	V
	Y	R	W	G	A	N
	1990	2000	2010	2020	2030	2040
	GGCAACTGGTTCGGCTGTACATGGATGAATGGCACTGGTTCACCAAGACATGTGGGGGC	G	N	W	F	G
20	CCGTTGACCAAGCCGACATGTACCTACTTACCGTGACCCAAGTGGTTCTGTACACCCCG	C	T	W	M	N
	G	N	W	F	G	G
	2050	2060	2070	2080	2090	2100
	CCCCCGTGTAAACATCGGGGGGCTCGGCAACATACTTACCTGACCTGCCAACGGACTGCTTC	P	P	C	N	I
25	GGGGGCACATTGTAGCCCCCCCAGCCGTTATGGA ACTGGCGGGGTCCCTGACGAAG	G	V	G	N	N
	T	L	T	C	P	T
	2110	2120	2130	2140	2150	2160
	CGAAAGCACCCCGGGGCCACTTACACCAAATGC GGTTGGGCCCTGGTTAACACCCAGG	R	K	E	P	G
30	GCTTCGTGGGGCCCCGGTGAATGTGGTTTACGCCAAGCCCCGGAACCAATTGTGGTCC	A	T	Y	T	K
	C	G	S	G	P	W
	2170	2180	2190	2200	2210	2220
	TGCTTAGTCGACTACCGTACAGGCTCTGGCATTACCCCTGCACTGTCAACTTACCATC	L	V	D	Y	P
35	ACGAATCAGCTGATGGCATGTCCGAGACCGTAATGGGACGTGACAGTTGAAATGGTAG	Y	R	L	W	Z
	Y	P	Y	R	Z	Y
	2230	2240	2250	2260	2270	2280
	TTTAAGGTTAGGATGTACGTGGGGCGCGGAGCACAGGCTCGACGCCGCATGCACTGG	F	K	V	R	X
40	AAATTCCAATCCTACATGCACCCCCCGGCCCTGTCCTGAGCTGCCGTACGTTGACC	Y	V	G	G	A
	V	G	A	E	S	R
	2290	2300	2310	2320	2330	2340
	ACTCGGGGAGAGCGTTGTGACCTGGAGGACAGGGATAGGTCAAGAGCTTAGCCCGCTGCTG	T	R	G	E	R
45	TGAGCCCTCTCGCAACACTGGACCTCCTGTCCTATCCAGTCTCGAATCGGGCGACGAC	D	L	E	D	R
	D	R	S	E	L	S
	2350	2360	2370	2380	2390	2400
	CTGTCTACAACAGAGTGGCAGGTACTGCCCTGTTCTCACAAACCTACCGGCTCTGTCC	L	S	T	T	E
50	GACAGATGTTGTCTCACCGTCCATGACGGGACAAGGAAGTGTGGGATGGCCGAGACAGG	W	Q	V	L	P
	S	F	T	T	L	P
	A	L	S			

## AT 405 053 B

2410        2420        2430        2440        2450        2460  
 ACTGGTTGATTCATCTCCATCAGAACATCGTGGACATACAATACTGTACGGTATAGGG  
 TGACCAAACTAAGTAGAGGTAGTCTTGTAGCACCTGTATGTTATGGACATGCCATATCCC  
 T G L I H L E Q N I V D I Q Y L Y G I G  
 5

2470        2480        2490        2500        2510        2520  
 TCGGCGGTTGTCTCCTTGCGATCAAATGGGAGTATATTGTGCTGCTCTCCCTCTCTG  
 AGCCGCCAACAGAGGAAACGCTAGTTACCCCTCATATAACACGACGAGAAGGAAGAAC  
 S A V V S F A I K W E Y I V L L F L L L  
 10

2530        2540        2550        2560        2570        2580  
 GCGGACCGCGCGTCTGCGTTGCTGGATGATGCTGCTGGTAGCGCAAGGCCAGGCC  
 CGCCTCGCGCGCAGACGCGAACGACACCTACTACGACGACCATCGCGTTCGGCTCCGG  
 A D A R V C A C L W M M L L V A Q A E A  
 15

2590        2600        2610        2620        2630        2640  
 GCCTTAGAGAACCTGGGGTCCATCAATGCAGCGTCCGTGGCCGGAGGCCATGGCATTCTT  
 CGGAATCTCTGGACCACCAGGAGTTACGTCGCAGGCACCGGCCTCGCTACCGTAAGAA  
 A L E N L V V L N A A S V A G A H G I L  
 20

2650        2660        2670        2680        2690        2700  
 TCCTTCATTGTGTTCTCTGTGCTGCCTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTTCCGGAGCG  
 AGGAAGTAACACAAGAACGACACGACGGACCATGTAGTTCCCGTCCGACCAAGGGCCTCGC  
 S F I V F F C A A W Y I K G R L V P G A  
 25

2710        2720        2730        2740        2750        2760  
 GCATACGCCCTCTATGGCGTATGGCCGCTGCTTCTGCTTCTGGCGTTACCAACCG  
 CGTATGCGGGAGATACCGCATACCGCGACGAAGACGAAGACGACCGCAATGGTGGTGG  
 A Y A L Y G V W P L L L L A L P P R  
 30

2770        2780        2790        2800        2810        2820  
 GCGTACGCCATGGACCGGGAGATGGCCGATCGTGGAGGGCGCGGTTTTGTAGGTCTG  
 CGCATGCGGTACCTGGCCCTCTACCGCGTAGCACGCCTCCGGGCCAAAAACATCCAGAC  
 A Y A M D R E M A A S C G G A V F V G L  
 35

2830        2840        2850        2860        2870        2880  
 GTACTCTTGACCTTGTCAACCACACTATAAAAGTGTCCCTGCCAGGTTCATATGGTGGCTA  
 CATGAGAACTGGAACAGTGGTGTGATATTCAACAAGGAACGGTCCAAGTATACCAACCGAT  
 V L L T L S P E Y K V F L A R F I W W L  
 40

2890        2900        2910        2920        2930        2940  
 CAATATCTCATCACCAGAACCGAACGCGCATCTGCAAGTGTGGTCCCCCTCTAACGTT  
 GTTATAGAGTAGTGGTCTTGGCTCGCGTAGACGTTCACACCCAGGGGGAGAGTTGCAA  
 Q Y L I T R T E A E L Q V W V P P L N V  
 45

2950        2960        2970        2980        2990        3000  
 CGGGGGGGTCGCGATGCCATCATCCTCCTCACATGCGTGGTCCACCCAGAGCTAACCTT  
 GCCCCCCCAGCGCTACGGTAGTAGGAGGAGTGTACGCACCAAGGTGGGTCTCGATTAGAAA  
 R G G R D A I I L L T C V V E P E L I F  
 50

55

## AT 405 053 B

3010        3020        3030        3040        3050        3060  
 GACATCACAAAATTTGCTGCCATATTGGCCCGCTCATGGTGCTCCAGGCCGGCATA  
 CTGTAGTGTGTTATAAACGAGCGGTATAAGCCGGCGAGTACCGAGGTCCGGCGTAT  
 D I T K Y L L A I F G P L M V L Q A G I  
 5

3070        3080        3090        3100        3110        3120  
 ACTAGAGTGCCTACTTCGTGCGCGACAAGGGCTCATCGTCATGCATGTTGGCGCGG  
 TGATCTCACGGCATGAAGCACCGCGTGTCCCGAGTAAGCACGTACGTACAACCGCGCC  
 T R V P Y F V R A Q G L I R A C M L A R  
 10

3130        3140        3150        3160        3170        3180  
 AAAGTCGTGGGGGTCAATTACGTCCAATGGTCTTCATGAAGCTGGCGCACTAGCAGGT  
 TTTCAGCACCCCCCAGTAATGCAGGTTACCAAGACTTCGACCGCGTGTGATCGTCCA  
 K V V G G H Y V Q M V F M K L A A L A G  
 15

3190        3200        3210        3220        3230        3240  
 ACGTACGTTATGACCATCTTA CTC ACTGC GAG ATTGGGCTCACACGGGCTTACGAGAC  
 TGCATGCAAATACTGGTAGAATGAGGTGACGCTCTAACCCGAGTGTGCCCAGTGTCTG  
 T Y V Y D H L T P L R D W A H T G L R D  
 20

3250        3260        3270        3280        3290        3300  
 CTTGCAGTGGCAGTAGAGCCCGTTGTCTCTGCACTGGAGACCAAAGTCATCACCTGG  
 GAACGTCACCGTCATCTCGGGCAACAGAAGAGACTGTACCTCTGGTTCACTAGTGGACC  
 L A V A V E P V V F S D M E T K V I T W  
 25

3310        3320        3330        3340        3350        3360  
 GGGGCAGACACC CGCGGTGCGGGGACATCATCTTGGCCCTGCCTGCTTCCGCCGAAGG  
 CCCCGTCTGTGGCCCGCACCCCCCTGTAGTAGAACC GGACGAAGGCCGGCTTCC  
 G A D T A A C G D I I L A L P A S A R R  
 30

3370        3380        3390        3400        3410        3420  
 GGGAAAGGAGATACTTCTGGGACCGGGCGATAGTCTTGAGGACAGGGTGGCGACTCCTT  
 CCCTTCCTCTATGAAGACCCCTGGCCGGCTATCAGAACCTCCTGTCCCCACCGCTGAGGA  
 G K E I L L G P A D S L E G Q G W R L L  
 35

3430        3440        3450        3460        3470        3480  
 GCGCCCATCACGGCTACTCCAAACAAACGCGAGGCCCTGCTTGTTGCATCATCACTAGC  
 CGCGGGTAGTGCCTGGATGAGGGTTGTTGCCTCCGGACGAACCAACGTAGTAGTGTGATCG  
 A P I T A Y S Q Q T R G L L G C I I T S  
 40

3490        3500        3510        3520        3530        3540  
 CTTACAGGCCGGACAAGAACCGAGGTTGAGGGGGAGGGTCAAGTGGTTCCACCGCAACA  
 GAATGTCCGGCCCTGTTCTGGTCAAACCCCCCTCCAGTTACCAAAAGGTGGCGTTGT  
 L T G R D K N Q V E G E V Q V V S T A T  
 45

3550        3560        3570        3580        3590        3600  
 CAATCTTCCTGGCGACCTGCATCAATGGCGTGTGGACTGTCTTCCACGGCGCCGGC  
 GTTAGAAAGGACCGCTGGACGTAGTTACCGAACACAAACCTGACAGAAGGTGCCGGCCG  
 Q S F L A T C I N G V C W T V F S G A G  
 50

## AT 405 053 B

3610        3620        3630        3640        3650        3660  
 TCAAAGACCCTAGCGGCCAAGGGTCCAATCACCCRAATGTACACCAATGTAGACCAAG  
 AGTTCTGGATCGGCCGGTTCCCAGGTTAGTGGTTACATGTGGTTACATCTGGTC  
 S K T L A G P K G P I T Q M Y T N V D Q  
 5

3670        3680        3690        3700        3710        3720  
 GACCTTGGTGGCTGGCCGGCACCTCCTGGGGCGCGTCCCTGACACCAGTCACCTGC  
 CTGGAACAAACCGACCGCCGTGGAGGACCCCGCGCAAGGGACTGTGGTACGTGAACGCCG  
 D L V G W P A P P G A R S L T P C T C G  
 10

3730        3740        3750        3760        3770        3780  
 TCCTCGGACCTTTACCTGGTCACGAGACATGCTGATGTCATTCCGGTGC  
 AGGAGCCTGGAAATGGACCAGTGCTCTGTACGACTACAGTAAGGCCACGCC  
 S S D L Y L V T R E A D V I P V R R R G  
 15

3790        3800        3810        3820        3830        3840  
 GACGGTAGGGGGAGCCTACTCCCCCCCAGGCCTGTCCTACTTGAAGGGCTCCTCGGGT  
 CTGCCATCCCCCTCGGATGAGGGGGGTCCGGACAGAGGATGAACCTCCC  
 D G R G S L L P P R P V S Y L K G S S G  
 20

3850        3860        3870        3880        3890        3900  
 GGTCCACTGCTCTGCCCTTCGGGGCACGGTGTGGCATACTTCCGGTGC  
 CCAGGTGACCEAGACGGAAAGCCCCGTGGCAGCCGTATGAAGGCC  
 G P L L C P S G E A V G I L P A A V C T  
 25

3910        3920        3930        3940        3950        3960  
 CGGGGGGTTGCCATGGCGGTGGAATTCATACCCGGTGGACTATG  
 GCCCCCCCACGGTACCGCCACCTTAAGTATGGCAACTCAGA  
 R G V A M A V E F I P V E S M E T T M R  
 30

3970        3980        3990        4000        4010        4020  
 TCTCCGGTCTTCACGGACAATCCGTCTCCCCCGGCTGTACCG  
 AGAGGCCAGAAGTGGCTGTTAGGCAGAGGGGGCCGACATGGCGT  
 S P V F T D N P S P P A V P Q T F Q V A  
 35

4030        4040        4050        4060        4070        4080  
 CACTTACACGCTCCACCGGCAGCGGAAAGACACTAGGGTGC  
 GTGAATGTGGAGGGTGGCGTCTCGTGTACCCACGGCG  
 E L H A P T G S G K S T R V P A A Y A A  
 40

4090        4100        4110        - 4120 - 4130        4140  
 CAAGGGTACAAGGTGCTCGTCTAAATCCGTCCGCGCCAC  
 GTTCCCATGTTCCACGAGCAGGATTAGGCAGGCAGCG  
 Q G Y K V L V L N P S V A A T L G F G A  
 45

4150        4160        4170        4180        4190        4200  
 TATATGTCCAAGGCACATGGTATCGACCCCAACCTTAGA  
 ATATACAGGGTCCGTGTACCATAGCTGGGTTGGAATCT  
 Y M S K A E G I D P N L R T G V R T I T  
 50

## AT 405 053 B

4210        4220        4230        4240        4250        4260  
 ACAGGTGCCCTATCACATACTCCACCTATGGCAAGTTCTTGCCGACGGTGGCGGTCC  
 TGTCCACGGGATAGTGTATGAGGTGATAACGTTAAGGAACGGCTGCCACCGCCGAGG  
 T G A P I T Y S T Y G K F L A D G G G S  
 5

4270        4280        4290        4300        4310        4320  
 GGGGGCGCTATGACATCATAATGTGTGATGAGTGCCACTCAACTGACTCGACTACCATT  
 CCCCCCGGATACTGTAGTATTACACACTACTCACGGTGAGTTGACTGAGCTGATGGTAA  
 G G A Y D I I M C D E C H S T D S T T I  
 10

4330        4340        4350        4360        4370        4380  
 TATGGCATCGGCACAGTCCTGGACCAAGCGGAGACGGCTGGAGCGCGGCTCGTGGTCTC  
 ATACCGTAGCCGTGTCAGGACCTGGTCGGCTCTGCCGACCTCGCGCCGAGCACCGAG  
 Y G I G T V L D Q A E T A G A R L V V L  
 15

4390        4400        4410        4420        4430        4440  
 TCCACCGCTACGCCCTCCGGATCGGTACCGTGCACACCTCAATATCGAGGGAGGTGGCC  
 AGGTGGCGATCGGGAGGCCCTAGCCAGTGGCACGGTGAGTTAGCTCCTCCACCGG  
 S T A T P P G S V T V P H L N I E E V A  
 20

4450        4460        4470        4480        4490        4500  
 CTGTCTAATACTGGAGAGATCCCCTTCTACGGCAAAGCCATTCCCATCGAGGGCTATCAAG  
 GACAGATTATGACCTCTCTAGGGGAAGATGCCGTTCGTAAGGGTAGCTCCGATAGTC  
 L S N T G E I P F Y G K A I P I E A I K  
 25

4510        4520        4530        4540        4550        4560  
 GGGGGAAAGGCATCTCATTTCTGCCATTCCAAGAAGAAGTGTGACGAACTCGCCGCAAAG  
 CCCCTTCCGTAGAGTAAAAGACGGTAAGGTTCTTACACTGCTTGAGCGGGCTTTC  
 G G R E L I F C E S K K C D E L A A K  
 30

4570        4580        4590        4600        4610        4620  
 CTGTCAGGCCTCGGACTCAATGCCGTAGCGTATTACCGGGGTCTTGACGTGTCCGTCATA  
 GACAGTCCGGAGCCTGAGTTACGGCATCGCATAATGGCCCCAGAACTGCACAGGAGTAT  
 L S G L G L N A V A Y Y R G L D V S V I  
 35

4630        4640        4650        4660        4670        4680  
 CCGACCAGCGGAGACGTTGTTGCTGGCGACGGACGGCTCTAACATGACGGCTTACCGGC  
 GGCTGGTGCCTCTGCAACAACAGCACCGCTGCCGAGATTACTGCCGAAATGGCCG  
 P T S G D V V V A T D A L M T G F T G  
 40

4690        4700        4710        4720        4730        4740  
 GACTTTGACTCAGTGATCGACTGTATACGTGTGTCACCCAGACAGTCGATTCAGCTTG  
 CTGAAACTGAGTCAGTACAGTACATTATGCACACAGTGGGTCTGTCAGCTAAAGTCGAAC  
 D F D S V I D C N T C V T Q T V D F S L  
 45

4750        4760        4770        4780        4790        4800  
 GACCCCACCTCACCAATTGAGACGACGACCGTGGCCCAAGACGCAGTGTGCGCGCTCGCAG  
 CTGGGGTGGAGTGGTAACCTGCTGCTGGCACGGGGTTCTGCGTCACAGCGCGAGCGTC  
 D P T F T I E T T V P Q D A V S R S Q  
 50

## AT 405 053 B

4810        4820        4830        4840        4850        4860  
 AGCGAGGCAGGACTGGTAGGGCAGGGCTGGCATATAACAGGTTGTGACTCCAGGAGAA  
 TCCGCTCCGTCTGACCATCCCCGTCCCACCGTATATGTCCAAACACTGAGGTCTCTT  
 R R G R T G R A G I Y R F V T P G E  
 5

4870        4880        4890        4900        4910        4920  
 CGGCCCTCGGGCATGTTGATTCTTCGGCCTGTGTGAGTGTATGACGCGGGTTGTGCG  
 GCCGGGAGCCCGTACAAGCTAAGAACCCAGGACACACTCACAACTACTCGGCCAACACGC  
 R P S G M F D S S V L C E C Y D A G C A  
 10

4930        4940        4950        4960        4970        4980  
 TGGTACGAACCTACGCCCGCTGAGACCTCGGTTAGGTTGGGGCGTACCTAACACACCA  
 ACCATGCTTGAGTGCGGCGACTCTGGAGCCAATCCAACGCCCGCATGGATTGTGTTGGT  
 W Y E L T P A E T S V R L R A Y L N T P  
 15

4990        5000        5010        5020        5030        5040  
 GGGTTGCCCGTCTGCCAGGACCATCTGGAGTTCTCGGAGGGTGTCTTCACAGGCCCTCACCC  
 CCAAACGGGCAGACGGCCTGGTAGACCTCAAGAGCCTCCCACAGAAGTGTCCGGAGTGG  
 G L P V C Q D E L E F S E G V F T G L T  
 20

5050        5060        5070        5080        5090        5100  
 CACATAGATGCCACTTCTTATCCCAGACTAAACAGGCAGGAGAGAACCTCCCTACTTG  
 GTGTATCTACGGGTGAAGAATAGGGTCTGATTTGTCCGTCTCTTGAACGGGATGAAAC  
 E I D A E F L S Q T K Q A G E N F P Y L  
 25

5110        5120        5130        5140        5150        5160  
 GTAGCATACCAAGGCTACAGTGTGCCAGGGCTCAAGCCCCACCTCCATCGTGGGATGAA  
 CATCGTATGGTCCGATGTACACACGGTCCGAGTTGGGGTAGCACCCCTACTT  
 V A Y Q A T V C A R A Q A P P P S W D E  
 30

5170        5180        5190        5200        5210        5220  
 ATGTGGAGGTGTCTCATACGGCTGAAACACTACGCTGCACGGGCCAACACCCCTGCTGTAT  
 TACACCTCCACAGAGTATGCCACTTGGATGCGACGTGCCCCGGTTGTGGGGACGACATA  
 M W R C L I R L K P T L E G P T P L L Y  
 35

5230        5240        5250        5260        5270        5280  
 AGGTAGGAGGCCGTCCAAAATGAGGTACCCCTCACACACCCATAACCAAATTCATCATG  
 TCCAATCCTCGGCAGGTTTACTCCAGTGGGAGTGTGTGGGTATTGGTTAAGTAGTAC  
 R L G A V Q N E V T L T E P I T K F I M  
 40

5290        5300        5310        5320        5330        5340  
 ACATGTATGTCGGCTGACCTGGAGGTGTCACCAGCACCTGGGTGCTGGTAGGGCGGAGTC  
 TGTACATACAGCCGACTGGACCTCCAGCAGTGGTGTGGACCCACGACCATCCGCCTCAG  
 T C M S A D L E V V T S T W V L V G G V  
 45

5350        5360        5370        5380        5390        5400  
 CTCGCAGCTCTGGCCCGTACTGCCTGACAAACAGGCAGCGTGGTCATTGTGGGCAGGATC  
 GAGCGTCGAGACCAGGGCATGACGGACTGTTGTCCGTGCAACAGTAACACCCGTCTAG  
 L A A L A A Y C L T T G S V V I V G R I  
 50

## AT 405 053 B

5410        5420        5430        5440        5450        5460  
 ATCTGTCCGGGAAGCCGGCTATCATCCCCGATAGGGAAAGTTCTTACCAAGGAGTTGAC  
 TAGGACAGGCCCTCGGCCGATAGTAGGGCTATCCCTCAAGAGATGGTCCTCAAGCTG  
 I L S G K P A I I P D R E V L Y Q E F D  
 5  
 5470        5480        5490        5500        5510        5520  
 GAGATGGAGGAGTGTGCCTCACACCTCCCTACTTCGAAACAGGGAAATGCAGCTCGCCGAG  
 CTCTACCTCCTCACACGGAGTGTGGAGGGAAATGAAGCTTGTCCCTTACGTCGAGCGGCTC  
 E M E E C A S E L P Y F E Q G M Q L A E  
 10  
 5530        5540        5550        5560        5570        5580  
 CAATTCAAACAGAAGGGCGCTCGGTTGCTGCAAACAGCCACCAAGCAGGCGGAGGCTGCT  
 GTTAAGTTGTCTTCGCGAGCCAAACGACGTTGTCGGTGGTCGTCCGCCTCCGACGA  
 Q F K Q K A L G L L Q T A T K Q A E A A  
 15  
 5590        5600        5610        5620        5630        5640  
 GCTCCCGTGGTGGAGTCCAAGTGGCAGGCCCTTGAGACCTTCTGGCGAAGCACATGTGG  
 CGAGGGCACCAACCTCAGGTTCACCGCTCGGAACACTCTGGAAGACCCGCTCGTGTACACC  
 A P V V E S K W R A L E T F W A K H M W  
 20  
 5650        5660        5670        5680        5690        5700  
 AACCTCATTAGTGGATACAGTACTTGGCAGGCTTGTCCACTCTGCCTGGAAACCCCGCA  
 TTGAAGTAATCACCCATGTCACTGAACCGTCCGAAACAGGTGAGCACGGACCCTTGGCGT  
 N F I S G I Q Y L A G L S T L P G N P A  
 25  
 5710        5720        5730        5740        5750        5760  
 ATACGATCACCGATGGCATTCACAGCCTCCATCACCAAGCCGCTCACCAACCCAGCATACC  
 TATGCTAGTGGCTACCGTAAGTGTGGAGGTAGTGGTGGCGAGTGGTGGTCGTATGG  
 I R S P M A F T A S I T S P L T T Q E T  
 30  
 5770        5780        5790        5800        5810        5820  
 CTCTGTTAACATCTGGGGGATGGGTGGCTGCCAACTCGCCCCCCCCAGCGCTGCC  
 GAGAACAAATTGTAGAACCCCCCTACCCACCGACGGGTGAGCGGGGGGTGCGGACGG  
 L L F N I L G G W V A A Q L A P P S A A  
 35  
 5830        5840        5850        5860        5870        5880  
 TCAGCTTCTCGTGGCGCCGGCATCGCTGGAGCCGCTGTGGCACGATAGGCCTTGGGAAG  
 AGTCGAAAGCACCCGCGGCCGTAGCGACCTCGGCACACCGTGTATCCGGAACCCCTTC  
 S A F V G A G I A G A A V G T I G L G K  
 40  
 5890        5900        5910        5920        5930        5940  
 GTGCTTGTGGACATTCTGGCAGGTTATGGAGCAAGGGGTGGCGGGCGCACTGTGGCCTT  
 CACGAACACCTGTAAAGACCGTCCAATACCTCGTCCCCACCGCCCGGTGAAACACCGGAAA  
 V L V D I L A G Y G A G V A G A L V A F  
 45  
 5950        5960        5970        5980        5990        6000  
 ARGATCATGAGCGGGAGATGCCTTCAGCCGAGGACATGGTCAAACCTACTCCCTGCCATC  
 TTCTAGTACTCGCCGCTACGGAAAGTCGGCTCCTGTACCGTGAATGAGGGACGGTAG  
 K I M S G E M P S A E D M V N L L P A I

50

55

## AT 405 053 B

6010        6020        6030        6040        6050        6060  
 CTTCTCCGGTGCCCTGGTCGGATTGTGTGCAGCAATACTGCGTCGGCATGTG  
 GAAAGAGGGCACGGGACAGCAGCCCTAACACACACGTCGTTATGACGCAGCCGTACAC  
 L S P G A L V V G I V C A A I L R R E V  
 5

6070        6080        6090        6100        6110        6120  
 GGCCCAGGGGAAGGGCTGTGCAGTGGATGAACCGGCTGATAGCGTTCGCCTCGCGGGGT  
 CGGGTCCCCCTTCCCCGACACGTCACCTACTTGGCCGACTATCGCAAGCGGAGCGCCCA  
 G P G E G A V Q W M N R L I A F A S R G  
 10

6130        6140        6150        6160        6170        6180  
 AACACACGTCTCCCCCAGGCACTATGTGCCAGAGAGCGAGCCTGCAGCGCGTGTACCCAG  
 TTGGTGCAGAGGGGTCCGTGATACACGGTCTCTCGCTCGGACGTCGCGCACAAATGGTC  
 N H V S P R H Y V P E S E P A A R V T Q  
 15

6190        6200        6210        6220        6230        6240  
 ATCCTTCCAGCCTCACCATCACTCAGCTGTTGAAGAGACTCCACCAGTGGATTAATGAG  
 TAGGAAAGGTGGAGGGTAGTGAGTCACAACTTCTCTGAGGTGGTACCTAATTACTC  
 I L S S L T I T Q L L K R L E Q W I N E  
 20

6250        6260        6270        6280        6290        6300  
 GACTGCTCTACGCCATGCTCCAGCTCGTGGCTAAGGGAGATTGGGACTGGATCTGCACG  
 CTGACGGAGATECGGTACGAGGTGAGGACCCGATTCCCTCTAAACCTGACCTAGACGTGC  
 D C S T P C S S S W L R E I W D W I C T  
 25

6310        6320        6330        6340        6350        6360  
 GTGTTGACTGACTTCAAGACCTGGCTCCAGTCCAAGCTCTGCCGGATTACCGGGAGTC  
 CACAACTGACTGAGTTCTGGACCGAGGTGAGGTCAGGTTGAGGACGGCGCTAATGGCCCTCAG  
 V L T D F K T W L Q S K L L P R L P G V  
 30

6370        6380        6390        6400        6410        6420  
 CCTTTTTCTCATGCCAACGGGGTATAAGGGAGTCTGGGGGGGACGGCATCATGCAC  
 GGAAAAAAAGAGTACGGTTGCCCTCATATTCCCTCAGACGGCCCCCTGCCGTAGTACGTG  
 P F F S C Q R G Y K G V W R G D G I M E  
 35

6430        6440        6450        6460        6470        6480  
 ACCACCTGCCATGGGAGCACAGATCACGGACACGTCAAAACGGTTCCATGAGGATC  
 TGGTGGACGGGTACGCCCTCGTGTCTAGTGGCTGTGCAGTTTGCCTAGGTACTCCTAG  
 T T C P C G A Q I T G E V K N G S M R I  
 40

6490        6500        6510        6520        6530        6540  
 GTGGGGCTAAAACCTGCAGCAACACGTGGTACGGGACATTCCCCATCAACGCCTACACC  
 CAACCCGGATTGGACGTCGTTGTGCACCATGCCCTGTAAGGGTAGTTGCGCATGTGG  
 V G P K T C S N T W Y G T F P I N A Y T  
 45

6550        6560        6570        6580        6590        6600  
 ACGGGGCCCTGCACACCCCTCCCCGGCGCCAAACTATTCCAAGGCATTGTGGAGAGTGGCC  
 TGCCCGGGACGTGTGGAGGGGCCGGTTGATAAGGTCCGTAACACCTCTCACCGG  
 T G P C T P S P A P N Y S K A L W R V A  
 50

## AT 405 053 B

6610 6620 6630 6640 6650 6660  
 GCTGAGGAGTACGTGGAGGTACCGCGGTGGAGATTTCACTACGTGACGGGCATGACC  
 CGACTCCTCATGCACCTCCAGTGCGCCACCCCTCTAAAAGTGTGACTGCCGTACTGG  
 A E E Y V E V T R V G D F H Y V T G M T  
 5  
 6670 6680 6690 6700 6710 6720  
 ACTGACAAACGTGAAGTGTCCATGCCAGGTTCCGGCCCCGAATTCTTCACGGAGGTGGAT  
 TGACTGTTGCACTTACAGGTACGGTCCAAGGCCGGGGCTTAAGAAGTGCCTCCACCTA  
 T D N V K C P C Q V P A P E F F T E V D  
 10  
 6730 6740 6750 6760 6770 6780  
 GGAGTGCGGTTGCACAGGTACGCTCCGGCGTGCAGACCTCTCCTACGGGAGGAGGTGTA  
 CCTCACGCCAACGTGTCCATGCCAGGCCGACGTCTGGAGAGGATGCCCTCCTCCAGCAT  
 G V R L E R Y A P A C R P L L R E E V V  
 15  
 6790 6800 6810 6820 6830 6840  
 TTCCAGGTCGGGCTCCACCAAGTACCTGGTCGGGTACAGCTCCCATGCGAGCCCGAACCG  
 AAGGTCCAGCCCAGGGTGGTCAATGGACCAAGCCCAGTGTGAGGGTACGCTCGGGCTTGGC  
 P Q V G L E Q Y L V G S Q L P C E P E P  
 20  
 6850 6860 6870 6880 6890 6900  
 GATGTAGCACTGCTCACTTCCATGCTCACTGACCCCTCCCACATTACAGCAGAGACGGCT  
 CTACATCGTCACGAGTGAAGGTACGAGTGACTGGGAGGGTGTAAATGTCGTCTCTGCCGA  
 D V A V L T S M L T D P S H I T A E T A  
 25  
 6910 6920 6930 6940 6950 6960  
 AAGCGTAGGCTGGCCAGGGGGTCTCCCCCCTCTGGCCAGCTCTCAGCTAGCCAGTTG  
 TTGCGATCCGACCGGTCCCCCAGAGGGGGAGGAACCGGTGAGAAGTCGATGGTCAAC  
 K R R L A R G S P P S L A S S S A S Q L  
 30  
 6970 6980 6990 7000 7010 7020  
 TCTGCCCTTCTTGAAGGGGACATGCACTACCCATCATGACTCCCCGGACGCTGACCTC  
 AGACGGCGAAGGAACCTCCGCTGTACGTGATGGGTACTGAGGGGCTGCGACTGGAG  
 S A P S L K A T C T T H E D S P D A D L  
 35  
 7030 7040 7050 7060 7070 7080  
 ATTGAGGCCAACCTCTTGTGGCGCAAGAGATGGGCGGGAACATCACCCCGCTGGAGTC  
 TAACCTCCGGTTGGAGAACACCGCCGTTCTACCCGCCCTGTAGTGGGCGCACCTCAGT  
 I E A N L L W R Q E M G G N I T R V E S  
 40  
 7090 7100 7110 7120 7130 7140  
 GAGAATAAGGTGGTAATCCTGGACTCTTCGACCCGCTCCGAGCGGAGGATGAGGGGG  
 CTCTTATTCCACCAATTAGGACCTGAGAAAGCTGGCGAGGCTGCCCTACTACTCCCC  
 E N K V V I L D S F D P L R A E D D E G  
 45  
 7150 7160 7170 7180 7190 7200  
 GAAATATCCGTTCCGGCGGAGATCCTGCGGAATCCAGGAAATCCCCCCCAGCGCTGCC  
 CTTTATAGGCAAGGCCGCTCTAGGACGCCCTTAGGTCTTAAAGGGGGTGCACGGG  
 E I S V P A E I L R K S R K F P P A L P  
 50

## AT 405 053 B

7210 7220 7230 7240 7250 7260  
 ATATGGCGCCGCCGGATTACAACCCCTCCGCTGCTAGAGTCCTGGAAGGACCCGGACTAC  
 TATAACCCGCCGCCGGCTTAATGTTGGGAGGCAGCGATCTCAGGACCTTCCTGGCCTGATG  
 I W A P P D Y N P P L L E S W K D P D Y  
 5

7270 7280 7290 7300 7310 7320  
 GTTCCTCCGGTGGTACACGGGTGCCCGTTGCCGCCACCAAGGCCCCCTCCAATACCACCT  
 CAAGGAGGCCACCATGTGCCAACGGGAAACGGGGTGGTTCCGGGGAGGTTATGGTGGA  
 V P P V V H G C P L P P T K A P P I P P  
 10

7330 7340 7350 7360 7370 7380  
 CCACGGAGGAAGAGGGACGGTTGTCCTGACAGAAATCCACCGTGTCTCTGCCTGGCGAG  
 GGTGCCTCCTCTGCCAACAGGACTGTCTTAGGTGGCACAGAAAGACGGAACCGCCTC  
 P R R K R T V V L T E S T V S S A L A E  
 15

7390 7400 7410 7420 7430 7440  
 CTCGCTACTAACACCTTCGGCAGCTCCGGATCGTGGGCCATCGACAGCGGTACGGCGACC  
 GAGCGATGATTCTGGAAGCCGTCGAGGCCACTGCGAGCCGGTAGCTGTGCGCCATGCCGCTGG  
 L A T K T F G S S G S S A I D S G T A T  
 20

7450 7460 7470 7480 7490 7500  
 GCCCCTCCTGACCAAGCCTCCGGTGACGGCGACAGAGAGTCCGACGTTGAGTCGTTCTCC  
 CGGGGAGGACTGGTTGGAGGCCACTGCCGCTGTCTCAGGCTGCAACTCAGCAAGAGG  
 A P P D Q A S G D G D R E S D V E S F S  
 25

7510 7520 7530 7540 7550 7560  
 TCCATCCCCCCCCCTTGAGGGAGAGCCGGGACCCCGATCTCAGCGACGGATCTTGGTCC  
 AGGTACGGGGGGAACTCCCTCTGGCCCCCTGGGGCTAGAGTCGCTGCCTAGAACCAAGG  
 S M P P L E G E P G D P D L S D G S W S  
 30

7570 7580 7590 7600 7610 7620  
 ACCGTGAGCGAGGAGGGCTAGTGAGGACGCGTCTGCTGTTGATGTCCTACACATGGACA  
 TGGCACTCGCTCCTCCGATCACTCCTGCAAGCAGACAGACAAGCTACAGGATGTGACCTGT  
 T V S E E A S E D V V C C S M S Y T W T  
 35

7630 7640 7650 7660 7670 7680  
 GGCGCCCTGATCACGCCATGCCGTCGGAGGAAAGCAAGTGGCCATCAACCCGTTGAGC  
 CCGCGGGACTAGTGCGGTACCGACGCCCTTCGTTAACGGTAGTTGGCAACTCG  
 G A L I T P C A A E E S K L P I N P L S  
 40

7690 7700 7710 7720 7730 7740  
 AATTCTTGCTACGTACCAACACATGGCTATGCTACAAACATCCCGCAGCGCAGGGCTG  
 TTAAGAAACGATGCGAGTGGTGTGTACCAAGATACTGATGTTGAGGGCGTCGCGTCCGGAC  
 N S L L R E S N M V Y A T T S R S A G L  
 45

7750 7760 7770 7780 7790 7800  
 CGGCAGAAGAAGGTACACCTTGACAGACTGCAAGTCCTGGACGACCAACTACCGGGACGTG  
 GCCGTCTTCTCCAGTGGAAACTGTCTGACGTTCAAGGACCTGCTGGTGTGATGGCCCTGCAC  
 R Q K K V T F D R L Q V L D D E Y R D V  
 50

## AT 405 053 B

7810 7820 7830 7840 7850 7860  
 CTTAAGGAGATGAAGGCGAAGGCCTCACAGTTAAGGCTAAACTTCTATCTGTAGAAGAA  
 GAATTCCCTACTTCCGCTTCGCAGGTGTCAATTCCGATTGAAGATAGACATCTTCTT  
 L K E M K A K A S T V K A R L L S V E E  
 5  
 7870 7880 7890 7900 7910 7920  
 GCCTGCAAACGTGACGCCACATTGGCCAATCCAAATTGGCTACGGGGCGAAGGAC  
 CGGACGTTGACTGGGGGTGTAGCGGGTTAGGTTAAACCGATGCCCGCTTCCTG  
 A C K L T P P H S A K S F G Y G A K D  
 10  
 7930 7940 7950 7960 7970 7980  
 GTCCGGAGCCTATCCAGCAGGGCGTTACCCACATCCGCTCCGTGTGGAAAGGACCTGCTG  
 CAGGCCTCGGATAGGTGTCGTCCCGGCATGGGTGTAGGCAGGGCACACCTCCTGGACGAC  
 V R S L S S R A V T H I R S V W K D L L  
 15  
 7990 8000 8010 8020 8030 8040  
 GAAGACACTGAAACACCAATTAGCACTACCATCATGGCAAAAAATGAGGTTTCTGTGTC  
 CTTCTGTGACTTTGTGGTAATCGTGATGGTAGTACCGTTTTACTCCAAAAGACACAG  
 E D F E T P I S T T I M A K N E V F C V  
 20  
 8050 8060 8070 8080 8090 8100  
 CAACCAGAGAAGGGAGGCCGCAAGCCAGCTCGCCTTATCGTGTCCCAGATCTGGAGTT  
 GTGGTCTCTCCCTCCGGCGTTGGTCGAGCGGAATAGCACAGGGCTAGACCCCTCAA  
 Q P E K G G R K P A R L I V F P D L G V  
 25  
 8110 8120 8130 8140 8150 8160  
 CGTGTATGGAGAAGATGGCCCTTATGACGTGGTCTCACCCCTCCTCAGGCCGTGATG  
 GCACATACGCTCTTCTACCGGGAAATACTGCACCAAGAGTGGGAAGGACTCCGGCACTAC  
 R V C E K M A L Y D V V S T L P Q A V M  
 30  
 8170 8180 8190 8200 8210 8220  
 GGCTCCTCATACGGATTCCAGTACTCTCCTAACGCAGCGGGTCGAGTTCTGGTGAATACC  
 CCGAGGAGTATGCCTAACGGTCAAGGATCGTCGCCCCAGCTCAAGGACCACTATGG  
 G S S Y G F Q Y S P K Q R V E F L V N T  
 35  
 8230 8240 8250 8260 8270 8280  
 TGGAAATCAAAGAAATGCCCATGGGCTCTCATATGACACCCGCTGTTTGACTCAACG  
 ACCTTTAGTTCTTACGGGTACCCGAAGAGTATACTGTGGCGACAAAAGTCAAGGTTGC  
 W K S K K C P M G F S Y D T R C F D S T  
 40  
 8290 8300 8310 8320 8330 8340  
 GTCACTGAGAATGACATCCGTGTTGAGGAGTCAATTACCAATGTTGTGACTTGGCCCC  
 CAGTGACTCTTACTGTAGGCACAACCTCCTCAGTTAAATGGTTACAACACTGAACCGGGGG  
 V T E N D I R V E E S I Y Q C C D L A P  
 45  
 8350 8360 8370 8380 8390 8400  
 GAAGCCAAACTGGCCATAAAGTCGCTCACAGAGCGGCTCTATATCGGGGGTCCCTGACT  
 CTTGGTTGACCGGTATTCAAGCGAGTGTCTCGCCGAGATATAGCCCCCAGGGGACTGA  
 E A K L A I K S L T E R L Y I G G P L T

50

55

## AT 405 053 B

8410        8420        8430        8440        8450        8460  
 AATTCAAAAGGGCAGAACCTGCGGTTACCGCCGGTGCAGCGCGAGCGGGGTGCTGACGACT  
 TTAAGTTTCCCCTCTTGACGCCAATGGCGGCCACGGCGCGCTGCCGCACGACTGCTGA  
 N S K G Q N C G Y R R C R A S G V L T T  
 5

8470        8480        8490        8500        8510        8520  
 AGCTGCGGTAATAACCTCACATGTTACCTGAAAGCCACTGCGGGCTGTCGAGCTGCGAAG  
 TCGACGCCATTATGGGAGTGTACAATGGACTTTCGGTGACGCCGGACAGCTCGACGCTTC  
 S C G N T L T C Y L K A T A A C R A A K  
 10

8530        8540        8550        8560        8570        8580  
 CTCCGGGACTGCACGATGCTCGTGAACGGAGACGACCTTGTGTTATCTGTGAAAGCGCG  
 GAGGCCCTGACGTGCTACGAGCACTTGCCCTGTGGAACAGCAATAGACACTTTCGCGC  
 L R D C T M L V N G D D L V V I C E S A  
 15

8590        8600        8610        8620        8630        8640  
 GGAACCCAAGAGGATGGGGCGAGCCTACGAGTCTTACCGAGGCTATGACTAGGTACTCT  
 CCTTGGGTTCTCCTACGCCCTCGGATGCTCAGAAGTGCCTCCGATACTGATCCATGAGA  
 G T Q E D A A S L R V F T E A M T R Y S  
 20

8650        8660        8670        8680        8690        8700  
 GCCCCCCCCTGGGGACCCGCCTCAACCAGAACCGACTTGGAGTTGATAACATCATGTTCC  
 CGGGGGGGACCCCTGGGGAGTTGGCCTTATGCTGACCTCAACTATTGTAGTACAGG  
 A P P G D P P Q P E Y D L E L I T S C S  
 25

8710        8720        8730        8740        8750        8760  
 TCCAATGTGTCGGTCCACACGATGCATCTGGTAAAAGGGTGTACTACCTCACCCGTGAC  
 AGGTTACACAGCCAGCGTGTGCTACGTAGACCATTTCACATGATGGAGTGGGCACTG  
 S N V S V A E D A S G K R V Y Y L T R D  
 30

8770        8780        8790        8800        8810        8820  
 CCTTACCACCCCCTTGCACGGCTGCCTGGGAGACAGCTAGACACACTCCAGTCACACTCC  
 GGATGGTGGGGGGAACGTGCCGACGCAACCTCTGCGATCTGTGAGGTCAAGTGAGG  
 P T T P L A R A A W E T A R E H T P V N S  
 35

8830        8840        8850        8860        8870        8880  
 TGGCTAGGCAACATCATCATGTATGCGGCCACCTTATGGCAAGGATGATTCTGATGACT  
 ACCGATCCGTTGTTAGTAGTACATACGCCGGTGGAAATACCGTTCTACTAAGACTACTGA  
 W L G N I I M Y A P T L W A R M I L M T  
 40

8890        8900        8910        8920        8930        8940  
 CATTCTTCTCCATCCTCTAGCTCAGGAGCAACTTGAAAAAAACCTAGATTGTCAGATC  
 GTAAAGAGAGGTAGGAAGATCGAGTCCTCGTTGAACCTTTGGATCTAACAGTCTAG  
 E F F S I L L A Q E Q L E K T L D C Q I  
 45

8950        8960        8970        8980        8990        9000  
 TACGGGGCCTGTTACTCCATTGAAACCACCTGATCTACCTCAGATCATTGAGCGACTCCAT  
 ATGCCCGGACAATGAGGTAACCTGGGTGAACTAGATGGAGTCTAGTAACTCGCTGAGGTA  
 Y G A C Y S I E P L D L P Q I I E R L E  
 50

AT 405 053 B

5	9010	9020	9030	9040	9050	9060
	GGTCTTAGCGCATTTCACTCCATAGTTACTCTCCAGGCAGATCAATAGGGTGGCTTCA					
	CCAGAATCGCGTAAAAGTGAGGTATCAATGAGAGGTCCGCTCTAGTTATCCCACCGAAGT					
	G L S A F S L H S Y S P G E I N R V A S					
10	9070	9080	9090	9100	9110	9120
	TGCCTCAGAAAACCTGGGTACCACCCCTGCAGGAGACATCGGGCCAGAAGTGTGTC					
	ACGGAGTCCTTGAACCCCATGGTGGAAACGCTCGGACCTCTGTAGCCCCGTCTCACAG					
	C L R K L G V P P L R A W R H R A R S V					
15	9130	9140	9150	9160	9170	9180
	CGCGCTAACGCTACTGTCCCAGGGGGAGGGCCGCCACTGTGGCAAGTACCTCTTCAAC					
	GCGCGATTGATGACAGGGTCCCCCCTCCCGCGGTGAACACCGTTATGGAGAAGTTG					
	R A K L L S Q G G R A A T C G K Y L F N					
20	9190	9200	9210	9220	9230	9240
	TGGGCCTGGTGGAGGACCAAGCTCAAACCTCACTCCAATCCCAGCCGCGTCCCGGTGGACTTG					
	ACCCGCCACTCCTGGTTCGAGTTGAGGTAGGGTCGGCGCAGGGCCAACCTGAAC					
	W A V R T K L K L T P I P A A S R L D L					
25	9250	9260	9270	9280	9290	9300
	TCCGGCTGGTCGTGGTTACAGCGGGGAGACATAATATCACAGCCTGTCCTCGTGC					
	AGGCCGACCAAGCAACGACCAATGTGCCCCCTCTGTATATAGTGTGGACAGAGCACGG					
	S G W F V A G Y S G G D I Y H S L S R A					
30	9310	9320	9330	9340	9350	9360
	CGACCCCGCTGGTTCATGTTGTGCCTACTCCTACTTTCCGTGGGGTAGGCATCTACCTG					
	GCTGGGGCGACCAAGTACAACACGGATGAGGATGAAAGGCACCCCCATCCGTAGATGGAC					
	R P R W F X L C L L I L S V G V G I Y L					
35	9370	9380	9390	9400	9410	
	CTCCCCAACCGATGAATGGGGAGCTAAACACTCCAGGCCAATAGGCCGTTCTCT					
	GAGGGGTTGGCTACTTACCCCTCGATTGTGAGGTCCGGTTATCCGGCAAAAGAGA					
	L P N R					

2. Polynukleotid, welches ein KHCV-Epitop kodiert, das aus der folgenden Gruppe von Nukleotidsequenzen in einer KHCV cDNA voller Länge gemäß Anspruch 1 ausgewählt ist: 301.-726.; 301.-855.; 343.-726.; 343.-852.; 343.-915.; 814.-1326.; 916.-1509.; 1201.-2016.; 1510.-2010.; 1510.-2529.; 2011.-2529.; 1945.-2742.; 3208.-3960.; 3475.-3744.; 3916.-4713.; 3928.-4563.; 5422.-5547.; 6649.-7050.; 6649.-7824.; 7612.-8184.; 7642.-8136.; und 8722.-9216., oder eine Kombination von zwei oder mehreren derartigen Polynukleotiden, oder ein Fragment dieses Polynukleotids, welches ein Polypeptid kodiert, das eine genügend große Anzahl von Aminosäureresten kodiert, um eine immunreaktive und/oder antigene Determinante zu bilden.
3. Rekombinanter Expressionsvektor, dadurch gekennzeichnet, daß er einen offenen Leseraster umfaßt, der das Polynukleotid gemäß Anspruch 2 enthält, wobei der offene Leseraster wirksam mit einer Regulatorsequenz verbunden ist, die mit einem gewünschten Wirtsorganismus kompatibel ist.
4. Vektor nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß der offene Leseraster ein Polynukleotid enthält, das Ubiquitin kodiert, das mit dem Polynukleotid gemäß Anspruch 2 fusioniert ist.
5. Vektor nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß er ein Hefe-Expressionsvektor aus der Gruppe pYLBC-A/G-UB-CORE 14, pYLBC-A/G-UB-CORE 17, pYLBC-A/G-UB-CORE 22, pYLBC-A/G-UB-KHCV 897, pYLBC-A/G-UB-KHCV 403, pYLBC-A/G-UB-KHCV 573, pYLBC-A/G-UB-E2N und pYLBC-A/G-UB-E2C ist.

6. Vektor nach Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß er ein E. coli-Expressionsvektor aus der Gruppe ptrpH-UB-CORE 14, ptrpH-UB-CORE 22, ptrpH-UB-KHCV 897, ptrpH-UB-E2N oder ptrpH-UB-E2C ist.
- 5 7. Vektor nach Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß der offene Leseraster ein Polynucleotid enthält, das ein Maltose bindendes Protein kodiert, das mit dem Polynucleotid gemäß Anspruch 2 fusioniert ist.
8. Vektor nach Anspruch 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß er ein E. coli-Expressionsvektor aus der 10 Gruppe pMAL-KHCV 426, pMAL-KHCV 555, pMAL-KHCV 513, pMAL-KHCV 810, pMAL-KHCV 798, pMAL-KHCV 754, pMAL-KHCV 652, pMAL-KHCV 403, pMAL-KHCV 271, pMAL-KHCV 495 und pMAL-KHCV 494 ist.
9. Wirtszelle, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie mit einem Vektor gemäß Anspruch 3 transformiert ist. 15
10. Wirtszelle nach Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie eine Hefezelle ist, die mit dem Vektor gemäß Anspruch 5 transformiert ist.
11. Wirtszelle nach Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie eine mit dem Vektor gemäß Anspruch 20 6 transformierte E.coli-Zelle ist.
12. Wirtszelle nach Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie eine mit dem Vektor gemäß Anspruch 8 transformierte E.coli-Zelle ist.
- 25 13. Polypeptid, welches immunologisch ident mit einem Epitop ist, das durch die KHCV-cDNA gemäß Anspruch 1 kodiert ist, **dadurch gekennzeichnet**, daß es ein KHCV-Polypeptid umfaßt, das aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist: 1.-128.; 1.-170.; 1.-191.; 158.-328.; 192.-389.; 287.-558.; 390.-556.; 390.-729.; 535.-1028.; 557.-729.; 956.-1206.; 1045.-1134.; 1192.-1457.; 1196.-1407.; 1694.-1735.; 2103.-2236.; 2103.-2494.; 2424.-2614.; 2434.-2598.; 2794.-2958.; und Polypeptiden mit 142 und 185 Amino- 30 säuren, kodiert von den Nucleotiden 301.-726. und 301.-855. der KHCV-cDNA des Anspruch 1; sowie eine Kombination von zwei oder mehreren dieser Polypeptide oder ein Fragment davon, welches ein Polypeptid kodiert, das eine genügend große Anzahl von Aminosäureresten kodiert, um eine immunoreaktive und/oder antigene Determinante zu bilden.
- 35 14. Polypeptid nach Anspruch 13, **dadurch gekennzeichnet**, daß es ein rekombinantes KHCV-Polypeptid ist, welches mit einem ubiquitin- oder maltosebindenden Protein fusioniert ist.
15. Polypeptid nach Anspruch 13, **dadurch gekennzeichnet**, daß es ein KHCV UB 897 Protein, KHCV 40 897 Protein, UB E1 Protein, KHCV 403 Protein, KHCV CORE 14 Protein, KHCV 573 Protein, KHCV UB CORE 17 Protein, E2N Protein, E2C Protein, UB-E2N Protein, UB-E2C Protein, KHCV 426 Protein, KHCV 555 Protein, KHCV 513 Protein, KHCV 810 Protein, KHCV 798 Protein, KHCV 271 Protein, KHCV 754 Protein, KHCV 652 Protein, KHCV 403 Protein, KHCV 495 Protein oder KHCV 494 Protein ist.
- 45 16. Verfahren zur Herstellung des Polypeptids nach Anspruch 13, **dadurch gekennzeichnet**, daß es folgende Schritte umfaßt: Linken eines das Polypeptid kodierenden Polynucleotids an eine Regulatorsequenz eines Vektors; Transformieren einer Wirtszelle mit dem Vektor; und Kultivierung der Wirtszelle unter Bedingungen, die die Expression dieses Polypeptids erlauben.
17. Diagnosemittel für das Aufspüren von Antikörpern gegen KHCV-Antigen in einer verdächtigen Probe, 50 **dadurch gekennzeichnet**, daß es ein Polypeptid gemäß Anspruch 13 als aktiven Bestandteil enthält.
18. Diagnosemittel nach Anspruch 17, **dadurch gekennzeichnet**, daß es zwei oder mehrere Polypeptide gemäß den Ansprüchen 13 bis 15 enthält.
- 55 19. Diagnosemittel nach Anspruch 17, **dadurch gekennzeichnet**, daß es ein oder mehrere Polypeptide enthält, die aus der Gruppe KHCV UB CORE 14 Protein, KHCV 897 Protein und KHCV 403 Protein ausgewählt sind.

20. Diagnosekit, **dadurch gekennzeichnet**, daß er ein Diagnosemittel gemäß Anspruch 17 enthält.

21. In vitro Diagnoseverfahren zum Aufspüren eines gegen KHCV-Antigen gerichteten Antikörpers in einer verdächtigen Probe, **dadurch gekennzeichnet**, daß folgende Schritte vorgesehen sind:

5           (a) Adsorption eines Polypeptids, welches im wesentlichen immunologisch identisch mit einem in KHCV enthaltenen Epitop ist, an einem festen Träger,  
             (b) Zugabe einer zu untersuchenden Probe zum festen Träger, um einen Antigen-Antikörper-Komplex zu bilden und die Menge des Komplexes zu bestimmen.

10          22. Diagnoseverfahren nach Anspruch 21, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Kit gemäß Anspruch 20 in jeder dieser Stufen angewendet wird.

15          23. Diagnoseverfahren nach Anspruch 22, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Kit ein Diagnosemittel nach Anspruch 19 umfaßt.

20          24. Monoklonaler Antikörper, der gegen ein Polypeptid gemäß Anspruch 13 gerichtet ist, **dadurch gekennzeichnet**, daß er aus einer Hybridomazelle, hergestellt durch Fusionieren einer Spleen-Zelle einer mit dem Polypeptid immunisierten Maus und einer Myeloma-Zelle erzeugt ist.

25          25. Antikörper nach Anspruch 24, **dadurch gekennzeichnet**, daß er in einer IgG-Subklasse eingeschlossen ist.

30          26. Antikörper nach Anspruch 24, **dadurch gekennzeichnet**, daß er gegen ein KHCV 897 Protein gerichtet ist, das ein Polypeptid der 1192. bis 1457. Aminosäuresequenzen des gesamten Polypeptids, kodiert in der KHCV cDNA gemäß Anspruch 1 in voller Länge, ist.

35          27. Antikörper nach Anspruch 26, **dadurch gekennzeichnet**, daß er mit der folgenden Aminosäuresequenz immunoreaktiv ist, die die 1192. bis 1289. Aminosäure des gesamten Polypeptids, kodiert in der KHCV cDNA voller Länge gemäß Anspruch 1, umfaßt:

40

45

Ala Val Glu Phe Ile Pro Val Glu Ser Met  
Glu Thr Thr Met Arg Ser Pro Val Phe Thr  
Asp Asn Pro Ser Pro Pro Ala Val Pro Gln  
Thr Phe Gln Val Ala His Leu His Ala Pro  
Thr Gly Ser Gly Lys Ser Thr Arg Val Pro  
Ala Ala Tyr Ala Ala Gln Gly Tyr Lys Val  
Leu Val Leu Asn Pro Ser Val Ala Ala Thr  
Leu Gly Phe Gly Ala Tyr Met Ser Lys Ala  
His Gly Ile Asp Pro Asn Leu Arg Thr Gly  
Val Arg Thr Ile Thr Thr Gly Ala.

50 28. Antikörper nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß er mit der folgenden Aminosäuresequenz immunoreaktiv ist, die die 1371. bis 1407. Aminosäure im gesamten Polypeptid, kodiert in einer KHCV cDNA der vollen Länge gemäß Anspruch 1, umfaßt:

5  
Gly Glu Ile Pro Phe Tyr Gly Lys Ala Ile  
Pro Ile Glu Ala Ile Lys Gly Gly Arg His  
Leu Ile Phe Cys His Ser Lys Lys Lys Cys  
Asp Glu Leu Ala Ala Lys Leu.

- 10 29. Verfahren zur Herstellung einer Zelllinie, die einen gegen ein Polypeptid gemäß Anspruch 13 gerichteten Antikörper bildet, **dadurch gekennzeichnet**, daß eine Myeloma-Zelle und eine Spleen-Zelle, die diesen Antikörper bildet, fusioniert werden.
- 15 30. Verfahren nach Anspruch 29, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Zelllinie Lucky 1.1 (ATCC 10949) oder Lucky 1.2 (ATCC 10950) ist.
31. Diagnosemittel für das Aufspüren eines KHCV-Epitops in einer zu untersuchenden Probe, **dadurch gekennzeichnet**, daß als ein aktiver Bestandteil der Antikörper gemäß Anspruch 24 enthalten ist.
- 20 32. Verfahren zum Aufspüren eines KHCV-Epitops in einer zu untersuchenden Probe, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Diagnosemittel gemäß Anspruch 31 angewendet wird.
33. Impfstoff zur Behandlung oder Vorbeugung vor KHCV-Infektion, **dadurch gekennzeichnet**, daß er inaktiviertes gereinigtes KHVC mit der cDNA gemäß Anspruch 1 enthält.
- 25 34. Impfstoff für die Behandlung oder Vorbeugung vor KHCV-Infektion, **dadurch gekennzeichnet**, daß er als aktiven Bestandteil ein Polypeptid enthält, das nach dem Verfahren gemäß Anspruch 16 hergestellt ist.
- 30 35. Impfstoff nach Anspruch 34, **dadurch gekennzeichnet**, daß er als aktiven Bestandteil E1 Protein, E2N Protein und/oder E2C Protein als aktiven Bestandteil enthält, wobei es sich um Polypeptide der Aminosäurenummern 916-1509, 390-556 und 557-729 des gesamten Polypeptids, kodiert in der KHCV-cDNA des Anspruchs 1 in voller Länge, handelt.
- 35 36. Kit für das Aufspüren eines von KHCV abgeleiteten Polynucleotids in einer zu untersuchenden Probe, **dadurch gekennzeichnet**, daß er eine Nucleotidsequenz von 8 oder mehr Nucleotiden umfaßt, die von einer KHCV cDNA gemäß Anspruch 1 abgeleitet ist.
- 40 37. Verfahren zum Aufspüren eines von KHCV abgeleiteten Polynucleotids in einer zu untersuchenden Probe, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Kit gemäß Anspruch 36 angewendet wird.

Hiezu 59 Blatt Zeichnungen

45

50

55

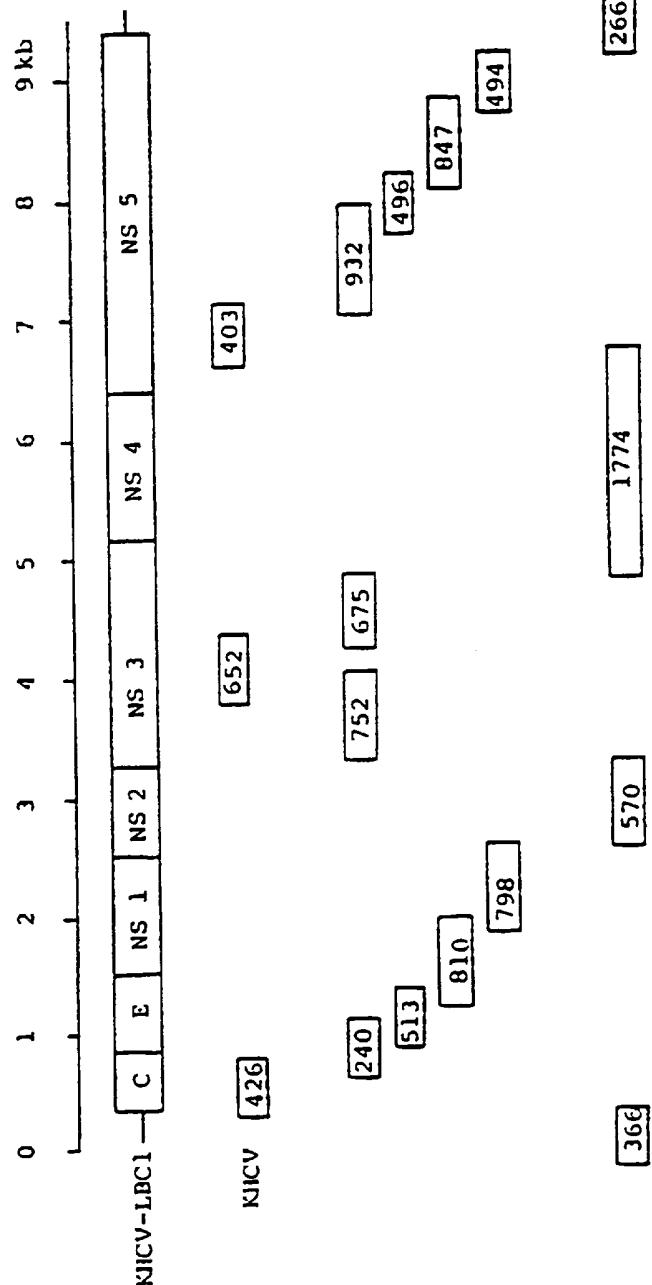


Fig. 1

10	20	30	40	50	60
TGCCAGCCCCGATTGGGGCGACACTCCACCATACTCACTCCCTGTGAGGAACCTACT					
ACGGTCGGGGCTAACCCCCGCTGTGAGGTGGTATCTAGTGAGGGACACTCCTGATGA					
70	80	90	100	110	120
GTCTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTGTCAGGCCCTCAGGA					
CAGAAGTGCCTTTCGCAGATCGTACCGCAATCATACTCACAGCACGTGGAGGTCT					
130	140	150	160	170	180
CCCCCCCCTCCCAGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCCA					
GGGGGGGAGGGCCCTCTCGGTATCACCAGACGCCCTGGCACTCATGTGGCCTAACGGT					
190	200	210	220	230	240
GGACGACCGGGTCCTTCTTGGATCAACCCGCTCAATGCCCTGGAGATTGGCGTGC					
CCTGCTGGCCCAGGAAAGAACCTAGTTGGCGAGTTACGGACCTCTAAACCCGACGGGG					
250	260	270	280	290	300
CGCGAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGTCGCGAAAGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAG					
GCGCTCTGACGATCGCTCATCACAAACCCAGCGCTTCCGGAACACCATGACGGACTATC					
310	320	330	340	350	360
GGTGCTTGCGAGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCACCATGAGCACGAATCCTAAA					
CCACGAACGCTCACGGGGCCCTCCAGAGCATCTGGCACGTGGTACTCGTGCCTAGGATT					
M S T N P K					
370	380	390	400	410	420
CCTCAAAGAAAAACCAAACGTAACACCAACCGCCGCCACAGGATATTAAGTTCCC					
GGAGTTCTTTGGTTGCATTGTGGTGGCGGGTGTCTATAATTCAAGGGCCCG					
P	Q	R	K	T	R
N	T	N	R	R	P
R	P	Q	D	I	K
F	P	G			
430	440	450	460	470	480
GGTGGTCAGATCGTTGGAGTTACTTGTGCCGCGCAGGGGCCCAAGGTTGGGTGTG					
CCACCAAGTCTAGCAACCACCTCAAATGAACAACGGCGCGTCCCCGGGTCCAACCCACAC					
G	G	Q	I	V	G
G	V	Y	L	L	P
R	R	R	R	G	P
R	L	G	V		
490	500	510	520	530	540
CGCGCGACTAGGAAGACTTCCGAGCGGTGCAACCTCGTGGAGGGCGACAGCCTATCCC					
GCGCGCTGATCCTTCTGAAGGCTCGCCAGCGTTGGAGCACCTCCGCTGTGGATAGGGG					
R	A	T	R	K	T
S	E	R	S	Q	P
R	R	R	R	Q	P
I	P				
550	560	570	580	590	600
AAGGCTGCCGGCCCGAGGGCAGGGCCTGGGCTAGCCCCGGTACCCCTGGCCCTCTAT					
TTCCGAGCGGCCGGCTCCGGACCCGAGTCGGGCCATGGGAACCGGGGAGATA					
K	A	R	R	P	E
R	A	W	A	Q	G
P	P	G	P	Y	Y
L	Y				

Fig. 2-1

610	620	630	640	650	660
GGCAATGAGGGCTGGGTGGGCAGGATGGCTCTGTCAACCCCGGGCTCCGGCTAGT					
CCGTTACTCCCGAACCCCCACCCGTCCTACCGAGGAACAGTGGGGGCCGAGGGCCGGATCA					
G	N	E	G	L	G
W	A	G	W	L	L
S	P	R	G	S	R
P	S				
670	680	690	700	710	720
TGGGGCCCCACGGACCCCCGGCGTAAGTCGCATAATTGGGTAAAGGTATCGACACCCCTC					
ACCCCGGGGTGCCTGGGGCCGCATTAGCGCATTAAACCCATTCCAGTAGCTGTGGGAG					
W	G	P	T	D	P
R	R	K	S	R	N
L	G	K	V	I	D
G					T
730	740	750	760	770	780
ACATGCGGCTTCGCCGACCTCATGGGTACATTCCGCTCGTCGGCGCCCCCTAGGGGGC					
TGTACGCCGAAGCGGCTGGAGTACCCATGTAAGGCGAGCAGCCGGGGGGATCCCCCG					
T	C	G	F	A	D
L	M	G	Y	I	P
V	L	V	G	A	P
G	G				
790	800	810	820	830	840
GTTGCCAGGGCCCTGGCACATGGTGTCCGGGTGCTGGAGGACGGCGTAACTATGCAACA					
CAACGGTCCCAGGGACCCTGTGTAACACAGGCCACGACCTCTGCCACTTGATACGTTGT					
V	A	R	A	L	A
H	G	V	R	V	E
D	G	V	N	Y	A
T					T
850	860	870	880	890	900
GGGAATCTGCCCGGTTGCTTTCTCTATCTTCTCTGGCTCTGCTGTCTGTTGACC					
CCCTTAGACGGGCCAACGAGAAAGAGATAGAAGGAGAACCGAGACAGAACAACTGG					
G	N	L	P	G	C
S	F	S	I	F	L
L	A	L	L	S	C
S	C	L	T		
910	920	930	940	950	960
ACCCCAGTTCCGTTATGAAGTGCCTAACCGCGTCCGGATGTACCATGTCACGAACGAC					
TGGGGTCAAAGGCGAACATTCACGCATTGCGCAGGCCCTACATGGTACAGTGCTTGCTG					
T	P	V	S	A	Y
E	V	R	N	A	S
G	M	Y	H	V	T
N	D				
970	980	990	1000	1010	1020
TGCTCCAACCTCAAGCATTGTTATGAGGCAGCGGACATGATCATGCACACTCCGGGTGC					
ACGAGGTTGAGTTGTAACACATACTCCGTCGCTGTACTAGTACGTGTAGGGGCCACG					
C	S	N	S	S	I
S	I	V	Y	E	A
A	D	M	I	M	H
T	P	G	C		
1030	1040	1050	1060	1070	1080
GTGCCCTGCCTGGGAGGACAACCTCTCCGTTGCTGGGTGGCACTTACTCCCACGCTC					
CACGGGACGCAAGCCCTCTGTTGAGGAGGGCAACGACCCACCGTGAATGAGGGTGCAG					
V	P	C	V	R	E
D	N	S	S	R	C
W	V	A	L	T	P
T	L				
1090	1100	1110	-1120	1130	1140
GCGGCCAGGAATGCCAGCGTCCCCACTACGACATTGCGACGCCATGTCGACTTGCTCGTT					
CGCCGGTCCTACGGTCGCAGGGGTGATGCTGTAACGCTGCGGTACAGCTGAACGAGCAA					
A	A	R	N	A	S
V	P	T	T	T	L
R	R	H	V	D	L
L	V				
1150	1160	1170	1180	1190	1200
GGGGTAGCTGCTTTCTGTTCCGCTATGTACGTGGGGGACCTCTGCGGATCTGTTTCTT					
CCCCATCGACGAAAGACAAGGCGATAACATGCACCCCTGGAGACGCCCTAGACAAAAGGAA					
G	V	A	A	F	C
S	A	M	Y	V	G
D	L	C	G	S	V
F	L				

Fig. 2-2

1210	1220	1230	1240	1250	1260
GTTTCCCAGCTGTTCACCTTTGCCTGCCGGCATGAGACGGTACAGGACTGCAACTGC					
CAAAGGGTCGACAAGTGGAAAAGCGGAGCGGCCGTACTCTGCCATGTCCTGACGTTGACG					
V	S	Q	L	F	T
1270	1280	1290	1300	1310	1320
TCAATCTATCCCGGCCGCGTATCAGGTACCGCATGGCCTGGGATATGATGATGAACCTGG					
AGTTAGATAGGGCCGGCGCATAGTCCAGTGGCGTACCGGACCCCTATACTACTACTTGACC					
S	I	Y	P	G	R
1330	1340	1350	1360	1370	1380
TCGCCTACAAACAGCCCTAGTGGTATCGCAGCTACTCCGGATCCCACAAGCTGTCGTGGAC					
AGCGGATGTTGTCGGGATCACCATAGCGTCGATGAGGCCTAGGGTGTTCGACAGCACCTG					
S	P	T	T	A	L
1390	1400	1410	1420	1430	1440
ATGGTGACAGGGTCCCCTAGGGGAATCCTGGCGGGCCTTGCCTACTATTCCATGGTGGGG					
TACCACTGTCCTCAGGGTACCCCTTAGGACCGCCCGAACGGATGATAAGGTACCAACCCC					
M	V	T	G	S	H
1450	1460	1470	1480	1490	1500
AACTGGGCTAAGGTCTAATTGCGATGCTACTCTTGCCTGGCGTTGACGGAACCAACCCAC					
TTGACCCGATTCCAGAATTACGCTACGATGAGAACGGCGCAACTGCCTGGTGGGTG					
N	W	A	K	V	L
1510	1520	1530	1540	1550	1560
GTGACAGGGGGGGCGCAAGGTGGCCGCTAGCTCGTAACGTCCCTCTTAGCCCTGGG					
CACTGTCCCCCCCCCTCGTTCCAGCCGGCGATCGAGCGATTGCAAGGGAGAAATCGGGACCC					
V	T	G	G	A	Q
1570	1580	1590	1600	1610	1620
CCGGTTCAGCACCTCCAGCTCATAAACACCAACGGCAGCTGGCATATCAACAGGACCGCC					
GGCCAAGTCGTGGAGGTGAGTATTGTTGGTGCACCGTATAGTTGTCCTGGCGG					
P	V	Q	H	L	Q
1630	1640	1650	1660	1670	1680
CTGAGCTGCAATGACTCCCTAACACTGGGTTTGTGCCCCGCTGTTCTACAAATACAGG					
GACTCGACGTTACTGAGGGAGTTGTGACCCAAACACGGCGGACAAGATGTTATGTC					
L	S	C	N	D	S
1690	1700	1710	1720	1730	1740
TTCAACGCGTCCGGGTGCCGGAGCGCTTGGCACGTGCGCCCCATTGATACATTGCG					
AAGTTGCGCAGGCCACGGGCTCGCGAACCGGTGCACGGCGGGGTAACATGTAAGCGC					
F	N	A	S	G	C
1750	1760	1770	1780	1790	1800
CAGGGGTGGGGTCCCACACTTACACTGAGCCTCATGATTGGATCAGAGGCCCTATTGC					
GTCCCCACCCAGGGTAGTGAATGTGACTCGGAGTACTAACCTAGTCTCCGGGATAACG					
Q	G	W	G	P	I
T	Y	T	E	P	H
Y	C				

1810	1820	1830	1840	1850	1860
TGGCACTACGCCCTAACCGTGTGGTATTGTGCCAACGTTGCAGGGTGTGGCCAGTA					
ACCGTGATGCGGGAGTTGCACACCATAACACACGGGTGCAACGTCCACACACCGGGTCAT					
W H Y A P Q P C G I V P T L Q V C G P V					
1870	1880	1890	1900	1910	1920
TACTGCTCACCCCGAGTCCTGTTGGTGGGACTACCGATCGTTGGTGCCTACAA					
ATGACGAAGTGGGGCTCAGGACAACGCCACCCCTGATGGCTAGCAAAGCCACGGGGATGT					
Y C F T P S P V A V G T T D R F G A P T					
1930	1940	1950	1960	1970	1980
TACAGATGGGGGGCAAATGAGACGGACGTGCTGCTCTAACAAACGCCGGGCCGCAA					
ATGTCTACCCCCCGTTACTCTGCCTGCACGAGGAATTGTTGGCCCGGCGTT					
Y R W G A N E T D V L L N N A G P P Q					
1990	2000	2010	2020	2030	2040
GGCAACTGGTTGGCTGTACATGGATGAATGGCACTGGGTCACCAAGACATGTGGGGC					
CCGTTGACCAAGCCGACATGTACCTACTTACCGTGACCCAAGTGGTTCTGTACACCCCG					
G N W F G C T W M N G T G F T K T C G G					
2050	2060	2070	2080	2090	2100
CCCCCGTGTAAACATGGGGGGTCGGCAACAATACTTACGCTGCCCCACGGACTGCTTC					
GGGGGCACATTGTAGCCCCCCCAGCCGTTGTTATGGAACACTGGACGGGGTGCTGACGAAG					
P P C N I G G V G N N T L T C P T D C F					
2110	2120	2130	2140	2150	2160
CGAAAGCACCCCGGGGCCACTTACACCAAATGGGTTGGGGCTTGGTTAACACCCAGG					
GCTTTCGTGGGGCCCGGTGAATGGTTACGCCAAGCCCCGGAACCAATTGTGGTCC					
R K H P G A T Y T K C G S G P W L T P R					
2170	2180	2190	2200	2210	2220
TGCTTAGTCGACTACCCGTACAGGCTCTGGCATTACCCCTGCACGTCAACTTACCATC					
ACGAATCAGCTGATGGCATGTCCGAGACCGTAATGGGACGTGACAGTTGAAATGGTAG					
C L V D Y P Y R L W H Y P C T V N F T I					
2230	2240	2250	2260	2270	2280
TTTAAGGTTAGGATGTACGTGGGGGGCGGGAGCACAGGCTCGACGCCGCATGCACTGG					
AAATTCCAATCCTACATGCACCCCCCGCGCTCGTGTCCGAGCTGCCGTACGTTGACC					
F K V R M Y V G G A E H R L D A A C N W					
2290	2300	2310	2320	2330	2340
ACTCGGGGAGAGCGTTGTGACCTGGAGGACAGGGATAGGTCAAGAGCTTAGCCGCTGCTG					
TGAGCCCCCTCGCAACACTGGACCTCCCTATCCAGTCTCGAATGGCGACGAC					
T R G E R C D L E D R D R S E L S P L L					
2350	2360	2370	2380	2390	2400
CTGTCTACAACAGAGTGGCAGGTACTGCCCTGTTCTTACAACCCCTACCGGCTCTGTCC					
GACAGATGTTGTCTACCGTCCATGACGGGACAAGGAAGTGGTGGATGGCCGAGACAGG					
L S T T E W Q V L P C S F T T L P A L S					

Fig. 2-4

2410 2420 2430 2440 2450 2460  
ACTGGTTGATTCACTCCATCAGAACATCGTGGACATAACAATACCTGTACGGTATAAGGG  
TGACCAAACTAAGTAGAGGTAGTCTTGTAGCACCTGTATGTTATGGACATGCCATATCCC  
T G L I H L H Q N I V D I Q Y L Y G I G  
  
2470 2480 2490 2500 2510 2520  
TCGGCGGTTGTCTCCTTGCATCAAATGGGAGTATATTGTGCTGCTCTCCTCTCTG  
AGCCGCCAACAGAGGAAACGCTAGTTACCCATATAACACGACGAGAAGGAAGAAC  
S A V V S F A I K W E Y I V L L F L L L  
  
2530 2540 2550 2560 2570 2580  
GCGGACGCGCGCGTCTCGCCTGCTTGTGGATGATGCTGCTGGTAGCGCAAGCCGAGGCC  
CGCCTGCGCGCGAGACGCAACACCTACTACGACGACCATCGCGTTCGGCTCCGG  
A D A R V C A C L W M M L L V A Q A E A  
  
2590 2600 2610 2620 2630 2640  
GCCTTAGAGAACCTGGTGGCCTCAATGCAGCGTCCGTGGCCGGAGCGCATGGCATTCTT  
CGGAATCTCTGGACCACCAGGAGTTACGTGCGAGGCACCGGCTCGCTACCGTAAGAA  
A L E N L V V L N A A S V A G A H G I L  
  
2650 2660 2670 2680 2690 2700  
TCCTTCATTGTGTTCTTCTGTGCTGCCTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCGAGCG  
AGGAAGTAACACAAGAACGACGACGGACCATGTAGTTCCCGACCAAGGGCCTCGC  
S F I V F F C A A W Y I K G R L V P G A  
  
2710 2720 2730 2740 2750 2760  
GCATACGCCCTCTATGGCGTATGGCCGCTGCTTCTGCTGCTGGCTTACCAACCACGG  
CGTATGCGGGAGATACCGCATAACCGCGACGAAGACGAAGACGACCGCAATGGTGGTGC  
A Y A L Y G V W P L L L L A L P P R  
  
2770 2780 2790 2800 2810 2820  
GCGTACGCCATGGACCAGGGAGATGGCCGATCGTGGAGGGCGGGTTTTGTAGGTCTG  
CGCATGCGGTACCTGGCCCTCTACCGCGTAGCACGCCCTCCGCGCCAAAACATCCAGAC  
A Y A M D R E M A A S C G G A V F V G L  
  
2830 2840 2850 2860 2870 2880  
GTACTCTGACCTTGTCAACCACACTATAAAGTGTCTTGCAGGTTCATATGGTGGCTA  
CATGAGAACTGGAACAGTGGTGTGATATTCAACAAGGAACGGTCCAAGTATAACCACCGAT  
V L L T L S P H Y K V F L A R F I W W L  
  
2890 2900 2910 2920 2930 2940  
CAATATCTCATCACCAAGAACCGAACGCGATCTGCAAGTGTGGGTCCCCCTCTAACGTT  
GTTATAGAGTAGTGGTCTTGGCTTGCCTACGCTACACCCAGGGGGGAGAGTTGCAA  
Q Y L I T R T E A H L Q V W V P P L N V  
  
2950 2960 2970 2980 2990 3000  
CGGGGGGGTCGCGATGCCATCATCCTCCATCACATGGTGGTCCACCCAGAGCTAACCTT  
GCCCGCCAGCGCTACGGTAGTAGGAGGAGTGTACGCACCAGGTGGGTCTCGATTAGAAA  
R G G R D A I I L L T C V V H P E L I F

3010        3020        3030        3040        3050        3060  
 GACATCACAAATATTGCTCGCCATATTGGCCCCGCTCATGGTGCTCCAGGCCGGCATA  
 CTGTAGTGTATAAACGAGCGGTATAAGCCGGCGAGTACCAACGAGGTCCGGCCGTAT  
 D I T K Y L L A I F G P L M V L Q A G I  
  
 3070        3080        3090        3100        3110        3120  
 ACTAGAGTGCCTACTTCGTGCGCGACAAGGGCTCATCGTGCATGCATGTTGGCGCGG  
 TGATCTCACGGCATGAAGCACGCGCGTGTCCCAGTAAGCACGTACGTACAACCGCGCC  
 T R V P Y F V R A Q G L I R A C M L A R  
  
 3130        3140        3150        3160        3170        3180  
 AAAGTCGTGGGGGGTCATTACGTCAAATGGTCTTCATGAAGCTGGCCGCACTAGCAGGT  
 TTTCAGCACCCCCCAGTAATGCAGGTTTACCAAGAAGTACTTCGACCAGGTGATCGTCCA  
 K V V G G H Y V Q M V F M K L A A L A G  
  
 3190        3200        3210        3220        3230        3240  
 ACGTACGTTATGACCATCTTACTCCACTGCAGATTGGGCTCACACGGGTTACGAGAC  
 TGCGATGCAAATACTGGTAGAATGAGGTGACGCTCTAACCCGAGTGTGCCCCAATGCTCTG  
 T Y V Y D H L T P L R D W A H T G L R D  
  
 3250        3260        3270        3280        3290        3300  
 CTTGCAGTGGCAGTAGAGCCCGTTGTCTCTGACATGGAGACCAAAGTCATCACCTGG  
 GAACGTCAACCGTCATCTCGGGCAACAGAAGAGACTGTACCTCTGGTTTCACTAGTGGACC  
 L A V A V E P V V F S D M E T K V I T W  
  
 3310        3320        3330        3340        3350        3360  
 GGGGCAGACACCGCGCGTGCAGGGGACATCATCTGGCCCTGCCTGCTTCCGCCGAAGG  
 CCCCGTCTGTGGCGCCGACGCCCTGTAGTAGAACCGGGACGGACGAAGGCCGGCTTCC  
 G A D T A A C G D I I L A L P A S A R R  
  
 3370        3380        3390        3400        3410        3420  
 GGGAAAGGAGATACTTCTGGGACCGGGCGATAGTCTTGAAGGACAGGGGTGGCGACTCCTT  
 CCCTCCCTCTATGAAGACCCCTGGCCGGCTATCAGAACTCCTGTCCCCACCGCTGAGGAA  
 G K E I L L G P A D S L E G Q G W R L L  
  
 3430        3440        3450        3460        3470        3480  
 GCGCCCACACGGCTACTCCAAACAAACGCGAGGCCTGCTTGGTTGCATCATCACTAGC  
 CGCGGGTAGTGCAGGATGAGGGTTGTTGCGCTCCGGACGAACCAACGTAGTAGTGTGATCG  
 A P I T A Y S Q Q T R G L L G C I I T S  
  
 3490        3500        3510        3520        3530        3540  
 CTTACAGGCCGGACAAGAACCAAGGTTGAGGGGGAGGTCAAGTGGTTCCACCGCAACA  
 GAATGTCCGGCCCTGTTCTGGTCCAACCTCCCCCTCCAAGTTCACCAAAGGTGGCGTTGT  
 L T G R D K N Q V E G E V Q V V S T A T  
  
 3550        3560        3570        3580        3590        3600  
 CAATCTTCCCTGGCGACCTGCATCAATGGCGTGTGTTGGACTGTCTCCACGGCGCCGGC  
 GTTAGAAAGGACCGCTGGACGTAGTTACCGCACACAACTGACAGAAGGTGCCGGCCCG  
 Q S F L A T C I N G V C W T V F S G A G

Blatt 8

3610 3620 3630 3640 3650 3660  
TCAAAGACCCCTAGCCGGCCAAAGGGTCCAATCACCCAAATGTACACCAATGTAGACCAAG  
AGTTCTGGGATCGGCCGGTTCCAGGTTAGTGGGTTACATGTGGTTACATCTGGTC  
S K T L A G P K G P I T Q M Y T N V D Q  
  
3670 3680 3690 3700 3710 3720  
GACCTTGGCTGGCCGGCACCTCCTGGGCGGTTCCCTGACACCAGCAGTGCACCTGGCGC  
CTGGAACAACCGACCGGCGTGGAGGACCCCGCGCAAGGGACTGTGGTACGTGAACGCCG  
D L V G W P A P P G A R S L T P C T C G  
  
3730 3740 3750 3760 3770 3780  
TCCTCGGACCTTACCTGGTCACGAGACATGCTGATGTCATTCCGGTGCGCCGGCGGGGT  
AGGAGCCTGGAAATGGACCAGTGCTCTGTACACTACAGTAAGGCCACGCCGGCGCCCCA  
S S D L Y L V T R H A D V I P V R R R G  
  
3790 3800 3810 3820 3830 3840  
GACGGTAGGGGGAGCCTACTCCCCCCCAGGCCTGCTCCTACTTGAAGGGCTCCTCGGGT  
CTGCCATCCCCCTGGATGAGGGGGGTCGGACAGAGGATGAACCTCCGAGGAGGCCA  
D G R G S L L P P R P V S Y L K G S S G  
  
3850 3860 3870 3880 3890 3900  
GGTCCACTGCTCTGCCCTTCGGGGCACGCTGTCGGCATACTTCCGGCTGCTGTATGCACC  
CCAGGTGACGAGACGGGAAGCCCCGTGCGACAGCCGTATGAAGGCCACGACATACGTGG  
G P L L C P S G H A V G I L P A A V C T  
  
3910 3920 3930 3940 3950 3960  
CGGGGGGTTGCCATGGCGGTGGAATTCATACCCGTTGAGTCTATGGAAACTACTATGCGG  
GCCCCCAACGGTACCGCCACCTTAAGTATGGCAACTCAGATACTTGTATGATACGCC  
R G V A M A V E F I P V E S M E T T M R  
  
3970 3980 3990 4000 4010 4020  
TCTCCGGTCTTCACGGACAATCCGTCTCCCCGGCTGTACCGCAGACATTCAAAGTGGCC  
AGAGGCCAGAAGTGCCTGTTAGGCAGAGGGGGCCACATGGCGTCTGTAAGGTTACCGG  
S P V F T D N P S P P A V P Q T F Q V A  
  
4030 4040 4050 4060 4070 4080  
CACTTACACGCTCCCACCGGCAGCGGAAGAGCACTAGGGTGCCTGCATATGCAGCC  
GTGAATGTGCAGGGTGGCCGTCGCGTCTCGTACCCACGGCCACGTATACGTGG  
H L H A P T G S G K S T R V P A A Y A A  
  
4090 4100 4110 4120 4130 4140  
CAAGGGTACAAGGTGCTCGTCTAAATCCGTCCGTCGCCGCCACCTGGTTTGGGGCG  
GTTCCCATGTCCACGAGCAGGATTAGGCAGGCAGCGGGGTGGAACCCAAAACCCCGC  
Q G Y R V L V L N P S V A A T L G F G A  
  
4150 4160 4170 4180 4190 4200  
TATATGTCCAAGGCACATGGTATCGACCCCAACCTTAGAAGTGGGGTAAGGACCATCACC  
ATATACAGGTTCCGTGTACCATAGCTGGGGTTGGAATCTGACCCCATCCTGGTAGTGG  
Y M S K A H G I D P N L R T G V R T I T

4210	4220	4230	4240	4250	4260														
ACAGGTCCCCCTATCACATACTCCACCTATGGCAAGTTCCCTGCCGACGGTGGCGGCCTCC																			
TGTCCACGGGGATAGTGTATGAGGTGGATACCGTTCAAGGAACGGCTGCCACCGCCGAGG																			
T	G	A	P	I	T	Y	S	T	Y	G	K	F	L	A	D	G	G	G	S
4270	4280	4290	4300	4310	4320														
GGGGGCGCCTATGACATCATTAATGTGTGATGAGTGCCACTCAACTGACTCGACTACCATT																			
CCCCCGCGGATACTGTAGTATTACACACTACTCACGGTGAGTTGACTGAGCTGATGGTAA																			
G	G	A	Y	D	I	I	M	C	D	E	C	H	S	T	D	S	T	T	I
4330	4340	4350	4360	4370	4380														
TATGGCATCGGCACAGTCCTGGACCAAGCGGAGACGGCTGGAGCGCGGCTCGTGGTGCCTC																			
ATACCGTAGCCGTGTCAGGACCTGGTCTGCCCTCTGCCGACCTCGCGCCGAGCACCACGAG																			
Y	G	I	G	T	V	L	D	Q	A	E	T	A	G	A	R	L	V	V	L
4390	4400	4410	4420	4430	4440														
TCCACCGCTACGCCCTCCGGGATCGGTACCGTGCCACACCTCAATATCGAGGGAGGTGGCC																			
AGGTGGCGATCGGGAGGCCCTAGCCAGTGGCACGGTGTGGAGTTATAGCTCCTCCACCGG																			
S	T	A	T	P	P	G	S	V	T	V	P	H	L	N	I	E	E	V	A
4450	4460	4470	4480	4490	4500														
CTGTCTAATACTGGAGAGATCCCCTCTACGGCAAAGCATTCCCATCGAGGCTATCAAG																			
GACAGATTATGACCTCTCTAGGGGAAGATGCCGTTCTGGTAAGGGTAGCTCCGATAGTTCTC																			
L	S	N	T	G	E	I	P	F	Y	G	K	A	I	P	I	E	A	I	K
4510	4520	4530	4540	4550	4560														
GGGGGAAGGCATCTCATTTCTGCCATTCCAAGAAGAAGTGTGACGAACCGCCGCAAAG																			
CCCCCTCCGTAGAGTAAAAGACGGTAAGGTTCTTACACTGCTTGAGCGGCGTTTC																			
G	G	R	H	L	I	F	C	H	S	K	K	C	D	E	L	A	A	K	
4570	4580	4590	4600	4610	4620														
CTGTCAGGCCTCGGACTCAATGCCGTAGCGTATTACCGGGGTCTTGACGTGTCGTCTCATA																			
GACAGTCGGAGCCTGAGTTACGGCATCGCATAATGCCCCCAGAACTGCACAGGCAGTAT																			
L	S	G	L	N	A	V	A	Y	Y	R	G	L	D	V	S	V	I		
4630	4640	4650	4660	4670	4680														
CCGACCAGCGGAGACGTTGTCGGCGACGGACGCTCTAATGACGGGCTTACCGGC																			
GGCTGGTCGCCTCTGCAACAACAGCACCGCTGCCCTGCAGGATTACTGCCCGAAATGGCCG																			
P	T	S	G	D	V	V	V	V	A	T	D	A	L	M	T	G	F	T	G
4690	4700	4710	4720	4730	4740														
GACTTTGACTCAGTGATCGACTGTAATACGTGTGTCACCCAGACAGTCGATTTCAGCTTG																			
CTGAAACTGAGTCACTAGCTGACATTATGCACACAGTGGTCTGTCAGCTAAAGTCGAAC																			
D	F	D	S	V	I	D	C	N	T	C	V	T	Q	T	V	D	F	S	L
4750	4760	4770	4780	4790	4800														
GACCCCACCTTCACCATTGAGACGACGACCGTGCCTCAAGACGAGCAGTCAGTGTGCGCTCGCAG																			
CTGGGGTGGAAAGTGGTAACCTCTGCTGCTGGCACGGGTTCTGCGTCACAGCGCGAGCGTC																			
D	P	T	F	T	I	E	T	T	T	V	P	Q	D	A	V	S	R	S	Q

Blatt 10

4810	4820	4830	4840	4850	4860
AGGCAGGGCAGGACTGGTAGGGGCAGGGCTGGCATATACAGGTTGTGACTCCAGGAGAA					
TCCGCTCCGTCCTGACCATCCCCGTCCCACCGTATATGTCCAACACTGAGGTCCCTTT					
R	R	G	R	T	G
4870	4880	4890	4900	4910	4920
CGGCCCTCGGGCATGTTGATTCTTCGGTCTGTGAGTGTATGACGCGGGTTGTGCG					
GCCGGGAGCCCGTACAAGCTAAGAACCCAGGACACACTCACAAATACTGCGCCCAACACGC					
R	P	S	G	M	F
D	S	S	V	L	C
E	C	Y	D	A	G
4930	4940	4950	4960	4970	4980
TGGTACGAACACTACGCCCGCTGAGACCTCGGTTAGGTTGCGGGCGTACCTAAACACACCA					
ACCATGCTTGAGTGCAGGGCAGCTGGAGCCAATCCAACGCCCGCATGGATTGTGTTG					
W	Y	E	L	T	P
A	S	T	S	V	R
L	R	A	Y	L	N
T	P				
4990	5000	5010	5020	5030	5040
GGGTTGCCCGTCTGCCAGGACCATCTGGAGTTCTCGGAGGGTGTCTCACAGGCCTCAC					
CCCAACGGGCAGACGGTCTGGTAGACCTCAAGAGCCTCCCACAGAAGTGTCCGGAGTGG					
G	L	P	V	C	Q
D	H	L	E	F	S
E	S	G	V	F	T
G	L	T			
5050	5060	5070	5080	5090	5100
CACATAGATGCCACTTCTTATCCCAGACTAAACAGGCAGGAGAGAACTTCCCCTACTTG					
GTGTATCTACGGGTGAAGAATAGGGTCTGATTGTCCGCTCTCTGAAGGGGATGAAC					
H	I	D	A	H	F
L	S	Q	T	K	Q
A	G	E	N	F	P
G	V	L			
5110	5120	5130	5140	5150	5160
GTAGCATACCAGGCTACAGTGTGCCAGGGCTCAAGCCCCACCTCCATCGTGGGATGAA					
CATCGTATGGTCCGATGTACACCGCGTCCCAGTTGGAGTGTGGGGTAGCACCCCTACTT					
V	A	Y	Q	A	T
V	C	A	R	A	Q
A	P	P	P	S	W
P	S	W	D	E	
5170	5180	5190	5200	5210	5220
ATGTGGAGGTGTCTCATACGGCTGAAACCTACGCTGCACGGGCCAACACCCCTGCTGTAT					
TACACCTCACAGAGTATGCCACTTGGATGCGACGTGGCCGGTTGTGGGGACGACATA					
M	W	R	C	L	I
R	L	K	P	T	L
H	G	P	T	P	L
G	P	T	L	L	Y
5230	5240	5250	5260	5270	5280
AGGTTAGGAGCCGTCCAAAATGAGGTACCCCTCACACACCCCATAACCAAATTCATCATG					
TCCAATCCTCGGCAGGTTTACTCCAGTGGAGTGTGGGGTATTGGTTAACGTAGTAC					
R	L	G	A	V	Q
N	E	V	T	L	T
H	P	I	T	K	F
I	M				
5290	5300	5310	5320	5330	5340
ACATGTATGTCGGCTGACCTGGAGGTGTCACCAGCACCTGGTGCTGGTAGGCAGGTC					
TGTACATACAGCCGACTGGACCTCCAGCAGTGGTCGTGGACCCACGACCATCCGCCTCAG					
T	C	M	S	A	D
L	E	V	V	T	S
W	V	L	V	G	G
V					
5350	5360	5370	5380	5390	5400
CTCGCAGCTCTGGCCCGTACTGCCTGACAACAGGCAGCGTGGTCATTGTGGGCAGGATC					
GAGCGTCGAGACCGGGCATGACGGACTGTTGTCCGTCGCACCAGTAACACCCGTCTAG					
L	A	A	L	A	A
Y	C	L	T	T	G
S	V	V	I	V	G
V					

5410 5420 5430 5440 5450 5460  
ATCCCTGCCGGAAAGCCGGCTATCATCCCCGATAGGGAAAGTTCTCTACCAGGAGTCGAC  
TAGGACAGGCCCTCGGCCGATAGTAGGGCTATCCCTCAAGAGATGGCCTCAAGCTG  
I L S G K P A I I P D R E V L Y Q E F D

5470 5480 5490 5500 5510 5520  
GAGATGGAGGAGTGTGCCTCACACCTCCCTACTTCGAACAGGGAAATGCAGCTGCCGAG  
CTCTACCTCCCTCACACGGAGTGTGGAGGGAAATGAAGCTTGTCGCCCTACGTCGAGCGGCTC  
E M E E C A S H L P Y F E Q G M Q L A E

5530 5540 5550 5560 5570 5580  
CAATTCAAACAGAAGGGCCTCGGGTTGCTGAAACAGCCACCAAGCAGGGAGGCTGCT  
GTTAAGTTGTCTTCCCGAGCCAACGACGTTGTCGGTGGTCTCGTCCGCCCTCCGACGA  
Q F K Q K A L G L L Q T A T K Q A E A A

5590 5600 5610 5620 5630 5640  
GCTCCCGTGGTGGAGTCCAAGTGGCGAGCCCTGAGACCTCTGGCGAAGCACATGTGG  
CGAGGGCACCACCTCAGGTTCACCGCTCGGAACACTCTGAAGAACCCGCTCGTGTACACC  
A P V V E S K W R A L E T F W A K H M W

5650 5660 5670 5680 5690 5700  
AACTTCATTAGTGGGATACTAGTACTTGGCAGGCTTGTCCACTCTGCCTGGAAACCCGCA  
TTGAAGTAATCACCTATGTCATGAACCGTCCGAACAGTGAGACGGACCCTGGGGCGT  
N F I S G I Q Y L A G L S T L P G N P A

5710 5720 5730 5740 5750 5760  
ATACGATCACCGATGGCATTACAGCCTCCATCACAGCCCTCACCAAGCCCGCTCACCAACCCAGCATAACC  
TATGCTAGTGGCTACCGTAAGTGTGGAGGTAGTGGTGGCGAGTGGTGGTCGTATGG  
I R S P M A F T A S I T S P L T T Q H T

5770 5780 5790 5800 5810 5820  
CTCTTGTAAACATCTGGGGGATGGGTGGCTGCCAAGTCGCCCCCCCCAGCGCTGCC  
GAGAACAAATTGTAGAACCCCCCTACCCACCGACGGGTTGAGCGGGGGGGTCGCGACGG  
L L F N I L G G W V A A Q L A P P S A A

5830 5840 5850 5860 5870 5880  
TCAGCTTCGTGGCGCCGGATCGCTGGAGCCGCTGTGGCACGATAGGCCTTGGGAAG  
AGTCGAAAGCACCCCGGGCGTAGCGACCTCGCGACAACCGTGTATCCGAACCCCTTC  
S A F V G A G I A G A A V G T I G L G K

5890 5900 5910 5920 5930 5940  
GTGCTTGTGGACATTCTGGCAGGTTATGGAGCAGGGGTGGCGGGCGCACTGTGGCCTTT  
CACGAACACCTGTAAGACCGTCCAATACCTCGTCCCCACCGCCCGGTGAACACCGGAAA  
V L V D I L A G Y G A G V A G A L V A F

5950 5960 5970 5980 5990 6000  
AAGATCATGAGCGGCAGATGCCTTCAGCCGAGGACATGGTCAACTTACTCCCTGCCATC  
TTCTAGTACTGCCGCTCTACGGAAGTCGGCTCTGTACCGAGTTGAATGAGGGACGGTAG  
K I M S G E M P S A E D M V N L L P A I

6010	6020	6030	6040	6050	6060
CTTTCTCCGGTGCCCTGGTCGGGATTGTGTGCAGCAATACTCGTCGGCATGTG					
GAAAGAGGGCACGGGACCAGCAGCCCTAACACACACGTGTTATGACGCAGCCGTACAC					
L	S	P	G	A	L
V	V	G	I	V	C
A	A	A	I	L	R
R	R	H	V		
6070	6080	6090	6100	6110	6120
GGCCCAGGGGAAGGGGCTGTGCAGTGGATGAACCGGCTGATAGCGTCGCCCTCGCGGGGT					
CCGGGTCCCCCTCCCCGACACGTACCTACTTGGCCGACTATCGCAAGCGGAGCGCCCCA					
G	P	G	E	G	A
V	Q	W	M	N	R
L	I	A	F	A	S
R	G				
6130	6140	6150	6160	6170	6180
AACCACGTCTCCCCAGGCACTATGTGCCAGAGAGCGAGCCTGCAGCGCGTGTACCCAG					
TTGGTGAGAGGGGTCCCGTGTACACGGTCTCTCGCTCGACGTGCGCACAAATGGGTC					
N	H	V	S	P	R
H	Y	V	P	E	S
E	P	A	A	R	V
T	Q				
6190	6200	6210	6220	6230	6240
ATCCTTCCAGCCTCACCATCACTCAGTGTGAAGAGACTCCACCACTGGATTAATGAG					
TAGGAAAGGTCCGGAGTGGTAGTGAGTCACAACCTCTGAGGTGGCACCTAATTACTC					
I	L	S	S	L	T
I	T	Q	L	L	K
R	L	H	Q	W	I
N	E				
6250	6260	6270	6280	6290.	6300
GACTGCTCTACGCCATGCTCCAGCTCGTGGCTAAGGGAGATTGGACTGGATCTGCACG					
CTGACGAGATGCGGTACGAGGTCGAGCACCGATTCCCTCTAAACCCCTGACCTAGACGTGC					
D	C	S	T	P	C
S	S	S	W	L	R
E	I	W	D	W	I
C	T				
6310	6320	6330	6340	6350	6360
GTGTTGACTGACTTCAAGACCTGGCTCCAGTCCAAGCTCTGCCGCGATTACCGGGAGTC					
CACAACTGACTGAAGTTCTGGACCGAGGTCAAGGTCAGGTTGAGGACGGCGCTAATGGCCCTCAG					
V	L	T	D	F	K
T	W	L	Q	S	X
L	P	R	L	P	G
P	G	V			
6370	6380	6390	6400	6410	6420
CCTTTTTCTCATGCCAACGGGGTATAAGGGAGTCTGGCGGGGGACGGCATCATGCAC					
GCGAAAAAGAGTACGGTTGCCCTCATATTCCCTCAGACGCCCGGCGTAGTACGTG					
P	F	F	S	C	Q
R	G	Y	K	G	V
G	V	W	R	G	D
M	H				
6430	6440	6450	6460	6470	6480
ACACACCTGCCCATGCGGAGCACAGATCACCGGACACGTCAAAACGGTCCATGAGGATC					
TGGTGGACGGGTACGCCCTCGTGTCTAGTGGCTGTGCAGTTTGCCAAGGTACTCCTAG					
T	T	C	P	C	G
A	Q	I	T	G	H
N	G	K	N	G	S
G	R	V	K	M	R
I					
6490	6500	6510	6520	6530	6540
GTTGGGCTAAACCTGCAGAACACAGTGGTACGGGACATTCCCATCACCGTACACC					
CAACCCGGATTGGACGTGTTGTGCACCATGCCCTGTAAGGGTAGTTGCCATGTGG					
V	G	P	K	T	C
S	N	T	W	Y	G
T	F	P	I	N	A
Y	T				
6550	6560	6570	6580	6590	6600
ACGGGCCCCCTGCACACCCTCCCCGGGCCAAACTATTCCAAGGCATTGTGGAGAGTGGCC					
TGCCCGGGGACGTGTGGAGGGGCCGCGTTGATAAGGTCCGTAACACCTCTCACCGG					
T	G	P	C	T	P
S	P	A	P	N	Y
A	S	K	A	L	W
R	V				

6610 6620 6630 6640 6650 6660  
 GCTGAGGAGTACGTGGAGGTACCGGGTGGGAGATTTCACTACGTGACGGGCATGACC  
 CGACTCCTCATGCACCTCCAGTGCGCCACCCCTCTAAAGTGATGCACTGCCCGTACTGG  
 A E E Y V E V T R V G D F H Y V T G M T  
  
 6670 6680 6690 6700 6710 6720  
 ACTGACAACGTGAAGTGTCCATGCCAGGTTCCGGCCCCCGAATTCTTCACGGAGGTGGAT  
 TGACTGTGCACTTCACAGGTACGGTCCAAGGCCGGGGCTTAAGAAGTGCTCCACCTA  
 T D N V K C P C Q V P A P E F F T E V D  
  
 6730 6740 6750 6760 6770 6780  
 GGAGTGGGTTGCACAGGTACGCTCCGGCGTGCAGACCTCTCCTACGGGAGGGAGGTGCGTA  
 CCTCACGCCAACGTGTCATGCAGGCCACGTCTGGAGAGGATGCCCTCCTACAGCAT  
 G V R L H R Y A P A C R P L L R E E V V  
  
 6790 6800 6810 6820 6830 6840  
 TTCCAGGTGGGCTCCACCAAGTACCTGGTCGGGTACAGCTCCCATGCGAGGCCAACCG  
 AAGGTCCAGCCCAGGGTGGTCATGGACCAGGCCAGTGTGAGGGTACGCTGGGCTTGGC  
 F Q V G L H Q Y L V G S Q L P C E P E P  
  
 6850 6860 6870 6880 6890 6900  
 GATGTAGCAGTGCTCACTTCATGCTCACTGACCCCTCCACATTACAGCAGAGACGGCT  
 CTACATCGTCACGAGTGAAGGTACGAGTGAETGGGAGGGTGTAAATGTCGTCTCTGCCGA  
 D V A V L T S M L T D P S H I T A E T A  
  
 6910 6920 6930 6940 6950 6960  
 AAGCGTAGGCTGGCAGGGGGTCTCCCCCTCCTGGCCAGCTCTCAGCTAGCCAGTTG  
 TTCGCATCCGACGGTCCCCAGAGGGGGAGGAACCGGTCGAGAAGTCGATCGGTCAAC  
 K R R L A R G S P P S L A S S S A S Q L  
  
 6970 6980 6990 7000 7010 7020  
 TCTGCGCTTCCTTGAAGGCAGATGCACTACCCATCATGACTCCCCGGACGCTGACCTC  
 AGACGGCGAAGGAACCTCCGCTGTACGTGATGGTAGTACTGAGGGGCTGCGACTGGAG  
 S A P S L K A T C T T H E D S P D A D L  
  
 7030 7040 7050 7060 7070 7080  
 ATTGAGGCCAACCTCTTGTGGCGCAAGAGATGGGCGGGAACATCACCCGGCTGGAGTCA  
 TAACCTGGTTGGAGAACACCGCCGTCTCACCCGCCCTGTAGTGGCGCACCTCAGT  
 I E A N L L W R Q E M G G N I T R V E S  
  
 7090 7100 7110 7120 7130 7140  
 GAGAATAAGGTGGTAATCCTGGACTCTTCGACCCGCTCGAGCGGAGGATGATGAGGGG  
 CTCTTATTCCACCATAGGACCTGAGAAAGCTGGCGAGGCTGCCCTACTACTCCCC  
 E N K V V I L D S F D P L R A E D D E G  
  
 7150 7160 7170 7180 7190 7200  
 GAAATATCCGTTCCGGCGGAGATCCTGCGAAATCCAGGAAATTCCCCCCAGCGCTGCC  
 CTTTATAGGCAAGGCCGCTCTAGGACGCCCTTAGGTCCCTTAAGGGGGTGCAGGG  
 E I S V P A E I L R K S R K F P P A L P

7210	7220	7230	7240	7250	7260
ATATGGGCGCCGCCGGATTACAACCCCTCCGCTGCTAGAGTCCTGGAAGGACCCGGACTAC					
TATACCCCGGGCGGCCTAATGTGGGAGGCCACCGATCTCAGGACCTTCCTGGGCTGATG					
I	W	A	P	P	D
Y	N	P	P	L	L
E	S	W	K	D	P
D	Y				
7270	7280	7290	7300	7310	7320
GTTCCCTCCGGTGGTACACGGGTGCCCGTGCACGCCACCAAGGCCCCTCCAATACCACCT					
CAAGGAGGCCACCATGTGCCAACGGCAACGGCGGTGGTCCGGGGAGGTATGGTGGGA					
V	P	P	V	V	H
G	C	P	L	P	P
T	K	A	P	P	I
A	P	P	I	P	P
7330	7340	7350	7360	7370	7380
CCACGGAGGAAGAGGACGGTTGTCCTGACAGAAATCCACCGTGCTTCTGCCCTGGCGGAG					
GGTGCCTCCTCTCCTGCCAACAGGACTGTCTTAGGTGGCACAGAAGACGGAACCGCCTC					
P	R	R	K	R	T
V	V	L	T	E	S
T	V	S	T	V	S
S	A	L	A	E	
7390	7400	7410	7420	7430	7440
CTCGCTACTAACGACCTTCGGCAGCTCCGGATCGTCGGCCATCGACAGCGGTACGGCGACC					
GAGCGATGATTCTGGAAGCCGTCGAGGCCTAGCAGCCGGTAGCTGTCGCCATGCCGTGG					
L	A	T	K	T	F
G	S	S	G	S	S
S	A	I	D	S	G
A	T	K	T	A	T
7450	7460	7470	7480	7490	7500
GCCCTCCTGACCAAGCCTCCGGTGACGGCAGAGAGAGTCGACGTTGAGTCGTTCTCC					
CGGGGAGGACTGGTCGGAGGCCACTGCCGTGTCCTCAGGCTGCAACTCAGCAAGAGG					
A	P	P	D	Q	A
S	G	D	G	D	R
E	S	R	E	S	D
S	F	S	V	E	S
7510	7520	7530	7540	7550	7560
TCCATGCCCCCCCTTGAGGGAGAGCCGGGGACCCCGATCTCAGCGACGGATCTGGTCC					
AGGTACGGGGGGAACTCCCTCTGGGCCCCCTGGGCTAGAGTCGCTGCCTAGAACCAAGG					
S	M	P	P	L	E
G	E	P	G	D	P
E	S	D	P	D	L
A	S	S	D	L	S
7570	7580	7590	7600	7610	7620
ACCGTGAGCGAGGGAGGCTAGTGAGGACGTCGCTGCTGTTGATGTCCTACACATGGACA					
TGGCACTCGCTCCTCCGATCACTCCTGCAGCAGACGACAAGCTACAGGATGTGTACCTGT					
T	V	S	E	E	A
S	E	D	V	V	C
E	A	S	C	C	S
A	S	M	S	S	Y
S	M	S	T	W	T
7630	7640	7650	7660	7670	7680
GGCGCCCTGATCACGCCATGCGCTGCGAGGAAGCAAGTTGCCCATCAACCCGTTGAGC					
CCGCGGGACTAGTGCGGTACGCGACGCCCTTCGTTCAACGGGTAGTTGGCAACTCG					
G	A	L	I	T	P
I	T	P	C	A	A
A	E	E	S	K	L
E	S	K	L	P	I
S	K	L	P	I	N
A	G	L			
7690	7700	7710	7720	7730	7740
AATTCTTGCTACGTACCAACACATGGCTATGCTACAAACATCCCGCAGCGCAGGGCTG					
TTAAGAAAACGATGCAGTGGTGTACAGATACTGATGTTGATGGGCGTCCGGAC					
N	S	L	L	R	H
H	N	M	V	Y	A
N	M	V	Y	A	T
M	V	Y	A	T	T
V	Y	A	T	T	S
Y	A	T	T	S	R
A	T	T	S	R	S
G	L				
7750	7760	7770	7780	7790	7800
CGGCAGAAGAAGGTACCTTGACAGACTGCAAGTCCTGGACGACCACTACCGGGACGTG					
GCCGTCTTCTTCCAGTGGAAACTGTCTGACGTTCAAGGACCTGCTGGTATGGCCCTGCAC					
R	Q	K	X	V	T
K	X	V	T	F	D
X	V	T	F	D	R
V	T	F	D	R	L
T	F	D	R	L	Q
F	D	R	L	Q	V
D	R	L	Q	V	L
R	L	Q	V	L	D
L	Q	V	L	D	D
Q	V	L	D	D	H
V	L	D	D	H	Y
L	D	D	H	Y	R
D	H	Y	R	D	V

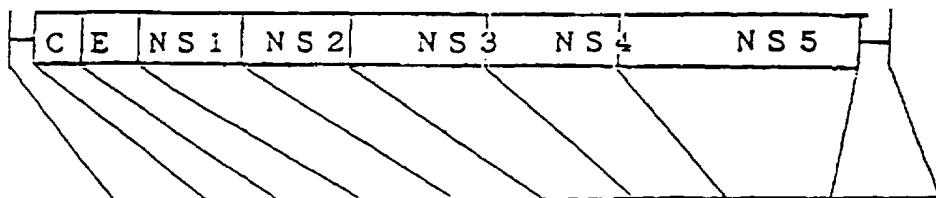
7810 7820 7830 7840 7850 7860  
 CTTAAGGAGATGAAGGCCAAGGGCGTCCACAGTTAAGGCTAAACTCTATCTGTAGAAGAA  
 GAATTCCCTACTTCCGCTTCGCAAGGTGTCAATTCCGATTGAAGATAGACATCTTCCTT  
 L K E M K A K A S T V K A K L L S V E E  
  
 7870 7880 7890 7900 7910 7920  
 GCCTGCAAACGTGACGCCACACATTGGCAAATCCAATTTGGCTACGGGGCGAAGGAC  
 CGGACGTTGACTGCAGGGGTGTAAGCCGGTTAGGTTAACCGATGCCCGCTTCCTG  
 A C K L T P P H S A K S K F G Y G A K D  
  
 7930 7940 7950 7960 7970 7980  
 GTCCGGAGCCTATCCAGCAGGGCGTTACCCACATCCGCTCCGTGTGGAAGGACCTGCTG  
 CAGGCCTCGGATAGGTGTCGTCCCAGCAATGGGTGTAGGCAGGGCACACCTCCTGGACGAC  
 V R S L S S R A V T H I R S V W X D L L  
  
 7990 8000 8010 8020 8030 8040  
 GAAGACACTGAAACACCAATTAGCACTACCACATGGCAAAAATGAGGTTTCTGTGTC  
 CTTCTGTGACTTGTGGTTATCGTGATGGTAGTACCGTTTTACTCCAAAAGACACAG  
 E D T E T P I S T T I M A K N E V F C V  
  
 8050 8060 8070 8080 8090 8100  
 CAACCAGAGAAGGGAGGCCGCAAGCCAGCTCGCCTTATCGTGTTCCAGATCTGGGAGTT  
 GTTGGTCTCTCCCTCCGGCTTCGGTCAGCGGAATAGCACACAAGGGCTAGACCCCTCAA  
 Q P E K G G R K P A R L I V F P D L G V  
  
 8110 8120 8130 8140 8150 8160  
 CGTGTATGCGAGAAGATGGCCCTTATGACGTGGTCTCCACCCCTCCTCAGGCCGTGATG  
 GCACATACGCTCTTCTACCGGGAAATACTGCACCAGAGGTGGAAAGGAGTCGGCACTAC  
 R V C E K X A L Y D V V S T L P Q A V M  
  
 8170 8180 8190 8200 8210 8220  
 GGCTCCTCATACGGATTCCAGTACTCTCCTAAGCAGCGGGTCGAGTTCTGGTGAATACC  
 CCGAGGAGTATGCCCTAAGGTATGAGAGGATTGTCGCCAGCTCAAGGACCACTTATGG  
 G S S Y G F Q Y S P K Q R V E F L V N T  
  
 8230 8240 8250 8260 8270 8280  
 TGGAAATCAAAGAAATGCCCATGGGCTCTCATATGACACCCGCTGTTTGTACTCAACG  
 ACCTTTAGTTCTTACGGGTACCCGAAGAGTATACTGTGGCGACAAAAGTGTGAGTGC  
 W K S K K C P M G F S Y D T R C F D S T  
  
 8290 8300 8310 8320 8330 8340  
 GTCACTGAGAATGACATCCGTGTTGAGGAGTCATTTACCAATGTTGTGACTTGGCCCC  
 CAGTGACTCTTACTGTAGGCACAACTCCTCAGTTAACACTGAACCGGGGG  
 V T E N D I R V E E S I Y Q C C D L A P  
  
 8350 8360 8370 8380 8390 8400  
 GAAGCCAAACTGGCCATAAAGTCGCTCACAGAGCGGCTATATCAGGGGGTCCCCTGACT  
 CTTGGTTTGACCGGTATTCAGCGAGTGTCTGCCAGATATAGCCCCCAGGGGACTGA  
 E A K L A I K S L T E R L Y I G G P L T

8410	8420	8430	8440	8450	8460
AATTCAAAAGGGCAGAACTGCGGTTACCGCCGGTGCGCGAGCGGCCTGCTGACGACT					
TTAACGTTTCCCCTGACGCCAATGGCGGCCACGGCGCTCGCCGCACGACTGCTGA					
N	S	K	G	Q	N
S	K	G	Q	N	C
G	Y	R	R	C	R
A	S	G	V	L	T
T	T				
8470	8480	8490	8500	8510	8520
AGCTGCGGTAATAACCCCTCACATGTTACCTGAAAGCCACTGCGGCCCTGTCGAGCTGCGAAG					
TCGACGCCATTATGGGAGTGACGACTTACGACTGGACTTCGGTGACGCCGGACAGCTCGACGCTTC					
S	C	G	N	T	L
C	G	N	T	L	T
T	C	Y	L	K	A
C	A	T	A	A	C
R	A	A	K		
8530	8540	8550	8560	8570	8580
CTCCGGGACTGCA CGATGCTCGTGAACGGAGACGACCTTGTGTTATCTGTGAAAGCGCG					
GAGGCCCTGACGTGCTACGAGCACTTGCCTCTGCTGGAACAGCAATAGACACTTCGCGC					
L	R	D	C	T	M
L	V	N	G	D	D
V	I	C	E	S	A
8590	8600	8610	8620	8630	8640
GGAACCCAAGAGGATGCGGCGAGCCTACGAGTCTTCACGGAGGCTATGACTAGGTACTCT					
CCTTGGGTTCTCCTACGCCGCTCGGATGCTCAGAAGTGCCTCCGATACTGATCCATGAGA					
G	T	Q	E	D	A
A	S	L	R	V	F
M	T	R	Y	S	
8650	8660	8670	8680	8690	8700
GCCCCCCCTGGGACCCGCCTCAACCGGAATACGACTTGGAGTTGATAACATCATGTTCC					
CGGGGGGGACCCCTGGCGGAGTTGGCCTTATGCTGAACCTCAACTATTGTAGTACAAGG					
A	P	P	G	D	P
Q	P	E	Y	D	L
E	A	M	T	R	Y
L	I	T	S	C	S
8710	8720	8730	8740	8750	8760
TCCAATGTGTCGGTCGCACACGATGCATCTGGTAAAAGGGTGTACTACCTCACCCGTGAC					
AGGTTACACAGCCAGCCTGTGCTACGTAGACCATTTCACATGATGGAGTGGCACTG					
S	N	V	S	V	A
H	D	A	S	G	K
R	V	Y	Y	L	T
T	R	D			
8770	8780	8790	8800	8810	8820
CCTACCACCCCCCTTGCACGGGCTGCGTGGGAGACAGCTAGACACACTCCAGTCACACTCC					
GGATGGTGGGGGAACGTGCCGACGACCCCTCTGTCATCTGTGAGGTCAAGTGGAGG					
P	T	T	P	L	A
A	R	A	W	E	T
R	H	T	P	V	N
8830	8840	8850	8860	8870	8880
TGGCTAGGCAACATCATCATGTATGCGCCCACCTTATGGGCAAGGATGATTCTGATGACT					
ACCGATCCGTTGAGTAGTACATACGCGGGTGGAAATACCGTTCTACTAAGACTACTGA					
W	L	G	N	I	I
M	Y	A	P	T	L
W	A	R	M	I	L
M	T				
8890	8900	8910	8920	8930	8940
CATTCTCTCCATCCTTCTAGCTCAGGAGCAACTGAAAAACCTAGATTGTCAGATC					
GTAAAGAAGAGGTAGGAAGATCGAGTCCTCGTTGAACCTTTGGGATCTAACAGTCTAG					
H	F	F	S	I	L
L	A	Q	E	Q	L
E	K	T	L	D	C
Q	I				
8950	8960	8970	8980	8990	9000
TACGGGGCTGTTACTCCATTGAAACCACCTGATCTACCTCAGATCATTGAGCGACTCCAT					
ATGCCCGGACAATGAGGTAACCTGGTGAACTAGATGGAGTCTAGTAACTCGCTGAGGTA					
Y	G	A	C	Y	S
S	I	E	P	L	D
I	E	R	L	H	

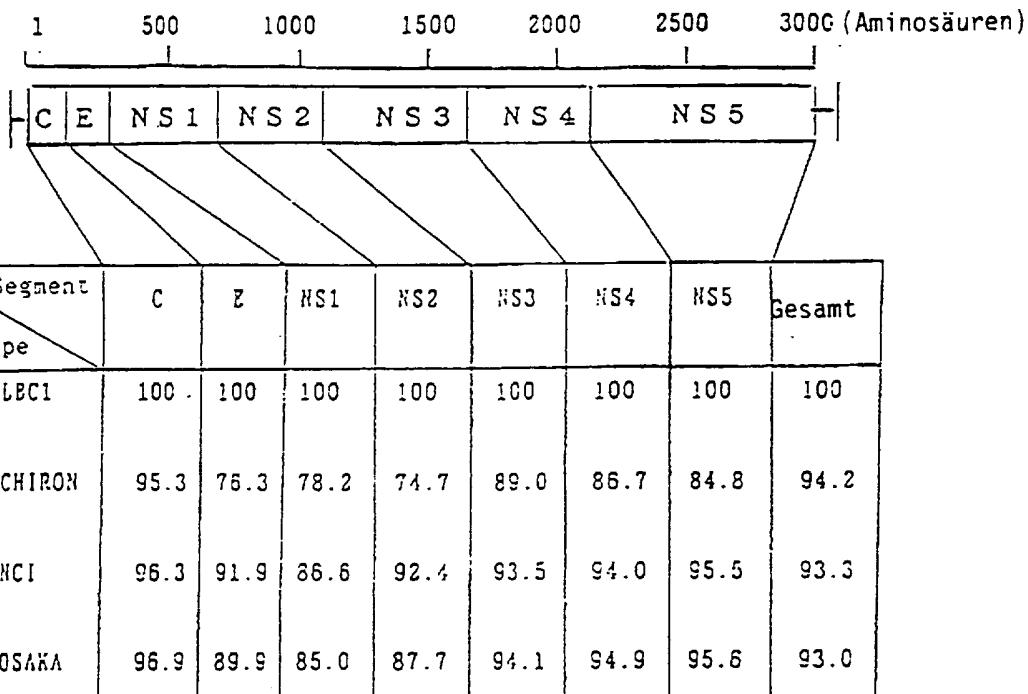
9010	9020	9030	9040	9050	9060
GGTCTTAGCGCATTTCACTCCATAGTTACTCTCCAGGCAGATCAATAGGGTGGCTCA					
CCAGAACATCGCGTAAAAGTGAGGTATCAATGAGAGGTCCGCTCTAGTTATCCCACCGAAGT					
G L S A F S L H S Y S P G E I N R V A S					
9070	9080	9090	9100	9110	9120
TGCCTCAGAAAACCTGGGGTACCAACCCTTGCAGCCTGGAGACATCGGGCCAGAAAGTGTG					
ACGGAGTCTTTGAACCCCATGGTGGGACGCTCGGACCTCTGTAGCCGGTCTCACAG					
C L R K L G V P P L R A W R H R A R S V					
9130	9140	9150	9160	9170	9180
CGCGCTAACGCTACTGTCCCAGGGGGAGGGCCACTTGTGGCAAGTACCTCTCAAC					
GCGCGATTGATGACAGGGTCCCCCCTCCCGCGGTGAACACCGTTATGGAGAAGTTG					
R A K L L S Q G G R A A T C G K Y L F N					
9190	9200	9210	9220	9230	9240
TGGGCGGTGAGGACCAAGCTCAAACACTCACTCCAATCCCAGCCGGTCCCGGTGGACTTG					
ACCCGCCACTCCTGGTTGAGTTGAGTTAGGGTCGGCCAGGGCCAACCTGAAC					
W A V R T K L K L T P I P A A S R L D L					
9250	9260	9270	9280	9290	9300
TCCGGCTGGTTCGTTGCTGGTTACAGCGGGGAGACATATATCACAGCCGTCTCGTGCC					
AGGCCGACCAAGCAACGACCAATGTCGCCCCCTCTGTATATAGTGTGGACAGAGCACGG					
S G W F V A G Y S G G D I Y H S L S R A					
9310	9320	9330	9340	9350	9360
CGACCCCGCTGGTTCATGTTGTGCCTACTCCTACTTCCGTGGGGTAGGCATCTACCTG					
GCTGGGGCGACCAAGTACAACACGGATGAGGATGAAAGGCACCCCCATCCGTAGATGGAC					
R P R W F M L C L L L S V G V G I Y L					
9370	9380	9390	9400	9410	9420
CTCCCCAACCGATGAATGGGGAGCTAAACACTCCAGGCCAATAGGCCGTTCTCTTTTT					
GAGGGGTTGGCTACTTACCCCTCGATTGTGAGGTCCGGTTATCCGGCAAAGAGAAAAAA					
L P N R					
9430	9440	9450	9460	9470	
TT					
AA					

Name des cDNA Klons	Position in der KHCV-LBC1 (Nucleotidnummer)
KHCV 426	von 301 bis 726
KHCV 652	von 3928 bis 4563
KHCV 403	von 6649 bis 7050
KHCV 752	von 3208 bis 3960
KHCV 675	von 4264 bis 4938
KHCV 240	von 616 bis 855
KHCV 513	von 814 bis 1326
KHCV 810	von 1201 bis 2016
KHCV 798	von 1945 bis 2742
KHCV 932	von 6892 bis 7823
KHCV 496	von 7642 bis 8136
KHCV 847	von 7968 bis 8814
KHCV 494	von 8722 bis 9216
KHCV 570	von 2686 bis 3300
KHCV 1774	von 4904 bis 6677
KHCV 266	von 9160 bis 9472
KHCV 366	von 1 bis 366

1 1000 2000 3000 4000 5000 6000 7000 8000 9000(bp)



Segment Subtype	5'-Ende C	Z	NS1	NS2	NS3	NS4	NS5	3'-Ende	Gesamt
KHCV-LBC1	100	100	100	100	100	100	100	100	100
HCP-T-CHIRON	93.2	90.4	73.9	72.9	73.0	79.1	78.3	83.3	78.3
JHCV-HCI	99.4	96.0	90.4	85.5	88.7	90.6	90.0	93.3	90.9
JHCV-OSAKA	100	96.3	89.1	85.0	86.3	90.3	90.5	93.1	90.9



( % )

KHCV366  
HCPT-CHIRON  
JHCV-NCI

1    9GCCAGCCCCCgATTGGGGGGCGACACTCCACCATAGATCACTCCCCCTGTGACCGAACTACT  
1     GCCAGCCCCCtgaTTGGGGGGCGACACTCCACCATgaaATCACTCCCCCTGTGAGGAACACTACT  
1     TTGGGGGGCGACACTCCACCATAGATCACTCCCCCTGTGACCGAACTACT

KHCV366  
HCPT-CHIRON  
JHCV-NCI

61    GTCTTCACCCAGAAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTGCGAGCCTCCAGGA  
60    GTCTTCACCCAGAAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTGCGAGCCTCCAGGA  
48    GTCTTCACCCAGAAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTtGTGAGCCTCCAGGA

KHCV366  
HCPT-CHIRON  
JHCV-NCI

121    CCCCCCCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGGGAACCCGGTGAGTAACCCGGAAATTGCCA  
120    CCCCCCCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGGGAACCCGGTGAGTAACCCGGAAATTGCCA  
108    CCCCCCCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGGGAACCCGGTGAGTAACCCGGAAATTGCCA

KHCV366  
HCPT-CHIRON  
JHCV-NCI

121    GGACGACCGGGTCCCTTCTTGGATCAACCCGCTCAATGGCTGGAGATTGGCCGTGCCCC  
120    GGACGACCGGGTCCCTTCTTGGATCAACCCGCTCAATGGCTGGAGATTGGCCGTGCCCC  
162    GGACGACCGGGTCCCTTCTTGGATCAACCGCTCAATGGCTGGAGATTGGCCGTGCCCC

KHCV366  
HCPT-CHIRON  
JHCV-NCI

241    CGCGAGACTGCTAGCCGACTAGTGTGGGTGGCGAAAAGCCCTTGTGCTACTGCCTGATAG  
240    CGCaAGACTGCTAGCCGACTAGTGTGGGTGGCGAAAAGCCCTTGTGCTACTGCCTGATAG  
228    CGCGAGACTGCTAGCCGACTAGTGTGGGTGGCGAAAAGCCCTTGTGCTACTGCCTGATAG

KHCV366  
HCPT-CHIRON  
JHCV-NCI

301    CCTGCTTGGAGTGCCTCCGGGGAGGTCTCGTAGACCGTGACCATGAGCACGAAATCCTAAA  
300    CCTGCTTGGAGTGCCTCCGGGGAGGTCTCGTAGACCGTGACCATGAGCACGAAATCCTAAA  
288    CCTGCTTGGAGTGCCTCCGGGGAGGTCTCGTAGACCGTGACCATGAGCACGAAATCCTAAA

10            20            30            40            50            60  
CTCTTTACCTGTCAACCACACTACAAAGTGTTCCTCGCTAGGCTCATATGGTGGTTACAG  
LeuPheThrLeuSerProHisTyrLysValPheLeuAlaArgLeuIleTrpTrpLeuGln

70            80            90            100          110          120  
TATTTTATCACCAAGGGCCGAAGCGCACCTGCAAGTGTGGATCCCCCCCCCTAACGTTCGG  
TyrPheIleThrArgAlaGluAlaHisLeuGlnValTrpIleProProLeuAsnValArg

130          140          150          160          170          180  
GGGGGCCGCGATGCCATCATCCTCCTCACGTGTGCGGTCCACTCAGAGCTGATTTTGAC  
GlyGlyArgAspAlaIleIleLeuLeuThrCysAlaValHisSerGluLeuIlePheAsp

190          200          210          220          230          240  
ATCACCAAGATCTTGCTGCCATACTTGGTCCGCTCATGGTACTCCAGGCTGGCCTAAC  
IleThrLysIleLeuLeuAlaIleLeuGlyProLeuMETValLeuGlnAlaGlyLeuThr

250          260          270  
AGAGTGCCGTACTTTGTCAGCGCTCAAGGGCTCATCC  
ArgValProTyrPheValSerAlaGlnGlyLeuIle

Fig. 7

10            20            30            40            50            60  
 CTCTTGACCTTGTCAACCATACTATAAAGTGTTCCTCGCTAGGGCTCATATGGTGGTTGCAA  
 LeuLeuThrLeuSerProTyrTyrLysValPheLeuAlaArgLeuIleTrpTrpLeuGln

70            80            90            100          110          120  
 TATTTCATCACCAAGAGCCGAGGCACACTTGCAAGTGTGGATCCCCCTCTAACGTCCGG  
 TyrPheIleThrArgAlaGluAlaHisLeuGlnValTrpIleProProLeuAsnValArg

130          140          150          160          170          180  
 GGAGGCCGTGATGCAATCATCCTCCTGGCGTGTGCGGTCCACCCAGAGCCGATCTTGAC  
 GlyGlyArgAspAlaIleIleLeuLeuAlaCysAlaValHisProGluProIlePheAsp

190          200          210          220          230          240  
 ATCACAAAATATTGCTCGCCATATTGGCCCCGCTCATGGTGCTCCAGGCCGGCATAACT  
 IleThrLysTyrLeuLeuAlaIlePheGlyProLeuMETValLeuGlnAlaGlyIleThr

250          260          270          280          290          300  
 AGAGTGCCGTACTTCTGGCGCGCACAAAGGGCTCATTGTGCATGCATGTTGGCGCGGAAA  
 ArgValProTyrPheTrpArgAlaGlnGlyLeuIleArgAlaCysMETLeuAlaArgLys

310  
 GTCGCTGGGGGTCAATTAC  
 ValAlaGlyGlyHisTyr

Fig. 8

10            20            30            40            50            60

CTCTTGACCTTGTCAACCACACTATAAAGTGTTCCTGCCAGGTTCATATGGTGGCTACAA  
LeuLeuThrLeuSerProHisTyrLysValPheLeuAlaArgPheIleTrpTrpLeuGln

70            80            90            100          110          120

TATCTCATCACCAAGAACCGAACGCATCTGCAAGTGTGGGTCCCCCCTCTAACGTTCGA  
TyrLeuIleThrArgThrGluAlaHisLeuGlnValTrpValProProLeuAsnValArg

130          140          150          160          170          180

GGAGGCCGTGATGCCGTCATCCTCCTCACGTGCGCAGTCTACCCAGAGCTAACCTTGAC  
GlyGlyArgAspAlaValIleLeuLeuThrCysAlaValTyrProGluLeuIlePheAsp

190          200          210          220          230          240

ATCACCAAACCTCCTGCTTGCCACACTCGGTCCGCTCATGGTGCTCCAGGCTGGCTTAATT  
IleThrLysLeuLeuLeuAlaThrLeuGlyProLeuMETValLeuGlnAlaGlyLeuIle

250          260          270          280          290          300

AGAGTGCCGTACTTCGTACGCTCAGGGCTCATTGTGCATGCATGTTGGTGC GGAAAGTT  
ArgValProTyrPheValArgSerGlyLeuIleArgAlaCysMETLeuValArgLysVal

310

GCTGGGGGTCAATTAT  
AlaGlyGlyHisTyr

10            20            30            40            50            60

CTCTTGACCCCTGTCACCACACTATAAAGTGTTCCTCGCTAGGGCTCATGTGGTGGTTACAA  
 LeuLeuThrLeuSerProHisTyrLysValPheLeuAlaArgLeuMETTrpTrpLeuGln

70            80            90            100          110          120

TACTTCCTCACCAAGAGCCGAAGCGCAGTTGCAAGTGTGGGTCCCCCTCTCAACGTTCGA  
 TyrPheLeuThrArgAlaGluAlaHisLeuGlnValTrpValProSerLeuAsnValArg

130          140          150          160          170          180

GGAGGCCCGATGCCATCATCCTCCTCACGTGCGCAGTCTACCCAGAGCTAACATTGGAC  
 GlyGlyArgAspAlaIleIleLeuLeuThrCysAlaValTyrProGluLeuIlePheAsp

190          200          210          220          230          240

ATCACCAAACCTTGCTTGCCACACTCGGCCCGCTCATGGTGCTCCAGGCTGGCTTAACCT  
 IleThrLysLeuLeuLeuAlaThrLeuGlyProLeuMETValLeuGlnAlaGlyLeuThr

250          260          270          280          290          300

AGAGTGCCGTACTTGCTGCCCGCCCAGGGGCTCATTGCGTGCATGTTGGTGCAGGAAA  
 ArgValProTyrPheValArgAlaGlnGlyLeuIleArgAlaCysMETLeuValArgLys

310

GTTGTGGGGGGGCCATTAT  
 ValValGlyGlyHisTyr

10	20	30	40	50	60
CTCTTGACCTTGTCAACCACACTATAAAGTGTTCCTGCCAGGTTCATATGGTGGCTACAA					
LeuLeuThrLeuSerProHisTyrLysValPheLeuAlaArgPheIleTrpTrpLeuGln					
70	80	90	100	110	120
TATCTCATCACCGAACCGAACGCATCTGCAAGTGTGGGTCCCCCTCTAACGTTGG					
TyrLeuIleThrArgThrGluAlaHisLeuGlnValTrpValProProLeuAsnValArg					
130	140	150	160	170	180
GGGGGTCGCGATGCCATCATCCTCCTCGCGTGTGCGGTCCACCCAGAGCTGATCTTGAC					
GlyGlyArgAspAlaIleIleLeuLeuAlaCysAlaValHisProGluLeuIlePheAsp					
190	200	210	220	230	240
ATCACCAAACCTTTGCTCGCCATACTCGGTCCGCTCATGGTGCTCCAGGCTAGCATAATT					
IleThrLysLeuLeuLeuAlaIleLeuGlyProLeuMETValLeuGlnAlaSerIleIle					
250	260	270	280	290	300
CGAGTGCCGTACTCCGTGCGCGCTCAAGGCCTCATTGTCATGCATGTTGGTGC GGAAA					
ArgValProTyrSerValArgAlaGlnGlyLeuIleArgAlaCysMETLeuValArgLys					
310					
GCCGCCGGGGTCATTAT					
AlaAlaGlyGlyHisTyr					

10            20            30            40            50            60  
 CTCTTGACCTTGTCAACCATACTATAAGGTGCTCCTCGCTAGGCTCATATGGTGGTTGCAA  
 LeuLeuThrLeuSerProTyrTyrLysValLeuLeuAlaArgLeuIleTrpTrpLeuGln

70            80            90            100          110          120  
 TATTTCATCACCAGAGGCCGAGGCGCAGTTGCAAGTGTGGCTCCCCCCCCTAACGTCGG  
 TyrPheIleThrArgAlaGluAlaHisLeuGlnValTrpAlaProProLeuAsnValArg

130          140          150          160          170          180  
 GGGGGCCGCGATGCCATCATCCTCCTCATGTGTGTAGTTCACCCGGAGCTAATCTTGAC  
 GlyGlyArgAspAlaIleIleLeuLeuMETCysValValHisProGluLeuIlePheAsp

190          200          210          220          230          240  
 ATCACAAAAATCCTGCTGCCGTGCTCGGTCCGCTCACGGTGCTCCAGGCTGGCATAACC  
 IleThrLysIleLeuLeuAlaValLeuGlyProLeuThrValLeuGlnAlaGlyIleThr

250          260          270          280          290          300  
 CGAGTGCCGTACTTGTGCGCGCTCAATGGCTATTCTGCGTGCATGTTGGTGCAGAAC  
 ArgValProTyrPheValArgAlaGlnTrpLeuIleArgAlaCysMETLeuValArgAsn

310  
 ATCGCTGGGGGTCAATTAT  
 IleAlaGlyGlyHisTyr

10            20            30            40            50            60

CTCTTGACCTTGTCAACCACACTATAAAGTGTTCCTGCCAGGTTCATATGGTGGCTACAA  
 LeuLeuThrLeuSerProHisTyrLysValPheLeuAlaArgPheIleTrpTrpLeuGln

70            80            90            100          110          120

TATCTCATCACAGAACCGAAGCGCATCTGCAAGTGTGGTCCCCCTCTAACGTTCGG  
 TyrLeuIleThrArgThrGluAlaHisLeuGlnValTrpValProProLeuAsnValArg

130          140          150          160          170          180

GGGGGTCGCGATGCCATCATCCTCCTCACATGCGTGGTCCACCCAGAGCTAACATTGAC  
 GlyGlyArgAspAlaIleIleLeuLeuThrCysValValHisProGluLeuIlePheAsp

190          200          210          220          230          240

ATCACCAAACCTTTGCTCGCCATACTCGGTCCGCTCATGGTGCTCCAGGCTAGCATAATT  
 IleThrLysLeuLeuLeuAlaIleLeuGlyProLeuMETValLeuGlnAlaSerIleIle

250          260          270          280          290          300

CGAGTGCCGTACTTTGTGCGCGCTCAAGGCCTCATTCGTGCATGTATGTTGGTGCAGAAA  
 ArgValProTyrPheValArgAlaGlnGlyLeuIleArgAlaCysMETLeuValArgLys

310

GTTGCTGGGGGTCAATTAT  
 ValAlaGlyGlyHisTyr

Fig. 13

10                  20                  30                  40                  50                  60

CTCTTGACTCTGTCGCCACACTATAAAGTGTTCCTCGCTAGCCTCATGTGGTGGTTACAA  
LeuLeuThrLeuSerProHisTyrLysValPheLeuAlaSerLeuMETTrpTrpLeuGln

70                  80                  90                  100                  110                  120

TACTTCCTCACCAAGAGGCCAACGCGACTTGCAAGTGTGGTCCCCTCTCTAACGTCGA  
TyrPheLeuThrArgAlaGluAlaHisLeuGlnValTrpValProSerLeuAsnValArg

130                  140                  150                  160                  170                  180

GGAGGCCGCGATGCCATCATCCTCCTCACGTGCGCAGTCTACCCAGAGCTAATCTTAGAC  
GlyGlyArgAspAlaIleIleLeuLeuThrCysAlaValTyrProGluLeuIleLeuAsp

190                  200                  210                  220                  230                  240

ATCACCAAACCTTTGCTCGCCATACTCGGTCCGCTCATGGTGCTCCAGGCTAGCATAATT  
IleThrLysLeuLeuLeuAlaIleLeuGlyProLeuMETValLeuGlnAlaSerIleIle

250                  260                  270                  280                  290                  300

CGAGTGCCTACTTCGTACCGCCTCAAGGCCTCATTCTGCATGCATGTTGGTGCCTGGAAA  
ArgValProTyrPheValArgAlaGlnGlyLeuIleArgAlaCysMETLeuValArgLys

310

GCCGCCGGGGGTCAATTAT  
AlaAlaGlyGlyHisTyr

10                  20                  30                  40                  50                  60

CTCTTGACCCTGTCACCGCACTATAAAGTGTTCCTCGCTAGGCTCACGTGGTGGTTACAA  
LeuLeuThrLeuSerProHisTyrLysValPheLeuAlaArgLeuThrTrpTrpLeuGln

70                  80                  90                  100                  110                  120

TACTTCCTCACCAAGAGCCGAAGCGCACTTGCAAGTGTGGTCCCCTCTCTAACGTTCGA  
TyrPheLeuThrArgAlaGluAlaHisLeuGlnValTrpValProSerLeuAsnValArg

130                  140                  150                  160                  170                  180

GGAGGCCGCGATGCCATCATCCTCCTCACGTGCGCAGTCTACCCAGAGCTGATCTTGAC  
GlyGlyArgAspAlaIleIleLeuLeuThrCysAlaValTyrProGluLeuIlePheAsp

190                  200                  210                  220                  230                  240

ATCACCAAACCTTGCTTGCCACACTCGGCCCGCTCATGGTGCCTCAGGCTGGCTTA  
IleThrLysLeuLeuLeuAlaThrLeuGlyProLeuMETValLeuGlnAlaGlyLeuThr

250                  260                  270                  280                  290                  300

AGAGTGCCTACTTGTGCGCGCCAGGGGCTCATTGCGTGCATGTTGGTGCAGAAA  
ArgValProTyrPheValArgAlaGlnGlyLeuIleArgAlaCysMETLeuValArgLys

310

GTTGCTGGGGGCCATTAT  
ValAlaGlyGlyHisTyr

10                  20                  30                  40                  50                  60  
 CTCTTGACCTTGTCAACCATACTATAAAGTGTTCCTCGCTAGGCTCATATGGTGGTTGCAA  
 LeuLeuThrLeuSerProTyrTyrLysValPheLeuAlaArgLeuIleTrpTrpLeuGln

70                  80                  90                  100                  110                  120  
 TATTTTATCACCAAGAGCCGAAGCGCACTTGCAAGTGTGGTCCCCCTCTAACGTTCGA  
 TyrPheIleThrArgAlaGluAlaHisLeuGlnValTrpValProProLeuAsnValArg

130                  140                  150                  160                  170                  180  
 GGAGGCCGTGATGCTATCATCCTCCTCACGTGCGCAGTCTACCCAGAGCTAATCTTGAC  
 GlyGlyArgAspAlaIleIleLeuLeuThrCysAlaValTyrProGluLeuIlePheAsp

190                  200                  210                  220                  230                  240  
 ATCACCAAACCTTGCTTGCCATACTCGGTCCGCTCATGGTGCTCCAGGCTAGCATAATT  
 IleThrLysLeuLeuLeuAlaIleLeuGlyProLeuMETValLeuGlnAlaSerIleIle

250                  260                  270                  280                  290                  300  
 CGAGTGCCTACTCGTACCGCGCTCAAGGCCTCATTGCGATGCATGTCATGTTGGTGCAGAAA  
 ArgValProTyrPheValArgAlaGlnGlyLeuIleArgAlaCysMETLeuValArgLys

310  
 GCCGCCGGGTCAATTAT  
 AlaAlaGlyValAsnTyr

10                  20                  30                  40                  50                  60

CTCTTTACCCCTGTCAACCACACTGC<sub>A</sub>AAAGTGTTCTCGCTAGGCTCATATGGTGGTTACAG  
LeuPheThrLeuSerProHisCysLysValPheLeuAlaArgLeuIleTrpTrpLeuGln

70                  80                  90                  100                  110                  120

TATTTTATCACCA<sub>G</sub>GGGCCGAAGCGCACCTGCAAGTGTGGATCCCCCCCCTAACGTTCGG  
TyrPheIleThrArgAlaGluAlaHisLeuGlnValTrpIleProProLeuAsnValArg

130                  140                  150                  160                  170                  180

GGGGGCCGTGATGCCATCATCCTCCTCGCATGTGCGGTCCACCCAGAGCTGATCTTCGAC  
GlyGlyArgAspAlaIleIleLeuLeuAlaCysAlaValHisProGluLeuIlePheAsp

190                  200                  210                  220                  230                  240

ATCACCAA<sub>C</sub>ACTCTTGCTCGCCATACTCGGTCCGCTCATGGTGCTCCAGGCTAGCATAATT  
IleThrLysLeuLeuLeuAlaIleLeuGlyProLeuMETValLeuGlnAlaSerIleIle

250                  260                  270                  280                  290                  300

CGAGTGCCGTACTTGTA<sub>C</sub>CGCGCTCAAGGCCTCATT<sub>T</sub>CGTCATGCATGTTGGTGC<sub>G</sub>GGAAA  
ArgValProTyrLeuTyrArgAlaGlnGlyLeuIleArgAlaCysMETLeuValArgLys

310

GCCGCCGGGGTCATTAT  
AlaAlaGlyGlyHisTyr

Fig. 17

10                  20                  30                  40                  50                  60

CTCTTTAACCTGTCACCACACTACAAAGTGTTCCCTCGCTAGGCTCATATGGTGGTTACAG  
LeuPheAsnLeuSerProHisTyrLysValPheLeuAlaArgLeuIleTrpTrpLeuGln

70                  80                  90                  100                  110                  120

TATTTTATCACCAAGGGGCCGAAGCGCACCTGCAAGTGTGGATCCCCCCCCCTAACACGTTCAAG  
TyrPheIleThrArgAlaGluAlaHisLeuGlnValTrpIleProProLeuAsnValGln

130                  140                  150                  160                  170                  180

GGGGGCCGTGATGCCATCATCCTCCTCGCATGTGCAGGTCCACCCAGAGCTGATTTGAC  
GlyGlyArgAspAlaIleIleLeuLeuAlaCysAlaValHisProGluLeuIlePheAsp

190                  200                  210                  220                  230                  240

ATCACCAAACCTTGCTCGCCATACTCGGTCCGCTCATGGTGCCTCAGGCTAGCATAATT  
IleThrLysLeuLeuLeuAlaIleLeuGlyProLeuMETValLeuGlnAlaSerIleIle

250                  260                  270                  280                  290                  300

CGAGTGCCGTACTTCGTACCGCCTCAAGGCCTCATTCGTGCATGCATGTTGGTGCAGGAAA  
ArgValProTyrPheValArgAlaGlnGlyLeuIleArgAlaCysMETLeuValArgLys

310

GCCGCCGGGGTCATTAT  
AlaAlaGlyGlyHisTyr

10	20	30	40	50	60
CTCTTGACCTTGTCAACCACACTATAAAGTGTTCCTTGCCAGGGTTCGTATGGTGGCTACAA					
LeuLeuThrLeuSerProHisTyrLysValPheLeuAlaArgPheValTrpTrpLeuGln					
70	80	90	100	110	120
TATCTCATCACCAAGAACCGAAGCGCATCTGCAAGTGTGGGTCCCCCTCTCAACGTTCGG					
TyrLeuIleThrArgThrGluAlaHisLeuGlnValTrpValProProLeuAsnValArg					
130	140	150	160	170	180
GGGGGTCGGATGCCATCACCCCTCCTCACATGCGTGGTCCACCCAGAGCTAATCTTCGAC					
GlyGlyArgAspAlaIleThrLeuLeuThrCysValValHisProGluLeuIlePheAsp					
190	200	210	220	230	240
ATCACAAAATATTGCTCGCCATATTGGCCCGCTCATGGTGCTCCAGGCCGGCATAACT					
IleThrLysTyrLeuLeuAlaIlePheGlyProLeuMETValLeuGlnAlaGlyIleThr					
250	260	270	280	290	300
AGAGTGCCTACTTCGTGCGCGCACAAAGGGCTATTGCGCATGCATGTTGGTGCGGAAA					
ArgValProTyrPheValArgAlaGlnGlyLeuIleArgAlaCysMETLeuValArgLys					
310					
GTTGCTGGGGGCCATTAT					
ValAlaGlyGlyHisTyr					

10            20            30            40            50            60

CCGTGTTGAGGAGTCAATTACCAATGTTGTGACTTGCCCCCGAACGCCAACTGGCCAT  
 ArgValGluGluSerIleTyrGlnCysCysAspLeuAlaProGluAlaLysLeuAlaIle

70            80            90            100          110          120

AAAGTCGCCAACAGAGCGGCTCTATATCGGGGGTCCCCTGACTAATTCAAAAGGGCAGAA  
 LysSerProThrGluArgLeuTyrIleGlyGlyProLeuThrAsnSerLysGlyGlnAsn

130          140          150          160          170          180

CTGCGGTTACTGCCGGTGCCCGCGAGCCTGCTGACGACTAGCTGCGGTAATACCCTCAC  
 CysGlyTyrCysArgCysArgAlaSerLeuLeuThrThrSerCysGlyAsnThrLeuThr

190          200          210          220          230          240

ATGTCACCTGAAAGCCACTGCGGCCTGTCGAGCTGCGAAGCTCCAGGACTGCACGATGCT  
 CysHisLeuLysAlaThrAlaAlaCysArgAlaAlaLysLeuGlnAspCysThrMETLeu

250          260          270          280          290          300

CGTGAACGGAGACGACCTTGTGTTATCTGTGAAAGCGCGGGACCCAGGAGGACGCGGC  
 ValAsnGlyAspAspLeuValValIleCysGluSerAlaGlyThrGlnGluAspAlaAla

310

GAGCCTACGAGTC  
 SerLeuArgVal

10	20	30	40	50	60
CCGTGTTGAGGAGTCAATTACCAATGTTGTGACTTGCCCCGAAGCCAACTGGCCAT					
ArgValGluGluSerIleTyrGlnCysCysAspLeuAlaProGluAlaLysLeuAlaIle					
70	80	90	100	110	120
AAAGTCGCCAACAGAGCGGCTCTATATCGGGGGTCCCCTGACTAATTCAAAAGGGCAGAA					
LysSerProThrGluArgLeuTyrIleGlyGlyProLeuThrAsnSerLysGlyGlnAsn					
130	140	150	160	170	180
CTGCGGTTACTGCCGGTGCCGCGCGAGCCTGCTGACGACTAGCTGCCTTAATACCCTCAC					
CysGlyTyrCysArgCysArgAlaSerLeuLeuThrThrSerCysGlyAsnThrLeuThr					
190	200	210	220	230	240
ATGTCACCTGAAAGCCACTGCGGCCTGTCGAGCTGCGAAGCTCCAGGACTGCACGATGCT					
CysHisLeuLysAlaThrAlaAlaCysArgAlaAlaLysLeuGlnAspCysThrMETLeu					
250	260	270	280	290	300
CGTGAACGGAGACGACCTTGTGTTATCTGTGAAAGCGCGGGGACCCAGGAGGACGCGGC					
ValAsnGlyAspAspLeuValValIleCysGluSerAlaGlyThrGlnGluAspAlaAla					
310					
GAGCCTACGAGTC					
SerLeuArgVal					

Fig. 21

10            20            30            40            50            60  
CCGTGTTGAGGAGTCATTTACCAATGTTGTGACTTGGCCCCGAAGCCAACTGGCCAT  
ArgValGluGluSerIleTyrGlnCysCysAspLeuAlaProGluAlaLysLeuAlaIle

70            80            90            100          110          120  
AAAGTCGCTCACAGAGCGGCTCTATATCGGGGGTCCCCTGACTAATTCAAAGGGCAGAA  
LysSerLeuThrGluArgLeuTyrIleGlyGlyProLeuThrAsnSerLysGlyGlnAsn

130          140          150          160          170          180  
CTGCGGTTACCGCCGGTGCCACGCGAGCGGGCGTGCTGACGACTAGCTGCCTTAATACCT  
CysGlyTyrArgArgCysHisAlaSerGlyValLeuThrThrSerCysGlyAsnThrLeu

190          200          210          220          230          240  
CACATGTCACCTGAAAGCCACTGCGGCCTGTCGAGCTGCGAAGCTCCGGGACTGCACGAT  
ThrCysHisLeuLysAlaThrAlaAlaCysArgAlaAlaLysLeuArgAspCysThrMET

250          260          270          280  
GCTCGTGAACGGAGATGACCTTGTGTTATCTGTGAAAGCGCGGG  
LeuValAsnGlyAspAspLeuValValIleCysGluSerAla

10            20            30            40            50            60  
CCGTGTTGAGGAGTCAATTACCAATGTTGTGACTTGGCCCCGAAGCCAAACTGGCCAT  
ArgValGluGluSerIleTyrGlnCysCysAspLeuAlaProGluAlaLysLeuAlaIle

70            80            90            100          110          120  
AAAGTCGCTCACAGAGCGGCTCTATATCGGGGGTCCCCTGACTAATTCAAAAGGGCAGAA  
LysSerLeuThrGluArgLeuTyrIleGlyGlyProLeuThrAsnSerLysGlyGlnAsn

130          140          150          160          170          180  
CTGCGGTTACCGCCGGTGCCGCGCGAGCCTGCTGACGACTAGCTGCGGTAATACCCTCAC  
CysGlyTyrArgArgCysArgAlaSerLeuLeuThrThrSerCysGlyAsnThrLeuThr

190          200          210          220          230          240  
ATGTCACCTGAAAGCCACTGCGGCCTGTCGAGCTGCGAAGCTCCGGGACTGCACGATGCT  
CysHisLeuLysAlaThrAlaAlaCysArgAlaAlaLysLeuArgAspCysThrMETLeu

250          260          270          280  
CGTGAACGGAGACGACCTTGTGTTATCTGTGAAAGCGCGGG  
ValAsnGlyAspAspLeuValValIleCysGluSerAla

10            20            30            40            50            60  
CCGTGTTGAGGAGTCATTTACCAATGTTGTGACTTGGCCCCCGAAGCCAACTGGCCAT  
ArgValGluGluSerIleTyrGlnCysCysAspLeuAlaProGluAlaLysLeuAlaIle

70            80            90            100          110          120  
AAAGTCGCTCACAGAGCGGCTCTATATCGGGGGTCCCCTGACTAATTCAAAGGGCAGAA  
LysSerLeuThrGluArgLeuTyrIleGlyGlyProLeuThrAsnSerLysGlyGlnAsn

130          140          150          160          170          180  
CTGCGGTTACCGCCGGTGCCACGCGAGCGGCCGTGCTGACGACTAGCTGCGGTAATACCT  
CysGlyTyrArgArgCysHisAlaSerGlyValLeuThrThrSerCysGlyAsnThrLeu

190          200  
CACATGTCACCTGAAAGCCACTGCGGCC  
ThrCysHisLeuLysAlaThrAlaAla

10	20	30	40	50	60
CCGTGTTGAGGAGTCATTTACCAATGTTGTGACTTGCCCCCGAAGCCAACTGGCCAT					
ArgValGluGluSerIleTyrGlnCysCysAspLeuAlaProGluAlaLysLeuAlaIle					
70	80	90	100	110	120
AAAGTCGCTCACAGAGCGGCTCTATATCGGGGGTCCCCTGACTAATTCAAAAGGGCAGAA					
LysSerLeuThrGluArgLeuTyrIleGlyGlyProLeuThrAsnSerLysGlyGlnAsn					
130	140	150	160	170	180
CTGCGGTTACCGCCGGTGCCACCGCAGCGGGCGTGCTGACGACTAGCTGC GGTAATACCCT					
CysGlyTyrArgArgCysHisAlaSerGlyValLeuThrThrSerCysGlyAsnThrLeu					
190	200	210	220	230	240
CACATGTCG CCTGAAAGCCACTGCGGCCTGTCGAGCTGCGAAGCTCCGGGACTGCACGAT					
ThrCysArgLeuLysAlaThrAlaAlaCysArgAlaAlaLysLeuArgAspCysThrMET					
250	260	270	280	290	300
GCTCGTGAACGGAGATGACCTTGTGTTATCTGTGAAAGCGCGGGACCCAGGAGGACGC					
LeuValAsnGlyAspAspLeuValValIleCysGluSerAlaGlyThrGlnGluAspAla					
310					
GGCGAGCCTACGAGTC					
AlaSerLeuArgVal					

Fig. 25

	828	842	849 853	890
KHCV-LBC1	LLTLSPEYKVFLARFIWWLQYLITRTEAHLQVWVPPPLNVRGGRDAIILLTCVV			
KHCV-LBC23	-----F-----L-----T-----			A-A-
KHCV-LBC26	-----F-----L-----T-----			
KHCV-LBC20	-----F-----L-----T-----			V---A-
 KHCV-LBC2	-F-----L-----F-----A-----I-----			A-
KHCV-LBC3	-F-----Y-----L-----F-----A-----I-----			A-A-
KHCV-LBC25	-F-----Y-----L-----F-----A-----A-----			M-
KHCV-LBC21	-----LM-----FL-----A-----S-----			A-
KHCV-LBC27	-----LM-----FL-----A-----S-----			A-
KHCV-LBC28	-----LM-----FL-----A-----R-----S-----			A-
JHCV-NCI	-----Y-----L-----F-----A-----			A-
JHCV-Osaka	-----Y-----L-----PT-----A-----D-H-----I-----A-----			M-A-
 HCPT-CHIRON	A-----RYISWCL-----L-----V-----Q-H-----I-----V-----M-A-			
  933				
KHCV-LBC1	HPELIFDITKYLLAIFGPLMVHQAGITRVPYFVRAQGLIRACMLARKVVGHHY			
KHCV-LBC23	-----L-----L-----S-I-----S-----			V-AA-----
KHCV-LBC26	-----L-----L-----P-----S-I-----			V-A-----
KHCV-LBC20	Y-----L-----TL-----LI-----S-----			V-A-----
 KHCV-LBC2	-S-----I-----L-----L-----S-----			
KHCV-LBC3	---P-----			W-----A-----
KHCV-LBC25	-----I-----VL-----T-----			W-----V-NIA-----
KHCV-LBC21	Y-----L-----TL-----L-----			V-----
KHCV-LBC27	Y-----L-----L-----L-----S-I-----			V-AA-----
KHCV-LBC28	Y-----L-----TL-----L-----			V-A-----
JHCV-NCI	-----L-----L-----			V-A-----
JHCV-Osaka	-----L-----I-----L-----			H-----V-----A-----
 HCPT-CHIRON	--T-V-----L-----V-----WI-----SLLK-----V-----L-F-A-----MI-----			

CTCTTGACCTTGTCACCACTTAAGTAGTTCTTGCAGGTTCATATGGTGGCTACAAATATCTCATCACAGAACCGA 2904

HCV-LBC1

HCV-LBC23

HCV-LBC26

HCV-LBC20

HCV-LBC32

HCV-LBC1

HCV-LBC23

HCV-LBC26

ICV-LBC1	CTCTGACCTGTGCCAGCCAGCTTAAAGTGTCCTGGCAGGTTGGCTACATTTCATCAGCGA	2904
ICV-LBC2	-T-C-----C-T-----C-T-----C-T-----C-T-----C-T-----C-T-----C-T-----	GG-----T-T-----CT-T-----T-G-----T-G-----T-G-----T-G-----T-G-----
ICV-LBC3	-T-----G-C-----C-T-----C-T-----C-T-----C-T-----C-T-----C-T-----	G-----G-----G-----G-----G-----G-----G-----G-----G-----
ICV-LBC25	C-----G-----C-T-----C-T-----C-T-----C-T-----C-T-----C-T-----	G-----G-----G-----G-----G-----G-----G-----G-----G-----
ICV-LBC21	C-----T-C-----G-----T-C-----G-----T-C-----G-----T-C-----	G-----T-C-----CT-C-----CT-C-----CT-C-----CT-C-----CT-C-----
ICV-LBC27	-T-C-----G-----C-T-----CC-----G-----T-----CT-----C-----	T-----T-----G-----G-----G-----G-----G-----G-----
ICV-LBC20	C-----C-----T-C-----CG-----T-----CT-----C-----G-----	G-----G-----G-----G-----G-----G-----G-----G-----
ICV-LBC29	-T-----G-----T-----G-----T-----G-----T-----G-----T-----	G-----G-----G-----G-----G-----G-----G-----G-----
ICV-LBC30	-T-----C-----GC-----C-T-----C-----C-T-----C-----C-T-----	G-----G-----G-----G-----G-----G-----G-----G-----
ICV-LBC31	--T-A-C-----C-----C-T-----C-----C-T-----C-----C-T-----	G-----G-----G-----G-----G-----G-----G-----G-----
ICV-LBC1	AGGGCATCTGCAGCTGGCTGGCTCCCCCTCTCAACGTTGGGGGGGATGGCGATCCTCCTACATGGCTGGCTCA	2984
ICV-LBC2	-C-----A-----C-----C-----A-----N-----C-----A-----T-----	C-----C-----G-----G-----T-C-----TG-----T-----A-----T-----
ICV-LBC3	-CT-----CT-----CT-----CT-----CT-----CT-----CT-----CT-----	G-----G-----G-----G-----G-----G-----G-----G-----
ICV-LBC25	G-----CT-----CT-----CT-----CT-----CT-----CT-----CT-----	G-----G-----G-----G-----G-----G-----G-----G-----
ICV-LBC21	-T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----	G-----G-----G-----G-----G-----G-----G-----G-----
ICV-LBC27	CT-----CT-----CT-----CT-----CT-----CT-----CT-----CT-----	G-----G-----G-----G-----G-----G-----G-----G-----
ICV-LBC20	CT-----G-----CT-----G-----CT-----G-----CT-----CT-----	G-----G-----G-----G-----G-----G-----G-----G-----
ICV-LBC29	CT-----T-----CT-----T-----T-----T-----T-----T-----	G-----G-----G-----G-----G-----G-----G-----G-----
ICV-LBC30	C-----A-----C-----A-----A-----C-----C-----T-----	G-----G-----G-----G-----G-----G-----G-----G-----
ICV-LBC31	-A-----C-----C-----A-----C-----T-----C-----T-----	G-----G-----G-----G-----G-----G-----G-----G-----
ICV-LBC1	CCCAGGCTTAATCTTGACATCACATAATTGCTCGCCATTTCGGCCGATGCTCGCCATTTCGGCCGGCTAACCTAG	3065
ICV-LBC2	-T-----G-----T-----C-----G-----T-----T-----C-----	A-----A-----C-----C-----T-----T-----C-----C-----
ICV-LBC3	-CG-----CG-----G-----T-----T-----T-----C-----T-----	G-----G-----G-----G-----T-----T-----C-----C-----
ICV-LBC25	G-----G-----ATGCC-----T-----C-----C-----T-----T-----	A-----A-----C-----C-----T-----T-----C-----C-----
ICV-LBC21	-A-----C-----CTC-----T-----C-----C-----T-----T-----	T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----
ICV-LBC27	G-----G-----CRC-----T-----C-----C-----T-----T-----	T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----
ICV-LBC20	-----C-----CTC-----T-----C-----C-----T-----T-----	T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----
ICV-LBC29	-----G-----C-----CTC-----T-----C-----C-----T-----	T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----
ICV-LBC30	-----G-----C-----CTC-----T-----C-----C-----T-----	T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----
ICV-LBC31	-----G-----C-----CTC-----T-----C-----C-----T-----	T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----
ICV-LBC1	AGTGCAGTACTCTGCGCCAGCAGGGCTCATTCCTGGCTGCTATTCGGCTGGCTCTAC	3141
ICV-LBC2	-T-----CA-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----	T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----
ICV-LBC3	-T-----G-----G-----G-----G-----G-----G-----G-----	T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----
ICV-LBC25	-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----	C-----C-----C-----C-----C-----C-----C-----C-----
ICV-LBC21	-----A-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----	C-----C-----C-----C-----C-----C-----C-----C-----
ICV-LBC27	-----T-----A-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----	T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----
ICV-LBC20	-----T-----T-----G-----G-----G-----G-----G-----G-----	C-----C-----C-----C-----C-----C-----C-----C-----
ICV-LBC29	-----T-----A-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----	T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----
ICV-LBC30	-----A-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----	C-----C-----C-----C-----C-----C-----C-----C-----
ICV-LBC31	-----G-----T-----G-----T-----T-----T-----T-----T-----	T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----

NS5D-LBC1 CCGTGTTGGGGTCAATTACCMATGTGTGACTTGGCCCTGAGAACCTGGCCATTAAGTCGCTCACAGACGGC  
 NS5D-20 ---  
 NS5D-23 ---  
 NS5D-24 --- A  
 NS5D-25 ---  
 NS5D-27 ---  
 NS5D-28 ---

NS5D-LBC1 TCTATATTCGGGGTCCCTGACTAATTCAAAGGGAGAACTGGCCATGCCGGTACCGGGAGGGGGTGCACGA  
 NS5D-LBC20 ---  
 NS5D-LBC23 ---  
 NS5D-LBC24 ---  
 NS5D-LBC25 ---  
 NS5D-LBC27 --- A  
 NS5D-LBC20 --- A

NS5B-LBC1 CTAGCTGGTAAACCTCAACATGTTACCTGAAAGCCAACTGGCCCTGTCGAGCTGCAAGCTGGCAGNTGC  
 NS5D-LBC20 --- C  
 NS5D-LBC23 --- C  
 NS5D-LBC24 --- C  
 NS5D-LBC25 --- C  
 NS5D-LBC27 --- C  
 NS5D-LBC28 --- CG

NS5B-LBC1 TCGTGACGGAGACGACCTTGTGCGTTATCTGTGAAAGGGGAGCCAAAGGGATGGCGAGCTACGAGTC  
 NS5B-LBC20 --- G  
 NS5D-LDC23 --- T  
 NS5D-LDC24 ---  
 NS5B-LBC25 ---  
 NS5D-LBC27 --- T  
 NS5B-LBC28 --- G --- G --- C

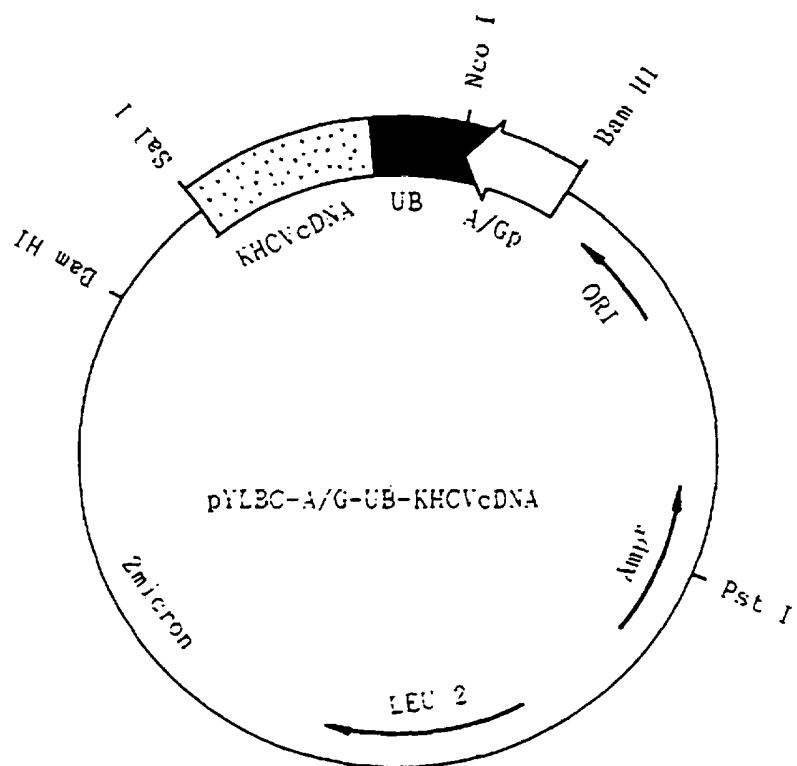


FIG. 30

Fig 31

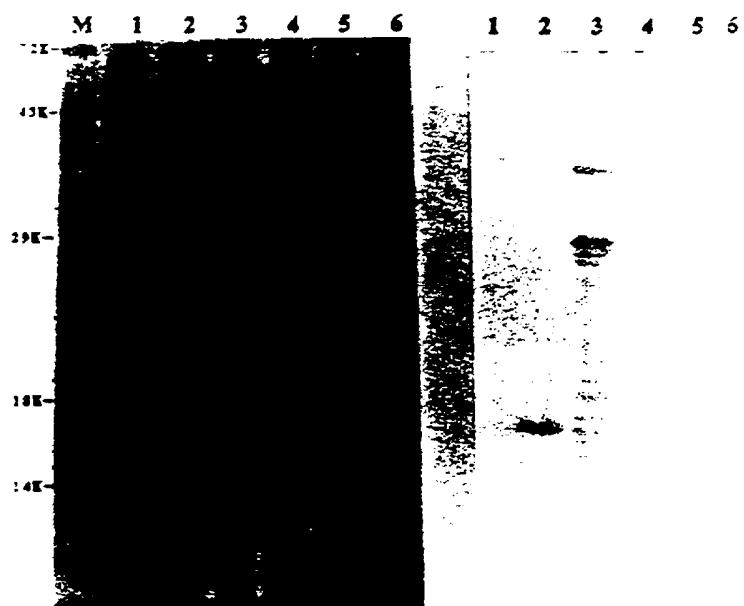
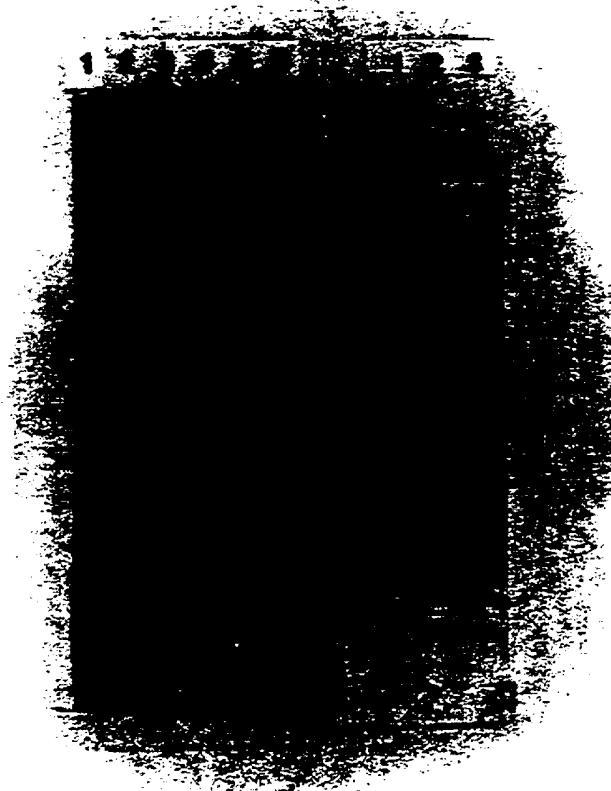


Fig 32



10            20            30            40            50            60  
ATGCAAATTT TCGTCAAALLAC TCTAACAGGG AAGACTATAA CCCTAGAGGT TGAATCTTCC  
TACGTTTAAAG AGCAGTTTG AGATTGTCCC TTCTGATATT GGGATCTCCA ACTTAGAAGG

70            80            90            100          110          120  
GACACTATTG ACAACGTCAA AAGTAAAATT CAAGATAAAG AAGGTATCCC TCCGGATCAG  
CTGTGATAAAC TGTTGCAGTT TTCATTTAA GTTCTATTTC TTCCATAGGG AGGCCTAGTC

130          140          150          160          170          180  
CAGAGATTGA TTTTGCTGG TAAGCAACTA GAAGATGGTA GAACCTTGTC TGACTACAAC  
GTCTCTAACT AAAAACGACC ATTCTGTTGAT CTTCTACCAT CTTGGAACAG ACTGATGTTG

190          200          210          220  
ATCCAAAAGG AATCTACTCT TCACCTGGTG TTGAGACTCC GCGGTGGT  
TAGGTTTCC TTAGATGAGA ACTGAACCCAC AACTCTGAGG CGCCACCA

FIG. 33

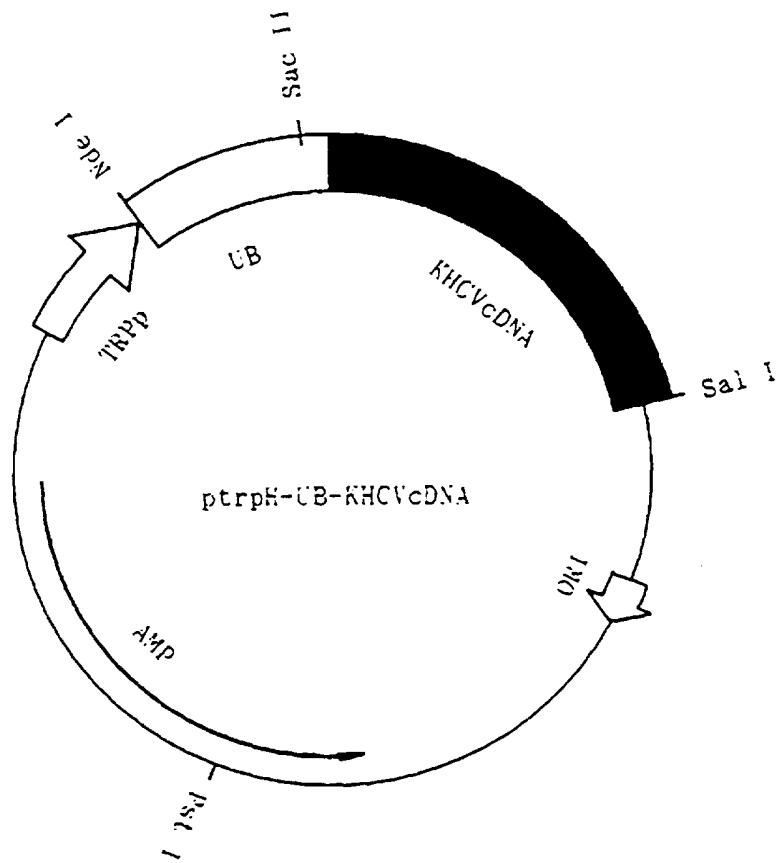


Fig. 34

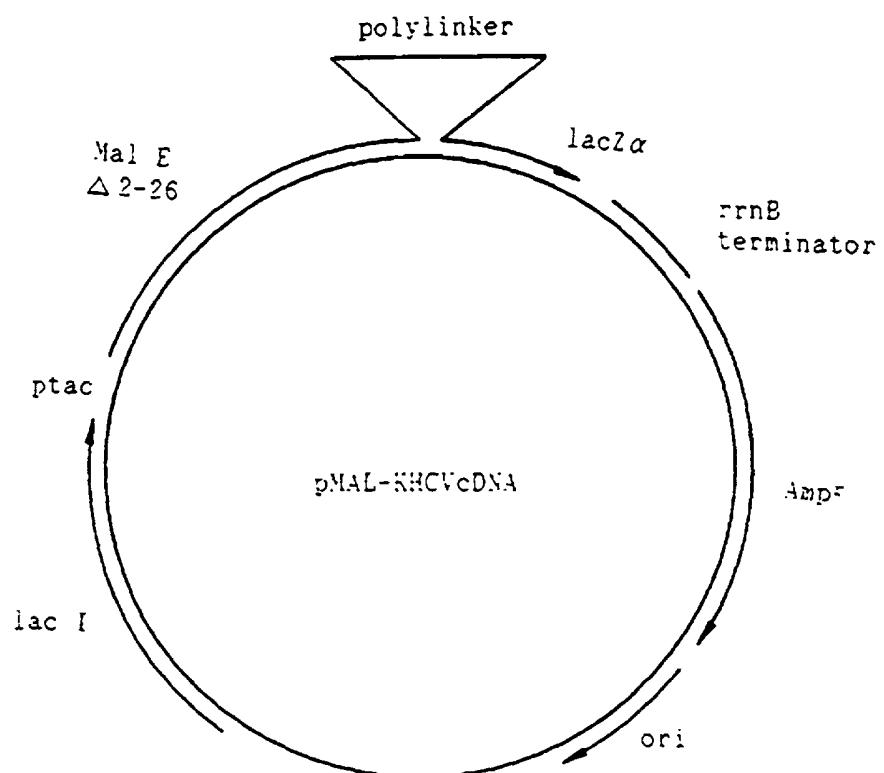


Fig. 35

Fig. 36

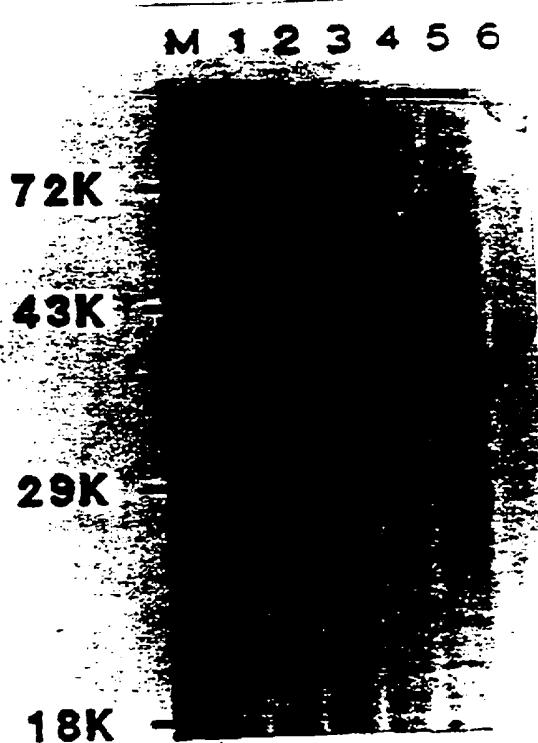


Fig. 37

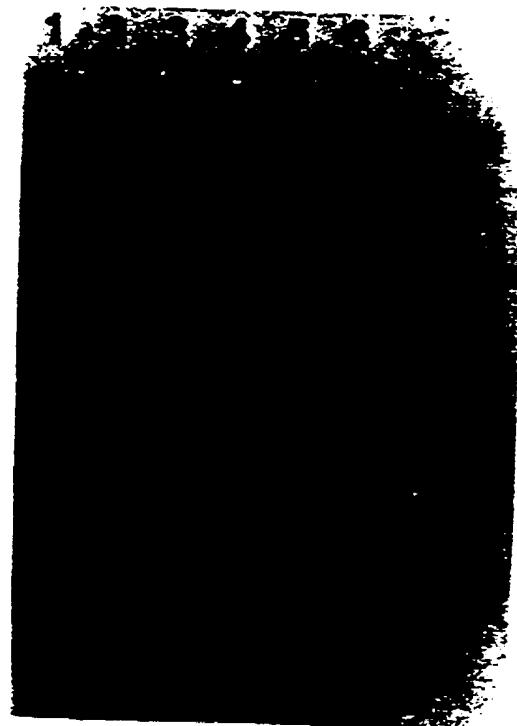
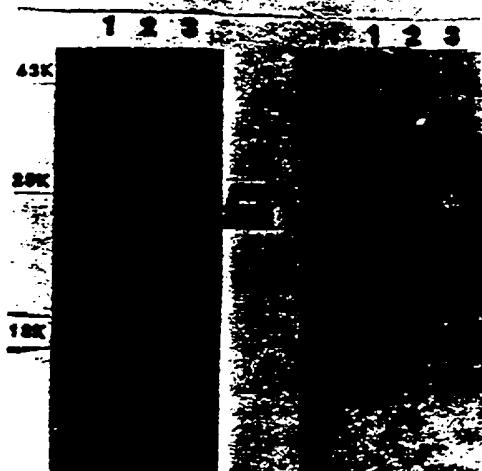


Fig 38 und 41



ÖSTERREICHISCHES PATENTAMT

Ausgegeben 25. 5.1999

Blatt 54

Patentschrift Nr. AT 405 053 B

Int. Cl. : C12N 15/51

C12N 5/12, C07K 16/08, C12P 21/08,

G01N 33/577, A61K 39/29

Fig. 39



Fig. 40



ÖSTERREICHISCHES PATENTAMT

Ausgegeben 25. 5.1999

Blatt 56

Patentschrift Nr. AT 405 053 B

Int. Cl. : C12N 15/51

C12N 5/12, C07K 16/08, C12P 21/08,

G01N 33/577, A61K 39/29

Fig. 42



ÖSTERREICHISCHES PATENTAMT

Ausgegeben 25. 5.1999

Blatt 57

Patentschrift Nr. AT 405 053 B

Int. Cl. : C12N 15/51

C12N 5/12, C07K 16/08, C12P 21/08,

G01N 33/577, A61K 39/29

Fig. 43



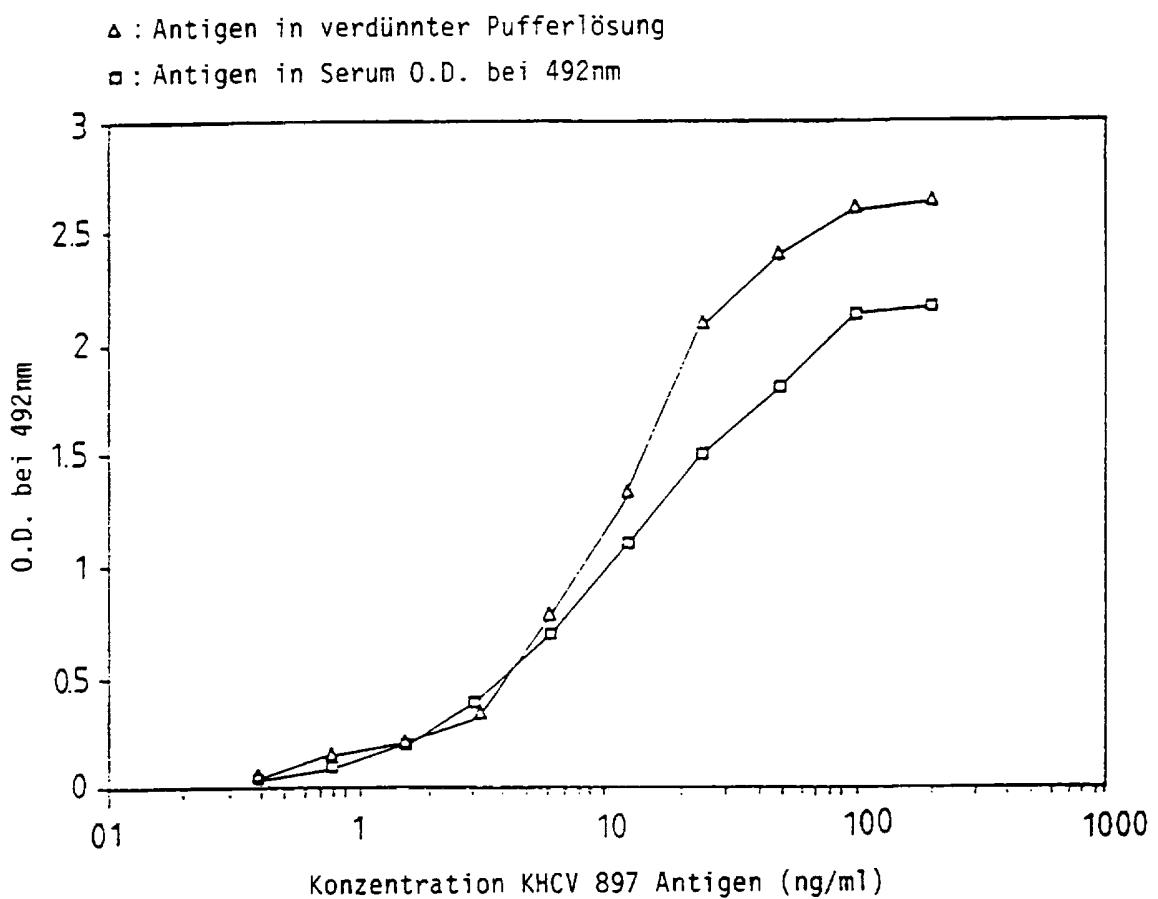


Fig. 44

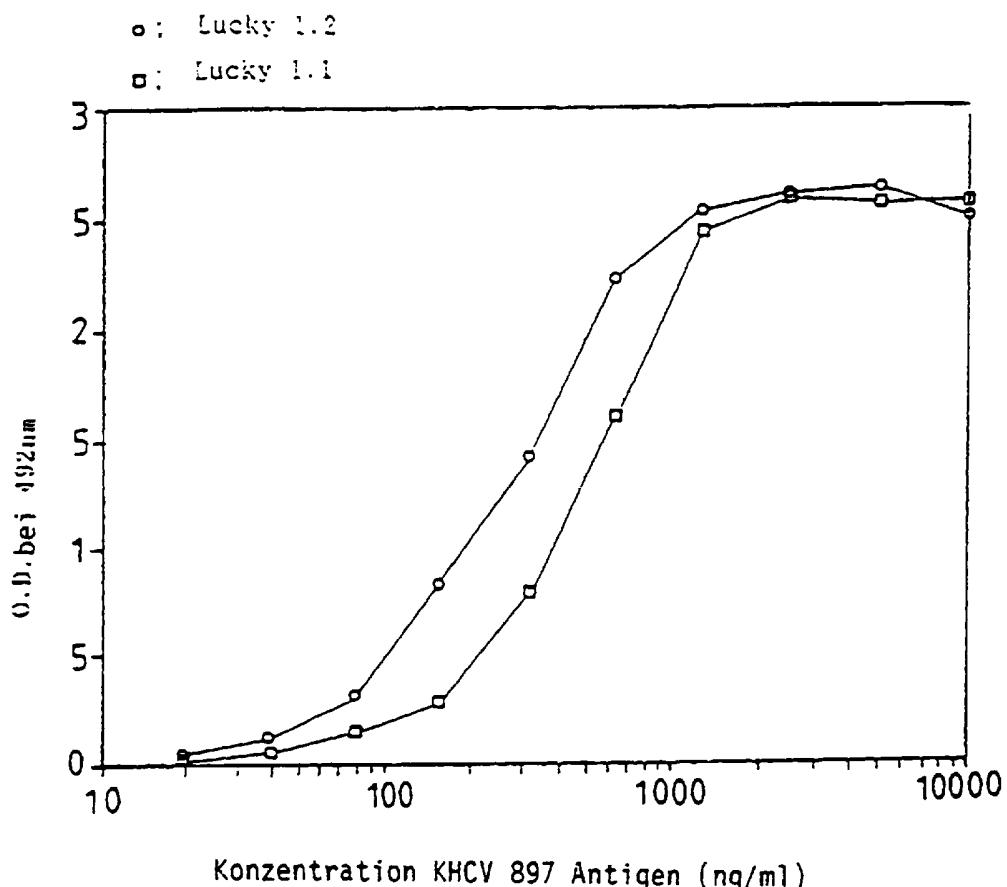


Fig. 45