



(19) Republik
Österreich
Patentamt

(11) Nummer: AT 400 724 B

(12)

PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 2571/90

(51) Int.Cl.⁶ : C12N 15/51

(22) Anmelddatum: 17.12.1990

A61K 39/29, C07K 14/02, C12Q 1/68,
G01N 33/53

(42) Beginn der Patentdauer: 15. 7.1995

(45) Ausgabedatum: 25. 3.1996

(30) Priorität:

18.12.1989 GB 8928562 beansprucht.
27. 2.1990 GB 9004414 beansprucht.
3. 3.1990 GB 9004814 beansprucht.

(73) Patentinhaber:

THE WELLCOME FOUNDATION LIMITED
NW1 2BP LONDON (GB).

(56) Entgegenhaltungen:

EP 0293274A1 EP 0318216A1 WO 90/00597A1

(54) VIRALES POLYPEPTID

(57) Die Erfindung betrifft posttransfusionale non-A non-B Hepatitis virale Polypeptide, solche viralen Polypeptide kodierende DNA-Sequenzen, diese DNA-Sequenzen enthaltende Expressionsvektoren und durch diese Expressionsvektoren transformierte Wirtszellen. Die Erfindung betrifft auch die Verwendung dieser Polypeptide in Diagnosetests und Impfstoffformulierungen.

B

400 724

AT

AT 400 724 B

Die Erfindung betrifft die Isolierung und Charakterisierung des viralen Agens, welches die nach Transfusionen auftretende non-A-non-B-Hepatitis (PT-NANBH) verursacht, und insbesondere PT-NANBH virale Polypeptide, diese viralen Polypeptide kodierenden DNA-Sequenzen und durch solche Expressionsvektoren transformierte Wirtszellen. Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung PT-NANBH viraler Polypeptide oder polyklonaler oder monoklonaler Antikörper gegen solche Polypeptide in einem Immunotest zur Diagnose von PT-NANBH, oder die Verwendung in einem Präventivimpfstoff.

Non-A-non-B-Hepatitis (NANBH) ist per Definition eine durch Ausschluß gestellte Diagnose und dient im allgemeinen zur Beschreibung von Fällen viraler Hepatitisinfektionen beim Menschen, die nicht auf Hepatitis A oder B Viren zurückzuführen sind. In der Mehrzahl dieser Fälle ist die Ursache der Infektion nicht festgestellt worden, obwohl man aus klinischen und epidemiologischen Gründen eine Anzahl dafür verantwortlicher Agenzen vermutet, siehe Übersicht in Shih et al (Prog. Liver Dis., 1986, 8, 433-452). Allein in den USA können bis zu 10 % der Bluttransfusionen eine NANBH zur Folge haben, was sie zu einem schwierigen Problem macht. Es können mindestens mehrere virale Agenzen eine PT-NANBH Infektion verursachen und in den letzten Jahren wurde vielfach die Identifizierung der Agenzen beansprucht, von denen jedoch keines substantiiert wurde.

Die EP 318 216 A1 gibt eine Beschreibung der Isolierung und Charakterisierung des verursachenden Agens, welches PT-NANBH auslöst, das in der Anmeldung auch als Hepatitis C Virus (HCV) bezeichnet wird. Eine cDNA-Bank, hergestellt aus viraler Nukleinsäure, die von einem mit PT-NANBH infizierten Schimpansen gewonnen wurde, wurde unter Verwendung humaner Antiseren gescreent. Es wurde eine Anzahl positiver Klone isoliert und sequenziert. Die erhaltenen Nukleinsäure- und Aminosäure-Sequenzdaten, die in der Anmeldung aufgeführt sind, repräsentieren ca. 70 % des 10kb viralen Genoms und sind vollständig von seinem 3'-Ende, was der nicht-strukturkodierenden Region entspricht, abgeleitet.

Die Erfinder haben jetzt PT-NANBH virale Polypeptide durch Klonierung und Expression der diese viralen Polypeptide kodierenden DNA-Sequenzen isoliert und charakterisiert. Überraschenderweise zeigen sowohl die Nukleinsäure- als auch die Aminosäure-Sequenzdaten bemerkenswerte Abweichungen zu den entsprechenden Daten aus der EP 318 216 A1. Insgesamt summieren sich diese Abweichungen auf ca. 20 % auf der Stufe der Nukleinsäuren und ca. 15 % auf der Stufe der Aminosäuren, manche Regionen in den Sequenzen zeigen sogar größere Unterschiede. Die Gesamtabweichung ist viel größer als man für zwei Isolierungen desselben Virus erwarten könnte, auch unter Berücksichtigung geographischer Faktoren. Dies ist wahrscheinlich auf einen der beiden folgenden möglichen Gründe zurückzuführen.

Erstens benutzten die vorliegenden Erfinder und jene der zuvor erwähnten europäischen Veröffentlichung verschiedene Quellen für die zur cDNA-Klonierung verwendeten Nukleinsäuren. Insbesondere beschreibt die europäische Veröffentlichung die Verwendung Schimpansenplasmas als Quelle des viralen Nukleinsäure-Ausgangsmaterials, wobei das Virus zweimal durch den Schimpansen gelangte. Natürlich ist PT-NANBH eine Krankheit des Menschen, und die Passage des Virus durch einen fremden Wirt, auch wenn dieser relativ nahe dem Menschen verwandt ist, verursacht wahrscheinlich eine extensive Mutation der viralen Nukleinsäure. Demzufolge können die Sequenzdaten aus der EP 318 216 A1 nicht tatsächlich repräsentativ für das tatsächliche, PT-NANBH im Menschen verursachende virale Agens sein. Im Gegensatz hierzu haben die jetzigen Erfinder virale Nukleinsäuren, die aus menschlichem Plasma stammten, als Ausgangsmaterial für die cDNA-Klonierung verwendet. Die auf diese Weise erhaltenen Sequenzdaten entsprechen viel wahrscheinlicher den ursprünglichen Nukleinsäure- und Aminosäure-Sequenzen der PT-NANBH.

Zweitens kann es sein, daß das virale Agens in mehr als einem Subtyp existiert und die in der EP 318 216 A1 offenbarten Sequenzdaten und diejenigen, die von den jetzigen Erfindern ermittelt wurden, getrennten und unterschiedlichen Subtypen desselben viralen Agens entsprechen. Eine weitere Möglichkeit kann sein, daß der Grad der Abweichung zwischen den beiden Sätzen der Sequenzdaten auf eine Verbindung dieser zwei Faktoren zurückzuführen ist.

Die vorliegende Erfindung stellt ein PT-NANBH virales Polypeptid zur Verfügung, das ein Antigen mit einer Aminosäure-Sequenz enthält, die mindestens zu 90 % homolog mit der Aminosäure-Sequenz, wie dargestellt in SEQ ID Nr. 3, 4, 19, 20, 21 oder 22, oder als ein Antigen wirkendes Fragment davon ist.

SEQ ID Nr. 3, 4, 5, 18, 19, 20, 21 oder 22 stellen die Aminosäure-Sequenz dar, wie sie aus der Nukleinsäure-Sequenz abgeleitet wurde. Die Aminosäure-Sequenz ist vorzugsweise wenigstens zu 95 oder sogar 98 % homolog mit der Aminosäure-Sequenz dargestellt in SEQ ID Nr. 3, 4, 19, 20, 21 oder 22. Die Antigene können wahlweise mit einem heterologen Polypeptid fusioniert werden.

Es können wahlweise zwei oder mehr Antigene zusammen entweder in Kombination oder zu einem einzelnen Polypeptid fusioniert verwendet werden. Die Verwendung eines oder mehrerer Antigene in einem Diagnosetest bietet auf diese Weise verlässliche Ergebnisse bei Verwendung des Tests zur Untersuchung von Blut auf PT-NANBH Viren. Vorzugsweise wird ein Antigen aus der strukturkodierenden Region (5'-Ende)

und ein anderes Antigen aus der nicht-strukturell kodierenden Region (3'-Ende) erhalten. Besonders bevorzugt werden die Antigene miteinander zu einem rekombinanen Polypeptid fusioniert. Die letztere Lösung bietet eine Reihe von Vorteilen dahingehend, daß individuelle Antigene in einem festen, vorbestimmten Verhältnis (im allgemeinen äquimolar) kombiniert werden und nur ein einziges Polypeptid hergestellt, gereinigt und charakterisiert werden muß.

- 5 Ein als Antigen wirkendes Fragment eines Antigens mit einer Aminosäure-Sequenz, die mindestens zu 90 % homolog mit der wie in SEQ ID Nr. 3, 4, 19, 20, 21 oder 22 dargestellt ist, umfaßt vorzugsweise mindestens fünf, sechs, sieben, acht, neun oder zehn, fünfzehn, zwanzig, dreißig, vierzig oder fünfzig Aminosäuren. Die antigenischen Bindungsstellen eines solchen Antigens können unter Verwendung von 10 Standardverfahren identifiziert werden. Diese Verfahren umfassen Fragmentierung des Polypeptids mittels proteolytischer Enzyme oder chemischer Mittel und anschließende Untersuchung auf die Fähigkeit eines jeden Fragments, Antikörper zu binden, oder eine Immunantwort nach Impfung an einem Tier oder einem geeigneten in vitro Modellsystem (Strohmaier et al., J. Gen. Virol., 1982, 59, 205-306) hervorzurufen. Alternativ kann die das Polypeptid kodierende DNA durch Restriktionsenzymverdauung oder andere 15 bekannte Verfahren fragmentiert werden und dann in ein Expressionssystem zur Herstellung von Fragmenten eingeschleust werden (die wahlweise an ein Polypeptid im allgemeinen bakteriellen Ursprungs fusioniert werden). Die entstehenden Fragmente können wie bereits beschrieben beurteilt werden (Spence et al., J. Gen. Virol., 1989, 70, 2843-51; Smith et al., Gene, 1984, 29, 263-269). Eine weitere Möglichkeit ist die chemische Synthese kurzer Peptidfragmente (3-20 Aminosäuren lang; im allgemeinen 6 Aminosäuren lang), 20 welche die gesamte Sequenz des Polypeptids voller Länge umfassen, wobei jedes Peptid mit dem angrenzenden Peptid überlappt. (Dieser überlappende Bereich kann 1-10 Aminosäuren umfassen aber beträgt idealerweise n-1 Aminosäuren, wobei n die Länge des Peptids ist; Geysen et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 1984, 81, 3998-4002). Jedes Peptid wird dann wie zuvor beschrieben beurteilt, mit der Ausnahme, daß 25 das Peptid gewöhnlich zuerst an ein Trägermolekül gekoppelt wird, wodurch die Induktion einer Immunantwort bewirkt wird. Schließlich gibt es eine Reihe zur Vorhersage geeigneter Methoden, die die Sequenzanalyse für bestimmte Merkmale, z.B. der Hydrophilität, wobei man annimmt, daß diese mit immunologisch wichtigen Stellen verknüpft ist, umfassen (Hopp und Woods, Proc. Natl. Acad. Sci., 1981, 78, 3824-3428; Berzofsky, Science, 1985, 229, 932-940). Diese Voraussagen können anschließend unter Einsatz rekombinanter Polypeptid- oder Peptidverfahren wie oben beschrieben überprüfen werden.

30 Das virale Polypeptid wird vorzugsweise in reiner Form, d.h. in einer Reinheit von mehr als 90 % oder sogar 95 % zur Verfügung gestellt.

Das PT-NANBH virale Polypeptid gemäß der vorliegenden Erfindung kann mittels eines Aminosäure-Synthesizers hergestellt werden, falls es ein Antigen mit nicht mehr als ca. dreißig Aminosäuren ist, oder durch rekombinante DNA-Techniken.

35 Die Erfindung stellt auch eine DNA-Sequenz zur Verfügung, die ein PT-NANBH virales Polypeptid wie hier definiert kodiert.

Die DNA-Sequenzen der vorliegenden Erfindung können synthetisch sein oder kloniert. Die bevorzugten DNA-Sequenzen sind in SEQ ID Nr. 3, 4, 19, 20, 21 oder 22 dargestellt.

Zur Gewinnung eines PT-NANBH viralen Polypeptids, umfassend multiple Antigene, wird bevorzugt die 40 individuelle kodierende Sequenz in ein einzelnes offenes Leseraster fusioniert. Die Fusion sollte natürlich in einer solchen Weise durchgeführt werden, daß die antigene Aktivität eines jeden Antigens nicht wesentlich durch seine Stellung relativ zu einem anderen Antigen beeinträchtigt wird. Besondere Beachtung sollte natürlich der Natur der Sequenzen an der tatsächlichen Verknüpfungsstelle zwischen den Antigenen gewidmet werden. Die Verfahren zur Herstellung solcher einzelner Polypeptide sind aus dem Stand der 45 Technik bekannt.

Die vorliegende Erfindung stellt auch einen Expressionsvektor zur Verfügung, der eine wie hier definierte DNA-Sequenz enthält, und in einem geeigneten Wirt zur Expression der DNA-Sequenz in der Lage ist unter Erzeugung eines PT-NANBH viralen Polypeptids.

Der Expressionsvektor enthält normalerweise Kontrollelemente der DNA, die die Expression der 50 DNA-Sequenz in einem geeigneten Wirt bewirken. Diese Elemente können je nach Wirt verschieden sein, aber umfassen gewöhnlicherweise einen Promotor, eine Ribosom-Bindungsstelle, translationale Start- und Stopstellen und eine transkriptionale Terminationsstelle. Beispiele solcher Vektoren umfassen Plasmide und Viren. Die Expressionsvektoren der vorliegenden Erfindung schließen sowohl extrachromosomalale Vektoren und in das Wirtszellchromosom integrierte Vektoren mit ein. Zur Verwendung in E. coli kann der 55 Expressionsvektor die DNA-Sequenz entsprechend der vorliegenden Verbindung wahlweise in Fusion entweder mit dem 5'- oder 3'-Ende einer DNA-Sequenz verknüpft enthalten, die z.B. mit der β -Galactosidase oder mit dem 3'-Ende der DNA-Sequenz verknüpft, die z.B. das trp E-Gen kodiert. Bei Verwendung im Insekten-Baculovirus(AcNPV)-System wird die DNA-Sequenz wahlweise an die Polyhedrin kodierende

Sequenz fusioniert.

Die vorliegende Erfindung stellt auch eine mit einem wie hier definierten Expressionsvektor transformierte Wirtszelle zur Verfügung.

Beispiele von Wirtszellen zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung umfassen prokaryontische und eukaryontische Zellen, z.B. Bakterien, Hefe, Säugetier- und Insektenzellen. Spezielle Beispiele solcher Zellen sind E. coli, S. cerevisiae, P. pastoris, Eizellen des chinesischen Hamsters und Mauszellen sowie Spodoptera frugiperda und Tricoplusia ni. Die Wahl der Wirtszellen kann von einer Reihe Faktoren abhängen aber, falls posttranskriptionale Modifikation des PT-NANBH viralen Polypeptids erforderlich ist, wird vorzugsweise eine eukaryontische Wirtszelle verwendet.

Die vorliegende Erfindung stellt auch ein Verfahren zur Herstellung PT-NANBH viralen Polypeptids zur Verfügung, welches die Schritte umfaßt: Klonieren oder Synthetisieren einer PT-NANBH virales Polypeptid kodierenden DNA-Sequenz wie hier definiert, Einfügen der DNA-Sequenz in ein Expressionsvektor, so daß sie in einen geeigneten Wirt exprimiert werden kann, Transformation einer Wirtszelle mit dem Expressionsvektor, Kultur der transformierten Wirtszelle und Isolierung des viralen Polypeptids.

Die Klonierung der DNA-Sequenz kann unter Verwendung bekannter Standardverfahren durchgeführt werden. Es ist jedoch besonders vorteilhaft, in diesen Verfahren die hier offenbarten Sequenzdaten zu verwenden, um so die Identifizierung und Isolierung der erwünschten klonierten DNA-Sequenzen durchzuführen. Die RNA wird vorzugsweise durch Pelletierung des Virus aus dem Plasma infizierter Menschen, die durch die Auswirkung einer PT-NANBH-Übertragung identifiziert wurden, isoliert. Die isolierte RNA wird revers in cDNA transkribiert, entweder unter Zufalls- oder oligo-dT-Priming. Die RNA kann wahlweise einem Vorbehandlungsschritt unterworfen werden, um andere Sekundärstrukturen, die mit der cDNA-Synthese interferieren könnten, zu entfernen, z.B. durch Erwärmung oder Reaktion mit Methylquecksilberhydroxid. Die cDNA wird im allgemeinen durch Zugabe von Linker mit nachfolgender Restriktionsenzymverdauung modifiziert. Sie wird dann in einen Klonierungsvektor eingeschleust, z.B. pBR322 oder eines seiner Derivate oder dem lambda Vektoren gt10 und gt11 (Huynh et al., DNA Cloning, 1985, Vol. 1: A Practical Approach, Oxford, IRL Press) in geeignete Virionen gepackt und die erhaltenen rekombinanten DNA-Moleküle zur Transformation von E. coli verwendet, wobei auf diese Weise die erwünschte cDNA-Bank erzeugt wird.

Die cDNA-Bank kann unter Einsatz von Standardstrategien gescreent werden. Falls die Bank eine Expressionsbank ist, kann sie mittels immunologischer Methoden gescreent werden, wobei Antiseren aus demselben Plasma, das auch für das RNA-Ausgangsmaterial verwendet wurde, und ebenfalls Antiseren aus weiteren menschlichen Quellen erwartungsgemäß positiv für Antikörper gegen PT-NANBH sein sollten. Da humane Antiseren im allgemeinen Antikörper gegen E. coli enthalten, die zu einem hohen Hintergrund während des Screenens Anlaß geben könnten, werden vorzugsweise die Antiseren zunächst mit einem untransformierten E. coli Lysat behandelt, um auf diese Weise solche Antikörper zu entfernen. Vorteilhafterweise wird eine Negativkontrolle unter Verwendung von Antiseren überwachter menschlicher Spender, d.h. solche Spender, die wiederholt getestet wurden und bei denen keine Antikörper gegen virale Hepatitis gefunden wurden, durchgeführt. Als alternative Screeningstrategie können ein oder mehrere markierte Oligonukleotide als Hybridisierungssonden eingesetzt werden. Die Verwendung von Oligonukleotiden beim Screening einer cDNA-Bank ist im allgemeinen leichter durchzuführen und verlässlicher als das Screenen mit Antiseren. Die Oligonukleotide werden vorzugsweise unter Verwendung der DNA-Sequenzinformation, wie hier offenbart, synthetisiert. Es können eine oder mehrere Screeningrunden nach der einen oder anderen Methode durchgeführt werden, um positive Klone zu charakterisieren und zu identifizieren.

Nach Identifikation eines ersten positiven Klons kann die Bank nach zusätzlichen positiven Klonen unter Verwendung des ersten Klones als Hybridisierungssonde nochmals gescreent werden. Alternativ oder zusätzlich können weitere Banken hergestellt werden, wobei diese unter Verwendung von Immunoscreens oder Hybridisierungssonden gescreent werden können. Auf diese Weise können weitere DNA-Sequenzen erhalten werden.

Alternativ kann die DNA-Sequenz, welche das PT-NANBH virale Polypeptid kodiert, unter Verwendung von Standardverfahren synthetisiert werden, was unter gewissen Umständen der Klonierung der DNA vorzuziehen ist (Gait, Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, 1984, Oxord, IRL Press).

Die auf diese Weise klonierte oder synthetisierte DNA-Sequenz kann mittels bekannter und Standardtechniken in einen Expressionsvektor eingefügt werden. Der Expressionsvektor wird normalerweise mit Restriktionsenzymen geschnitten und die DNA-Sequenz mit glatt endender oder versetzter Ligasierung eingefügt. Der Schnitt wird gewöhnlicherweise an einer Restriktionsschnittstelle an einer geeigneten Position im Expressionsvektor gemacht, so daß die einmal eingefügte DNA-Sequenz von den funktionalen Elementen der DNA, welche seine Expression bewirken, gesteuert wird.

Die Transformation einer Wirtszelle kann unter Verwendung von Standardtechniken ausgeführt werden. Es werden im allgemeinen einige phenotypische Marker verwendet, um zwischen den Transformanten, die

den Expressionsvektor erfolgreich aufgenommen haben und solchen, die es nicht haben, zu unterscheiden. Die Kultur der transformierten Wirtszellen und Isolierung des PT-NANBH viralen Polypeptids kann ebenfalls nach Standardverfahren ausgeführt werden.

Spezifische Antikörper gegen erfindungsgemäßes PT-NANBH virales Polypeptid können mittels des 5 Polypeptids erzeugt werden. Die Antikörper können polyklonal oder monoklonal sein. Die Antikörper können verwendet werden bei: der Qualitätskontrolle zum Test von PT-NANBH viralen Polypeptidchargen; bei der Reinigung eines PT-NANBH viralen Polypeptids oder viralen Lysats; bei der Epitopkartierung; falls markiert, als Konjugat in einem Test vom Verdrängungstyp zum Antikörpernachweis; und beim Test auf Antigene.

10 Polyklonale Antikörper gegen erfindungsgemäßes PT-NANBH virales Polypeptid können durch Injektion eines PT-NANBH viralen Polypeptids, wahlweise an einen Carrier gekoppelt, um eine Immunantwort zu beschleunigen, in ein Säugetier wie Maus, Ratte, Schaf oder Kaninchen erhalten werden, und durch Isolierung der auf diese Weise gebildeten Antikörper. Das PT-NANBH virale Polypeptid wird im allgemeinen in Form einer injizierbaren Formulierung, bei der das Polypeptid mit einem physiologisch annehmbaren 15 Verdünnungsmittel vermischt ist, verabreicht. Adjuvanzien wie Freundsches komplettes Adjuvans (FKA) oder Freudsches inkomplettes Adjuvans (FIA) können in der Formulierung enthalten sein. Die Formulierung wird normalerweise dem Wirt über einen geeigneten Zeitraum injiziert, wobei Plasmaproblem zum Test auf anti-PT-NANBH virale Antikörper nach geeigneten Intervallen genommen werden. Sobald ein ausreichendes Aktivitätsniveau erreicht ist, wird das Wirtstier ausgeblutet. Anschließend werden die Antikörper 20 aus dem Blutplasma extrahiert und gereinigt, wobei Standardmethoden zum Einsatz kommen, z.B. Protein A oder Ionenaustauschchromatographie.

Monoklonale Antikörper gegen erfindungsgemäßes PT-NANBH virales Polypeptid können durch Fusionieren von Zellen einer unsterblichen Zelllinie mit Antikörper gegen virales Polypeptid produzierenden Zellen und Kultur der fusionierten unsterblichen Zelllinie erhalten werden. Typischerweise wird ein nicht-25 menschliches Säugetier, z.B. Maus oder Ratte, mit dem viralen Polypeptid geimpft. Nach ausreichender Zeit zum Anstieg der Antikörperantwort werden Antikörper produzierende Zellen, z.B. Splenocyten, entnommen. Die Antikörper produzierenden Zellen werden mit Zellen einer unsterblichen Zelllinie, z.B. einer Maus- oder Ratten-Myelomazelllinie, fusioniert und die erhaltenen Fusionen zur Identifikation einer Hybridomazelllinie gescreent, die die erwünschten monoklonalen Antikörper ausscheidet. Die fusionierte Zelllinie kann 30 kultiviert werden und die monoklonalen Antikörper können aus dem Kulturmedium in ähnlicher Weise wie bei der Reinigung der polyklonalen Antikörper gereinigt werden.

Die Diagnosetestverfahren basierend auf der vorliegenden Erfindung können zum Nachweis der An- oder Abwesenheit einer PT-NANBH Infektion verwendet werden. Sie können auch zur Überwachung des Behandlungsverlaufs einer solchen Infektion eingesetzt werden, z.B. bei der Interferontherapie.

35 Es gibt grundsätzlich drei verschiedene Möglichkeiten zu einem Diagnosetest auf virale Infektion, wobei entweder virale Nukleinsäure, virales Antigen oder viraler Antikörper nachgewiesen wird. Virale Nukleinsäure wird im allgemeinen als bester Indikator auf Anwesenheit des Virus selbst angesehen und könnte Substanzen identifizieren, die wahrscheinlich infektiös sind. Der Nachweis von Nukleinsäure ist jedoch im allgemeinen nicht so einfach wie der Nachweis von Antigenen oder Antikörpern, da der Anteil der 40 Zielsubstanz sehr gering sein kann. Man verwendet virales Antigen als Marker für die Anwesenheit des Virus und als einen Indikator für Infektiösität. Je nach Virus kann die Menge an Antigen in einer Probe sehr gering und damit schwierig nachzuweisen sein. Antikörpernachweis ist relativ einfach, weil im Endeffekt das Wirtsimmunsystem die Antwort auf eine Infektion durch Produktion großer Mengen im Blutstrom zirkulierender Antikörper verstärkt. Die Art der Antikörperantwort kann oft klinisch nützlich sein; so sind zum Beispiel 45 eher Antikörper der IgM-Klasse als der IgG-Klasse ein geeigneter Indikator zum Nachweis einer kürzlichen Infektion oder die Antwort auf ein bestimmtes virales Antigen kann mit einer Clearance des Virus einhergehen. Daher hängt der beste Weg zum Nachweis einer viralen Infektion von besonderen Umständen und der gewünschten Information ab. Im Fall von PT-NANBH kann jeder der drei Wege als Diagnosetest beschritten werden.

50 Ein Testverfahren zur Diagnose auf PT-NANBH unter Nachweis der viralen Nukleinsäure umfaßt Hybridisierung in der Testprobe enthaltener viraler RNA oder aus dieser viralen RNA synthetisierter cDNA mit einer DNA-Sequenz, die den Nucleotid-Sequenzen von SEQ ID Nr. 3, 4, 19, 20, 21 oder 22 entspricht, und Screenen der erhaltenen Nukleinsäurehybride zur Identifikation PT-NANBH viraler Nukleinsäure. Die Anwendbarkeit dieses Verfahrens ist im allgemeinen beschränkt auf eine Testprobe eines geeigneten Gewebes, z.B. Leberbiopsie, in der die virale RNA wahrscheinlich in einem hohen Grad vorkommt. Die 55 DNA-Sequenzen entsprechend den Nucleotid-Sequenzen von SEQ ID Nr. 3, 4, 19, 20, 21 oder 22 können in Form eines Oligonucleotids oder einer cDNA-Sequenz, wahlweise eingebaut in einem Plasmid, vorliegen. Die Nukleinsäurehybride werden vorzugsweise unter Verwendung einer markierten DNA-Sequenz gescre-

ent. Es können eine oder mehrere zusätzliche Screening-Runden nach dem einen oder anderen Verfahren durchgeführt werden, um die Hybride weiter zu charakterisieren und so jede PT-NANBH virale Nukleinsäure zu identifizieren. Die Hybridisierung und das Screening werden nach aus dem Stand der Technik bekannten Methoden durchgeführt.

5 Wegen der beschränkten Anwendbarkeit dieses Verfahrens zum Test auf virale Nukleinsäure umfaßt eine bevorzugte und bequemere Methode die Synthese von cDNA von in einer Testprobe vorliegender viraler RNA, Amplifizierung einer zuvor ausgewählten DNA-Sequenz entsprechend einer Untersequenz der Nucleotid-Sequenzen von SEQ ID Nr. 3, 4, 19, 20, 21 oder 22, und Identifikation der zuvor ausgewählten DNA-Sequenz. Die Testprobe kann ein geeignetes Gewebe oder eine physiologische Flüssigkeit sein und wird vorzugsweise für jede vorliegende virale RNA konzentriert. Beispiele für ein geeignetes Gewebe schließen eine Leberbiopsie mit ein. Beispiele einer geeigneten physiologischen Flüssigkeit umfassen Urin, Plasma, Blut, Serum, Sperma, Tränenflüssigkeit, Speichel oder zerebrospinale Flüssigkeit. Bevorzugte Beispiele sind Serum und Plasma.

10 Die Synthese der cDNA wird normalerweise durch reverse Transkription mittels eines Primers mit Zufallssequenz oder mit definiertem oder oligo-dT Primer durchgeführt. Der Primer ist vorteilhafterweise ein Oligonucleotid entsprechend der Nucleotid-Sequenz von SEQ ID Nr. 3, 4, 19, 20, 21 oder 22 und ist bestimmt, die cDNA, welche die ausgewählte Sequenz enthält, anzureichern.

15 Die Amplifikation der ausgewählten DNA-Sequenz wird vorzugsweise mit der polymerasen Kettenreaktion(PKR)-Technik durchgeführt (Saiki et al, *Science*, 1985, 230, 1350-1354). Bei diesem Verfahren wird ein Paar Oligonucleotidprimer verwendet, von denen der eine einem Teil der Nucleotid-Sequenz von SEQ ID Nr. 3, 4, 19, 20, 21 oder 22 entspricht und der andere, welcher auf der 3'-Seite des ersten lokalisiert ist, einem Teil der komplimentären Sequenz entspricht, und das Paar die dazwischenliegende ausgewählte DNA-Sequenz definiert. Die Oligonucleotide sind im allgemeinen mindestens 15, optimal 20 bis 26 Basen lang und, obwohl einige wenige Fehlpaarungen durch Variation der Reaktionsbedingungen toleriert werden können, sollte das 3'-Ende der Oligonucleotide perfekt komplimentär sein, um so wirksam als Primer arbeiten zu können. Der Abstand zwischen den 3'-Enden der Oligonucleotide kann zwischen 100 bis 2000 Basen groß sein. Ein Paar der bei dieser Technik verwendeten Oligonucleotide kann günstig auch zur cDNA-Synthese mittels Primer verwendet werden. Die PKR-Technik selbst wird mit der cDNA in Einzelstrangform mittels eines Enzyms, wie der Taq-Polymerase, und einem Überschuß der Oligonucleotid-primer über 20-40 Zyklen nach veröffentlichten Vorschriften durchgeführt (Saiki et al, *Science*, 1988, 239, 487-491).

20 Zur Verfeinerung des Verfahrens können mehrere Amplifikationszyklen durchgeführt werden, wobei jeder Zyklus mit einem verschiedenen Paar an Oligonucleotiden als Primern durchgeführt wird. Auf diese Weise kann nach dem ersten Amplifikationszyklus ein internes Oligonucleotidpaar, das eine kurze DNA-Sequenz (z.B. 50 bis 500 Basen lang) definiert, für den zweiten Amplifikationszyklus verwendet werden. Bei dieser etwas verlässlicheren Verbesserung, "Nested PKR" genannt, ist es natürlich die abschließend amplifizierte DNA-Sequenz, die die ausgewählte Sequenz ausmacht (Kemp et al, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1989, 86(7), 2423-2427 und Mullis et al, *Methods in Enzymology*, 1987, 155, 335-350).

25 Die Identifizierung der ausgewählten DNA-Sequenz kann durch Analyse der PKR-Produkte auf einem Agarosegel ausgeführt werden. Das Auftreten einer Bande mit dem für die ausgewählte Sequenz berechneten Molekulargewicht ist ein positiver Indikator der viralen Nukleinsäure in der Testprobe. Alternative Methoden zur Identifizierung umfassen Southern Blotting, Dot Blotting, Oligomerrestriktion und DNA-Sequenzierung.

30 Die vorliegende Erfindung stellt auch ein Testkit zum Nachweis auf PT-NANBH virale Nukleinsäure zur Verfügung, das enthält:

- 35 i) ein Paar Oligonucleotidprimer, von denen einer einem Teil der Nucleotidsequenz von SEQ ID Nr. 3, 4, 19, 20, 21 oder 22, und der andere, der auf der 3'-Seite des ersten Primers lokalisiert ist, einem Teil der Komplimentärsequenz entspricht, und das Primerpaar die zwischen ihm liegende ausgewählte DNA-Sequenz definiert;
- 40 ii) reverse Transkriptase-Enzym zur Synthese von cDNA aus RNA der Testprobe stromaufwärts des Primers, der der komplimentären Nucleotidsequenz von SEQ ID Nr. 3, 4, 19, 20, 21 oder 22 entspricht;
- 45 iii) ein Enzym, das in der Lage ist, die ausgewählte DNA-Sequenz zu amplifizieren; und wahlweise iv) Waschlösungen und Reaktionspuffer.

50 Das Testkit enthält vorteilhaft auch eine positive Kontrollprobe, um die Identifizierung der viralen Nukleinsäure durchzuführen.

55 Die charakteristischen Eigenschaften der Primer und der Enzyme sind vorzugsweise wie oben in Verbindung mit der PKR-Technik beschrieben.

AT 400 724 B

In einem Diagnosetest auf PT-NANBH unter Nachweis viralen Antigens oder viraler Antikörper kann das Verfahren die Schritte umfassen: Zusammenbringen einer Testprobe mit einem PT-NANBH viralen Polypeptid der vorliegenden Erfindung oder einem polyklonalen oder monoklonalen Antikörper gegen das Polypeptid, und Nachweis, ob Antigen-Antikörper-Bindung innerhalb der Testprobe stattfindet. Zu diesem Zweck kann ein Testkit zur Verfügung gestellt werden, das PT-NANBH virales Polypeptid, wie hier definiert, oder einen dagegen gerichteten monoklonalen oder polyklonalen Antikörper und Hilfsmittel zum Nachweis des Auftretens einer Antikörper-Antigen-Bindung in der Testprobe enthält. Die Testprobe kann aus jedem geeigneten Gewebe und physiologischen Flüssigkeiten, wie oben zum Nachweis auf virale Nukleinsäure erwähnt, entnommen werden. Falls eine physiologische Flüssigkeit entnommen wird, kann sie wahlweise für jedes vorhandene virale Antigen oder Antikörper konzentriert werden.

Es kann eine Vielzahl von Testaufbauten eingesetzt werden. Das PT-NANBH virale Polypeptid kann eingesetzt werden, um selektiv Antikörper gegen PT-NANBH aus der Lösung zu binden und die bereits gebundenen Antikörper selektiv zu markieren, oder um die Antikörper sowohl zu binden und zu markieren. Zusätzlich kann das virale Polypeptid bei einer Vielzahl homogener Testaufbauten verwendet werden, bei denen die mit dem Antigen reaktiven Antikörper aus der Lösung ohne Phasentrennung nachgewiesen werden.

Die Arten von Testverfahren, bei denen das PT-NANBH virale Polypeptid zur Bindung viraler Antikörper aus der Lösung eingesetzt wird, umfassen die Immobilisierung des Polypeptids auf einer festen Oberfläche. Dieser Oberfläche sollte abwaschbar sein. Beispiele geeigneter Oberflächen umfassen Polymere verschiedener Arten (eingegossen in Mikrotiterwells, Perlen, verschiedene Arten von Eintauchstäben, Ansaugstücke, Elektroden und optische Artikel), Teilchen (z.B. Latex, stabilisierte rote Blutzellen, Bakterien oder Pilzzellen, Sporen, Gold oder andere metallische oder Metall enthaltende Sole und proteinhaltige Kolloide) mit einer normalen Teilchengröße von 0,02 bis 5 µm, Membranen (z.B. Nitrozellulose, Papier, Zelluloseacetat und Membran mit einer hohen Porosität und hoher Oberfläche aus organischem oder anorganischem Material).

Die Anheftung des PT-NANBH viralen Polypeptids auf der Oberfläche kann durch passive Adsorption aus einer optimal zusammengesetzten Lösung, die Benetzungsmittel, Lösungsmittel, Salze und/oder Chaotropen enthalten kann, oder durch aktive chemische Bindung geschehen. Aktive chemische Bindung kann durch eine Reihe von reaktiven oder aktivierbaren funktionellen Gruppen erfolgen, die auf der Oberfläche exponiert sein müssen (z.B. kondensierende Mittel, reaktive Säureester, Halogenide und Anhydride, Aminohydroxyl- oder Carboxylgruppen, Sulphydrylgruppen, Carbonylgruppen, Diazogruppen oder ungesättigten Gruppen). Wahlweise kann die aktive Bindung über ein Protein geschehen (was selbst auf der Oberfläche passiv oder aktiv gebunden ist), wie Albumin oder Casein, mit dem das virale Polypeptid chemisch mit einer Reihe von Methoden verbunden werden kann. Die Verwendung eines Proteins in dieser Weise kann vorteilhaft sein im Hinblick auf isoelektrischen Punkt, Ladung, Hydrophilität oder andere physikalisch-chemische Eigenschaften. Das virale Polypeptid kann auch auf eine Oberfläche (im allgemeinen), aber nicht notwendigerweise eine Membran) aufgebracht werden mit anschließender elektrophoretischer Auftrennung der Reaktionsmischung, wie z.B. Immunpräzipitation.

Nach Zusammenbringen (Reaktion) der das PT-NANBH virale Polypeptid tragenden Oberfläche mit der Testprobe, Verstreichen der Reaktionszeit und, wo notwendig, Entfernen des Probenüberschusses nach einer Reihe von Methoden (wie Waschen, Zentrifugation, Filtration, Magnetismus oder Kapillareffekt) werden die gebundenen Antikörper nachgewiesen, wobei jedes Verfahren geeignet ist, das ein detektierbares Signal ergibt. Zum Beispiel kann dies erreicht werden unter Verwendung eines markierten Moleküls oder Teilchens wie oben beschrieben, das mit dem gebundenen Antikörper reagiert (z.B. Protein A oder Protein G und ähnliches; gegen die Art gerichtete oder Anti-Immunglobuline-Subtypen; Rheumafaktor; oder Antikörper gegen das Antigen, wobei das kompetitive blockierende Verfahren eingesetzt werden kann), oder jedes Molekül, das ein Epitop aus dem Polypeptid enthält.

Das detektierbare Signal kann optisch, radioaktiv oder physikalisch-chemisch sein und kann direkt durch Markierung des Moleküls oder der Teilchen mit z.B. einem Farbstoff, einer radioaktiven Markierung, einem elektroaktiven Teilchen, einem magnetischen Teilchen oder einem Fluorophor, oder indirekt durch Markierung des Moleküls oder Teilchens mit einem Enzym, das selbst in der Lage ist, eine meßbare Veränderung irgendwelcher Art hervorzurufen, erzeugt werden. Wahlweise kann das detektierbare Signal mittels z.B. Agglutination oder durch Brechung oder Doppelbrechung erzeugt werden, falls die Oberfläche in Form von Teilchen vorliegt.

Testverfahren, bei denen ein PT-NANBH virales Polypeptid selbst zur Markierung eines bereits gebundenen Antikörpers verwendet wird, erfordern eine bestimmte Art der Markierung des Antigens, das einen Nachweis erlaubt. Die Markierung kann direkt durch chemische oder passive Bindung, z.B. als radioaktive Bindung, magnetisches Teilchen, Teilchen- oder Enzymmarkierung am Polypeptid, oder indirekt durch Anbindung irgendeiner Markierung an ein Molekül, das selbst mit dem Polypeptid reagiert, durchge-

AT 400 724 B

führt werden. Die Art der chemischen Bindung einer Markierung an das PT-NANBH virale Polypeptid kann direkt durch eine im Polypeptid bereits vorhandene Gruppe, wie z.B. einer Aminogruppe, oder durch eine Zwischengruppe, wie eine Maleimidgruppe, hergestellt werden. Bindung der Antikörper kann auf jeder der bereits erwähnten Oberflächen geschehen mittels eines jeden Mittels, einschließlich passiver oder aktivierter Adsorption, die zur Bindung spezifischer Antikörper oder Immunkomplexe führt. Insbesondere können die Antikörper durch gegen die Art gerichtete oder Anti-Immunoglobulin-Subtypen, durch Rheumafaktor, Protein A und G und ähnliche oder durch jedes Molekül, das ein Epitop aus dem Polypeptid enthält, gebunden werden.

Das markierte PT-NANBH Polypeptid kann zur kompetitiven Bindung verwendet werden, bei der seine Bindung an ein spezifisches Molekül an eine der oben dargestellten Oberflächen durch das Antigen aus der Probe blockiert ist. Es kann wahlweise in einer nicht-kompetitiven Bindung verwendet werden, bei der das Antigen aus der Probe spezifisch oder nicht-spezifisch auf eine der obigen Oberflächen gebunden wird und auch an ein spezifisches bi- oder polyvalentes Molekül (z.B. einen Antikörper) gebunden wird, wobei die übrigen Valenzen zur Bindung des markierten Polypeptids verwendet werden.

In einem homogenen Test werden oft das PT-NANBH virale Polypeptid und die Antikörper getrennt markiert, so daß wenn der Antikörper mit dem viralen Polypeptid in der freien Lösung reagiert, die beiden Markierungen interagieren können und so z.B. ein nicht-strahlender Energietransfer von einer auf die andere Markierung mit einem geeigneten Nachweis der angeregten zweiten Markierung oder gequenchten ersten Markierung (z.B. durch Fluorometrie, magnetische Resonanz oder Enzymmessung) möglich wird. Zugabe von entweder viralem Polypeptid oder Antikörpern zu einer Probe führt zur Abnahme der Interaktion der gepaarten Markierungen und so auch zu einer unterschiedlichen Signalhöhe im Detektor.

Ein geeigneter Testaufbau zum Nachweis PT-NANBH-Antikörper ist der direkte Sandwich-Enzymimmunoassay(EIA)-Aufbau. Mikrotiterwells werden mit einer Schicht PT-NANBH viralen Polypeptids bedeckt. Eine Testprobe und ein PT-NANBH virales Polypeptid, an das ein Enzym gekoppelt ist, werden gleichzeitig zugegeben. Alle in der Testprobe vorhandenen PT-NANBH-Antikörper binden sowohl an das die Wells bedeckende virale Polypeptid wie auch an das Enzym gekoppelte virale Polypeptid. Typischerweise reagiert dasselbe virale Polypeptid an beiden Seiten des Sandwiches. Nach einem Waschvorgang wird das gebundene Enzym unter Verwendung eines spezifischen Substrats, welches eine Farbänderung bedingt, nachgewiesen. Ein für ein EIA geeignetes Testkit enthält:

- 30 1) ein PT-NANBH virales Polypeptid markiert mit einem Enzym;
- 2) ein Substrat für das Enzym;
- 3) Hilfsmittel, die eine Oberfläche zur Verfügung stellen, auf die PT-NANBH virales Polypeptid immobilisiert ist, und
- 4) wahlweise Waschlösungen und/oder Puffer.

Die erfindungsgemäßen viralen Polypeptide können Bestandteil einer Impfstoffformulierung zur Immunitätserzeugung gegen PT-NANBH beim Menschen sein. Zu diesem Zweck wird das virale Polypeptid zusammen mit einem pharmazeutisch annehmbaren Träger dargereicht.

Zur Verwendung in einer Impfstoffformulierung kann das virale Polypeptid wahlweise als Teil eines mit dem Hepatitis B-Kern verschmolzenes Teilchen vorliegen, wie beschrieben bei Clarke et al (*Nature*, 1987, 330, 381-384), oder als Polymer of Polylysinbasis, wie beschrieben in Tam (*PNAS*, 1988, 85, 5409-5413). Alternativ kann das virale Polypeptid an particuläre Strukturen wie Liposomen oder ISCOMS gebunden werden.

Pharmazeutisch annehmbare Träger umfassen flüssige Medien, die zur Verwendung als Vehikel zur Einschleusung des viralen Polypeptids in einen Patienten geeignet sind. Ein Beispiel solcher flüssigen Media ist eine Salzlösung. Das virale Polypeptid kann selbst aufgelöst oder als Feststoff im Träger suspendiert werden.

Die Impfstoffformulierung kann auch ein Adjuvant zur Stimulierung der Immunantwort enthalten, wobei hierdurch die Wirkung des Impfstoffes verstärkt wird. Beispiele von Adjuvantien umfassen Aluminiumhydroxid und Aluminiumphosphat.

Die Impfstoffformulierung kann eine Endkonzentration an viralem Polypeptid im Bereich von 0,01 bis 5 mg/ml, vorzugsweise 0,03 bis 2 mg/ml enthalten. Die Impfstoffformulierung kann in einen sterilen Behälter eingefüllt werden, der anschließend versiegelt und bei einer niedrigen Temperatur, z.B. 4 °C, gelagert wird oder gefriergetrocknet werden kann.

Zur Induzierung der Immunität gegen PT-NANBH beim Menschen können eine oder mehrere Dosen der Impfstoffformulierung verabreicht werden. Jede Dosis kann 0,1 bis 2 ml, vorzugsweise 0,2 bis 1 ml betragen. Ein Verfahren zur Immunitätsinduktion gegen PT-NANBH beim Menschen umfaßt die Verabreichung einer wirksamen Menge einer wie oben definierten Impfstoffformulierung.

AT 400 724 B

Die vorliegende Erfindung umfaßt auch die Verwendung eines PT-NANBH viralen Polypeptids zur Herstellung eines Impfstoffes zur Induktion von Immunität gegen PT-NANBH beim Menschen.

Die erfindungsgemäßen Impfstoffe können nach jedem bequemen Verfahren zur Verabreichung von Impfstoffen, einschließlich oraler und parenteraler Injektion (z.B. intravenös, subkutan oder intramuskulär), verabreicht werden. Die Behandlung kann die Gabe einer Einzeldosis des Impfstoffes oder mehrere Gaben der Dosis über einen bestimmten Zeitraum umfassen.

Die folgenden transformierten Stämme von E. coli wurden am National Collection of Type Cultures (NCTC), Central Public Health Laboratory, 61, Colindale Avenue, London, NW9 5HT an den angegebenen Daten hinterlegt:

- 10 i) E. coli TG1 transformiert durch pDX113 (WD001); Hinterlegungsnummer NCTC 12369; 7. Dezember 1989.
- ii) E. coli TG1 transformiert durch pDX128 (WD002); Hinterlegungsnummer NCTC 12382; 23. Februar 1990.
- iii) E. coli TG1 transformiert durch p136/155 (WD003); Hinterlegungsnummer NCTC 12428; 28. November 1990.
- iv) E. coli TG1 transformiert durch p156/92 (WD004); Hinterlegungsnummer NCTC 12429; 28. November 1990.
- v) E. coli TG1 transformiert durch p129/164 (WD005); Hinterlegungsnummer NCTC 12430; 28. November 1990.
- vi) E. coli TG1 transformiert durch pDX136 (WD006); Hinterlegungsnummer NCTC 12431; 28. November 1990.

Figuren

25 Fig. 1 zeigt eine Darstellung der Herstellung von pDX122, wie beschrieben in Beispiel 7, Fig. 2 zeigt die Darstellung der Herstellung zwei alternativ fusionierter Sequenzen beschrieben in Beispiel 17, und Fig. 3 zeigt die Restriktionskarten SEQ ID Nr. 21 und 22.

In der Sequenzauflistung sind die Sequenzen SEQ ID Nr. 1 bis 25 aufgeführt, auf die in der Beschreibung und in den Ansprüchen Bezug genommen wird.

30 Die folgenden Beispiele dienen zur Beschreibung der Erfindung.

Beispiel 1. Synthese von cDNA

Gesammeltes Plasma (160 ml) zweier Patienten (bezeichnet als A und L), von denen bekannt war, daß sie an durch Transfusionen übertragener NANBH erkrankt waren, wurde mit Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS) verdünnt (1:2,5) und anschließend bei 190.000 g (z.B. 30.000 upm in einem MSE 8x50 Rotor) 5 Std. bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde als Quelle der spezifischen Antikörper für späteres Screening der cDNA-Banken zurück behalten. Das Pellet wurde in 2 ml 20 mM Tris-Hydrochlorid, 2 mM EDTA 3 % SDS, 0,2 M NaCl (2xPK) resuspendiert, 3 mal mit dem gleichen Volumen an Phenol, 3 mal mit 40 Chloroform und einmal mit Ether extrahiert, und anschließend mit dem 2,5-fachen Volumen an Ethanol bei -20°C ausgefällt. Das Präzipitat wurde in 10 µl 10 mM Tris-Hydrochlorid, 1 mM EDTA bei pH 8,0 (TE) resuspendiert.

Die Nukleinsäure wurde als Matrize in einem cDNA-Synthesekit (Amersham International plc, Amersham, U.K.) unter Verwendung von sowohl oligo-dT wie auch Zufalls-Hexanucleotidprimer eingesetzt. Es wurden die vom Hersteller empfohlenen Reaktionsbedingungen verwendet. 1 µl der Nukleinsäure wurde für eine erste Strangsynthesereaktion, die mit [α -³²P]dCTP (Amersham; spezifische Aktivität 3000Ci/mmol) in einem Endvolumen von 20 µl verwendet und bei 42°C 1 Std. inkubiert. Die gesamte erste Strangreaktion wurde anschließend für die zweite Strangsynthesereaktion verwendet, die E. coli RNaseH (0,8 U) und DNA Polymerase I (23 U) in einem Endvolumen von 100 µl enthielt, wobei bei 12°C 60 Min. und dann bei 22°C für 60 Min. inkubiert wurde. Die gesamte Reaktion wurde anschließend bei 70°C 10 Min. inkubiert, in Eis gestellt, 1 U von T4 DNA Polymerase wurde zugegeben und anschließend bei 37°C für 10 Min. inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 µl 0,2 M EDTA pH8 beendet.

Nicht-eingegebene Nukleotide wurden durch Durchtritt der Reaktionslösung durch eine Gelfiltrationschromatographiesäule enthaltend ein unmodifiziertes dreidimensional vernetztes Dextran-Gel (NICK-Säule (Pharmacia Ltd. Milton Keynes, U.K.)) entfernt. Die cDNA wurde dann zweimal mit Phenol, dreimal mit Chloroform und einmal mit Ether extrahiert und anschließend wurden 20 µg Dextran zugegeben, bevor mit dem 2,5-fachen Volumen an 100 %igem Ethanol präzipitiert wurde.

AT 400 724 B

Beispiel 2. Herstellung von Expressionsbanken

Das getrocknete cDNA-Pellet wurde in 5 µl sterilem TE resuspendiert und anschließend mit 500 ng EcoRI Linker (Pharmacia; GGAATTCC phosphoryliert) und 0,5 U T4 DNA Ligase (New England BioLabs, Beverley, MA, USA) in einem Endvolumen von 10 µl, enthaltend 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP 3 Std. bei 15 °C inkubiert. Die Ligase wurde durch Erhitzen auf 65 °C für 10 Min. inaktiviert und die cDNA wurde mit 180 U von EcoRI (BCL, Lewes, U.K.) in einem Endvolumen von 100 µl bei 37 °C 1 Std. lang verdaut. Es wurde EDTA zugegeben bis zum Erreichen einer Endkonzentration von 10 mM und die gesamte Reaktionslösung wurde auf eine AcA34 (LKB) Säule gegeben. Fraktionen (50 µl) wurden gesammelt und gezählt. Der Peak der cDNA im Ausschlußvolumen (980 cpm) wurde gesammelt, zweimal mit Phenol, dreimal mit Chloroform und einmal mit Ether extrahiert und anschließend mit Ethanol ausgefällt.

Die ds cDNA wurde in 5 µl TE resuspendiert und an lambda gt11 EcoRI Arme (Gibco, Paisley, Schottland) in einer 10 µl Reaktionslösung enthaltend 0,5 U T4 DNA Ligase, 66 mM Tris-Hydrochlorid, 10 mM MgCl₂, 15 mM DTT pH 7,6 bei 15 °C Übernacht ligasiert. Nach Inaktivierung der Ligase durch Erhitzen auf 65 °C für 10 Min. wurden 5 µl Reaktionslösung zu einer Amersham Packreaktionslösung gegeben und bei 22 °C 2 Std. inkubiert. Das gepackte Material wurde auf den *E. coli* Strang Y1090 (Huynh et al 1985) titriert und enthielt eine Gesamtmenge von $2,6 \times 10^4$ Rekombinananten.

Plattenkultivierbare Zellen (Y1090) wurden hergestellt durch Impfen von 10 ml L-Kulturbrühe mit einer einzelnen Kolonie von einer Agarplatte und Schütteln bei 37 °C über Nacht. Am nächsten Tag wurden 0,5 ml der Übernachtkultur mit 10 ml frischer L-Kulturbrühe verdünnt und es wurden 0,1 ml 1 M MgSO₄ und 0,1 ml 20 % (w/v) Maltose zugefügt. Die Kultur wurde 2 Std. bei 37 °C geschüttelt, die Bakterien durch Zentrifugation bei 5.000 g für 10 Min. geerntet und in 5 ml 10 mM MgSO₄ resuspendiert, wobei eine plattenkultivierbare Zellstocklösung erhalten wurde. Ein Teil (1 µl) des gepackten Materials wurde mit 0,2 ml der plattenkultivierbaren Zellen vermischt, bei 37 °C für 20 Min. inkubiert, dann wurden 3 ml Top-Agar zugefügt und die gesamte Mischung auf 90 mm L-Agarplatten gegossen. Nach Inkubation Übernacht bei 37 °C wurden die Plaques gezählt und die gesamte Anzahl der rekombinanten Phagen bestimmt. Das übrige gepackte Material (500 µl) wurde bei 4 °C aufbewahrt.

Weitere Banken wurden im wesentlichen nach dem ähnlichen Verfahren hergestellt.

30

Beispiel 3. Screening der Expressionsbanken

Die ursprüngliche Bank, wie in Beispiel 2 beschrieben, wurden auf dem *E. coli* Strang Y1090 mit einer Dichte von ca. 5×10^3 pfu pro 140 mm Platte ausplattiert und zum Wachstum bei 37 °C 2 Std. stehengelassen, bis die Plaques sichtbar wurden. Sterile Nitrozellulosefilter, die mit IPTG (Isopropylthiogalactosid) imprägniert worden waren, wurden für 3 Std. mit der Platte in Kontakt gebracht und anschließend entfernt. Die Filter wurden zuerst durch Inkubation mit Blockierlösung [3%(w/v) bovinus Serum-albumin/Tris-gepufferter Salz-Polysorbet-Lösung (BSA/TBS-Tween; 10 mM Tris-HCl pH8, 150 mM NaCl, 0,05% (v/v) Polyethoxysorbitanlaurat (Tween 20), enthaltend 0,05 % einer Lösung von 5-Brom-5-nitro-1,3-dioxan in 1,2 Propylenglykol (Bronidox)] (20 ml/Filter) blockiert und anschließend in einen Bindungspuffer überführt [1%(w/v)-BSA/TBS-Tween enthaltend 0,05% Bronidox], der (durch Ionenaustauschchromatographie) gereinigte Antikörper aus dem gesammelten A & L Plasma (20 µg/ml) enthielt. Nach Inkubation bei Raumtemperatur für 2 Std. wurden die Filter dreimal mit TBS-Tween gewaschen und anschließend in Bindungspuffer der biotinylierten Schaf-anti-Mensch-Antikörper (1:250) enthielt, inkubiert. Nach 1 Std. bei Raumtemperatur wurden die Filter 3 mal mit TBS-Tween gewaschen und anschließend in Bindungspuffer der Streptavidin/Peroxidasekomplex (1:100) enthielt, inkubiert. Das Signal wurde mit DAB entwickelt. Positive Signale erschienen als (gefärbte) Plaques.

Aus einer Gesamtzahl von $2,6 \times 10^4$ gescreenter Plaques wurden 8 positive Plaques aus dem ersten Screeningrunde erhalten. Unter Verwendung der Filter als Matrize wurden die Regionen der ursprünglichen Platten, die dem positiven Signal entsprachen, mittels einer sterilen Pasteur-Pipette ausgestochen. Die Agarstückchen wurden in 0,1 ml SM-Puffer suspendiert und man ließ den Phagen ausdiffundieren. Der Phagentiter aus jedem Agarstückchen wurde auf dem *E. coli* Stamm Y1090 bestimmt. Der Phagenstock aus jedem Agarstückchen wurde anschließend nochmal wie zuvor auf einzelne 90 mm Platten bei einer Dichte von ca. 1×10^3 pfu pro Platte gescreent. Von den 8 positiven Plaques der ersten Runde waren nach der zweiten Runde ein Plaque deutlich positiv, d.h. < 1 %, dieser Plaque wurde JG2 genannt. Dies entspricht einem Positiverhältnis von 40/10⁶ in der Bank.

Diese und andere positive Phagen wurden in ähnlicher Weise aus den anderen cDNA-Banken, wie in Beispiel 2 beschrieben, identifiziert und anschließend durch wiederholte Plaque-Screeningrunden bei

AT 400 724 B

niederer Dichte (1-200 pfu/90 mm Platte) gereinigt, bis 100 % der Plaques im A & L Antikörperscreening positiv waren. Drei solcher rekombinannten Phagen waren JG1, JG2 und JG3.

Beispiel 4. Sekundärscreening von JG1, JG2 und JG3 mit Serumreihen

5

Die Plaques jeder der recombinantnen Phagen JG1, JG2 und JG3 wurden gereinigt und als titrierte Stocklösungen in einem SM-Puffer bei 4 °C aufbewahrt. Diese Phagen wurden mit einer Stocklösung von Phagen, die in Beispiel 3 als negativ identifiziert wurden, gemischt (1:1) und die Mischung zur Infektion eines *E. coli* Y1090 Stranges bei 1000 pfu pro Platte verwendet. Es wurden Plaqueproben entnommen, mit denen wie in Beispiel 3 beschrieben verfahren wurde, mit der Ausnahme, daß die Filter in Quadrate geschnitten wurden und jedes Quadrat mit einem verschiedenen Antikörper inkubiert wurde. Diese waren A & L Antikörper (20 µg/ml); A Plasma (1:500); L Plasma (1:500) und H IgG (20 µg/ml). H ist ein Patient, der positiv auf PT-NANBH Antikörper sein sollte, da er als Bluterkranker keinen hitzebehandelten Faktor VIII erhalten hatte. Am Ende der Reaktion wurde jeder Filter als positiv grob geschätzt (wenn es eindeutig zwei Signalklassen gab) oder negativ (wenn alle Plaques dasselbe Signal zeigten). Dies konnte jedoch nur eine subjektive Bewertung sein, und daher wurden bei einem Vergleich der Ergebnisse nur diejenigen Filter als positiv gezählt, bei denen mehrheitlich eine Übereinstimmung gefunden wurde. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 dargestellt.

20

Tabelle 1

25

	A & L	A	L	H
JG1	+	+	-	-
JG2	+	+	+	+
JG3	+	+	+	+

30

JG1 schien nur mit Antikörpern von Patient A und nicht von Patient L oder H zu reagieren; dieses sollte man nicht von einem echten PT-NANBH verwandten rekombinannten Polypeptid erwarten und daher wurde JG1 aus der Analyse genommen. Sowohl JG2 und JG3 ergaben eindeutig positive Reaktionen mit den drei PT-NANBH Seren A, L und H und wurden weiter analysiert.

35

Das obige Analyseverfahren wurde bei JG2 und JG3 wiederholt, mit der Ausnahme, daß die Filter in kleinere Teile geschnitten wurden und diese mit Testreihen positiver und negativer Seren inkubiert wurden. Die Testreihen der positiven Seren enthielten eine Reihe von 10 hämophilischen Seren und eine Reihe von 9 Seren intravenös Drogenabhängiger (IVDA). Diese repräsentierten die beste Quelle positiver Seren, obwohl die tatsächliche positive Rate unbekannt war. Die Reihe negativer Seren wurde von überwachten Spendern erhalten, die über viele Jahre genau vom North London Blood Transfusion Centre, Deansbrook Road, Edgware, Middlesex, U.K. überwacht wurden und niemals Anzeichen einer Infektion von einer Reihe von Agenzien, einschließlich PT-NANBH zeigten. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 2 und 3 dargestellt.

40

45

50

55

AT 400 724 B

Tabelle 2

	I.D.	JG2	JG3
5	IVDAs	V19146 <u>4/4</u> V27083 <u>2/4</u> V29779 0/4 V12561 0/5 V15444 <u>3/4</u> V18342 <u>4/4</u> V8403 <u>3/4</u> V20001 <u>4/4</u> V21213 <u>3/4</u>	0/5 0/5 0/5 4/5 5/5 0/5 0/5 0/5 0/5
	Hämophile	M1582 <u>4/4</u> M1581 <u>5/5</u> M1575 <u>3/5</u> M1579 <u>5/5</u> M1585 <u>3/5</u> M1576 1/5 M1580 1/5 M1578 1/5 M1587 1/5 M1577 2/5	4/5 5/5 0/5 5/5 0/5 1/5 0/5 0/5 3/5 1/5

25

Positive sind unterstrichen.

Tabelle 3

30

	IVDA	Hämophile	überwachte Spender
	JG2 6/9(66%)	5/10(50%)	0/10(0%)
	JG3 2/9(22%)	4/10(40%)	0/10(0%)
	JG2 + JG3 1/9(11%)	3/10(30%)	0/10(0%)
35	JG2 or JG3 7/9(77%)	6/10(60%)	0/10(0%)

40

Diese Daten sind mit der Hypothese vereinbar, daß beide Rekombinanten Polypeptide exprimieren, die mit einem PT-NANBH auslösenden Agens assoziiert sind, und daß diese Polypeptide nicht identisch sind, jedoch gemeinsame antigene Bindungsstellen aufweisen können.

45

Beispiel 5. Restriktionskartierung und DNA-Sequenzierung von JG2 und JG3

Ein Teil (10 µl) der Phagenstocklösung sowohl von JG2 als auch JG3 wurde gekocht, um die Phagen zu denaturieren und die DNA freizulegen. Diese DNA wurde anschließend als Matrize in einer PCR-Amplifikation mittels Taq Polymerase verwendet; jede Reaktionslösung enthielt die folgenden Substanzen in einem Endvolumen von 50 µl: 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,01 % Gelatine, pH 8,3 bei 25 °C zusätzlich Oligonucleotidprimer d19 und d20 (SEQ ID Nr. 1 und 2; jeweils 200 ng); diese Primer sind in den lambda-Sequenzen lokalisiert, die die EcoR1 Klonierungsstelle flankieren, und bewirken daher die Amplifikation mittels Primer von allem, was in diese Stelle kloniert wurde.

50

Ein Anteil der Reaktion wurde auf einem 1,0 %igem Agarosegel analysiert und mit Markern verglichen. Amplifikation von JG2 produzierte ein Fragment von ca. 2 Kb; JG3 eines von ca. 1 Kb. Die übrige Reaktionsmischung wurde mit Phenol/Chloroform in Anwesenheit von 10 mM EDTA und 1 % SDS extrahiert und die DNA durch Ethanolpräzipitation zurückgewonnen. Das amplifizierte Material wurde anschließend mit 20 U von EcoR1 für 60 Min. bei 37 °C verdaut und auf einem 1,0 % LGT Agarosegel in TAE aufgetrennt. Die Fragmente waren wie erwartet in der Größe reduziert und wurden unter Verwendung von Elutips (S & S) eluiert und gereinigt. Die JG2 und JG3 Insertionssequenzen wurden mit EcoR1 verdaullem pUC13 ligasiert und in den *E. coli* Stamm TG1 transformiert. Die Rekombinanten wurden als weiße Kolonien auf X-gal/L-Amp Platten identifiziert (L-Agarplatten ergänzt mit 100 µg/ml Ampicillin, 0,5 mg/ml X-gal) und wurden

überprüft durch Plasmidpräparationen in kleinem Maßstab und EcoR1 Restriktionsenzymverdauung zur Größenbestimmung der Insertions-DNA. Das rekombinante Plasmid mit den JG2 Insertionssequenzen wurde DM415 genannt und dasjenige mit den JG3 Insertionssequenzen DM416.

- Die Insertionssequenzen des JG2 wurden durch direkte doppelsträngige Sequenzierung der Plasmid 5 DNA und Subklonierung in M13 Sequenzierungsvektoren wie mp18 und mp19 mit anschließender Einzelstrangsequenzierung bestimmt. Die Insertionssequenz von JG3 wurde ähnlich bestimmt. Die erhaltene DNA und die abgeleiteten Aminosäure-Sequenzen sind in SEQ ID Nr. 3 und 4 aufgeführt.

Beispiel 6. Expression von PT-NANBH Polypeptid in E. coli

- 10 Das Plasmid pDM416 (5 µg) wurde mit EcoR1 (20 U) in einem Endvolumen von 20 µl verdaut und die 1 Kb Insertionssequenz durch Elution von einem 1 %igen LGT Agarosegel gewonnen. Dieses Material wurde dann unter Verwendung des Klenow Fragments und einer dNTP Mischung zur Auffüllung der nach EcoR1-Schnitt überstehenden Enden glattgemacht. Die DNA wurde durch Ethanolpräzipitation mit anschließender Extraktion mit Phenol/Chloroform gewonnen. Die glatten Fragmente wurde in SmaI gespaltene/phosphatasierte pDEV107 ligasiert (ein Vektor, der Klonierung am 3'-Ende des lac Z erlaubt) und anschließend in E. coli TG1 Zellen transformiert. Es zeigte sich ein 30-facher Anstieg in den Kolonien gegenüber der bloßen Vektorkontrolle. Die Transformanten mit dem gewünschten rekombinanten Plasmid 15 wurden durch Hybridisierung mit einer radioaktiven Sonde, hergestellt durch PKR-Amplifikation der JG3 Rekombinante, identifiziert. Zwölf Kolonien wurden durch Restriktionsenzymverdauung (Sall) von Miniplasmidpräparationen analysiert, um die Orientierung der Insertionssequenzen zu bestimmen. Ein Viertel dieser Rekombinanten waren in der korrekten Orientierung, um die PT-NANBH Sequenz als Fusionsprodukt mit β-Galactosidase zu exprimieren. Eines dieser Rekombinanten (pDX113) wurde für weitere Analysen verwendet.
- 20 Eine Kolonie von pDX113, gewachsen bis zur mittleren Logphase bei 37 °C unter Schütteln, wurde verwendet, um 50 ml L-Kulturbrühe zu überimpfen und die Expression wurde durch Zugabe von 20 mM IPTG induziert. Nach 3 Std. wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 5.000 g für 20 Min. geerntet, in 50 ml PBS resuspendiert und nochmals pelletiert. Die pelletierten Zellen wurde in 5 ml Puffer (25 mM Tris-HCl, 30 1 mM EDTA, 1 mg/ml Lysozym, 0,2 % (v/v) Nonidet-P40, pH 8,0) per Gramm Pellet resuspendiert und bei 0 °C 2 Std. inkubiert. Die freigesetzte bakterielle DNA wurde durch Zugabe von DNase I und MgSO₄ bei einer Endkonzentration von 40 µg/ml und 2 mM verdaut, wobei die Viskosität herabgesetzt wurde.

- 25 Dieses rohe Lysat wurde durch PAGE analysiert und das Proteinmuster mit Coomassie blue gefärbt. Ein Protein von ca. 150 kD wurde in den Bakterien mit pDX113 induziert, wobei dieses Protein schätzungsweise 10-15 % des Gesamtproteinanteil ausmachte. Ähnliche Gele wurden auf PVDF Membran transferiert 30 (GRI, Dunmow, Essex, U.K.) und die Membranen mit PT-NANBH positiven und negativen Seren inkubiert; das 150 kD Protein reagierte mit A und L Seren aber nicht mit normalem menschlichen Serum. Kontrollspuren, die Lysat aus E. coli, die β-Galactosidase exprimierten, enthielt, reagierten nicht mit A, L oder normalen menschlichen Seren.

- 35 Zum rohen Lysat wurde Harnstoff bis zu einer Endkonzentration von 6 M zugegeben und das unlösliche Material durch Zentrifugation entfernt. Der 6 M Harnstoffextrakt wurde verwendet, um die Mikrotiterwells direkt für 1 Std. bei 37 °C zu beschichten. Die Wells wurden dreimal mit bidestilliertem Wasser gewaschen und anschließend durch Zugabe von 0,25 ml 0,2 %igem BSA mit 0,02 % NaN₃ pro Well 20 Min. bei 37 °C blockiert. Dann wurden die Platten behaucht. Kontrollplatten, die mit einem Rohlysat eines β-Galactosidase produzierenden E. coli Stranges (pXY461) beschichtet waren, wurden auf dieselbe Weise hergestellt. Diese 40 Platten wurden in ELISA Tests, wie in Beispiel 10 beschrieben, verwendet.

Beispiel 7. Expression des PT-NANBH Polypeptids in Insektenzellen

- 45 Die PT-NANBH Insertionssequenz JG3, isoliert wie in Beispiel 5 beschrieben, wurde im Leseraster mit den ersten 34 Nucleotiden des Polyhydrins in den Vektor pAc360 (Luckow und Summers, Biotechnology, 1988, 6, 47-55) unter Anwendung unseres Wissens über das Leseraster des lacZ Gens im gt11 Vektor. Es wurden Oligonucleotide synthetisiert, die in der Lage waren, mit den die EcoR1 Klonierungsstelle flankierenden gt11 Sequenzen zu hybridisieren und die zur Amplifikation der Insertionssequenzen durch PKR fähig waren. Diese Oligonucleotide enthielten BamH1 Restriktionsschnittstellen, die so plaziert waren, daß sie eine direkte Klonierung in die BamH1 Schnittstelle von pAc360 erlaubten, und wobei das Insertionsgen im Leseraster mit den Sequenzen am aminoterminalen Ende des Polyhydrins eingefügt wurde.

50 Eine kleine Menge an gt11 Rekombinanten JG3 wurde gekocht, wobei die DNA freigelegt wurde und anschließend in einer PKR-Amplifikation mit den Oligonucleotidprimern d75 und d76 (SEQ ID Nr. 6 und 7;

200 mg) und 0,5 U Taq Polymerase verwendet wurde.

Nach der Amplifikation wurde die Reaktionsmischung mit dem gleichen Volumenanteil Phenol/Chloroform extrahiert, mit Ethanol präzipitiert und mit 10 U BamH1 in einem Endvolumen von 30 µl verdaut. Das amplifizierte Fragment wurde auf einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt, eluiert und in 5 BamH1-verdautem pAc360 ligasiert, wobei das Transferkonstrukt pDX119 erhalten wurde. Insektenzellen wurden mit dem rekombinanten Plasmid (2 µg) und Wildtyp AcNPV DNA (1 µg) durch Calciumphosphat-präzipitation kotransfiziert. Einschlußnegative rekombinante Viren wurden durch optisches Screening selektiert. Nach drei Runden der Plaquereinigung wurde das rekombinante Virus (BHC-5) vermehrt und die Expression des rekombinanten Proteins in den Insektenzellen durch SDS-PAGE, Western Blot und ELISA 10 beurteilt. In den infizierten Zellen wurde im Überschuß exprimiertes Protein von ca. 70 kD produziert. Dieses Protein reagiert mit PT-NANBH Seren im Western Blot und ELISA.

Eine weitere Baculovirus Rekombinante (BHC-7) wurde konstruiert, wobei JG2 Sequenzen zusätzlich zu den im BHC-5 anwesenden JG3 Sequenzen, wie in Fig. 1 dargestellt, einschleust wurden. Die in JG2 vorliegenden PT-NANBH Sequenzen wurden amplifiziert und in pAc360 Vektoren kloniert, wie oben 15 beschrieben, wobei pDX118 erhalten wurden und die geeigneten BamH1/Sall Fragmente von pDX119 und pDX118 wurden miteinander in dieser Reihenfolge in pAc360 verknüpft, wobei das Transferkonstrukt pDX122 hergestellt wurde.

Die rekombinanten Plasmide wurden durch Hybridisierung identifiziert und die Orientierung der Insertions-DNA wurde durch Restriktionsenzymanalyse bestimmt. Rekombinante Viren wurden wie oben 20 beschrieben hergestellt und das exprimierte Protein durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, Western Blot und ELISA analysiert. Es wurde ein 95 kDa Polypeptid in hohem Überschuß (40 % des gesamten Zellproteins) in den infizierten Zellen gefunden, das mit den PT-NANBH Seren reagierte.

Beispiel 8. Reinigung des DX113 Polypeptids

Der *E. coli* Stamm TG1 mit dem Plasmid pDX113 (bezeichnet als WDL001 Stamm) wurde in einem 1,5 l Fermenter (Modell SET002, SGI, Newhaven, East Sussex, U.K.) induziert und bei 37 °C 5 Std. wachsen gelassen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 5.000 g für 20 Min. geerntet und wie folgt behandelt.

a) Extraktion

Die nassen Zellen wurden in Puffer A (50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 10 % (v/v) Glycerol, pH 8,0) resuspendiert (1:20 w/v). 5 mg festes Lysozym wurde pro ml der Suspension zugefügt und die Mischung bei 4 °C stehengelassen. Nach 15 Min. wurde die Mischung im Eisbad mit Ultraschall behandelt (6 µm Peak-zu-Peak Amplitude) für eine Gesamtzeit von 3 Min. (6 x 30 Sek. Schallung). 4 µg DNase I wurde pro ml Suspension zugefügt und die Mischung weitere 30 Min. stehengelassen. Die Suspension wurde 20 Min. bei 18.000 g (max) zentrifugiert und der Überstand 35 dekandiert.

Das Pellet wurde in Puffer B (25 mM Hepes, 4 M Harnstoff, 4 mM DTT, pH 8,0) bei einem Verhältnis von 1:6 (w/v) unter Erhalt einer feinen Suspension resuspendiert. Diese wurde bei 18.000 g (max) 20 Min. zentrifugiert und der Überstand abdekandiert. Das Pellet wurde in Puffer C (25 mM Hepes, 8 M Harnstoff, 2 mM DTT, pH 8,0) in einem Verhältnis von 1:6 (w/v) resuspendiert: vor Suspendierung 40 wurden die folgenden Substanzen zugegeben: Leupeptin (1 µg/ml), Pepstatin (1 µg/ml) und E64 (1 µg/ml). Die Suspension wurde bei 18.000 g (max) 30 Min. zentrifugiert, der Überstand abdekandiert und zurückbehalten. Das Pellet wurde in 25 mM Hepes, 1 % SDS pH 8,0 resuspendiert.

b) Chromatographie

Der Überstand der 8 M Harnstofffraktion wurde 1:5 (v/v) mit 25 mM Hepes, 8 M Harnstoff, 2 mM DTT, pH 8,0 verdünnt und auf einer 7 ml Q-Sepharosesäule fraktioniert. Die Proteine wurde mittels eines Salzgradienten von 0-1 M NaCl eluiert. Die Chromatographie und die Datenverarbeitung wurde über eine FPLC-Anlage (Pharmacia) gesteuert. DX113 eluierte bei ca. 500 mM NaCl und war nahezu homogen bei der SDS-PAGE und Western Blot Analyse.

Beispiel 9. Reinigung des BHC-5 Polypeptids

Sf9 Zellen (2×10^9) wurden mit der Stocklösung des BHC-5 rekombinanten Virus (moi 5) infiziert. Nach 2-tägiger Inkubation bei 28 °C wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und dann wie folgt 55 verarbeitet.

a) Extraktion

Die nasse Zellmasse (1,2 g) wurde in 6 ml Puffer A (25 mM Hepes, 5 mM DTT, Leupeptin 1 µg/ml, Pepstatin 1 µg/ml, E64 1 µg/ml pH 8,0) resuspendiert. Die resuspendierten Zellen wurden in ein Eisbad

AT 400 724 B

gestellt und 3 x 15 Sek. mit Ultraschall behandelt (6 µm Peak-zu-Peak Amplitude), mit Ruhepausen von je 30 Sek.. Die beschallte Suspension wurde bei 18.000 g (max) 20 Min. zentrifugiert und der Überstand dekandiert. Das Pellet wurde in Puffer A plus 4 M Harnstoff (6 ml) resuspendiert und bei 18.000 g (max) 20 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde abdekandiert und das Pellet mit Puffer A plus 8 M Harnstoff (6 ml) reexstriert. Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 18.000 g (max) wurde der Überstand zurückbehalten und 1:6 im Puffer A plus 8 M Harnstoff verdünnt. Dieses Extrakt wurde auf einer mit demselben Puffer equilibrierten mono-Q-Säule chromatographiert. Die Säule wurde mit einem Salzgradienten (0-1,0 M NaCl) mit 12 Säulenvolumen eluiert. BHC-5 eluierte bei ca. 0,45 - 0,55 M NaCl und seine Reinheit bestimmt durch SDS-PAGE war größer als 90 %. Die Ausbeute betrug ca. 70 %.

10

Beispiel 10.

Einsatz von DX113 und BHC-5 und BHC-7 Polypeptiden in einem ELISA

15

Mikroelisaplatten (96 Wells, Nunc) wurden direkt in 50 mm Bikarbonatpuffer (50 mM Natriumbikarbonat und 50 mM Natriumkarbonat auf pH 9,5 titriert) mit entweder einem 6 M Harnstoff Rohlysat von BHC-5 oder mit gereinigten pDX113 beschichtet. Die Platten wurden mit 0,2 %iger BSA-Lösung blockiert und anschließend 30 Min. bei 37 °C mit 1:20 verdünnten Seren (Baculo) oder 1:100 (*E. coli*) inkubiert. Die Platten wurden in einer Tween-Salzlösung (0,85 % Salzlösung, 0,05 % Tween 20, 0,01 % Bronidox) gewaschen und mit Peroxidase-konjugiertem Ziegen-anti-Mensch Immunoglobulin (1:2000) 30 Min. bei 37 °C inkubiert. Dann wurden die Platten in Tween-Salzlösung gewaschen und es entwickelte sich eine Farbe durch Zugabe des chromogenen Substrats TMB (Tetramethylbenzidin-HCl) (100 µl/Well) in 20-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur. Die Reaktion wurde mit 50 µl 2 M Schwefelsäure abgestoppt und die OD450 bestimmt (Tabelle 4).

25

Tabelle 4

Indirekter Anti-Mensch Ig-ELISA Aufbau zum Nachweis von NANB Antikörper		
	Baculo BHC-5 (feste Phase)	<i>E.coli</i> DX113 (feste Phase)
Seren von positiven Hochrisiko-Patienten im Test	>2 1.855 1.081 1.842 0.526 >2 1.823 1.779 1.122 1.686	1.670 1.531 1.015 1.558 0.638 1.516 1.602 1.318 0.616 1.441
Seren von negativen Hochrisiko-Patienten im Test	0.259 0.158 0.298 0.194 0.282 0.263 0.184 0.121 0.243	0.205 0.120 0.209 0.111 0.181 0.165 0.163 0.099 0.104
Überwachter Spender	0.224	0.119

55

Seren von Patienten mit einem hohen Risiko für die PT-NANB Infektion (IVDA's, Bluter) wurden wie beschrieben getestet. Alle Werte sind als OD450 Angaben ausgedrückt mit den überwachten Spendern als Negativkontrolle. Von dieser besonderen Gruppe sind 10/19 Seren positiv auf beiden festen Phasen.

AT 400 724 B

Zusätzlich wurde gereinigtes DX113 an alkalische Phosphatase mittels SATA/Maleimid-Reduktion konjugiert und ein immunometrischer Test aufgebaut. Bekannte NANB positive und negative Seren wurden verdünnt, wie beim überwachten Spenderserum angegeben, und zu einer BHC-7 beschichteten festen Phase gegeben. Das DX113 Konjugat wurde entweder gleichzeitig oder nach Inkubation (30 Min. bei 37 °C) zugegeben (50 µl, 1:2000). Nach 30-minütiger Inkubation bei 37 °C wurden die Platten mit 50 mM Bikarbonatpuffer gewaschen, und es fand Farbentwicklung statt bei Verwendung des IQ Bio-Amplifizierungssystems und es wurde die OD492 bestimmt (Tabelle 5).

Tabelle 5

10

Immunometrischer ELISA (markiertes Polypeptid) zum Nachweis von NANB Antikörper			
	Positiv im Test	Negativ im Test	überwachter Spender
15	>2 0.821 >2 0.542 0.876 1.583 >2 >2 1.830 >2	0.217 0.252 0.214 0.257 0.308 0.278 0.296 0.273 0.262 0.251	0.234
20			
25			

25

Sowohl der Antiglobulin- wie auch der immunometrische Testaufbau ergab bei allen Hochrisikoproben ein übereinstimmendes Ergebnis.

30

Beispiel 11. Impfstoffformulierung
Eine Impfstoffformulierung wurde hergestellt durch konventionelle Techniken unter Verwendung der folgenden Bestandteile in den angegebenen Mengen:

35

PT-NANBH virales Polypeptid	> 0,36 mg
Thiomersal	0,04-0,2 mg
Natriumchlorid	< 8,5 mg
Wasser	bis 1 ml

40

Beispiel 12

Herstellung monoklonaler Antikörper gegen PT-NANBH Polypeptide

45

Die DNA-Insertionssequenzen aus DM415 wurden im Baculovirus Transfervektor p36C subkloniert und rekombinante Viren nach einer im wesentlichen in Beispiel 7 beschriebenen Methode hergestellt. Das rekombinante Virus wurde BHC-1 genannt und exprimierte in sehr geringem Ausmaß PT-NANBH-spezifisches Protein. Sf-9 Zellen (5×10^7 Zellen/ml), infiziert mit BHC-1, wurden in PBS mit 1 % (v/v) NP40 lysiert und bei 13.000 g 2 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde über Extractigel-D (Pierce Chemicals) gegeben, wobei das Detergens entfernt wurde und anschließend als 1:1 Emulsion mit Freundschem kompletten Adjuvans gemischt. Mäuse wurden subkutan mit 0,1 ml der Emulsion (entspricht 5×10^6 Zellen) injiziert. 14 und 28 Tage nach der Injektion wurden die Mäuse durch intraperitoneale Injektion von 0,1 ml (entspricht 5×10^6 Zellen) eines Detergens-freien Extraks von BHC-5-infizierter Sf-9 Zellen geboostet; BHC-5 enthält die

55

DNA Insertionssequenzen von DM416. Blutproben vom Schwanz wurden genommen und auf anti-PT-NANBH Aktivität in einem ELISA (Beispiel 10) getestet. Zwei Mäuse mit einer PT-NANBH-spezifischen Antwort wurden nochmals durch i.v. Injektion mit einem Detergens-freien Extrakt von BHC-7-infizierten Sf-9 Zellen geboostet; BHC-7 enthält die DNA Insertionssequenzen, die durch Ligasierung der überlappenden

AT 400 724 B

Regionen von DM415 und DM416 (Beispiel 7) hergestellt wurden. Die Milz wurde drei Tage später entnommen.

Die Milzzellen wurden mit NSo-myelomazellen in Gegenwart von PEG1500 nach Standardverfahren fusioniert. Die erhaltenen Hybridomazellen wurden durch Wachstum in HAT (Hypoxanthin, Aminopterin,

- 5 Thymidin) Medium selektiert. 10-14 Tage nach Fusion wurden die Überstände auf anti-PT-NANBH Aktivität durch ELISA gescreent. Wells, die Reaktivität sowohl mit DX113 und HBC-7 Antigenen (Beispiel 10) zeigten, wurden identifiziert und einzelne Kolonien in separate Wells transferiert, kultiviert und nochmals getestet. Wells, die eine spezifische Reaktivität in diesem Stadium zeigten, wurden weiter bis zur limitierenden Verdünnung kloniert, um Monoklonalität sicherzustellen.

10

Beispiel 13

Nachweis von PT-NANBH viraler Nukleinsäure in serumpositiven Patienten

- 15 Seren: Spenderproben von 1400 Spendern, die an einer Übersichtstudie zur posttransfusionalen Hepatitis teilnahmen, wurden bei -20 °C eingefroren. Die prätransfusionale Proben und Reihen posttransfusionale Proben von 260 Empfängern wurden in gleicher Weise gelagert. Die posttransfusionale Proben wurden in 14-tägigem Abstand bis zu 3 Monaten, dann im monatlichen Abstand bis zu 6 Monaten und 6-monatlich danach bis zu 18 Monaten gesammelt. Gefrorene Spender- und Empfängerseren von drei Fällen
20 von PT-NANBH, die 1981 auftraten, standen auch für die Untersuchung zur Verfügung. Die Diagnose auf PT-NANBH basierte auf einem Anstieg in der Serumalaninaminotransferase (ALT) bis zu 2,5 mal über den normalen oberen Grenzwert bei wenigstens zwei verschiedenen getrennten posttransfusionalen Proben. Andere hepatotrope Viren wurden durch serologische Tests ausgeschlossen und nicht-virale Ursachen einer hepatozellulärer Verletzung wurde durch konventionelle klinische oder Laboruntersuchungen ausgeschlossen.
25

Immunoassay: Die Serumproben wurden auf die Anwesenheit von gegen HCV gerichteter Antikörper (C100 Antigen) mit dem Ortho Diagnostics ELISA Kit entsprechend den Herstellerangaben getestet. Wiederholte reaktive Seren wurden titriert bis zu einem Endpunkt in einem menschlichen Serum, das negativ auf anti-C100 war.

- 30 Nachweis der PT-NANBH viralen Sequenzen: Serum oder Plasma RNA wurde extrahiert, revers transkribiert und, wie unten beschrieben, amplifiziert. Die reverse Transkription/PKR Oligonukleotidprimer wurden aus der Nucleotidsequenz des JG2 Klons, wie in Beispiel 3 isoliert, abgeleitet und auf einem Applied Biosystems 381A Synthesizer synthetisiert. Die Sequenzen der vier Oligonucleotidprimer sind wie folgt:

35

Designierung	SED ID Nr.	Produktgröße
d94 Sinn	8	729bp
D95 Antisinn	9	
N1 Sinn	10	
N2 Antisinn	11	402bp

45

i) RNA Extraktion

5-50 µl Serum (oder Plasma) wurden auf 200 µl durch Zugabe sterilen destillierten Wassers verdünnt. Die 200 µl Probe wurde zu einem gleichen Volumen an 2 x PK Puffer (2 x PK = 0,2 M TrisHCl, pH 7,5, 25 mM EDTA, 0,3 M NaCl, 2 % w/v SDS, Proteinase K 200 µg/ml) zugegeben, gemischt und bei 37 °C 40 Min. inkubiert. Die Proteine wurden durch Extraktion zweimal mit Phenol/Chloroform und einmal mit Chloroform allein entfernt. Es wurden 20 µg Glycogen zur wäßrigen Phase zugegeben und die RNA durch Zusatz des 3-fachen Volumens an eiskalten absoluten Ethanol aufgefällt: Nach 1-stündiger Lagerung bei -70 °C wurde die RNA in einer Eppendorf-Zentrifuge (15 Min. 14.000 Upm, 4 °C) pelletiert. Das Pellet wurde einmal in 95 %igem Ethanol gewaschen, im Vakuum getrocknet und in 10 µl sterilem destilliertem Wasser aufgelöst. Die RNA Lösungen wurden bei -70 °C gelagert.

55

ii) cDNA Synthese

Es wurde eine 10 µl Mischung hergestellt, die 2 µl RNA Lösung, 50 ng des synthetischen Oligonucleotids d95, 10 mM Hepes-HCl pH 6,9 und 0,2 mM EDTA pH 8,0 enthielt. Diese 10 µl Mischung wurde mit 2 Tropfen Mineralöl überschichtet, 2 Min. in einem Wasserbad bei 90 °C erhitzt und rasch in Eis

AT 400 724 B

abgekühlt. Die Reaktionslösung wurde auf 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT, jeweils 0,5 mM von dATP, dCTP, dGTP und dTTP, 20 U des RNase Inhibitors (Pharmacia) und 15 U der klonierten MLV reversen Transkriptase (Pharmacia) bei einem Endvolumen von 20 µl eingestellt und die cDNA Synthese durchgeführt. Die 20 µl Mischung wurde 90 Min. bei 37°C inkubiert. Nach der Synthese wurde die cDNA bei -20°C gelagert.

5 iii) "Nested" PKR

Falsch positive PKR Ergebnisse im Rahmen dieser Studie wurden vermieden, indem strenge Maßnahmen nach Kwok und Higuchi (*Nature*, 1989, 339, 237-238) zur Vermeidung von Kontamination ergriffen wurden.

10 a) Runde 1

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde in einer 50 µl Mischung enthaltend 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,01 % w/v Gelatine, 1 U rekombinanter Taq DNA Polymerase (Perkin Elmer Cetus), 200 µM von jedem dNTP, 30 ng von jedem "äußeren" Primer (d94 und d95; SEQ ID Nr. 8 und 9) und 5 µl der cDNA Lösung durchgeführt. Nach einer ersten 5-minütigen Denaturierung bei 94°C wurden 35 Zyklen bei 95°C für 1,2 Min., bei 56°C für 1 Min. und bei 72°C für 1 Min. durchgeführt, gefolgt von einer abschließenden 7-minütigen Verlängerung bei 72°C (Techne PHC-1 Automated Thermal Cycler).

15 b) Runde 2

Es wurde dieselbe Reaktionsmischung wie für Schritt 1 beschrieben verwendet, jedoch wurden 125 ng eines jeden "inneren" Primers N1 und N2 (SEQ ID Nr. 10 und 11) anstelle der "äußeren" Primer d94 und d95 eingesetzt. Ein Aliquot von 1 µl der PKR-Produkte aus Runde 1 wurde in 50 µl Reaktionsmischung von Runde 2 überführt. Es wurden 25 Schritte bei 95°C für 1,2 Min., bei 46°C für 1 Min., bei 72°C für 1 Min. durchgeführt, an die sich eine 7-minütige Verlängerung bei 72°C anschloß.

20 c) Analyse

25 20 µl der PKR-Produkte aus Runde 1 und Runde 2 wurden durch Elektrophorese auf einem 2 %igen Agarosegel analysiert. Die Banden wurden durch Ethidiumbromidfärbung sichtbar gemacht und bei 302 nm fotografiert.

30 Vorhergesagter Wert der anti-HCV Serologie und PKR in der Übersichtsstudie: Sechs der 1400 Spender (0,43 %), die an der Übersichtsstudie teilnahmen, zeigten gegen C100 gerichtete Antikörper in ihrem Serum. Von diesen sechs Antikörper-positiven Spendern erwies sich nur einer (Spender D6) als infektiös, wie durch Ausbruch von PT-NANBH und C100 Serumkonversion in einem Empfänger (Empfänger R6) nachgewiesen werden konnte - siehe unten Tabelle 6. Im Serum des Spenders D6 wurden durch PKR virale Sequenzen nachgewiesen, jedoch in keinem anderen der fünf serumpositiven Spenderseren. Der Empfänger R6, bei dem PT-NANBH auftrat, hatte ebenfalls Blut von sieben anderen Spendern (D7 bis D13) erhalten. Überprüfung der Seren von diesen Spendern ergab, daß sie sowohl Antikörper-negativ und PKR-negativ waren.

40

45

50

55

Tabelle 6

Spender/Empfänger Datenzusammenfassung: Übersichtsstudie						
5	Spender			Empfänger		
	Spender	anti-HCV	PKR	Empfänger	PT-NANBH	anti-HCV Serumkonversion
10	D1	+	-	R1	nein	nein
	D2	+	-	R2	nein	nein
	D3	+	-	R3	nein	nein
	D4	+	-	R4	nein	nein
	D5	+	-	R5	nein	nein
	D6	+	+			
	D7	-	-			
	D8	-	-			
	D9	-	-	R6	ja *	ja +
	D10	-	-			
	D11	-	-			
	D12	-	-			
	D13	-	-			

* Inkubationszeit 1 Monat

+ Serumkonversion trat 5 Monate nach der Transfusion auf

25

Beispiel 14Isolierung und Expression zusätzlicher PT-NANBH DNA-Sequenzen

30

Die Banken aus lambda gt11 aus Beispiel 2 wurden ebenfalls gescreent mit Seren von PT-NANBH Hochrisiko-Patienten, die aber nicht mit den viralen Antigenen DX113, BHC-5 und BHC-7 reagierten. Der Grund dafür mag sein, daß sie auch Antikörper, die verschiedene Antigene erkennen können, enthalten. Die Seren PJ-5 (The Newcastle Royal Infirmary, Newcastle), Birm-64 (Queen Elizabeth Medical Centre, Birmingham), PG und Le (University College and Middlesex School of Medicine, London) erfüllten dieses Kriterium und wurden zum Screenen der Banken nach denselben Verfahren, wie in Beispiel 3 und Beispiel 4 beschrieben, eingesetzt. Es wurde auf diese Weise an Zahl Rekombinannten identifiziert, von denen keine mit aus JG2 und JG3 hergestellten Sonden kreuzhybridisierte. Eine der Rekombinannten, BR11, identifiziert durch Reaktion mit PJ-5, wurde für eine weitere Analyse ausgewählt.

40

Der Klon BR11 enthielt eine Insertionssequenz von ca. 900 BP, die durch PKR mittels der d75 und d76 Primer (SEQ ID No. 6 und 7), wie in Beispiel 7 beschrieben, amplifiziert wurden. Die amplifizierte Sequenz wurde direkt in den Baculovirus Vektor pAc360 unter Bildung des pDX128 kloniert, der ein offenes Leseraster in Phase mit den ersten 11 Aminosäuren des Polyhydrins enthielt. Stocklösungen des rekombinanten Baculovirus (bezeichnet BHC-9) wurden nach den Verfahren wie in Beispiel 7 beschrieben hergestellt. Insektenzellen wurden mit gereinigten rekombinanten Viren infiziert und ein Polypeptid von ca. 22 kD wurde aus radioaktiv markierten Zellextrakten erhalten.

Die amplifizierte Insertionssequenz von BR11 wurde auch in pUC13 und M13 Phagenvektor zur Sequenzierung kloniert; die DNA und die Aminosäure-Sequenzdaten sind in SEQ ID Nr. 5 dargestellt. Die Insertionssequenz enthält 834 BP plus die EcoR1 Linker, die während der Klonierung hinzukamen.

50

Beispiel 15. Einsatz des BHC-9 Polypeptides in einem ELISA

Es wurde ein Elisa aufgebaut unter Verwendung von Mikrotiterwells, die mit Extrakten aus BHC-9 infizierten Zellen beschichtet waren, und einem anti-human Ig konjugiertem Nachweissystem entsprechend dem Verfahren aus Beispiel 10. Eine Testreihe von Hochrisiko-Seren wurden parallel gegen BHC-7 und BHC-9 getestet und wurden auch durch PKR gemäß dem in Beispiel 13 beschriebenen Verfahren überprüft. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 dargestellt, wobei die positiven Proben unterstrichen sind.

AT 400 724 B

Tabelle 7

	Nummer	PKR	BHC-7	BHC-9
5	1	+	<u>2.09</u>	<u>2.00</u>
	2	+	<u>2.09</u>	<u>2.00</u>
	3	+	<u>1.89</u>	<u>1.37</u>
	4	+	<u>1.57</u>	0.27
10	5	+	<u>1.26</u>	<u>2.00</u>
	6	+	<u>0.91</u>	<u>2.00</u>
	7	-	<u>0.90</u>	0.51
	8	+	<u>0.84</u>	<u>1.19</u>
	9	-	<u>0.53</u>	0.43
15	10	-	<u>0.45</u>	<u>2.00</u>
	11	+	0.37	<u>1.07</u>
	12	-	0.32	<u>2.00</u>
	13	-	0.23	0.30
	14	-	0.15	<u>0.43</u>
20	15	+	0.16	<u>0.76</u>
	16	-	0.09	<u>1.74</u>
	17	-	0.27	<u>2.00</u>
	18	-	0.15	<u>2.00</u>
	19	-	0.12	<u>2.00</u>
25	20	-	0.08	0.05
	Nachweisgrenze		0.27	0.29

50 % der 20 Proben waren eindeutig BHC-7 positiv, wohingegen 85 % BHC-9 positiv waren. Zwei Proben (11 & 12), die ganz knapp BHC-7 positiv waren, waren eindeutig BHC-9 positiv und einige der Proben an der BHC-7 Nachweisgrenze oder darunter waren BHC-9 positiv. Zusätzlich waren zwei Proben (11 & 15) PKR positiv, die Grenzfälle waren, oder BHC-7 negativ aber BHC-9 positiv. Insgesamt fanden sich nur zwei Proben (13 & 20), die negativ auf beide Polypeptide und PKR waren.

Beispiel 16Isolierung überlappendender PT-NANBH DNA-Sequenzen in existierenden Klonen

Das immunologische Screening der cDNA-Expressionsbanken, wie in den Beispielen 3, 4 und 14 beschrieben, kann nur solche Klone identifizieren, die eine immunoreaktive Region des Virus enthalten. Eine andere Möglichkeit zur Produktion von PT-NANBH-spezifischer Klone ist die Verwendung von PKR zur Amplifikation von cDNA-Molekülen, die existierende Klone überlappen. Es können Sets von Primer hergestellt werden, bei denen ein Partner eines Paars innerhalb bestehender klonierter Sequenzen liegt und der andere außerhalb liegt; dieses Verfahren kann auch auf "nested" Paaren von Primern angewandt werden.

Die in Beispiel 1 beschriebene cDNA wurde durch PKR amplifiziert, mit entweder einem einzelnen oder einem "nested" Paar von Primern unter Einsatz der Reaktionsbedingungen wie in Beispiel 13 beschrieben. Dieses Verfahren lässt sich durch Verwendung der folgenden Primerpaare darstellen; d164 (SEQ ID No. 12) und d137 (SEQ ID No. 13); d136 (SEQ ID Nr. 14) und d155 (SEQ ID Nr. 15); d156 (SEQ ID Nr. 16) und d92 (SEQ ID Nr. 17). Ein Partner eines jeden Paars ist bestimmt, den Primevorgang innerhalb der existierenden klonierten Sequenzen zu bewerkstelligen (d137 und d136 innerhalb der 5'- und 3'-Enden des BR11, d92 am 5'-Ende von JG3). Die anderen Primer basieren auf Sequenzen, wie sie für andere PT-NANBH Agenzien erhältlich sind. Primer d164 entspricht den Basen 10 bis 31 aus Figur 2 in Okamoto et al., Japan J. Exp. Med., 1990, 60, 167-177. Die Primer d155 und d156 entsprechen den Positionen 462 bis 489 und 3315 bis 3337 in Figur 47 der europäischen Patentanmeldung 88 310 922.5. Um eine EcoR1 Erkennungsstelle nahe dem 5'-Ende des Primers einzuführen, wurde eine oder mehrere Nucleotidsubstitutionen gemacht, ausgenommen für d164, wo eine Bg12 Erkennungsstelle eingeführt wurde; diese Veränderungen ermöglichen die anschließende Klonierung des amplifizierten Produkts.

PKR-Produkte wurden mit geeigneten Restriktionsenzym(en) verdaut, durch Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt, die Banden mit der erwarteten Größe wurden ausgeschnitten und sowohl in Plasmid wie auch

bakteriophagen Vektoren wie in Beispiel 5 beschrieben kloniert. Die Sequenzen der amplifizierten DNAs 164/137 (SEQ ID Nr. 18), 136/155 (SEQ ID Nr. 19) und 156/92 (SEQ ID Nr. 20) sind in der Sequenzaufstellung dargestellt. Diese neuen Sequenzen übersteigen die Größe des PT-NANBH Genoms, wie es durch 5 Immunoscreening (SEQ ID Nr. 3, 4 & 5) erhalten wurde. Diese Sequenzen zusammen mit anderen, die innerhalb der bereits beschriebenen Regionen liegen, können zu einer zusammenhängenden Sequenz am 5'-Ende (SEQ ID Nr. 21) und am 3'-Ende (SEQ ID Nr. 22) des PT-NANBH Genoms geknüpft werden.

Beispiel 17

10 Fusion verschiedener PT-NANBH Antigene in ein einzelnes rekombinantes Polypeptid

Die Daten aus Tabelle 7 deuten darauf hin, daß es einige Proben (z.B. Nr. 4) gibt, die nur BHC-7 positiv sind, während mehr Serumproben als Antikörper-positiv bei Verwendung von BHC-9 als Zielantigen (17/20) statt BHC-7 (10/20) nachgewiesen wurden. Diese Zahlen werden durch umfangreichere Probentests 15 bestätigt. Es wurde daher entsprechend ein Fusionskonstrukt unter Verwendung der Sequenzen von BHC-7 und BHC-9 abgeleitet.

Sequenzen aus BHC-7 und BHC-9 können nach einer Vielzahl von Methoden verknüpft werden; jede 20 Sequenz kann an den aminoterminalen Enden des erhaltenen Fusionsprodukts positioniert werden, und die Art der Bindungssequenzen kann ebenfalls variiert werden. Fig. 2 beschreibt zwei mögliche Wege, nach denen die Sequenzen verknüpft werden können.

Geeignete Restriktionsfragmente, die passende Restriktionsenzym-Schnittstellen und Linkersequenzen tragen, wurden entweder mittels PCR unter Verwendung spezifischer Primer oder durch Restriktionsenzym-Verdauung bestehender Plasmide erzeugt. Der Transfervektor DX143 besteht aus einem BamH1/PstI 25 Fragment von DX122 (Fig. 1; die Pst Schnittstelle ist an der Position 1504 JG2, SEQ ID Nr. 3) verknüpft mit dem 5'-Ende der gesamten kodierenden Region von BR11 (SEQ ID Nr. 7), die als ein PstI/BamH1 Fragment unter Verwendung der Primer d24 (SEQ ID Nr. 23) und d126 (SEQ ID Nr. 24) amplifiziert wurde; die Verknüpfungsregion besteht aus sechs Aminosäuren abgeleitet vom d126 Primer und restlichen 30 bakteriophagen lambda Sequenzen. Der Transfervektor DX136 unterscheidet sich von DX143 darin, daß das BR11 Fragment unter Verwendung von d24 (SEQ ID Nr. 23) und d132 (SEQ ID Nr. 25) erzeugt wurde und daher die Verknüpfungsregion fünf Lysinreste enthält. Diese Transfervektoren wurden verwendet zur Kotransfektion von SF9 Insektenzellen in einer Kultur mit AcNPV DNA und es wurden gereinigte Plaque Stocklösung von rekombinanten Baculoviren, wie in Beispiel 7 beschrieben, hergestellt. BHC-10 wurde erzeugt als Ergebnis der Transfektion mit DX143; BHC-11 war das Ergebnis der Transfektion mit DX136.

Die durch diese zwei Viren exprimierten rekombinanten Polypeptide wurden durch SDS-PAGE und 35 Western Blotting analysiert. BHC-10 produzierte ein Polypeptid mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 118 kDa. BHC-11 produzierte ein Polypeptid mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 96 kDa. Beide Polypeptide reagierten mit Seren, die bekannterweise im ELISA nur mit BHC-7 (z.B. Serum A) oder nur mit BHC-9 (Serum B64, Beispiel 14) reagierten. Die beiden Polypeptide unterscheiden sich nur in der Verknüpfungssequenz, was einen Einfluß entweder auf ihre Mobilität während der SDS-PAGE oder ihre 40 Prozessierung in den infizierten Zellen hat.

Beispiel 18

Einsatz von PT-NANBH Fusionantigenen in einem ELISA

45 Es wurde ein ELISA aufgebaut unter Verwendung von Mikrotiterwells, die mit Extrakten BHC-9-infizierter Zellen beschichtet waren, und einem anti-human Ig Konjugat nach dem Verfahren aus Beispiel 10. Tabelle 8 enthält die Daten aus dem Vergleich der zwei Fusionierungsprodukte mit den anderen PT-NANBH rekombinanten Antigenen BHC-7 und BHC-9 wie auch dem HCV rekombinanten Protein C-100-3 (Ortho 50 Diagnostic Systems, Raritan, New Jersey). Diese Seren sind zu Gruppen zusammengefaßt nach ihrer Reaktion mit BHC-7, BHC-9 und C-100-3. Seren der Gruppe I reagieren stark mit allen drei Antigenen; Seren der Gruppe II reagieren stark nur mit BHC-7; Seren der Gruppe III zeigen eine starke Reaktion nur mit BHC-9 und Seren der Gruppe IV reagieren stark nur mit zwei der drei Antigene.

AT 400 724 B

Tabelle 8

SEREN	BHC-7	BHC-9	C-100-3	BHC-10	BHC-11
Gruppe I					
AH	>2.0	>2.0	>2.0	>2.0	>2.0
AC	>2.0	>2.0	>2.0	>2.0	>2.0
57	>2.0	>2.0	>2.0	>2.0	>2.0
77	>2.0	>2.0	>2.0	>2.0	>2.0
84	1.4	>2.0	>2.0	>2.0	>2.0
Gruppe II					
805-6	>2.0	0.261	0.1	1.78	+*
805-17	>2.0	0.181	0.12	1.37	+*
805-149	>2.0	0.651	0.084	1.57	+ +*
Gruppe III					
JS	0.32	>2.0	0.17	>2.0	>2.0
805-57	0.069	1.403	0.25	1.9	+*
805-82	0.116	1.272	0.4	1.85	+ +*
805-94	0.353	1.675	0.2	>2.0	+*
PJ1	0.27	>2.0	0.2	>2.0	1.85
Gruppe IV					
A	>2.0	0.14	>2.0	>2.0	>2.0
KT	1.57	0.27	>2.0	>2.0	>2.0
Le	0.152	>2.0	>2.0	>2.0	>2.0
PJ5	0.123	>2.0	>2.0	>2.0	>2.0
303-923	>2.0	0.9	0.37	1.9	+*
303-939	>2.0	1.55	0.268	2.0	+*

* Diese Proben sind nur durch Western Blotting auf BHC-11 getestet worden.

Diese Werte zeigen, daß sowohl BHC-10 und BHC-11 eine vergleichbare Reaktivität mit diesen Seren zeigen und, was sehr wichtig ist, daß beide Antigenaktivitäten in den Fusionsprodukten offensichtlich erhalten blieben. Alle Seren der Gruppen II und III, die jeweils nur mit BHC-7 oder BHC-9 reagieren, zeigen eine deutliche Reaktion mit den Fusionsprodukten. Zusätzlich findet sich der Hinweis, daß die beiden Antigene zusammen einen empfindlicheren Test ermöglichen. Zum Beispiel ergibt die Probe KT OD-Werte von 1,57 und 0,27 mit BHC-7 und BHC-9, wohingegen bei den Fusionsprodukten der OD-Wert > 2,0 ist.

40

45

50

55

Sequenzprotokoll

5 SEQ ID Nr. 1

ART DER SEQUENZ: Nucleotid

SEQUENZLÄNGE: 21 Basen

10

STRANGFORM: Einzelstrang

TOPOLOGIE: linear

15

ART DES MOLEKÜLS: synthetische DNA

URSPRÜNGLICHER HERKUNFTSORGANISMUS: Bakteriophage lambda gt11

20

UNMITTELBARE EXPERIMENTELLE HERKUNFT: Oligonucleotid-Synthesizer; oligo d19

25

MERKMALE: von 1 bis 21 Basen homolog zum stromaufwärts gelegenen Teil des lacZ Gens, der die ECOR1 Schnittstelle im Bakteriophagen lambda gt11 flankiert

30

EIGENSCHAFTEN: startet DNA-Synthese vom Phagenvektor in cDNA, eingefügt an der EcoR1 Schnittstelle

GGTGGCGACG ACTCCTGGAG C

21

35

40

45

50

55

AT 400 724 B

SEQ ID Nr. 2

ART DER SEQUENZ: Nucleotid

5 SEQUENZLÄNGE: 21 Basen

STRANGFORM: Einzelstrang

10 TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: synthetische DNA

15 URSPRÜNGLICHER HERKUNFTSORGANISMUS: Bakteriophage lambda gt11

UNMITTELBARE EXPERIMENTELLE HERKUNFT: Oligonucleotid-Synthesizer; oligo
d20

20 MERkmale: von 1 bis 21 Basen homolog zum stromabwärts gelegenen Teil des
lacZ Gens, der die EcoR1 Schnittstelle im Bakteriophagen lambda gt11
flankiert

25 EIGENSCHAFTEN: startet DNA-Synthese vom Phagenvektor in cDNA, eingefügt
an der EcoR1 Schnittstelle

30 TTGACACCAAG ACCAACTGGT A

21

35

40

45

50

55

AT 400 724 B

SEQ ID Nr. 3

ART DER SEQUENZ: Nucleotid mit entsprechendem Protein

5

SEQUENZLÄNGE: 1770 Basenpaare

STRANGFORM: Einzelstrang

10

TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: cDNA zu Genom-RNA

15

URSPRÜNGLICHER HERKUNFTSORGANISMUS: Mensch; für posttransfusionale non-A,
non-B-Hepatitis infektiöses Serum

20

UNMITTELBARE EXPERIMENTELLE HERKUNFT: Klon JG2 aus der cDNA-Bank in
lambda gt11

MERKMALE: von 1 bis 1770 BP Teil des PT-NANBH-Polyproteins

25

EIGENSCHAFTEN: kodiert wahrscheinlich virale nicht-strukturelle Proteine

30

CAA AAT GAC TTC CCA GAC GCT GAC CTC ATC GAG GCC AAC CTC CTG TGG 48

Gln Asn Asp Phe Pro Asp Ala Asp Leu Ile Glu Ala Asn Leu Leu Trp

5

10

15

35

CGG CAT GAG ATG GGC GGG GAC ATT ACC CGC GTG GAG TCA GAG AAC AAG 96

Arg His Glu Met Gly Gly Asp Ile Thr Arg Val Glu Ser Glu Asn Lys

20

25

30

40

GTA GTA ATC CTG GAC TCT TTC GAC CCG CTC CGA GCG GAG GAG GAT GAG 144

Val Val Ile Leu Asp Ser Phe Asp Pro Leu Arg Ala Glu Glu Asp Glu

35

40

45

45

CGG GAA GTG TCC GTC CCG GCG GAG ATC CTG CGG AAA TCC AAG AAA TTC 192

Arg Glu Val Ser Val Pro Ala Glu Ile Leu Arg Lys Ser Lys Lys Phe

50

55

60

55

AT 400 724 B

5	CCA CCA CCG ATG CCC GCA TGG GCA CGC CCG GAT TAC AAC CCT CCG CTG Pro Pro Ala Met Pro Ala Trp Ala Arg Pro Asp Tyr Asn Pro Pro Leu 65	70	75	80	240
10	CTG GAG TCC TGG AAG GCC CCG GAC TAC GTC CCT CCA GTG GTA CAT GGG Leu Glu Ser Trp Lys Ala Pro Asp Tyr Val Pro Pro Val Val His Gly 85	90		95	288
15	TGC CCA CTG CCA CCT ACT AAG ACC CCT CCT ATA CCA CCT CCA CGG AGA Cys Pro Leu Pro Pro Thr Lys Thr Pro Pro Ile Pro Pro Pro Arg Arg 100	105		110	336
20	AAG AGG ACA GTT GTT CTG ACA GAA TCC ACC GTG TCT TCT GCC CTG GCG Lys Arg Thr Val Val Leu Thr Glu Ser Thr Val Ser Ser Ala Leu Ala 115	120		125	384
25	GAG CTT GCC ACA AAG GCT TTT GGT AGC TCC GGA CCG TCG GCC GTC GAC Glu Leu Ala Thr Lys Ala Phe Gly Ser Ser Gly Pro Ser Ala Val Asp 130	135	140		432
30	AGC GGC ACG GCA ACC GCC CCT CCT GAC CAA TCC TCC GAC GAC GGC GGA Ser Gly Thr Ala Thr Ala Pro Pro Asp Gln Ser Ser Asp Asp Gly Gly 145	150	155	160	480
35	GCA GGA TCT GAC GTT GAG TCG TAT TCC TCC ATG CCC CCC CTT GAG GGG Ala Gly Ser Asp Val Glu Ser Tyr Ser Ser Met Pro Pro Leu Glu Gly 165	170		175	528
40	GAG CCG GGG GAC CCC GAT CTC AGC GAC GGG TCT TGG TCT ACC GTG AGT Glu Pro Gly Asp Pro Asp Leu Ser Asp Gly Ser Trp Ser Thr Val Ser 180	185	190		576
45	GAG GAG GCC GGT GAG GAC GTC GTC TGC TCG ATG TCC TAC ACA TGG Glu Glu Ala Gly Glu Asp Val Val Cys Cys Ser Met Ser Tyr Thr Trp 195	200	205		624

AT 400 724 B

ACA	GCC	GCT	CTG	ATC	ACG	CCA	TGC	GCT	GCG	GAG	GAA	AGC	AAG	CTG	CCC	672
Thr	Gly	Ala	Leu	Ile	Thr	Pro	Cys	Ala	Ala	Glu	Glu	Ser	Lys	Leu	Pro	
5		210			215					220						
ATC	AAC	GCG	TTG	AGC	AAC	TCT	TTG	CTG	CGT	CAC	CAC	AAC	ATG	GTC	TAC	720
Ile	Asn	Ala	Leu	Ser	Asn	Ser	Leu	Leu	Arg	His	His	Asn	Met	Val	Tyr	
10		225			230				235			240				
GCT	ACC	ACA	TCC	CGC	AGC	GCA	AGC	CAG	CGG	CAG	AAG	AAG	GTC	ACC	TTT	768
Ala	Thr	Thr	Ser	Arg	Ser	Ala	Ser	Gln	Arg	Gln	Lys	Lys	Val	Thr	Phe	
15				245					250			255				
GAC	AGA	CTG	CAA	ATC	CTG	GAC	GAT	CAC	TAC	CAG	GAC	CTG	CTC	AAG	GAG	816
Asp	Arg	Leu	Gln	Ile	Leu	Asp	Asp	His	Tyr	Gln	Asp	Val	Leu	Lys	Glu	
20				260				265			270					
ATG	AAG	GCG	AAG	GCG	TCC	ACA	GTT	AAG	GCT	AAG	CTT	CTA	TCA	GTA	GAG	864
Met	Lys	Ala	Lys	Ala	Ser	Thr	Val	Lys	Ala	Lys	Leu	Leu	Ser	Val	Glu	
25				275			280			285						
GAA	GCC	TGC	AAG	CTG	ACG	CCC	CCA	CAT	TCG	GCC	AAA	TCT	AAA	TTT	GGC	912
Glu	Ala	Cys	Lys	Leu	Thr	Pro	Pro	His	Ser	Ala	Lys	Ser	Lys	Phe	Gly	
30				290			295			300						
TAT	GGG	GCA	AAG	GAC	GTC	CGG	AAC	CTA	TCC	AGC	AAG	GCC	ATT	AAC	CAC	960
Tyr	Gly	Ala	Lys	Asp	Val	Arg	Asn	Leu	Ser	Ser	Lys	Ala	Ile	Asn	His	
35				305		310				315			320			
ATC	CGC	TCC	GTG	TCG	GAG	GAC	TTG	TTG	GAA	GAC	ACT	GAA	ACA	CCA	ATT	1008
Ile	Arg	Ser	Val	Trp	Glu	Asp	Leu	Leu	Glu	Asp	Thr	Glu	Thr	Pro	Ile	
40					325			330			335					
GAC	ACC	ACC	ATC	ATG	GCA	AAA	AAT	GAG	GTT	TTC	TGC	GTC	CAA	CCA	GAG	1056
Asp	Thr	Thr	Ile	Met	Ala	Lys	Asn	Glu	Val	Phe	Cys	Val	Gln	Pro	Glu	
45					340			345			350					

AT 400 724 B

	AGA GGA GGC CGC AAG CCA GCT CGC CTT ATC GTG TTC CCA GAC TTG GGG		1104
	Arg Gly Gly Arg Lys Pro Ala Arg Leu Ile Val Phe Pro Asp Leu Gly		
5	355	360	365
	GTC CGT GTG TGC GAG AAA ATG GCC CTC TAT GAC GTG GTC TCC ACC CTC		1152
10	Val Arg Val Cys Glu Lys Met Ala Leu Tyr Asp Val Val Ser Thr Leu		
	370	375	380
	CCT CAG GCT GTG ATG GGC TCC TCG TAC GGA TTC CAG TAT TCT CCT GGA		1200
15	Pro Gln Ala Val Met Gly Ser Ser Tyr Gly Phe Gln Tyr Ser Pro Gly		
	385	390	395
			400
20	CAG CGG GTC GAG TTC CTG GTG AAC GCC TGG AAA TCA AAG AAG ACC CCT		1248
	Gln Arg Val Glu Phe Leu Val Asn Ala Trp Lys Ser Lys Lys Thr Pro		
	405	410	415
25	ATG GGC TTT GCA TAT GAC ACC CGC TGT TTT GAC TCA ACA GTC ACT GAG		1296
	Met Gly Phe Ala Tyr Asp Thr Arg Cys Phe Asp Ser Thr Val Thr Glu		
	420	425	430
30	AAT GAC ATC CGT GTA GAG GAG TCA ATT TAT CAA TGT TGT GAC TTG GCC		1344
	Asn Asp Ile Arg Val Glu Glu Ser Ile Tyr Gln Cys Cys Asp Leu Ala		
	435	440	445
35	CCC GAA GCC AGA CAG GCC ATA AGG TCG CTC ACA GAG CGG CTT TAT ATC		1392
	Pro Glu Ala Arg Gln Ala Ile Arg Ser Leu Thr Glu Arg Leu Tyr Ile		
	450	455	460
40	GGG GGT CCC CTG ACT AAT TCA AAA GGG CAG AAC TGC CGC TAT CGC CGG		1440
	Gly Gly Pro Leu Thr Asn Ser Lys Gly Gln Asn Cys Gly Tyr Arg Arg		
	465	470	475
			480
45	TGC CGC GCG AGC GGC GTG CTG ACG ACT AGC TGC GGT AAT ACC CTC ACA		1488
	Cys Arg Ala Ser Gly Val Leu Thr Thr Ser Cys Gly Asn Thr Leu Thr		
	485	490	495

AT 400 724 B

TGT TAC TTG AAG GCC TCT GCA GCC TGT CGA GCT GCA AAG CTC CAG GAC 1536
Cys Tyr Leu Lys Ala Ser Ala Ala Cys Arg Ala Ala Lys Leu Gln Asp
5 500 505 510

TGC ACG ATG CTC GTG TGC GGA GAC GGC CTT GTC GTT ATC TCT GAG AGC 1584
Cys Thr Met Leu Val Cys Gly Asp Asp Leu Val Val Ile Cys Glu Ser
10 515 520 525

GCG GGA ACC CAG GAG GAC GCG GCG AGC CTA CGA GTC TTC ACG GAG GCT 1632
15 Ala Gly Thr Gln Glu Asp Ala Ala Ser Leu Arg Val Phe Thr Glu Ala
530 535 540

20 ATG ACT AGG TAC TCT GCC CCC CCC GGG GAC CCG CCC CAA CCA GAA TAC 1680
Met Thr Arg Tyr Ser Ala Pro Pro Gly Asp Pro Pro Gln Pro Glu Tyr
545 550 555 560

25 GAC CTG GAG TTG ATA ACA TCA TGC TCC TCC AAT GTG TCG GTC GCG CAC 1728
Asp Leu Glu Leu Ile Thr Ser Cys Ser Ser Asn Val Ser Val Ala His
565 570 575

30 GAT GCA TCT GGC AAA AGG GTA TAC TAC CTC ACC CGT GAC CCG 1770
Asp Ala Ser Gly Lys Arg Val Tyr Tyr Leu Thr Arg Asp Pro
35 580 585 590

40

45

50

55

AT 400 724 B

SEQ ID Nr. 4

ART DER SEQUENZ: Nucleotid mit entsprechendem Protein

5 SEQUENZLÄNGE: 1035 Basenpaare

STRANGFORM: Einzelstrang

10 TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: cDNA zu Genom-RNA

15 URSPRÜNGLICHER HERKUNFTSORGANISMUS: Mensch; für posttransfusionale non-A, non-B-Hepatitis infektiöses Serum

UNMITTELBARE EXPERIMENTELLE HERKUNFT: Klon JG3 aus der cDNA-Bank in
lambda gt11

20 MERKMALE: von 1 bis 1035 BP Teil des PT-NANBH-Polyproteins

25 EIGENSCHAFTEN: kodiert wahrscheinlich virale nicht-strukturelle Proteine

ACA GAA GTG GAT GGG GTG CGG CTG CAC AGG TAC GCT CCG GCG TGC AAA 48
30 Thr Glu Val Asp Gly Val Arg Leu His Arg Tyr Ala Pro Ala Cys Lys
5 10 15

CCT CTC CTA CGG GAG GAG GTC ACA TTC CAG GTC GGG CTC AAC CAA TAC 96
35 Pro Leu Leu Arg Glu Glu Val Thr Phe Gln Val Gly Leu Asn Gln Tyr
20 25 30

40 CTG GTT GGG TCG CAG CTC CCA TGC GAG CCC GAA CCG GAT GTA GCA GTG 144
Leu Val Gly Ser Gln Leu Pro Cys Glu Pro Glu Pro Asp Val Ala Val
35 40 45

45 CTC ACT TCC ATG CTC ACC GAC CCC TCC CAC ATC ACA GCA GAG ACG GCT 192
Leu Thr Ser Met Leu Thr Asp Pro Ser His Ile Thr Ala Glu Thr Ala
50 55 60

50

55

AT 400 724 B

	AAG CGC AGG CTG GCC AGG GGG TCT CCC CCC TCC TTG GCC AGC TCT TCA	240		
	Lys Arg Arg Leu Ala Arg Gly Ser Pro Pro Ser Leu Ala Ser Ser Ser			
5	65	70	75	80
	CCT AGC CAG TTG TCT GGCG CCT TCC TCG AAG GCG ACA TAC ATT ACC CAA	288		
	Ala Ser Gln Leu Ser Gly Pro Ser Ser Lys Ala Thr Tyr Ile Thr Gln			
10	85	90	95	
	AAT GAC TTC CCA GAC GCT GAC CTC ATC GAG GCC AAC CTC CTG TGG CGG	336		
	Asn Asp Phe Pro Asp Ala Asp Leu Ile Glu Ala Asn Leu Leu Trp Arg			
15	100	105	110	
	CAT GAG ATG GGC GGG GAC ATT ACC CGC GTG GAG TCA GAG AAC AAG GTA	384		
	His Glu Met Gly Gly Asp Ile Thr Arg Val Glu Ser Glu Asn Lys Val			
20	115	120	125	
	GTA ATC CTG GAC TCT TTC GAC CCG CTC CGA GCG GAG GAG GAT GAG CGG	432		
	Val Ile Leu Asp Ser Phe Asp Pro Leu Arg Ala Glu Glu Asp Glu Arg			
25	130	135	140	
	GAA GTG TCC GTC CCG GCG GAG ATC CTG CGG AAA TCC AAG AAA TTC CCA	480		
	Glu Val Ser Val Pro Ala Glu Ile Leu Arg Lys Ser Lys Lys Phe Pro			
30	145	150	155	160
	CCA GCG ATG CCC GCA TGG GCA CGC CCG GAT TAC AAC CCT CCG CTG CTG	528		
	Pro Ala Met Pro Ala Trp Ala Arg Pro Asp Tyr Asn Pro Pro Leu Leu			
35	165	170	175	
	GAG TCC TCG AAG CCC CCG GAC TAC GTC CCT CCA GTG GTA CAT GGG TGC	576		
	Glu Ser Trp Lys Ala Pro Asp Tyr Val Pro Pro Val Val His Gly Cys			
40	180	185	190	
	CCA CTG CCA CCT ACT AAG ACC CCT CCT ATA CCA CCT CCA CGG AGA AAG	624		
	Pro Leu Pro Pro Thr Lys Thr Pro Pro Ile Pro Pro Pro Arg Arg Lys			
45	195	200	205	

AT 400 724 B

	AGG ACA GTT GTT CTG ACA GAA TCC ACC GTG TCT TCT GCC CTG GCG GAG	672		
	Arg Thr Val Val Leu Thr Glu Ser Thr Val Ser Ser Ala Leu Ala Glu			
5	210	215	220	
	CTT GCC ACA AAG GCT TTT GGT AGC TCC GGA CCG TCG CCC GTC GAC AGC	720		
	Leu Ala Thr Lys Ala Phe Gly Ser Ser Gly Pro Ser Ala Val Asp Ser			
10	225	230	235	240
	GCC ACG GCA ACC GCC CCT CCT GAC CAA TCC TCC GAC GAC GGC GGA GCA	768		
	Gly Thr Ala Thr Ala Pro Pro Asp Gln Ser Ser Asp Asp Gly Gly Ala			
15	245	250	255	
	GGA TCT GAC GTT GAG TCG TAT TCC TCC ATG CCC CCC CTT GAG GGG GAG	816		
	Gly Ser Asp Val Glu Ser Tyr Ser Ser Met Pro Pro Leu Glu Gly Glu			
20	260	265	270	
	CCG GGG GAC CCC GAT CTC AGC GAC GGG TCT TGG TCT ACC GTG AGT GAG	864		
	Pro Gly Asp Pro Asp Leu Ser Asp Gly Ser Trp Ser Thr Val Ser Glu			
25	275	280	285	
	GAG GCC GGT GAG GAC GTC GTC TGC TGC TCG ATG TCC TAC ACA TGG ACA	912		
	Glu Ala Gly Glu Asp Val Val Cys Cys Ser Met Ser Tyr Thr Trp Thr			
30	290	295	300	
	GGC GCT CTG ATC ACG CCA TGC GCT GCG GAG GAA AGC AAG CTG CCC ATC	960		
	Gly Ala Leu Ile Thr Pro Cys Ala Ala Glu Glu Ser Lys Leu Pro Ile			
35	305	310	315	320
	AAC GCG TTG AGC AAC TCT TTG CTG CGT CAC CAC AAC ATG GTC TAC GCT	1008		
	Asn Ala Leu Ser Asn Ser Leu Leu Arg His His Asn Met Val Tyr Ala			
40	325	330	335	
	ACC ACA TCC CGC AGC GCA AGC CAG CGG	1035		
	Thr Thr Ser Arg Ser Ala Ser Gln Arg			
45	340	345		

AT 400 724 B

SEQ ID Nr. 5

ART DER SEQUENZ: Nucleotid mit entsprechendem Protein

5 SEQUENZLÄNGE: 834 Basenpaare

STRANGFORM: Einzelstrang

10 TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: cDNA zu Genom-RNA

15 URSPRÜNGLICHER HERKUNFTSORGANISMUS: Mensch; für posttransfusionale non-A, non-B-Hepatitis infektiöses Serum

UNMITTELBARE EXPERIMENTELLE HERKUNFT: Klon BR11 aus der cDNA-Bank in lambda gt11

20

MERKMALE: von 1 bis 834 BP Teil des PT-NANBH-Polyproteins

25

EIGENSCHAFTEN: kodiert wahrscheinlich virale Strukturproteine

AGA AAA ACC AAA CGT AAC ACC AAC CTC CGC CCA CAG GAC GTC AGG TTC 48
30 Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Asn Leu Arg Pro Gln Asp Val Arg Phe
5 10 15

CCG GGC GGT GGT CAG ATC GTT GGT GGA GTT TAC CTG TTG CCG CGC AGG 96
35 Pro Gly Gly Gln Ile Val Gly Val Tyr Leu Leu Pro Arg Arg
20 25 30

GGC CCC AGG TTG GGT GTG CGC GCG ACT AGG AAG ACT TCC GAG CGG TCG 144
40 Gly Pro Arg Leu Gly Val Arg Ala Thr Arg Lys Thr Ser Glu Arg Ser
35 40 45

45 CAA CCT CGT GGA AGG CGA CAA CCT ATC CCC AAG GCT CGC CAG CCC GAG 192
Gln Pro Arg Gly Arg Arg Gln Pro Ile Pro Lys Ala Arg Gln Pro Glu
50 55 60

50

55

AT 400 724 B

5	GCC AGG CCC TGG GCT CAG CCC GGG TAC CCT TGG CCC CTC TAT GGC AAC	240
	Gly Arg Ala Trp Ala Gln Pro Gly Tyr Pro Trp Pro Leu Tyr Gly Asn	
	65 70 75 80	
10	GAG GGC ATG GGG TGG GCA GGA TGG CTC CTG TCA CCC CGT GGC TCC CGG	288
	Glu Gly Met Gly Trp Ala Gly Trp Leu Leu Ser Pro Arg Gly Ser Arg	
	85 90 95	
15	CCT AGT TGG GGC CCC ACT GAC CCC CGG CGT AGG TCG CGT AAT TTG GGT	336
	Pro Ser Trp Gly Pro Thr Asp Pro Arg Arg Ser Arg Asn Leu Gly	
	100 105 110	
20	AAA GTC ATC GAT ACC CTC ACA TGC GGC TTC GCC GAC TCT CAT GGG GTA	384
	Lys Val Ile Asp Thr Leu Thr Cys Gly Phe Ala Asp Ser His Gly Val	
	115 120 125	
25	CAT TCC GCT CGT CGG CGC TCC CTT AGG GGC GCT GCC AGG GCC CTG GCG	432
	His Ser Ala Arg Arg Ser Leu Arg Gly Ala Ala Arg Ala Leu Ala	
	130 135 140	
30	CAT GGC GTC CGG GTT CTG GAG GAC GGC GTG AAC TAT GCA ACA GGG AAT	480
	His Gly Val Arg Val Leu Glu Asp Gly Val Asn Tyr Ala Thr Gly Asn	
	145 150 155 160	
35	TTA CCC GGT TGC TCT TTC TCT ATC TTC CTC TTG GCT TTG CTG TCC TGT	528
	Leu Pro Gly Cys Ser Phe Ser Ile Phe Leu Leu Ala Leu Leu Ser Cys	
	165 170 175	
40	TTG ACC ATT CCA GCT TCC GCT TAT GAA GTG CGC AAC GTG TCC GGG ATC	576
	Leu Thr Ile Pro Ala Ser Ala Tyr Glu Val Arg Asn Val Ser Gly Ile	
	180 185 190	
45	TAC CAT GTC ACG AAC GAT TGC TCC AAC TCA AGC ATC GTG TAC GAG ACA	624
	Tyr His Val Thr Asn Asp Cys Ser Asn Ser Ser Ile Val Tyr Glu Thr	
	195 200 205	

AT 400 724 B

GCG GAC ATG ATC ATG CAC ACC CCC GGG TGT GTG CCC TGT GTC CGG GAG 672
Ala Asp Met Ile Met His Thr Pro Gly Cys Val Pro Cys Val Arg Glu
210 215 220
5

GGT AAT TCC TCC CGC TGC TGG GTA GCG CTC ACT CCC ACG CTC GCG GCC 720
Gly Asn Ser Ser Arg Cys Trp Val Ala Leu Thr Pro Thr Leu Ala Ala
10 225 230 235 240

AAG GAC GCC AGC ATC CCC ACT GCG ACA ATA CGA CGC CAC GTC GAT TTG 768
Lys Asp Ala Ser Ile Pro Thr Ala Thr Ile Arg Arg His Val Asp Leu
15 245 250 255

CTC GTT GGG GCG GCT GCC TTC TCG TCC GCT ATG TAC GTG GGG GAT CTC 816
Leu Val Gly Ala Ala Ala Phe Ser Ser Ala Met Tyr Val Gly Asp Leu
20 260 265 270

TGC GGA TCT GTT TTC CCG 834
Cys Gly Ser Val Phe Pro
25 275

30

35

40

45

50

55

AT 400 724 B

SEQ ID Nr. 6

ART DER SEQUENZ: Nucleotid

5 SEQUENZLÄNGE: 31 Basen

STRANGFORM: Einzelstrang

10 TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: synthetische DNA

15 URSPRÜNGLICHER HERKUNFTSORGANISMUS: Bakteriophage lambda gt11

UNMITTELBARE EXPERIMENTELLE HERKUNFT: Oligonucleotid-Synthesizer; oligo d75

20 MERKMALE: von 4 bis 9 Basen BamH1 Schnittstelle
von 10 bis 31 Basen homolog zum stromaufwärts gelegenen Teil des lacZ
Gens, der die EcoR1 Schnittstelle im Bakteriophagen lambda gt11 flankiert
von 26 bis 31 Basen EcoR1 Schnittstelle

25 EIGENSCHAFTEN: startet DNA-Synthese vom Phagenvektor in cDNA, eingefügt
an der EcoR1 Schnittstelle, und führt eine BamH1 Schnittstelle ein, die
geeignet ist zur nachfolgenden Klonierung in Expressionsvektoren

30

TAAGGGATCCC CCGTCAGTAT CGGCAGGAATT C

31

35

40

45

50

55

AT 400 724 B

SEQ ID Nr. 7

ART DER SEQUENZ: Nucleotid

5 SEQUENZLÄNGE: 30 Basen

STRANGFORM: Einzelstrang

10 TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: synthetische DNA

15 URSPRÜNGLICHER HERKUNFTSORGANISMUS: Bakteriophage lambda gt11

UNMITTELBARE EXPERIMENTELLE HERKUNFT: Oligonucleotid-Synthesizer; oligo d76

20 MERkmale: von 4 bis 9 Basen BamH1 Schnittstelle
von 10 bis 30 Basen homolog zum stromabwärts gelegenen Teil des lacZ
Gens, der die EcoR1 Schnittstelle im Bakteriophagen lambda gt11 flankiert

25 EIGENSCHAFTEN: startet DNA-Synthese vom Phagenvektor in cDNA, eingefügt
an der EcoR1 Schnittstelle, und führt eine BamH1 Schnittstelle ein, die
geeignet ist zur nachfolgenden Klonierung in Expressionsvektoren

30 TATGGATCCG TAGCGACCGG CGCTCAGCTG 30

35

40

45

50

55

AT 400 724 B

SEQ ID Nr. 8

ART DER SEQUENZ: Nucleotid

5 SEQUENZLÄNGE: 19 Basen

STRANGFORM: Einzelstrang

10 TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: synthetische DNA

15 URSPRÜNGLICHER HERKUNFTSORGANISMUS: Mensch; für posttransfusionale non-A,
non-B-Hepatitis infektiöses Serum

20 UNMITTELBARE EXPERIMENTELLE HERKUNFT: Oligonucleotid-Synthesizer; oligo
d94

MERKMALE: von 4 bis 19 Basen homolog zu den Basen 914 bis 932 des
Sinn-Stranges von JG2 (SEQ ID Nr. 3)

25 EIGENSCHAFTEN: startet DNA-Synthese am Negativ-Strang der PT-NANBH Genom
RNA/DNA

30 ATGGGGCAA GGACGTCCG

19

35

40

45

50

55

AT 400 724 B

SEQ ID Nr. 9

ART DER SEQUENZ: Nucleotid

5 SEQUENZLÄNGE: 24 Basen

STRANGFORM: Einzelstrang

10 TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: synthetische DNA

15 URSPRÜNGLICHER HERKUNFTSORGANISMUS: Mensch; für posttransfusionale non-A,
non-B-Hepatitis infektiöses Serum

UNMITTELBARE EXPERIMENTELLE HERKUNFT: Oligonucleotid-Synthesizer; oligo
d95
20

MERKMALE: von 1 bis 24 Basen homolog zu den Basen 1620 bis 1643 des
Antisinn-Stranges von JG2 (SEQ ID Nr. 3)

25 EIGENSCHAFTEN: startet DNA-Synthese am Positiv-Strang der PT-NANBH Genom
RNA/DNA

30 TACCTAGTCA TAGCCTCCGT GAAG

24

35

40

45

50

55

AT 400 724 B

SEQ ID Nr. 10

ART DER SEQUENZ: Nucleotid

5 SEQUENZLÄNGE: 17 Basen

STRANGFORM: Einzelstrang

10 TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: synthetische DNA

15 URSPRÜNGLICHER HERKUNFTSORGANISMUS: Mensch; für posttransfusionale non-A,
non-B-Hepatitis infektiöses Serum

UNMITTELBARE EXPERIMENTELLE HERKUNFT: Oligonucleotid-Synthesizer; oligo N1

20 MERKMALE: von 1 bis 17 Basen homolog zu den Basen 1033 bis 1049 des
Sinn-Stranges von JG2 (SEQ ID Nr. 3)

25 EIGENSCHAFTEN: startet DNA-Synthese am Negativ-Strang der PT-NANBH Genom
RNA/DNA

GAGGTTCCT GCGTCCA

17

30

35

40

45

50

55

AT 400 724 B

SEQ ID Nr. 11

ART DER SEQUENZ: Nucleotid

5 SEQUENZLÄNGE: 17 Basen

STRANGFORM: Einzelstrang

10 TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: synthetische DNA

15 URSPRÜNGLICHER HERKUNFTSORGANISMUS: Mensch; für posttransfusionale non-A, non-B-Hepatitis infektiöses Serum

UNMITTELBARE EXPERIMENTELLE HERKUNFT: Oligonucleotid-Synthesizer; oligo N2

20 MERKMALE: von 1 bis 17 Basen homolog zu den Basen 1421 bis 1437 des Antisinn-Stranges von JG2 (SEQ ID Nr. 3)

25 EIGENSCHAFTEN: startet DNA-Synthese am Positiv-Strang der PT-NANBH Genom RNA/DNA

GCGATAGCCG CAGTTCT

17

30

35

40

45

50

55

AT 400 724 B

SEQ ID Nr. 12

ART DER SEQUENZ: Nucleotid

5

SEQUENZLÄNGE: 22 Basen

STRANGFORM: Einzelstrang

10

TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: synthetische DNA

15

URSPRÜNGLICHER HERKUNFTSORGANISMUS: Mensch; für posttransfusionale non-A,
non-B-Hepatitis infektiöses Serum

20

UNMITTELBARE EXPERIMENTELLE HERKUNFT: Oligonucleotid-Synthesizer; oligo
d164

25

MERKMALE: von 1 bis 22 Basen homolog zu den Basen 10 bis 31 der Sequenz
in Fig. 2 von Okamoto et al., Japan. J. Exp. Med., 1990, 60 167-177, Base
22 geändert von A nach T um Bg12 Erkennungsstelle einzuführen
von 8 bis 13 Basen Bg12 Erkennungsstelle

30

EIGENSCHAFTEN: startet DNA-Synthese am Negativ-Strang der PT-NANBH Genom
RNA/DNA und führt eine Bg12 Schnittstelle ein

CCACCATAGA TCTCTCCCCGT

22

35

40

50

55

AT 400 724 B

SEQ ID Nr. 13

ART DER SEQUENZ: Nucleotid

5 SEQUENZLÄNGE: 30 Basen

STRANGFORM: Einzelstrang

10 TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: synthetische DNA

15 URSPRÜNGLICHER HERKUNFTSORGANISMUS: Mensch; für posttransfusionale non-A, non-B-Hepatitis infektiöses Serum

20 UNMITTELBARE EXPERIMENTELLE HERKUNFT: Oligonucleotid-Synthesizer; oligo d137

25 MERKMALE: von 1 bis 30 Basen homolog zu den Basen 154 bis 183 des Negativ-Stranges von BR11 (SEQ ID Nr. 5); Basen 174, 177 und 178 verändert, um eine EcoR1 Erkennungsstelle einzuführen
von 5 bis 10 Basen EcoR1 Erkennungsstelle

30 EIGENSCHAFTEN: startet DNA-Synthese am Positiv-Strang der PT-NANBH Genom RNA/DNA und führt eine EcoR1 Schnittstelle zur Klonierung ein

GCGAGAATTG GGGATAGGTT GTCGCCTTCC

30

35

40

45

50

55

AT 400 724 B

SEQ ID Nr. 14

ART DER SEQUENZ: Nucleotid

5

SEQUENZLÄNGE: 27 Basen

STRANGFORM: Einzelstrang

10

TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: synthetische DNA

15

URSPRÜNGLICHER HERKUNFTSORGANISMUS: Mensch; für posttransfusionale non-A,
non-B-Hepatitis infektiöses Serum

UNMITTELBARE EXPERIMENTELLE HERKUNFT: Oligonucleotid-Synthesizer; oligo

20

d136

MERKMALE: von 1 bis 27 Basen homolog zu den Basen 672 bis 698 des
Positiv-Stranges von BR11 (SEQ ID Nr. 5); Base 675 geändert zu G, um eine
25 EcoRI Erkennungsstelle einzuführen
von 4 bis 9 Basen EcoRI Erkennungsstelle

EIGENSCHAFTEN: startet DNA-Synthese am Negativ-Strang der PT-NANBH Genom
RNA/DNA und führt eine EcoRI Schnittstelle zur Klonierung ein

GGGAAATTCC TCCCGCTGCT GGGTAGC

27

35

40

45

50

55

AT 400 724 B

SEQ ID Nr. 15

ART DER SEQUENZ: Nucleotid

5 SEQUENZLÄNGE: 28 Basen

STRANGFORM: Einzelstrang

10 TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: synthetische DNA

15 URSPRÜNGLICHER HERKUNFTSORGANISMUS: Schimpanse; für posttransfusionale non-A, non-B-Hepatitis infektiöses Serum

UNMITTELBARE EXPERIMENTELLE HERKUNFT: Oligonucleotid-Synthesizer; oligo d155

20 MERkmale: von 1 bis 28 Basen homolog zu den Basen 462 bis 489 des Negativ-Stranges in Fig. 47, EP-A1-318 216 Basen 483 und 485 geändert, um eine EcoR1 Erkennungsstelle einzuführen von 5 bis 10 Basen EcoR1 Erkennungsstelle
25

EIGENSCHAFTEN: startet DNA-Synthese am Positiv-Strang der PT-NANBH Genom RNA/DNA und führt eine EcoR1 Schnittstelle zur Klonierung ein

30 ACGGGAATTC GACCAGGCAC CTGGGTGT 28

35

40

45

50

55

AT 400 724 B

SEQ ID Nr. 16

ART DER SEQUENZ: Nucleotid

5 SEQUENZLÄNGE: 23 Basen

STRANGFORM: Einzelstrang

10 TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: synthetische DNA

15 URSPRÜNGLICHER HERKUNFTSORGANISMUS: Schimpanse; für posttransfusionale non-A, non-B-Hepatitis infektiöses Serum

20 UNMITTELBARE EXPERIMENTELLE HERKUNFT: Oligonucleotid-Synthesizer; oligo d156

25 MERKMALE: von 1 bis 23 Basen homolog zu den Basen 3315 bis 3337 des Positiv-Stranges in Fig. 47, EP-A1-318 216
Base 3323 geändert zu C, um eine EcoR1 Erkennungsstelle einzuführen von 4 bis 9 Basen EcoR1 Erkennungsstelle

30 EIGENSCHAFTEN: startet DNA-Synthese am Negativ-Strang der PT-NANBH Genom RNA/DNA und führt eine EcoR1 Schnittstelle zur Klonierung ein

CTTGAATTCT GGGAGGGCGT CTT

23

35

40

45

50

55

AT 400 724 B

SEQ ID Nr. 17

ART DER SEQUENZ: Nucleotid

5 SEQUENZLÄNGE: 29 Basen

STRANGFORM: Einzelstrang

10 TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: synthetische DNA

15 URSPRÜNGLICHER HERKUNFTSORGANISMUS: Mensch; für posttransfusionale non-A, non-B-Hepatitis infektiöses Serum

20 UNMITTELBARE EXPERIMENTELLE HERKUNFT: Oligonucleotid-Synthesizer; oligo d92

25 MERKMALE: von 1 bis 29 Basen homolog zu den Basen 36 bis 64 des Negativ-Stranges von JG2 (SEQ ID Nr. 3); Basen 57, 58 und 60 geändert, um eine EcoRI Erkennungsstelle einzuführen
von 5 bis 10 Basen EcoRI Erkennungsstelle

30 EIGENSCHAFTEN: startet DNA-Synthese am Positiv-Strang der PT-NANBH Genom RNA/DNA und führt eine EcoRI Schnittstelle zur Klonierung ein

CGCCGAATTCA TGCCGCCAC AGGAGGTTG

29

35

40

45

50

55

AT 400 724 B

SEQ ID Nr. 18

ART DER SEQUENZ: Nucleotid mit entsprechendem Protein

5 SEQUENZLÄNGE: 504 Basenpaare

STRANGFORM: Einzelstrang

10 TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: cDNA zu Genom-RNA

15 URSPRÜNLICHER HERKUNFTSORGANISMUS: Mensch; für posttransfusionale non-A, non-B-Hepatitis infektiöses Serum

UNMITTELBARE EXPERIMENTELLE HERKUNFT: Klon 164/137

20 MERkmale: von 308 bis 504 BP Anfang des PT-NANBH-Polyproteins

EIGENSCHAFTEN: kodiert wahrscheinlich virale Strukturproteine

25

GATCACTCCC CTGTGAGGAA CTACTGTCTT CACCGAGAAA GCGTCTAGCC ATGGCGTTAG 60
30 TATGAGTGTC GTGCAGCCTC CAGGACCCCC CCTCCCGGGA GAGCCATAGT GGTCTGCGGA 120
ACCGGTGAGT ACACCGGAAT TGCCAGGACG ACCGGGTCTT TTCTTGGATT AACCCGCTCA 180
ATGCCTGGAG ATTGGGGCGT GCCCCCCCAA GACTGCTAGC CGACTAGTGT TGGGTGCCGA 240
AAGGCCTTGT GGTACTGCCT GATAGGGTGC TTGCCAGTGC CCCGGGAGGT CTCGTAGACC 300
35 GTGCACC ATG AGC ACG AAT CCT AAA CCT CAA AGA AAA ACC AAA CGT AAC 349
Met Ser Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn

5 10

40

ACC AAC CGC CGC CCA CAG GAC GTC AAG TTC CCG GGC GGT GGT CAG ATC 397
Thr Asn Pro Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gln Ile
45 15 20 25 30

50

GTT GGT GGA GTT TAC CTG TTG CCG CGC AGG GGC CCC AGG TTG GGT GTG 445
Val Gly Gly Val Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Leu Gly Val
35 40 45

55

AT 400 724 B

CGC GCG ACT AGG AAG ACT TCC GAG CGG TCG CAA CCT CGT GGA AGG CGA 493
Arg Ala Thr Arg Lys Thr Ser Glu Arg Ser Gln Pro Arg Gly Arg Arg

5 50 55 60

CAA CCT ATC CC 504
Gln Pro Ile Pro
10 65

15

20

25

30

35

40

45

50

55

AT 400 724 B

SEQ ID Nr. 19

ART DER SEQUENZ: Nucleotid mit entsprechendem Protein

5 SEQUENZLÄNGE: 1107 Basenpaare

STRANGFORM: Einzelstrang

10 TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: cDNA zu Genom-RNA

15 URSPRÜNGLICHER HERKUNFTSORGANISMUS: Mensch; für posttransfusionale non-A, non-B-Hepatitis infektiöses Serum

UNMITTELBARE EXPERIMENTELLE HERKUNFT: Klon 136/155

20 MERKMALE: von 1 bis 1107 BP Teil des PT-NANBH-Polyproteins

EIGENSCHAFTEN: kodiert wahrscheinlich virale Strukturproteine

25

TCC TCC CGC TGC TGG GTA GCG CTC ACT CCC ACG CTC GCG GCC AAG GAC 48
Ser Ser Arg Cys Trp Val Ala Leu Thr Pro Thr Leu Ala Ala Lys Asp
30 5 10 15

GCC AGC ATC CCC ACT GCG ACA ATA CGA CGC CAC GTC GAT TTG CTC GTT 96
Ala Ser Ile Pro Thr Ala Thr Ile Arg Arg His Val Asp Leu Leu Val
35 20 25 30

GGG GCG GCT GCC TTC TGC TCC GCT ATG TAC GTG GGG GAT CTC TGC GGA 144
Gly Ala Ala Ala Phe Cys Ser Ala Met Tyr Val Gly Asp Leu Cys Gly
40 35 40 45

45 TCT GTT TTC CTC GTC TCT CAG CTG TTC ACC TTC TCG CCT CGC CGA CAT 192
Ser Val Phe Leu Val Ser Gln Leu Phe Thr Phe Ser Pro Arg Arg His
50 55 60

50

55

AT 400 724 B

5	CAG ACG GTA CAG GAC TGC AAT TGT TCA ATC TAT CCC GGC CAC GTC TCA Gln Thr Val Gln Asp Cys Asn Cys Ser Ile Tyr Pro Gly His Val Ser 65	70	75	80	240
10	GCT CAC CGC ATG GCT TGG GAT ATG ATG AAC TGG TCA CCT ACA GCA Gly His Arg Met Ala Trp Asp Met Met Asn Trp Ser Pro Thr Ala 85	90	95		288
15	GCC CTA GTG GTA TCG CAG CTA CTC CGG ATC CCA CAA GCT GTC GTG GAC Ala Leu Val Val Ser Gln Leu Leu Arg Ile Pro Gln Ala Val Val Asp 100	105	110		336
20	ATG GTG GCG GGG GCC CAC TCG GGA GTC CTG GCG GGC CTT GCC TAC TAT Met Val Ala Gly Ala His Trp Gly Val Leu Ala Gly Leu Ala Tyr Tyr 115	120	125		384
25	TCC ATG GTG GGG AAC TGG GCT AAG GTC TTG GTT GTG ATG CTA CTC TTT Ser Met Val Gly Asn Trp Ala Lys Val Leu Val Val Met Leu Leu Phe 130	135	140		432
30	GCC GGC GTT GAC GGG GAA CCT TAC ACG ACA GGG GGG ACA CAC GGC CGC Ala Gly Val Asp Gly Glu Pro Tyr Thr Thr Gly Gly Thr His Gly Arg 145	150	155	160	480
35	GCC GCC CAC GGG CTT ACA TCC CTC TTC ACA CCT GGG CCG GCT CAG AAA Ala Ala His Gly Leu Thr Ser Leu Phe Thr Pro Gly Pro Ala Gln Lys 165	170	175		528
40	ATC CAG CTT GTA AAC ACC AAC GGC AGC TGG CAC ATC AAC AGA ACT GCC Ile Gln Leu Val Asn Thr Asn Gly Ser Trp His Ile Asn Arg Thr Ala 180	185	190		576
45	TTG AAC TGC AAT GAC TCC CTC CAA ACT GGG TTC CTT GCC GCG CTG TTC Leu Asn Cys Asn Asp Ser Leu Gln Thr Gly Phe Leu Ala Ala Leu Phe 195	200	205		624

AT 400 724 B

	TAC ACG CAC AGG TTC AAT GCG TCC GGA TGC TCA GAG CGC ATG GCC AGC	672		
	Tyr Thr His Arg Phe Asn Ala Ser Gly Cys Ser Glu Arg Met Ala Ser			
5	210	215	220	
	TGC CGC CCC ATT GAC CAG TTC GAT CAG GGG TGG GGT CCC ATC ACT TAT	720		
	Cys Arg Pro Ile Asp Gln Phe Asp Gln Gly Trp Gly Pro Ile Thr Tyr			
10	225	230	235	240
	AAT GAG TCC CAC GGC TTG GAC CAG AGG CCC TAT TGC TGG CAC TAC GCA	768		
	Asn Glu Ser His Gly Leu Asp Gln Arg Pro Tyr Cys Trp His Tyr Ala			
15	245	250	255	
	CCT CAA CCG TGT GGT ATC GTG CCC GCG TTG CAG GTG TGT GGC CCA GTG	816		
	Pro Gln Pro Cys Gly Ile Val Pro Ala Leu Gln Val Cys Gly Pro Val			
20	260	265	270	
	TAC TGT TIC ACT CCA AGC CCT GTT GTG GTG GGG ACG ACC GAT CGT TTC	864		
	Tyr Cys Phe Thr Pro Ser Pro Val Val Val Gly Thr Thr Asp Arg Phe			
25	275	280	285	
	GGC GCC CCT ACG TAC AGA TGG GGT GAG AAT GAG ACG GAC GTG CTG CTT	912		
	Gly Ala Pro Thr Tyr Arg Trp Gly Glu Asn Glu Thr Asp Val Leu Leu			
30	290	295	300	
	CTC AAC AAC ACG CGG CCG CCA CGG GGC AAC TGG TTC GGC TGT ACA TGG	960		
	Leu Asn Asn Thr Arg Pro Pro Arg Gly Asn Trp Phe Gly Cys Thr Trp			
35	305	310	315	320
	ATG AAT AGC ACC GGG TTC ACC AAG ACG TGT GGG GGC CCC CCG TGC AAC	1008		
	Met Asn Ser Thr Gly Phe Thr Lys Thr Cys Gly Gly Pro Pro Cys Asn			
40	325	330	335	
	ATC GGG GGG GTC GGC AAC AAC ACT TTG ATC TGC CCC ACG GAC TGC TTC	1056		
	Ile Gly Gly Val Gly Asn Asn Thr Leu Ile Cys Pro Thr Asp Cys Phe			
45	340	345	350	

AT 400 724 B

CGG AAG CAT CCC GAG GCC ACT TAC ACC AAA TGC GGT TCG GGG CCT TGG 1104
Arg Lys His Pro Glu Ala Thr Tyr Thr Lys Cys Gly Ser Gly Pro Trp

355

360

365

5

TTC

1107

10

Leu

15

20

25

30

35

40

45

50

55

AT 400 724 B

SEQ ID Nr. 20

ART DER SEQUENZ: Nucleotid mit entsprechendem Protein

5 SEQUENZLÄNGE: 2043 Basenpaare

STRANGFORM: Einzelstrang

10 TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: cDNA zu Genom-RNA

15 URSPRÜNGLICHER HERKUNFTSORGANISMUS: Mensch; für posttransfusionale non-A, non-B-Hepatitis infektiöses Serum

UNMITTELBARE EXPERIMENTELLE HERKUNFT: Klon 156/92

20 MERkmale: von 1 bis 2043 BP Teil des PT-NANBH-Polyproteins

25 EIGENSCHAFTEN: kodiert wahrscheinlich virale nicht-strukturelle Proteine

30 TGG GAG GGC GTC TTC ACA GCC CTC ACC CAC GTG GAT GCC CAC TTC CTG 48
Trp Glu Gly Val Phe Thr Gly Leu Thr His Val Asp Ala His Phe Leu
5 10 15

35 TCC CAA ACA AAG CAG GCA GGA GAC AAC TTC CCC TAC CTG GTG GCG TAC 96
Ser Gln Thr Lys Gln Ala Gly Asp Asn Phe Pro Tyr Leu Val Ala Tyr
20 25 30

40 CAG GCT ACT GTG TGC GCT AGG GCC CAG GCC CCA CCT CCA TCA TGG GAT 144
Gln Ala Thr Val Cys Ala Arg Ala Gln Ala Pro Pro Pro Ser Trp Asp
35 40 45

45 CAA ATG TGG AAG TGT CTC ATA CGG CTA AAG CCT ACT CTG CGC GGG CCA 192
Gln Met Trp Lys Cys Leu Ile Arg Leu Lys Pro Thr Leu Arg Gly Pro
50 55 60

AT 400 724 B

ACA CCC TTG CTG TAT AGG CTG GGA GCC GTC CAA AAC GAG GTC ACC CTC	240
Thr Pro Leu Leu Tyr Arg Leu Gly Ala Val Gln Asn Glu Val Thr Leu	
5 65 70 75 80	
ACA CAC CCC ATA ACC AAA TTC ATC ATG GCA TGC ATG TCA GCC GAC CTG	288
Thr His Pro Ile Thr Lys Phe Ile Met Ala Cys Met Ser Ala Asp Leu	
10 85 90 95	
GAG GTC GTC ACG AGC ACC TGG GTG CTG GTG GGC GGG GTC CTT GCA GCT	336
Glu Val Val Thr Ser Thr Trp Val Leu Val Gly Gly Val Leu Ala Ala	
15 100 105 110	
CTG GCT GCG TAT TGC TTG ACA ACA GGC AGC GTG GTC ATT GTG GGT AGG	384
Leu Ala Ala Tyr Cys Leu Thr Thr Gly Ser Val Val Ile Val Gly Arg	
20 115 120 125	
ATC ATC TTG TCC CGG CGG CCG GCT ATT GTT CCC GAC AGG GAA GTC CTC	432
Ile Ile Leu Ser Gly Arg Pro Ala Ile Val Pro Asp Arg Glu Val Leu	
25 130 135 140	
TAC CAG GAG TTC CAT GAG ATG GAA GAG TGC GCG TCG CAC CTC CCT TAC	480
Tyr Gln Glu Phe Asp Glu Met Glu Glu Cys Ala Ser His Leu Pro Tyr	
30 145 150 155 160	
ATC GAG CAG GGA ATG CAG CTC GCC GAG CAG TTC AAG CAA AAA GCG CTC	528
Ile Glu Gln Gly Met Gln Leu Ala Glu Gln Phe Lys Gln Lys Ala Leu	
35 165 170 175	
GGG TTG CTG CAG ACA GCC ACC AAG CAA GCG GAG GCC GCT GCT CCC CTG	576
Gly Leu Leu Gln Thr Ala Thr Lys Gln Ala Glu Ala Ala Ala Pro Val	
40 180 185 190	
GTG GAG TCC AAG TGG CGA GCC CTT GAG ACC TTC TGG GCG AAA CAC ATG	624
Val Glu Ser Lys Trp Arg Ala Leu Glu Thr Phe Trp Ala Lys His Met	
45 195 200 205	

AT 400 724 B

TGG AAC TTC ATC AGC GGG ATA CAG TAC TTA GCA GGC TTG TCC ACT CTG	672	
Trp Asn Phe Ile Ser Gly Ile Gln Tyr Leu Ala Gly Leu Ser Thr Leu		
210	215	220
5		
CCT GGG AAT CCC GCG ATT GCA TCA CTG ATG GCG TTC ACA GCC TCT GTC	720	
Pro Gly Asn Pro Ala Ile Ala Ser Leu Met Ala Phe Thr Ala Ser Val		
225	230	235
10		
ACT AGC CCG CTC ACC ACC CAA TCT ACC CTC CTG CTT AAC ATC CTG GGG	768	
Thr Ser Pro Leu Thr Thr Gln Ser Thr Leu Leu Leu Asn Ile Leu Gly		
245	250	255
15		
GGA TGG GTA GCC GCC CAA CTC GCT CCC CCC AGT GCT GCT TCA GCT TTC	816	
Gly Trp Val Ala Ala Gln Leu Ala Pro Pro Ser Ala Ala Ser Ala Phe		
260	265	270
20		
GTA GGC GCC GGC ATT GCT GGT GCG GCT GTT GGC AGC ATA GGC CTT GGG	864	
Val Gly Ala Gly Ile Ala Gly Ala Ala Val Gly Ser Ile Gly Leu Gly		
275	280	285
25		
AAG GTG CTT GTG GAC ATC TTG GCG GGC TAT GGA GCA GGA GTG GCA GGC	912	
Lys Val Leu Val Asp Ile Leu Ala Gly Tyr Gly Ala Gly Val Ala Gly		
290	295	300
30		
GCG CTC GTG GCC TTT AAG GTC ATG AGC GGC GAA ATG CCC TCC ACC GAG	960	
Ala Leu Val Ala Phe Lys Val Met Ser Gly Glu Met Pro Ser Thr Glu		
305	310	315
35		
GAC CTG GTT AAC TTA CTC CCT GCC ATC CTC TCT CCT GGT GCC CTG GTC	1008	
Asp Leu Val Asn Leu Leu Pro Ala Ile Leu Ser Pro Gly Ala Leu Val		
325	330	335
40		
GTC GGG GTC GTG TGC GCA GCG ATA CTG CGT CGG CAC GTG GGT CCA GGG	1056	
Val Gly Val Val Cys Ala Ala Ile Leu Arg Arg His Val Gly Pro Gly		
340	345	350
45		

AT 400 724 B

5	GAG GGG GCT GTG CAG TGG ATG AAC CGG CTG ATA GCG TTC GCC TCG CGG Glu Gly Ala Val Gln Trp Met Asn Arg Leu Ile Ala Phe Ala Ser Arg 355	360	365	1104
10	GGT AAC CAT GTT TCC CCC ACG CAC TAT GTG CCA GAG AGC GAC GCC GCA Gly Asn His Val Ser Pro Thr His Tyr Val Pro Glu Ser Asp Ala Ala 370	375	380	1152
15	GCA CGT GTC ACT CAG ATC CTC TCC GAC CTT ACT ATC ACC CAA CTG TTG Ala Arg Val Thr Gln Ile Leu Ser Asp Leu Thr Ile Thr Gln Leu Leu 385	390	395	1200
20	AAG AGG CTC CAC CAG TGG ATT AAC GAG GAC TGC TCC ACG CCC TGC TCC Lys Arg Leu His Gln Trp Ile Asn Glu Asp Cys Ser Thr Pro Cys Ser 405	410	415	1248
25	GGC TCG TGG CTA AGG GAT GTT TGG GAC TGG ATA TGC ACA GTT TTG GCT Gly Ser Trp Leu Arg Asp Val Trp Asp Trp Ile Cys Thr Val Leu Ala 420	425	430	1296
30	GAC TTC AAG ACC TGG CTC CAG TCC AAG CTC CTG CCG CGA TTA CCG GGA Asp Phe Lys Thr Trp Leu Gln Ser Lys Leu Leu Pro Arg Leu Pro Gly 435	440	445	1344
35	GTC CCC TTT TTC TCA TGC CAA CGT GGG TAC AAG GGG GTC TGG CGG GGA Val Pro Phe Phe Ser Cys Gln Arg Gly Tyr Lys Gly Val Trp Arg Gly 450	455	460	1392
40	GAC GGC ATC ATG CAG ACC ACC TGC TCA TGT GGA GCA CAG ATC ACC GGA Asp Gly Ile Met Gln Thr Thr Cys Ser Cys Gly Ala Gln Ile Thr Gly 465	470	475	1440
45	CAT GTC AAA AAC GGT TCC ATG AGG ATC GTT GGG CCT AAG ACC TGT AGT His Val Lys Asn Gly Ser Met Arg Ile Val Gly Pro Lys Thr Cys Ser 485	490	495	1488

AT 400 724 B

	AAC ATG TGG CAT GGA ACA TTC CCC ATC AAC GCA TAC ACC ACG GGC CCC		1536
	Asn Met Trp His Gly Thr Phe Pro Ile Asn Ala Tyr Thr Thr Gly Pro		
5	500	505	510
	TGC ACG CCC TCC CCA GCG CCA AAC TAT TCC AGG GCG CTG TGG CGG GTG		1584
	Cys Thr Pro Ser Pro Ala Pro Asn Tyr Ser Arg Ala Leu Trp Arg Val		
10	515	520	525
	GCT GCT GAG GAG TAC GTG GAG GTT ACG CGG GTG GGG GAT TTC CAC TAC		1632
15	Ala Ala Glu Glu Tyr Val Glu Val Thr Arg Val Gly Asp Phe His Tyr		
	530	535	540
	GTG ACG AGC ATG ACC ACT GAC AAC GTA AAA TGC CCC TGC CAG GTT CCA		1680
20	Val Thr Ser Met Thr Thr Asp Asn Val Lys Cys Pro Cys Gln Val Pro		
	545	550	555
	560		
25	GCC CCC GAA TTC TTC ACA GAA GTG GAT GGG GTG CGG CTG CAC AGG TAC		1728
	Ala Pro Glu Phe Phe Thr Glu Val Asp Gly Val Arg Leu His Arg Tyr		
	565	570	575
30	GCT CCG GCG TGC AAA CCT CTC CTA CGG GAG GAG GTC ACA TTC CAG GTC		1776
	Ala Pro Ala Cys Lys Pro Leu Leu Arg Glu Glu Val Thr Phe Gln Val		
	580	585	590
35	GGG CTC AAC CAA TAC CTG GTT GGG TCG CAG CTC CCA TGC GAG CCC GAA		1824
	Gly Leu Asn Gln Tyr Leu Val Gly Ser Gln Leu Pro Cys Glu Pro Glu		
40	595	600	605
	CCC GAT GTA GCA GTG CTC ACT TCC ATG CTC ACC GAC CCC TCC CAC ATC		1872
	Pro Asp Val Ala Val Leu Thr Ser Met Leu Thr Asp Pro Ser His Ile		
45	610	615	620
	ACA GCA GAG ACG GCT AAG CGC AGG CTG GCC AGG GGG TCT CCC CCC TCC		1920
	Thr Ala Glu Thr Ala Lys Arg Arg Leu Ala Arg Gly Ser Pro Pro Ser		
50	625	630	635
	640		

AT 400 724 B

TTG GCC AGC TCT TCA GCT AGC CAG TTG TCT GCG CCT TCC TCG AAG GCG 1968
Leu Ala Ser Ser Ser Ala Ser Gln Leu Ser Ala Pro Ser Ser Lys Ala

5

645 650

655

ACA TAC ATT ACC CAA AAT GAC TTC CCA GAC GCT GAC CTC ATC GAG GCC 2016
Thr Tyr Ile Thr Gln Asn Asp Phe Pro Asp Ala Asp Leu Ile Glu Ala

10

660 665

670

AAC CTC CTG TGG CGG CAT GAG ATG GGC 2043
Asn Leu Leu Trp Arg His Glu Met Gly

15

675 680

20

25

30

35

40

45

50

55

AT 400 724 B

SEQ ID Nr. 21

ART DER SEQUENZ: Nucleotid mit entsprechendem Protein

5 SEQUENZLÄNGE: 2116 Basenpaare

STRANGFORM: Einzelstrang

10 TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: cDNA zu Genom-RNA

15 URSPRÜNGLICHER HERKUNFTSORGANISMUS: Mensch; für posttransfusionale non-A, non-B-Hepatitis infektiöses Serum

20 UNMITTELBARE EXPERIMENTELLE HERKUNFT: Contig gebildet von cDNA Klone vom 5' Ende des Genoms

MERKMALE: von 308 bis 2116 BP Anfang des PT-NANBH-Polyproteins

25 EIGENSCHAFTEN: virale Struktur und nicht-strukturelle Proteine

30 GATCACTCCC CTGTGAGGAA CTACTGTCTT CACGCAGAAA GCGTCTAGCC ATGGCGTTAG 60
TATGAGTGTC GTGCAGCCTC CAGGACCCCC CCTCCCCGGGA GAGCCATAGT GGTCTGCGGA 120
ACCCGGTGAGT ACACCGGAAT TGCCAGGACG ACCGGGTCTT TTCTTGGATT AACCCGCTCA 180
ATGCCCTGGAG ATTTGGGCGT GCCCCCCGCAA GACTGCTAGC CGAGTAGTGT TGGGTGCGGA 240
35 AAGGCCTTGT GGTACTGCCT GATAAGGGTGC TTGCGAGTGC CCCGGGAGGT CTCTAGACC 300
GTGCACC ATG AGC ACG AAT CCT AAA CCT CAA AGA AAA ACC AAA CGT AAC 349
Met Ser Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn

40 5 10

45 ACC AAC CGC CGC CCA CAG GAC GTC AAG ITC CCG CCC GGT GGT CAG ATC 397
Thr Asn Pro Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gln Ile
15 20 25 30

50 GTT GGT GGA GTT TAC CTG TTG CCG CGC AGG GGC CCC AGG TTG GGT GTG 445
Val Gly Gly Val Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Leu Gly Val
35 40 45

AT 400 724 B

CGC GCG ACT AGG AAG ACT TCC GAG CGG TCG CAA CCT CGT GGA AGG CGA	493
Arg Ala Thr Arg Lys Thr Ser Glu Arg Ser Gln Pro Arg Gly Arg Arg	
5 50 55 60	
CAA CCT ATC CCC AAG GCT CGC CAG CCC GAG GGC AGG GCC TGG GCT CAG	541
Gln Pro Ile Pro Lys Ala Arg Gln Pro Glu Gly Arg Ala Trp Ala Gln	
10 65 70 75	
CCC GGG TAC CCT TGG CCC CTC TAT GGC AAC GAG GGC ATG GGG TGG GCA	559
Pro Gly Tyr Pro Trp Pro Leu Tyr Gly Asn Glu Gly Met Gly Trp Ala	
15 80 85 90	
GGA TGG CTC CTG TCA CCC CGT GGC TCC CGG CCT AGT TGG GGC CCC ACT	637
Gly Trp Leu Leu Ser Pro Arg Gly Ser Arg Pro Ser Trp Gly Pro Thr	
20 100 105 110 115	
GAC CCC CGG CGT AGG TCG CGT AAT TTG GGT AAA GTC ATC GAT ACC CTC	685
Asp Pro Arg Arg Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Ile Asp Thr Leu	
25 120 125 130	
ACA TGC GGC TTC GCC GAC CTC ATG GGG TAC ATT CCG CTC GTC GGC GCT	733
Thr Cys Gly Phe Ala Asp Leu Met Gly Tyr Ile Pro Leu Val Gly Ala	
30 135 140 145	
CCC TTA GGG GGC GCT GCC AGG GCC CTG GCG CAT GGC GTC CGG GTT CTG	781
Pro Leu Gly Gly Ala Ala Arg Ala Leu Ala His Gly Val Arg Val Leu	
35 150 155 160	
GAG GAC GGC GTG AAC TAT GCA ACA CGG AAT TTA CCC GGT TGC TCT TTC	829
Glu Asp Gly Val Asn Tyr Ala Thr Gly Asn Leu Pro Gly Cys Ser Phe	
40 165 170 175	
TCT ATC TTC CTC TTG GCT TTG CTG TCC TGT TTG ACC ATT CCA GCT TCC	877
Ser Ile Phe Leu Leu Ala Leu Leu Ser Cys Leu Thr Ile Pro Ala Ser	
45 180 185 190 195	

AT 400 724 B

5	GCT TAT GAA GTG CGC AAC GTG TCC GGG ATC TAC CAT GTC ACG AAC GAT Ala Tyr Glu Val Arg Asn Val Ser Gly Ile Tyr His Val Thr Asn Asp 200 205 210	925
10	TGC TCC AAC TCA AGC ATC GTG TAC GAG ACA GCG GAC ATG ATC ATG CAC Cys Ser Asn Ser Ser Ile Val Tyr Glu Thr Ala Asp Met Ile Met His 215 220 225	973
15	ACC CCC GGG TGT GTG CCC TGT GTC CGG GAG GGT AAT TCC TCC CGC TGC Thr Pro Gly Cys Val Pro Cys Val Arg Glu Gly Asn Ser Ser Arg Cys 230 235 240	1021
20	TGG GTA GCG CTC ACT CCC ACG CTC GCG GCC AAG GAC GCC AGC ATC CCC Trp Val Ala Leu Thr Pro Thr Leu Ala Ala Lys Asp Ala Ser Ile Pro 245 250 255	1069
25	ACT GCG ACA ATA CGA CGC CAC GTC GAT TTG CTC GTT GGG GCG GCT GCC Thr Ala Thr Ile Arg Arg His Val Asp Leu Leu Val Gly Ala Ala Ala 260 265 270 275	1117
30	TTC TGC TCC CCT ATG TAC GTG GGG GAT CTC TGC GGA TCT GTT TTC CTC Phe Cys Ser Ala Met Tyr Val Gly Asp Leu Cys Gly Ser Val Phe Leu 280 285 290	1165
35	GTC TCT CAG CTG TTC ACC TTC TCG CCT CGC CGA CAT CAG ACG GTA CAG Val Ser Gln Leu Phe Thr Phe Ser Pro Arg Arg His Gln Thr Val Gln 295 300 305	1213
40	GAC TGC AAT TGT TCA ATC TAT CCC GGC CAC GTA TCA GGT CAC CGC ATG Asp Cys Asn Cys Ser Ile Tyr Pro Gly His Val Ser Gly His Arg Met 310 315 320	1261
45	GCT TGG GAT ATG ATG AAC TGG TCA CCT ACA GCA GCC CTA GTG GTA Ala Trp Asp Met Met Asn Trp Ser Pro Thr Ala Ala Leu Val Val 325 330 335	1309

AT 400 724 B

	TCG CAG CTA CTC CGG ATC CCA CAA GCT GTC GTG GAC ATG CTG GCG GGG		1357	
	Ser Gln Leu Leu Arg Ile Pro Gln Ala Val Val Asp Met Val Ala Gly			
5	340	345	350	355
	GCC CAC TGG GGA GTC CTG GCG GGC CTT GCC TAC TAT TCC ATG GTG GGG		1405	
	Ala His Trp Gly Val Leu Ala Gly Leu Ala Tyr Tyr Ser Met Val Gly			
10	360	365	370	
	AAC TGG GCT AAG GTC TTG GTG ATG CTA CTC TTT GCC CCC GTT GAC		1453	
15	Asn Trp Ala Lys Val Leu Val Val Met Leu Leu Phe Ala Gly Val Asp			
	375	380	385	
20	CGG GAA CCT TAC ACG ACA GGG GGG ACA CAC GGC CGC GCC CCC CAC GGG		1501	
	Gly Glu Pro Tyr Thr Thr Gly Gly Thr His Gly Arg Ala Ala His Gly			
	390	395	400	
25	CTT ACA TCC CTC TTC ACA CCT GGG CCG GCT CAG AAA ATC CAG CTT GTA		1549	
	Leu Thr Ser Leu Phe Thr Pro Gly Pro Ala Gln Lys Ile Gln Leu Val			
	405	410	415	
30	AAC ACC AAC GGC AGC TCG CAC ATC AAC AGA ACT GCC TTG AAC TGC AAT		1597	
	Asn Thr Asn Gly Ser Trp His Ile Asn Arg Thr Ala Leu Asn Cys Asn			
	420	425	430	435
35	GAC TCC CTC CAA ACT GGG TTC CTT GCC GCG CTG TTC TAC ACG CAC AGG		1645	
	Asp Ser Leu Gln Thr Gly Phe Leu Ala Ala Leu Phe Tyr Thr His Arg			
40	440	445	450	
	TTC AAT GCG TCC GGA TGC TCA GAG CGC ATG GCC AGC TGC CGC CCC ATT		1693	
	Phe Asn Ala Ser Gly Cys Ser Glu Arg Met Ala Ser Cys Arg Pro Ile			
45	455	460	465	
	GAC CAG TTC GAT CAG CGG TGG GGT CCC ATC ACT TAT AAT GAG TCC CAC		1741	
	Asp Gln Phe Asp Gln Gly Trp Gly Pro Ile Thr Tyr Asn Glu Ser His			
50	470	475	480	

AT 400 724 B

5	GGC TTG GAC CAG AGG CCC TAT TGC TGG CAC TAC GCA CCT CAA CCG TGT Gly Leu Asp Gln Arg Pro Tyr Cys Trp His Tyr Ala Pro Gln Pro Cys 485 490 495	1789
10	GGT ATC GTG CCC GCG TTG CAG GTG TGT GGC CCA GTG TAC TGT TTC ACT Gly Ile Val Pro Ala Leu Gln Val Cys Gly Pro Val Tyr Cys Phe Thr 500 505 510 515	1837
15	CCA AGC CCT GTT GTG GTG GGG ACG ACC GAT CGT TTC GCC GCC CCT ACG Pro Ser Pro Val Val Val Gly Thr Thr Asp Arg Phe Gly Ala Pro Thr 520 525 530	1885
20	TAC AGA TGG GGT GAG AAT GAG ACG GAC GTG CTG CTT CTC AAC AAC ACG Tyr Arg Trp Gly Glu Asn Glu Thr Asp Val Leu Leu Leu Asn Asn Thr 535 540 545	1933
25	CGG CCG CCA CGG GGC AAC TGG TTC GGC TGT ACA TGG ATG AAT AGC ACC Arg Pro Pro Arg Gly Asn Trp Phe Gly Cys Thr Trp Met Asn Ser Thr 550 555 560	1981
30	GGG TTC ACC AAG ACG TGT GGG GGC CCC CCC TGC AAC ATC GGG GGG GTC Gly Phe Thr Lys Thr Cys Gly Gly Pro Pro Cys Asn Ile Gly Gly Val 565 570 575	2029
35	GGC AAC AAC ACT TTG ATC TGC CCC ACG GAC TGC TTC CGG AAG CAT CCC Gly Asn Asn Thr Leu Ile Cys Pro Thr Asp Cys Phe Arg Lys His Pro 580 585 590 595	2077
40	GAG GCC ACT TAC ACC AAA TGC GGT TCG GGG CCT TGG TTG Glu Ala Thr Tyr Thr Lys Cys Gly Ser Gly Pro Trp Leu 600 605	2116
45		
50		

AT 400 724 B

SEQ ID Nr. 22

ART DER SEQUENZ: Nucleotid mit entsprechendem Protein

5 SEQUENZLÄNGE: 3750 Basenpaare

STRANGFORM: Einzelstrang

TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: cDNA zu Genom-RNA

15 URSPRÜNGLICHER HERKUNFTSORGANISMUS: Mensch; für posttransfusionale non-A, non-B-Hepatitis infektiöses Serum

UNMITTELBARE EXPERIMENTELLE HERKUNFT: Contig gebildet von cDNA Klonen vom
3' Ende des Genoms

20

MERkmale: von 1 bis 3750 BP Teil des PT-NANBH-Polyproteins

EIGENSCHAFTEN: virale nicht-strukturelle Proteine

TGG GAG GGC GTC TTC ACA GGC CTC ACC CAC GTG GAT GCC CAC TTC CTG 48
 Trp Glu Gly Val Phe Thr Gly Leu Thr His Val Asp Ala His Phe Leu
5 10 15

TCC CAA ACA AAG CAG GCA GGA GAC AAC TTC CCC TAC CTG GTG GCG TAC 96
 Ser Gln Thr Lys Gln Ala Gly Asp Asn Phe Pro Tyr Leu Val Ala Tyr
 20 25 30

CAG GCT ACT GTG TGC GCT AGG GCC CAG GCC CCA CCT CCA TCA TGG GAT 144
 Gln Ala Thr Val Cys Ala Arg Ala Gln Ala Pro Pro Pro Ser Trp Asp
 35 40 45

45

CAA ATG TGG AAG TGT CTC ATA CGG CTA AAG CCT ACT CTG CGC GGG CCA 192
Gln Met Trp Lys Cys Leu Ile Arg Leu Lys Pro Thr Leu Arg Gly Pro
50 55 60

50

AT 400 724 B

	ACA CCC TTG CTG TAT AGG CTG GGA GCC GTC CAA AAC GAG GTC ACC CTC		240
	Thr Pro Leu Leu Tyr Arg Leu Gly Ala Val Gln Asn Glu Val Thr Leu		
5	65	70	75
			80
	ACA CAC CCC ATA ACC AAA TTC ATC ATG GCA TGC ATG TCA CCC GAC CTG		288
	Thr His Pro Ile Thr Lys Phe Ile Met Ala Cys Met Ser Ala Asp Leu		
10	85	90	95
	GAG GTC GTC ACG AGC ACC TGG GTG CTG GTG GGC GGG GTC CTT GCA GCT		336
	Glu Val Val Thr Ser Thr Trp Val Leu Val Gly Gly Val Leu Ala Ala		
15	100	105	110
	CTG GCT GCG TAT TGC TTG ACA ACA GCA AGC GTG GTC ATT GTG GGT AGG		384
	Leu Ala Ala Tyr Cys Leu Thr Thr Gly Ser Val Val Ile Val Gly Arg		
20	115	120	125
	ATC ATC TTG TCC GGG CGG CCG GCT ATT GTT CCC GAC AGG GAA GTC CTC		432
	Ile Ile Leu Ser Gly Arg Pro Ala Ile Val Pro Asp Arg Glu Val Leu		
25	130	135	140
	TAC CAG GAG TTC GAT GAG ATG GAA GAG TGC GCG TCG CAC CTC CCT TAC		480
	Tyr Gln Glu Phe Asp Glu Met Glu Glu Cys Ala Ser His Leu Pro Tyr		
30	145	150	155
			160
	ATC GAG CAG GGA ATG CAG CTC GCC GAG CAG TTC AAG CAA AAA GCG CTC		528
	Ile Glu Gln Gly Met Gln Leu Ala Glu Gln Phe Lys Gln Lys Ala Leu		
35	165	170	175
	GCG TTG CTG CAG ACA GCC ACC AAG CAA GCG GAG GCC GCT GCT CCC GTG		576
	Gly Leu Leu Gln Thr Ala Thr Lys Gln Ala Glu Ala Ala Ala Pro Val		
40	180	185	190
	GTG GAG TCC AAG TGG CGA GCC CTT GAG ACC TTC TGG GCG AAA CAC ATG		624
	Val Glu Ser Lys Trp Arg Ala Leu Glu Thr Phe Trp Ala Lys His Met		
45	195	200	205

AT 400 724 B

TGG AAC TTC ATC AGC GGG ATA CAG TAC TTA GCA GGC TTG TCC ACT CTG		672
Trp Asn Phe Ile Ser Gly Ile Gln Tyr Leu Ala Gly Leu Ser Thr Leu		
5 210 215 220		
CCT GGG AAT CCC GCG ATT GCA TCA CTG ATG GCG TTC ACA GCC TCT GTC		720
Pro Gly Asn Pro Ala Ile Ala Ser Leu Met Ala Phe Thr Ala Ser Val		
10 225 230 235 240		
ACT AGC CCG CTC ACC ACC CAA TCT ACC CTC CTG CTT AAC ATC CTG GGG		768
Thr Ser Pro Leu Thr Thr Gln Ser Thr Leu Leu Leu Asn Ile Leu Gly		
15 245 250 255		
GGA TGG GTA GCC GCC CAA CTC GCT CCC CCC AGT GCT GCT TCA GCT TTC		816
Gly Trp Val Ala Ala Gln Leu Ala Pro Pro Ser Ala Ala Ser Ala Phe		
20 260 265 270		
GTA GGC GCC GGC ATT GCT GGT GCG GCT GTT GGC AGC ATA GGC CTT GGG		864
Val Gly Ala Gly Ile Ala Gly Ala Ala Val Gly Ser Ile Gly Leu Gly		
25 275 280 285		
AAG GTG CTT GTG GAC ATC TTG GCG GGC TAT GGA GCA GGA GTG GCA GGC		912
Lys Val Leu Val Asp Ile Leu Ala Gly Tyr Gly Ala Gly Val Ala Gly		
30 290 295 300		
GCG CTC GTG GCC TTT AAG GTC ATG AGC GGC GAA ATG CCC TCC ACC GAG		960
Ala Leu Val Ala Phe Lys Val Met Ser Gly Glu Met Pro Ser Thr Glu		
35 305 310 315 320		
GAC CTG GTT AAC TTA CTC CCT GCC ATC CTC TCT CCT GGT GCC CTG GTC		1008
Asp Leu Val Asn Leu Leu Pro Ala Ile Leu Ser Pro Gly Ala Leu Val		
40 325 330 335		
GTC GGG GTC GTG TGC GCA GCG ATA CTG CGT CGG CAC GTG GGT CCA GGG		1056
Val Gly Val Val Cys Ala Ala Ile Leu Arg Arg His Val Gly Pro Gly		
45 340 345 350		

AT 400 724 B

	GAG GGG GCT GTG CAG TGG ATG AAC CGG CTG ATA GCG TTC GCC TCG CGG	1104		
	Glu Gly Ala Val Gln Trp Met Asn Arg Leu Ile Ala Phe Ala Ser Arg			
5	355	360	365	
	CGT AAC CAT GTT TCC CCC ACG CAC TAT GTG CCA GAG AGC GAC GCC GCA	1152		
	Gly Asn His Val Ser Pro Thr His Tyr Val Pro Glu Ser Asp Ala Ala			
10	370	375	380	
	GCA CGT GTC ACT CAG ATC CTC TCC GAC CTT ACT ATC ACC CAA CTG TTG	1200		
	Ala Arg Val Thr Gln Ile Leu Ser Asp Leu Thr Ile Thr Gln Leu Leu			
15	385	390	395	400
	AAG AGG CTC CAC CAG TGG ATT AAC GAG GAC TGC TCC ACG CCC TGC TCC	1248		
	Lys Arg Leu His Gln Trp Ile Asn Glu Asp Cys Ser Thr Pro Cys Ser			
20	405	410	415	
	GCC TCG TGG CTA AGG GAT GTT TGG GAC TGG ATA TGC ACA GTT TTG GCT	1296		
	Gly Ser Trp Leu Arg Asp Val Trp Asp Trp Ile Cys Thr Val Leu Ala			
25	420	425	430	
30	GAC TTC AAG ACC TGG CTC CAG TCC AAG CTC CTG CCG CGA TTA CCG GGA	1344		
	Asp Phe Lys Thr Trp Leu Gln Ser Lys Leu Leu Pro Arg Leu Pro Gly			
	435	440	445	
35				
	GTC CCC TTT TTC TCA TGC CAA CGT GGG TAC AAG GGG GTC TGG CGG GGA	1392		
	Val Pro Phe Phe Ser Cys Gln Arg Gly Tyr Lys Gly Val Trp Arg Gly			
40	450	455	460	
	GAC GGC ATC ATG CAG ACC ACC TGC TCA TGT GGA GCA CAG ATC ACC GGA	1440		
	Asp Gly Ile Met Gln Thr Thr Cys Ser Cys Gly Ala Gln Ile Thr Gly			
45	465	470	475	480
	CAT GTC AAA AAC GGT TCC ATG AGG ATC GTT GGG CCT AAG ACC TGT AGT	1488		
	His Val Lys Asn Gly Ser Met Arg Ile Val Gly Pro Lys Thr Cys Ser			
50	485	490	495	

AT 400 724 B

AAC ATG TGG CAT GGA ACA TTC CCC ATC AAC GCA TAC ACC ACG GGC CCC			1536
Asn Met Trp His Gly Thr Phe Pro Ile Asn Ala Tyr Thr Thr Gly Pro			
5 500	505	510	
TGC ACG CCC TCC CCA GCG CCA AAC TAT TCC AGG GCG CTG TGG CGG GTG			1584
Cys Thr Pro Ser Pro Ala Pro Asn Tyr Ser Arg Ala Leu Trp Arg Val			
10 515	520	525	
GCT GCT GAG GAG TAC GTG GAG GTT ACG CGG GTG GGG GAT TTC CAC TAC			1632
Ala Ala Glu Glu Tyr Val Glu Val Thr Arg Val Gly Asp Phe His Tyr			
15 530	535	540	
GTG ACG AGC ATG ACC ACT GAC AAC GTA AAA TGC CCG TGC CAG GTT CCA			1680
20 Val Thr Ser Met Thr Asp Asn Val Lys Cys Pro Cys Gln Val Pro			
545 550	555	560	
GCC CCC GAA TTC TTC ACA GAA GTG GAT GGG GTG CGG CTG CAC AGG TAC			1728
Ala Pro Glu Phe Phe Thr Glu Val Asp Gly Val Arg Leu His Arg Tyr			
25 565	570	575	
GCT CCG GCG TGC AAA CCT CTC CTA CGG GAG GAG GTC ACA TTC CAG GTC			1776
30 Ala Pro Ala Cys Lys Pro Leu Leu Arg Glu Glu Val Thr Phe Gln Val			
580 585	590		
GGG CTC AAC CAA TAC CTG GTT GGG TCG CAG CTC CCA TGC GAG CCC GAA			1824
35 Gly Leu Asn Gln Tyr Leu Val Gly Ser Gln Leu Pro Cys Glu Pro Glu			
40 595	600	605	
CCG GAT GTA GCA GTG CTC ACT TCC ATG CTC ACC GAC CCC TCC CAC ATC			1872
Pro Asp Val Ala Val Leu Thr Ser Met Leu Thr Asp Pro Ser His Ile			
45 610	615	620	
ACA GCA GAG ACG CCT AAG CGC AGG CTG GCC AGG GGG TCT CCC CCC TCC			1920
50 Thr Ala Glu Thr Ala Lys Arg Arg Leu Ala Arg Gly Ser Pro Pro Ser			
625 630	635	640	

AT 400 724 B

TTG GCC ACC TCT TCA GCT ACC CAG TTG TCT GCG CCT TCC TCG AAG GCG	1968			
Leu Ala Ser Ser Ser Ala Ser Gln Leu Ser Ala Pro Ser Ser Lys Ala				
645	650	655		
5				
ACA TAC ATT ACC CAA AAT GAC TTC CCA GAC GCT GAC CTC ATC GAG GCC	2016			
Thr Tyr Ile Thr Gln Asn Asp Phe Pro Asp Ala Asp Leu Ile Glu Ala				
10	660	665	670	
AAC CTC CTG TGG CGG CAT GAG ATG GGC GGG GAC ATT ACC CGC GTG GAG	2064			
Asn Leu Leu Trp Arg His Glu Met Gly Gly Asp Ile Thr Arg Val Glu				
15	675	680	685	
TCA GAG AAC AAG GTA GTA ATC CTG GAC TCT TTC GAC CCG CTC CGA GCG	2112			
Ser Glu Asn Lys Val Val Ile Leu Asp Ser Phe Asp Pro Leu Arg Ala				
20	690	695	700	
GAG GAG GAT GAG CGG GAA GTG TCC GTC CCC GCG GAG ATC CTG CGG AAA	2160			
Glu Glu Asp Glu Arg Glu Val Ser Val Pro Ala Glu Ile Leu Arg Lys				
25	705	710	715	720
TCC AAG AAA TTC CCA CCA GCG ATG CCC GCA TGG GCA CGC CCG GAT TAC	2208			
Ser Lys Lys Phe Pro Pro Ala Met Pro Ala Trp Ala Arg Pro Asp Tyr				
30	725	730	735	
AAC CCT CCG CTG CTG GAG TCC TGG AAG GCC CCG GAC TAC GTC CCT CCA	2256			
Asn Pro Pro Leu Leu Glu Ser Trp Lys Ala Pro Asp Tyr Val Pro Pro				
35	740	745	750	
GTG GTA CAT GGG TGC CCA CTG CCA CCT ACT AAG ACC CCT CCT ATA CCA	2304			
Val Val His Gly Cys Pro Leu Pro Pro Thr Lys Thr Pro Pro Ile Pro				
40	755	760	765	
CCT CCA CGG AGG AAG AGG ACA GTT GTT CTG ACA GAA TCC ACC GTG TCT	2352			
Pro Pro Arg Arg Lys Arg Thr Val Val Leu Thr Glu Ser Thr Val Ser				
45	770	775	780	

AT 400 724 B

	TCT GCC CTG GCG GAG CTT GCC ACA AAG GCT TTC GGT AGC TCC GAA CCG	2400		
	Ser Ala Leu Ala Glu Leu Ala Thr Lys Ala Phe Gly Ser Ser Glu Pro			
5	785	790	795	800
	TCG GCC GTC GAC AGC GGC ACG GCA ACC GCC CCT CCT GAC CAA CCC TCC	2448		
	Ser Ala Val Asp Ser Gly Thr Ala Thr Ala Pro Pro Asp Gln Pro Ser			
10	805	810	815	
	GAC GAC GGC GGA GCA GGA TCT GAC GTT GAG TCG TAT TCC TCC ATG CCC	2496		
	Asp Asp Gly Gly Ala Gly Ser Asp Val Glu Ser Tyr Ser Ser Met Pro			
15	820	825	830	
	CCC CTT GAG GGG GAG CCG GGG GAC CCC GAT CTC AGC GAC GGG TCT TGG	2544		
	Pro Leu Glu Gly Glu Pro Gly Asp Pro Asp Leu Ser Asp Gly Ser Trp			
20	835	840	845	
	TCT ACC GTG AGT GAG GAG GCC GGT GAG GAC GTC GTC TGC TGC TCG ATG	2592		
	Ser Thr Val Ser Glu Glu Ala Gly Glu Asp Val Val Cys Cys Ser Met			
25	850	855	860	
	TCC TAC ACA TGG ACA GGC GCT CTG ATC ACG CCA TGC GCT GCG GAG GAA	2640		
	Ser Tyr Thr Trp Thr Gly Ala Leu Ile Thr Pro Cys Ala Ala Glu Glu			
30	865	870	875	880
	AGC AAG CTG CCC ATC AAC GCG TTG AGC AAC TCT TTG CTG CGT CAC CAC	2688		
	Ser Lys Leu Pro Ile Asn Ala Leu Ser Asn Ser Leu Leu Arg His His			
35	885	890	895	
	AAC ATG GTC TAC GCT ACC ACA TCC CGC AGC GCA AGC CAG CGG CAG AAG	2736		
	Asn Met Val Tyr Ala Thr Thr Ser Arg Ser Ala Ser Gln Arg Gln Lys			
40	900	905	910	
	AAG GTC ACC TTT GAC AGA CTG CAA ATC CTG GAC GAT CAC TAC CAG GAC	2784		
	Lys Val Thr Phe Asp Arg Leu Gln Ile Leu Asp Asp His Tyr Gln Asp			
45	915	920	925	

AT 400 724 B

	GTG CTC AAG GAG ATG AAG GCG AAG GCG TCC ACA GTT AAG GCT AAG CTT	2832		
	Val Leu Lys Glu Met Lys Ala Lys Ala Ser Thr Val Lys Ala Lys Leu			
5	930	935	940	
	CTA TCA GTA GAG GAA CCC TGC AAG CTG ACG CCC CCA CAT TCG GCC AAA	2880		
	Leu Ser Val Glu Ala Cys Lys Leu Thr Pro Pro His Ser Ala Lys			
10	945	950	955	960
	TCT AAA TTT GGC TAT GGG GCA AAG GAC GTC CGG AAC CTA TCC AGC AAG	2928		
	Ser Lys Phe Gly Tyr Gly Ala Lys Asp Val Arg Asn Leu Ser Ser Lys			
15	965	970	975	
	GCC ATT AAC CAC ATC CGC TCC GTG TGG GAG GAC TTG TTG GAA GAC ACT	2976		
	Ala Ile Asn His Ile Arg Ser Val Trp Glu Asp Leu Leu Glu Asp Thr			
20	980	985	990	
	GAA ACA CCA ATT GAC ACC ACC ATC ATG GCA AAA AAT GAG GTT TTC TGC	3024		
	Glu Thr Pro Ile Asp Thr Thr Ile Met Ala Lys Asn Glu Val Phe Cys			
25	995	1000	1005	
	GTC CAA CCA GAG AGA GGA GGC CGC AAG CCA GCT CGC CTT ATC GTG TTC	3072		
	Val Gln Pro Glu Arg Gly Gly Arg Lys Pro Ala Arg Leu Ile Val Phe			
30	1010	1015	1020	
	CCA GAC TTG GGG GTC CGT GTG TGC GAG AAA ATG GCC CTC TAT GAC GTG	3120		
	Pro Asp Leu Gly Val Arg Val Cys Glu Lys Met Ala Leu Tyr Asp Val			
35	1025	1030	1035	1040
	GTC TCC ACC CTC CCT CAG GCT GTG ATG GGC TCC TCG TAC GGA TTC CAG	3168		
	Val Ser Thr Leu Pro Gln Ala Val Met Gly Ser Ser Tyr Gly Phe Gln			
40	1045	1050	1055	
	TAT TCT CCT GGA CAG CGG GTC GAG TTC CTG GTG AAC GCC TGG AAA TCA	3216		
	Tyr Ser Pro Gly Gln Arg Val Glu Phe Leu Val Asn Ala Trp Lys Ser			
45	1060	1065	1070	

AT 400 724 B

	AAG AAG ACC CCT ATG GCC TTT GCA TAT GAC ACC CGC TGT TTT GAC TCA	3264	
	Lys Lys Thr Pro Met Gly Phe Ala Tyr Asp Thr Arg Cys Phe Asp Ser		
5	1075	1080	1085
	ACA GTC ACT GAG AAT GAC ATC CGT GTA GAG GAG TCA ATT TAT CAA TGT	3312	
	Thr Val Thr Glu Asn Asp Ile Arg Val Glu Glu Ser Ile Tyr Gln Cys		
10	1090	1095	1100
	TGT GAC TTG GCC CCC GAA GCC AGA CAG GCC ATA AGG TCG CTC ACA GAG	3360	
15	Cys Asp Leu Ala Pro Glu Ala Arg Gln Ala Ile Arg Ser Leu Thr Glu		
	1105	1110	1115
			1120
20	CGG CTT TAT ATC GGG GGT CCC CTG ACT AAT TCA AAA GGG CAG AAC TGC	3408	
	Arg Leu Tyr Ile Gly Gly Pro Leu Thr Asn Ser Lys Gly Gln Asn Cys		
	1125	1130	1135
25	GGC TAT CGC CGG TGC CGC GCG AGC GGC GTG CTG ACG ACT AGC TGC GGT	3456	
	Gly Tyr Arg Arg Cys Arg Ala Ser Gly Val Leu Thr Thr Ser Cys Gly		
	1140	1145	1150
30	AAT ACC CTC ACA TGT TAC TTG AAG GCC TCT GCA GCC TGT CGA GCT GCA	3504	
	Asn Thr Leu Thr Cys Tyr Leu Lys Ala Ser Ala Ala Cys Arg Ala Ala		
	1155	1160	1165
35			
	AAG CTC CAG GAC TGC ACG ATG CTC GTG TCC GGA GAC GGC CTT GTC GTT	3552	
	Lys Leu Gln Asp Cys Thr Met Leu Val Cys Gly Asp Asp Leu Val Val		
40	1170	1175	1180
	ATC TGT GAG AGC GCG GGA ACC CAG CAG GAC GCG GCG AGC CTA CGA GTC	3600	
	Ile Cys Glu Ser Ala Gly Thr Gln Glu Asp Ala Ala Ser Leu Arg Val		
45	1185	1190	1195
			1200
	TTC ACG GAG GCT ATG ACT AGG TAC TCT GCC CCC CCC GGG GAC CCG CCC	3648	
50	Phe Thr Glu Ala Met Thr Arg Tyr Ser Ala Pro Pro Gly Asp Pro Pro		
	1205	1210	1215

AT 400 724 B

CAA CCA GAA TAC GAC CTG GAG TTG ATA ACA TCA TGC TCC TCC AAT GTG 3696
Gln Pro Glu Tyr Asp Leu Glu Leu Ile Thr Ser Cys Ser Ser Asn Val

5 1220 1225 1230

TCG GTC GCG CAC GAT GCA TCT GGC AAA AGG GTA TAC TAC CTC ACC CGT 3744
Ser Val Ala His Asp Ala Ser Gly Lys Arg Val Tyr Tyr Leu Thr Arg

10 1235 1240 1245

GAC CCG 3750

15 Asp Pro
1250

20 SEQ ID Nr. 23

ART DER SEQUENZ: Nucleotid

25 SEQUENZLÄNGE: 23 Basen

STRANGFORM: Einzelstrang

30 TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: synthetische DNA

35 URSPRÜNGLICHER HERKUNFTSORGANISMUS: Baculovirus *Autographa californica*
Nuclear Polyhedrosis virus (AcNPV)

UNMITTELBARE EXPERIMENTELLE HERKUNFT: Oligonucleotid-Synthesizer; oligo
d24

40 MERkmale: von 1 bis 23 Basen homolog zum Teil des AcNPV Polyhedringens
stromabwärts der BamH1 Klonierungsstelle im pAc360 und ähnlichen Vektoren

45 EIGENSCHAFTEN: startet DNA-Synthese von
Baculovirustransfervektorsequenzen, die an der BamH1 Schnittstelle
eingefügte DNA flankieren

50 CGGGTTAAC ATTACGGATT TCC

23

55

AT 400 724 B

SEQ ID Nr. 24

ART DER SEQUENZ: Nucleotid

5 SEQUENZLÄNGE: 31 Basen

STRANGFORM: Einzelstrang

10 TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: synthetische DNA

15 URSPRÜNGLICHER HERKUNFTSORGANISMUS: Baculovirus *Autographa californica*
Nuclear Polyhedrosis virus (AcNPV)

20 UNMITTELBARE EXPERIMENTELLE HERKUNFT: Oligonucleotid-Synthesizer; oligo
d126

25 MERKMALE: von 1 bis 31 Basen homolog zu den stromaufwärts
Verknüpfungssequenzen hergestellt durch Klonierung der durch d75 (SEQ ID
5) amplifizierten cDNA in die BamH1 Klonierungsstelle in pAc360 und
ähnlichen Vektoren; Fehlpaarungen an den Basen 13 und 14 führt eine PstI
Schnittstelle ein
von 1 bis 10 Basen homolog zur Region der BamH1 Schnittstelle in pAc360
und ähnlichen Vektoren
30 von 4 bis 9 Basen BamH1 Schnittstelle
von 12 bis 17 Basen PstI Schnittstelle

35 EIGENSCHAFTEN: startet DNA-Synthese an der Verknüpfung der
Baculovirustransfervektorsequenzen und der zuvor durch oligo d75
amplifizierten Sequenzen; führt eine PstI Erkennungsstelle für
anschließende Klonierung ein

40 TAAGGATCCC CCT GCA GTA TCG GCG GAA TTC
Ser Ala Val Ser Ala Glu Phe

31

5

45

50

55

AT 400 724 B

SEO ID Nr. 25

ART DER SEQUENZ: Nucleotid

5 SEQUENZLÄNGE: 45 Basen

STRANGFORM: Einzelstrang

10 TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: synthetische DNA

15 URSPRÜNGLICHER HERKUNFTSORGANISMUS: N/A

UNMITTELBARE EXPERIMENTELLE HERKUNFT: Oligonucleotid-Synthesizer; oligo d132

20 MERkmale: von 5 bis 10 Basen PstI Erkennungsstelle
von 13 bis 27 Basen Linker, kodierend für fünf Lysinreste
von 28 bis 45 Basen homolog zu den Basen 4 bis 21 von BR11 (SEQ ID 7)

25 EIGENSCHAFTEN: startet DNA-Synthese am 5' Ende des BR11 und führt eine synthetische, fünf Lysinreste kodierende Sequenz ein, wie auch eine PstI Erkennungsstelle für anschließende Klonierung

30 CTGCCTGCA GTA AAG AAG AAG AAG AAA ACC AAA CGT AAC ACC A 45
 Val Lys Lys Lys Lys Lys Thr Lys Arg Asn Leu
 5 10

Patentansprüche

- 40 1. PT-NANBH virales Polypeptid, gekennzeichnet durch ein Antigen mit einer Aminosäure-Sequenz, die
mindestens zu 90 % homolog mit der Aminosäure-Sequenz der SEQ ID Nr. 3, 4, 19, 20, 21 oder 22 ist
oder ein als Antigen wirkendes Fragment davon ist.

45 2. PT-NANBH virales Polypeptid nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Aminosäure-
Sequenz mindestens zu 90 % homolog mit der Aminosäure-Sequenz der SEQ ID Nr. 3 oder 4 ist oder
ein als Antigen wirkendes Fragment davon ist.

50 3. PT-NANBH virales Polypeptid nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Aminosäu-
re-Sequenz mindestens zu 95 % homolog mit der Aminosäure-Sequenz der SEQ ID Nr. 3, 4, 19, 20, 21
oder 22 ist oder ein als Antigen wirkendes Fragment davon ist.

55 4. PT-NANBH virales Polypeptid nach Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Aminosäure-
Sequenz mindestens zu 98 % homolog mit der Aminosäure-Sequenz der SEQ ID Nr. 3, 4, 19, 20, 21
oder 22 ist oder ein als Antigen wirkendes Fragment davon ist.

55 5. PT-NANBH virales Polypeptid, gekennzeichnet durch ein Antigen aus der strukturierten Region
des viralen Genoms und ein Antigen aus der nicht-strukturierten Region des viralen Genoms.

AT 400 724 B

6. PT-NANBH virales Polypeptid nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Antigen aus der strukturmöglichkeit der Region eine Aminosäure-Sequenz hat, die mindestens zu 90 % homolog mit der Aminosäure-Sequenz der SEQ ID Nr. 5 ist oder ein als Antigen wirkendes Fragment davon ist, und das Antigen aus der nicht-strukturmöglichkeit der Region eine Aminosäure-Sequenz hat, die mindestens zu 90 % homolog mit der Aminosäure-Sequenz der SEQ ID Nr. 3 oder 4 ist oder ein als Antigen wirkendes Fragment davon ist.
5
7. DNA-Sequenz, kodierend ein PT-NANBH virales Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 6.
- 10 8. DNA-Sequenz nach Anspruch 7 der SEQ ID Nr. 3, 4, 19, 20, 21 oder 22.
9. Expressionsvektor, gekennzeichnet durch eine DNA-Sequenz nach einem der Ansprüche 7 oder 8, der in einem geeigneten Wirt zur Expression der DNA-Sequenz unter Produktion PT-NANBH viralen Polypeptides in der Lage ist.
15
10. Wirtszelle, transformiert mit einem Expressionsvektor nach Anspruch 9.
11. Verfahren zur Herstellung PT-NANBH viralen Polypeptids, gekennzeichnet durch die folgenden Schritte: Klonierung oder Synthesierung einer das PT-NANBH virale Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 6 kodierenden DNA-Sequenz, Einschleusen der DNA-Sequenz in einen Expressionsvektor, so daß dieser in einem geeigneten Wirt exprimiert werden kann, Transformierung der Wirtszelle mit dem Expressionsvektor, Kultivierung der transformierten Wirtszelle und Isolierung des viralen Polypeptids.
20
12. Polyklonaler oder monoklonaler Antikörper gegen PT-NANBH virales Polypeptid erhältlich durch die Verwendung eines PT-NANBH viralen Polypeptids nach einem der Ansprüche 1 bis 6.
25
13. Verfahren zum Nachweis PT-NANBH viraler Nukleinsäure, gekennzeichnet durch
 - i) die Hybridisierung der in einer Testprobe vorhandenen viralen RNA oder aus einer solchen RNA synthetisierten cDNA mit einer DNA-Sequenz der SEQ ID Nr. 3, 4, 19, 20, 21 oder 22 und Screenen der erhaltenen Nukleinsäurehybride zur Identifikation aller PT-NANBH viralen Nukleinsäuren; oder
 - ii) die cDNA-Synthese aus in einer Testprobe vorhandener viraler RNA, Amplifikation einer ausgewählten DNA-Sequenz entsprechend den Subsequenzen der SEQ ID Nr. 3, 4, 19, 20, 21 oder 22 und Identifikation der ausgewählten DNA-Sequenz.
30
- 35 14. Testkit zum Nachweis PT-NANBH viraler Nukleinsäure, gekennzeichnet durch
 - i) ein Paar Oligonucleotidprimer, von denen einer einem Teil der Nucleotid-Sequenz der SEQ ID Nr. 3, 4, 19, 20, 21 oder 22 entspricht und der andere der auf der 3'-Seite des ersten lokalisiert ist und einem Teil der Komplimentärsequenz entspricht, wobei das Paar die dazwischenliegende ausgewählte DNA-Sequenz definiert;
 - ii) ein reverse Transkriptase-Enzym zur cDNA-Synthese aus RNA in der Testprobe stromaufwärts des Primers, entsprechend der komplimentären Nucleotid-Sequenz der SEQ ID Nr. 3, 4, 19, 20, 21 oder 22;
 - iii) ein Enzym, das zur Amplifikation der ausgewählten DNA-Sequenz in der Lage ist; und gegebenenfalls
 - iv) Waschlösungen und Reaktionspuffer.
40
- 45 15. Verfahren zum Nachweis PT-NANBH viralen Antigens oder viralen Antikörpers, gekennzeichnet durch das Zusammenbringen einer Testprobe mit einem PT-NANBH viralen Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 6 oder einem polyklonalen oder monoklonalen Antikörper nach Anspruch 12 und der Bestimmung, ob Antigen-Antikörper Bindung innerhalb der Testprobe auftritt.
50
16. Testkit zum Nachweis PT-NANBH viralen Antigens oder viralen Antikörpers, gekennzeichnet durch ein PT-NANBH virales Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 6 oder einen polyklonalen oder monoklonalen Antikörper nach Anspruch 12 und Hilfsmittel zum Nachweis, ob Antigen-Antikörper Bindung innerhalb der Testprobe auftritt.
55
17. Impfstoffformulierung, gekennzeichnet durch ein PT-NANBH virales Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 6 in Verbindung mit einem pharmazeutischen annehmbaren Träger.

AT 400 724 B

18. Verfahren zum Nachweis eines PT-NANBH viralen Antikörpers, gekennzeichnet durch Kontaktieren einer Testprobe mit einem oder mehreren PT-NANBH viralen Polypeptiden, wobei diese viralen Polypeptide zwei oder mehr PT-NANBH virale Antigene in Kombination enthalten oder in einem einzigen Polypeptid fusioniert sind und wenigstens eines dieser Antigene aus der strukturmöglichkeiten
5 Region des Virus abgeleitet ist und wenigstens ein weiteres dieser Antigene aus der nicht-strukturmöglichkeiten Region abgeleitet ist, und Bestimmen, ob Antigen-Antikörperbindung innerhalb der Testprobe auftritt.
19. Testkit zur Bestimmung eines PT-NANBH viralen Antikörpers, gekennzeichnet durch ein oder mehrere PT-NANBH virale Polypeptide, wobei diese(s) virale(n) Polypeptid(e) zwei oder mehr PT-NANBH virale Antigene in Kombination enthalten oder in einem einzigen Polypeptid fusioniert sind und wenigstens eines dieser Antigene aus der strukturmöglichkeiten Region des Virus abgeleitet ist und wenigstens ein weiteres dieser Antigene aus der nicht-strukturmöglichkeiten Region abgeleitet ist, und Hilfsmittel zum Nachweis, ob Antigen-Antikörper Bindung innerhalb der Testprobe auftritt.

15

Hiezu 3 Blatt Zeichnungen

20

25

30

35

40

45

50

55

Fig. 1.

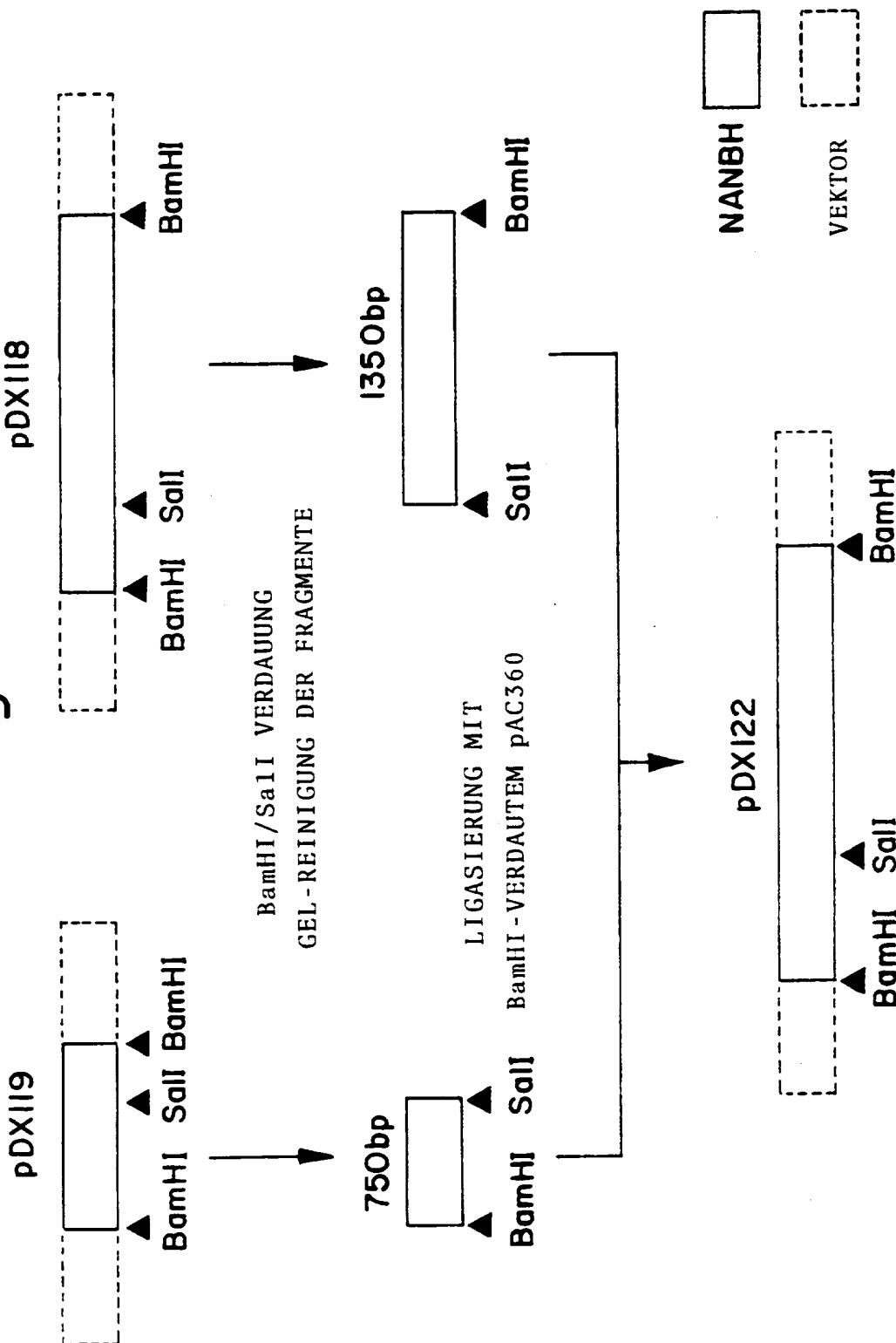


Fig. 2.

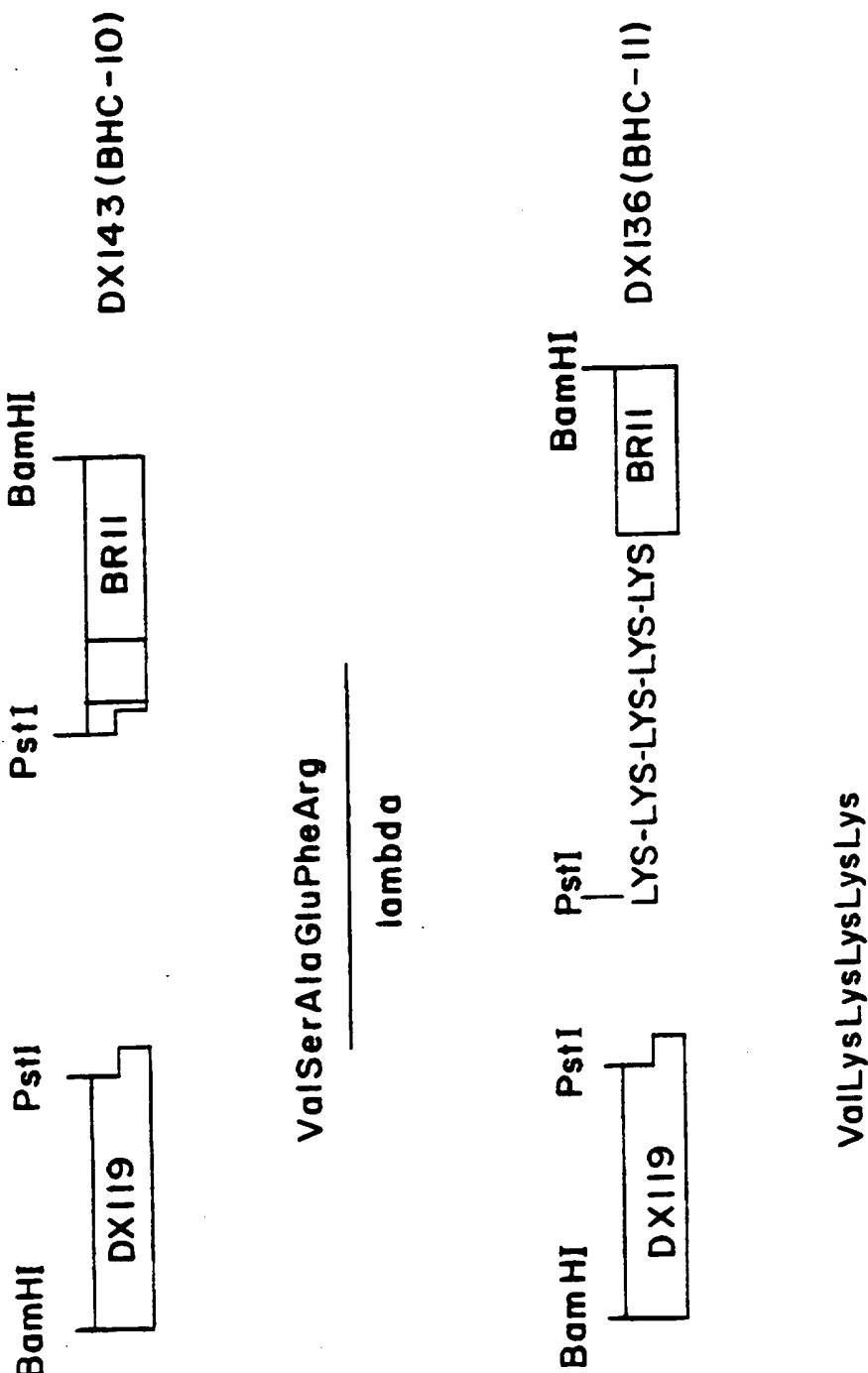
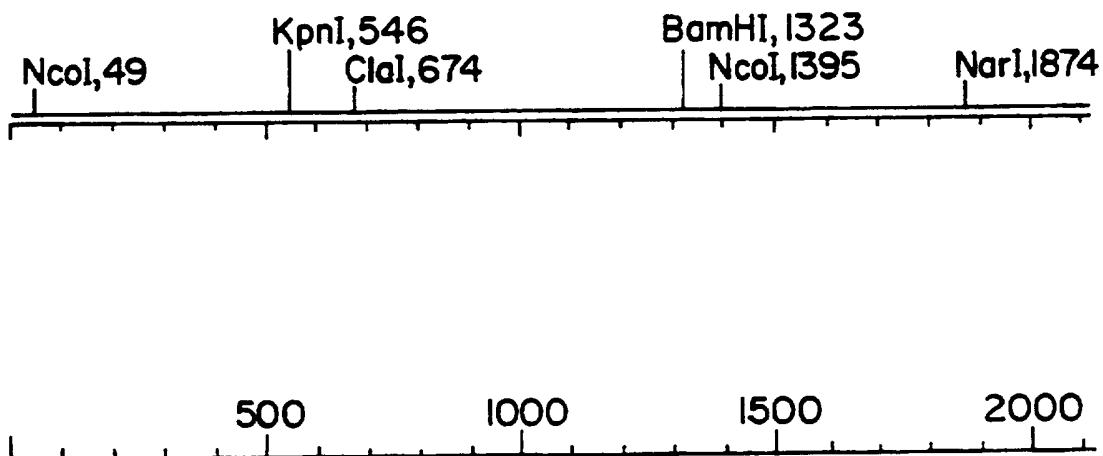


Fig. 3.

SEQ. ID No.21(2116 bps)



SEQ. ID No. 22 (3756 bps)

