

(19)



Republik
Österreich
Patentamt

(11) Nummer:

AT 405 053 B

(12)

PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 9013/92 KR92/00022

(22) Anmeldetag: 8. 6.1992

(42) Beginn der Patentdauer: 15. 9.1998

(45) Ausgabetag: 25. 5.1999

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

(30) Priorität:

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

(56) Entgegenhaltungen:

EP 0318216A1 EP 0388232A1 EP 0419182A1

(73) Patentinhaber:

LUCKY LIMITED
SEOUL (KR).

(54) HEPATITIS-C-DIAGNOSEMITTEL UND -IMPFSTOFFE

(57) Die vorliegende Erfindung sieht Polynucleotide 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 (HCV), 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 genannt 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 Agenzien.

Demzufolge wurde dem Studium von HCV großes Augenmerk 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. klonierte 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-Immunoreaktion mit den genannten Antigenen i. e. C100-3 angewendet wurde.

Auf Basis der oben genannten Erfindung entwickelte und vertrieb Ortho Diagnostic Systems Inc., USA, Diagnoseagenzien 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 her stammen, 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, oberflächlich behandelt worden, um als mögliches Mittel für die Entwicklung von Impfstoffen wie auch als
20 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 Wirtszelle und beim Anbinden an die Rezeptoren der Wirtszelle 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
25 International HCV Symposium, Strasbourg, France (1991)).

Weiters schlug Houghton et al. die Möglichkeit vor, daß das Hüllpro-tein 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 amerikansichen 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 amerikansichen 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. fusionerte Polypeptide mit einen 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 night-KHCV Protein kodiert, für die Herstel-
55 lung eines fusionerten 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 inaktivierte 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 Klone 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 Aminosäuresequenzen des Polypeptides.
- Fig. 23 zeigt die Nucleotidsequenz des cDNA Fragmentes NS5-LBC25 und die dadurch kodierten Aminosäuresequenzen des Polypeptides.
- 5 Fig. 24 zeigt die Nucleotidsequenz des cDNA Fragmentes NS5-LBC27 und die dadurch kodierten Aminosäuresequenzen des Polypeptides.
- Fig. 25 zeigt die Nucleotidsequenz des cDNA Fragmentes NS5-LBC28 und die dadurch kodierten Aminosäuresequenzen des Polypeptides.
- Fig. 26 zeigt die vergleichende Analyse der Aminosäuresequenzen von Polypeptiden, die in der NS2
- 10 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.
- Fig. 28 zeigt die vergleichende Analyse der Nucleotidsequenzen der NS2 Region der cDNA von KHCV
- 15 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.
- Fig. 30 zeigt einen Expressionsvektor, der für den Zweck der Expression eines KHCV cDNA Fragmentes in Hefezellen gebildet wurde.
- 20 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 Enzymimmunoassay (EIA), variiert mit der Konzentration des (der) KHCV Antigen(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 Erfindung, umfaßt. Solche Fragmente können durch enzymatische Spaltung größerer Moleküle hergestellt werden, wo Restriktionsendonukleasen für die DNA und Proteasen für die Proteine verwendet werden. Die erfindungsgemäßen Fragmente sind jedoch nicht auf Produkte beschränkt, die von irgendeiner besonderen Form der enzymatischen Spaltung herkommen 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 antigenetische 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.

Der Ausdruck "Expressionsvektor" bezeichnet ein Hilfsmittel zum Klonen, 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 Bindungsort und den Terminator.

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 Polypeptid 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.

Im folgenden wird die vorliegende Erfindung spezieller ausgeführt.

Klonierung von KHCV cDNA

Eine KHCV cDNA Bibliothek wird wie folgt hergestellt:

HCV Partikel werden aus Serum 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., 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 Serum 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 Ethanol-fällung.

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, Stratagene Co., 11099 N. Torrey Pines Rd., La Jolla, CA 92037, USA).

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'-TTTTTCATGATTGGTGGTGGAACTGGACOGTCTOGAGNNNNN-3'; N bezeichnet A, G, T oder C) und der Oligo d(T) Primer (5'-GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAACTAGTCTOGAG(T)18-3') 6 Random Nucleotide (Primer RANPSHCV) oder 18 T (Oligo d(T) Primer) in jeder 3'-Endregion und einen Erkennungsort der Restriktionsendonuclease 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')

an die synthetisierten cDNA Fragmente angelagert. Und danach werden die cDNA Fragmente mittels PCR mit dem Primer PSHCV (5'-TTTTTCATGATTGGTGGTGGAACTGGAA-3') und den Rco RI Primer (dem oberen Strang des Eco RI Adaptors) vermehrt. Die cDNA Fragmente werden partiell mittels Restriktionsendonucleasen Eco RI und Xho I abgebaut. Die abgebaute 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 Phagenauflagen 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 Dolleppstrang pBluescript DNA, isoliert von E. coli, infiziert mit positiver Plaque, wird mittels Restriktionsendonucleasen 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 überlappenden 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 Budapester 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.

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
 5 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
 10 28). Die NS5 Region zeigt eine Homologie von 96 bis 99% (Fig. 29) während die in den NS2 und NS5 Regionen kodierten Aminosäuresequenzen 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,
 15 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,
 20 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, Phenylalanin 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 Zugriffsnummer ATCC 75211 hinterlegt und die M13 Phagengruppe (M13mp18-NS2L2), die M13mp
 25 Phagen enthält, welche 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 Zugriffsnummer 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
 30 Verfahren durchgeführt werden wie die Phosphoramidite 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 potenzielle Nucleotidsequenzen existieren, die für die in den Fig. 2-1 bis 2-16 und den Fig. 7 bis 25 gezeigten Aminosäuresequenz kodieren können.

40

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
 45 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 ubiquitinen 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
 50 Science, 234, 178-186 (1986), daß ein mit Ubiquitin fusioniertes fremdes Protein ebenfalls am Ort neben Arg-Gly-Gly des Ubiquitins herausgeschnitten werden kann.

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

Weiters würde das fusionierte Protein, welches Ubiquitin enthält, erhalten werden, wenn das fusionierte Polynucleotid, 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 instabil 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 Expressionsvektor 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 herauschneidbaren 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 Transcription und Translation der eingefügten Gensequenzen aufweist. Nützliche Klonierungswerkzeuge können aus Segmenten anderer nicht-KHCV Polynucleotide bestehen, einschließlich syntetischer 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 Hefepiasmide.

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 Wirte 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 equivalenten 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 standardgemäße 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.

- 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-Phenylendiamindihydrochloresäure (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.

- 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 immunisierungsprotokoll 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 seperiert und der Überschuß jedes Klons wurde auf seine 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 intravenös injiziert und zwar mehrfach mit Intervallen von 14 bis 21 Tagen mit einer Gesamtmenge von 100 bis 200µg 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

- 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 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

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 Matrice 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, 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 vorgesehen 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 Alaun, Oberflächermittel wie Hexadecylamin, Octadecylamin, Lysolecithin, Dimethyldioctadecylammoniumbromid, N,N-Dioctadecyl-N',N'-bis(2-Hydroxymethyl) Propandiamin, Methoxyhexadecylglycerol und Pluronicpolyole; Polyanionen wie Pyran, Dextransulfat, Poly IC, Polyacrylsäure und Carbopol; Peptide wie Muramyllopeptid, Dimethylglycin und Tuftsin; und Ölemulsionen. Die Proteine gemäß vorliegender Erfindung können auch nach ihrer Inkorporierung in Liposome oder anderen Mikroträgern angewendet werden.

Die Immunogenizität der erfindungsgemäßen Proteine und insbesondere ihrer kleineren Fragmente 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 immunogenen 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 Säugetierserumproteine, wie z. B. als Keyhole Limpet Hemocyanin, menschliches Gammaglobulin oder Rindergammaglobulin, 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 quervernetzten, um so die Verwendung eines getrennten Trägermoleküls zu vermeiden. Solches Cross-linking zwischen den Proteinen oder ihren Fragmentaggregaten kann ebenfalls die Immunogenizität 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 200 µg 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, sofern es nicht anders beschrieben ist.

Weiters sind, sofern 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 100 µl 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 bis Trispropan HCl, 100mM MgCl ₂ 10mM Dithiothreitol (DTT), pH 7,0 |
| 10 x NEB Reaktionspuffer 2: | 100mM Tris-HCl, 100mM MgCl ₂ , 500mM NaCl, 10mM DTT, pH 7,0 |
| 10 x NEB Reaktionspuffer 3: | 100mM Tris-HCl, 100mM MgCl ₂ , 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 T₄ DNA Ligase und 10x Ligationsreaktionspuffer (0,5M Tris-HCl, 0,1M MgCl₂, 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 T₄ Ligase wurden zur Ligation der klebrigen Enden der DNA verwendet, während 100 Einheiten für die Ligation der

10

glatten Enden von DNAs verwendet wurden.
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 T₄ 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 Phosphoramidite-Chemie angewendet wurde.

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.

35

bis 260nm bestimmt.

Referenzbeispiel 7: Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

40

Zu einer Mischung von bis 100ng einer Matrizen DNA, 10µl 10x Taq Polymerasereaktionspuffer (10mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 15mM MgCl₂, 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 Gesamtvolumen 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 Äthanol-fällung gewonnen. Das Precipitat wurde in 20µl einer TE-Pufferlösung gelöst (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 7,5).

55

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

5

50µl 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 (Äthylendi-

10 aminotetraessigsäure), 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).
Die Extraktion der viralen genomischen RNA von den gefällten viralen Partikeln wurde durchgeführt, indem die Methode nach Cholozyński, 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
15 (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
20 Volumen Isopropanol und Glycogen (2µg/ml Überstand) als Träger wurden hinzugefügt. Die Mischung wurde in einem Kühler 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 400µl TE-Pufferlösung (10mM Tris, pH 7,5, 1mM EDTA) gelöst und in der nächsten Stufe verwendet. Die
25 virale RNA-Lösung kann für eine spätere Verwendung bei -70°C gehalten werden.

(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) hergestellte Hepatitis C virale RNA wurde als Matrize für die reverse Transkriptase verwendet. Es wurden ein Oligo-d(T)-Primer mit der Nucleotidsequenz 5'-GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAACTAGTCTCGAG(T)₁₈-3' und ein Randomprimer mit der Nucleotidsequenz
35 5'-TTTTTCATGATTGGTGGTGGAACTGGACCGTCTCGAGNNNNNN-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 Synthetisierung unter Verwendung eines DNA-Synthesizers erfolgte (Applied Biosystems Inc., USA, Modell 380 B).

Ein erster cDNA-Strang wurde wie folgt hergestellt: 18µl der hepatitisviralen RNA-Lösung gemäß
40 Beispiel (1-A) wurde mit 2µl 0,1M CH₃HgOH gemischt, und die Mischung wurde für 10 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen, um die Sekundärstruktur von RNA auffalten zu lassen. 2µl von 1M β-Mercaptoäthanol wurde zugegeben, und die Mischung wurde für 5 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen. Zu der behandelten RNA-Lösung wurden 5µl reverse Transkriptase-Reaktionspufferlösung gegeben (500mM Tris-HCl, pH 8,3, 750mM KCl, 30mM MgCl₂, 10mM Dithiothreitol (DDT)), 2,5µl 10mM von jeweils
45 dATP, dGTP, dTTP und 5-Methyl-dCTP, 2µl Oligo-d(T)-Primer (1,4µg/µl) oder 2µl RANPSHCV (1,0µg/µl), 15µl destilliertes Wasser, das mit Diäthylpyrocarbonat (DEPC) behandelt worden war und 1,0µl RNase-Inhibitor (1 Unit/µl, Promega Inc., USA) in dieser Reihenfolge zugegeben. Die Mischung wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen (Primers, Matrize). Dann wurden 2,5µl MMLV reverse Transkriptase (18 Units/µl, Superscript RNase H- reverse Transkriptase, BRL Inc., Cat. No. 8853SA) hinzugefügt. Die
50 Reaktionsmischung wurde eine Stunde bei 37°C inkubiert, um den ersten Strang der cDNA zu synthetisieren.

Ein zweiter Strang der cDNA wurde wie folgt hergestellt: Zu 45µl der erhaltenen ersten Stranglösung wurden 40µl der 10 x zweiten Strangpufferlösung (188mM Tris-HCl, pH 6,9, 906mM KCl, 46mM MgCl₂, 1,5mM β-NAD(Nikotinamidadenindinucleotid), 100mM (NH₄)₂SO₄, 6,0µl 10mM dNTP's-Mischung (jeweils
55 10mM dATP, dCTP, dTTP und dGTP) und 298 µl destilliertes Wasser in dieser Reihenfolge hinzugefügt und 1,0µl RNase H(4 Units/µl) und 10,0µl DNA-Polymerase I (11 Units/µl) wurden dann entlang der Wand des Teströhrchens getropft. Nach sofortigem Mischen wurde die Reaktionsmischung für 2,5 Stunden bei 16°C inkubiert.

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) β -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
 5 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

10 Um die in Beispiel 1-B-1 hergestellte doppelsträngige cDNA in eine stumpfendige umzuwandeln, wurde der cDNA Niederschlag in 43,5 μ l destilliertem Wasser gelöst. 39 μ l der cDNA Lösung wurden genommen und mit 5,0 μ l T4 DNA Polymerasereaktionslösung (670 mM Tris-HCl, pH 8,8 166mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 67mM MgCl_2 , 100mM β -mercaptoethanol, 67 μ M EDTA), 2,5 μ l einer 2,5mM dNTP's Mischung und 3,5 μ l T4 DNA Polymerase (2,9 units/ μ l) vermischt. Die Reaktionsmischung wurde 30 Minuten bei 37 °C stehengelassen
 15 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 stumpfendigen cDNA wurden 7,0 μ l Eco RI Adaptor (Stratagene Inc., Zap-cDNA Synthesis Kit Cat. No. 200400, CA, USA), 1,0 μ l 10 x Ligationspufferlösung, 1,0 μ l T4 DNA Ligase (1000 units/ μ l) und 1,0 μ l 10mM ATP gegeben und über Nacht bei 4 °C
 20 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.

25 Für die Amplifikation der cDNA wurde deren PCR wie folgt durchgeführt: Zu der zuvor hergestellten cDNA Lösung wurden 10 μ l 10 x PCR Pufferlösung (200mM Tris-HCl, pH 8,3, 15mM MgCl_2 , 250mM KCl, 0,5 % Tween 20, 1mg/ml Gelatine), 10 μ l 2mM dNTP's Mischung, 5 μ l Primer, PSHCV mit der Nucleotidsequenz 5'-TTTTTCATGATTGGTGGTGGGA-3' und 5 μ l des oberen Stranges (5'-CCCCCGAATTCGGCACGAG-3') des Eco RI Adaptors, 1 μ l (2,5 units) der Taq DNA Polymerase (Perkin Elmer-Cetus Inc., 761 Main Avenue, Norwalk, CT 06859-0010, USA) und 69 μ 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
 30 erhaltene Produkt wurde mit Phenol-Chloroform extrahiert und wie zuvor mit Ethanol gefällt und dann in 16 μ l TE Pufferlösung aufgelöst.

Zu der resultierenden Lösung wurden 2 μ l 10 x Pufferlösung (0,5M NaCl, 0,5M Tris-HCl, 50mM MgCl_2 5mM DTT, pH 7,9) und je 1 μ 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
 40 cDNA partiell abzubauen. Die cDNA Fragmente wurden wie zuvor mit Phenol-Chloroform extrahiert und mit Ethanol gefällt und dann mit 10 μ l TE Pufferlösung aufgelöst.

Das somit erhaltene cDNA Fragment wurde folgendermaßen in den Vektor UNI-ZAPXR geklont. Zu 10 μ l der mittels Eco RI-Xho I abgebauten cDNA Fragmentlösung, wie zuvor erhalten, wurden 2,0 μ l 10 x Ligationspufferlösung, 2,0 μ l 10mM ATP, 4,0 μ l der Vektor UNI-ZAPXR Lösung (1 μ g/ μ l), bereits behandelt mit Eco RI/Xho I und 2,0 μ l T4 DNA Ligase (4 Weiss units/ μ l) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde
 45 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

50 Um die ligierte DNA gemäß Beispiel 1-B-2 in Phagen zu verpacken, wurden 10 μ 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 μ l einer phagenverdünnenden Lösung (5,8g NaCl, 2,0g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, 50ml 1M Tris-HCl, pH 7,5, 5ml einer 2%igen Gelatine pro Liter) und 20 μ 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 MgSO₄ 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 MgSO₄ x 7 H₂O, 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 MgSO₄ x 7 H₂O, 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 abzuschleiden, 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 10¹⁰ bis 10¹³ 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

- 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).
- 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 (Stratagene 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% NYZ Agars wurden zugegeben. Jede Mischung wurde auf eine 40 NZY Agarplatte aufgetragen und für 12 Stunden bei 37°C kultiviert, um 2 x 10⁶ Phagenplaques herzustellen.
- 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).
- Für die Färbereaktion wurde jeder der Filter in 15ml einer Färbelösung (100mM Tris-HCl, pH 9,5, 100mM NaCl, 5mM MgCl₂, 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 purpurfärbigen 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 MgCl₂) für 1 bis 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Der zuvor beschriebene Immunoscreeningassay wurde wiederholt, um die Klone einer einzelnen Phageplaque zu erhalten.

Jeder der Phageplaques, bei dem bestätigt werden konnte, daß er das rekombinante HCV Gen enthält, wurde in eine sterilisierte Microfuge-Röhre gegeben, die 500µl einer SM Pufferlösung (5,8g NaCl, 2,0g MgSO₄, 50µl 1M Tris-HCl, pH 7,5, 5ml einer 2%igen Gelatine pro Liter) enthält 20µl Chloroform wurden zugegeben. Dann wurden die Inhalte der Röhren unter Schütteln für 1 bis 2 Stunden bei Raumtemperatur kultiviert. 200µl (> 1 x 10⁵ Phagenpartikelchen) der so erhaltenen Lösung, 1µl Helfer-phagen R408 (> 1 x 10⁶ PFU/ml, Stratagene Inc., USA) und 20µl E. coli XL-1 Zellsuspension (O.D.600 = 1,0) wurden 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-trytone 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 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⁺ 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.

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 Harbor, 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).

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

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. Als Sonden wurden Oligonucleotide P652a (5'-TTCATACCCGTTGAGTCTATGGAACTACT-3') und P652b (5'-GCCATTCCAAGAAGAAGTGTGACGAAGTCG-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 10⁶ 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
5 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
10 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 Hybridisierungslösung (6 x SSC, Denhardt Lösung, 100µg/ml Hefe tRNA, 0,05% Natriumpyrophosphat) gegeben und 30ng von jeweils P652a und P652b, markiert mit ³²P, 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 MgCl₂, 50mM DTT, 0,5mg/ml BSA), 100µCi (gamma-³²P) 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% Natriumphosphatlösung für 10 Minuten bei Raumtemperatur gewaschen und noch einmal mit der gleichen Lösung für 30
20 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 Röntgenstrahlenfilm (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'-ACGAGACCTCCCGGGGCACTCGCAAGCACC-3') und P426b (5'-CGTAATTTGGGTAAGGTCATCGACACCCTC-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
40 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'-GTCCGGGTGCTGGAGGACGGCGTGAAC-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 gleich Weise durchsucht wie in Beispiel 1-D-1. Der so erhaltene cDNA Klon, der etwa 110 Nucleotide
50 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'-CGCATGGCCTGGGATATGATGATGAAC-3'), 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'-AAATGAGACGGACGTGCTGCTCCTTAAC-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.

15

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

Es wurden Oligonucleotide P403A (5'-GTGAAGAATTCGGGGCCGGAACCTGGCAT-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.

25

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.

35

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

Es wurde das Oligonucleotid P496b (5'-CGTGTATGCGAGAAGATGGCCCTTTATGAC-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.

45

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

Es wurde das Oligonucleotid P847b (5'-TGCGTGGGAGACAGCTAGACACACTCCAG-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.

55

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'-CTGGTTCCCGGAGCGGCATAC-3'), ausgebildet auf Basis der Nucleotidsequenz am 3'-Ende der KHCV 798, und P752a (5'-CCAGGTGATGACTTTGGTCTCCAT-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
 10 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
 15 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 Aminosäuresequenz 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 offeinen Leseraster miteinander verbunden, der KHCV 2661 genannt wurde.

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

25 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'-TCGATTCTTCGGTCCTGTGTGAGTGT-3') und P675b₂ (5'-AAAAAGAATTCGGATCCATGACGCGGGTTGTGCGTGGTAC-3') auf Basis der Nucleotidsequenz auf der Seite des 3'-Endes des KHCV 675 ausgebildet, und P403a₂ (5'-CCCCCTCAGAGTCTGACTCACTTCACGTTGTGTCAGTGGTCAT-3'), ausgebildet auf Basis der Nucleotidsequenz auf der
 30 Seite des 5'-Endes der KHCV 403 synthetisiert. Unter Verwendung der Primer P675b, P675b₂ und P403a₂, wie zuvor hergestellt, und P403a gemäß Beispiel 1-D-6 wurde die PCR wie folgt durchgeführt.

Zue 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 Gesamtvolumen auf 100 µl einzustellen. Die Mischung wurde einer ersten PCR unterworfen, indem der folgende Zyklus 10x wiederholt wurde: 95°C für 2 Minuten - 55°C für 2 Minuten - 72°C für 3 Minuten. Nach Zugabe von 2µg P675b₂ und 2µg P403a₂ zur resultierenden Mischung, wurde die zweite PCR ausgeführt, indem der obige thermische Zyklus 20x wiederholt wurde.

40 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 Aminosäuresequenz 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_{1,3}') wie folgt
 50 durchgeführt.

Der Primer PSHCVSL, 5'-AAAAGTCGACTGGTGGTGGAACTGGACCGT-3' enthält 21 fixe Nucleotide des Primers RANPSHCV oder DA17PSHCV des Beispiels 1-B-1 und eine Sal I Erkennungsstelle (5'-GTTCGAC-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
 55 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.

10µl 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 Aminosäuresequenz sind in den Fig. 1 bis 3 dargestellt. In der Nucleotidsequenz der KHCV 266 wurden 2 Terminator-kodons gefunden, obwohl ein Poly (A)⁺ 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'-GTCCTGTGGGCGGCGTTGGTGTACG-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. 50µl der oben erhaltenen Mischung wurden mit 1ml TE Pufferlösung (10mM Tris-HCl, pH 7,5, 1mM EDTA) verdünnt. Die verdünnte Mischung wurde auf 10µl unter Verwendung eines Zentrifugationsgefäßes (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 10µl des so erhaltenen cDNA Lösung 4µl einer 5 x tailing Pufferlösung (0,5M Kaliumkacodylate, pH 7,2, 10mM CoCl₂, 1mM DTT), 4µl 1mM dTTP (oder 4µl 1mM dGTP) und 10 units der terminalen Deoxynucleotidtransferase (BRL Inc., USA, # 80085B) hinzugefügt. Destilliertes Wasser wurde zugegeben, um das Gesamtvolumen auf 50µl einzustellen. Die Reaktionsmischung wurde für 30 Minuten bei 37 ° C stehengelassen und dann auf 65 ° für 5 Minuten erhitzt.

Die so erhaltene Poly d(T)₊ tailed cDNA (oder die Poly d(G) tailed cDNA) wurde mittels PCR unter Verwendung der Primers KHCVL70 (5'-TTGAGGTTTAGGATTCGTGCTCAT-3') (oder dC12R1RO; 5'-AAGGATCCGTCGACATCGATAATACGACTCACTAGGGA(C)₁₂-3'), dT17R1RP (5'-AAGGATCCGTCGACATCGATAATACGACTCACTATAGGGA(T)₁₇-3'), RO (5'-AAGGATCCGTCGACATC-3') und R1 (5'-GACATCGATAATACGACTCAC-3') erhalten aus der Nucleotidsequenz der KHCV 426 gemäß Beispiel 1-C mittels PCR amplifiziert.

Zu 2µl der cDNA Lösung wurden 5µl 10 x Taq Polymerase Pufferlösung (100mM Tris-HCl, pH 8,3, 500mM KCl, 15mM MgCl₂, 0,1% Gelatin) 5µl einer 1,5mM dNTPS Mischung, 2,2µg KHCVL69 und 2,0µg dT17R1RO hinzugefügt. Destilliertes Wasser wurde zugegeben, um das Gesamtvolumen auf 50µl einzustellen. Die Mischung wurden auf 95 ° C für 7 Minuten erhitzt und dann auf 75 ° C abgekühlt. 2,5 units der Taq DNA Polymerase wurden zugegeben. 30µl Mineralöl wurden dann zugegeben, um die Verdampfung zu verhindern. Die Reaktionsmischung wurde auf 45 ° C für 2 Minuten gekühlt, um es den Primern 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 Sekunden - 72 ° C für 2 Minuten; und endlich bei 72 ° C für 15 Minuten.

2µg des Primers RO (oder R1) und 2µg KHCVL70 wurden zu 10µl 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 Aminosäuresequenz sind in den Fig. 1 bis 3 dargestellt.

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 Zugriffsnummer 75008 hinterlegt.

Beispiel 2: Herstellung der HCV Subtype cDNA

2-A: Extraktion der RNA

Zu 100µl jeden Serums, gesammelt von 13 kooreanischen Hepatitis C Patienten (Proben #2, #3, #20, #21, #23, #25, #26, #27, #28, #29, #30, #31 und #32) wurden 300µl eines die Zellerände aufbrechenden Mittels mit der Bezeichnung RNAzol B (Cinna/Biotech, 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 N_s 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-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., Science, 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

- NS2S1 (5'-CGGGAGATGGCCGCATCGTG-3') korrespondierte mit dem Strang des Fragmentes vom
- 25 2776igsten bis zum 2795igsten Nucleotid in KHCV-LBC1. NS2N1 (5'-ACCTGCTAGTGC GCCAGCTTCAT-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'-TTTTGGATCCGCGGTTTTGTAGGTCTGGT-3') korrespondierte mit dem Strang des Fragmentes von dem 2803 zum 2822 Nucleotid im KHCV-LBC1, der eine BamH
- 30 I Erkennungsstelle für die Angemessenheit der Klonierung aufwies. Und NS2N2 (5'-AAAGTCGACATGAAGACCATTTGGAC-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 NS2N2 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
- 50 B, USA) verwendet wurden, bei dem automatized solid phase phosphoramidite chemistry Verwendung fand. Die synthetisierten Primer wurden mittels Elektrophoresis isoliert, wobei denaturierendes Polyacrylamidgel Verwendung fand (2M Harnstoff, 12% Acrylamid und bis-Acrylamid (29:1, w/w) in 50mM Tris, 50mM Borsäure, 1mM EDTA-Na₂), 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, 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 KCl, 15mM MgCl₂, 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 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 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 Ethanol hinzugefügt. Die resultierende Mischung wurde dann zentrifugiert, wobei 340bp einer doppelsträngigen DNA vorlagen.

Die DNA Fragmente von den 13 verschiedenen Masken wurden folgendermaßen genannt: NS2-LBC2, 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: 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.

Beispiel 3: Herstellung des Vektors für die Expression des KHCV cDNA Fragmentes in Hefe3-A: Amplifizierung der KHCV cDNA Fragmente3-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 waren, ein ubiquitines Gen anzuhängen (im folgenden werden die Gene, hergestellt durch Anhängen oder Verbinden des ubiquitinen 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'-CTTGGTGTGAGACTCCGCGGTGGTATGAGCACGAATCCTAAACC-3') enthält 25 Nucleotide in der 5'-Endregion, überlappend mit der 3'-Endregion des Ubiquitins und die anderen 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'-GGGGTCGACTATTAGGGCAGATTCCTGTTGCATA-3') enthält ein stop codon zur Beendigung der Translation direkt nach dem 852igsten Nucleotid und eine Erkennungsstelle von Sal I.

Der Primer PSALCORE22 (5'-GGGGTCGACTATTAAGCGGAAGTGGGGATGGTCAA-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'-CTTGGTGTGAGACTCCGGTGGTACGGGCATGACCACTGACAA-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.

Der Primer PK573UBI (5'-CTTGGTGTGAGACTCCGCGGTGGTACATGGACAGGCGCCCTGA-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'-GACTGGTCTGACTATTACTCTTGCCGCCACAAGAGGTT-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).

Der Primer PK897UBI (5'-CTTGGTGTGAGACTCCGCGGTGGTGGTGGTGAATTCATACCCG-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.

Der Primer PK897SAL (5'-GACTGGTCTGACTATTAACACGTATTACAGTCGATCAC-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'-GACTGGTCTGACTATTAGTACTGGAATCCGTATGAGGAG-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.

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

Der Primer P240B (5'-CCTGTTGCATAGTTCACGCCGT-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.

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

<Stufe 2>

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

<Stufe 3>

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

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

Danach wurden zu jedem der Röhrchen A bis F 10µl 10 x Taq Polymerase-Pufferlösung, 10µl 10mM dNTP's Mischung und 25 units der Taq Polymerase zugegeben. Destilliertes Wasser wurde auf ein Gesamtvolumen von jeweils 100µl 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% Polyacrylamidgelelektrophorese 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 Polyacrylamidgelelektrophorese 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'-CTTGGTGTGAGACTCCGCGGTGGTGGGCGCAAGGTCGGGCCGCT-3') enthält 25 Nucleotide in der 5'-Endregion, die mit der 3'-Endregion des ubiquitinen Gens überlappt. Die anderen Nucleotide entsprechen der Region vom 1510 bis zum 1530igsten Nucleotid der KHCV-LBC1.
- Der Primer PE2NSAL (5'-GACTGGACTATTAATTTCATCCAGGTACAACCGAACCA-3') enthält ein stop codon, um die Translation direkt nach dem 2010 Nucleotid der KHCV-LBC1 zu stoppen, und eine
25 Erkennungsstelle der Sal I.
- Der Primer PE2CUBI (5'-CTTGGTGTGAGACTCCGCGGTGGTGGCACTGGGTTCACCAAGACA-3') enthält 25 Nucleotide in der 5'-Region, die mit den 25 Nucleotiden der 3'-Endregion des Ubiquitins überlappen. Die anderen Nucleotide entsprechen der Region vom 2011 bis zum 2031igsten Nucleotid der KHCV-LBC1.
- 30 Der Primer PE2CSAL (5'-GACTGGACTATTACGCGTCCGCCAGAAGAAGGAAGAG-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 2µg PE2NUBI und PE2NSAL und das Röhrchen B jeweils mit 2µg PE2CUBI und PE2CSAL versehen. Zu jedem der Röhrchen A und B wurden 50µg KHCV-LBC1, 10µl 10 x Polymerase Pufferlösung, 10µl 10mM dNTP's Mischung und 2,5 units Taq Polymerase zugegeben. Destilliertes Wasser wurde hinzugefügt, um ein Gesamtvolumen von 100µl einzustellen. Die PCRs wurden
40 durchgeführt, indem 15x der gleich thermische Zyklus durchgeführt wurde, wie in Referenzbeispiel 7.

<Stufe 3>

- Die in Stufe 2 erhaltenen PCR Produkt wurden einer 5% Polyacrylamidgelelektrophorese unterzogen.
45 Als Resultat 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 Polyacrylamidgelelektrophorese 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

- 2µg des Plasmides pYLBC-A/G-UB-HGH (ATCC74071) wurden mit Pst I und Sal I in NEB Pufferlösung 3
55 komplett abgebaut, während 2µg 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% Agarosegelelektrophorese 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 Ligationsröhrchen A wurde mit 100ng des Fragmentes K384 versehen. Das Ligationsröhrchen B wurde mit 100ng des Fragmentes K510
 10 versehen. Das Ligationsröhrchen C wurde mit 100ng des Fragmentes K573 versehen. Das Ligationsröhrchen D wurde mit 100ng des Fragmentes K897 versehen. Das Ligationsröhrchen E wurde mit 100ng des Fragmentes K403 und das Ligationsröhrchen F mit 100ng des Fragmentes K573 versehen. Zu jedem der Röhrchen 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 Gesamtvolumen von 20µl
 15 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
 20 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% Agarosegelelektrophorese 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.

Das Ligationsröhrchen G wurde mit 100ng der E2N-T2/L und das Ligationsröhrchen F mit 100ng der
 35 E2C-T2/L versehen. Zu jenem der Röhrchen wurden 100ng PL2, 100ng PT2, 2µl 10 x Ligationspufferlösung und 10 units der T4 DNA Ligase hinzugefügt. Mit destilliertem Wasser wurde das Gesamtvolumen 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

Die Hefen wurden mit den in Beispiel 3-B-2 hergestellten Expressionsvektoren transformiert, und zwar
 45 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 Budapester 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 Hefe-Nitrogenbase ohne Aminosäuren (Difco Inc., USA), 2,5g Aminosäuremischung ohne Leucin pro Liter und 5% Glucose) 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 400µl einer Pufferlösung (10mM Tris-HCl, pH 7,5, 1mM EDTA, 2mM PMSF (Phenylmethylsulfonyl-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 betätigen (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), 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-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 400µg/ml 4-chlor-1-naphthol und 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 repräsentiert 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.

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

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'-CTTGGTGTGAGACTCCGCGGTGGTTATGAAGTGGGCAACGCGTCC-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'-GACTGGACTATTACCCTGTCACGTGGGTGGTGGTTCC-3') enthält ein codon um die Translation nach dem 1509 Nucleotid des KHCV-LBC1 zu terminieren; und eine Erkennungsstelle der Sal I.

4-A-2: Herstellung des Ubiquitins

<Stufe 1>

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

UBI1: 5'- CCCCATATGCAAATTTTTCGTCAAACTCTAACAGGGAAGACTATAACCCCT
AGAGGTTGAATCTTCCGACACTATTGACAAAGTCAA-3'

UBI2: 5'-TAGTTGCTTACCAGCAAAAATCAATCTCTGCTGATCCGGAGGGATACCTT
CTTTATCTTTGAATTTTACTTTTGAAGTTGTCAATAGTCTC-3'

UBI3: 5'-ACCAACGGGGAGTCTCAACAACAAGTGAAGAGTAGATTCCCTTTTGGATGT
TGTAAGTCAGACAAGGTTCTACCATCTTCTAGTTGCTTACCAGCAAAA-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).

<Stufe 2>

Zu einer Mischung von 2µg UBI1, 0,02µg UBI2 und 2µg UBI3 wurden 10µl 10 x PCR-Pufferlösung, 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% Polyacrylamidgelelektrophorese unterworfen, um 240bp der DNA zu isolieren, die als Fragment Ub bezeichnet wird. Das isolierte Fragment wurde in 20µl TE-Pufferlösung aufgelöst.

(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.

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 Teströhrchen 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, 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 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 Nde I und Sal I 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

<Stufe 1>

- 5 2µg des ptrp 332-HGH (siehe horeanische Patentveröffentlichung Nr. 91-457, KFCC-10667) wurden vollständig mit Pst I und Sal I abgebaut und 2µg 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 <Stufe 2>

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

- Ligationsröhrchen A wurde mit 100ng UBCORE14 versehen. Ligationsröhrchen B wurde mit 100ng UBCORE17 versehen. Ligationsröhrchen C wurde mit 100ng UBCORE22 versehen. Ligationsröhrchen D wurde mit 100ng UBKHCV897 versehen. Ligationsröhrchen E wurde mit 100ng UBE2N versehen. Ligationsröhrchen F wurde mit 100ng UBE2C versehen. Ligationsröhrchen G wurde mit 100ng UBE1 versehen. Zu jedem der Röhrchen wurden 100 ng PB, 100ng PS, 2µl 10 x Ligationspufferlösung und 10 unites T4 DNA Ligase hinzugefügt. Mit destilliertem Wasser wurde das Gesamtvolumen jeweils auf 20µl eingestellt. Die 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 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).

30 (4-B): Herstellung des Vektors pMAL-KHCV, der den Tac-Promotor enthält (4-B-1): Amplifizierung der KHCV cDNA Fragmente

<Stufe 1>

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

- | | |
|---------------------|--|
| Primer PK426R : | 5'-CTCCGAATTCGGTGCTTGCAGAGTGCCCC-3' |
| Primer PK426X : | 5'-CACGCTCGAGGCATGTGAGGGTGTGCGATGAC-3' |
| Primer PSALCORE17 : | 5'-GGGGTTCGACTATTAGGGCAGATTCCCTGTTGC-3' |
| 40 Primer P426B : | 5'-GGGTGGGCAGGATGGCTCCTG-3' |
| Primer PK513R : | 5'-CTCCGAATTCGGCACGAGGCTGGAGGACGGCGTGAAC-3' |
| Primer PK513X : | 5'-CACGCTCGAGAGGGCGACCAAGTTCATCATCAT-3' |
| Primer PK810R : | 5'-CTCCGAATTCGGCACGAGGGTTTCCCAGCTGTTACACCTT-3' |
| Primer PK810X : | 5'-CACGCTCGAGATTCAGCCATGTACAACCGAACC-3' |
| 45 Primer PK798R : | 5'-CTCCGAATTCGGCACGAGGGACGTGCTGCTCCTTAAC-3' |
| Primer PK798X : | 5'-CACGCTCGAGCAGAAGCAGCGGCCATACGCC-3' |
| Primer PK754R : | 5'-AAAAAGAATTCGGCACGAGGCTGCGAGATTGGGCTCACACG-3' |
| Primer PK754X : | 5'-AAAAACTCGAGCCGCATAGTAGTTTCCATAGACTCAACGGG-TATGAATT-3' |
| 50 Primer PK652R : | 5'-AAAAAGAATTCGGCACGAGGTTTCATACCCGTTGAGTCTATG-GAA-3' |
| Primer PK652X : | 5'-ATTATTGTCGACTATCTATCTACTCGAGTCACAGCTTTGC-AGCGAGCTCGT-3' |
| Primer PK403R : | 5'-AAAAAGAATTCACGGGCATGACCACTGAC-3' |
| Primer PK403X : | 5'-ATTATTCTCGAGTATCACTCTTGCCGCCACAAGAG-3' |
| 55 Primer PK271R : | 5'-AAAAAGAATTCAGTAGCCTTACAGGCGCG-3' |
| Primer PK271X : | 5'-CACGCTCGAGTCACGTGACCAGGTAAAGGTC-3' |
| Primer PK495R : | 5'-CCCCCGAATTCGGCACGAGCGCTGCGGAGGAAAGCAAGTT-3' |
| Primer PK495X : | 5'-AAAAACTCGAGGACCACGTCATAAAGGCCA-3' |

Primer PK494R : 5' -AAAAGAATTCGGCACGAGCGATGCATCTGGTAAAAGGGT-3'
 Primer PK494X : 5'-AAACTCGAGATTGGAGTGAGTTTGAGCTT-3'

<Stufe 2>

5

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

- Tube A : Primer PK426R 2µg, Primer PK426X 2µg
- Tube B : Primer PK426R 2µg, Primer PK426B 20ng, PSALCORE17 20µg
- 10 Tube C : Primer PK513R 2µg, Primer PK513X 2µg
- Tube D : Primer PK810R 2µg, Primer PK810X 2µg
- Tube E : Primer PK798R 2µg, Primer PK798X 2µg
- Tube F : Primer PK754R 2µg, Primer PK754X 2µg
- Tube G : Primer PK652R 2µg, Primer PK652X 2µg
- 15 Tube H : Primer PK403R 2µg, Primer PK403X 2µg
- Tube I : Primer PK271R 2µg, Primer PK271X 2µg
- Tube J : Primer PK495R 2µg, Primer PK495X 2µg
- Tube K : Primer PK494R 2µg, Primer PK494X 2µg

20 Zu jedem der Röhrchen wurden 10ng KHCV-LCB1 (ATCC 75008), 10µl 10 x Polymerase-Pufferlösung, 10µl 10mM dNTP's-Mischung und 0,5µl (2 Units) der Taq-Polymerase hinzugefügt. Mit destilliertem Wasser wurde das Gesamtvolumen auf jeweils 100µl eingestellt.

Zu jeder der Peakaktionsmisch wurden 50µl 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

2µg 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 40µl TE-Pufferlösung aufgelöst.

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

1µg 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. 3µg jedes der PCR-Produkte in den Röhrchen G und I wurden komplett mittels Xho I und dann partiell mittels Eco RI abgebaut. Und 1µg 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.

40 Zu 5µl von jedem der oben genannten cDNA-Fragmente, die mit Eco RI-Xho I und Eco RI und Sal I abgebaut worden waren, wurden 2µl 10 x Ligationspufferlösung, 1µl (50ng) pMAL-CR1, behandelt mit Eco RI und Sal I, und 10 Units T4 DNA Ligase hinzugefügt. Mit destilliertem Wasser wurde das Gesamtvolumen auf 20µl 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.

45 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
 5 unter der Zugriffsnummer ATCC 68966 am 22. April 1992 hinterlegt, wobei die Hinterlegung bei der American Type Culture Collection unter den Bestimmungen des Budapester 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
 10 Stunden. 5ml der Kultur wurden in 1l M9-Medium transferiert (40mM K₂HPO₄, 22mM KH₂PO₄, 8,5mM NaCl, 18,7mM NH₄Cl, 1% Glukose, 0,1mM MgSO₄, 0,1mM CaCl₂, 0,4% Casamino-säure, 1µl/ml Vit. B₁, 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
 15 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>

20 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
 25 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,
 30 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
 35 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 gleich Weise durchgeführt, wie in Beispiel 3-C, um zu bestätigen, daß
 40 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 Budapester Vertrag hinterlegt.

Der transformierte E. coli wurde in flüssigem LB Medium kultiviert, welches 50µl/ml Ampicillin enthielt wobei für 12 Stunden geschüttelt wurde 5ml der Kultur wurden in 1l des M9 Mediums (6g Na₂HPO₄, 3g KH₂PO₄, 0,5g NaCl, 1g NH₄Cl, 2µl 1M MgSO₄, 100µl 20% Glucose, 0,1ml CaCl₂ 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
 55 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.

<Stufe 2>

Der Zelniederschlag 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-KHCV 798, 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 CaCl₂, 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

55

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.

10l 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 Schlamm mit rekombinanten Hefezellen zu erhalten.

Stufe 2: Aufbrechen der Hefezellen

Die in Stufe 1 erhaltenen rekombinanten Hefezellen wurden in 500ml Puffer suspendiert (50mM Tris, pH 8,5, 5mM EDTA, 10mM β -mercaptoethanol, 1mM Phenylmethylsulfonylfluorid, 1 μ g/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 affinitäts-gereinigt 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 400 μ g/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 Niederschlages mit Harnstoff

Der in Stufe 4 erhaltene Niederschlag wurde in 750ml eines Puffers (50mM Tris, pH 8,5, 5mM EDTA, 10mM β -mercaptoethanol, 1mM Phenylmethylsulfonylfluorid, 1 μ 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 β -mercaptoet-

hanol) mit einen 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 β -mercaptoethanol, 1mM Phenylmethylsulfonylfluorid, 1 μ 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 einen Puffer (10mM Tris, pH 9,0, 2mM EDTA, 5mM β -mercaptoethanol) mit einen Gehalt an 2M Harnstoff dialysiert und zentrifugiert, um die Niederschläge zu entfernen und ein Überstand zu erhalten, der das KHCV 403 Protein enthielt.

10

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 einen Puffer (10mM Tris, pH 9,0, 2mM EDTA, 5mM β -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 β -mercaptoethanol) mit einem Gehalt an 0,2M Natriumchlorid hinzugefügt wurden.

20

Stufe 7: Zweite DEAE Ionentausch-Chromatographie

Die Proteinfractionen, die das KHCV 403 Protein enthielten, wurden gesammelt und mit einen Puffer (10mM Tris, pH 9,0, 2mM EDTA, 5mM β -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 β -mercaptoethanol) enthaltend 0,1M Natriumchlorid, wurde abgegeben, um das eluierte Protein abzutrennen. 500ml des Puffers mit einem Konzentrationsgradienten von 0,1M bis 0,2M Natriumchlorid wurden zugegeben, um die säule-gebundenen Proteine zu fraktionieren. Die Fraktionen wurden der SDS-PAGE unterworfen, um die Fraktionen zu sammeln, die hochgereinigtes KHCV 403 Protein enthalten.

30

Stufe 8: FPLC-phenyl Chromatographie

Die in Stufe 7 erhaltenen Fraktionen wurden mit einen Puffer (50mM Tris, pH 7,4, 2mM EDTA, 5mM β -mercaptoethanol), der 1,5M Natriumchlorid enthielt, dialysiert und über eine FPLC-phenylsuperosäule geschickt (Pharmacia, HR 10/10, 1cm x 8cm, USA), die mit dem genannten Puffer äquilibriert worden war. 160ml des Puffers, der einen Konzentrationsgradienten von 1,5 bis 0M Natriumchlorid enthielt, wurden zugegeben, um die Proteine zu fraktionieren. Die Fraktionen wurden der SDS-PAGE unterworfen, um die Reinheit zu identifizieren. Die Fraktionen mit einem Gehalt hochgereinigter KHCV 403 Proteine wurden separat gesammelt, um KHCV 403 Proteine mit einer Reinheit größer 95% zu erhalten.

40

5-B: Reinigung des KHCV CORE 14 Proteins

Stufe 1: Kultur rekombinanter Hefezellen

45

Saccharomyces cerevisiae DC04-UB-CORE 14, transformiert mit einem Vektor (pYLBC-A/G-UB-CORE14) und enthaltend ein cDNA Fragment, welches das KHCV CORE 14 Protein kodiert, und Ubiquitin-Gen wurden in einem Leucin freien Medium kultiviert, welches 5% Glucose enthielt, entsprechend dem Verfahren der Stufe 1 des Beispiels 5-A. 20ml der Kultur wurden in 100ml YEPD Medium transferiert, welches 4% Glucose enthielt, und es wurde unter Schütteln bei 30 °C für 6 Stunden kultiviert. Das Resultat wurde in 1l YEPD Medium mit 2% Glucose transferiert und bei 30 °C für 24 bis 48 Stunden kultiviert. Die Kultur wurde zentrifugiert, um den Zellenniederschlag zu sammeln.

50

Stufe 2: Aufbrechen der Hefezellen

55

Die rekombinanten Hefezellniederschläge gemäß Stufe 1 wurden in 30ml eines Puffers (50mM Tris, pH 7,5, 5mM EDTA, 10mM β -mercaptoethanol, 1mM Phenylmethylsulfonylfluorid, 1 μ g/ml Pepstatin) suspendiert und Glasperlen mit einem Durchmesser von 0,4mm wurden in einer Menge zugegeben, die äquivalent

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
10 folgenden als KHCV CORE 14 Protein bezeichnet) wurde mit einem Molekulargewicht von etwa 16.000 Dalton gebildet.

Western Blotting wurde gemäß Stufe 3 des Beispiels 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
20 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 β -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 β -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
30 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)-Sephroseharz (Pharmacia, Sweden)
35 geschickt, die mit einem Puffer äquilibriert worden war (pH 6,5) der 6M Harnstoff, 1mM EDTA, 10mM β -mercaptoethanol und 10mM Phosphat enthielt. Die in der Säule in freier Form verbleibenden 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
40 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 Sephacryl Säule geschickt (Pharmacia, Sweden, 2,5cm x 100cm), die mit einer PBS Lösung äquilibriert worden war, die 6M Harnstoff,
50 1mM EDTA und 10mM β -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
55 Hefe exprimiert werden, ebenso durch andere, ähnlich dem zuvor beschriebenen Verfahren gereinigt werden können.

Beispiel 6: Reinigung des KHCV-Proteins, exprimiert in E. coli6-A: Reinigung des KHCV UB 897 Proteins5 Stufe 1: Kultur rekombinanter E. coli

E. coli W3110 ptrpH-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 Bactotripton, 5g Hefeextrakt, 10g NaCl pro Liter) enthaltend 50µg/ml Ampizillin kultiviert. 5ml der Kultur wurden in 1l M9 Medium transferiert (40mM K₂HPO₄, 22mM KH₂PO₄, 8,5mM NaCl, 18,7mM NH₄Cl, 1% Glucose, 0,1mM MgSO₄, 0,1mM CaCl₂, 0,4% Casaminoäure, 10µg/ml von Vit. B₁), 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 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 Zelleniederschlags der Stufe 1 wurden in 40ml eines Puffers (50mM Tris, pH 8,5, 5mM EDTA, 2mM β-mercaptoethanol, 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 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 (nachfolgend 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 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 Niederschlags 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-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 JA 14) zentrifugiert, um den Überstand zu entfernen und den unlöslichen Niederschlag zu erhalten. Darauf folgend wurde der Niederschlag in 50ml eines Puffers (50mM Tris, pH 8,5, 5mM EDTA 2mM β-mercaptoethanol) suspendiert. Die Suspension wurde gerührt und nochmals zentrifugiert, um den Überstand zu entfernen und den unlöslichen Niederschlag zu erhalten.

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

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 β -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 β -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 Proteinfractionen wurden der SDS-PAGE unterworfen, um die Fraktionen zu sammeln, die hochgereinigtes KHCV UB 897 Protein enthielten.

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

Die in Stufe 7 gesammelten Proteinfractionen mit dem KHCV UB 897 Protein wurden gegen einen Puffer (10mM Tris, pH 8,5, 2mM EDTA, 2mM β -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.

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 μ g/ml Ampizillin, 100 μ 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 Beispiels 6-A beschrieben.

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 β -mercaptoethanol, 1mM Phenylmethylsulfonylfluorid, 1 μ 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

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).
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 Beispiels 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.

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

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 β -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 β -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.

20

Stufe 7: S-200 Gel-Permeation-Chromatographie

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

30

6-C: Reinigung des UB-E1 Proteins

Stufe 1: Kultur rekombinanter Bakterienzellen

35

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 Beispiels 6-A.

40

Stufe 2: Aufbrechen der Zellen

Der in Stufe 1 erhaltene Bakterienzellenniederschlag wurde in 50ml eines Puffers 1 (20mM Tris, pH 7,5, 1mM EDTA, 2mM β -mercaptoethanol, 1mM Phenylmethylsulfonylfluorid, 1 μ 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.

45

Stufe 3: Identifizierung der Expression des spezifischen Antigens

50

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 μ m) und auf die gleiche Weise wie in Stufe 3 des Beispiels 5-A dem Western-Blotting unterworfen.

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 β -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 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 unlöslichen Proteine zu er

halten. 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 β -mercaptoethanol) enthielt. Die 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 β -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

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 einen Konzentrationsgradienten von 0 bis 0,4M Natriumchlorid zugegeben, um die gebundenen Proteine zu eluieren. Die Proteinfraction 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

45

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 μ g/ml Ampizillin und 100 μ 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 Zellschlamm wurde gesammelt, wie im gleichen Prozeß der Stufe 1 des Beispielles 6-A.

55

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 β -mercaptoethanol, 1mM Phenylmethylsulfonylfluorid, 1 μ 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

- 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).

- 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 Beispiels 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.

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

- 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 β -mercaptoethanol und 10mM Acetat. Die in der Säule zurückbleibenden Materialien in freier Form wurden 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 in der nächsten Stufe gesammelt.

Stufe 7: S-200 Gel-Permeations-Chromatographie

- Die in Stufe 6 gesammelten Fraktionen wurden über eine YM5 Ultrafiltrationsmembran geschickt (Amicon, USA), um eine Konzentration auf ein Volumen von 10ml herbeizuführen. Das Konzentrat wurde über eine S-200 Sephacrylsäule geschickt (2,5cm x 100cm, Pharmacia, Sweden), die mit einer PBS Lösung äquilibriert worden war, die 6M Harnstoff, 1mM EDTA und 1mM β -mercaptoethanol enthielt, wobei eine Flußrate von 0,5ml/min eingehalten wurde, um die Proteine entsprechend ihres Molekulargewichtes aufzutrennen. Die Proteinfractionen 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 β -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 β -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.

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

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 μ g/ml Ampicillin enthielt. 10ml der Kultur wurden in 1l M9-Medium transferiert, welches 2% Casaminoäure und 10 μ g/ml Tryptophan enthielt. Es wurde unter Schütteln bei 37°C für etwa 3 Stunden kultiviert. Der Kultur wurde Indolacrylsäure (IAA) bis zu einer Endkonzentration von 50 μ g/ml zugegeben, 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 Zellschlag zu sammeln. Der Niederschlag wurde einmal mit PBS gewaschen.

30 Stufe 2: Identifikation des spezifischen Antigens

Das Homogenisat 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 Immobilon-P-Filter übertragen (Millipore, Cat.No. IPUH 00010, Porengröße 0,45 μ 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 unspezifische Bindung des Immunglobulins 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 mildem Schwenken bei Raumtemperatur für eine Stunde reagieren gelassen und 4mal je 5 Minuten mit PBS gewaschen, welches 0,05% Tween 20 enthielt. Antihuman-Immunglobulin G, markiert mit einer alkalischen Phosphatase (Boehringer Mannheim, 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 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 μ g/ml Nitro-Blue-Tetrazolium (Pierce, NBT) und 25 μ g/ml Bromchlorindolphosphat (Pierce, BCIP) enthielt, um die Farbentwicklung zu entwickeln. Als Ergebnis zeigte sich, daß das UB-E2N-Protein im gesamten Zellschlag 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

Etwa 3g des in Stufe 1 erhaltenen Zellschlags wurde in 50ml Puffer 1 suspendiert (20mM Tris, pH 7,5, 1mM EDTA, 2mM β -Mercaptoethanol, 1mM Phenylmethylsulfonylfluorid, 1 μ 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 β -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.

15 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 β -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: 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 Ionentauschchromatographie

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 β -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-ProteinsStufe 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 Ampizillin 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, 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 Zellschlag 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 Immunglobulins 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. Anthuman-Immunglobulin 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.

30 Dem Filter wurden 50mM Tris-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 Zellschlag immunologisch mit dem Serum eines Hepatitis-C-Patienten reagiert hatte, um ein sichtbares Band zu zeigen.

Stufe 3: Aufbrechen der Zellen und Entfernung des löslichen Proteins

Etwa 1g des in Stufe 1 erhaltenen Zellschlags wurde in 50ml Lysispuffer suspendiert (20mM Tris, pH 7,5, 1mM EDTA, 2mM β-Mercaptoethanol, 1mM Phenylmethylsulfonylfluorid 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 (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.

Stufe 5: Auflösen des unlöslichen Niederschlags mit 8M Harnstoff

Der unlösliche Niederschlag, der das UB-E2C-Protein der Stufe 4 enthält, wurde in 20ml Puffer 2 suspendiert (50mM Carbonat, pH 9,5, 1mM EDTA, 2mM β -Mercaptoethanol), der 8M Harnstoff enthält. 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

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 enthält. 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.

Stufe 7: Entfernung des Harnstoffs und FPLC-Phenylchromatographie

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 β -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, 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

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

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 μ g/ml, 2,0 μ g/ml und 2,0 μ g/ml verdünnt. Die verdünnten Proteinlösungen wurden in die Öffnungen einer Mikrontiterplatte (Dynatech, Immulon Typ 1 Mikrontiterplatte) in einer Menge von 200 μ 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.

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) enthält. Die PBS mit einem Gehalt an 0,1% Gelatine (v/v) wurde den Öffnungen in einer Menge von 210 μ l/Öffnung zugegeben. Es wurde bei 37°C für 2 Stunden inkubiert. Die Öffnungen wurden 2x mit 300 μ l der genannten Waschlösung gewaschen. Es wurden 190 μ l PBS mit 0,25% Gelatine, 1mM EDTA, 1,0% (v/v) Triton X-100 und 0,02% Thimerosal sowie 10 μ l einer positiven Serumprobe eines HCV Patienten oder eine negative Serumprobe zu jeder Öffnung zugegeben 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.

Die Öffnungen (wells) wurden nach einer Reaktionszeit von 1 Stunde bei 37°C 5x mit 300 μ l der Waschlösung gewaschen. Anti-human IgG gamma-Ketten Immunglobulin, 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 enthält. Die verdünnte Lösung wurde den Öffnungen in einer Menge von 200 μ 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 μ l O-Phenylendiamindihydrochlorid (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 μ l

4N schwefelige Säure pro Öffnung zugegeben, um die Farbreaktion zu stoppen. Die O.D. jeder Öffnungen wurden bei einer Wellenlänge von 492nm mit einem Dynatech Microtiter Plate 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 200µl/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 0,75µg/ml für das KHCV UB-CORE 14 Protein, 0,06 bis 0,3µg/ml für das KHCV 897 Protein und 0,12 bis 0,5µg/ml für das KHCV 403 Protein. 15 Bei diesem Beispiel wurden jeweils 0,3µg/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 (210µg/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 190µl 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 10µl 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 200µl 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. 200µl OPD Lösung wurden zugegeben, um bei Raumtemperatur für 30 Minuten eine 30 Farbreaktion zu entwickeln. Danach wurden pro Öffnung 50µl 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.

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

40

45

50

55

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 |
| 1 | ++ | +++ | - | ++++ | - |
| 2 | ++++ | ++++ | ++ | ++++ | + |
| 3 | + | - | - | ++ | - |
| 4 | + | + | - | ++ | - |
| 5 | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | + |
| 6 | ++ | - | - | +++ | - |
| 7 | ++++ | +++ | - | ++++ | + |
| 8 | - | ++ | - | +++ | - |
| 9 | - | - | +++ | ++++ | - |
| 10 | - | +++ | - | ++++ | - |
| 11 | ++ | + | - | +++ | - |
| 12 | ++++ | +++ | +++ | ++++ | + |
| 13 | ++ | - | - | ++ | - |

Bemerkung:

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

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.

Tabelle 2

| 5 | 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* |
| | | 5-1-1 | C100-3 | C33c | C22-3 | SOD | |
| 10 | 1** | +/- | +/- | - | - | - | - |
| | 2 | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | - | ++++ |
| | 3 | + | +/- | ++++ | ++++ | - | ++++ |
| | 4 | + | ++++ | ++++ | +/- | - | ++++ |
| | 5 | - | - | - | - | - | - |
| 15 | 6 | - | - | - | - | - | - |
| | 7 | - | +/- | - | - | - | - |
| | 8 | - | - | - | - | - | - |
| | 9 | - | +/- | - | - | - | - |
| | 10 | - | - | - | - | - | - |
| 20 | Positive | ++ | ++++ | ++++ | ++ | - | ++++ |
| | Controlle | - | - | - | - | - | - |
| | Negative | - | - | - | - | - | - |
| | Controlle | - | - | - | - | - | - |

* 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.

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 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 CH₃HgOH gemischt und bei Raumtemperatur für 10 Minuten stengelassen. 0,5µl 1M β-mercaptoethanol, 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-Reversetranscriptase (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.

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 MgCl₂, 0,1% (w/v) Gelatine), 10µl einer Mischung von 1,25mM dNTPs, 2µg Primer A 5'-CATAGTGGTCTGCGGAACCG-3', 2µg Primer B 5'-TTGAGGTTT-AGGATTCGTGC-3' und 75µl destilliertem

Wasser vermischt. 50µl 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 1µl des Produktes der ersten PCR mit 1µl des Primers C 5'-TA-CACCGGAATTGCCAGGAC-3' und 1µl des Primers D 5'-TCATGGTGACGGTCTACGAG-3' vermischt worden waren.

Etwa 5µl 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 50µg des Proteins wurden einer etwa 10 Wochen alten Balb/c Maus intraperitoneal injiziert. 30µg 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 100µg des Proteins in 0,5ml Salzlösung wurden weiters injiziert, wenn der Titer 10.000 erreichte. Der Antikörper-Titer wird 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 monoklonalen Antikörper produziert.

9-B: Zellfusion

Immunisierte Milzzellen wurden mit P3 x 63 Ag8.653 (ATCC CRL 1580) fusioniert, die eine Myelomzelle der Maus ist. 5×10^7 Milzzellen der immunisierten Maus wurden mit 2×10^7 P3 x 63-Ag8.653 gemischt und bei 300 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Zellschlag 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 Zellschlag unter Rühren zugegeben. Weiters wurde bei 200 x g 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, 100µM Hypoxanthin, 0,4µM Aminopterin und 16µM Thymidin zu dem IMDM Medium, wurde hinzugefügt, um die Zellkonzentration auf 5×10^5 Zellen P3 x 63 Ag8.653 pro ml zu verdünnen. Das Produkt wurde auf eine Platte (96 Öffnungen) für Gewebeskulturen in einer Menge von 0,1ml/Öffnung gegeben. Den Öffnungen wurden jeweils 0,1ml IMDM-HAT Medium mit 1×10^5 Zellen/ml intraperitoneale Makrophagen zugeführt und einen Tag vor der Fusion kultiviert. Die myelomische 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 Enzymimmunoassay (enzyme immunoassay) durchgeführt.

Stufe 1

KHCV 897 Protein wurde in 50mM Natriumboratpuffer (pH 9,0) gelöst, bis eine Konzentration von 2µg/ml vorlag. 100µl 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). 200µl 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

Die Öffnungen der Stufe 2 wurden 2x mit der Waschlösung gewaschen. 50µl 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. 50µl des Überstandes, in dem fusionierte Zellen gewachsen waren, wurden zu jeder Öffnung zugegeben und bei einer Temperatur von 37 °C für 1 Stunde inkubiert.

Stufe 4

Die in Stufe 3 behandelten Öffnungen wurden 5x mit der Waschlösung gewaschen. Anti-Maus IgG-HRP (Boehringer Mannheim, Cat. No. 605-250), markiert mit Horseradish-Peroxide (HRP) wurde mit PBS verdünnt, die 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 enthält. Die verdünnte Lösung wurde zu den Öffnungen in einer Menge von 100µl/Öffnungen zugegeben und bei einer Temperatur von 37 °C für 1 Stunde inkubiert. Nach der Reaktion wurde die Platte 5x mit der Waschlösung gewaschen.

Stufe 5

100µl 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 50µl 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.

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 Aszitenflüssigkeit, die die Klone enthielt, die im Peritoneum einer Balb/C Maus gewachsen waren.

2,5 x 10⁶ 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 Serooperitoneumflüssigkeit erhalten. Daraus wurden Antikörper nach einer konventionellen Methode isoliert.

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.

Stufe 2: Enzymimmunoassay

200µl KHCV 897 Protein, aufgelöst in 50mM Natriumboratpuffer in einer Konzentration von 2µg/ml 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. 210µl 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.

200µl der anti-Maus IgG (Boehringer Mannheim, 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

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-Sepharosesäulenaффinitätschromatographie (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.

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.

- | | |
|-----------------------|---|
| (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. |
| (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. |
| (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. |
| (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

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 |

10

15

Tabelle 4

20

| 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 |

25

30

35

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

40

Beispiel 10: Diagnosemittel mit einem Antikörper gegen KHCV Antigen

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

45

In eine ersten Stufe wurde die genannte Lucky 1.1 Zelllinie mit Horseradish-Peroxidase markiert, indem die bekannte Periodate Method (Nakane et al., J. Histochemcytochem., 22, 1084 (1974)) wie folgt angewendet wurde. 0,3ml 0,1M Natriumperodat 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 Natriumcetatpuffer 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 Sephacryl S 300 Chromatographiersäule geschickt, um monoklonale Antikörper zu entfernen, die nicht markiert waren.

50

55

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

200µl der 5µg/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.

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). 200µl 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

200µl 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. 100µl des verdünnten Blutes wurden mit 100µl 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 beigemischt 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.

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

200µl Lucky 1.1, das auf eine Konzentration von 5µg/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. 200µl des O.P.D.-Entwicklungsreagens, welches durch Zugabe von O-Phenylendiamin(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. 50µl 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 dagestellt.

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

100µl eines zu analysierenden Serums, welches mit 100µl 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 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 ¹⁾ |
|------------|--------------|---------------------------|
| ≥ 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: ¹⁾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: ¹⁾ 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.

Patentansprüche

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

```

15      10      20      30      40      50      60
GGCCAGCCCCCGATTGGGGGCGACACTCCACCATAGATCACTCCCCCTGTGAGGAAGTACT
CCGTCGGGGGCTAACCCCGCTGTGAGGTGGTATCTAGTGAGGGGACACTCCTTGATGA

20      70      80      90      100     110     120
GTCTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTCGTGCAGCCTCCAGGA
CAGAAGTGCGTCTTTCGCAGATCGGTACCGCAATCATACTCACAGCACGTTCGGAGGTCCT

25      130     140     150     160     170     180
CCCCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCCA
GGGGGGGAGGGCCCTCTCGGTATCACCAGACGCCTTGCCACTCATGTGGCCTTAACGGT

30      190     200     210     220     230     240
GGACGACCGGGTCCTTTCTTGGATCAACCCGCTCAATGCCTGGAGATTTGGGGCGTGCCCC
CCTGCTGGCCCAGGAAAGAACCTAGTTGGGCGAGTTACGGACCTCTAAACCCGCACGGGG

35      250     260     270     280     290     300
CGCGAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTTGGGTCGCGAAAGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAG
GCGCTCTGACGATCGGCTCATCACAACCCAGCGCTTTCGGGAACACCATGACGGACTATC

40      310     320     330     340     350     360
GGTGCTTGCGAGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCACCATGAGCACGAATCCTAAA
CCACGAACGCTCACGGGGCCCTCCAGAGCATCTGGCACGTGGTACTCGTGCTTAGGATTT
                                     M S T N P K

45      370     380     390     400     410     420
CCTCAAAGAAAAACCAACGTAACACCAACCGCCGCCACAGGATATTAAGTTCCCGGGC
GGAGTTTCTTTTGGTTTGCATTGTGGTTGGCGGGGGTGTCTTATAATTCAAGGGCCCCG
P Q R K T K R N T N R R P Q D I K F P G

50      430     440     450     460     470     480
GGTGGTCAGATCGTTGGTGGAGTTTACTTGTGTGCCGCGCAGGGGGCCCCAGGTTGGGTGTG
CCACCAGTCTAGCAACCACCTCAATGAACAACGGCGCGTCCCCGGGGTCCAACCCACAC
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
CGCGCGACTAGGAAGACTTCCGAGCGGTGCGAACCTCGTGGAAGGCGACAGCCTATCCCC
GCGCGCTGATCCTTCTGAAGGCTCGCCAGCGTTGGAGCACCTTCCGCTGTCGGATAGGGG
R A T R K T S E R S Q P R G R R Q P I P

60      550     560     570     580     590     600
AAGGCTCGCCGGCCCCGAGGGCAGGGCCTGGGCTCAGCCCCGGGTACCCTTGGCCCCCTCTAT
TTCCGAGCGGGCCGGGCTCCCGTCCCGGACCCGAGTCGGGGCCCATGGGAACCGGGGAGATA
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
GGCAATGAGGGCTTGGGGTGGGCAGGATGGCTCCTGTACCCCCGCGGCTCCCGGCCTAGT
CCGTTACTCCCGAACCCACCCGTCCTACCGAGGACAGTGGGGCGCCGAGGGCCGGATCA
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
TGGGGCCCCACGGACCCCCGGCGTAAGTCGCGTAATTTGGGTAAAGGTCATCGACACCCCTC
ACCCCGGGGTGCCTGGGGGGCCGCATTCAGCGCATTAACCCATTCCAGTAGCTGTGGGAG
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
ACATGCGGCTTCGCCGACCTCATGGGGTACATTCCGCTCGTCGGCGCCCCCTAGGGGGC
TGTACGCCGAAGCGGCTGGAGTACCCCATGTAAGGCGAGCAGCCGCGGGGGGATCCCCCG
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
GTTGCCAGGGCCCTGGCACATGGTGTCCGGGTGCTGGAGGACGGCGTGAACATGCAACA
CAACGGTCCCGGGACCGTGTACCACAGGCCACGACCTCCTGCCGCACTTGATACGTTGT
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
GGGAATCTGCCCGGTTGCTCTTTCTCTATCTTCTCTGGCTCTGCTGTCTTGTGTTTGACC
CCCTTAGACGGGCCAACGAGAAAGAGATAGAAGGAGAACCGAGACGACAGAACAACTGG
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
ACCCAGTTTCCGCTTATGAAGTGCCTAACGCGTCCGGGATGTACCATGTCACGAACGAC
TGGGGTCAAAGGCGAATACTTCACGCATTGCGCAGGCCCTACATGGTACAGTGCTTGCTG
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
TGCTCCAACCTCAAGCATTGTGTATGAGGCAGCGGACATGATCATGCACACTCCCGGGTGC
ACGAGGTTGAGTTCGTAACACATACTCCGTGCGCTGTACTAGTACGTGTGAGGGCCCCACG
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
GTCCCTGCGTTCCGGGAGGACAACCTCCCTCCCGTTGCTGGGTGGCACTTACTCCCACGCTC
CACGGGACGCAAGCCCTCCTGTTGAGGAGGGCAACGACCCACCGTGAATGAGGGTGGGAG
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
GCGGCCAGGAATGCCAGCGTCCCCACTACGACATTGCGACGCCATGTGCACTTGCTCGTT
CGCCGGTCTTACGGTCCGAGGGGTGATGCTGTAACGCTGCGGTACAGCTGAACGAGCAA
A A R N A S V P T T T L R R E V D L L V

45 1150 1160 1170 1180 1190 1200
GGGGTAGCTGCTTTCTGTTCCGCTATGTACGTGGGGGACCTCTGCGGATCTGTTTTCCTT
CCCCATCGACGAAAGACAAGGCGATACATGCACCCCTGGAGACGCCTAGACAAAAGGAA
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
GTTTCCCAGCTGTTTCACCTTTTCGCCTCGCCGGCATGAGACGGTACAGGACTGCAACTGC
CAAAGGGTCGACAAGTGGAAGCGGAGCGGCCGTACTCTGCCATGTCCTGACGTTGACG
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
TCAATCTATCCCGGCCGCGTATCAGGTCCACCGCATGGCCTGGGATATGATGATGAACTGG
AGTTAGATAGGGCCGCGCATAGTCCAGTGGCGTACCGGACCCTATACTACTACTTGACC
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
TCGCCTACAACAGCCCTAGTGGTATCGCAGCTACTCCGGATCCCACAAGCTGTCGTGGAC
AGCGGATGTTGTCGGGATCACCATAGCGTCGATGAGCCCTAGGGTGTTCGACAGCACCTG
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
ATGGTGACAGGGTCCCACTGGGGAATCCTGGCGGGCCTTGCCCTACTATTCCATGGTGGGG
TACCACTGTCCAGGGTGACCCCTTAGGACCGCCCGGAACGGATGATAAGGTACCACCCC
20 M 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
AACTGGGGCTAAGGTCTTAATTGCGATGCTACTCTTTGCCGGCGTTGACGGAACCACCCAC
TTGACCCGATTCCAGAATTAACGCTACGATGAGAAACGGCCGCAACTGCCTTGGTGGGTG
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
GTGACAGGGGGGGCGCAAGGTGCGGGCCGCTAGCTCGCTAACGTCCCTCTTTAGCCCTGGG
CACTGTCCCCCCCCGCGTTCCAGCCCGCGCATCGAGCGATTGCAGGGAGAAATCGGGACCC
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
CCGGTTCAGCACCTCCAGCTCATAAACACCAACGGCAGCTGGCATATCAACAGGACCGCC
GGCCAAGTCGTGGAGGTGAGTATTTGTGCTTGCCGTCGACCGTATAGTTGTCTGCGCGG
35 P V Q H L Q L I N T N G S W E I N R T A

1630 1640 1650 1660 1670 1680
CTGAGCTGCAATGACTCCCTCAACACTGGGTTTGTGTCGCGCTGTTCTACAAATACAGG
GACTCGACGTTACTGAGGGAGTTGTGACCCAAACAACGGCGCGACAAGATGTTTATGTCC
40 L S C N D S L N T G F V A A L F Y K Y R

1690 1700 1710 1720 1730 1740
TTCAACGCGTCCGGGTGCCCGGAGCGCTTGGCCACGTGCCGCCCCATTGATACATTGCGG
AAGTTGCGCAGGCCCCACGGGCCTCGCGAACCGGTGCACGGCGGGGTAAGTATGTAAGCGC
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
CAGGGGTGGGGTCCCATCACTTACACTGAGCCTCATGATTTGGATCAGAGGCCCTATTGC
GTCCCCACCCAGGGTAGTGAATGTGACTCGGAGTACTAAACCTAGTCTCCGGGATAACG
50 Q G W G P I T Y T E P E D L D Q R P Y C

55

AT 405 053 B

1810 1820 1830 1840 1850 1860
TGGCACTACGCGCCTCAACCGTGTGGTATTGTGCCACGTTGCAGGTGTGTGGCCCAAGTA
ACCGTGATGCGCGGAGTTGGCACACCATAACACGGGTGCAACGTCCACACACCGGGTCAT
W H Y A P Q P C G I V P T L Q V C G P V
5
1870 1880 1890 1900 1910 1920
TACTGCTTCACCCCGAGTCTGTGCGGTGGGACTACCGATCGTTTCGGTGCCCTACA
ATGACGAAGTGGGGCTCAGGACAACGCCACCCCTGATGGCTAGCAAAGCCACGGGGATGT
Y C F T P S P V A V G T T D R F G A P T
10
1930 1940 1950 1960 1970 1980
TACAGATGGGGGGCAAATGAGACGGACGTGCTGCTCCTTAACAACGCCGGGCGCCGCAA
ATGTCTACCCCCCGTTTACTCTGCCTGCACGACGAGGAATTGTTGCGGGCCGCGCGGCTT
Y R W G A N E T D V L L L N N A G P P Q
15
1990 2000 2010 2020 2030 2040
GCCAACTGGTTTCGGCTGTACATGGATGAATGGCACTGGGTTTCACCAAGACATGTGGGGGC
CCGTTGACCAAGCCGACATGTACCTACTTACCGTGACCCAAAGTGTTCTGTACACCCCCG
G N W F G C T W M N G T G F T K T C G G
20
2050 2060 2070 2080 2090 2100
CCCCCGTGTAACATCGGGGGGTCGGCAACAATACCTTGACCTGCCCCACGGACTGCTTC
GGGGGCACATTGTAGCCCCCCCAGCCGTTGTTATGGAAGTGGACGGGGTGCCTGACGAAG
P P C N I G G V G N N T L T C P T D C F
25
2110 2120 2130 2140 2150 2160
CGAAAGCACCCCGGGGCCACTTACACCAAATGCGGTTTCGGGGCCTTGTTAAACACCCAGG
GCTTTCGTGGGGCCCCGGTGAATGTGTTTACGCCAAGCCCCGGAACCAATTGTGGGTCC
R K E P G A T Y T K C G S G P W L T P R
30
2170 2180 2190 2200 2210 2220
TGCTTAGTTCGACTACCCGTACAGGCTCTGGCATTACCCCTGCACTGTCAACTTTACCATC
ACGAATCAGCTGATGGGCATGTCCGAGACCGTAATGGGGACGTGACAGTTGAAATGGTAG
C L V D Y P Y R L W E Y P C T V N F T I
35
2230 2240 2250 2260 2270 2280
TTTAAGGTTAGGATGTACGTGGGGGGCGCGGAGCACAGGCTCGACGCCGCATGCAACTGG
AAATTCCAATCCTACATGCACCCCCCGCGCCTCGTGTCCGAGCTGCGGCGTACGTTGACC
F K V R M Y V G G A E E R L D A A C N W
40
2290 2300 2310 2320 2330 2340
ACTCGGGGAGAGCGTTGTGACCTGGAGGACAGGGATAGGTCAGAGCTTAGCCCCGTGCTG
TGAGCCCCCTCTCGCAACACTGGACCTCCTGTCCCTATCCAGTCTCGAATCGGGGCGACGAC
T R G E R C D L E D R D R S E L S P L L
45
2350 2360 2370 2380 2390 2400
CTGTCTACAACAGAGTGGCAGGTACTGCCCTGTTCCCTTCACAACCCTACCGGCTCTGTCC
GACAGATGTTGTCTCACCGTCCATGACGGGACAAGGAAGTGTGGGATGGCCGAGACAGG
L S T T E W Q V L P C S F T T L P A L S
50
55

AT 405 053 B

2410 2420 2430 2440 2450 2460
ACTGGTTTGTATTCATCTCCATCAGAACATCGTGGACATACAATACCTGTACGGTATAGGG
TGACCAAACTAAGTAGAGGTAGTCTTGTAGCACCTGTATGTTATGGACATGCCATATCCC
T G L I E L E Q N I V D I Q Y L Y G I G
5
2470 2480 2490 2500 2510 2520
TCGGCGGTTGTCTCCTTTGCGATCAAATGGGAGTATATTGTGCTGCTCTTCCTTCTTCTG
AGCCGCCAACAGAGGAAACGCTAGTTTACCCTCATATAACACGACGAGAAGGAAGAAGAC
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
GCGGACGCGCGCGTCTGCGCTTGCTTGTGGATGATGCTGCTGGTAGCGCAAGCCGAGGCC
CGCCTGCGCGCGCAGACGCGAACGAACACCTACTACGACGACCATCGCGCTTCGGCTCCGG
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
GCCTTAGAGAACCTGGTGGTCCTCAATGCAGCGTCCGTGGCCGGAGCGCATGGCATTCTT
CGGAATCTCTTGGACCACCAGGAGTTACGTGCGAGGCACCGGCCTCGCGTACCGTAAGAA
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
TCCTTCATTGTGTTCTTCTGTGCTGCCTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTTCCCGGAGCG
AGGAAGTAACACAAGAAGACACGACGACCATGTAGTTCCCGTCCGACCAAGGGCCTCGC
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
GCATACGCCCTCTATGGCGTATGGCCGCTGCTTCTGCTTCTGCTGGCGTTACCACCACGG
CGTATGCGGGAGATACCGCATACCGGCGACGAAGACGAAGACGACCGCAATGGTGGTGCC
A Y A L Y G V W P L L L L L L A L P P R
30
2770 2780 2790 2800 2810 2820
GCGTACGCCATGGACCGGGAGATGGCCGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTTGTAGGTCTG
CGCATGCGGTACCTGGCCCTCTACCGGCGTAGCACGCCTCCGCGCCAAAACATCCAGAC
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
GTACTCTTGACCTTGTCAACCACTATAAAGTGTTTCCTTGCCAGGTTTCATATGGTGGCTA
CATGAGAACTGGAACAGTGGTGTGATATTTTACAAGGAACGGTCCAAGTATAACCACCGAT
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
CAATATCTCATCACCAGAACCAGAAGCGCATCTGCAAGTGTGGGTCCCCCTCTCAACGTT
GTTATAGAGTAGTGGTCTTGGCTTCGCGTAGACGTTACACCCAGGGGGGAGAGTTGCAA
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
CGGGGGGGTTCGCGATGCCATCATCCTCCTCACATGCGTGGTCCACCCAGAGCTAATCTTT
GCCCCCCCAGCGCTACGGTAGTAGGAGGAGTGACGCACCAGGTGGGTCTCGATTAGAAA
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

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

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

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

20 3190 3200 3210 3220 3230 3240
ACGTACGTTTATGACCATCTTACTCCACTGCGAGATTGGGCTCACACGGGCTTACGAGAC
TGCATGCAAATACTGGTAGAATGAGGTGACGCTCTAACCCGAGTGTGCCCCGAATGCTCTG
T Y V Y D H L T P L R D W A E T G L R D

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

30 3310 3320 3330 3340 3350 3360
GGGGCAGACACCGCGCGGTGCGGGGACATCATCTTGGCCCTGCCTGCTTCCGCCCGAAGG
CCCCGTCTGTGGCGCCGACGCCCCCTGTAGTAGAACCGGGACGGACGAAGGCGGGCTTCC
G A D T A A C G D I I L A L P A S A R R

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

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

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

50 3550 3560 3570 3580 3590 3600
CAATCTTTCTTGGCGACCTGCATCAATGGCGTGTGTTGGACTGTCTTCCACGGCGCCGGC
GTTAGAAAAGGACCGCTGGACGTAGTTACCGCACACAACCTGACAGAAGGTGCCGCGGGCG
Q S F L A T C I N G V C W T V F E G A G

55

AT 405 053 B

3610 3620 3630 3640 3650 3660
 TCAAAGACCCTAGCCGGCCCAAAGGGTCCAATCACCCAAATGTACACCAATGTAGACCAG
 AGTTTCTGGGATCGGCCGGGTTTCCCAGGTTAGTGGGTTTACATGTGGTTACATCTGGTC
 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
 GACCTTGTGGCTGGCCGGCACCTCCTGGGGCGCGTTCCCTGACACCATGCACTTGCGGC
 CTGGAACAACCGACCGGCCGTGGAGGACCCCGCGCAAGGGACTGTGGTACGTGAACGCCG
 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
 TCCTCGGACCTTTACCTGCTCAGGAGACATGCTGATGTCATTCCGGTGCGCCGGCGGGGT
 AGGAGCCTGGAAATGGACCAGTGCTCTGTACGACTACAGTAAGGCCACGCGGCCGCCCA
 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
 GACGGTAGGGGAGCCTACTCCCCCCCAGGCCTGTCTCCTACTTGAAGGGCTCCTCGGGT
 CTGCCATCCCCCTCGGATGAGGGGGGTCCGGACAGAGGATGAACCTCCCGAGGAGCCCA
 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
 GGTCCACTGCTCTGCCCTTCGGGGCACGCTGTGCGGCATACTTCCGGCTGCTGTATGCACC
 CCAGGTGACGAGACGGGAAGCCCCGTGCGACAGCCGTATGAAGGCCGACGACATACGTGG
 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
 CGGGGGGTTCGCATGGCGGTGGAATTCATACCCGTTGAGTCTATGGAACTACTATGCGG
 GCCCCCAACGGTACCGCCACCTTAAGTATGGGCAACTCAGATACCTTTGATGATACGCC
 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
 TCTCCGGTCTTCACGGACAATCCGTCTCCCCCGGCTGTACCGCAGACATTCCAAGTGGCC
 AGAGGCCAGAAGTGCTGTAGGCAGAGGGGGCCGACATGGCGTCTGTAAAGGTTACACCG
 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
 CACTTACACGCTCCCACCGGCAGCGGCAAGAGCACTAGGGTGCCGGCTGCATATGCAGCC
 GTGAATGTGCGAGGGTGGCCGTCGCCGTTCTCGTGATCCACGGCCGACGTATACGTGCG
 E L E A P T G S G K S T R V P A A Y A A
 40
 4090 4100 4110 - 4120 4130 4140
 CAAGGGTACAAGGTGCTCGTCTAAATCCGTCCGTCGCCGCCACCTTGGGTTTTGGGGCG
 GTTCCCATGTTCCACGAGCAGGATTTAGGCAGGCAGCGGCGGTGGAACCCAAAACCCCGC
 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
 TATATGTCCAAGGCACATGGTATCGACCCCAACCTTAGAACTGGGGTAAGGACCATCACC
 ATATACAGGTTCCGTGTACCATAGCTGGGGTTGGAATCTTGACCCCATTCCTGGTAGTGG
 Y M S K A E G I D P N L R T G V R T I T
 50
 55

AT 405 053 B

4210 4220 4230 4240 4250 4260
ACAGGTGCCCCCTATCACATACTCCACCTATGGCAAGTTCCTTGCCGACGGTGGCGGGCTCC
TGTCCACGGGGATAGTGTATGAGGTGGATAACCGTTCAAGGAACGGCTGCCACCGCCGAGG
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
GGGGGCGCCTATGACATCATAATGTGTGATGAGTGCCACTCAACTGACTCGACTACCAT
CCCCCGCGGATACTGTAGTATTACACACTACTCACGGTGAGTTGACTGAGCTGATGGTAA
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
TATGGCATCGGCACAGTCCTGGACCAAGCGGAGACGGCTGGAGCGCGGCTCGTGGTGCTC
ATACCGTAGCCGTGTCTAGGACCTGGTTCGCCCTCTGCCGACCTCGCGCCGAGCACCACGAG
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
TCCACCGCTACGCCTCCGGGATCGGTCAACCGTGCCACACCTCAATATCGAGGAGGTGGCC
AGGTGGCGATGCGGAGGCCCTAGCCAGTGGCACGGTGTGGAGTTATAGCTCCTCCACCGG
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
CTGTCTAATACTGGAGAGATCCCCTTCTACGGCAAAGCCATTCCCATCGAGGCTATCAAG
GACAGATTATGACCTCTCTAGGGGAAGATGCCGTTTCGGTAAGGGTAGCTCCGATAGTTC
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
GGGGGAAGGCATCTCATTCTTCTGCCATTCCAAGAAGAAGTGTGACGAAGTCTGCCGCAAAG
CCCCCTTCCGTAGAGTAAAAGACGGTAAGGTTCTTCTTCACACTGCTTGAGCGGCGTTTC
G G R H L I F C H S K K K C D E L A A K

30
4570 4580 4590 4600 4610 4620
CTGTCTAGGCCTCGGACTCAATGCCGTAGCGTATTACCGGGGTCTTGACGTGTCCGTGATA
GACAGTCCGGAGCCTGAGTTACGGCATCGCATAATGGCCCCAGAAGTGCACAGGCAGTAT
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
CCGACCAGCGGAGACGTTGTTGTCTGTCGGCAGCGACGCTCTAATGACGGGCTTTACCGGC
GGCTGGTCGCCTCTGCAACAACAGCACCGCTGCCTGCGAGATTACTGCCCGAAATGGCCG
P T S G D V V V V A T D A L M T G F T G

40
4690 4700 4710 4720 4730 4740
GACTTTGACTCAGTGATCGACTGTAATACGTGTGTACCCAGACAGTCGATTTCAGCTTG
CTGAAACTGAGTCACTAGCTGACATTATGCACACAGTGGGTCTGTCTAGCTAAAGTCGAAC
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
GACCCACCTTCACCATGAGACGACGACCGTGCCCCAAGACGCAGTGTGCGGCTCGCAG
CTGGGGTGGAGTGGTAACTCTGCTGCTGGCACGGGGTTCTGCGTCAACAGCGCGAGCGTC
D P F F T I E T T T V P Q D A V S R S Q

50

55

AT 405 053 B

4810 4820 4830 4840 4850 4860
AGGCGAGGCAGGACTGGTAGGGGCAGGGCTGGCATATACAGGTTTGTGACTCCAGGAGAA
TCCGCTCCGCTCCTGACCATCCCCGTCCCGACCGTATATGTCCAAACACTGAGGTCCTCTT
R R G R T G R G R A G I Y R F V T P G E
5
4870 4880 4890 4900 4910 4920
CGGCCCTCGGGCATGTTTCGATTCTTCGGTCTGTGTGAGTGTTATGACGCGGGTTGTGCG
GCCGGGAGCCCGTACAAGCTAAGAAGCCAGGACACACTCACAATACTGCGCCCAACACGC
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
TGGTACGAATCAGCCCCGTGAGACCTCGGTTAGGTTGCGGGCGTACCTAAACACACCA
ACCATGCTTGAGTGCGGGCGACTCTGGAGCCAATCCAACGCCCGCATGGATTTGTGTGGT
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
GGGTTGCCCGTCTGCCAGGACCATCTGGAGTTCTCGGAGGGTGTCTTCACAGGCCTCACC
CCCAACGGGCAGACGGTCTGTAGACCTCAAGAGCCTCCACAGAAAGTGTCCGGAGTGG
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
CACATAGATGCCCACTTCTTATCCAGACTAAACAGGCAGGAGAGAACTTCCCCTACTTG
GTGTATCTACGGGTGAAGAATAGGGTCTGATTTGTCCGTCCTCTCTTGAAGGGGATGAAC
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
GTAGCATACCAGGCTACAGTGTGCGCCAGGGCTCAAGCCCCACCTCCATCGTGGGATGAA
CATCGTATGGTCCGATGTCACACGCGGTCCCGAGTTCGGGGTGGAGGTAGCACCTACTT
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
ATGTGGAGGTGTCTCATACGGCTGAAACCTACGCTGCACGGGCCAACACCCCTGCTGTAT
TACACCTCCACAGAGTATGCCGACTTTGGATGCGACGTGCCCCGTTGTGGGGACGACATA
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
AGGTTAGGAGCCGTCCAAAATGAGGTCACCCCTCACACACCCCATACCAAATTCATCATG
TCCAATCCTCGGCAGGTTTTACTCCAGTGGGAGTGTGTGGGGTATTGGTTTAAAGTAGTAC
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
ACATGTATGTGCGCTGACCTGGAGGTGCTCACCAGCACCTGGGTGCTGGTAGGCGGAGTC
TGTACATACAGCCGACTGGACCTCCAGCAGTGGTCTGGACCCACGACCATCCGCCTCAG
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
CTCGCAGCTCTGGCCGCGTACTGCCTGACAACAGGCAGCGTGGTCATTGTGGGCAGGATC
GAGCGTCGAGACCGGCGCATGACGGACTGTTGTCCGTCGCACCAGTAACACCCGTCCTAG
L A A L A A Y C L T T G S V V I V G R I
50
55

AT 405 053 B

5410 5420 5430 5440 5450 5460
ATCCTGTCCGGGAAGCCGGCTATCATCCCCGATAGGGAAGTTCTCTACCAGGAGTTCGAC
TAGGACAGGCCCTTCGGCCGATAGTAGGGGCTATCCCTTCAAGAGATGGTCCTCAAGCTG
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
GAGATGGAGGAGTGTGCCTCACACCTCCCTTACTTCGAACAGGGAATGCAGCTCGCCGAG
CTCTACCTCCTCACACGGAGTGTGGAGGGAATGAAGCTTGTCCCTTACGTCGAGCGGCTC
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
CAATTCAAACAGAAGGCGCTCGGGTTGCTGCAAACAGCCACCAAGCAGGCGGAGGCTGCT
GTTAAGTTTGTCTTCCGCGAGCCCAACGACGTTTGTGCGGTGGTTTCGTCCGCCTCCGACGA
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
GCTCCCGTGGTGGAGTCCAAGTGGCGAGCCCTTGAGACCTTCTGGGCGAAGCACATGTGG
CGAGGGCACCACCTCAGGTTCAACCGCTCGGGAACCTCTGGAAGACCCGCTTCGTGTACACC
A P V V E S K W R A L E T F W A K E M W

20 5650 5660 5670 5680 5690 5700
AACTTCATTAGTGGGATACAGTACTTGGCAGGCTTGTCCACTCTGCCTGGGAACCCCGCA
TTGAAGTAATCACCCCTATGTATGAACCGTCCGAACAGGTGAGACGGACCCCTTGGGGCGT
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
ATACGATCACCGATGGCATTACAGCCTCCATCACCAGCCCGCTCACCACCCAGCATACC
TATGCTAGTGGCTACCGTAAGTGTGCGAGGTAGTGGTCCGGCGAGTGGTGGGTCTGTATGG
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
CTCTTGTTTAAATCTTGGGGGGATGGGTGGCTGCCCAACTCGCCCCCCCCAGCGCTGCC
GAGAACAAATTGTAGAACCCCCCTACCCACCGACGGGTGAGCGGGGGGGGTCCGCGACGG
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
TCAGCTTTTCGTGGGCGCCGGCATCGCTGGAGCCGCTGTTGGCACGATAGGCCTTGGGAAG
AGTCGAAAGCACCCGCGCCGTAGCGACCTCGGCGACAACCGTGCTATCCGGAACCCCTTC
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
GTGCTTGTGGACATTCTGGCAGGTTATGGAGCAGGGGTGGCGGGCGCACTTGTGGCCTTT
CACGAACACCTGTAAGACCGTCCAATACCTCGTCCCCACCGCCCGCGTGAACACCGGAAA
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
AAGATCATGAGCGGCGAGATGCCTTCAGCCGAGGACATGGTCAACTTACTCCCTGCCATC
TTCTAGTACTCGCCGCTCTACGGAAGTCGGCTCCTGTACCAGTTGAATGAGGGACGGTAG
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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

55

AT 405 053 B

6610 6620 6630 6640 6650 6660
GCTGAGGAGTACGTGGAGGTACGCGGGGTGGGAGATTTTCACTACGTGACGGGCATGACC
CGACTCCTCATGCACCTCCAGTGCAGCCACCCCTCTAAAAGTGATGCACTGCCCGTACTGG
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
ACTGACAACGTGAAGTGTCCATGCCAGGTTCGGGCCCCCGAATTCTTCACGGAGGTGGAT
TGACTGTTGCACTTCACAGGTACGGTCCAAGGCCGGGGGCTTAAGAAGTGCCTCCACCTA
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
GGAGTGCGGTTGCACAGGTACGCTCCGGCGTGACAGCCTCTCCTACGGGAGGAGGTGCGTA
CCTCAGCCCAACGTGTCCATGCGAGGCCGACGTCTGGAGAGGATGCCCTCCTCCAGCAT
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
FTCCAGGTCCGGCTCCACCAGTACCTGGTCCGGGTACAGCTCCCATGCGAGCCCCGAACCG
AAGSTCCAGCCCGAGSTGGTTCATGGACCAGCCAGTGTGAGGGTACGCTCGGGCTTGGC
F Q V G L H Q Y L V G S Q L P C E P E P

20 6850 6860 6870 6880 6890 6900
GATGTAGCAGTGCTCACTTCCATGCTCACTGACCCCTCCACATTACAGCAGAGACGGCT
CTACATCGTCACGAGTGAAGGTACGAGTGAAGTGGGGAGGGTGTAAATGTCGTCTCTGCCGA
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
AAGCGTAGGCTGGCCAGGGGGTCTCCCCCTCCTTGGCCAGCTCTTCAGCTAGCCAGTTG
TTCGCATCCGACCGGTCCCCCAGAGGGGGGAGGAACCGGTGAGAAAGTCGATCGGTCAAC
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
TCTGCGCCTTCTTGAAGGCGACATGCACTACCCATCATGACTCCCCGGACGCTGACCTC
AGACGCGGAAGGAACCTCCGCTGTACGTGATGGGTAGTACTGAGGGGCTGCGACTGGAG
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
ATTGAGGCCAACCTCTTGTGGCGGCAAGAGATGGGCGGGAACATCACCCGCGTGGAGTCA
TAACTCCGCTTGGAGAACACCGCCGCTCTCTACCCGCCCTTGTAGTGGGCGCACCTCAGT
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
GAGAATAAGGTGGTAATCCTGGACTCTTTCGACCCGCTCCGAGCGGAGGATGATGAGGGG
CTCTTATTCCACCATTAGGACCTGAGAAAGCTGGGCGAGGCTCGCCTCCTACTACTCCCC
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
GAAATATCCGTTCCGGCGGAGATCCTGCGGAAATCCAGGAAATTCACCCCGAGCGCTGCCC
CTTTATAGGCAAGGCCGCTCTAGGACGCTTTAGGTCTTTAAGGGGGGTGCGGACGGG
E I S V P A E I L R K S R K F P P A L P

50

55

AT 405 053 B

7210 7220 7230 7240 7250 7260
 ATATGGGCGCCGCGGATTACAACCCCTCCGCTGCTAGAGTCCTGGAAGGACCCGGACTAC
 TATACCCGCGGCGGCCTAATGTTGGGAGGCGACGATCTCAGGACCTTCTGGGCCTGATG
 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
 GTTCCTCCGGTGGTACACGGGTGCCCGTTGCCGCCCACCAAGGCCCTCCAATACCACCT
 CAAGGAGGCCACCATGTGCCACGGGCAACGGCGGGTGGTTCCGGGGAGGTTATGGTGA
 V P P V V E G C P L P P T K A P P I P P
 10
 7330 7340 7350 7360 7370 7380
 CCACGGAGGAAGAGGACGGTTGTCTCAGACAATCCACCGTGTCTTCTGCCTTGGCGGAG
 GGTGCCTCCTTCTCCTGCCAACAGGACTGTCTTAGGTGGCACAGAAGACGGAACCGCCTC
 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
 CTCGCTACTAAGACCTTCCGGCAGCTCCGGATCGTCGGCCATCGACAGCGGTACGGCGACC
 GAGCGATGATTCTGGAAGCCGTCGAGGCCCTAGCAGCCGCTAGCTGTCCGCATGCCGCTGG
 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
 GCCCCCTCCTGACCAAGCCCTCCGGTGACGGCGACAGAGAGTCCGACGTTGAGTCGTTCTCC
 CGGGGAGGACTGGTTCCGAGGCCACTGCCGCTGTCTCTCAGGCTGCAACTCAGCAAGAGG
 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
 TCCATGCCCCCCTTGAGGGAGAGCCGGGGGACCCCGATCTCAGCGACGGATCTTGGTCC
 AGGTACGGGGGGGAACCTCCCTCTCGGCCCCCTGGGGCTAGAGTCCGTGCCTAGAACCAGG
 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
 ACCGTGAGCGAGGAGGCTAGTGAGGACGTCTGCTGCTGTTTCGATGTCCTACACATGGACA
 TGGCACTCGCTCCTCCGATCACTCCTGCAGCAGACGACAAGCTACAGGATGTGTACCTGT
 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
 GGCGCCCTGATCACGCCATGCGCTGCGGAGGAAAGCAAGTTGCCCATCAACCCGTTGAGC
 CCGCGGACTAGTGCGGTACGCGACGCCTCCTTTTCGTTCAACGGGTAGTTGGGCAACTCG
 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
 AATTCTTTGCTACGTCACCACAACATGGTCTATGCTACAACATCCCGCAGCGCAGGCCTG
 TTAAGAAACGATGCAGTGTTGTGTACCAGATACGATGTTGTAGGGCGTCGCGTCCGGAC
 N S L L R E E N M V Y A T T S R S A G L
 45
 7750 7760 7770 7780 7790 7800
 CGGCAGAAGAAGGTCACCTTTGACAGACTGCAAGTCCTGGACGACCACTACCGGGACGTG
 GCCGTCTTCTTCCAGTGGAACCTGTCTGACGTTTCAGGACCTGCTGGTGATGGCCCTGCAC
 R Q K K V T F D R L Q V L D D E Y R D V
 50
 55

AT 405 053 B

7810 7820 7830 7840 7850 7860
CTTAAGGAGATGAAGGCGAAGGCGTCCACAGTTAAGGCTAAACTTCTATCTGTAGAAGAA
GAATTCCTCTACTTCCGCTTCCGCAGGTGTCAATTCCGATTGGAAGATAGACATCTTCTT
L K E M K A K A S T V K A K L L S V E E

5 7870 7880 7890 7900 7910 7920
GCCTGCAAACTGACGCCCCACATTTCGGCCAAATCCAAATTTGGCTACGGGGCGAAGGAC
CGGACGTTTGACTGCGGGGGTGTAAAGCCGGTTTAGGTTTAAACCGATGCCCCGCTTCCTG
A C K L T P P E S A K S K F G Y G A K D

10 7930 7940 7950 7960 7970 7980
GTCCGGAGCCTATCCAGCAGGGCCGTTACCCACATCCGCTCCGTGTGGAAGGACCTGCTG
CAGGCCTCGGATAGGTCTGTCGGCAATGGGTGTAGGCGAGGCACACCTTCCTGGACGAC
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
CTTCTGTGACTTTGTGGTTAATCGTGATGGTAGTACCGTTTTTTACTCCAAAAGACACAG
E D T E T P I S T T I M A K N E V F C V

20 8050 8060 8070 8080 8090 8100
CAACCAGAGAAGGGAGGCGCAAGCCAGCTCGCCTTATCGTGTTCCCAAGATCTGGGAGTT
GTTGGTCTCTTCCCTCCGGCGTTTCGGTTCGAGCGGAATAGCACAAGGGTCTAGACCCTCAA
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
CGTGTATCGGAGAAGATGGCCCTTTATGACGTGGTCTCCACCCTTCCTCAGGCCGCTGATG
GCACATACGCTCTTCTACCGGGAAATACTGCACCAGAGGTGGGAAGGAGTCCGGCACTAC
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
GGCTCCTCATACGGATTCCAGTACTCTCCTAAGCAGCGGGTTCGAGTTCTCTGGTGAATACC
CCGAGGAGTATGCCTAAGGTCATGAGAGGATTCGTCGCCAGCTCAAGGACCACTTATGG
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
TGGAAATCAAAGAAATGCCCCATGGGCTTCTCATATGACACCCGCTGTTTTGACTCAACG
ACCTTTAGTTTTCTTTACGGGGTACCCGAAGAGTATACTGTGGGCGACAAAAGTGAAGTTGC
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
GTCAGTGAGAATGACATCCGTGTTGAGGAGTCAATTTACCAATGTTGTGACTTGGCCCCC
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
GAAGCCAAACTGGCCATAAAGTCGCTCACAGAGCGGCTCTATATCGGGGGTCCCCTGACT
CTTCGGTTTGACCGGTATTTTCAGCGAGTGTCTCGCCGAGATATAGCCCCAGGGGACTGA
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
AATTCAAAAGGGCAGAACTGCGGTTACCGCCGGTGCCGCGGAGCGGCGTGCTGACGACT
TTAAGTTTTCCCGTCTTGACGCCAATGGCGGCCACGGCGCGCTCGCCGCACGACTGCTGA
N S K G Q N C G Y R R C R A S G V L T T

8470 8480 8490 8500 8510 8520
AGCTGCGGTAATACCCTCACATGTTACCTGAAAGCCACTGCGGCCTGTCGAGCTGCGAAG
TCGACGCCATTATGGGAGTGTACAATGGACTTTGCGGTGACGCCGGACAGCTCGACGCTTC
S C G N T L T C Y L K A T A A C R A A K

8530 8540 8550 8560 8570 8580
CTCCGGGACTGCACGATGCTCGTGAAACGGAGACGACCTTGTCTGTTATCTGTGAAAGCGCG
GAGGCCCTGACGTGCTACGAGCACTTGCCCTCTGCTGGAACAGCAATAGACACTTTCGCGC
L R D C T M L V N G D D L V V I C E S A

8590 8600 8610 8620 8630 8640
GGPACCCAAAGAGGATGCGGCGAGCCTACGAGTCTTCACGGAGGCTATGACTAGGTACTCT
CCTTGGGTTCTCCTACGCCGCTCGGATGCTCAGAAGTGCCTCCGATACTGATCCATGAGA
G T Q E D A A S L R V F T E A M T R Y S

8650 8660 8670 8680 8690 8700
GCCCCCCTGCGGACCCGCTCAACCGGAATACGACTTGGAGTTGATAACATCATGTTCC
CGGGGGGACCCCTGCGGCGAGTTGGCCTTATGCTGAACCTCAACTATTGTAGTACAAGG
A P P G D P P Q P E Y D L E L I T S C S

8710 8720 8730 8740 8750 8760
TCCAATGTGTGCGTTCGCACACGATGCATCTGGTAAAGGGTGTACTACCTCACCCGTGAC
AGGTTACACAGCCAGCGTGTGCTACGTAGACCATTTCACACATGATGGAGTGGGCACTG
S N V S V A E D A S G K R V Y Y L T R D

8770 8780 8790 8800 8810 8820
CCTACCACCCCCCTTGACCGGGCTCGGTGGGAGACAGCTAGACACACTCCAGTCAACTCC
GGATGGTGGGGGGAACGTGCCCCGACGCACCCCTCTGTGATCTGTGTGAGGTCAGTTGAGG
P T T P L A R A A W E T A R E T P V N S

8830 8840 8850 8860 8870 8880
TGGCTAGGCAACATCATCATGTATGCGCCACCTTATGGGCAAGGATGATTCTGATGACT
ACCGATCCGTTGTAGTAGTACATACGCGGGTGGGAATACCCGTTCTACTAAGACTACTGA
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
CATTTCTTCTCCATCCTTCTAGCTCAGGAGCAACTTGAAAAAACCTAGATTGTGAGATC
GTAAAGAAGAGGTTAGGAAGATCGAGTCCTCGTTGAACTTTTTTGGGATCTAACAGTCTAG
E 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
TACGGGGCCTGTTACTCCATTGAACCACTTGATCTACCTCAGATCATTGAGCGACTCCAT
ATGCCCCGGACAATGAGGTAACCTTGGTGAACCTAGATGGAGTCTAGTAACCTCGCTGAGGTA
Y G A C Y S I E P L D L P Q I I E R L E

AT 405 053 B

9010 9020 9030 9040 9050 9060
 GGTCTTAGCGCATTTCCTCACTCCATAGTTACTCTCCAGGCGAGATCAATAGGGTGGCTTCA
 CCAGAATCGCGTAAAAGTGAGGTATCAATGAGAGGTCGCGCTCTAGTTATCCCACCGAAGT
 5 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
 TGCCTCAGAAAACTTGGGGTACCACCCTTGCGAGCCTGGAGACATCGGGCCAGAAGTGTC
 ACGGAGTCTTTTGAACCCCATGGTGGGAACGCTCGGACCTCTGTAGCCCGGTCTTCACAG
 10 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
 CGCGCTAAGCTACTGTCCCAGGGGGGGAGGGCCGCCACTTGTGGCAAGTACCTCTTCAAC
 CGCGGATTGATGACAGGGTCCCCCCTCCCGGCGGTGAACACCGTTCATGGAGAAGTTG
 15 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
 TGGGCGGTGAGGACCAAGCTCAAACCTCACTCCAACTCCAGCCGCGTCCCGGTGGACTTG
 ACCCGCCACTCCTGGTTCGAGTTTGAGTGAGGTTAGGGTCGGCCGAGGGCCAACCTGAAC
 20 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
 TCCGGCTGGTTCGTTGCTGGTTACAGCGGGGAGACATATATCACAGCCTGTCTCGTGCC
 AGGCGGACCAAGCAACGACCAATGTGCGCCCCCTCTGTATATAGTGTGGACAGAGCACGG
 25 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
 CGACCCCGGTGGTTTCATGTTGTGCTACTCCTACTTTCCGTGGGGGTAGGCATCTACCTG
 GCTGGGGCGACCAAGTACAACACGGATGAGGATGAAGGCACCCCATCCGTAGATGGAC
 30 R P R W F M L C L L L L S V G V G I Y L
 9370 9380 9390 9400 9410
 CTCCCCAACCGATGAATGGGGAGCTAAACACTCCAGGCCAATAGGCCGTTTCTCT
 GAGGGGTTGGCTACTTACCCCTCGATTGTGAGGTCCGGTTATCCGGCAAAGAGA
 35 L P N R

2. Polynucleotid, welches ein KHCV-Epitop kodiert, das aus der folgenden Gruppe von Nucleotidsequenzen 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 Polynucleotiden, oder ein Fragment dieses Polynucleotids, welches ein Polypeptid kodiert, das eine genügend große Anzahl von Aminosäureresten kodiert, um eine immunoreaktive und/oder antigene Determinante zu bilden.
3. Rekombinanter Expressionsvektor, dadurch gekennzeichnet, daß er einen offenen Leseraster umfaßt, der das Polynucleotid 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 Polynucleotid enthält, das Ubiquitin kodiert, das mit dem Polynucleotid 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.
- 10 8. Vektor nach Anspruch 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß er ein E. coli-Expressionsvektor aus der 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.
- 15 9. Wirtszelle, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie mit einem Vektor gemäß Anspruch 3 transformiert ist.
10. Wirtszelle nach Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie eine Hefezelle ist, die mit dem Vektor gemäß Anspruch 5 transformiert ist.
- 20 11. Wirtszelle nach Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie eine mit dem Vektor gemäß Anspruch 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 Aminosäuren, kodiert von den Nucleotiden 301.-726. und 301.-855. der KHCV-cDNA des Anspruch 1; sowie

30 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.
- 40 15. Polypeptid nach Anspruch 13, **dadurch gekennzeichnet**, daß es ein KHCV UB 897 Protein, KHCV 897 Protein, UB E1 Protein, KHCV 403 Protein, KHCV CORE 14 Protein, KHCV 573 Protein, KHVC 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.
- 50 17. Diagnosemittel für das Aufspüren von Antikörpern gegen KHCV-Antigen in einer verdächtigen Probe, **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 KHVC-Antigen gerichteten Antikörpers in einer verdächtigen Probe, **dadurch gekennzeichnet**, daß folgende Schritte vorgesehen sind:
- (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.
22. Diagnoseverfahren nach Anspruch 21, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Kit gemäß Anspruch 20 in jeder dieser Stufen angewendet wird.
23. Diagnoseverfahren nach Anspruch 22, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Kit ein Diagnosemittel nach Anspruch 19 umfaßt.
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. Antikörper nach Anspruch 24, **dadurch gekennzeichnet**, daß er in einer IgG-Subklasse eingeschlossen ist.
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.
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:
- 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.
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:

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.

- 5
- 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

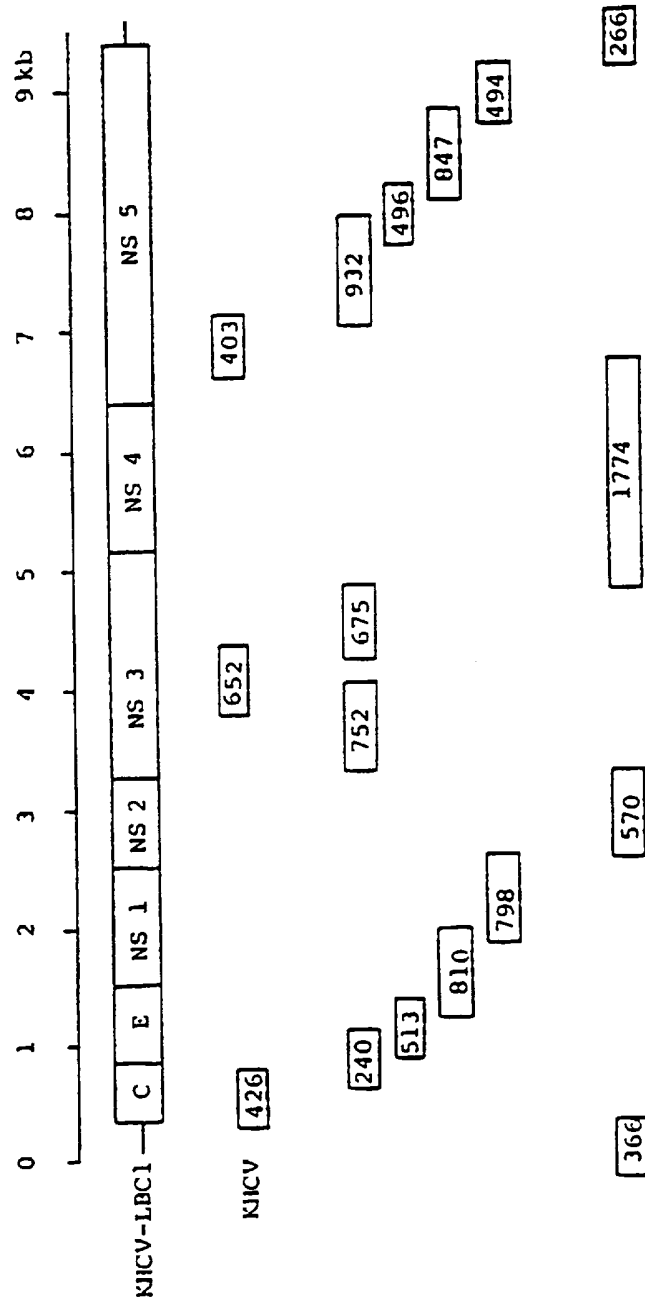


Fig. 1

10 20 30 40 50 60
TGCCAGCCCCGATTGGGGGCGACACTCCACCATAGATCACTCCCCTGTGAGGAACTACT
ACGGTCGGGGGCTAACCCCGCTGTGAGGTGGTATCTAGTGAGGGGACACTCCTTGATGA

70 80 90 100 110 120
GTCTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTGTCGTCAGCCTCCAGGA
CAGAAGTGCGTCTTTCGCAGATCGGTACCGCAATCATACTCACAGCACGTGCGGAGGTCCT

130 140 150 160 170 180
CCCCCCTCCC GGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCCA
GGGGGGGAGGGCCCTCTCGGTATCACCAGACGCCTTGGCCACTCATGTGGCCTTAACGGT

190 200 210 220 230 240
GGACGACCGGGTCCTTTCTTGGATCAACCCGCTCAATGCCTGGAGATTGTTGGGCGTGCCCC
CCTGCTGGCCCAGGAAAGAACCTAGTTGGGCGAGTTACGGACCTCTAAACCCGCACGGGG

250 260 270 280 290 300
CGCGAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGTGCGGAAAGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAG
GCGCTCTGACGATCGGCTCATCACAACCCAGCGCTTTCGGAACACCATGACGGACTATC

310 320 330 340 350 360
GGTGCTTGCGAGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCACCATGAGCACGAATCCTAAA
CCACGAACGCTCACGGGGCCCTCCAGAGCATCTGGCACGTGGTACTCGTGCTTAGGATTT
M S T N P K

370 380 390 400 410 420
CCTCAAAGAAAAACCAAACGTAACACCAACCGCCGCCACAGGATATTAAGTTCCCGGGC
GGAGTTTCTTTTTTGGTTTGCATTGTGGTTGGCGGCGGGTGTCTATAATTCAAGGGCCCC
P Q R K T K R N T N R R P Q D I K F P G

430 440 450 460 470 480
GGTGGTCAGATCGTTGGTGGAGTTTACTTGTGTTGCCGCGCAGGGGGCCCCAGGTTGGGTGTG
CCACCAGTCTAGCAACCACCTCAAATGAACAACGGCGCGTCCCCGGGGTCCAACCCACAC
G G Q I V G G V Y L L P R R G P R L G V

490 500 510 520 530 540
CGCGCGACTAGGAAGACTTCCGAGCGGTCGCAACCTCGTGGAAGGCGACAGCCTATCCCC
GCGCGCTGATCCTTCTGAAGGCTCGCCAGCGTTGGAGCACCTTCCGCTGTGCGGATAGGGG
R A T R K T S E R S Q P R G R R Q P I P

550 560 570 580 590 600
AAGGCTCGCCGGCCCGAGGGCAGGGCCTGGGCTCAGCCCGGGTACCCTTGGCCCCCTCTAT
TTCCGAGCGGCCGGGCTCCCGTCCCGGACCCGAGTCGGGCCCATGGGAACCGGGGAGATA
K A R R P E G R A W A Q P G Y P W P L Y

610 620 630 640 650 660
GGCAATGAGGGCTTGGGGTGGGCAGGATGGCTCCTGTACCCCCGCGGCTCCCGGCCTAGT
CCGTTACTCCCGAACCCACCCGTCCTACCGAGGACAGTGGGGCGCCGAGGGCCGGATCA
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
TGGGGCCCCACGGACCCCCGGCGTAAGTCGCGTAATTTGGGTAAGGTGATCGACACCCTC
ACCCCGGGGTGCCTGGGGGCCGCATTGAGCGCATTAAACCCATTCCAGTAGCTGTGGGAG
W G P T D P R R K S R N L G K V I D T L

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

790 800 810 820 830 840
GTTGCCAGGGCCCTGGCACATGGTGTCCGGGTGCTGGAGGACGGCGTGAACATGCAACA
CAACGGTCCCGGGACCGTGTACCACAGGCCCACGACCTCCTGCCGCACTTGATACGTTGT
V A R A L A H G V R V L E D G V N Y A T

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

910 920 930 940 950 960
ACCCAGTTCGCTTATGAAGTGCCTAACGCGTCCGGGATGTACCATGTCACGAACGAC
TGGGGTCAAAGGCGAATACTTCACGCATTGCGCAGGCCCTACATGGTACAGTGCTTGCTG
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
TGCTCCAACTCAAGCATTGTGTATGAGGACGCGGACATGATCATGCACACTCCCGGGTGC
ACGAGGTTGAGTTCGTAACACATACTCCGTCGCCTGTACTAGTACGTGTGAGGGCCACG
C S N S S I V Y E A A D M I M H T P G C

1030 1040 1050 1060 1070 1080
GTGCCCTGCGTTCGGGAGGACAACTCCTCCCGTTGCTGGGTGGCACTTACTCCACGCTC
CACGGGACGCAAGCCCTCCTGTTGAGGAGGGCAACGACCCACCGTGAATGAGGGTGCGAG
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
CGCCGGTCCTTACGGTCGCAGGGGTGATGCTGTAACGCTGCGGTACAGCTGAACGAGCAA
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
GGGGTAGCTGCTTTCTGTTCCGCTATGTACGTGGGGGACCTCTGCGGATCTGTTTTCCTT
CCCCATCGACGAAAGACAAGGCGATACATGCACCCCTGGAGACGCCTAGACAAAAGGAA
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
GTTTCCCAGCTGTTACCTTTTCGCCTCGCCGGCATGAGACGGTACAGGACTGCAACTGC
CAAAGGGTCGACAAGTGGAAGCGGAGCGCCGTACTCTGCCATGTCCTGACGTTGACG
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
TCAATCTATCCCGGCCGCGTATCAGGTCACCGCATGGCCTGGGATATGATGATGAACTGG
AGTTAGATAGGGCCGCGCATAGTCCAGTGGCGTACCGGACCCTATACTACTACTTGACC
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
TCGCCTACAACAGCCCTAGTGGTATCGCAGCTACTCCGGATCCCACAAGCTGTCGTGGAC
AGCGGATGTTGTCTGGGATCACCATAGCGTCGATGAGGCCTAGGGTGTTTCGACAGCACCTG
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
ATGGTGACAGGGTCCCACTGGGGAATCCTGGCGGGCCTTGCCCTACTATTCCATGGTGGGG
TACCACTGTCCCAGGGTGACCCCTTAGGACCGCCCGGAACGGATGATAAGGTACCACCCC
M 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
AACTGGGGCTAAGGTCTTAATTGCGATGCTACTCTTTGCCGGCGTTGACGGAAACCACCCAC
TTGACCCGATTCCAGAATTAACGCTACGATGAGAAACGGCCGCAACTGCCTTGGTGGGTG
N W A K V L I A M L L F A G V D G T T H

1510 1520 1530 1540 1550 1560
GTGACAGGGGGGGCGCAAGGTCGGGGCCGCTAGCTCGCTAACGTCCCTCTTTAGCCCTGGG
CACTGTCCCCCGCGTTCCAGCCCGCGGATCGAGCGATTGCAGGGAGAAATCGGGACCC
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
CCGGTTCAGCACCTCCAGCTCATAAACACCAACGGCAGCTGGCATATCAACAGGACCGCC
GGCCAAGTCGTGGAGGTCGAGTATTTGTGGTTGCCGTCGACCGTATAGTTGTCCTGGCGG
P V Q H L Q L I N T N G S W H I N R T A

1630 1640 1650 1660 1670 1680
CTGAGCTGCAATGACTCCCTCAACACTGGGTTTGTGTGCCGCGCTGTTCTACAAATACAGG
GACTCGACGTTACTGAGGGAGTTGTGACCCAAACAACGGCGCGACAAGATGTTTATGTCC
L S C N D S L N T G F V A A L F Y K Y R

1690 1700 1710 1720 1730 1740
TTCAACGCGTCCGGGTGCCCGGAGCGCTTGCCACGTGCCGCCCCATTGATACATTTCGCG
AAGTTGCGCAGGCCCCACGGGCCTCGCGAACCGGTGCACGGCGGGGTAACCTATGTAAGCGC
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
CAGGGGTGGGGTCCCATCACTTACACTGAGCCTCATGATTTGGATCAGAGGGCCCTATTGC
GTCCCCACCCAGGGTAGTGAATGTGACTCGGAGTACTAAACCTAGTCTCCGGGATAACG
Q G W G P I T Y T E P H D L D Q R P Y C

Fig. 2-3

1810 1820 1830 1840 1850 1860
TGGCACTACGCGCCTCAACCGTGTGGTATTGTGCCCCACGTTGCAGGTGTGTGGCCCAGTA
ACCGTGATGCGCGGAGTTGGCACACCATAACACGGGTGCAACGTCCACACACCGGGTCAT
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
TACTGCTTCACCCCGAGTCCTGTTGCGGTGGGGACTACCGATCGTTTCGGTGCCCCCTACA
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
TACAGATGGGGGGCAAATGAGACGGACGTGCTGCTCCTTAACAACGCCGGGCGCCGCGCAA
ATGTCTACCCCCCGTTTACTCTGCCTGCACGACGAGGAATTGTTGCGGGCCCGCGGGCGTT
Y R W G A N E T D V L L L N N A G P P Q

1990 2000 2010 2020 2030 2040
GGCAACTGGTTTCGGCTGTACATGGATGAATGGCACTGGGTTACCAAGACATGTGGGGGC
CCGTTGACCAAGCCGACATGTACCTACTTACCGTGACCCAAGTGGTTCTGTACACCCCCG
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
CCCCCGTGTAAACATCGGGGGGGTCGGCAACAATACCTTGACCTGCCCCACGGACTGCTTC
GGGGGCACATTGTAGCCCCCCCCAGCGTTGTTATGGAAGTGGACGGGGTGCTGACGAAG
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
CGAAAGCACCCCGGGGCCACTTACACCAAATGCGGTTTCGGGGCCCTTGTTAACACCCAGG
GCTTTTCGTGGGGCCCCCGGTGAATGTGGTTTACGCCAAGCCCCGGAACCAATTGTGGGTCC
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
TGCTTAGTCGACTACCCGTACAGGCTCTGGCATTACCCCTGCACTGTCAACTTTACCATC
ACGAATCAGCTGATGGGCATGTCCGAGACCGTAATGGGGACGTGACAGTTGAAATGGTAG
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
TTTAAGGTTAGGATGTACGTGGGGGGCGCGGAGCACAGGCTCGACGCCCGCATGCAACTGG
AAATTCCAATCCTACATGCACCCCCCGCGCCTCGTGTCCGAGCTGCGGCGTACGTTGACC
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
ACTCGGGGAGAGCGTTGTGACCTGGAGGACAGGGATAGGTGACAGCTTAGCCCCGCTGCTG
TGAGCCCCCTCTCGCAACACTGGACCTCCTGTCCCTATCCAGTCTCGAATCGGGCGACGAC
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
CTGTCTACAACAGAGTGGCAGGTACTGCCCTGTTCTTCACAACCCTACCGGCTCTGTCC
GACAGATGTTGTCTCACCGTCCATGACGGGACAAGGAAGTGTGTTGGGATGGCCGAGACAGG
L S T T E W Q V L P C S F T T L P A L S

2410 2420 2430 2440 2450 2460
ACTGGTTTGTATTCATCTCCATCAGAACATCGTGGACATACAATACCTGTACGGTATAGGG
TGACCAAACCTAAGTAGAGGTAGTCTTGTAGCACCTGTATGTTATGGACATGCCATATCCC
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
TCGGCGGTTGTCTCCTTTGCGATCAAATGGGAGTATATTGTGCTGCTCTTCCTTCTTCTG
AGCCGCCAACAGAGGAAACGCTAGTTTACCCTCATATAACACGACGAGAAGGAAGAAGAC
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
GCGGACGCGCGCGTCTGCGCTTGCTTGTGGATGATGCTGCTGGTAGCGCAAGCCGAGGCC
CGCCTGCGCGCGCAGACGCGAACGAACACCTACTACGACGACCATCGCGTTCGGCTCCGG
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
GCCTTAGAGAACCTGGTGGTCCCTCAATGCAGCGTCCGTGGCCGGAGCGCATGGCATTCTT
CGGAATCTCTTGGACCACCAGGAGTTACGTGCGCAGGCACCGGCCTCGCGTACCGTAAGAA
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
TCCTTCATTGTGTTCTTCTGTGCTGCCTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTTCCCGGAGCG
AGGAAGTAACACAAGAAGACACGACGGACCATGTAGTTCCCGTCCGACCAAGGGCCTCGC
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
GCATACGCCCTCTATGGCGTATGGCCGCTGCTTCTGCTTCTGCTGGCGTTACCACCACGG
CGTATGCGGGAGATACCGCATACCGGCGACGAAGACGAAGACGACCGCAATGGTGGTGCC
A Y A L Y G V W P L L L L L L A L P P R

2770 2780 2790 2800 2810 2820
GCGTACGCCATGGACCGGGAGATGGCCGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTTGTAGGTCTG
CGCATGCGGTACCTGGCCCTCTACCGGCGTAGCACGCCTCCGCGCCAAAACATCCAGAC
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
GTACTCTTGACCTTGTCAACCACTATAAAGTGTTCCCTTGCCAGGTTTCATATGGTGGCTA
CATGAGAACTGGAACAGTGGTGTGATATTTCAAGGAACGGTCCAAGTATACCACCGAT
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
CAATATCTCATCACCAGAACCGAAGCGCATCTGCAAGTGTGGGTCCCCCTCTCAACGTT
GTTATAGAGTAGTGGTCTTGCTTCGCGTAGACGTTACACCCAGGGGGGAGAGTTGCAA
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
CGGGGGGGTTCGCGATGCCATCATCCTCCTCACATGCGTGGTCCACCCAGAGCTAATCTTT
GCCCCCAGCGCTACGGTAGTAGGAGGAGTGACGCACCAGGTGGGTCTCGATTAGAAA
R G G R D A I I L L T C V V H P E L I F

Fig. 2-5

3010 3020 3030 3040 3050 3060
GACATCACAAAATATTTGCTCGCCATATTGGGCCGCTCATGGTGCTCCAGGCCGGGCATA
CTGTAGTGTTTTATAAACGAGCGGTATAAGCCGGGCGAGTACCACGAGGTCCGGCCGTAT
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
ACTAGAGTGCCGTACTTCGTGCGCGCACAAAGGGCTCATTCGTGCATGCATGTTGGCGCGG
TGATCTCACGGCATGAAGCACGCGCGTGTTCGAGTAAGCACGTACGTACAACCGCGCC
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
AAAGTCGTGGGGGGTCATTACGTCCAAATGGTCTTCATGAAGCTGGCCGCACTAGCAGGT
TTTCAGCACCCCCCAGTAATGCAGGTTTACCAGAAGTACTTCGACCGCGCGTGATCGTCCA
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
ACGTACGTTTATGACCATCTTACTCCACTGCGAGATTGGGCTCACACGGGCTTACGAGAC
TGCATGCAAATACTGGTAGAATGAGGTGACGCTCTAACCCGAGTGTGCCCGAATGCTCTG
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
CTTGCACTGGCAGTAGAGCCCCGTGTCTCTCTGACATGGAGACCAAAGTCATCACCTGG
GAACGTCACCGTCATCTCGGGCAACAGAAGAGACTGTACCTCTGGTTTTCAGTAGTGACCC
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
GGGGCAGACACCGCGGCGTGCGGGGACATCATCTTGGCCCTGCCTGCTTCCGCCCGAAGG
CCCCGTCTGTGGCGCCGCACGCCCCCTGTAGTAGAACCGGGACGGACGAAGGCGGGCTTCC
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
GGGAAGGAGATACTTCTGGGACCGGCCGATAGTCTTGAAGGACAGGGGTGGCGACTCCTT
CCCTTCTCTATGAAGACCCTGGCCGGCTATCAGAACTTCTGTCCCCACCGCTGAGGAA
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
GCGCCCATCACGGCCTACTCCCAACAAACGCGAGGCCTGCTTGGTTGCATCATCACTAGC
CGCGGGTAGTGCCGGATGAGGGTTGTTTGCCTCCGGACGAACCAACGTAGTAGTGATCG
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
CTTACAGGCCGGGACAAGAACCAGGTTGAGGGGGAGGTTCAAGTGGTTTCCACCGCAACA
GAATGTCCGGCCCTGTTCTTGGTCCAACTCCCCCTCCAAGTTCACCAAAGGTGGCGTTGT
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
CAATCTTTTCTTGCGACCTGCATCAATGGCGTGTGTTGGACTGTCTTCCACGGCGCCGGC
GTTAGAAAGGACCGCTGGACGTAGTTACCGCACACAACCTGACAGAAGGTGCCGCGGGCCG
Q S F L A T C I N G V C W T V F H G A G

Fig. 2-6

3610 3620 3630 3640 3650 3660
TCAAAGACCCCTAGCCGGCCCAAAGGGTCCAATCACCCAAATGTACACCAATGTAGACCAG
AGTTTCTGGGATCGGCCGGGTTCCTCCAGGTTAGTGGGTTACATGTGGTTACATCTGGTC
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
GACCTTGTTGGCTGGCCGGCACCTCCTGGGGCGCGTTCCCTGACACCATGCACCTTGCGGC
CTGGAACAACCGACCGGCCGTGGAGGACCCCGCGCAAGGGACTGTGGTACGTGAACGCCG
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
TCCTCGGACCTTTACCTGGTCACGAGACATGCTGATGTCATTCCGGTGCGCCGGCGGGGT
AGGAGCCTGGAAATGGACCAGTGCTCTGTACGACTACAGTAAGGCCACGCGGCCGCCCA
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
GACGGTAGGGGAGCCTACTCCCCCAGGCCTGTCTCCTACTTGAAGGGCTCCTCGGGT
CTGCCATCCCCCTCGGATGAGGGGGGTCCGGACAGAGGATGAACTTCCCGAGGAGCCCA
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
GGTCCACTGCTCTGCCCTTCGGGGCACGCTGTCCGCATACTTCCGGCTGCTGTATGCACC
CCAGGTGACGAGACGGGAAGCCCCGTGCGACAGCCGTATGAAGGCCGACGACATACGTGG
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
CGGGGGGTTGCCATGGCGGTGGAATTCATACCCGTTGAGTCTATGGAACTACTATGCGG
GCCCCCAACGGTACCGCCACCTTAAGTATGGGCAACTCAGATACCTTTGATGATACGCC
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
TCTCCGGTCTTCACGGACAATCCGTCTCCCCCGGCTGTACCGCAGACATTCCAAGTGGCC
AGAGGCCAGAAGTGCTGTAGGCAGAGGGGGCCGACATGGCGTCTGTAAGGTTACCCGG
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
CACTTACACGCTCCCACCGGCAGCGGCAAGAGCACTAGGGTGCCGGCTGCATATGCAGCC
GTGAATGTGCGAGGGTGGCCGTGCGCGTTCTCGTGATCCACGGCCGACGTATACGTCCG
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
CAAGGGTACAAGGTGCTCGTCCTAAATCCGTCCGTGCGCGCCACCTTGGGTTTTGGGGCG
GTTCCCATGTTCCACGAGCAGGATTTAGGCAGGCAGCGGCGGTGGAACCCAAAACCCCGC
Q G Y K V L V L N P S V A A T L G F G A

4150 4160 4170 4180 4190 4200
TATATGTCCAAGGCACATGGTATCGACCCCAACCTTAGAACTGGGGTAAGGACCATCACC
ATATACAGGTTCCGTGTACCATAGCTGGGGTTGGAATCTTGACCCCATTCCTGGTAGTGG
Y M S K A H G I D P N L R T G V R T I T

Fig. 2-7

4210 4220 4230 4240 4250 4260
ACAGGTGCCCCATACATACTCCACCTATGGCAAGTTCCTTGCCGACGGTGGCGGCTCC
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
GGGGGCGCCTATGACATCATAATGTGTGATGAGTGCCACTCAACTGACTCGACTACCAT
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
TATGGCATCGGCACAGTCCTGGACCAAGCGGAGACGGCTGGAGCGCGGCTCGTGGTGCTC
ATACCGTAGCCGTGTCAGGACCTGGTTCGCCTCTGCCGACCTCGCGCCGAGCACCACGAG
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
TCCACCGCTACGCCTCCGGGATCGGTACCGTGCACACCTCAATATCGAGGAGGTGGCC
AGGTGGCGATGCGGAGGCCCTAGCCAGTGGCAGCGGTGTGGAGTTATAGCTCCTCCACCGG
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
CTGTCTAATACTGGAGAGATCCCCTTCTACGGCAAAGCCATTCCCATCGAGGCTATCAAG
GACAGATTATGACCTCTCTAGGGGAAGATGCCGTTTCGGTAAGGGTAGCTCCGATAGTTC
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
GGGGGAAGGCATCTCATTTTCTGCCATTCCAAGAAGAAGTGTGACGAACTCGCCGCAAAG
CCCCCTTCCGTAGAGTAAAGACGGTAAGGTTCTTCTTCACACTGCTTGAGCGGCGTTTC
G G R H L I F C H S K K K C D E L A A K

4570 4580 4590 4600 4610 4620
CTGTCAGGCCTCGGACTCAATGCCGTAGCGTATTACCGGGGTCTTGACGTGTCCGTGATA
GACAGTCCGGAGCCTGAGTTACGGCATCGCATAATGGCCCCAGAACTGCACAGGCAGTAT
L S G L G L N A V A Y Y R G L D V S V I

4630 4640 4650 4660 4670 4680
CCGACCAGCGGAGACGTTGTTGTGTCGTGGCGACGGACGCTCTAATGACGGGCTTTACCGGC
GGCTGGTTCGCCTCTGCAACAACAGCACCGCTGCCTGCGAGATTACTGCCCCGAAATGGCCG
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
GACTTTGACTCAGTGATCGACTGTAATACGTGTGTACCCAGACAGTCGATTTTCAGCTTG
CTGAAACTGAGTCACTAGCTGACATTATGCACACAGTGGGTCTGTGAGCTAAAGTCGAAC
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
GACCCACCTTCACCATGAGACGACGACCGTGCCCCAAGACGCAAGTGTGCGGCTCGCAG
CTGGGGTGGAAAGTGGTAACTCTGCTGCTGGCACGGGGTTCTGCGTCACAGCGCGAGCGTC
D P T F T I E T T T V P Q D A V S R S Q

4810 4820 4830 4840 4850 4860
AGGCGAGGCAGGACTGGTAGGGGCAGGGCTGGCATATACAGGTTTGTGACTCCAGGAGAA
TCCGCTCCGTCCTGACCATCCCCGTCCCGACCGTATATGTCCAAACACTGAGGTCCTCTT
R R G R T G R G R A G I Y R F V T P G E

4870 4880 4890 4900 4910 4920
CGGCCCTCGGGCATGTTTCGATTCTTCGGTCCTGTGTGAGTGTATGACGCGGGTTGTGCG
GCCGGGAGCCCGTACAAGCTAAGAAGCCAGGACACACTCACAATACTGCGCCCAACACGC
R P S G M F D S S V L C E C Y D A G C A

4930 4940 4950 4960 4970 4980
TGGTACGAACTCACGCCCCGCTGAGACCTCGGTTAGGTTGCGGGCGTACCTAAACACACCA
ACCATGCTTGAGTGCGGGCGACTCTGGAGCCAATCCAACGCCCCGCATGGATTGTGTGGT
W Y E L T P A E T S V R L R A Y L N T P

4990 5000 5010 5020 5030 5040
GGGTTGCCCCGTCTGCCAGGACCATCTGGAGTTCTCGGAGGGTGTCTTCACAGGCCCTCACC
CCCAACGGGCAGACGGTCCTGGTAGACCTCAAGAGCCTCCACAGAAGTGTCCGGAGTGG
G L P V C Q D H L E F S E G V F T G L T

5050 5060 5070 5080 5090 5100
CACATAGATGCCCCACTTCTTATCCAGACTAAACAGGCAGGAGAGAACTTCCCCCTACTTG
GTGTATCTACGGGTGAAGAATAGGGTCTGATTTGTCCGTCCTCTCTTGAAGGGGATGAAC
H I D A H F L S Q T K Q A G E N F P Y L

5110 5120 5130 5140 5150 5160
GTAGCATACCAGGCTACAGTGTGCGCCAGGGCTCAAGCCCCACCTCCATCGTGGGATGAA
CATCGTATGGTCCGATGTCACACGCGGTCCCGAGTTCGGGGTGGAGGTAGCACCCCTACTT
V A Y Q A T V C A R A Q A P P P S W D E

5170 5180 5190 5200 5210 5220
ATGTGGAGGTGTCTCATACGGCTGAAACCTACGCTGCACGGGCCAACACCCCTGCTGTAT
TACACCTCCACAGAGTATGCCGACTTTGGATGCGACGTGCCCGGTGTGGGGACGACATA
M W R C L I R L K P T L H G P T P L L Y

5230 5240 5250 5260 5270 5280
AGGTTAGGAGCCGTCCAAAATGAGGTCACCCCTCACACACCCCATACCAAATTCATCATG
TCCAATCCTCGGCAGGTTTTACTCCAGTGGGAGTGTGTGGGGTATTGGTTTAAGTAGTAC
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
ACATGTATGTGCGCTGACCTGGAGGTGCTCACCAGCACCTGGGTGCTGGTAGGCGGAGTC
TGTACATACAGCCGACTGGACCTCCAGCAGTGGTCGTGGACCCACGACCATCCGCCTCAG
T C M S A D L E V V T S T W V L V G G V

5350 5360 5370 5380 5390 5400
CTCGCAGCTCTGGCCGCGTACTGCCTGACAACAGGCAGCGTGGTCATTGTGGGCAGGATC
GAGCGTCGAGACCGGCGCATGACGGACTGTTGTCCGTCGCACCAGTAACACCCGTCCTAG
L A A L A A Y C L T T G S V V I V G R I

Fig. 2-9

5410 5420 5430 5440 5450 5460
ATCCTGTCCGGGAAGCCGGCTATCATCCCCGATAGGGAAGTTCTCTACCAGGAGTTCGAC
TAGGACAGGCCCTTCGGCCGATAGTAGGGCTATCCCTTCAAGAGATGGTCCCTCAAGCTG
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
GAGATGGAGGAGTGTGCCTCACACCTCCCTTACTTTCGAACAGGGAATGCAGCTCGCCGAG
CTCTACCTCCTCACACGGAGTGTGGAGGGAATGAAGCTTGTCCCTTACGTCGAGCGGCTC
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
CAATTCAAACAGAAGGCGCTCGGGTTGCTGCAAACAGCCACCAAGCAGGCGGAGGCTGCT
GTTAAGTTTGTCTTCCGCGAGCCCAACGACGTTTGTGCGGTGGTTCGTCCGCCCTCCGACGA
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
GCTCCCGTGGTGGAGTCCAAGTGGCGAGCCCTTGAGACCTTCTGGGCGAAGCACATGTGG
CGAGGGCACCACCTCAGGTTACCCGCTCGGGAACCTCTGGAAGACCCGCTTCGTGTACACC
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
AACTTCATTAGTGGGATACAGTACTTGGCAGGCTTGTCCACTCTGCCTGGGAACCCCGCA
TTGAAGTAATCACCTATGTCATGAACCGTCCGAACAGGTGAGACGGACCCCTTGGGGCGT
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
ATACGATCACCGATGGCATTACACGCCTCCATCACCAGCCCGCTCACCACCCAGCATACC
TATGCTAGTGGCTACCGTAAGTGTCTGGAGGTAGTGGTCTGGGCGAGTGGTGGGTCTATGG
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
CTCTTGTTTAATCATCTTGGGGGGATGGGTGGCTGCCAACTCGCCCCCCCCAGCGCTGCC
GAGAACAAATTGTAGAACCCCCCTACCCACCGACGGGTTGAGCGGGGGGGGTCGCGACGG
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
TCAGCTTTCGTGGGCGCCGGCATCGCTGGAGCCGCTGTTGGCACGATAGGCCTTGGGAAG
AGTCGAAAGCACCCGCGGCCGTAGCGACCTCGGCGACAACCGTGCTATCCGGAACCCCTTC
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
GTGCTTGTGGACATTCTGGCAGGTTATGGAGCAGGGGTGGCGGGCGCACTTGTGGCCTTT
CACGAACACCTGTAAGACCGTCCAATACCTCGTCCCCACCGCCCGCGTGAACACCGGAAA
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
AAGATCATGAGCGGCGAGATGCCTTCAGCCGAGGACATGGTCAACTTACTCCCTGCCATC
TTCTAGTACTCGCCGCTCTACGGAAGTCGGCTCCTGTACCAGTTGAATGAGGGACGGTAG
K I M S G E M P S A E D M V N L L P A I

Fig. 2-10

6010 6020 6030 6040 6050 6060
CTTTCTCCCGGTGCCCTGGTCGTCGGGATTGTGTGTGCAGCAATACTGCGTCGGCATGTG
GAAAGAGGGCCACGGGACCAGCAGCCCTAACACACACGTCGTTATGACGCAGCCGTACAC
L S P G A L V V G I V C A A I L R R H V

6070 6080 6090 6100 6110 6120
GGCCCAGGGGAAGGGGCTGTGCAGTGGATGAACCGGCTGATAGCGTTTCGCCTCGCGGGGT
CCGGGTCCCCTTCCCCGACACGTCACCTACTTGGCCGACTATCGCAAGCGGAGCGCCCCA
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
AACCACGTCTCCCCCAGGCACCTATGTGCCAGAGAGCGAGCCTGCAGCGCGTGTACCCAG
TTGGTGCAGAGGGGTCCGTGATACACGGTCTCTCGCTCGGACGTCGCGCACAATGGGTC
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
ATCCTTTCCAGCCTCACCATCACTCAGCTGTTGAAGAGACTCCACCAGTGGATTAATGAG
TAGGAAAGGTTCGGAGTGGTAGTGAGTCGACAACCTTCTCTGAGGTGGTTCACCTAATTACTC
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
GACTGCTCTACGCCATGCTCCAGCTCGTGGCTAAGGGAGATTGTTGGGACTGGATCTGCACG
CTGACGAGATGCGGTACGAGGTCGAGCACCGATTCCCTCTAAACCCTGACCTAGACGTGC
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
GTGTTGACTGACTTCAAGACCTGGCTCCAGTCCAAGCTCCTGCCGCGATTACCGGGAGTC
CACAAGTGAAGTTCTGGACCGAGGTCAGGTTTCGAGGACGGCGCTAATGGCCCTCAG
V L T D F K T W L Q S K L L P R L P G V

6370 6380 6390 6400 6410 6420
CCTTTTTTCTCATGCCAACGCGGGTATAAGGGAGTCTGGCGGGGGGACGGCATCATGCAC
GGAAAAAAGAGTACGGTTGCGCCCATATTCCTCAGACCGCCCCCTGCCGTAGTACGTG
P F F S C Q R G Y K G V W R G D G I M H

6430 6440 6450 6460 6470 6480
ACCACCTGCCCATGCGGAGCACAGATCACCGGACACGTCAAAAACGGTTCCATGAGGATC
TGGTGGACGGGTACGCCTCGTGTCTAGTGGCCTGTGCAGTTTTTGCCAAGGTACTCCTAG
T T C P C G A Q I T G H V K N G S M R I

6490 6500 6510 6520 6530 6540
GTTGGGCCTAAAACCTGCAGCAACACGTGGTACGGGACATTCCCCATCAACGCGTACACC
CAACCCGGATTTTGGACGTCGTTGTGCACCATGCCCTGTAAGGGGTAGTTGCGCATGTGG
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
ACGGGCCCCCTGCACACCCTCCCCGGCGCCAACTATTCCAAGGCATTGTGGAGAGTGGCC
TGCCCGGGGACGTGTGGGAGGGGCGCGGTTTGATAAGGTTCCGTAACACCTCTCACCGG
T G P C T P S P A P N Y S K A L W R V A

Fig. 2-11

6610 6620 6630 6640 6650 6660
GCTGAGGAGTACGTGGAGGTCACGCGGGTGGGAGATTTCACTACGTGACGGGCATGACC
CGACTCCTCATGCACCTCCAGTGCGCCACCCTCTAAAAGTGATGCACTGCCCGTACTGG
A E E Y V E V T R V G D F E Y V T G M T

6670 6680 6690 6700 6710 6720
ACTGACAACGTGAAGTGTCCATGCCAGGTTCCGGCCCCCGAATTCTTCACGGAGGTGGAT
TGACTGTTGCACTTCACAGGTACGGTCCAAGGCCGGGGCTTAAGAAGTGCCCTCCACCTA
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
GGAGTGCGGTTGCACAGGTACGCTCCGGCGTGACAGCTCTCCTACGGGAGGAGGTGCGTA
CCTCAGGCCAACGTGTCCATGCGAGGCCGCACGTCTGGAGAGGATGCCCTCCTCAGCAT
G V R L E R Y A P A C R P L L R E E V V

6790 6800 6810 6820 6830 6840
TTCCAGGTGCGGCTCCACCAGTACCTGGTTCGGGTACAGCTCCCATGCGAGCCCCGAACCG
AAGGTCCAGCCCGAGGTGGTCATGGACCAGCCAGTGTGCGAGGGTACGCTCGGGCTTGGC
F Q V G L E Q Y L V G S Q L P C E P E P

6850 6860 6870 6880 6890 6900
GATGTAGCAGTGCTCACTTCCATGCTCACTGACCCCTCCCACATTACAGCAGAGACGGCT
CTACATCGTACAGGTGAAGGTACGAGTGACTGGGGAGGGTGTAAATGTCGTCTCTGCCGA
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
AAGCGTAGGCTGGCCAGGGGGTCTCCCCCTCCTTGGCCAGCTCTTCAGCTAGCCAGTTG
TTCGCATCCGACCGGTCCCCCAGAGGGGGGAGGAACCGGTGAGAAAGTCGATCGGTCAAC
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
TCTGCGCCTTCTTGAAGGCGACATGCACTACCCATCATGACTCCCCGGACGCTGACCTC
AGACGCGGAAGGAACTTCCGCTGTACGTGATGGGTAGTACTGAGGGGCCTGCGACTGGAG
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
ATTGAGGCCAACCTCTTGTGGCGGCAAGAGATGGGCGGGAACATCACCCGCGTGGAGTCA
TAACTCCGGTTGGAGAACACCGCGTCTCTACCCGCCCTTGTAGTGGGCGCACCTCAGT
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
GAGAATAAGGTGGTAATCCTGGACTCTTTCGACCCGCTCCGAGCGGAGGATGATGAGGGG
CTCTTATTCCACCATAGGACCTGAGAAAGCTGGGCGAGGCTCGCCTCCTACTACTCCCC
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
GAAATATCCGTTCCGGCGGAGATCCTGCGGAAATCCAGGAAATCCCCCAGCGCTGCCC
CTTTATAGGCAAGGCCGCTCTAGGACGCTTTAGGTCCTTTAAGGGGGGTGCGGACGGG
E I S V P A E I L R K S R K F P P A L P

Fig. 2-12

7210 7220 7230 7240 7250 7260
ATATGGGCGCCGCGGATTACAACCCCTCCGCTGCTAGAGTCCTGGAAGGACCCGGACTAC
TATACCCGCGGCGGCCTAATGTTGGGAGGCGACGATCTCAGGACCTTCCTGGGCCTGATG
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
GTTCCCTCCGGTGGTACACGGGTGCCCGTTGCCGCCACCAAGGCCCTCCAATACCACCT
CAAGGAGGCCACCATGTGCCACGGGCAACGGCGGGTGGTTCCGGGGAGGTTATGGTGGGA
V P P V V H G C P L P P T K A P P I P P

7330 7340 7350 7360 7370 7380
CCACGGAGGAAGAGGACGGTTGTCCTGACAGAATCCACCGTGTCTTCTGCCTTGGCGGAG
GGTGCCCTCCTTCTCCTGCCAACAGGACTGTCTTAGGTGGCACAGAAGACGGAACCGCCTC
P R R K R T V V L T E S T V S S A L A E

7390 7400 7410 7420 7430 7440
CTCGCTACTAAGACCTTCGGGCAGCTCCGGATCGTCGGCCATCGACAGCGGTACGGCGACC
GAGCGATGATTCTGGAAGCCGTCGAGGCCTAGCAGCCGCTAGCTGTGCCATGCCGCTGG
L A T K T F G S S G S S A I D S G T A T

7450 7460 7470 7480 7490 7500
GCCCCCTCCTGACCAAGCCTCCGGTGACGGCGACAGAGAGTCCGACGTTGAGTCGTTCTCC
CGGGGAGGACTGGTTCGGAGGCCACTGCCGCTGTCTCTCAGGCTGCAACTCAGCAAGAGG
A P P D Q A S G D G D R E S D V E S F S

7510 7520 7530 7540 7550 7560
TCCATGCCCCCCTTGAGGGAGAGCCGGGGGACCCCGATCTCAGCGACGGATCTTGGTCC
AGGTACGGGGGGGAACCTCCCTCTCGGCCCCCTGGGGCTAGAGTCGCTGCCTAGAACCAGG
S M P P L E G E P G D P D L S D G S W S

7570 7580 7590 7600 7610 7620
ACCGTGAGCGAGGAGGCTAGTGAGGACGTCGTCTGCTGTTGATGTCCTACACATGGACA
TGGCACTCGCTCCTCCGATCACTCCTGCAGCAGACGACAAGCTACAGGATGTGTACCTGT
T V S E E A S E D V V C C S M S Y T W T

7630 7640 7650 7660 7670 7680
GGCGCCCTGATCACGCCATGCGCTGCGGAGGAAAGCAAGTTGCCCATCAACCCGTTGAGC
CCGCGGGACTAGTGCGGTACGCGACGCCCTCCTTTCGTTCAACGGGTAGTTGGGCAACTCG
G A L I T P C A A E E S K L P I N P L S

7690 7700 7710 7720 7730 7740
AATTCTTTGCTACGTCACCACAACATGGTCTATGCTACAACATCCCGCAGCGCAGGCCTG
TTAAGAAACGATGCAGTGGTGTGTACCAGATACGATGTTGTAGGGCGTCGCGTCCGGAC
N S L L R H H N M V Y A T T S R S A G L

7750 7760 7770 7780 7790 7800
CGGCAGAAGAAGGTCACCTTTGACAGACTGCAAGTCCTGGACGACCACTACCGGGACGTG
GCCGTCTTCTTCCAGTGGAACCTGTCTGACGTTTCAGGACCTGCTGGTGTATGGCCCTGCAC
R Q K K V T F D R L Q V L D D H Y R D V

Fig. 2-13

7810 7820 7830 7840 7850 7860
CTTAAGGAGATGAAGGCGAAGGCGTCCACAGTTAAGGCTAAACTTCTATCTGTAGAAGAA
GAATTCCTCTACTTCCGCTTCCGCAGGTGTCAATTCCGATTTGAAGATAGACATCTTCTT
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
GCCTGCAAACTGACGCCCCACATTCCGGCCAAATCCAAATTTGGCTACGGGGCGAAGGAC
CGSACGTTTGACTGCGGGGGTGTAAAGCCGTTTAGGTTTAAACCGATGCCCCGCTTCCTG
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
GTCCGGAGCCTATCCAGCAGGGCCGTTACCCACATCCGCTCCGTGTGGAAGGACCTGCTG
CAGGCCTCGGATAGGTCTGTCGCGCAATGGGTGTAGGCGAGGCACACCTTCCTGGACGAC
V R S L S S R A V T H I R S V W K D L L

7990 8000 8010 8020 8030 8040
GAAGACACTGAAACACCAATTAGCACTACCATCATGGCAAAAAATGAGGTTTTCTGTGTC
CTTCTGTGACTTTGTGGTTAATCGTGATGGTAGTACCGTTTTTTACTCCAAAAGACACAG
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
CAACCAGAGAAGGGAGGGCCGCAAGCCAGCTCGCCTTATCGTGTTCCCAGATCTGGGAGTT
GTTGGTCTCTTCCCTCCGGCGTTTCGGTCGAGCGGAATAGCACAAAGGTCTAGACCCCTCAA
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
CGTGTATGCGAGAAGATGGCCCTTTATGACGTGGTCTCCACCCTTCCTCAGGGCCGTGATG
GCACATACGCTCTTCTACCGGGAAATACTGCACCAGAGGTGGGAAGGAGTCCGGCACTAC
R V C E K H A L Y D V V S T L P Q A V M

8170 8180 8190 8200 8210 8220
GGCTCCTCATACGGATTCCAGTACTCTCCTAAGCAGCGGGTCGAGTTTCCTGGTGAATACC
CCGAGGAGTATGCCTAAGGTCATGAGAGGATTCGTCGCCCAGCTCAAGGACCACTTATGG
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
TGGAAATCAAAGAAATGCCCCATGGGCTTCTCATATGACACCCGCTGTTTTGACTCAACG
ACCTTTAGTTTTCTTTACGGGGTACCCGAAGAGTATACTGTGGGCGACAAAACCTGAGTTGC
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
GTCAGTGAGAATGACATCCGTGTTGAGGAGTCAATTTACCAATGTTGTGACTTGGCCCCC
CAGTGACTCTTACTGTAGGCACAACCTCCTCAGTTAAATGGTTACAACACTGAACCGGGGG
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
GAAGCCAAACTGGCCATAAAGTCGCTCACAGAGCGGCTCTATATCGGGGGTCCCTGACT
CTTCGGTTTTGACCGGTATTTACGCGAGTGTCTCGCCGAGATATAGCCCCAGGGGACTGA
E A K L A I K S L T E R L Y I G G P L T

Fig. 2-14

8410 8420 8430 8440 8450 8460
AATTCAAAAGGGCAGAACTGCGGTTACCGCCGGTGCCGCGGAGCGGGCGTGCTGACGACT
TTAAGTTTTCCCGTCTTGACGCCAATGGCGGCCACGGCGCGCTCGCCGCACGACTGCTGA
N S K G Q N C G Y R R C R A S G V L T T

8470 8480 8490 8500 8510 8520
AGCTGCGGTAATACCCTCACATGTTACCTGAAAGCCACTGCGGCCTGTGAGCTGCGAAG
TCGACGCCATTATGGGAGTGTAATGGACTTTTCGGTGACGCCGGACAGCTCGACGCTTC
S C G N T L T C Y L K A T A A C R A A K

8530 8540 8550 8560 8570 8580
CTCCGGGACTGCACGATGCTCGTGAACGGAGACGACCTTGTCGTTATCTGTGAAAGCGCG
GAGGCCCTGACGTGCTACGAGCACTTGCCCTCTGCTGGAACAGCAATAGACACTTTCGCGC
L R D C T M L V N G D D L V V I C E S A

8590 8600 8610 8620 8630 8640
GGAACCCAGAGGATGCGGCGAGCCTACGAGTCTTCACGGAGGCTATGACTAGGTACTCT
CCTTGGGTTCTCCTACGCCGCTCGGATGCTCAGAAGTGCCCTCCGATACTGATCCATGAGA
G T Q E D A A S L R V F T E A M T R Y S

8650 8660 8670 8680 8690 8700
GCCCCCCTGGGGACCCGCTCAACCGGAATACGACTTGGAGTTGATAACATCATGTTCC
CGGGGGGGACCCCTGGGCGGAGTTGGCCTTATGCTGAACCTCAACTATTGTAGTACAAGG
A P P G D P P Q P E Y D L E L I T S C S

8710 8720 8730 8740 8750 8760
TCCAATGTGTGCGTTCGCACACGATGCATCTGGTAAAGGGTGTACTACCTCACCCGTGAC
AGGTTACACAGCCAGCGTGTGCTACGTAGACCATTTTCCCACATGATGGAGTGGGCACTG
S N V S V A H D A S G K R V Y Y L T R D

8770 8780 8790 8800 8810 8820
CCTACCACCCCCCTTGCACGGGCTGCGTGGGAGACAGCTAGACACACTCCAGTCAACTCC
GGATGGTGGGGGGAACGTGCCCCGACGCACCCCTCTGTGATCTGTGTGAGGTCAGTTGAGG
P T T P L A R A A W E T A R H T P V N S

8830 8840 8850 8860 8870 8880
TGGCTAGGCAACATCATCATGTATGCGCCACCTTATGGGCAAGGATGATTCTGATGACT
ACCGATCCGTTGTAGTAGTACATACGCGGGTGGAATACCCGTTCTACTAAGACTACTGA
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
CATTTCTTCTCCATCCTTCTAGCTCAGGAGCAACTTGAAAAAACCTAGATTGTCAGATC
GTAAAGAAGAGGTAGGAAGATCGAGTCCTCGTTGAACTTTTTTGGGATCTAACAGTCTAG
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
TACGGGGCCTGTTACTCCATTGAACCACTTGATCTACCTCAGATCATTGAGCGACTCCAT
ATGCCCCGGACAATGAGGTAACCTTGGTGAACCTAGATGGAGTCTAGTAACTCGCTGAGGTA
Y G A C Y S I E P L D L P Q I I E R L H

Fig. 2-15

9010 9020 9030 9040 9050 9060
GGTCTTAGCGCATTTTCACTCCATAGTTACTCTCCAGGCGAGATCAATAGGGTGGCTTCA
CCAGAATCGCGTAAAAGTGAGGTATCAATGAGAGGTCGCTCTAGTTATCCACCGAAGT
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
TGCCTCAGAAAACCTTGGGGTACCACCCTTGCGAGCCTGGAGACATCGGGCCAGAAGTGTC
ACGGAGTCTTTTGAACCCCATGGTGGGAACGCTCGGACCTCTGTAGCCCGGTCTTCACAG
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
CGCGCTAAGCTACTGTCCAGGGGGGGAGGGCCGCCACTTGTGGCAAGTACCTCTTCAAC
GCGCGATTGATGACAGGGTCCCCCCTCCCGCGGGTGAACACCGTTCATGGAGAAGTTG
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
TGGGCGGTGAGGACCAAGCTCAAACCTCACTCCAATCCAGCCGCGTCCCGGTGGACTTG
ACCCGCCACTCCTGGTTCGAGTTTGAGTGAGGTTAGGGTCCGCGCAGGGCCAACCTGAAC
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
TCCGGCTGGTTCGTTGCTGGTTACAGCGGGGGAGACATATATCACAGCCTGTCTCGTGCC
AGGCCGACCAAGCAACGACCAATGTCGCCCCCTCTGTATATAGTGTCCGACAGAGCACGG
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
CGACCCCGCTGGTTCATGTTGTGCTACTCCTACTTTCCGTGGGGGTAGGCATCTACCTG
GCTGGGGCGACCAAGTACAACACGGATGAGGATGAAAGGCACCCCCATCCGTAGATGGAC
R P R W F M L C L L L L S V G V G I Y L

9370 9380 9390 9400 9410 9420
CTCCCCAACCGATGAATGGGGAGCTAAACACTCCAGGCCAATAGGCCGTTTCTCTTTTTT
GAGGGGTGGCTACTTACCCCTCGATTTGTGAGGTCCGTTATCCGGCAAAGAGAAAAAA
L P N R

9430 9440 9450 9460 9470
TT
AAA

Fig. 2-16

| 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 |

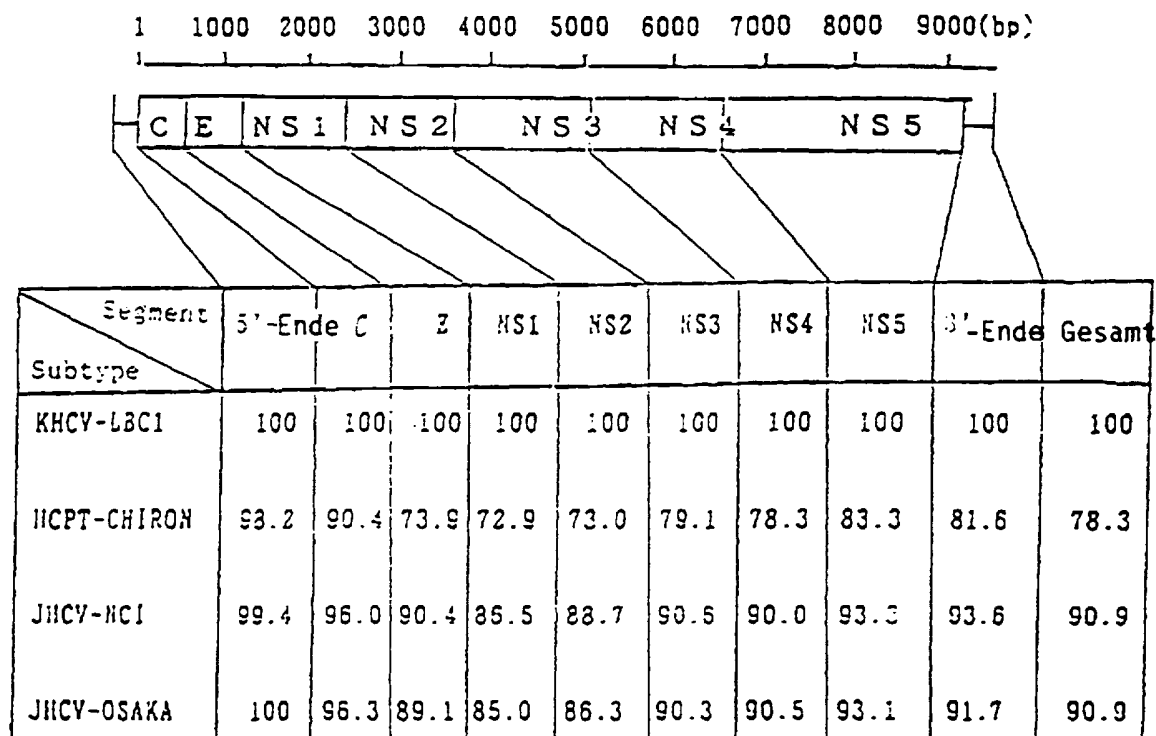


Fig. 1

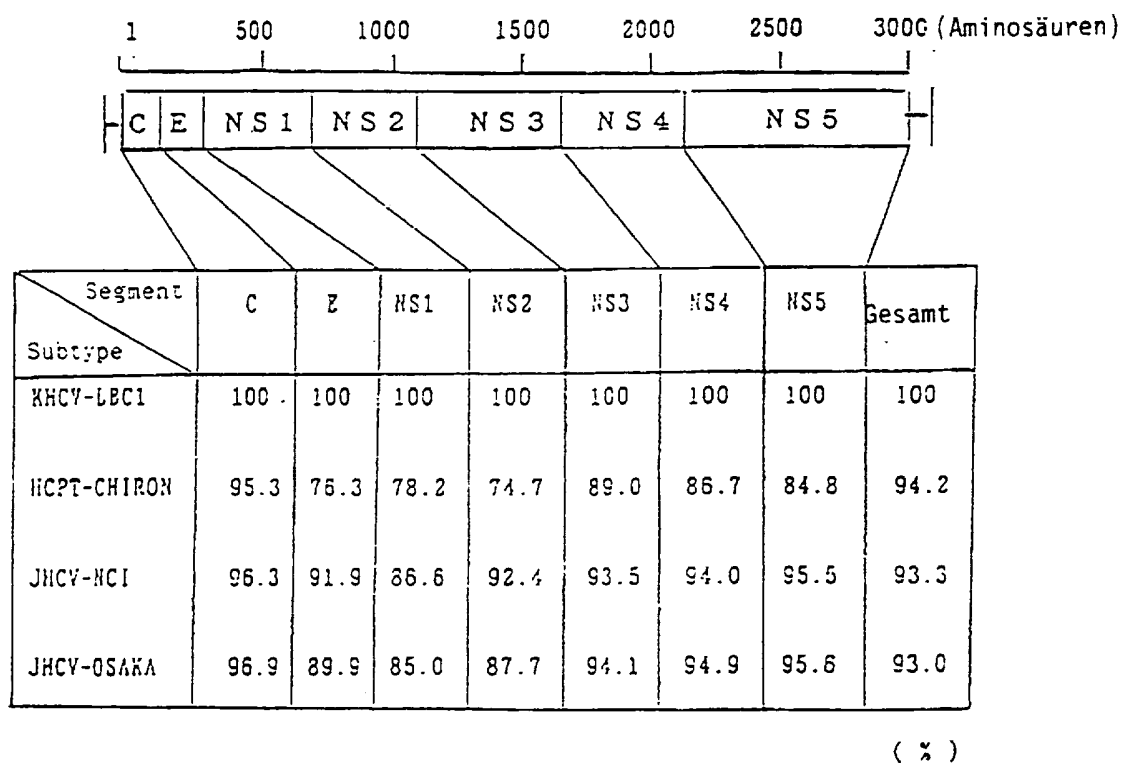


Fig. 5

| | | |
|-------------|-----|--|
| KHCV366 | 1 | gGCCAGCCCCcgattGGGGGGCGACACTCCACCATAGATCACTCCCCCTGTGAGGAACTACT |
| HCPT-CHIRON | 1 | gGCCAGCCCCctgaTGGGGGGCGACACTCCACCNTgaATCACTCCCCCTGTGAGGAACTACT |
| JHCV-NCI | 1 | TTGGGGGGCGACACTCCACCATAGATCACTCCCCCTGTGAGGAACTACT |
| | | |
| KHCV366 | 61 | GTCTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTCGTGCAGCCTCCAGGA |
| HCPT-CHIRON | 60 | GTCTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTCGTGCAGCCTCCAGGA |
| JHCV-NCI | 48 | GTCTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTCGTGCAGCCTCCAGGA |
| | | |
| KHCV366 | 121 | CCCCCCTCCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCCA |
| HCPT-CHIRON | 120 | CCCCCCTCCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCCA |
| JHCV-NCI | 108 | CCCCCCTCCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCCA |
| | | |
| KHCV366 | 181 | GGACGACCGGGTCCTTTCTTGGATCAACCCGCTCAATGCCTGGAGATTTGGGCGTGCCCC |
| HCPT-CHIRON | 180 | GGACGACCGGGTCCTTTCTTGGATCAACCCGCTCAATGCCTGGAGATTTGGGCGTGCCCC |
| JHCV-NCI | 168 | GGACGACCGGGTCCTTTCTTGGATCAACGCGCTCAATGCCTGGAGATTTGGGCGTGCCCC |
| | | |
| KHCV366 | 241 | CGCGAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGTGCGGAAGGCCCTTGTTGCTACTGCCTGATAG |
| HCPT-CHIRON | 240 | CGCaAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGTGCGGAAGGCCCTTGTTGCTACTGCCTGATAG |
| JHCV-NCI | 228 | CGCGAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGTGCGGAAGGCCCTTGTTGCTACTGCCTGATAG |
| | | |
| KHCV366 | 301 | GCTGCTTGCGAGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCAACCATGAGCACGAATCCTAAA |
| HCPT-CHIRON | 300 | GCTGCTTGCGAGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCAACCATGAGCACGAATCCTAAA |
| JHCV-NCI | 288 | GCTGCTTGCGAGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCAACCATGAGCACGAATCCTAAA |

```

      10      20      30      40      50      60
      |      |      |      |      |      |
CTCTTTACCCTGTCACCACACTACAAAGTGTTCTCGCTAGGCTCATATGGTGGTTACAG
LeuPheThrLeuSerProHisTyrLysValPheLeuAlaArgLeuIleTrpTrpLeuGln

      70      80      90     100     110     120
      |      |      |      |      |      |
TATTTTATCACCAGGGCCGAAGCGCACCTGCAAGTGTTGGATCCCCCCCCTCAACGTTTCGG
TyrPheIleThrArgAlaGluAlaHisLeuGlnValTrpIleProProLeuAsnValArg

     130     140     150     160     170     180
     |      |      |      |      |      |
GGGGGCCGCGATGCCATCATCCTCCTCACGTGTGCGGTCCACTCAGAGCTGATTTTGGAC
GlyGlyArgAspAlaIleIleLeuLeuThrCysAlaValHisSerGluLeuIlePheAsp

     190     200     210     220     230     240
     |      |      |      |      |      |
ATCACCAAGATCTTGCTCGCCATACTTGGTCCGCTCATGGTACTCCAGGCTGGCCTAACC
IleThrLysIleLeuLeuAlaIleLeuGlyProLeuMETValLeuGlnAlaGlyLeuThr

     250     260     270
     |      |      |
AGAGTGCCGTACTTTGTCAGCGCTCAAGGGCTCATCC
ArgValProTyrPheValSerAlaGlnGlyLeuIle
```

Fig. 7

```

      10      20      30      40      50      60
      |      |      |      |      |      |
CTCTTGACCTTGTCAACATACTATAAAGTGTTCCCTCGCTAGGCTCATATGGTGGTTGCAA
LeuLeuThrLeuSerProTyrTyrLysValPheLeuAlaArgLeuIleTrpTrpLeuGln

      70      80      90     100     110     120
      |      |      |      |      |      |
TATTTTATCACCAGAGCCGAGGCGCACTTGCAAGTGTGGATCCCCCTCTCAACGTCCGG
TyrPheIleThrArgAlaGluAlaHisLeuGlnValTrpIleProProLeuAsnValArg

     130     140     150     160     170     180
     |      |      |      |      |      |
GGAGGCCGTGATGCAATCATCCTCCTGGCGTGTGCGGTCCACCCAGAGCCGATCTTTGAC
GlyGlyArgAspAlaIleIleLeuLeuAlaCysAlaValHisProGluProIlePheAsp

     190     200     210     220     230     240
     |      |      |      |      |      |
ATCACAAAATATTTGCTCGCCATATTCGGCCCGCTCATGGTGCTCCAGGCCGGCATAACT
IleThrLysTyrLeuLeuAlaIlePheGlyProLeuMETValLeuGlnAlaGlyIleThr

     250     260     270     280     290     300
     |      |      |      |      |      |
AGAGTGCCGTACTTCTGGCGCGCACAAAGGGCTCATTCGTGCATGCATGTTGGCGCGGAAA
ArgValProTyrPheTrpArgAlaGlnGlyLeuIleArgAlaCysMETLeuAlaArgLys

     310
     |
GTCGCTGGGGGTCATTAC
ValAlaGlyGlyHisTyr
```

Fig. 8

10 20 30 40 50 60
CTCTTGACCTTGTCACCACTATAAAGTGTTCCCTTGCCAGGTTTCATATGGTGGCTACAA
LeuLeuThrLeuSerProHisTyrLysValPheLeuAlaArgPheIleTrpTrpLeuGln

70 80 90 100 110 120
TATCTCATCACCAGAACCGAAGCGCATCTGCAAGTGTGGGTCCCCCTCTCAACGTTCTGA
TyrLeuIleThrArgThrGluAlaHisLeuGlnValTrpValProProLeuAsnValArg

130 140 150 160 170 180
GGAGGCCGTGATGCCGTCATCCTCCTCACGTGCGCAGTCTACCCAGAGCTAATCTTTGAC
GlyGlyArgAspAlaValIleLeuLeuThrCysAlaValTyrProGluLeuIlePheAsp

190 200 210 220 230 240
ATCACCAAACCTCCTGCTTGCCACACTCGGTCCGCTCATGGTGCTCCAGGCTGGCTTAATT
IleThrLysLeuLeuLeuAlaThrLeuGlyProLeuMETValLeuGlnAlaGlyLeuIle

250 260 270 280 290 300
AGAGTGCCGTACTTCGTACGCTCAGGGCTCATTCGTGCATGCATGTTGGTGCGGAAAGTT
ArgValProTyrPheValArgSerGlyLeuIleArgAlaCysMETLeuValArgLysVal

310
GCTGGGGGTCATTAT
AlaGlyGlyHisTyr

Fig. 9

10 20 30 40 50 60
CTCTTGACCTGTCAACCACTATAAAGTGTTCCCTCGCTAGGCTCATGTGGTGGTTACAA
LeuLeuThrLeuSerProHisTyrLysValPheLeuAlaArgLeuMETTrpTrpLeuGln

70 80 90 100 110 120
TACTTCCTCACCAGAGCCGAAGCGCACTTGCAAGTGTGGGTCCCCTCTCTCAACGTTCTGA
TyrPheLeuThrArgAlaGluAlaHisLeuGlnValTrpValProSerLeuAsnValArg

130 140 150 160 170 180
GGAGGCCGCGATGCCATCATCCTCCTCACGTGCGCAGTCTACCCAGAGCTAATCTTTGAC
GlyGlyArgAspAlaIleIleLeuLeuThrCysAlaValTyrProGluLeuIlePheAsp

190 200 210 220 230 240
ATCACCAAACCTCTTGCTTGCCCACTCGGCCCGCTCATGGTGCTCCAGGCTGGCTTAACT
IleThrLysLeuLeuLeuAlaThrLeuGlyProLeuMETValLeuGlnAlaGlyLeuThr

250 260 270 280 290 300
AGAGTGCCGTACTTTGTGCGCGCCAGGGGCTCATTCGTGCGTGCATGTTGGTGCGGAAA
ArgValProTyrPheValArgAlaGlnGlyLeuIleArgAlaCysMETLeuValArgLys

310
GTTGTGGGGGGGCCATTAT
ValValGlyGlyHisTyr

Fig. 10

10 20 30 40 50 60
CTCTTGACCTTGTCACCACACTATAAAGTGTTCTTGCCAGGTTTCATATGGTGGCTACAA
LeuLeuThrLeuSerProHisTyrLysValPheLeuAlaArgPheIleTrpTrpLeuGln

70 80 90 100 110 120
TATCTCATCACCAGAACCGAAGCGCATCTGCAAGTGTTGGTCCCCCTCTCAACGTTGG
TyrLeuIleThrArgThrGluAlaHisLeuGlnValTrpValProProLeuAsnValArg

130 140 150 160 170 180
GGGGGTCGCGATGCCATCATCCTCCTCGCGTGTGCGGTCCACCCAGAGCTGATCTTTGAC
GlyGlyArgAspAlaIleIleLeuLeuAlaCysAlaValHisProGluLeuIlePheAsp

190 200 210 220 230 240
ATCACCAAACCTCTTGCTCGCCATACTCGGTCCGCTCATGGTGCTCCAGGCTAGCATAATT
IleThrLysLeuLeuLeuAlaIleLeuGlyProLeuMETValLeuGlnAlaSerIleIle

250 260 270 280 290 300
CGAGTGCCGTACTCCGTGCGCGCTCAAGGCCTCATTCGTGCATGCATGTTGGTGCGGAAA
ArgValProTyrSerValArgAlaGlnGlyLeuIleArgAlaCysMETLeuValArgLys

310
GCCGCGGGGGTCATTAT
AlaAlaGlyGlyHisTyr

Fig. 11

```

      10      20      30      40      50      60
      |      |      |      |      |      |
CTCTTGACCTTGTCACCATACTATAAGGTGCTCCTCGCTAGGCTCATATGGTGGTTGCAA
LeuLeuThrLeuSerProTyrTyrLysValLeuLeuAlaArgLeuIleTrpTrpLeuGln

      70      80      90      100     110     120
      |      |      |      |      |      |
TATTTTATCACCAGAGCCGAGGCGCACTTGCAAGTGTGGGCTCCCCCCTTAACGTTTCGG
TyrPheIleThrArgAlaGluAlaHisLeuGlnValTrpAlaProProLeuAsnValArg

      130     140     150     160     170     180
      |      |      |      |      |      |
GGGGGCCGCGATGCCATCATCCTCCTCATGTGTGTAGTTCACCCGGAGCTAATCTTTGAC
GlyGlyArgAspAlaIleIleLeuLeuMETCysValValHisProGluLeuIlePheAsp

      190     200     210     220     230     240
      |      |      |      |      |      |
ATCACAAAATCCTGCTCGCCGTGCTCGGTCCGCTCACGGTGCTCCAGGCTGGCATAACC
IleThrLysIleLeuLeuAlaValLeuGlyProLeuThrValLeuGlnAlaGlyIleThr

      250     260     270     280     290     300
      |      |      |      |      |      |
CGAGTGCCGTACTTTGTGCGCGCTCAATGGCTCATTCGTGCGTGCGTGGTGGCGGAAC
ArgValProTyrPheValArgAlaGlnTrpLeuIleArgAlaCysMETLeuValArgAsn

      310
      |
ATCGCTGGGGGTCATTAT
IleAlaGlyGlyHisTyr
```

Fig. 12

```

      10      20      30      40      50      60
      |      |      |      |      |      |
CTCTTGACCTTGTCACCACTATAAAGTGTTCCCTTGCCAGGTTTCATATGGTGGCTACAA
LeuLeuThrLeuSerProHisTyrLysValPheLeuAlaArgPheIleTrpTrpLeuGln

      70      80      90     100     110     120
      |      |      |      |      |      |
TATCTCATCACCAGAACCGAAGCGCATCTGCAAGTGTGGGTCCCCCTCTCAACGTTTCGG
TyrLeuIleThrArgThrGluAlaHisLeuGlnValTrpValProProLeuAsnValArg

     130     140     150     160     170     180
     |      |      |      |      |      |
GGGGGTGCGGATGCCATCATCCTCCTCACATGCGTGGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGAC
GlyGlyArgAspAlaIleIleLeuLeuThrCysValValHisProGluLeuIlePheAsp

     190     200     210     220     230     240
     |      |      |      |      |      |
ATCACCAAACTCTTGCTCGCCATACTCGGTCCGCTCATGGTGCTCCAGGCTAGCATAATT
IleThrLysLeuLeuLeuAlaIleLeuGlyProLeuMETValLeuGlnAlaSerIleIle

     250     260     270     280     290     300
     |      |      |      |      |      |
CGAGTGCCGTACTTTGTGCGCGCTCAAGGCCTCATTCGTGCATGTATGTTGGTGCGGAAA
ArgValProTyrPheValArgAlaGlnGlyLeuIleArgAlaCysMETLeuValArgLys

     310
     |
GTTGCTGGGGGTCATTAT
ValAlaGlyGlyHisTyr
```

Fig. 13

10 20 30 40 50 60
CTCTTGACTCTGTGCGCCACACTATAAAGTGTTCCCTCGCTAGCCTCATGTGGTGGTTACAA
LeuLeuThrLeuSerProHisTyrLysValPheLeuAlaSerLeuMETTrpTrpLeuGln

70 80 90 100 110 120
TACTTCCTCACCAGAGCCGAAGCGCACTTGCAAGTGTTGGTCCCCCTCTCTCAACGTTTCGA
TyrPheLeuThrArgAlaGluAlaHisLeuGlnValTrpValProSerLeuAsnValArg

130 140 150 160 170 180
GGAGGCCGCGATGCCATCATCCTCCTCACGTGCGCAGTCTACCCAGAGCTAATCTTAGAC
GlyGlyArgAspAlaIleIleLeuLeuThrCysAlaValTyrProGluLeuIleLeuAsp

190 200 210 220 230 240
ATCACCAAACCTCTTGCTCGCCATACTCGGTCCGCTCATGGTGCTCCAGGCTAGCATAATT
IleThrLysLeuLeuLeuAlaIleLeuGlyProLeuMETValLeuGlnAlaSerIleIle

250 260 270 280 290 300
CGAGTGCCGTACTTCGTACGCGCTCAAGGCCTCATTCGTGCATGCATGTTGGTGCGGAAA
ArgValProTyrPheValArgAlaGlnGlyLeuIleArgAlaCysMETLeuValArgLys

310
GCCGCCGGGGGTCATTAT
AlaAlaGlyGlyHisTyr

Fig. 14

```

      10      20      30      40      50      60
      |      |      |      |      |      |
CTCTTGACCCTGTCACCGCACTATAAAGTGTTTCCTCGCTAGGCTCACGTGGTGGTTACAA
LeuLeuThrLeuSerProHisTyrLysValPheLeuAlaArgLeuThrTrpTrpLeuGln

      70      80      90     100     110     120
      |      |      |      |      |      |
TACTTCCTCACCAGAGCCGAAGCGCACTTGCAAGTGTGGGTCCCCTCTCTCAACGTTCGA
TyrPheLeuThrArgAlaGluAlaHisLeuGlnValTrpValProSerLeuAsnValArg

      130     140     150     160     170     180
      |      |      |      |      |      |
GGAGGCCGCGATGCCATCATCCTCCTCACGTGCGCAGTCTACCCAGAGCTGATCTTTGAC
GlyGlyArgAspAlaIleIleLeuLeuThrCysAlaValTyrProGluLeuIlePheAsp

      190     200     210     220     230     240
      |      |      |      |      |      |
ATCACCAAACCTCTTGCTTGCCACACTCGGCGCCGCTCATGGTGCTCCAGGCTGGCTTAACT
IleThrLysLeuLeuLeuAlaThrLeuGlyProLeuMETValLeuGlnAlaGlyLeuThr

      250     260     270     280     290     300
      |      |      |      |      |      |
AGAGTGCCGTACTTTGTGCGCGCCAGGGGCTCATTCGTGCGTGCATGTTGGTGCGGAAA
ArgValProTyrPheValArgAlaGlnGlyLeuIleArgAlaCysMETLeuValArgLys

      310
      |
GTTGCTGGGGGCCATTAT
ValAlaGlyGlyHisTyr
```

Fig. 1.5

10 20 30 40 50 60
CTCTTGACCTTGTCACCATACTATAAAGTGTTCCCTCGCTAGGCTCATATGGTGGTTGCAA
LeuLeuThrLeuSerProTyrTyrLysValPheLeuAlaArgLeuIleTrpTrpLeuGln

70 80 90 100 110 120
TATTTTATCACCAGAGCCGAAGCGCACTTGCAAGTGTGGGTCCCCCTCTCAACGTTCTGA
TyrPheIleThrArgAlaGluAlaHisLeuGlnValTrpValProProLeuAsnValArg

130 140 150 160 170 180
GGAGGCCGTGATGCTATCATCCTCCTCACGTGCGCAGTCTACCCAGAGCTAATCTTTGAC
GlyGlyArgAspAlaIleIleLeuLeuThrCysAlaValTyrProGluLeuIlePheAsp

190 200 210 220 230 240
ATCACCAAACCTCTTGCTTGCCATACTCGGTCCGCTCATGGTGCTCCAGGCTAGCATAATT
IleThrLysLeuLeuLeuAlaIleLeuGlyProLeuMETValLeuGlnAlaSerIleIle

250 260 270 280 290 300
CGAGTGCCGTACTTCGTACGCGCTCAAGGCCTCATTCGTGCATGCATGTTGGTGCGGAAA
ArgValProTyrPheValArgAlaGlnGlyLeuIleArgAlaCysMETLeuValArgLys

310
GCCGCCGGGGTCAATTAT
AlaAlaGlyValAsnTyr

```

      10      20      30      40      50      60
      |      |      |      |      |      |
CTCTTTACCCCTGTCACCACTGCAAAGTGTTTCCTCGCTAGGCTCATATGGTGGTTACAG
LeuPheThrLeuSerProHisCysLysValPheLeuAlaArgLeuIleTrpTrpLeuGln

      70      80      90      100     110     120
      |      |      |      |      |      |
TATTTTATCACCAGGGCCGAAGCGCACCTGCAAGTGTGGATCCCCCCCCTCAACGTTTCGG
TyrPheIleThrArgAlaGluAlaHisLeuGlnValTrpIleProProLeuAsnValArg

      130     140     150     160     170     180
      |      |      |      |      |      |
GGGGGCCGTGATGCCATCATCCTCCTCGCATGTGCGGTCCACCCAGAGCTGATCTTCGAC
GlyGlyArgAspAlaIleIleLeuLeuAlaCysAlaValHisProGluLeuIlePheAsp

      190     200     210     220     230     240
      |      |      |      |      |      |
ATCACCAAACCTCTTGCTCGCCATACTCGGTCCGCTCATGGTGCTCCAGGCTAGCATAATT
IleThrLysLeuLeuLeuAlaIleLeuGlyProLeuMETValLeuGlnAlaSerIleIle

      250     260     270     280     290     300
      |      |      |      |      |      |
CGAGTGCCGTACTTGTACCGCGCTCAAGGCCTCATTCGTGCATGCATGTTGGTGCGGAAA
ArgValProTyrLeuTyrArgAlaGlnGlyLeuIleArgAlaCysMETLeuValArgLys

      310
      |
GCCGCCGGGGGTCATTAT
AlaAlaGlyGlyHisTyr
```

Fig. 17


```

      10      20      30      40      50      60
      |      |      |      |      |      |
CTCTTTAACCTGTCACCACACTACAAAGTGTTCCCTCGCTAGGCTCATATGGTGGTTACAG
LeuPheAsnLeuSerProHisTyrLysValPheLeuAlaArgLeuIleTrpTrpLeuGln

      70      80      90     100     110     120
      |      |      |      |      |      |
TATTTTATCACCAGGGCCGAAGCGCACCTGCAAGTGTGGATCCCCCCCCTCAACGTTTCAG
TyrPheIleThrArgAlaGluAlaHisLeuGlnValTrpIleProProLeuAsnValGln

     130     140     150     160     170     180
     |      |      |      |      |      |
GGGGGCCGTGATGCCATCATCCTCCTCGCATGTGCGGTCCACCCAGAGCTGATCTTTGAC
GlyGlyArgAspAlaIleIleLeuLeuAlaCysAlaValHisProGluLeuIlePheAsp

     190     200     210     220     230     240
     |      |      |      |      |      |
ATCACCAAACCTCTTGCTCGCCATACTCGGTCCGCTCATGGTGCTCCAGGCTAGCATAATT
IleThrLysLeuLeuLeuAlaIleLeuGlyProLeuMETValLeuGlnAlaSerIleIle

     250     260     270     280     290     300
     |      |      |      |      |      |
CGAGTGCCGTA CTTCGTACGCGCTCAAGGCCTCATTCGTGCATGCATGTTGGTGCGGAAA
ArgValProTyrPheValArgAlaGlnGlyLeuIleArgAlaCysMETLeuValArgLys

     310
     |
GCCGCCGGGGGTCATTAT
AlaAlaGlyGlyHisTyr
```

Fig. 18

```

      10      20      30      40      50      60
      |      |      |      |      |      |
CTCTTGACCTTGTCACCACACTATAAAGTGTTTCCTTGCCAGGTTCGTATGGTGGCTACAA
LeuLeuThrLeuSerProHisTyrLysValPheLeuAlaArgPheValTrpTrpLeuGln

      70      80      90      100     110     120
      |      |      |      |      |      |
TATCTCATCACCAGAACCGAAGCGCATCTGCAAGTGTGGGTCCCCCTCTCAACGTTCCGG
TyrLeuIleThrArgThrGluAlaHisLeuGlnValTrpValProProLeuAsnValArg

      130     140     150     160     170     180
      |      |      |      |      |      |
GGGGGTCGCGATGCCATCACCCCTCCTCACATGCGTGGTCCACCCAGAGCTAATCTTCGAC
GlyGlyArgAspAlaIleThrLeuLeuThrCysValValHisProGluLeuIlePheAsp

      190     200     210     220     230     240
      |      |      |      |      |      |
ATCACAAAATATTTGCTCGCCATATTCGGCCCGCTCATGGTGCTCCAGGCCGGCATAACT
IleThrLysTyrLeuLeuAlaIlePheGlyProLeuMETValLeuGlnAlaGlyIleThr

      250     260     270     280     290     300
      |      |      |      |      |      |
AGAGTGCCGTACTTCGTGCGCGCACAAAGGGCTCATTCGTGCATGCATGTTGGTGCGGAAA
ArgValProTyrPheValArgAlaGlnGlyLeuIleArgAlaCysMETLeuValArgLys

      310
      |
GTTGCTGGGGGCCATTAT
ValAlaGlyGlyHisTyr
```

Fig. 19

```

      10      20      30      40      50      60
      |      |      |      |      |      |
CCGTGTTGAGGAGTCAATTTACCAATGTTGTGACTTGGCCCCCGAAGCCAAACTGGCCAT
ArgValGluGluSerIleTyrGlnCysCysAspLeuAlaProGluAlaLysLeuAlaIle

      70      80      90     100     110     120
      |      |      |      |      |      |
AAAGTCGCCCCACAGAGCGGCTCTATATCGGGGGTCCCCTGACTAATTCAAAAGGGCAGAA
LysSerProThrGluArgLeuTyrIleGlyGlyProLeuThrAsnSerLysGlyGlnAsn

     130     140     150     160     170     180
     |      |      |      |      |      |
CTGCGGTTACTGCCGGTGCCGCGGAGCCTGCTGACGACTAGCTGCGGTAATACCCTCAC
CysGlyTyrCysArgCysArgAlaSerLeuLeuThrThrSerCysGlyAsnThrLeuThr

     190     200     210     220     230     240
     |      |      |      |      |      |
ATGTCACCTGAAAGCCACTGCGGCCTGTGAGCTGCGAAGCTCCAGGACTGCACGATGCT
CysHisLeuLysAlaThrAlaAlaCysArgAlaAlaLysLeuGlnAspCysThrMETLeu

     250     260     270     280     290     300
     |      |      |      |      |      |
CGTGAACGGAGACGACCTTGTCGTTATCTGTGAAAGCGCGGGGACCCAGGAGGACGCGGC
ValAsnGlyAspAspLeuValValIleCysGluSerAlaGlyThrGlnGluAspAlaAla

     310
     |
GAGCCTACGAGTC
SerLeuArgVal
```

Fig. 20

10 20 30 40 50 60
| | | | |
CCGTGTTGAGGAGTCAATTTACCAATGTTGTGACTTGGCCCCCGAAGCCAAACTGGCCAT
ArgValGluGluSerIleTyrGlnCysCysAspLeuAlaProGluAlaLysLeuAlaIle

70 80 90 100 110 120
| | | | |
AAAGTCGCCCACAGAGCGGCTCTATATCGGGGGTCCCCTGACTAATTCAAAGGGCAGAA
LysSerProThrGluArgLeuTyrIleGlyGlyProLeuThrAsnSerLysGlyGlnAsn

130 140 150 160 170 180
| | | | |
CTGCGGTTACTGCCGGTGCCGCGGAGCCTGCTGACGACTAGCTGCGGTAATACCCTCAC
CysGlyTyrCysArgCysArgAlaSerLeuLeuThrThrSerCysGlyAsnThrLeuThr

190 200 210 220 230 240
| | | | |
ATGTCACCTGAAAGCCACTGCGGCCTGTCGAGCTGCGAAGCTCCAGGACTGCACGATGCT
CysHisLeuLysAlaThrAlaAlaCysArgAlaAlaLysLeuGlnAspCysThrMETLeu

250 260 270 280 290 300
| | | | |
CGTGAACGGAGACGACCTTGTCGTTATCTGTGAAAGCGCGGGGACCCAGGAGGACGCGGC
ValAsnGlyAspAspLeuValValIleCysGluSerAlaGlyThrGlnGluAspAlaAla

310
|
GAGCCTACGAGTC
SerLeuArgVal

Fig. 21

| | | | | | |
|---|-----|-----|-----|-----|-----|
| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |
| | | | | | |
| CCGTGTTGAGGAGTCAATTTACCAATGTTGTGACTTGGCCCCCGAAGCCAAACTGGCCAT | | | | | |
| ArgValGluGluSerIleTyrGlnCysCysAspLeuAlaProGluAlaLysLeuAlaIle | | | | | |
| | | | | | |
| 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 |
| | | | | | |
| AAAGTCGCTCACAGAGCGGCTCTATATCGGGGGTCCCCTGACTAATTCAAAAGGGCAGAA | | | | | |
| LysSerLeuThrGluArgLeuTyrIleGlyGlyProLeuThrAsnSerLysGlyGlnAsn | | | | | |
| | | | | | |
| 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 |
| | | | | | |
| CTGCGGTTACCGCCGGTGCCACGCGAGCGGCGTGCTGACGACTAGCTGCGGTAATACCCT | | | | | |
| CysGlyTyrArgArgCysHisAlaSerGlyValLeuThrThrSerCysGlyAsnThrLeu | | | | | |
| | | | | | |
| 190 | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 |
| | | | | | |
| CACATGTCACCTGAAAGCCACTGCGGCCTGTGCGAGCTGCGAAGCTCCGGGACTGCACGAT | | | | | |
| ThrCysHisLeuLysAlaThrAlaAlaCysArgAlaAlaLysLeuArgAspCysThrMET | | | | | |
| | | | | | |
| 250 | 260 | 270 | 280 | | |
| | | | | | |
| GCTCGTGAACGGAGATGACCTTGTCGTTATCTGTGAAAGCGCGGG | | | | | |
| LeuValAsnGlyAspAspLeuValValIleCysGluSerAla | | | | | |

Fig. 22

```

      10      20      30      40      50      60
      |      |      |      |      |      |
CCGTGTTGAGGAGTCAATTTACCAATGTTGTGACTTGGCCCCCGAAGCCAAACTGGCCAT
ArgValGluGluSerIleTyrGlnCysCysAspLeuAlaProGluAlaLysLeuAlaIle

      70      80      90      100     110     120
      |      |      |      |      |      |
AAAGTCGCTCACAGAGCGGCTCTATATCGGGGGTCCCCTGACTAATTCAAAGGGCAGAA
LysSerLeuThrGluArgLeuTyrIleGlyGlyProLeuThrAsnSerLysGlyGlnAsn

      130     140     150     160     170     180
      |      |      |      |      |      |
CTGCGGTTACCGCCGGTGCCGCGCGAGCCTGCTGACGACTAGCTGCGGTAATACCCTCAC
CysGlyTyrArgArgCysArgAlaSerLeuLeuThrThrSerCysGlyAsnThrLeuThr

      190     200     210     220     230     240
      |      |      |      |      |      |
ATGTCACCTGAAAGCCACTGCGGCCTGTGCGAGCTGCGAAGCTCCGGGACTGCACGATGCT
CysHisLeuLysAlaThrAlaAlaCysArgAlaAlaLysLeuArgAspCysThrMETLeu

      250     260     270     280
      |      |      |      |
CGTGAACGGAGACGACCTTGTCGTTATCTGTGAAAGCGCGGG
ValAsnGlyAspAspLeuValValIleCysGluSerAla
```

```

      10      20      30      40      50      60
      |      |      |      |      |      |
CCGTGTTGAGGAGTCAATTTACCAATGTTGTGACTTGGCCCCGAAGCCAAACTGGCCAT
ArgValGluGluSerIleTyrGlnCysCysAspLeuAlaProGluAlaLysLeuAlaIle

      70      80      90      100     110     120
      |      |      |      |      |      |
AAAGTCGCTCACAGAGCGGCTCTATATCGGGGGTCCCCTGACTAATTCAAAGGGCAGAA
LysSerLeuThrGluArgLeuTyrIleGlyGlyProLeuThrAsnSerLysGlyGlnAsn

      130     140     150     160     170     180
      |      |      |      |      |      |
CTGCGGTTACCGCCGGTGCCACGCGAGCGGCGTGCTGACGACTAGCTGCGGTAATACCCT
CysGlyTyrArgArgCysHisAlaSerGlyValLeuThrThrSerCysGlyAsnThrLeu

      190     200
      |      |
CACATGTCACCTGAAAGCCACTGCGGCC
ThrCysHisLeuLysAlaThrAlaAla
```

Fig. 24

```

      10      20      30      40      50      60
      |      |      |      |      |      |
CCGTGTTGAGGAGTCAATTTACCAATGTTGTGACTTGGCCCCGAAGCCAAACTGGCCAT
ArgValGluGluSerIleTyrGlnCysCysAspLeuAlaProGluAlaLysLeuAlaIle

      70      80      90     100     110     120
      |      |      |      |      |      |
AAAGTCGCTCACAGAGCGGCTCTATATCGGGGGTCCCCTGACTAATTCAAAGGGCAGAA
LysSerLeuThrGluArgLeuTyrIleGlyGlyProLeuThrAsnSerLysGlyGlnAsn

     130     140     150     160     170     180
     |      |      |      |      |      |
CTGCGGTTACCGCCGGTGCCACGCGAGCGGCGTGCTGACGACTAGCTGCGGTAATACCCT
CysGlyTyrArgArgCysHisAlaSerGlyValLeuThrThrSerCysGlyAsnThrLeu

     190     200     210     220     230     240
     |      |      |      |      |      |
CACATGTCGCCTGAAAGCCACTGCGGCCTGTCTGAGCTGCGAAGCTCCGGGACTGCACGAT
ThrCysArgLeuLysAlaThrAlaAlaCysArgAlaAlaLysLeuArgAspCysThrMET

     250     260     270     280     290     300
     |      |      |      |      |      |
GCTCGTGAACGGAGATGACCTTGTCGTTATCTGTGAAAGCGCGGGGACCCAGGAGGACGC
LeuValAsnGlyAspAspLeuValValIleCysGluSerAlaGlyThrGlnGluAspAla

     310
     |
GGCGAGCCTACGAGTC
AlaSerLeuArgVal
```

Fig. 25

| | 828 | 842 | 849 | 853 | 880 |
|-------------|---|-----|-----|-----|------------------|
| KHCV-LBC1 | LLTLSPHYKVFLARFIWWLQYLITRTEAHLQVWVPPLNVRGGRDAIILLTCVV | | | | |
| 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---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-----FT-A--D-E-I----- | | | | M-A- |
| HCPT-CHIRON | A-----RYISWCL-----L--V--Q-H--I----- | | | | V--M-A- |
| | | | | | 933 |
| KHCV-LBC1 | HPELIFDITKYLLAIFGPLMVLOAGITRVPFVRAQGLIRACMLARKVVGHHY | | | | |
| 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-----L-----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--- |

Fig. 26

| | | |
|-----------|--|--------------------|
| HCV-LBC1 | CTCTTGACCTTGTCCACCACACTATAAGTGTTCCTTGCCAGGTTTCATATGGTGGCTACATATCTCATCACCAGAACCGA | 2904 |
| HCV-LBC23 | ----- | ----- |
| HCV-LBC26 | ----- | ----- |
| HCV-LBC20 | ----- | ----- |
| HCV-LBC32 | -----G----- | ----- |
| HCV-LBC1 | AGGCGATCTGCAAGTGTGGGTCCCCCTCTCAACGTTCCGGGGGGTCCGATGCCATCATCTCCTCACATGCGTGGTCCA | 2984 |
| HCV-LBC23 | ----- | -----G-G--T-C----- |
| HCV-LBC26 | ----- | ----- |
| HCV-LBC20 | -----A--A--C--T-----G-----G-----CA--T----- | ----- |
| HCV-LBC32 | -----C----- | ----- |
| HCV-LBC1 | CCCAGAGCTATCTTTGACATCACAAATATTTTCTCGCCATATTCGGCCGGCTCATGTGCTCCNGCCGGCATAACTAG | 3065 |
| HCV-LBC23 | -----G-----C--CTC-----C--T-----TA-----T-C----- | ----- |
| HCV-LBC26 | -----C--CTC-----C--T-----CT-----TA-----T-C----- | ----- |
| HCV-LBC20 | -----C--CTCC--T--C-C--T-----T-----T-----T-----C----- | ----- |
| HCV-LBC32 | -----C----- | ----- |
| HCV-LBC1 | AGTCCCGTACTTCTGTGGCGGCACANGGGCTCATTCGTGCATGCATGTTGGCGCGGAAAGTCGTGGGGGTCATTAC | 3141 |
| HCV-LBC23 | -----C-----T-----C-----T-----C--CC-----T----- | ----- |
| HCV-LBC26 | -----T-----T-----C-----T-----T-----TT-CT-----T----- | ----- |
| HCV-LBC20 | -----A--T-----T-----T-----T-----T-CT-----T----- | ----- |
| HCV-LBC32 | -----T-----T-----T-----T-----T-CT-----C-----T----- | ----- |

| | | |
|-----------|---|------|
| HCV-LBC1 | CTCTTGACCTTGTACACACACTATATTAAGTGGTCCAGGGTTCNTATNGGTGGCTACATATATCTCATCACCAGAACCGA | 2904 |
| HCV-LBC2 | -----T-----C-----C-----T-----C-----T-----G-----T-----G-----T-----G-----G----- | |
| HCV-LBC3 | -----T-----T-----C-----T-----C-----G-----T-----T-----G-----T-----G-----T-----G----- | |
| HCV-LBC25 | -----C-----G-----C-----T-----C-----T-----C-----G-----T-----T-----G-----T-----G----- | |
| HCV-LBC21 | -----TC-----G-----C-----T-----C-----G-----T-----T-----G-----T-----G-----T-----G----- | |
| HCV-LBC27 | -----C-----G-----C-----T-----CC-----G-----T-----T-----G-----T-----G-----T-----G----- | |
| HCV-LBC28 | -----C-----G-----C-----T-----C-----CG-----T-----T-----G-----T-----G-----T-----G----- | |
| HCV-LBC29 | -----T-----T-----GC-----C-----T-----C-----T-----G-----T-----G-----T-----G----- | |
| HCV-LBC30 | -----T-----A-----C-----C-----T-----C-----T-----G-----T-----G-----T-----G----- | |
| HCV-LBC31 | -----C-----C-----C-----T-----C-----T-----G-----T-----G-----T-----G----- | |
| HCV-LBC1 | AGCGGTCGTGCAGGTGGGTCCCTCTCAACGTTGCGGGGGTCCGGGATGCCATCTCTCTCTCATCTGCGTGGTCCA | 2984 |
| HCV-LBC2 | -----C-----A-----C-----C-----A-----A-----C-----T-----A-----A-----G-----G-----T-----C----- | |
| HCV-LBC3 | -----CT-----A-----CT-----C-----T-----C-----A-----A-----C-----T-----A-----A-----G-----G----- | |
| HCV-LBC25 | -----CT-----CT-----A-----A-----A-----C-----C-----T-----A-----A-----G-----G-----T-----C----- | |
| HCV-LBC21 | -----CT-----CT-----T-----T-----A-----A-----A-----C-----C-----T-----A-----A-----G-----G----- | |
| HCV-LBC27 | -----CT-----CT-----T-----T-----A-----A-----A-----C-----C-----T-----A-----A-----G-----G----- | |
| HCV-LBC28 | -----CT-----CT-----T-----T-----A-----A-----A-----C-----C-----T-----A-----A-----G-----G----- | |
| HCV-LBC29 | -----CT-----CT-----T-----T-----A-----A-----A-----C-----C-----T-----A-----A-----G-----G----- | |
| HCV-LBC30 | -----C-----C-----A-----A-----C-----C-----T-----T-----T-----G-----T-----G-----T-----G----- | |
| HCV-LBC31 | -----C-----C-----A-----A-----C-----C-----T-----T-----T-----G-----T-----G-----T-----G----- | |
| HCV-LBC1 | CCCAGAGCTAATCTTTGACATCAGCAAAATATTTGCTCGCCNTATTCGGGCCCGCTCCTGTCGTCAGGCGGCGCATTAAG | 3065 |
| HCV-LBC2 | -----T-----G-----T-----C-----G-----ATC-----C-----T-----T-----C-----T-----T-----A-----T-----C----- | |
| HCV-LBC3 | -----CG-----G-----ATCC-----G-----C-----C-----T-----C-----T-----T-----C-----T-----C----- | |
| HCV-LBC25 | -----G-----C-----CTC-----T-----C-----C-----T-----C-----T-----T-----T-----T-----C----- | |
| HCV-LBC21 | -----A-----C-----CTC-----T-----C-----C-----T-----C-----T-----T-----T-----T-----C----- | |
| HCV-LBC27 | -----G-----C-----CTC-----T-----C-----C-----T-----C-----T-----T-----T-----T-----C----- | |
| HCV-LBC28 | -----G-----C-----CTC-----T-----C-----C-----T-----C-----T-----T-----T-----T-----C----- | |
| HCV-LBC29 | -----G-----C-----CTC-----T-----C-----C-----T-----C-----T-----T-----T-----T-----C----- | |
| HCV-LBC30 | -----G-----C-----CTC-----T-----C-----C-----T-----C-----T-----T-----T-----T-----C----- | |
| HCV-LBC31 | -----G-----C-----CTC-----T-----C-----C-----T-----C-----T-----T-----T-----T-----C----- | |
| HCV-LBC1 | AGTGGCGTACTTCGTGCGGCAAGGCGCTCATTGCTGTCATGTGTGGCGCGGAAAGTCGTGGGGGTCNTTAC | 3141 |
| HCV-LBC2 | -----T-----CA-----T-----TG-----T-----T-----G-----T-----T-----CA-----CT-----T----- | |
| HCV-LBC3 | -----TG-----T-----T-----T-----G-----T-----T-----G-----T-----T-----CA-----CT-----T----- | |
| HCV-LBC25 | -----T-----T-----C-----G-----T-----G-----T-----T-----G-----T-----T-----CA-----CT-----T----- | |
| HCV-LBC21 | -----A-----A-----T-----T-----G-----T-----T-----G-----T-----T-----CA-----CT-----T----- | |
| HCV-LBC27 | -----T-----T-----C-----G-----T-----G-----T-----T-----G-----T-----T-----CA-----CT-----T----- | |
| HCV-LBC28 | -----A-----A-----T-----T-----G-----T-----T-----G-----T-----T-----CA-----CT-----T----- | |
| HCV-LBC29 | -----GTAC-----T-----T-----G-----T-----T-----G-----T-----T-----CA-----CT-----T----- | |
| HCV-LBC30 | -----A-----A-----T-----T-----G-----T-----T-----G-----T-----T-----CA-----CT-----T----- | |
| HCV-LBC31 | -----A-----A-----T-----T-----G-----T-----T-----G-----T-----T-----CA-----CT-----T----- | |

NS5B-LBC1 CCGTGTGAGGAGTCATTTACCAATGTTGTGACTTGGCCCCCGNAGCCMACTGGCCATTAAGTCGCTCACAGACGGCC
NS5B-20 -----C-----
NS5B-23 -----
NS5B-24 -----C-----
NS5B-25 -----
NS5B-27 -----C-----
NS5B-28 -----

NS5B-LBC1 TCTATATCGGGGTCCCTGACTAATTCMAAAGGGCAGMACTGCGGTACCGCCGGTGCGGCGGAGCGCGGTGCTGACGA
NS5B-LBC20 -----T-----C-----
NS5B-LBC23 -----A-----
NS5B-LBC24 -----C-----
NS5B-LBC25 -----C-----
NS5B-LBC27 -----A-----
NS5B-LBC28 -----A-----

NS5B-LBC1 CTAGCTGCGGTAAATACCTCACATGTGTACCTGAAAGCCACTGCGGCCCTGTGAGCTGCGMAAGCTCCGGGACTGCACGNTGC
NS5B-LBC20 -----C-----A-----
NS5B-LBC23 -----C-----
NS5B-LBC24 -----C-----A-----
NS5B-LBC25 -----C-----
NS5B-LBC27 -----C-----
NS5B-LBC28 -----CG-----

NS5B-LBC1 TCGTGAAACGGAGACGACCTTGTGCTTATCTGTGAAAGCGGGGNAACCCAGAGGNTGCGGGAGCCTACGAGTC
NS5B-LBC20 -----G-----C-----
NS5B-LBC23 -----T-----
NS5B-LBC24 -----
NS5B-LBC25 -----
NS5B-LBC27 -----G-----C-----
NS5B-LBC28 -----T-----G-----

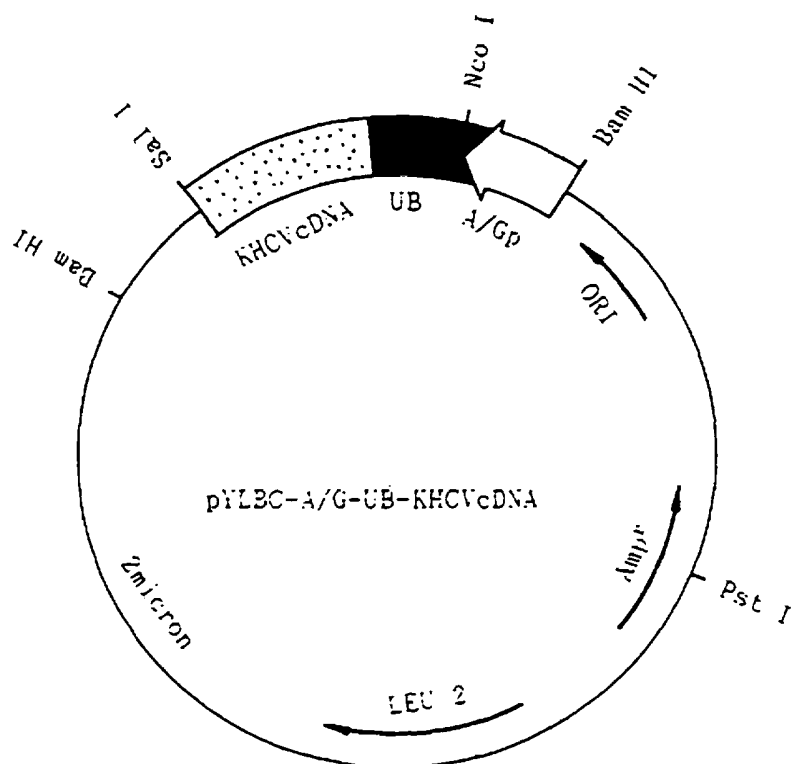
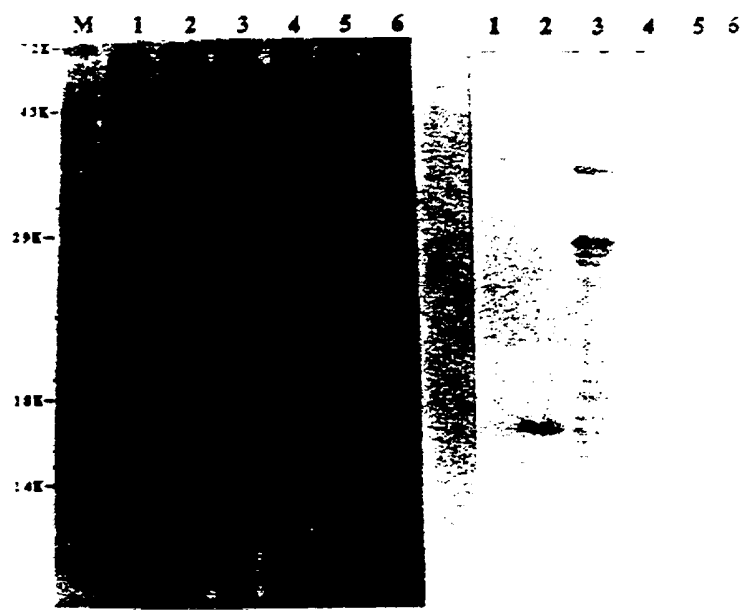


Fig. 30

Fig 31



ÖSTERREICHISCHES PATENTAMT
Ausgegeben 25. 5. 1999

Patentschrift Nr. AT 405 053 B

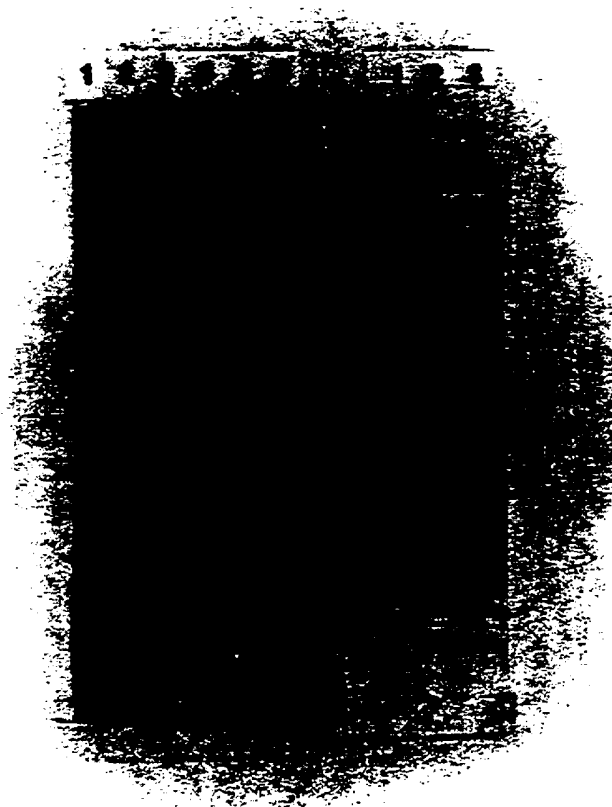
Int. Cl.⁶ : C12N 15/51

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

G01N 33/577, A61K 39/29

Blatt 47

Fig 32



| | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |
| ATGCAAATTT | TCGTCAAAC | TCTAACAGGG | AAGACTATAA | CCCTAGAGGT | TGAATCTTCC |
| TACGTTTAAA | AGCAGTTTGG | AGATTGTCCC | TTCTGATATT | GGGATCTCCA | ACTTAGAAGG |
| 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 |
| GACACTATTG | ACAACGTCAA | AAGTAAAATT | CAAGATAAAG | AAGGTATCCC | TCCGGATCAG |
| CTGTGATAAC | TGTTGCAGTT | TTCATTTTAA | GTTCTATTTC | TTCCATAGGG | AGGCCTAGTC |
| 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 |
| CAGAGATTGA | TTTTTGCTGG | TAAGCAACTA | GAAGATGGTA | GAACCTTGTC | TGACTACAAC |
| GTCTCTAACT | AAAAACGACC | ATTCGTTGAT | CTTCTACCAT | CTTGGAACAG | ACTGATGTTG |
| 190 | 200 | 210 | 220 | | |
| ATCCAAAAGG | AATCTACTCT | TCACTTGGTG | TTGAGACTCC | GCGGTGGT | |
| TAGGTTTTCC | TTAGATGAGA | AGTGAACCAC | AATCTGAGG | CGCCACCA | |

Fig. 33

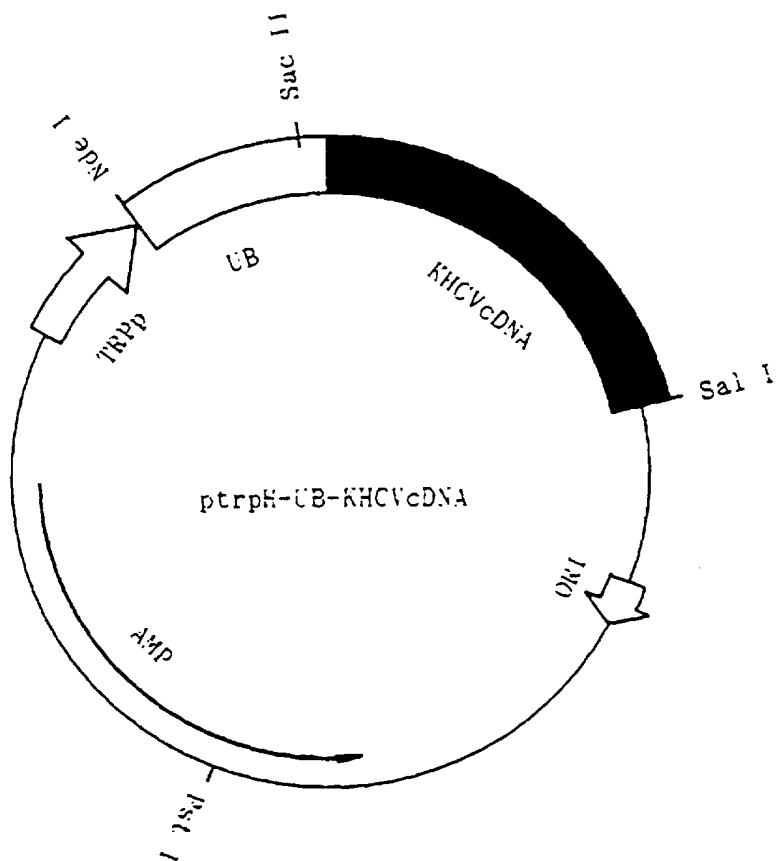


Fig. 34

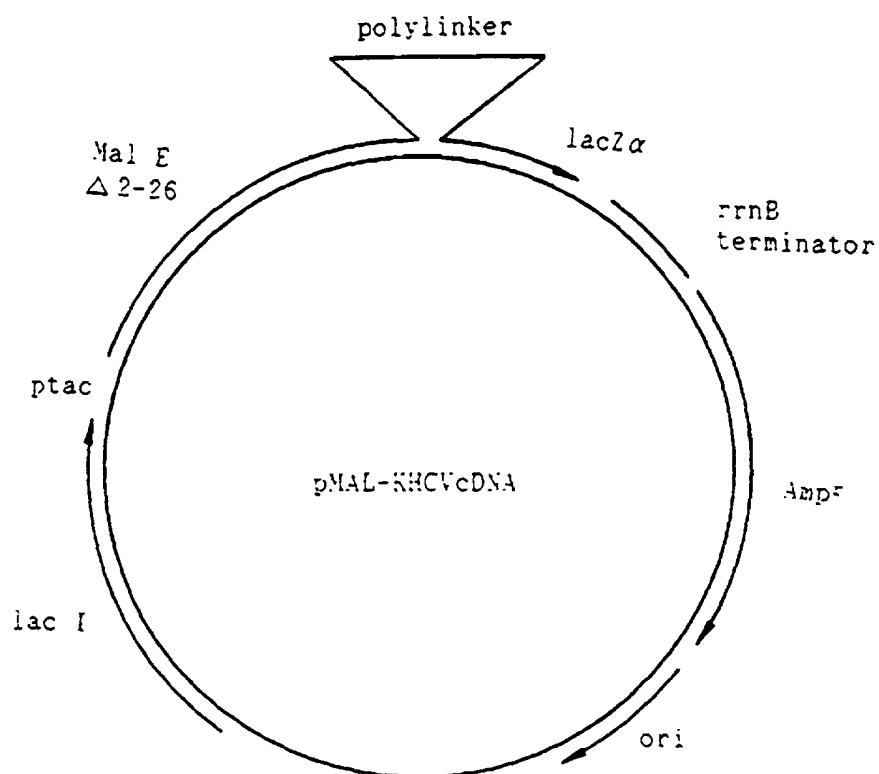


Fig. 35

Fig. 36



Fig. 37

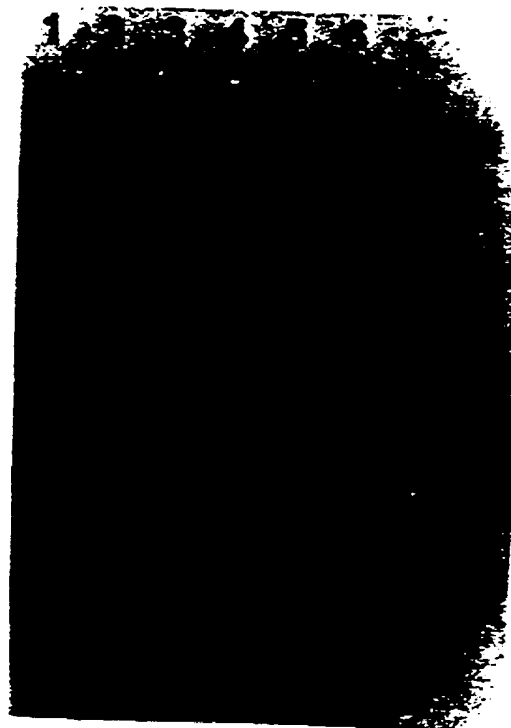
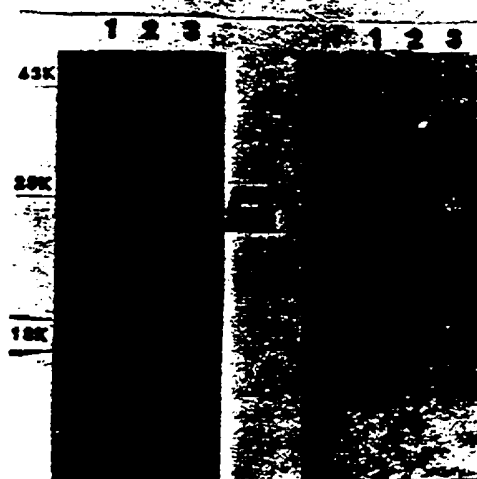


Fig 38 und 41



ÖSTERREICHISCHES PATENTAMT

Ausgegeben 25. 5. 1999

Blatt 54

Patentschrift Nr. AT 405 053 B

Int. Cl.⁶ : 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

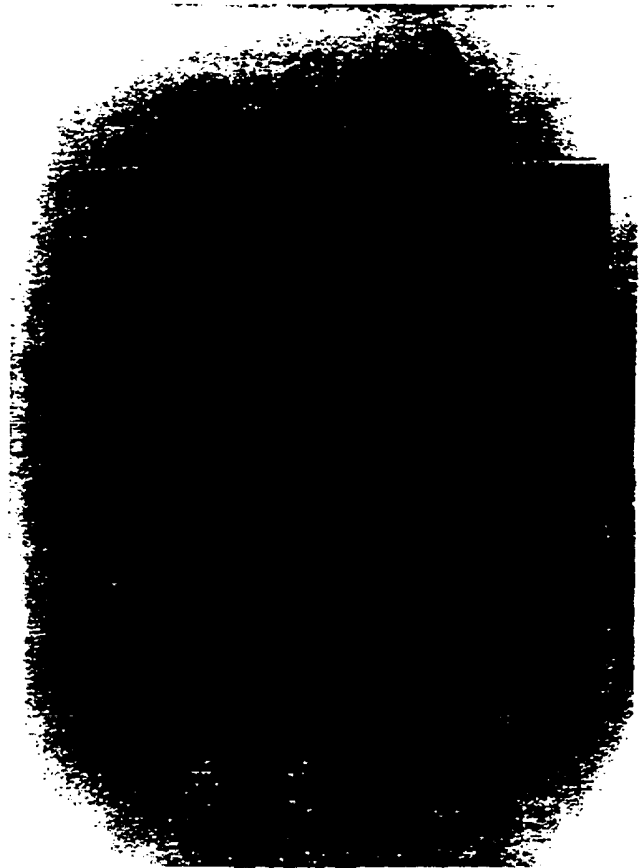
Blatt 56

Patentschrift Nr. AT 405 053 B

Int. Cl.⁶ : 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.⁶ : C12N 15/51

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

G01N 33/577, A61K 39/29

Fig. 43



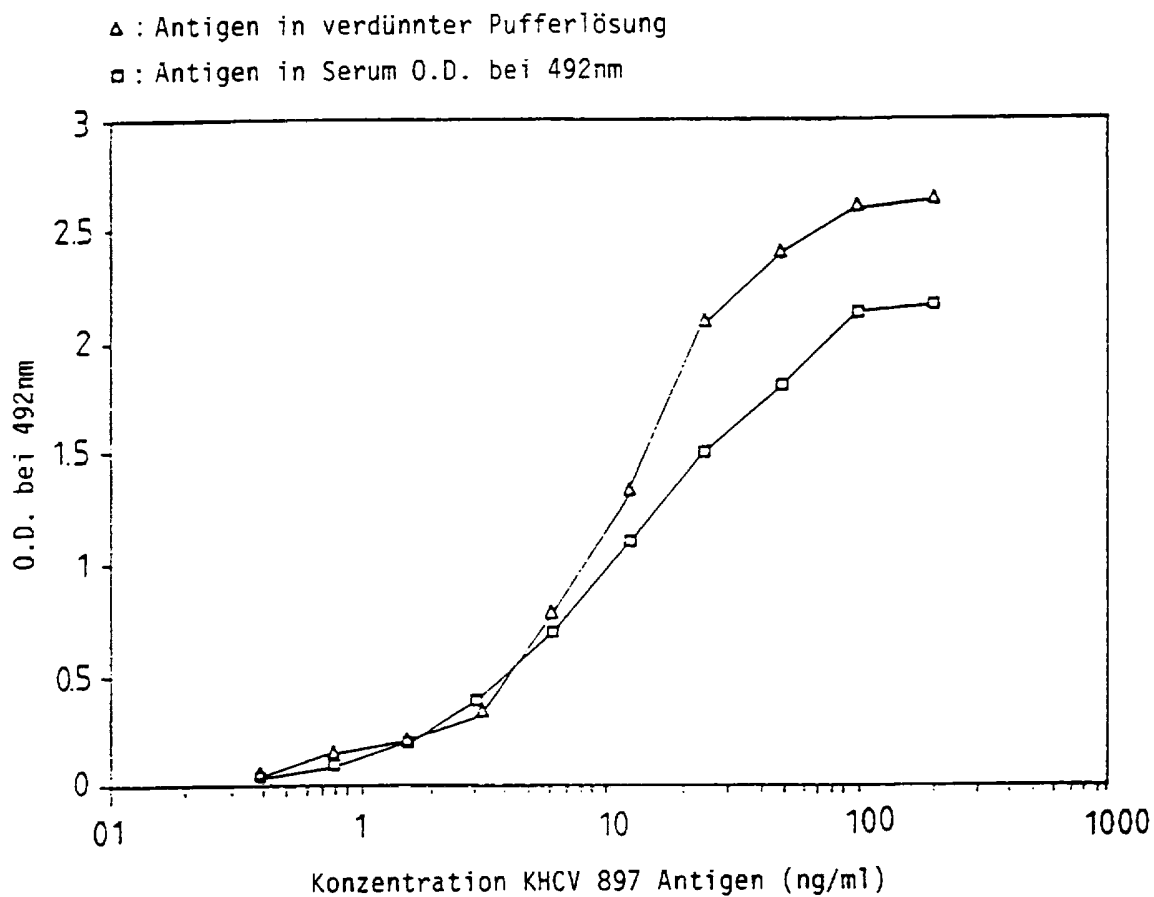


Fig. 44

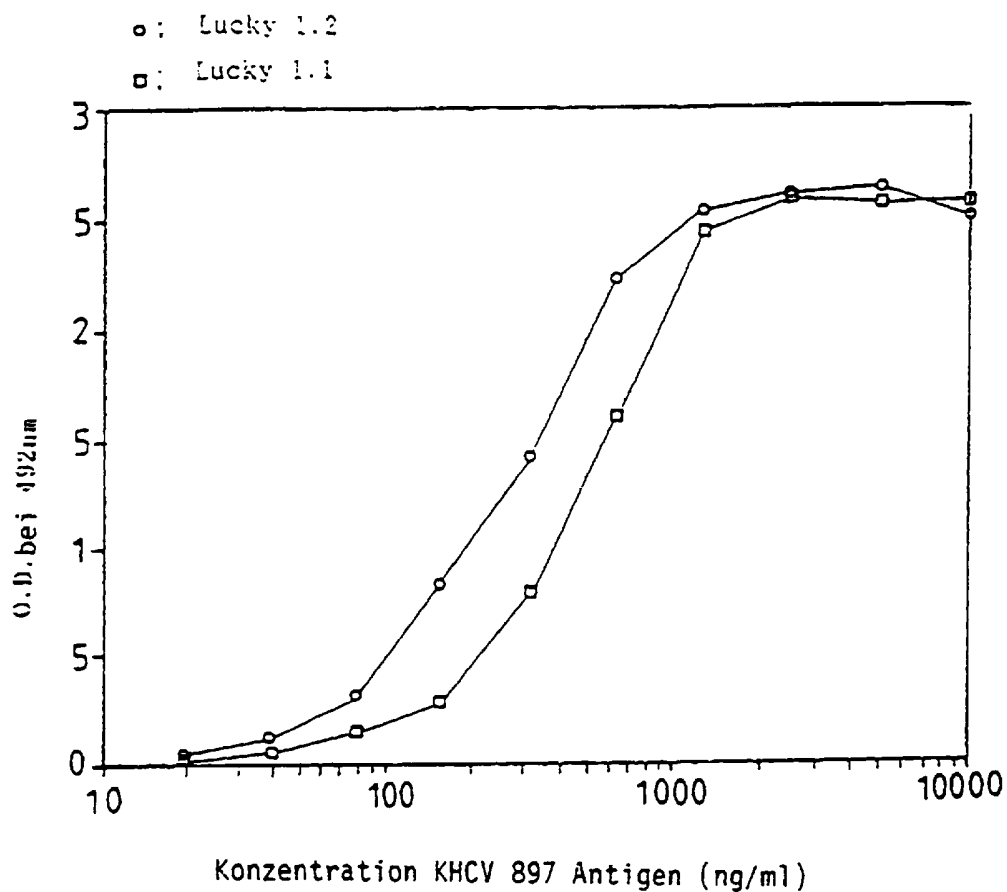


Fig. 45