(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 690 34 182 T2** 2005.12.15

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 388 232 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **690 34 182.2**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **90 302 866.0**
(96) Europäischer Anmeldetag: **16.03.1990**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **19.09.1990**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **12.01.2005**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **15.12.2005**

(51) Int Cl.[7]: **C12N 15/51**
A61K 39/29, G01N 33/576, C12Q 1/70

(30) Unionspriorität:

325338	**17.03.1989**	**US**
341334	**20.04.1989**	**US**
355002	**18.05.1989**	**US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LI, LU, NL, SE

(73) Patentinhaber:
Chiron Corp. (n.d.Ges.d. Staates Delaware), Emeryville, Calif., US

(74) Vertreter:
Uexküll & Stolberg, 22607 Hamburg

(72) Erfinder:
Houghton, Michael, Danville, California 94526, US;
Choo, Qui-Lim, El Cerrito, California 94530, US;
Kuo, George, San Francisco, California 94122, US

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

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

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

Beschreibung

Technisches Gebiet

[0001] Die Erfindung betrifft Materialien und Verfahren zum Management der Verbreitung von Nicht-A, Nicht-B-Hepatitis-Virus (NANBV)-Infektion. Spezieller betrifft sie Polynukleotide, welche von dem Genom eines ätiologischen Agens von NANBH, des Hepatitis C-Virus (HCV), abgeleitet sind, darin kodierte Polypeptide und Antikörper, die gegen die Polypeptide gerichtet sind. Diese Reagenzien sind als Screening-Agentien für HCV und dessen Infektion und als schützende Agentien oder Mittel gegen die Erkrankung nützlich.

In der Anmeldung zitierte Referenzen

Barr et al. (1986), Biotechniques 4: 428.
Botstein (1979), Gene 8: 17.
Brinton, M. A. (1986) in THE VIRUSES: THE TOGAVIRIDAE AND FLAVIVIRIDAE (Hrsg. der Reihe: Fraenkel-Conrat und Wagner, Hrsg. des Bandes: Schlesinger und Schlesinger, Plenum Press), S. 327–374.
Broach (1981) in: Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces, Band 1, S. 445, Cold Spring Harbor Press.
Broach et al. (1983), Meth. Enz. 101: 307.
Chang et al. (1977), Nature 198: 1056.
Chirgwin et al. (1979), Biochemistry 18: 5294.
Chomczynski und Sacchi (1987), Analytical Biochemistry 162: 156.
Clewell et al. (1969), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 62: 1159.
Clewell (1972), J. Bacteriol. 110: 667
Cohen (1972), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 2110.
Cousens et al. (1987), Gene 61: 265.
Boer et De al. (1983), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 292: 128.
Dreesman et al. (1985), J. Infect. Disease 151: 761.
Feinstone, S. M. und Hoofnagle, J. H. (1984), New Engl. J. Med. 311: 185.
Fields & Knipe (1986), FUNDAMENTAL VIROLOGY (Raven Press, N. Y.).
Fiers et al. (1978), Nature 273: 113.
Gerety, R. J., et al., in VIRAL HEPATITIS AND LIVER DISEASE (Vyas, B. N., Dienstag, J. L., und Hoofnagle, J. H., Hrsg.).
Grune und Stratton, Inc., 1984) S. 23–47.
Goeddel et al. (1980), Nucleic Acids Res. 8: 4057.
Graham und Van der Eb (1978), Virology 52: 546.
Grunstein und Hogness (1975), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73: 3961.
Grych et al. (1985), Nature 316: 74.
Gubler und Hoffman (1983), Gene 25: 263.
Hahn (1988), Virology 162: 167.
Hammerling et al. (1981), MONOCLONAL ANTIBODIES AND T-CELL HYBRIDOMAS.
Han (1987), Biochemistry 26: 1617.
Helfman (1983), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 31.
Hess et al. (1968), J. Adv. Enzyme Reg. 7: 149.
Hinnen et al. (1978), Proc. Natl. Acad. Sci. 75: 1929.
Hitzeman et al. (1980), J. Biol. Chem. 255: 2073.
Holland et al. (1978), Biochemistry 17: 4900.
Holland (1981), J. Biol. Chem. 256: 1385.
Houghton et al. (1981), Nucleic Acids Res. 9: 247.
Hunyh, T. V., et al. (1985) in DNA CLONING TECHNIQUES; A PRACTICAL APPROACH (D. Glover, Hrsg., IRL Press, Oxford, Vereinigtes Königreich), S. 49–78.
Immun. Rev. (1982) 62: 185.
Iwarson (1987), British Medical J. 295: 946.
Kennett et al. (1980) MONOCLONAL ANTIBODIES.
Kyte und Doolittle (1982), J. Mol. Biol. 157: 105–132.
Laemmli (1970), Nature 227, 680.
Lee et al. (1988), Science 239: 1288.
Maniatis, T., et al. (1982) MOLECULAR CLONING; A LABORATORY MANUAL (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N. Y.).
Mayer und Walker, Hrsg. (1987), IMMUNOCHEMICAL METHODS IN CELL AND MOLECULAR BIOLOGY (Academic Press, London).

Maxam et al. (1980), Methods in Enzymology 65: 499.
MacNamara et al. (1984), Science 226: 1325.
Messing et al. (1981), Nucleic Acids Res. 9: 309.
Messing (1983), Methods in Enzymology 101: 20–37. METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press).
Michelle et al., Int. Symposium on Viral Hepatitis.
Monath (1986) in THE VIRUSES: THE TOGAVIRIDAE AND FLAVIVIRIDAE (Hrsg. der Reihe: Fraenkel-Conrat und Wagner, Hrsg. des Bandes: Schlesinger und Schlesinger, Plenum Press), S. 375–440.
Nagahuma et al. (1984), Anal. Biochem. 141: 74.
Neurath et al. (1984), Science 224: 392.
Nisonoff et al. (1981), Clin. Immunol. Immunopathol. 21: 397–406.
Overby, L. R. (1985), Curr. Hepatol. 5: 49.
Overby, L. R. (1986), Curr. Hepatol. 6: 65.
Overby, L. R. (1987), Curr. Hepatol. 7: 35.
Peleg (1969), Nature 221: 193.
Pfefferkorn und Shapiro (1974), in COMPREHENSIVE VIROLOGY, Band 2 (Fraenkel-Conrat & Wagner, Hrsg, Plenum, N. Y.), S. 171–230.
Prince. A. M. (1983), Annu. Rev. Microbiol. 37: 217.
Rice et al. (1985), Science 229: 726.
Rice et al. (1986) in THE VIRUSES: THE TOGAVIRIDAE AND FLAVIVIRIDAE (Hrsg. der Reihe: Fraenkel-Conrat und Wagner, Hrsg. des Bandes: Schlesinger und Schlesinger, Plenum Press), S. 279–328.
Roehrig (1986) in THE VIRUSES: THE TOGAVIRIDAE AND FLAVIVIRIDAE (Hrsg. der Reihe: Fraenkel-Conrat und Wagner, Hrsg. des Bandes: Schlesinger und Schlesinger, Plenum Press).
Sadler et al. (1980), Gene 8, 279.
Saiki et al. (1986), Nature 324: 163.
Saiki et al. (1988), Science 239: 487.
Sanger et Saal. (1977), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463.
Schlesinger et al. (1986), J. Virol. 60: 1153.
Schreier, M., et al. (1980) HYBRIDOMA TECHNIQUES Scopes (1984), PROTEIN PURIFICATION, PRINCIPLES AND PRACTICE, SECOND EDITION (Springer-Verlag, N. Y.).
Shimatake et al. (1981), Nature 292: 128.
Sippel (1973), Eur. J. Biochem. 37: 31.
Steimer et al. (1986), J. Virol. 58: 9.
Stollar (1980), in THE TOGAVIRUSES (R. W. Schlesinger, Hrsg., Academic Press, N. Y.), S. 584–622.
Sumiyoshi et al. (1987), Virology 161: 497.
Taylor et al. (1976), Biochem. Biophys. Acta 442: 324.
Towbin et al. (1979), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350.
Tsu und Herzenberg (1980), in SELECTED METHODS IN CELLULAR IMMUNOLOGY (W. H. Freeman and Co.), S. 373–391.
Vytdehaag et al. (1985), J. Immunol. 134: 1225.
Valenzuela, P., et al. (1982), Nature 298: 344.
Valenzuela, P., et al. (1984), in HEPATITIS B (Millman, I., et al., Hrsg., Plenum Press), S. 225–236.
Warner (1984), DNA 3: 401.
Wu und Grossman (1987), Methods in Enzymology, Band 154, RECOMBINANT DNA, Teil E.
Wu (1987), Methods in Enzymology, Band 155, RECOMBINANT DNA, Teil F.
Zoller (1982), Nucleic Acids Res. 10: 6487.

Zitierte Patente

EPA-Veröffentlichung Nr. 318,216
PCT-Veröffentl. Nr. WO 89/04669.
U.S.-Patent Nr. 4,341,761
U.S.-Patent Nr. 4,399,121
U.S.-Patent Nr. 4,427,783
U.S.-Patent Nr. 4,444,887
U.S.-Patent Nr. 4,466,917
U.S.-Patent Nr. 4,472,500
U.S.-Patent Nr. 4,491,632
U.S.-Patent Nr. 4,493,890

Zugrundeliegender Stand der Technik

[0002] Nicht-A, Nicht-B-Hepatitis (NANBH) ist eine übertragbare Krankheit oder Familie von Krankheiten, von der bzw. denen angenommen wird, dass sie durch Viren induziert wird bzw. werden und die von anderen Formen von Virus-assoziierten Lebererkrankungen, einschließlich jenen, die durch die bekannten Hepatitis-Viren, d. h. Hepatitis A-Virus (HAV), Hepatitis B-Virus (HBV) und Deltahepatitis-Virus (HDV), hervorgerufen werden, wie auch von der Hepatitis, die durch Zytomegalievirus (CMV) oder Epstein-Barr-Virus (EBV) induziert wird, unterscheidbar ist bzw. sind. NANBH wurde erstmals bei Individuen, die Transfusionen erhalten hatten, identifiziert. Die Übertragung vom Menschen auf den Schimpansen und die reihenweise Weitergabe bei Schimpansen lieferten den Beweis dafür, dass NANBH auf ein übertragbares infektiöses Agens oder übertragbare infektiöse Agentien zurückzuführen ist.

[0003] Epidemiologische Hinweise legen nahe, dass es drei Typen von NANBH geben könnte: den durch Wasser übertragenen Epidemietyp; den mit Blut oder Nadeln assoziierten Typ; und den sporadisch auftretenden (in der Öffentlichkeit erworbenen) Typ. Jedoch ist die Anzahl von Agentien, die der Verursacher von NANBH sein könnten, unbekannt.

[0004] Die klinische Diagnose und die Identifizierung von NANBH erfolgten primär durch Ausschluss von anderen viralen Markern. Unter den Methoden, die verwendet wurden, um mutmaßliche NANBV-Antigene und -Antikörper nachzuweisen, befinden sich Agar-Gel-Diffusion, Gegenstromimmunoelektrophorese, Immunfluoreszenzmikroskopie, Immunelektronenmikroskopie, Radioimmunoassays und Enzymimmuntests. Jedoch hat sich keiner dieser Assays als ausreichend empfindlich, spezifisch und reproduzierbar erwiesen, um als diagnostischer Test für NANBH verwendet zu werden.

[0005] Zuvor bestand weder Klarheit noch eine Übereinstimmung hinsichtlich der Identität oder Spezifität der mit NANBH-Agentien assoziierten Antigen-Antikörper-Systeme. Dies war, wenigstens zum Teil, auf die frühere oder gleichzeitig mit NANBV erfolgte Infektion mit HBV bei Individuen und auf die bekannte Komplexität der mit HBV assoziierten löslichen und teilchenförmigen Antigene wie auch auf die Integration von HBV-DNA in das Genom von Leberzellen zurückzuführen. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, dass NANBH durch mehr als ein infektiöses Agens verursacht wird, wie auch die Möglichkeit, dass NANBH fehldiagnostiziert worden ist. Darüber hinaus ist unklar, was die serologischen Assays im Serum von Patienten mit NANBH nachweisen. Es ist postuliert worden, dass die Agar-Gel-Diffusions- und Gegenstromimmunoelektrophorese-Assays Autoimmunreaktionen oder nicht-spezifische Proteinwechselwirkungen, die bei Serumproben manchmal vorkommen, nachweisen und dass sie keine spezifischen NANBV-Antigen-Antikörper-Reaktionen darstellen. Die Immunfluoreszenz und die Enzymimmun- und Radioimmunoassays scheinen geringe Konzentrationen eines Rheumafaktor-artigen Materials nachzuweisen, das im Serum von Patienten mit NANBH wie auch bei Patienten mit anderen hepatischen und nicht-hepatischen Erkrankungen häufig vorhanden ist. Ein gewisser Teil der nachgewiesenen Reaktivität könnte Antikörper gegen vom Wirt determinierte zytoplasmatische Antigene repräsentieren.

[0006] Es hat eine Anzahl von NANBV-Kandidaten gegeben. Siehe beispielsweise die Übersichtsartikel von Prince (1983), Feinstone und Hoofnagle (1984) und Overby (1985, 1986, 1987) und der Artikel von Iwarson (1987). Es gibt jedoch keinen Beweis dafür, dass irgendeiner dieser Kandidaten das ätiologische Agens von NANBH darstellt.

[0007] Der Bedarf an empfindlichen, spezifischen Verfahren zum Screenen und zur Identifizierung von Trägern von NANBV und von durch NANBV kontaminiertem Blut oder durch NANBV kontaminierten Blutprodukten ist signifikant. Posttransfusionshepatitis (PTH) tritt bei ungefähr 10% der Patienten auf, die Transfusionen erhalten, und NANBH ist für bis zu 90% dieser Fälle verantwortlich. Das Hauptproblem bei dieser Krankheit ist das häufige Fortschreiten hin zu chronischen Leberschädigungen (25–55%).

[0008] Der Schutz der Patienten wie auch die Verhütung einer Übertragung von NANBH durch Blut und Blutprodukte oder durch engen persönlichen Kontakt erfordern verlässliche Screening-, diagnostische und prognostische Hilfsmittel (Tools), um Nukleinsäuren, Antigene und Antikörper, die mit NANBV in Verbindung stehen, nachzuweisen. Zusätzlich gibt es auch einen Bedarf an wirksamen Impfstoffen und immuntherapeutisch therapeutischen Mitteln für die Verhütung und/oder Behandlung der Krankheit.

[0009] Die Anmelderin hat ein neues Virus, das Hepatitis C-Virus (HCV), entdeckt, das sich als das hauptsächliche ätiologische Agens von durch Blut übertragener NANBH (BB-NANBH) erwiesen ist. Die anfänglichen Arbeiten der Anmelderin, einschließlich einer partiellen genomischen Sequenz des Prototyp-HCV-Isolats,

CDC/HCV1 (auch als HCV1 bezeichnet) sind in der EPA-Veröffentl. Nr. 318,216 (veröffentlicht am 31. Mai 1989) und der PCT-Veröffentl. Nr. WO 89/04669 (veröffentlicht am 01. Juni 1989) beschrieben. Die Offenbarungen dieser Patentanmeldungen wie auch von jeglichen entsprechenden nationalen Patentanmeldungen werden durch Bezugnahme in diese Unterlagen aufgenommen. Diese Anmeldungen lehren unter anderem DNA-Rekombinationsmethoden zur Klonierung und zur Expression von HCV-Sequenzen, HCV-Polypeptide, Techniken zur Immundiagnose von HCV, Diagnosetechniken unter Verwendung von HCV-Sonden, anti-HCV-Antikörper und Verfahren zur Isolierung von neuen hCV-Sequenzen, einschließlich Sequenzen von neuen HCV-Isolaten.

Offenbarung der Erfindung

[0010] Die vorliegende Erfindung beruht, zum Teil, auf neuen HCV-Sequenzen und Polypeptiden, die in der EPA-Veröffentl. Nr. 318,216 oder in der PCT-Veröffentl. Nr. WO 89/04669 nicht offenbart werden. In der Erfindung enthalten ist die Anwendung dieser neuen Sequenzen und Polypeptide unter anderem in Immundiagnoseverfahren, Diagnoseverfahren mittels Sonden, bei der anti-HCV-Antikörperproduktion, in PCR-Techniken und DNA-Rekombinationstechniken. Von der Erfindung werden auch neue Immunoassays umfasst, welche auf der Immunogenität von hier offenbarten HCV-Polypeptiden basieren. Die hier beanspruchten neuen Gegenstände haben, obwohl sie unter Verwendung von Techniken, die beispielsweise in der EPA-Veröffentl. Nr. 318,216 beschrieben worden sind, entwickelt worden sind, ein Prioritätsdatum, welches jener Veröffentlichung oder einem jeglichen Gegenstück davon vorangeht. Folglich stellt die Erfindung neue Zusammensetzungen und Verfahren bereit, die zum Screenen von Proben auf HCV-Antigene und -Antikörper nützlich sind und die für eine Behandlung von HCV-Infektionen nützlich sind.

[0011] Dementsprechend beruht ein Aspekt der Erfindung auf der Charakterisierung rekombinanter Polynukleotide, welche von HCV-cDNA abgeleitete Sequenzen umfassen, wobei die HCV-cDNA sich in Klon 13i oder Klon 26j oder Klon 59a oder Klon 84a oder Klon CA156e oder Klon 167b oder Klon pi14a oder Klon CA216a oder Klon CA290a oder Klon ag30a oder Klon 205a oder Klon 18g oder Klon 16jh befindet oder wobei die HCV-cDNA einer Sequenz entstammt, die durch die Nukleotidnummern –319 bis 1348 in **Fig.** 17 angegeben wird.

[0012] Ein anderer Aspekt der Erfindung beruht auf der Charakterisierung gereinigter Polypeptide, die ein innerhalb von HCV-cDNA kodiertes Epitop umfassen, wobei die HCV-cDNA einer Sequenz entstammt, die durch die Nukleotidnummern –319 bis 1348 in **Fig.** 17 angegeben wird.

[0013] Entsprechend stellt die vorliegende Erfindung ein Polypeptid in im Wesentlichen isolierter Form zur Verfügung, das eine zusammenhängende Sequenz eines Hepatitis C Virus (HCV)-Polyproteins von mindestens 10 Aminosäuren umfasst, bei dem die zusammenhängende Sequenz im Bereich der Aminosäuren 1 bis 449 eines HCV-Polyproteins liegt, wobei HCV gekennzeichnet ist durch:
ein RNA-Genom mit Positivstranganordnung;
wobei das Genom einen für ein Polyprotein kodierenden offenen Leserahmen (ORF) umfasst; und
die Gesamtheit des kodierenden Polyproteins mindestens 40% Homologie zu dem gesamten Polyprotein hat, das ausgewählt ist aus (i) dem wie in **Fig.** 17 gezeigten Polyprotein, oder (ii) dem Polyprotein eines viralen Isolates des Genoms, von dem die in einer Lambda gt-11 cDNA-Bibliothek bei der American Type Culture Collection (ATCC) mit der Zugangskodenummer 40394 hinterlegten cDNAs hergestellt wurden.

[0014] Bevorzugt ist die zusammenhängende Sequenz
a. HCV-Aminosäuren 1 bis 84;
b. HCV-Aminosäuren 9 bis 177;
c. ein immunologisch reaktives Fragment vom vorhergehenden (a) oder (b).

[0015] Das immunologisch reaktive Fragment kann von Aminosäuren 1 bis 50, 35 bis 45, 50 bis 100, 40 bis 90, 65 bis 75, 80 bis 90, 99 bis 120, 95 bis 110 oder 100 bis 150 des HCV-Polyproteins stammen.

[0016] Noch ein anderer Aspekt der Erfindung bezieht sich auf immunogene Polypeptide, die durch eine Zelle produziert werden, die mit einem rekombinanten Expressionsvektor, welcher ein ORF von aus HCV-cDNA abgeleiteter DNA umfasst, transformiert ist, wobei die HCV-cDNA eine Sequenz umfasst, die von der HCV-cDNA-Sequenz in Klon CA279a oder Klon CA74a oder Klon 13i oder Klon CA290a oder Klon 33C oder Klon 40b oder Klon 33b oder Klon 25c oder Klon 14c oder Klon 8f oder Klon 33f oder Klon 33g oder Klon 39c oder Klon 15e abgeleitet ist und bei welcher der ORF funktionsfähig (bzw. operativ) an eine Kontrollsequenz, die mit einem gewünschten Wirt verträglich ist, geknüpft ist.

[0017] Ein anderer Aspekt der Erfindung ist ein Polypeptid, bei dem die zusammenhängende Sequenz die Formel

AA_x-AA_y

aufweist, bei der x und y die in **Fig.** 17 dargestellten Aminosäurenummern angeben und bei der das Peptid ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus
AA1-AA35, AA1-AA50, AA1-AA84, AA9-AA177, AA1-AA10, AA5-AA20, AA20-AA25, AA35-AA45, AA50-AA100, AA40-AA90, AA45-AA65, AA65-AA75, AA80-AA90, AA99-AA120, AA95-AA110, AA105-AA120, AA100-AA150, AA150-AA200, AA155-AA170, AA190-AA210, AA200-AA250, AA220-AA240, AA245-AA265, AA250-AA300, AA290-AA330, AA290-AA305, AA300-AA350, AA310-AA330, AA350-AA400, AA380-AA395, AA405-AA495, AA400-AA450, AA405-AA415, AA415-AA425, AA425-AA435, AA437-AA582, AA440-AA460.

[0018] Die Erfindung bezieht sich ferner auf Polynukleotidsonden für HCV, im besonderen Sonden bestehend aus einer HCV-Sequenz, die von einer HCV-cDNA-Sequenz, die durch die Nukleotidnummern –319 bis 1348 in **Fig.** 17 angegeben wird, oder von der zu der HCV-cDNA-Sequenz komplementären Sequenz abgeleitet ist. Somit stellt die Erfindung ein rekombinantes oder auf gereinigtes virales Polynukleotid zur Verfügung, das eine HCV genomische Sequenz oder das Komplement davon umfasst, die selektiv hybridisierbar ist an Nukleotide -319 bis 1348 des HCV-Genoms oder dem Komplement davon.

[0019] Die Erfindung stellt auch ein Kit zur Analyse von Proben auf die Anwesenheit von Polynukleotiden aus HCV hin zur Verfügung, das eine erfindungsgemäße Polynukleotidsonde in einem geeigneten Behälter umfasst.

[0020] Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist ein Kit zur Analyse von Proben auf die Anwesenheit eines HCV-Antigens hin, umfassend einen Antikörper, der immunologisch mit einem HCV-Antigen der Erfindung reagiert, wie z. B. einem Antigen, das ein Epitop enthält, das innerhalb von HCV-cDNA kodiert wird, die in einer Sequenz vorhanden ist, die durch die Nukleotidnummern –319 bis 1348 in **Fig.** 17 angegeben wird, oder wobei die HCV-cDNA in Klon 13i oder Klon 26j oder Klon 59a oder Klon 84a oder Klon CA156e oder Klon 167b oder Klon pi14a oder Klon CA216a oder Klon CA290a oder Klon ag30a oder Klon 205a oder Klon 18g oder Klon 16jh vorhanden ist.

[0021] Noch ein weiterer Aspekt der Erfindung ist ein Kit zur Analyse von Proben auf die Anwesenheit eines HCV-Antikörpers hin, umfassend ein antigenes Polypeptid, welches ein HCV-Epitop der Erfindung enthält, wie z. B. ein Epitop, das innerhalb von HCV-cDNA kodiert ist, die in einer Sequenz vorhanden ist, die durch die Nukleotidnummern –319 bis 1348 in **Fig.** 17 angegeben wird, oder die in Klon 13i oder Klon 26j oder Klon 59a oder Klon 84a oder Klon CA156e oder Klon 167b oder Klon pi14a oder Klon CA216a oder Klon CA290a oder Klon ag30a oder Klon 205a oder Klon 18g oder Klon 16jh vorhanden ist.

[0022] Ein anderer Aspekt der Erfindung ist ein Kit zur Analyse von Proben auf die Anwesenheit eines HCV-Antikörpers hin, umfassend ein antigenes Polypeptid der Erfindung, wie z. B. ein Polypeptid, das von HCV-cDNA in Klon CA279a oder Klon CA74a oder Klon 13i oder Klon CA290a oder Klon 33C oder Klon 40b oder Klon 33b oder Klon 25c oder Klon 14c oder Klon 8f oder Klon 33f oder Klon 33g oder Klon 39c oder Klon 15e exprimiert wird, bei dem das antigene Polypeptid in einem geeigneten Behälter vorhanden ist.

[0023] Noch ein anderer Aspekt der Erfindung ist ein Verfahren zum Nachweis von HCV-Nukleinsäuren in einer Probe, das die Schritte umfasst:

(a) Umsetzen der Nukleinsäuren der Probe mit einer Polynukleotidsonde für HCV, wobei die Sonde eine HCV-Sequenz der Erfindung umfasst, wobei die Umsetzung unter Bedingungen erfolgt, die die Bildung eines Polynukleotid-Doppelstrangs zwischen der Sonde und der HCV-Nukleinsäure aus der Probe erlauben; und

(b) Detektieren eines die Sonde enthaltenden Polynukleotid-Doppelstrangs, der in Schritt (a) gebildet worden ist.

[0024] Noch ein anderer Aspekt der Erfindung ist ein Immunoassay zum Detektieren eines HCV-Antigens, das die Schritte umfasst:

(a) Inkubieren einer Probe, von der vermutet wird, dass sie ein HCV-Antigen enthält, mit einem gegen ein in HCV-cDNA kodiertem HCV-Epitop gerichteten Antikörper, wobei die HCV-cDNA aus einer Sequenz stammt, die durch die Nukleotidnummern –319 bis 1348 oder 8659 bis 8866 in **Fig.** 17 angegeben wird, oder die in Klon 13i oder Klon 26j oder Klon 59a oder Klon 84a oder Klon CA156e oder Klon 167b oder Klon

pi14a oder Klon CA216a oder Klon CA290a oder Klon ag30a oder Klon 205a oder Klon 18g oder Klon 16jh vorhanden ist, und wobei das Inkubieren unter Bedingungen erfolgt, welche die Bildung eines Antigen-Antikörper-Komplexes erlauben; und

(b) Detektieren eines in Schritt (a) gebildeten Antikörper-Antigen-Komplex, der den Antikörper enthält.

[0025] Noch ein anderer Aspekt der Erfindung ist ein Immunoassay zum Detektieren von gegen ein HCV-Antigen gerichteten Antikörpern, das die Schritte umfasst:

(a) Inkubieren einer Probe, von der vermutet wird, dass sie anti-HCV-Antikörper enthält, mit einem Antigen-Polypeptid, das ein in HCV-cDNA kodiertes Epitop enthält, wobei die HCV-cDNA aus einer Sequenz stammt, die durch die Nukleotidnummern –319 bis 1348 oder 8659 bis 8866 in **Fig.** 17 angegeben wird, oder die in Klon 13i oder Klon 26j oder Klon 59a oder Klon 84a oder Klon CA156e oder Klon 167b oder Klon pi14a oder Klon CA216a oder Klon CA290a oder Klon ag30a oder Klon 205a oder Klon 18g oder Klon 16jh vorhanden ist, und wobei das Inkubieren unter Bedingungen erfolgt, welche die Bildung eines Antigen-Antikörper-Komplexes erlauben; und

(b) Detektieren eines in Schritt (a) gebildeten Antikörper-Antigen-Komplexes, der das Antigen-Polypeptid enthält.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0026] Fig. 1 zeigt die Sequenz der HCV-cDNA in Klon 12f und die darin kodierten Aminosäuren.

[0027] **Fig.** 2 zeigt die HCV-cDNA-Sequenz in Klon k9-1 und die darin kodierten Aminosäuren.

[0028] Fig. 3 zeigt die Sequenz von Klon 15e und die darin kodierten Aminosäuren.

[0029] Fig. 4 zeigt die Nukleotidsequenz von HCV-cDNA in Klon 13i, die darin kodierten Aminosäuren und die Sequenzen, die mit Klon 12f überlappen.

[0030] Fig. 5 zeigt die Nukleotidsequenz von HCV-cDNA in Klon 26j, die darin kodierten Aminosäuren und die Sequenzen, die mit Klon 13i überlappen.

[0031] Fig. 6 zeigt die Nukleotidsequenz von HCV-cDNA in Klon CA59a, die darin kodierten Aminosäuren und die Sequenzen, die mit den Klonen 26j und K9-1 überlappen.

[0032] Fig. 7 zeigt die Nukleotidsequenz von HCV-cDNA in Klon CA84a, die darin kodierten Aminosäuren und die Sequenzen, die mit Klon CA59a überlappen.

[0033] Fig. 8 zeigt die Nukleotidsequenz von HCV-cDNA in Klon CA156e, die darin kodierten Aminosäuren und die Sequenzen, die mit CA84a überlappen.

[0034] Fig. 9 zeigt die Nukleotidsequenz von HCV-cDNA in Klon CA167b, die darin kodierten Aminosäuren und die Sequenzen, die mit CA156e überlappen.

[0035] Fig. 10 zeigt die Nukleotidsequenz von HCV-cDNA in Klon CA216a, die darin kodierten Aminosäuren und die Überlappung mit Klon CA167b.

[0036] Fig. 11 zeigt die Nukleotidsequenz von HCV-cDNA in Klon CA290a, die darin kodierten Aminosäuren und die Überlappung mit Klon CA216a.

[0037] **Fig.** 12 zeigt die Nukleotidsequenz von HCV-cDNA in Klon ag30a und die Überlappung mit Klon CA290a.

[0038] Fig. 13 zeigt die Nukleotidsequenz von HCV-cDNA in Klon CA205a und die Überlappung mit der HCV-cDNA-Sequenz in Klon CA290a.

[0039] Fig. 14 zeigt die Nukleotidsequenz von HCV-cDNA in Klon 18g und die Überlappung mit der HCV-cDNA-Sequenz in Klon ag30a.

[0040] Fig. 15 zeigt die Nukleotidsequenz von HCV-cDNA in Klon 16jh, die darin kodierten Aminosäuren und die Überlappung von Nukleotiden mit der HCV-cDNA-Sequenz in Klon 15e.

[0041] **Fig.** 16 zeigt den ORF von HCV-cDNA, abgeleitet aus den Klonen pi14a, CA167b, CA156e, CA84a, CA59a, K9-1, 12f, 14i, 11b, 7f, 7e, 8h, 33c, 40b, 37b, 35, 36, 81, 32, 33b, 25c, 14c, 8f, 33f, 33g, 39c, 35f, 19g, 26g und 15e.

[0042] **Fig.** 17 zeigt den Sinnstrang der zusammengesetzten HCV-cDNA-Sequenz, die aus den oben beschriebenen Klonen abgeleitet worden ist, und die zusammengesetzte HCV-cDNA-Sequenz, die in der EPA-Veröffentl. Nr. 318,216 veröffentlicht worden ist. Die Klone, von denen ausgehend die Sequenz abgeleitet wurde, sind b114a, 18g, ag30a, CA205a, CA290a, CA216a, pi14a, CA167b, CA156e, CA84a, CA59a, K9-1 (auch als k9-1 bezeichnet), 26j, 13i, 12f, 14i, 11b, 7f, 7e, 8h, 33c, 40b, 37b, 35, 36, 81, 32, 33b, 25c, 14c, 8f, 33f, 33g, 39c, 35f, 19g, 26g, 15e, b5a und 16jh. In der Figur geben die drei horizontalen Striche über der Sequenz die Position des mutmaßlichen Methionin-Startcodons an; die zwei vertikalen Striche geben das erste und das letzte Nukleotid der veröffentlichten Sequenz an. In der Figur ist ebenfalls die Aminosäuresequenz des mutmaßlichen, in der HCV-cDNA kodierten Polyproteins gezeigt.

[0043] Fig. 18 ist ein Diagramm des immunologischen Koloniescreeningverfahrens, welches bei den Antigen-Kartierungsstudien verwendet worden ist.

[0044] **Fig.** 19 zeigt die Hydrophobieprofile von in HCV und in West Nile-Virus kodierten Polyproteinen.

[0045] **Fig.** 20 ist ein Aufriss des Hydrophibie/Hydrophobie-Profils und des Antigen-Indexes des mutmaßlichen HCV-Polyproteins.

[0046] Fig. 21 zeigt die konservierten colinearen Peptide in HCV und Flaviviren.

Wege zum Ausführen der Erfindung

I. Definitionen

[0047] Der Ausdruck "Hepatitis C-Virus" ist durch Forscher auf dem Gebiet für ein zuvor unbekanntes ätiologisches Agens von NANBH reserviert worden. Dementsprechend bezieht sich "Hepatitis C-Virus" (HCV), wie hier verwendet, auf einen NANBH verursachenden Erreger von, der zuvor als NANBV und/oder BB-NANBV bezeichnet worden war. Die Ausdrücke HCV, NANBV und BB-NANBV werden hier gegeneinander austauschbar verwendet. Als eine Erweiterung dieser Terminologie wird die Erkrankung, die durch HCV verursacht wird, welche zuvor als NANB-Hepatitis (NANBH) bezeichnet worden ist, als Hepatitis C bezeichnet. Die Ausdrücke NANBH und Hepatitis C können hier gegeneinander austauschbar verwendet werden.

[0048] Der Ausdruck "HCV", wie hier verwendet, bezeichnet eine Virus-Spezies, von der pathogene Stämme NANBH hervorrufen, und attenuierte Stämme oder defekte interferierende Partikel, die davon abgeleitet sind. Wie weiter unten gezeigt, wird das HCV-Genom aus RNA gebildet. Es ist bekannt, dass RNA enthaltende Viren relative hohe Raten von spontaner Mutation aufweisen, d. h. es wird über die Größenordnung von 10^{-3} bis 10^{-4} pro eingebautes Nukleotid berichtet (Fields & Knipe (1986)). Dementsprechend gibt es innerhalb der weiter unten beschriebenen HCV-Spezies eine Mehrzahl von Stämmen, die virulent oder avirulent sein können. Die hier beschriebenen Zusammensetzungen und Verfahren ermöglichen die Vermehrung, Identifizierung, den Nachweis und die Isolierung der verschiedenen HCV-Stämme oder -Isolate. Darüber hinaus erlaubt die hierin enthaltene Offenbarung die Herstellung von Diagnostika und Impfstoffen für die verschiedenen Stämme ebenso wie auch Zusammensetzungen und Verfahren, die Nützlichkeit bei Screening-Verfahren für antivirale Mittel für eine pharmakologische Verwendung haben, wie z. B. Agentien, die die Replikation von HCV hemmen.

[0049] Die hier bereitgestellten Informationen sind, obwohl sie von dem Prototyp-Stamm oder -Isolat von HCV, der im Folgenden als CDC/HCV1 bezeichnet wird (auch HCV1 genannt), abgeleitet worden sind, ausreichend, um es einem Virus-Taxonomen zu ermöglichen, andere Stämme, die unter diese Spezies fallen, zu identifizieren. Die hier bereitgestellten Informationen ermöglichen die Annahme, dass HCV ein Flavi-artiges Virus ist. Die Morphologie und Zusammensetzung von Flavivirus-Partikeln sind bekannt und werden in Brinton (1986) diskutiert. Im allgemeinen enthalten Flaviviren in Hinblick auf die Morphologie ein zentrales Nukleokapsid, welches von einer Lipiddoppelschicht umgeben ist. Virionen sind kugelförmig und haben einen Durchmesser von ungefähr 40–50 nm. Ihre Kerne haben ungefähr 25–30 nm im Durchmesser. Entlang der äußeren Oberfläche der Virionenhülle gibt es Vorsprünge, die ungefähr 5–10 nm lang sind, mit terminalen Verdickungen von ungefähr 2 nm Durchmesser.

[0050] Es wird angenommen, dass unterschiedliche Stämme oder Isolate von HCV Variationen bei den Ami-

nosäuren und Nukleinsäuren verglichen mit dem Prototyp-Isolat, HCV1, enthalten. Es wird erwartet, dass viele Isolate ein hohes Ausmaß (d. h. mehr als ungefähr 40%) Homologie bei der gesamten Aminosäuresequenz verglichen mit HCV1 zeigen. Es könnten jedoch auch andere, weniger homologe HCV-Isolate gefunden werden. Diese würden gemäß verschiedener Kriterien, wie einem ORF mit ungefähr 9000 Nukleotiden bis ungefähr 12000 Nukleotiden, welches ein Polyprotein von ähnlicher Größe wie jenes von HCV1 kodiert, einem kodierten Polyprotein von ähnlichem hydrophobem und antigenem Charakter wie jenes von HCV1 und dem Vorhandensein von colinearen Peptidsequenzen, die bezogen auf HCV1 konserviert sind, als HCV-Stämme definiert werden. Zusätzlich wäre das Genom eine positiv-strängige RNA.

[0051] HCV kodiert wenigstens ein Epitop, das immunologisch identifiziert werden kann mit einem Epitop in dem HCV-Genom, von dem ausgehend die hier beschriebenen cDNAs abgeleitet werden; das Epitop ist vorzugsweise (in) einer hier beschriebenen Aminosäuresequenz enthalten. Das Epitop ist verglichen mit anderen bekannten Flaviviren einzigartig für HCV. Die Einzigartigkeit des Epitops kann durch dessen immunologische Reaktivität mit anti-HCV-Antikörpern und durch das Fehlen einer immunologischen Reaktivität mit Antikörpern gegen andere Flavivirus-Spezies bestimmt werden. Verfahren zur Bestimmung der immunologischen Reaktivität sind dem Fachmann bekannt, beispielsweise durch Radioimmunoassays, durch ELISA-Assays, durch Hämagglutination, und es werden hier drin mehrere Beispiele von geeigneten Techniken aufgeführt.

[0052] Zusätzlich zu den Obigen sind die folgenden Parameter von Nukleinsäurehomologie und Aminosäurehomologie, entweder allein oder in Kombination, bei der Identifizierung eines Stamms oder Isolats als HCV anwendbar. Da HCV-Stämme und -Isolate evolutionär verwandt sind, wird erwartet, dass die gesamte Homologie der Genome auf der Nukleotidebene wahrscheinlich ungefähr 40% oder mehr, vermutlich ungefähr 60% oder mehr und sogar noch wahrscheinlicher ungefähr 80% oder mehr betragen wird; und dass es zusätzlich entsprechende zusammenhängende Sequenzen von wenigstens ungefähr 13 Nukleotiden geben wird. Die Übereinstimmung zwischen der mutmaßlichen genomischen Sequenz eines HCV-Stamms und der CDC/HCV1-cDNA-Sequenz kann durch Techniken, die in diesem Fachgebiet bekannt sind, bestimmt werden. Sie können beispielsweise durch einen direkten Vergleich der Sequenzinformation des Polynukleotids aus dem mutmaßlichen HCV und der bzw. den hier beschriebenen HCV-cDNA-Sequenz(en) bestimmt werden. Sie können auch beispielsweise durch Hybridisierung der Polynukleotide unter Bedingungen, bei denen stabile Doppelstränge zwischen homologen Regionen gebildet werden (beispielsweise jene, die vor einem S1-Verdau verwendet werden würden), gefolgt von einem Verdau mit einer oder mehreren Einzelstrang-spezifischen Nuklease(n), gefolgt von einer Größenbestimmung der verdauten Fragmente bestimmt werden.

[0053] Aufgrund der evolutionären Verwandtschaft der Stämme oder Isolate des HCV sind mutmaßliche HCV-Stämme oder -Isolate durch ihre Homologie auf der Polypeptid-Ebene identifizierbar. Im allgemeinen wird erwartet, dass HCV-Stämme oder -Isolate zu mehr als 40% homolog sind, wahrscheinlich zu mehr als ungefähr 70% homolog sind und sogar noch wahrscheinlicher zu mehr als ungefähr 80% homolog sind, und einige können auf der Polypeptid-Ebene sogar zu mehr als ungefähr 90% homolog sein. Die Techniken zur Bestimmung der Aminosäuresequenz-Homologie sind dem Fachmann bekannt. Die Aminosäuresequenz kann beispielsweise direkt bestimmt und mit den hier bereitgestellten Sequenzen verglichen werden. Alternativ kann die Nukleotidsequenz des genomischen Materials des mutmaßlichen HCV bestimmt werden (üblicherweise über ein cDNA-Zwischenprodukt), die darin kodierte Aminosäuresequenz kann bestimmt werden und die entsprechenden Regionen können verglichen werden.

[0054] Wie hier verwendet, bezieht sich ein Polynukleotid, das "abgeleitet ist von" einer angegebenen Sequenz, auf eine Polynukleotidsequenz, die eine Sequenz von wenigstens 10–12 Nukleotiden und bevorzugter wenigstens ungefähr 15–20 Nukleotiden, welche einer Region der angegebenen Nukleotidsequenz entspricht, umfasst. "Welche (...) entspricht" oder "entsprechend" bedeutet homolog zu oder komplementär zu der angegebenen Sequenz. Die Sequenz der Region, ausgehend von der das Polynukleotid abgeleitet ist, ist vorzugsweise homolog zu oder komplementär zu einer Sequenz, die einmal in einem HCV-Genom vorkommt. Ob eine Sequenz einmal in dem HCV-Genom vorkommt oder nicht, kann durch Techniken, die den Fachleuten auf diesem Gebiet bekannt sind, bestimmt werden. Die Sequenz kann beispielsweise mit Sequenzen in Datenbanken, z. B. Genebank, verglichen werden, um zu bestimmen, ob sie in dem nicht-infizierten Wirt oder anderen Organismen vorkommt. Die Sequenz kann auch mit den bekannten Sequenzen von anderen viralen Agentien, einschließlich jenen, die bekanntermaßen Hepatitis induzieren, z. B. HAV, HBV und HDV, und anderen Mitgliedern der Flaviviridae verglichen werden. Die Übereinstimmung oder Nicht-Übereinstimmung der abgeleiteten Sequenz mit anderen Sequenzen kann auch durch Hybridisierung unter den geeigneten Stringenzbedingungen bestimmt werden. Hybridisierungstechniken zur Bestimmung der Komplementarität von Nukleinsäuresequenzen sind in diesem Fachgebiet bekannt und werden nachfolgend diskutiert. Siehe auch beispielsweise Maniatis et al. (1982). Zusätzlich können Fehlpaarungen von Doppelstrang-Polynukleotiden, die durch Hybri-

disierung gebildet werden, durch bekannte Techniken bestimmt werden, einschließlich beispielsweise Verdau mit einer Nuklease, wie S1, die spezifisch einzelsträngige Abschnitte in doppelsträngigen Polynukleotiden verdaut. Regionen, ausgehend von denen typische DNA-Sequenzen "abgeleitet" werden können, umfassen, sind aber nicht beschränkt auf, beispielsweise Regionen, die spezifische Epitope kodieren, wie auch nicht-transkribierte und/oder nicht-translatierte Regionen.

[0055] Das abgeleitete Polynukleotid wird nicht notwendigerweise körperlich/physisch von der gezeigten Nukleotidsequenz abgeleitet, sondern kann auf eine beliebige Weise, einschließlich beispielsweise durch chemische Synthese oder DNA-Replikation oder reverse Transkription oder Transkription, erzeugt werden. Zusätzlich können Kombinationen von Regionen, die jener der angegebenen Sequenz entsprechen, auf Weisen modifiziert werden, die in diesem Fachgebiet bekannt sind, so dass sie mit einer beabsichtigten Verwendung konsistent sind.

[0056] In ähnlicher Weise bezieht sich ein Polypeptid oder eine Aminosäuresequenz, welche(s) "abgeleitet ist von" einer angegebenen Nukleinsäuresequenz, auf ein Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz, die identisch ist zu jener eines Polypeptids, das in der Sequenz kodiert wird, oder einen Abschnitt davon, wobei der Abschnitt aus wenigstens 10 Aminosäuren und sogar noch mehr bevorzugt wenigstens 11–15 Aminosäuren besteht oder welcher immunologisch als ein in der Sequenz kodiertes Polypeptid identifizierbar ist.

[0057] Ein rekombinantes oder abgeleitetes Polypeptid wird nicht notwendigerweise ausgehend von einer angegebenen Nukleinsäuresequenz, beispielsweise den hier beschriebenen HCV-cDNA-Sequenzen, oder ausgehend von einem HCV-Genom translatiert; es kann auf eine jegliche Weise erzeugt werden, einschließlich beispielsweise durch chemische Synthese oder Expression eines rekombinanten Expressionssystems oder Isolierung aus mutiertem HCV. Ein rekombinantes oder abgeleitetes Polypeptid kann ein oder mehrere Analoga von Aminosäuren oder nicht-natürliche Aminosäuren in seiner Sequenz umfassen. Verfahren zum Insertieren von Analoga von Aminosäuren in eine Sequenz, sind in diesem Fachgebiet bekannt. Es kann auch eine oder mehrere Markierungen, die den Fachleuten auf diesem Gebiet bekannt sind, umfassen.

[0058] Der Ausdruck "rekombinantes Polynukleotid", wie hier verwendet, meint ein Polynukleotid von genomischem, cDNA-, halbsynthetischem oder synthetischem Ursprung, das aufgrund seiner Herkunft oder Manipulation (1) mit der Gesamtheit oder einem Abschnitt eines Polynukleotids, mit dem es in der Natur assoziiert ist, nicht assoziiert ist, (2) mit einem anderen Polynukleotid verknüpft ist als jenem, mit welchem es in der Natur verknüpft ist oder (3) in der Natur nicht vorkommt.

[0059] Der Ausdruck "Polynukleotid", wie hier verwendet, bezieht sich auf eine polymere Form von Nukleotiden von beliebiger Länge, entweder Ribonukleotiden oder Desoxyribonukleotiden. Dieser Ausdruck bezieht sich nur auf die Primärstruktur des Moleküls. Dementsprechend umfasst dieser Ausdruck doppel- und einzelsträngige DNA wie auch doppel- und einzelsträngige RNA. Er umfasst auch bekannte Arten von Modifizierungen, beispielsweise Markierungen, die in diesem Fachgebiet bekannt sind, Methylierung, "caps" (Kappen-Strukturen), Substitution von einem oder mehreren der natürlicherweise vorkommenden Nukleotide durch ein Analogon, Internukleotid-Modifikationen, wie beispielsweise jene mit ungeladenen Verknüpfungen (z. B. Methylphosphonate, Phosphotriester, Phosphoamidate, Carbamate usw.) und mit geladenen Verknüpfungen (z. B. Phosphorothioate, Phosphorodithioate usw.), solche, die überhängende Gruppierungen enthalten, wie beispielsweise Proteine (einschließlich z. B. Nukleasen, Toxine, Antikörper, Signalpeptide, Poly-L-Lysin usw.), solche mit Interkalatoren (z. B. Acridin, Psoralen usw.), solche, die Chelatbildner enthalten (z. B. Metalle, radioaktive Metalle, Bor, oxidative Metalle usw.), solche, die alkylierend wirkende Komponenten enthalten, solche mit modifizierten Verknüpfungen (z. B. alpha-anomere Nukleinsäuren usw.) wie auch unmodifizierte Formen des Polynukleotids.

[0060] "Rekombinante Wirtszellen", "Wirtszellen", "Zellen", "Zelllinien", "Zellkulturen" und andere derartige Ausdrücke, die Mikroorganismen oder höhere eukaryotische Zelllinien, welche als einzellige Einheiten kultiviert werden, bezeichnen, beziehen sich auf Zellen, die als Empfänger für rekombinante Vektor- oder andere Transfer-DNA verwendet werden können oder verwendet worden sind, und umfassen die Nachkommenschaft der ursprünglichen Zelle, die transfiziert worden ist. Es versteht sich, dass die Nachkommenschaft einer einzigen Ausgangszelle möglicherweise aufgrund einer natürlichen, zufälligen oder beabsichtigten Mutation hinsichtlich der Morphologie nicht notwendigerweise vollständig identisch ist oder hinsichtlich der genomischen oder gesamten DNA nicht notwendigerweise die gesamte Größe bzw. Struktur wie die ursprüngliche Ausgangszelle aufweist.

[0061] Ein "Replikon" ist ein jegliches genetisches Element, z. B. ein Plasmid, ein Chromosom, ein Virus, ein

Cosmid usw., das sich innerhalb einer Zelle wie eine autonome Polynukleotidreplikations-Einheit verhält, d. h. zur Replikation unter seiner eigenen Kontrolle in der Lage ist.

[0062] Ein "Vektor" ist ein Replikon, in dem ein anderes Polynukleotidsegment angefügt ist, um die Replikation und/oder Expression des angefügten Segments zu ermöglichen.

[0063] "Kontrollsequenz" bezieht sich auf Polynukleotidsequenzen, die notwendig sind, um die Expression von kodierenden Sequenzen, an die sie ligiert sind, zu bewirken. Die Natur von solchen Kontrollsequenzen differiert abhängig von dem Wirtsorganismus; in Prokaryoten umfassen solche Kontrollsequenzen im allgemeinen Promotor, Ribosomenbindungsstelle und Terminatoren; in Eukaryoten umfassen solche Kontrollsequenzen im allgemeinen Promotoren, Terminatoren und in einigen Fällen Enhancer. Der Ausdruck "Kontrollsequenzen" soll zumindest alle Komponenten umfassen, deren Anwesenheit für eine Expression erforderlich ist, und kann auch zusätzliche Komponenten umfassen, deren Anwesenheit vorteilhaft ist, beispielsweise Leader-Sequenzen.

[0064] "Funktionsfähig (oder operativ) verknüpft" bezieht sich auf eine Nebeneinander-Anordnung, wobei die so beschriebenen Komponenten in einer Beziehung stehen, die es diesen erlaubt, in ihrer beabsichtigten Weise zu funktionieren. Eine Kontrollsequenz, welche "funktionsfähig (operativ) verknüpft" ist mit einer kodierenden Sequenz, ist in einer solchen Weise ligiert, dass eine Expression der kodierenden Sequenz unter Bedingungen, die für die Kontrollsequenzen verträglich sind, erzielt wird.

[0065] Ein "offenes Leseraster" (ORF) ist eine Region einer Polynukleotidsequenz, die ein Polypeptid kodiert; diese Region kann einen Abschnitt einer kodierenden Sequenz oder eine vollständige kodierende Sequenz darstellen.

[0066] Eine "kodierende Sequenz" ist eine Polynukleotidsequenz, die in mRNA transkribiert und/oder in ein Polypeptid translatiert wird, wenn sie unter die Kontrolle von geeigneten regulatorischen Sequenzen gestellt wird. Die Grenzen der kodierenden Sequenz werden durch ein Translationsstartcodon am 5'-Terminus und ein Translationsstopcodon am 3'-Terminus bestimmt. Eine kodierende Sequenz kann mRNA, cDNA und rekombinante Polynukleotidsequenzen umfassen, ist aber nicht auf diese beschränkt.

[0067] "Immunologisch identifizierbar mit/als" bezieht sich auf die Anwesenheit von einem oder mehreren Epitop(en) und Polypeptid(en), das bzw. die auch in dem bzw. den angegebenen Polypeptid(en), üblicherweise HCV-Proteinen, vorhanden ist bzw. sind. Immunologische Identität kann durch Antikörperbindung und/oder -Kompetition bei der Bindung bestimmt werden; diese Techniken sind den durchschnittlichen Fachleuten auf diesem Gebiet bekannt und werden ebenfalls nachfolgend veranschaulicht.

[0068] Wie hier verwendet, bezieht sich "Epitop" auf eine antigene Determinante eines Polypeptids; ein Epitop könnte 3 Aminosäuren in einer räumlichen Konformation, die einzig bei diesem Epitop vorkommt, umfassen; im allgemeinen besteht ein Epitop aus wenigstens 5 solchen Aminosäuren und besteht noch üblicher aus wenigstens 8–10 solchen Aminosäuren. Verfahren zur Bestimmung der räumlichen Konformation von Aminosäuren sind in diesem Fachgebiet bekannt und umfassen beispielsweise Röntgenkristallographie und 2-dimensionale Kernmagnetresonanz.

[0069] Ein Polypeptid ist "immunologisch reaktiv" gegenüber einem Antikörper, wenn es an einen Antikörper aufgrund einer Antikörpererkennung eines innerhalb des Polypeptids enthaltenen spezifischen Epitops bindet. Immunologische Reaktivität kann durch Antikörperbindung, spezieller durch die Kinetik der Antikörperbindung, und/oder durch Kompetition bei der Bindung unter Verwendung von einem oder mehreren bekannten Polypeptid(en), welche(s) ein Epitop, gegen das der Antikörper gerichtet ist, enthält bzw. enthalten, als Kompetitor(en) bestimmt werden. Die Techniken zur Bestimmung, ob ein Polypeptid gegenüber einem Antikörper immunologisch reaktiv ist, sind in diesem Fachgebiet bekannt.

[0070] Wie hier verwendet, bezeichnet der Ausdruck "immunogenes Polypeptid" ein Polypeptid, das eine zelluläre und/oder humorale Antwort, entweder allein oder gebunden an einen Träger, in Gegenwart oder Abwesenheit eines Adjuvans auslöst.

[0071] Der Ausdruck "Polypeptid" bezieht sich auf ein Polymer von Aminosäuren und bezieht sich nicht auf eine spezielle Länge des Produkts; dementsprechend sind Peptide, Oligopeptide und Proteine innerhalb der Definition eines Polypeptids enthalten. Dieser Ausdruck bezieht sich gleichfalls nicht auf Modifikationen des Polypeptids nach der Expression, beispielsweise Glykosylierungen, Acetylierungen, Phosphorylierungen und

dergleichen, bzw. schließt diese nicht aus. Von der Definition umfasst werden beispielsweise Polypeptide, die ein oder mehrere Analoga einer Aminosäure (einschließlich beispielsweise nicht-natürliche Aminosäuren usw.) enthalten, Polypeptide mit substituierten Verknüpfungen wie auch anderen Modifikationen, die in diesem Fachgebiet bekannt sind, die sowohl in der Natur vorkommen als auch in der Natur nicht vorkommen.

[0072] "Transformation", wie hier verwendet, bezieht sich auf die Einschleusung eines exogenen Polynukleotids in eine Wirtszelle unabhängig von dem Verfahren, das für die Einschleusung verwendet wird, beispielsweise direkte Aufnahme, Transduktion, F-Duktion oder -Paarung oder Elektroporation. Das exogene Polynukleotid kann als ein nicht-integrierter Vektor, beispielsweise ein Plasmid aufrechterhalten werden oder kann alternativ in das Wirtsgenom integriert werden.

[0073] "Behandlung", wie hier verwendet, bezieht sich auf Prophylaxe und/oder Therapie.

[0074] Ein "Individuum", wie hier verwendet, bezieht sich auf Vertebraten, insbesondere Mitglieder der Säugetierspezies und umfasst, ist aber nicht beschränkt auf Haustiere, Sporttiere und Primaten, einschließlich Menschen.

[0075] Wie hier verwendet, enthält der "Sinnstrang" einer Nukleinsäure die Sequenz, die Sequenzhomologie zu jener der mRNA aufweist. Der "Antisinn-Strang" enthält eine Sequenz, die zu jener des "Sinnstrangs" komplementär ist.

[0076] Wie hier verwendet, ist ein "Genom in Positivstranganordnung" eines Virus eines, bei dem das Genom, unabhängig davon ob RNA oder DNA, einzelsträngig ist und das ein oder mehrere virale(s) Polypeptid(e) kodiert. Beispiele von positivsträngigen RNA-Viren umfassen Togaviridae, Coronaviridae, Retroviridae, Picornaviridae und Caliciviridae. Umfasst werden auch die Flaviviridae, die zuvor als Togaviridae klassifiziert worden sind. Siehe Fields & Knipe (1986).

[0077] Wie hier verwendet, bezieht sich "Antikörper-enthaltender Körperbestandteil" auf einen Bestandteil eines Körpers eines Individuums, der eine Quelle für die Antikörper von Interesse ist. Antikörper-enthaltende Körperbestandteile sind in diesem Fachgebiet bekannt und umfassen beispielsweise Plasma, Serum, Rückenmarksflüssigkeit, Lymphflüssigkeit, die äußeren Abschnitte der Atemwege, des Darmtrakts und des Urogenitaltrakts, Tränenflüssigkeit, Speichel, Milch, weiße Blutkörperchen und Myelome, sind aber nicht auf diese beschränkt.

[0078] Wie hier verwendet, bezieht sich "gereinigtes HCV" auf eine Präparation von HCV, die von den zellulären Bestandteilen, mit denen das Virus normalerweise assoziiert ist, oder von anderen Arten von Viren, die in dem infizierten Gewebe vorhanden sein könnten, isoliert worden sind. Die Techniken zur Isolierung von Viren sind den Fachleuten auf diesem Gebiet bekannt und umfassen beispielsweise Zentrifugation und Affinitätschromatographie; ein Verfahren zur Herstellung von gereinigten HCV wird nachfolgend diskutiert.

[0079] Der Ausdruck "HCV-Partikel", wie hier verwendet, umfasst das vollständige Virion wie auch Partikel, die Zwischenstufen bei der Virionenbildung darstellen. HCV-Partikel weisen im allgemeinen ein oder mehrere HCV-Proteine, welche(s) mit der HCV-Nukleinsäure assoziiert ist bzw. sind, auf.

[0080] Wie hier verwendet, bezieht sich der Ausdruck "Sonde" auf ein Polynukleotid, welches eine hybride Struktur mit einer Sequenz in einer Zielregion aufgrund von Komplementarität von wenigstens einer Sequenz in der Sonde mit einer Sequenz in der Zielregion bildet. Die Sonde enthält jedoch keine Sequenz, welche komplementär ist zu einer oder mehreren Sequenz(en), die verwendet wird bzw. werden, um die Polymerasekettenreaktion mittels Primer zu starten (primen).

[0081] Wie hier verwendet, bezieht sich der Ausdruck "Zielregion" auf eine Region der Nukleinsäure, die zu amplifizieren und/oder nachzuweisen ist.

[0082] Wie hier verwendet, bezieht sich der Ausdruck "virale RNA", der HCV-RNA mit umfasst, auf RNA aus dem Virusgenom, Fragmente davon, Transkripte davon und davon abgeleitete mutierte Sequenzen.

[0083] Wie hier verwendet, bezieht sich eine "biologische Probe" auf eine Probe von Gewebe oder Flüssigkeit, die aus einem Individuum isoliert worden ist, einschließlich, aber nicht beschränkt auf beispielsweise Plasma, Serum, Rückenmarksflüssigkeit, Lymphflüssigkeit, die äußeren Abschnitte der Haut, der Atemwege, des Darmtrakts und des Urogenitaltrakts, Tränenflüssigkeit, Speichel, Milch, Blutzellen, Tumore, Organe und auch

Proben von Bestandteilen einer in vitro-Zellkultur (einschließlich, aber nicht beschränkt auf konditioniertes Medium, das aus der Vermehrung von Zellen in Zellkulturmedium resultiert, mutmaßlich durch Viren infizierte Zellen, rekombinante Zellen und Zellbestandteile).

II. Beschreibung der Erfindung

[0084] Die praktische Ausführung der Erfindung wird, sofern nicht anders angegeben, herkömmliche Techniken der Molekularbiologie, Mikrobiologie, DNA-Rekombination und Immunologie, die innerhalb des Vermögens der Fachleute auf diesem Gebiet liegen, einsetzen. Solche Techniken werden vollständig in der Literatur erläutert. Siehe z. B. Maniatis, Fitsch & Sambrook, MOLECULAR CLONING; A LABORATORY MANUAL (1982); DNA CLONING, VOLUMES I AND II (Hrsg. D. N. Glover, 1985); OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS (Hrsg. M. J. Gait, 1984); NUCLEIC ACID HYBRIDIZATION (Hrsg. B. D. Hames & S. J. Higgins, 1984); TRANSCRIPTION AND TRANSLATION (Hrsg. B. D. Hames & S. J. Higgins, 1984); ANIMAL CELL CULTURE (Hrsg. R. I. Freshney, 1986); IMMOBILIZED CELLS AND ENZYMES (IRL Press, 1986); B. Perbal, A PRACTICAL GUIDE TO MOLECULAR CLONING (1984); die Reihe METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.); GENE TRANSFER VECTORS FOR MAMMALIAN CELLS (Hrsg. J. H. Miller und M. P. Calos, 1987, Cold Spring Harbor Laboratory), Methods in Enzymology, Band 154 und Band 155 (Hrsg. Wu und Grossman bzw. Wu), Mayer und Walker, Hrsg. (1987), IMMUNOCHEMICAL METHODS IN CELL AND MOLECULAR BIOLOGY (Academic Press, London), Scopes (1987), PROTEIN PURIFICATION: PRINCIPLES AND PRACTICE, 2. Auflage (Springer-Verlag, N. Y.) und HANDBOOK OF EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY, VOLUMES I–IV (Hrsg. D. M. Weir und C. C. Blackwell, 1986). Alle Patente, Patentanmeldungen und Veröffentlichungen, die hier, sowohl weiter oben als auch weiter unten, erwähnt werden, werden hiermit durch Bezugnahme in diese Unterlagen aufgenommen.

[0085] Die nützlichen Materialien und Verfahren der vorliegenden Erfindung werden durch die Bereitstellung einer Familie von Nukleotidsequenzen, die ausgehend von cDNA-Bibliotheken, die HCV-cDNA-Sequenzen enthalten, isoliert worden sind, ermöglicht. Diese cDNA-Bibliotheken wurden von Nukleinsäuresequenzen abgeleitet, die in dem Plasma eines HCV-infizierten Schimpansen vorhanden sind. Über die Konstruktion von einer dieser Bibliotheken, der "c"-Bibliothek (ATCC Nr. 40394) wurde in der EPA-Veröffentlichung Nr. 318 216 berichtet. Mehrere der HCV-cDNA enthaltenden Klone, über die hier berichtet wird, wurden ausgehend von der "c"-Bibliothek erhalten. Obwohl andere Klone, über die hier berichtet wird, ausgehend von anderen HCV-cDNA-Bibliotheken erhalten worden sind, wurde das Vorhandensein von Klonen, welche die Sequenzen enthalten, in der "c"-Bibliothek bestätigt. Wie in der EPA-Veröffentl. Nr. 318 216 diskutiert, ist die Familie von HCV-cDNA-Sequenzen, die ausgehend von der "c"-Bibliothek isoliert worden sind, nicht menschlichem oder Schimpansen-Ursprungs und zeigt keine signifikante Homologie zu Sequenzen, die innerhalb des HBV-Genoms enthalten sind.

[0086] Die Verfügbarkeit der hier beschriebenen HCV-cDNA-Sequenzen erlaubt die Konstruktion von Polynukleotidsonden, die Reagenzien sind, die zum Nachweis viraler Polynukleotide in biologischen Proben, einschließlich Spenderblut, nützlich sind. Es ist beispielsweise ausgehend von den Sequenzen möglich, DNA-Oligomere von ungefähr 8–10 Nukleotiden oder mehr zu synthetisieren, die als Hybridisierungssonden nützlich sind, um das Vorhandensein von HCV-RNA in beispielsweise Spenderblut, Seren von Personen, von denen vermutet wird, dass sie das Virus tragen, oder Zellkultursystemen, in denen das Virus sich repliziert, nachzuweisen. Zusätzlich ermöglichen die cDNA-Sequenzen auch die Gestaltung und Produktion von HCV-spezifischen Polypeptiden, die als Reagenzien zur Diagnose der Anwesenheit von Antikörpern, die während einer HCV-Infektion erzeugt werden, nützlich sind. Antikörper gegen gereinigte Polypeptide, welche sich von den cDNAs ableiten, können auch verwendet werden, um virale Antigene in biologischen Proben, einschließlich beispielsweise Spenderblutproben, Seren von Patienten mit NANBH und in Gewebekultursystemen, die für die HCV-Replikation verwendet werden, nachzuweisen. Darüber hinaus sind die hier offenbarten immunogenen Polypeptide, die in Abschnitten des ORF der in **Fig.** 17 gezeigten HCV-cDNA kodiert werden, auch nützlich für HCV-Screening, Diagnose und Behandlung und zur Erzeugung von Antikörpern, die ebenfalls für diese Zwecke nützlich sind.

[0087] Zusätzlich ermöglichen die hier beschriebenen neuen cDNA-Sequenzen die weitere Charakterisierung des HCV-Genoms. Polynukleotidsonden und Primer, die ausgehend von diesen Sequenzen abgeleitet werden, können verwendet werden, um in cDNA-Bibliotheken vorhandene Sequenzen zu amplifizieren und/oder um cDNA-Bibliotheken auf zusätzliche überlappende cDNA-Sequenzen zu durchmustern, die ihrerseits wieder verwendet werden können, um mehr überlappende Sequenzen zu erhalten. Wie weiter unten und in der EPA-Veröffentl. Nr. 318 216 angegeben, scheint das Genom von HCV aus RNA zu bestehen, die hauptsächlich ein großes offenes Leseraster (ORF), das ein langes Polyprotein kodiert, umfasst.

[0088] Die hier bereitgestellten HCV-cDNA-Sequenzen, die von diesen Sequenzen abgeleiteten Polypeptide und die hier beschriebenen immunogenen Polypeptide wie auch Antikörper, die gegen diese Polypeptide gerichtet sind, sind auch bei der Isolierung und Identifizierung des bzw. der durch Blut übertragenen NABV (BB-NANBV)-Agens bzw. -Agentien nützlich. Beispielsweise können Antikörper, die gegen HCV-Epitope, welche in von den cDNAs abgeleiteten Polypeptiden enthalten sind, gerichtet sind, in Verfahren, die auf Affinitätschromatographie basieren, verwendet werden, um das Virus zu isolieren. Alternativ können die Antikörper verwendet werden, um virale Partikel zu identifizieren, die durch andere Techniken isoliert wurden. Die viralen Antigene und das genomische Material innerhalb der isolierten viralen Partikel kann dann weiter charakterisiert werden.

[0089] Zusätzlich zu dem Obigen ermöglichen die weiter unten bereitgestellten Informationen die Identifizierung von zusätzlichen HCV-Stämmen oder -Isolaten. Die Isolierung und Charakterisierung der zusätzlichen HCV-Stämme oder -Isolate kann bewerkstelligt werden, indem die Nukleinsäuren aus Körperbestandteilen, die virale Partikel und/oder virale RNA enthalten, isoliert werden, unter Verwendung von Polynukleotidsonden, die auf den weiter unten beschriebenen HCV-cDNA-Sonden basieren, cDNA-Bibliotheken erzeugt werden, die Bibliotheken auf Klone, die weiter unten beschriebene HCV-cDNA-Sequenzen enthalten, durchmustert werden und die HCV-cDNAs aus den neuen Isolaten mit den weiter unten beschriebenen cDNAs verglichen werden. Die darin oder in dem Virusgenom kodierten Polypeptide können auf immunologische Kreuzreaktivität unter Einsatz der Polypeptide und Antikörper, die weiter oben beschrieben worden sind, überprüft werden. Stämme oder Isolate, die mit den Parametern von HCV, wie in dem Abschnitt "Definitionen" weiter oben beschrieben, übereinstimmen, sind leicht identifizierbar. Andere Verfahren zur Identifizierung von HCV-Stämmen werden für die Fachleute auf diesem Gebiet basierend auf den hier bereitgestellten Informationen offensichtlich sein.

Isolierung der HCV-cDNA-Sequenzen

[0090] Die neuen HCV-cDNA-Sequenzen, die weiter unten beschrieben werden, erweitern die Sequenz der cDNA zu dem HCV-Genom, über das in der EPA-Veröffentl. Nr. 318 216 berichtet worden ist. Die Sequenzen, die in den Klonen b114a, 18g, ag30a, CA205a, CA290a, CA216a, pi14a, CA167b, CA156e, CA84a und CA59a vorhanden sind, liegen stromaufwärts von der berichteten Sequenz und ergeben, wenn sie zusammengestellt werden, die Nukleotide Nr. –319 bis 1348 der zusammengesetzten HCV-cDNA-Sequenz. (Die negative Zahl an einem Nukleotid gibt dessen Abstand stromaufwärts von dem Nukleotid, mit welchem das mutmaßliche MET-Startcodon beginnt, an). Die zusammengesetzte HCV-cDNA-Sequenz, die die Sequenzen in den vorerwähnten Klonen mit umfasst, ist in **Fig.** 17 gezeigt.

[0091] Die hier beschriebenen neuen HCV-cDNAs wurden ausgehend von einer Anzahl von HCV-cDNA-Bibliotheken, einschließlich der in lambda gt11 vorliegenden "c"-Bibliothek (ATCC Nr. 40394), isoliert. Die HCV-cDNA-Bibliotheken wurden unter Verwendung eines gepoolten Serums aus einem Schimpansen mit einer chronischen HCV-Infektion, der einen hohen Titer des Virus, d. h. wenigstens 106 Schimpansen-infektiöse Dosen/ml (CID/ml), enthielt, konstruiert. Das gepoolte Serum wurde verwendet, um virale Partikel zu isolieren; aus diesen Partikeln isolierte Nukleinsäuren wurden als Matrize bei der Konstruktion von cDNA-Bibliotheken für das Virusgenom verwendet. Die Vorgehensweisen zur Isolierung von mutmaßlichen HCV-Partikeln und zur Konstruktion der HCV-cDNA-Bilbiothek "c" sind in der EPA-Veröffentl. Nr. 318 216 beschrieben. Andere Verfahren zur Konstruktion von HCV-cDNA-Bibliotheken sind in diesem Fachgebiet bekannt und einige von diesen Verfahren werden weiter unten in den Beispielen beschrieben. Die Isolierung der Sequenzen erfolgte durch Durchmustern der Bibliotheken unter Verwendung von synthetischen Polynukleotidsonden, die Sequenzen von diesen wurden ausgehend von der 5'-Region und der 3'-Region der bekannten HCV-cDNA-Sequenz abgeleitet. Die Beschreibung des Verfahrens zur Gewinnung der cDNA-Sequenzen ist hauptsächlich von historischem Interesse. Die resultierenden Sequenzen (und deren komplementäre Sequenzen) werden hier bereitgestellt und die Sequenzen oder ein jeglicher Abschnitt davon könnten unter Verwendung von Syntheseverfahren oder durch eine Kombination von Syntheseverfahren mit einer Gewinnung von partiellen Sequenzen unter Verwendung von Verfahren, welche ähnlich zu jenen, die hier beschrieben werden, sind, hergestellt werden.

Herstellung von viralen Polypeptiden und Fragmenten

[0092] Die Verfügbarkeit von HCV-cDNA-Sequenzen oder davon abgeleiteten Nukleotidsequenzen (einschließlich Abschnitten und Modifizierungen der Sequenz) erlaubt die Konstruktion von Expressionsvektoren, die antigen aktive Regionen des in jedem der beiden Stränge kodierten Polypeptids kodieren. Diese antigen aktiven Regionen können ausgehend von Kapsid- oder Hüllantigenen oder ausgehend von Kernantigenen oder ausgehend von Antigenen, die nicht-strukturell sind, einschließlich beispielsweise Polynukleotid-binden-

den Proteinen, Polynukleotidpolymerase(n) und anderen viralen Proteinen, die für die Replikation und/oder den Zusammenbau des Viruspartikels benötigt werden, abgeleitet werden. Fragmente, welche die gewünschten Polypeptide kodieren, werden von den cDNA-Klonen unter Verwendung eines herkömmlichen Restriktionsverdaus oder durch Syntheseverfahren abgeleitet und werden in Vektoren ligiert, die beispielsweise Abschnitte von Fusionssequenzen, wie β-Galactosidase oder Superoxiddismutase (SOD), vorzugsweise SOD, enthalten. Verfahren und Vektoren, die für die Herstellung von Polypeptiden, die Fusionssequenzen von SOD enthalten, nützlich sind, werden in der Veröffentlichung des Europäischen Patentamts Nr. 0 196 056, die am 01. Oktober 1986 veröffentlicht wurde, beschrieben. Vektoren für die Expression von Fusionspolypeptiden von SOD und HCV-Polypeptiden, die in einer Anzahl von HCV-Klonen kodiert werden, werden weiter unten in den Beispielen beschrieben. Es kann ein jeglicher gewünschter Abschnitt der HCV-cDNA, der ein offenes Leseraster in einem jeden der beiden Sinnstränge enthält, als ein rekombinantes Polypeptid erhalten werden, z. B. als ein reifes oder fusioniertes Protein; alternativ kann ein in der cDNA kodiertes Polypeptid durch chemische Synthese bereitgestellt werden.

[0093] Die das gewünschte Polypeptid kodierende DNA, unabhängig davon, ob in fusionierter oder reifer Form, und ob dieses eine Signalsequenz, um eine Sekretion zu ermöglichen, enthält oder nicht, kann in Expressionsvektoren, die für einen jeglichen passenden Wirt geeignet sind, ligiert werden. Bei der Herstellung von rekombinanten Polypeptiden werden gegenwärtig sowohl eukaryotische als auch prokaryotische Wirtssysteme verwendet, und eine Zusammenfassung von einigen der üblicheren Kontrollsysteme und Wirtszelllinien wird weiter unten gegeben. Das Polypeptid wird dann aus lysierten Zellen oder aus dem Kulturmedium isoliert und bis zu dem Ausmaß, das für dessen beabsichtigte Verwendung benötigt wird, gereinigt. Die Reinigung kann durch Techniken erfolgen, die in diesem Fachgebiet bekannt sind, beispielsweise differenzielle Extraktion, Salzfraktionierung, Chromatographie an Ionenaustauscherharzen, Affinitätschromatographie, Zentrifugation und dergleichen. Siehe beispielsweise Methods in Enzymology für verschiedene Verfahren zur Reinigung von Proteinen. Solche Polypeptide können als Diagnostika verwendet werden oder jene, die neutralisierende Antikörper erzeugen, können zu Impfstoffen formuliert werden. Gegen diese Polypeptide erzeugte Antikörper können ebenfalls als Diagnostika oder für eine passive Immuntherapie verwendet werden. Zusätzlich sind Antikörper gegen diese Polypeptide, wie weiter unten diskutiert, zur Isolierung und Identifizierung von HCV-Partikeln nützlich.

Herstellung von antigenen Polypeptiden und Konjugation mit einem Träger

[0094] Eine antigene Region eines Polypeptids ist im allgemeinen relativ klein – typischerweise 8 bis 10 Aminosäuren oder weniger lang. Fragmente von so wenig wie 5 Aminosäuren können eine antigene Region charakterisieren. Diese Segmente können Regionen eines HCV-Antigens entsprechen. Dementsprechend können unter Verwendung der cDNAs von HCV als Grundlage DNAs, die kurze Abschnitte von HCV-Polypeptiden kodieren, rekombinant entweder als Fusionsproteine oder als isolierte Polypeptide exprimiert werden. Zusätzlich können kurze Aminosäuresequenzen bequem durch chemische Synthese erhalten werden. In Fällen, wo das synthetisierte Polypeptid korrekt konfiguriert ist, so dass das korrekte Epitop bereitgestellt wird, aber zu klein ist, um immunogen zu sein, kann das Polypeptid mit einem geeigneten Träger verknüpft werden.

[0095] Es sind eine Anzahl von Techniken zur Erzielung einer solchen Verknüpfung in diesem Fachgebiet bekannt, einschließlich der Bildung von Disulfid-Verknüpfungen unter Verwendung von N-Succinimidyl-3-(2-pyridylthio)propionat (SPDP) und Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexan-1-carboxylat (SMCC), erhalten von der Pierce Company, Rockford, Illinois, (wenn dem Peptid eine Sulfhydrylgruppe fehlt, kann diese durch Addition eines Cysteinrests bereitgestellt werden). Diese Reagenzien erzeugen zwischen sich selbst und Peptid-Cysteinresten an einem Protein eine Disulfid-Verknüpfung und eine Amidverknüpfung durch die ε-Aminogruppe an einem Lysin oder eine andere freie Aminogruppe in dem anderen. Es sind verschiedene derartige Disulfid/Amid-bildende Mittel bekannt. Siehe beispielsweise Immun Rev. (1982) 62: 185. Andere bifunktionale Kopplungsmittel bilden einen Thioether anstelle einer Disulfid-Verknüpfung. Viele dieser Thioether-bildenden Mittel sind kommerziell erhältlich und umfassen reaktive Ester von 6-Maleimidocapronsäure, 2-Bromessigsäure, 2-Iodessigsäure, 4-(N-Maleimidomethyl)cyclohexan-1-carbonsäure und dergleichen. Die Carboxylgruppen können aktiviert werden, indem diese mit Succinimid oder dem Natriumsalz von 1-Hydroxy-2-nitro-4-sulfonsäure kombiniert werden. Zusätzliche Verfahren zur Kopplung von Antigenen setzen das Rotavirus/"binding peptide"-System, welches in der EPA-Veröffentlichung Nr. 259 149, deren Offenbarung unter Bezugnahme in diese Unterlagen aufgenommen wird, beschrieben wird, ein. Die vorangegangene Liste soll nicht als erschöpfend verstanden werden und es können selbstverständlich Modifizierungen der genannten Verbindungen verwendet werden.

[0096] Es kann ein jeglicher Träger verwendet werden, der selbst keine Produktion von Antikörpern, die für

den Wirt schädlich sind, induziert. Geeignete Träger sind typischerweise große, langsam metabolisierte Makromoleküle, wie Proteine, Polysaccharide, wie z. B. mit Latex funktionalisierte Sepharose, Agarose, Cellulose, Cellulosekügelchen und dergleichen, polymere Aminosäuren, wie Polyglutaminsäure, Polylysin und dergleichen, Aminosäure-Copolymere und inaktive Viruspartikel. Besonders nützliche Proteinsubstrate sind Serumalbumine, Schlüssellochnapfschnecken-Hämocyanin, Immunglobulinmoleküle, Thyroglobulin, Ovalbumin, Tetanus-Toxoid und andere Proteine, die den Fachleuten auf diesem Gebiet wohlbekannt sind.

[0097] Zusätzlich zu viralen Proteinen von voller Länge sind Polypeptide, die verkürzte HCV-Aminosäuresequenzen, welche wenigstens ein virales Epitop kodieren, umfassen, nützliche immunologische Reagenzien. Polypeptide, die solche verkürzten Sequenzen umfassen, können beispielsweise als Reagenzien in einem Immunoassay verwendet werden. Diese Polypeptide sind auch Kandidaten-Untereinheits-Antigene in Zusammensetzungen für eine Antiserum-Produktion oder Impfstoffe. Obwohl diese verkürzten Sequenzen durch verschiedene bekannte Behandlungen von nativem viralem Protein hergestellt werden können, ist es im allgemeinen bevorzugt, synthetische oder rekombinante Polypeptide, die eine HCV-Sequenz umfassen, herzustellen. Polypeptide, die diese verkürzten HCV-Sequenzen umfassen, können vollständig aus HCV-Sequenzen (einem oder mehreren Epitopen, die entweder zusammenhängen oder nicht zusammenhängen) oder HCV-Sequenzen und heterologen Sequenzen in einem Fusionsprotein aufgebaut sein. Nützliche heterologe Sequenzen umfassen Sequenzen, die eine Sekretion aus einem rekombinanten Wirt ermöglichen, die immunologische Reaktivität des HCV-Epitops bzw. der HCV-Epitope verstärken oder die Kopplung des Polypeptids an einen Immunoassay-Träger oder einen Impfstoffträger erleichtern. Siehe z. B. EPA-Veröffentl. Nr. 116 201; U.S.-Patent Nr. 4,722,840; EPA-Veröffentl. Nr. 259 149; U.S.-Patent Nr. 4,629,783, deren Offenbarungen unter Bezugnahme in diese Unterlagen aufgenommen werden.

[0098] Die Größe von Polypeptiden, welche die verkürzten HCV-Sequenzen umfassen, kann stark variieren, wobei die minimale Größe eine Sequenz von ausreichender Größe ist, um ein HCV-Epitop bereitzustellen, während die maximale Größe nicht kritisch ist. Aus Bequemlichkeitsgründen ist die maximale Größe üblicherweise nicht substantiell größer als jene, die erforderlich ist, um die gewünschten HCV-Epitope und Funktion(en) der heterologen Sequenzen, sofern es solche gibt, bereitzustellen. Typischerweise wird die verkürzte HCV-Aminosäuresequenz von ungefähr 5 bis ungefähr 100 Aminosäuren Länge reichen. Noch typischer wird die HCV-Sequenz jedoch maximal ungefähr 50 Aminosäuren lang sein, vorzugsweise maximal ungefähr 30 Aminosäuren lang. Es ist üblicherweise wünschenswert, HCV-Sequenzen von wenigstens ungefähr 10, 12 oder 15 Aminosäuren bis zu einem Maximum von ungefähr 20 oder 25 Aminosäuren auszuwählen.

[0099] Verkürzte HCV-Aminosäuresequenzen, die Epitope umfassen, können auf verschiedene Weisen identifiziert werden. Beispielsweise kann die gesamte virale Proteinsequenz durchgemustert werden, indem eine Reihe von kurzen Peptiden hergestellt wird, die zusammen die gesamte Proteinsequenz abdecken. Ein Beispiel für ein Antigenitäts-Durchmusterung der Regionen des HCV-Polyproteins ist weiter unten gezeigt. Zusätzlich wäre es, wenn man mit beispielsweise 100-meren Polypeptiden beginnt, Routine, jedes Polypeptid auf das Vorhandensein von einem oder mehreren Epitop(en), welche(s) eine gewünschte Reaktivität zeigt bzw. zeigen, zu testen und dann fortschreitend kleinere und überlappende Fragmente ausgehend von einem identifizierten 100-mer zu testen, um das Epitop von Interesse zu kartieren.

[0100] Das Durchmustern von solchen Peptiden in einem Immunoassay liegt innerhalb des Vermögens der Fachleute auf diesem Gebiet. Es ist auch bekannt, eine Computeranalyse einer Proteinsequenz durchzuführen, um potentielle Epitope zu identifizieren, und dann Oligopeptide, welche die identifizierten Regionen umfassen, für ein Screening herzustellen. Eine solche Computeranalyse der HCV-Aminosäuresequenz ist in **Fig.** 20 gezeigt, wo der hydrophile/hydrophobe Charakter über dem Antigen-Index gezeigt ist. Die Aminosäuren sind ausgehend von dem MET-Startcodon (Position 1) nummeriert, wie in **Fig.** 17 gezeigt. Es versteht sich für die Fachleute auf diesem Gebiet, dass eine solche Computeranalyse der Antigenität ein Epitop, das tatsächlich existiert, nicht immer identifiziert und auch eine Region des Proteins inkorrekt als eine solche, die ein Epitop enthält, identifizieren kann.

[0101] Beispiele von HCV-Aminosäuresequenzen, die nützlich sein können, die ausgehend von Expressionsvektoren, welche die Klone 5-1-1, 81, CA74a, 35f, 279a, C36, C33b, CA290a, C8f, C12f, 14c, 15e, C25c, C33c, C33f, 33g, C39c, C40b, CA167b umfassen, exprimiert werden, werden weiter unten beschrieben. Andere Beispiele von HCV-Aminosäuresequenzen, die wie hier beschrieben nützlich sein können, werden nachfolgend erläutert. Es versteht sich, dass diese Peptide nicht notwendigerweise ein Epitop präzise kartieren und auch HCV-Sequenz enthalten können, die nicht immunogen ist. Diese nicht-immunogenen Abschnitte der Sequenz können, wie oben beschrieben, unter Verwendung von herkömmlichen Techniken definiert und aus den beschriebenen Sequenzen deletiert werden. Ferner können zusätzliche verkürzte HCV-Aminosäuresequenzen,

die ein Epitop umfassen oder immunogen sind, identifiziert werden, wie oben beschrieben. Die folgenden Sequenzen werden anhand der Aminosäurenummer (d. h. "AAn") angegeben, wobei n die Aminosäurenummer, wie in **Fig.** 17 gezeigt, ist,:
AA1-AA25, AA1-AA50; AA1-AA84; AA9-AA177; AA1-AA10; AA5-AA20; AA35-AA45; AA50-AA100; AA40-AA90; AA45-AA65; AA65-AA75; AA80-AA90; AA99-AA120; AA95-AA110; AA105-AA120; AA100-AA150; AA150-AA200; AA155-AA170; AA190-AA210; AA200-AA250; AA220-AA240; AA245-AA265; AA250-AA300; AA290-AA330; AA290-AA305; AA300-AA350; AA310-AA330; AA350-AA400; AA380-AA395; AA405-AA495; AA400-AA450; AA405-AA415; AA415-AA425; AA425-AA435; AA437-AA582; AA440-AA460.

[0102] Die obigen HCV-Aminosäuresequenzen können als diskrete Peptide hergestellt werden oder in ein größeres Polypeptid eingebaut werden und können Verwendung, wie hier beschrieben, finden. Zusätzliche Polypeptide, die verkürzte HCV-Sequenzen umfassen, werden in den Beispielen beschrieben.

[0103] Die beobachtete Verwandtschaft der mutmaßlichen Polyproteine von HCV und den Flaviviren ermöglicht gewisse Vorhersagen über die mutmaßlichen Domänen der HCV-"Nicht-Struktur" (NS)-Proteine. Die Lage der individuellen NS-Proteine in dem mutmaßlichen Flavivirus-Vorläufer-Polyprotein sind recht gut bekannt. Darüber hinaus fallen diese mit beobachteten größeren Schwankungen im Hydrophobieprofil des Polyproteins zusammen. Es ist ermittelt worden, dass NS5 der Flaviviren die Virionenpolymerase kodiert und dass NS1 einem Komplementfixierungsantigen entspricht, von dem gezeigt worden ist, dass es ein wirksamer Impfstoff bei Tieren ist. Unlängst ist gezeigt worden, dass eine flavivirale Proteasefunktion in NS3 existiert. Aufgrund der beobachteten Ähnlichkeiten zwischen HCV und den Flaviviren, die weiter unten beschrieben werden, sind Ableitungen, welche die ungefähre Lage der entsprechenden Proteindomänen und Funktionen in dem HCV-Polyprotein betreffen, möglich. Die Expression von Polypeptiden, die diese Domänen enthalten, in verschiedenen rekombinanten Wirtszellen, einschließlich beispielsweise Bakterien-, Hefe-, Insekten- und Vertebratenzellen, sollte wichtige immunologische Reagenzien erzeugen, die für Diagnose, Nachweis und Impfstoffe verwendet werden können.

[0104] Obwohl die Nicht-Struktur-Protein-Regionen der mutmaßlichen Polyproteine des hier beschriebenen HCV-Isolats und von Flaviviren eine gewisse Ähnlichkeit aufzuweisen scheinen, gibt es weniger Ähnlichkeit zwischen den mutmaßlichen Strukturregionen, die in Richtung des N-Terminus gelegen sind. In dieser Region gibt es eine größere Sequenzabweichung und zusätzlich zeigt das hydrophobe Profil der beiden Regionen weniger Ähnlichkeit. Diese "Abweichung" oder "Divergenz" beginnt in der N-terminalen Region der mutmaßlichen NS1-Domäne in HCV und erstreckt sich bis zu dem mutmaßlichen N-Terminus. Nichtsdestoweniger kann es nach wie vor möglich sein, die ungefähren Lagen der mutmaßlichen Nukleokapsid-(N-terminale basische Domäne) und E-(im allgemeinen hydrophoben) Domänen innerhalb des HCV-Polyproteins vorherzusagen. In den Beispielen basieren die Vorhersagen auf den in dem hydrophoben Profil des HCV-Polyproteins beobachteten Veränderungen und auf einer Kenntnis der Lage und des Charakters der flaviviralen Proteine. Ausgehend von diesen Vorhersagen kann es möglich sein, ungefähre Regionen des HCV-Polyproteins zu identifizieren, die nützlichen immunologischen Reagenzien entsprechen könnten. Beispielsweise ist bekannt, dass die E- und NS1-Proteine von Flaviviren Wirksamkeit als schützende Impfstoffe aufweisen. Diese Regionen wie auch einige in dem hier beschriebenen HCV-Isolat, von denen gezeigt wird, dass sie antigen sind, beispielsweise jene innerhalb der mutmaßlichen NS3, C und NS5 usw., sollten auch diagnostische Reagenzien bereitstellen. Darüber hinaus könnte die Lokalisierung und Expression von viruskodierten Enzymen auch die Evaluierung von antiviralen Enzymhemmern, d. h. beispielsweise Inhibitoren, die Enzymaktivität aufgrund einer Wechselwirkung mit dem Enzym selbst verhindern, oder Substanzen, die eine Expression des Enzyms verhindern können (beispielsweise Antisinn-RNA oder andere Arzneimittel, die mit der Expression interferieren), ermöglichen.

Herstellung von hybriden Partikel-Immunogenen, die HCV-Epitope enthalten

[0105] Die Immunogenität der Epitope von HCV kann auch verstärkt werden, indem diese in Säugetier- oder Hefesystemen fusioniert mit oder zusammengefügt mit Partikel-bildenden Proteinen, wie beispielsweise jenem, das mit dem Hepatitis B-Oberflächenantigen assoziiert ist, hergestellt werden. Konstrukte, in denen das NANBV-Epitop direkt mit den das Partikel-bildende Protein kodierenden Sequenzen verknüpft ist, erzeugen Hybride, die im Hinblick auf das HCV-Epitop immunogen sind. Zusätzlich umfassen alle hergestellten Vektoren für HBV spezifische Epitope, die verschiedene Grade an Immunogenität aufweisen, wie beispielsweise das pre-S-Peptid. Folglich sind Partikel, die ausgehend von Partikel-bildendem Protein konstruiert werden und die HCV-Sequenzen umfassen, bezüglich HCV und HBV immunogen.

[0106] Es ist gezeigt worden, dass das Hepatitis-Oberflächenantigen (HBSAg) in S. cerevisiae (Valenzuela et al. (1982)) wie auch beispielsweise in Säugetierzellen (Valenzuela, P., et al. (1984)) gebildet und zu Partikeln

zusammengebaut wird. Es ist gezeigt worden, dass die Bildung solcher Partikel die Immunogenität der Monomer-Untereinheit erhöht. Die Konstrukte können auch das immundominante Epitop von HBSAg, das die 55 Aminosäuren der Prä-Oberflächen-(pre-S-)Region umfasst, einschließen. Neurath et al. (1984). In Hefe exprimierbare Konstrukte des pre-S-HBSAg-Partikels werden in EPA 174 444, veröffentlicht am 19. März 1986, offenbart; Hybride, die heterologe virale Sequenzen für eine Expression in Hefe umfassen, werden in EPA 175 261, veröffentlicht am 26. März 1966, offenbart. Diese Konstrukte können auch in Säugetierzellen, wie Eierstockzellen des chinesischen Hamsters (CHO-Zellen), unter Verwendung eines SV40-Dihydrofolatreduktase-Vektors exprimiert werden (Michelle et al. (1984))

[0107] Zusätzlich können Abschnitte der das Partikel-bildende Protein kodierenden Sequenz durch Codons, die ein HCV-Epitop kodieren, ersetzt werden. Bei dieser Ersetzung können Regionen, die nicht benötigt werden, um die Aggregation der Einheiten zur Bildung von immunogenen Partikeln in Hefe oder Säugetieren zu vermitteln, deletiert werden, wodurch zusätzliche antigene HBV-Stellen zur Verhinderung einer Kompetition mit dem HCV-Epitop eliminiert werden.

Herstellung von Impfstoffen

[0108] Impfstoffe können aus einem oder mehreren immunogenen, von HCV-cDNA, einschließlich der in den Beispielen beschriebenen cDNA-Sequenzen, abgeleiteten Polypeptiden hergestellt werden. Die beobachtete Homologie zwischen HCV und Flaviviren liefert Information bezüglich der Polypeptide, die als Impfstoffe am wirkungsvollsten sein könnten wie auch bezüglich der Regionen des Genoms, in denen sie kodiert werden. Die allgemeine Struktur des Flavivirus-Genoms wird in Rice et al. (1986) diskutiert. Es wird angenommen, dass die genomische RNA der Flaviviren die einzige virusspezifische mRNA-Spezies ist, und diese wird in drei virale Strukturproteine, d. h. C, M und E, wie auch zwei große Nicht-Struktur-Proteine, NS4 und NS5, und einen komplexen Satz von kleineren Nicht-Struktur-Proteinen translatiert. Es ist bekannt, dass hauptsächliche neutralisierende Epitope für Flaviviren in dem E (Hüll)-Protein liegen (Roehrig (1986)). Dementsprechend könnten Impfstoffe rekombinante Polypeptide enthalten, die Epitope von HCV-E enthalten. Diese Polypeptide könnten in Bakterien-, Hefe- oder Säugetierzellen exprimiert oder könnten alternativ aus Viruspräparationen isoliert werden. Es wird ebenfalls antizipiert, dass die anderen Strukturproteine ebenfalls Epitope enthalten könnten, die schützende anti-HCV-Antikörper erzeugen. Folglich könnten Polypeptide, welche die Epitope von E, C und M enthalten, ebenfalls in HCV-Impfstoffen verwendet werden, entweder allein oder in Kombination.

[0109] Zusätzlich zu dem Obigen ist gezeigt worden, dass eine Immunisierung mit NS1 (Nicht-Struktur-Protein 1) zu einem Schutz gegen Gelbfieber führt (Schlesinger et al. (1986)). Dies trifft zu, obwohl die Immunisierung keine neutralisierenden Antikörper erzeugt. Dementsprechend ist es wahrscheinlich, insbesondere da dieses Protein unter Flaviviren stark konserviert zu sein scheint, dass HCV-NS1 ebenfalls gegen eine HCV-Infektion schützen wird. Darüber hinaus zeigt dies auch, dass Nicht-Struktur-Proteine einen Schutz gegen virale Pathogenität bewirken können, sogar wenn sie keine Produktion von neutralisierenden Antikörpern hervorrufen.

[0110] Die in den Beispielen bereitgestellten Informationen betreffend die Immunogenität der ausgehend von klonierten HCV-cDNAs, welche die verschiedenen Regionen des HCV-ORF überspannen, exprimierten Polypeptiden erlauben auch Vorhersagen betreffend deren Verwendung in Impfstoffen.

[0111] Angesichts des Obigen können multivalente Impfstoffe gegen HCV ein oder mehrere Epitope aus einem oder mehreren Strukturproteinen und/oder ein oder mehrere Epitope aus einem oder mehreren Nicht-Struktur-Proteinen umfassen. Diese Impfstoffe können beispielsweise rekombinante HCV-Polypeptide und/oder Polypeptide, die aus den Virionen isoliert werden, umfassen. Insbesondere wird an Impfstoffe gedacht, die ein oder mehrere der folgenden HCV-Proteine oder davon abgeleitete Untereinheits-Antigene umfassen: E, NS1, C, NS2, NS3, NS4 und NS5. Besonders bevorzugt sind Impfstoffe, die E und/oder NS1 oder Untereinheiten davon umfassen.

[0112] Die Herstellung von Impfstoffen, die ein oder mehrere immunogene(s) Polypeptid(e) als aktive Bestandteile enthalten, ist den Fachleuten auf diesem Gebiet bekannt. Solche Impfstoffe werden typischerweise als injizierbare Präparate, entweder als flüssige Lösungen oder Suspensionen hergestellt; feste Formen, die für eine Auflösung in oder Suspendierung in Flüssigkeit vor einer Injektion geeignet sind, können ebenfalls hergestellt werden. Die Präparation kann auch emulgiert werden oder das Protein in Liposomen verkapselt werden. Die aktiven immunogenen Bestandteile werden oftmals mit Vehikeln (Trägern) gemischt, die pharmazeutisch annehmbar und mit dem aktiven Bestandteil verträglich sind. Geeignete Vehikel (Träger) sind beispielsweise Wasser, Kochsalzlösung, Dextrose, Glycerol, Ethanol oder dergleichen und Kombinationen davon. Zu-

sätzlich kann der Impfstoff, sofern gewünscht, geringere Mengen von Hilfssubstanzen, wie Benetzungs- oder Emulgiermittel, pH-Pufferungsmittel und/oder Adjuvantien enthalten, die die Wirksamkeit des Impfstoffs erhöhen. Beispiele von Adjuvantien, die wirksam sein können, umfassen, sind aber nicht beschränkt auf: Aluminiumhydroxid, N-Acetylmuramyl-L-threonyl-D-isoglutamin (thr-MDP), N-Acetyl-nor-muramyl-L-alanyl-D-isoglutamin (CGP 11637, bezeichnet als nor-MDP), N-Acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-L-alanin-2-(1'-2'-dipalmitoyl-sn-glycerol-3-hydroxyphosphoryloxy)ethylamin (CGP 19835A, bezeichnet als MTP-PE), und RIBI, das drei aus Bakterien extrahierte Komponenten, Monophosphoryl-Lipid A, Trehalosedimycolat und Zellwandgerüst (MPL + TDM + CWS), in einer 2%-igen Squalen/Tween 80-Emulsion enthält. Die Wirksamkeit eines Adjuvans kann bestimmt werden, indem die Menge von Antikörpern, die gegen ein immunogenes Polypeptid, das eine antigene HCV-Sequenz enthält, gerichtet sind, die aus einer Verabreichung dieses Polypeptids in Impfstoffen, die auch die verschiedenen Adjuvantien umfassen, resultieren, gemessen wird.

[0113] Die Impfstoffe werden herkömmlicherweise parenteral, durch Injektion beispielsweise entweder subkutan oder intramuskulär verabreicht. Zusätzliche Formulierungen, die für andere Verabreichungsweisen geeignet sind, umfassen Suppositorien und in einigen Fällen orale Formulierungen. Für Suppositorien können traditionelle Bindemittel und Träger beispielsweise Polyalkylenglycole oder Triglyceride umfassen; solche Suppositorien können ausgehend von Mischungen, die den aktiven Bestandteil im Bereich von 0,5% bis 10%, vorzugsweise 1% bis 2% enthalten, hergestellt werden. Orale Formulierungen umfassen solche normalerweise eingesetzten Vehikel (Träger), wie beispielsweise pharmazeutische Qualitäten von Mannitol, Lactose, Stärke, Magnesiumstearat, Natriumsaccharin, Cellulose, Magnesiumcarbonat und dergleichen. Diese Zusammensetzungen nehmen die Form von Lösungen, Suspensionen, Tabletten, Pillen, Kapseln, Formulierungen für eine länger andauernde Freisetzung oder Pulvern ein und enthalten 10%–95% aktiven Bestandteil, vorzugsweise 25%–70%.

[0114] Die Proteine können zu dem Impfstoff als neutrale oder Salzformen formuliert werden. Pharmazeutisch annehmbare Salze umfassen die Säureadditionssalze (gebildet mit freien Aminogruppen des Peptids), die mit anorganischen Säuren, wie beispielsweise Salzsäure oder Phosphorsäure, oder solchen organischen Säuren, wie Essigsäure, Oxalsäure, Weinsäure, Maleinsäure und dergleichen, hergestellt werden. Mit den freien Carboxylgruppen gebildete Salze können auch ausgehend von anorganischen Basen, wie beispielsweise Natrium-, Kalium-, Ammonium-, Calcium- oder Eisen(III)-hydroxiden, und solchen organischen Basen, wie Isopropylamin, Trimethylamin, 2-Ethylaminoethanol, Histidin, Procain und dergleichen abgeleitet werden.

Dosierung und Verabreichung von Impfstoffen

[0115] Die Impfstoffe werden auf eine Weise verabreicht, die mit der Dosierungsformulierung verträglich ist, und in einer solchen Menge, die prophylaktisch und/oder therapeutisch wirksam sein wird. Die zu verabreichende Menge, die im allgemeinen im Bereich von 5 Mikrogramm bis 250 Mikrogramm Antigen pro Dosis liegt, hängt von dem zu behandelnden Patienten, dem Vermögen des Immunsystems des Patienten, Antikörper zu synthetisieren, und dem gewünschten Ausmaß des Schutzes ab. Genaue Mengen des aktiven Bestandteils, die verabreicht werden müssen, können von der Beurteilung des behandelnden Arztes abhängen und können für jeden Patienten eigentümlich sein.

[0116] Der Impfstoff kann in einem eine einzelne Dosis umfassenden Behandlungsplan oder vorzugsweise in einem eine Mehrzahl von Dosen umfassenden Behandlungsplan verabreicht werden. Ein eine Mehrzahl von Dosen umfassender Behandlungsplan ist einer, bei dem ein primärer Impfverlauf mit 1–10 separaten Dosen erfolgen kann, gefolgt von weiteren Dosen, die in nachfolgenden Zeitabständen verabreicht werden, welche benötigt werden, um die Immunantwort aufrecht zu erhalten oder erneut zu verstärken, beispielsweise nach 1–4 Monaten für eine zweite Dosis, und, sofern erforderlich, eine oder mehrere nachfolgende Dosis bzw. Dosen nach mehreren Monaten. Der Dosierungsplan wird auch, wenigstens zum Teil, durch den Bedarf des Individuums bestimmt werden und von der Beurteilung des behandelnden Arztes abhängen.

[0117] Zusätzlich kann der das oder die immunogene(n) HCV-Antigen(e) enthaltende Impfstoff in Verbindung mit anderen immunregulatorischen Mitteln, beispielsweise Immunglobulinen, verabreicht werden.

Herstellung von Antikörpern gegen HCV-Epitope

[0118] Die wie oben beschrieben hergestellten immunogenen Polypeptide werden verwendet, um Antikörper, sowohl polyklonale als auch monoklonale, herzustellen. Wenn polyklonale Antikörper gewünscht werden, wird ein ausgewähltes Säugetier (z. B. Maus, Kaninchen, Ziege, Pferd usw.) mit einem immunogenen Polypeptid, das ein oder mehrere HCV-Epitop(e) trägt, immunisiert. Serum von dem immunisierten Tier wird gesammelt

und gemäß bekannten Verfahren behandelt. Wenn polyklonale Antikörper gegen ein HCV-Epitop enthaltendes Serum Antikörper gegen andere Antigene enthält, können die polyklonalen Antikörper durch Immunaffinitätschromatographie gereinigt werden. Techniken zur Herstellung und Verarbeitung von polyklonalen Antiseren sind in diesem Fachgebiet bekannt, siehe beispielsweise Mayer und Walker (1987).

[0119] Alternativ können polyklonale Antikörper aus einem Säugetier isoliert werden, das zuvor mit HCV infiziert worden ist. Ein Beispiel für ein Verfahren zur Reinigung von Antikörpern gegen HCV-Epitope ausgehend von Serum aus einem infizierten Individuum, das auf Affinitätschromatographie basiert und ein Fusionspolypeptid aus SOD und einem innerhalb des cDNA-Klons 5-1-1 kodierten Polypeptid einsetzt, wird in der EPA-Veröffentl. Nr. 318 216 dargestellt.

[0120] Gegen HCV-Epitope gerichtete monoklonale Antikörper können durch einen Fachmann auf diesem Gebiet ebenfalls leicht hergestellt werden. Die allgemeine Methodik zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern durch Hybridome ist wohlbekannt. Unsterbliche, Antikörper-produzierende Zelllinien können durch Zellfusion und auch durch andere Techniken, wie direkte Transformation von B-Lymphozyten mit onkogener DNA oder Transfektion mit Epstein-Barr-Virus erzeugt werden. Siehe z. B. M. Schreier et al. (1980); Hammerling et al. (1981); Kennett et al. (1980); siehe auch U.S.-Patente Nr. 4,341,761, 4,399,121, 4,427,783, 4,444,887, 4,466,917, 4,472,500, 4,491,632 und 4,493,890. Gruppen von monoklonalen Antikörpern, die gegen HCV-Epitope produziert worden sind, können auf verschiedene Eigenschaften durchmustert werden, d. h. auf Isotyp, Epitopaffinität usw.

[0121] Sowohl monoklonale als auch polyklonale Antikörper, die gegen HCV-Epitope gerichtet sind, sind besonders nützlich bei der Diagnose und jene, die neutralisierend wirken, sind bei einer passiven Immuntherapie nützlich. Es können monoklonale Antikörper insbesondere verwendet werden, um Anti-Idiotyp-Antikörper zu erzeugen.

[0122] Anti-Idiotyp-Antikörper sind Immunglobuline, die ein "internes Bild" ("internal image") des Antigens des infektiösen Agens, gegen dem Schutz gewünscht wird, tragen. Siehe beispielsweise Nisonoff, A., et al. (1981) und Dreesman et al. (1985).

[0123] Techniken zur Erzeugung von Anti-Idiotyp-Antikörpern sind in diesem Fachgebiet bekannt. Siehe beispielsweise Grzych (1985), MacNamara et al. (1984) und Uytdehaag et al. (1985). Diese Anti-Idiotyp-Antikörper können auch für Behandlung und/oder Diagnose von NANBH wie auch für eine Ermittlung der immunogenen Regionen von HCV-Antigenen nützlich sein.

[0124] Es wäre für eine Fachmann auf diesem Gebiet ebenfalls ersichtlich, dass verschiedene Arten von gegen HCV-Epitope gerichteten Antikörpern produziert werden können. Wie hier verwendet, bezieht sich der Begriff "Antikörper" auf ein Polypeptid oder eine Gruppe von Polypeptiden, die wenigstens eine Antikörper-Bindungsstelle umfassen. Eine "Antikörper-Bindungsstelle" oder "Bindungsdomäne" wird aufgrund der Faltung von variablen Domänen eines oder mehrerer Antikörpermolekül(e) unter Bildung von dreidimensionalen Bindungsräumen mit einer inneren Oberflächengestalt und Ladungsverteilung, die zu den Charakteristiken eines Epitops eines Antigens komplementär sind, was eine immunologische Reaktion mit dem Antigen erlaubt, gebildet. Eine Antikörper-Bindungsstelle kann aus einer schweren und/oder einer leichten Kette-Domäne (VH bzw. VL), die hypervariable Schleifen bilden, die zur Antigenbindung beitragen, gebildet werden. Der Begriff "Antikörper" umfasst beispielsweise Vertebraten-Antikörper, hybride Antikörper, chimäre Antikörper, veränderte Antikörper, univalente Antikörper, die Fab-Proteine und aus einzelnen Domänen bestehende Antikörper.

[0125] Ein "aus einer einzelnen Domäne bestehender Antikörper" (dAb) ist ein Antikörper, der eine VH-Domäne umfasst, die immunologisch mit einem bezeichneten Antigen reagiert. Ein dAB enthält keine VL-Domäne, kann aber andere Antigenbindungsdomänen, die in Antikörpern bekanntermaßen vorkommen, beispielsweise die kappa- und lambda-Domänen, enthalten. Verfahren zur Herstellung von dABs sind in diesem Fachgebiet bekannt. Siehe beispielsweise Ward et al. (1989).

[0126] Antikörper können auch VH- und VL-Domänen umfassen wie auch andere bekannte Antigenbindungsdomänen. Beispiele für diese Arten von Antikörpern und Verfahren zu deren Herstellung sind in diesem Fachgebiet bekannt (siehe z. B. U.S.-Patent Nr. 4,816,467, das unter Bezugnahme in diese Unterlagen aufgenommen wird) und umfassen die Folgenden. Beispielsweise bezieht sich "Vertebraten-Antikörper" auf Antikörper, die Tetramere oder Aggregate davon sind, die leichte und schwere Ketten umfassen, die üblicherweise in einer "Y"-Konfiguration aggregiert sind und die kovalente Verknüpfungen zwischen den Ketten aufweisen können oder nicht. In Vertebraten-Antikörpern sind die Aminosäuresequenzen aller Ketten eines bestimmten Antikör-

pers homolog zu den Ketten, die in einem Antikörper gefunden werden, der durch den Lymphozyten, der jenen Antikörper in situ produziert, oder in vitro (beispielsweise in Hybridomen) produziert wird. Vertebraten-Antikörper umfassen typischerweise native Antikörper, beispielsweise gereinigte polyklonale Antikörper und monoklonale Antikörper. Beispiele für die Verfahren zur Herstellung von diesen Antikörpern werden nachfolgend beschrieben.

[0127] "Hybride Antikörper" sind Antikörper, in denen ein Paar von schweren und leichten Ketten homolog ist zu jenen in einem ersten Antikörper, während das andere Paar schwerer und leichter Ketten homolog ist zu jenen in einem unterschiedlichen zweiten Antikörper. Typischerweise wird jedes dieser beiden Paare unterschiedliche Epitope, insbesondere auf unterschiedlichen Antigenen, binden. Dies führt zu der Eigenschaft einer "Divalenz" oder "Zweiwertigkeit", d. h. der Fähigkeit, zwei Antigene gleichzeitig zu binden. Solche Hybride können auch unter Verwendung von chimären Ketten gebildet werden, wie nachfolgend erläutert wird.

[0128] "Chimäre Antikörper" sind Antikörper, bei denen die schweren und/oder leichten Ketten Fusionsproteine sind. Typischerweise stammt die konstante Domäne der Ketten aus einer speziellen Spezies und/oder Klasse und die variablen Domänen stammen aus einer unterschiedlichen Spezies und/oder Klasse. Es wird auch jeder Antikörper umfasst, bei dem eine oder beide der schweren oder leichten Ketten gebildet wird bzw. werden aus Kombinationen von Sequenzen, welche die Sequenzen in Antikörpern aus unterschiedlichen Quellen nachahmen, unabhängig davon, ob diese Quellen unterschiedliche Klassen oder unterschiedliche Herkunftsspezies sind, und unabhängig davon, ob die Fusionsstelle sich an der Grenze zwischen der variablen und konstanten Domäne befindet. Es ist dementsprechend möglich, Antikörper zu produzieren, bei denen weder die konstante noch die variable Region bekannte Antikörpersequenzen nachahmen. Es wird dann möglich, beispielsweise Antikörper zu konstruieren, deren variable Region eine höhere spezifische Affinität für ein bestimmtes Antigen aufweist oder dessen konstante Region eine verstärkte Komplementanheftung auslösen kann, oder um andere Verbesserungen bei Eigenschaften, die eine bestimmte konstante Region aufweist, zu bewirken.

[0129] Ein anderes Beispiel sind "veränderte Antikörper", was sich auf Antikörper bezieht, bei denen die natürlicherweise in einem Vertebraten-Antikörper vorkommende Aminosäuresequenz variiert worden ist. Unter Einsatz von DNA-Rekombinationstechniken können Antikörper neu gestaltet werden, um gewünschte Eigenschaften zu erhalten. Die möglichen Variationen sind zahlreich und reichen von der Veränderung von einer oder mehreren Aminosäuren bis zu der vollständigen Neugestaltung einer Region, beispielsweise der konstanten Region. Veränderungen in der konstanten Region, im allgemeinen um gewünschte zelluläre Prozess-Eigenschaften, z. B. Veränderungen bei der Komplementanheftung, Wechselwirkung mit Membranen und anderen Effektorfunktionen, zu erzielen. Veränderungen in der variablen Region können vorgenommen werden, um Antigenbindungseigenschaften zu verändern. Der Antikörper kann auch gentechnisch so modifiziert werden, dass die spezifische Abgabe eines Moleküls oder einer Substanz an eine spezielle Zelle oder einen speziellen Gewebeort unterstützt wird. Die gewünschten Veränderungen können durch bekannte Techniken in der Molekularbiologie, z. B. Rekombinationstechniken, ortsgerichtete Mutagenese usw., vorgenommen werden.

[0130] Noch ein anderes Beispiel sind "univalente Antikörper" oder "einwertige Antikörper", die Aggregate sind, die ein schwere Kette/leichte Kette-Dimer gebunden an die Fc (d. h. konstante) -Region einer zweiten schweren Kette umfassen. Diese Art von Antikörper entgeht der Antigenmodulation. Siehe z. B. Glennie et al. (1982).

[0131] In der Definition von Antikörpern sind auch "Fab"-Fragmente von Antikörpern enthalten. Die "Fab"-Region bezieht sich auf jene Abschnitte der schweren und leichten Ketten, die grob äquivalent oder analog sind zu den Sequenzen, die den Verzweigungsabschnitt der schweren und leichten Ketten umfassen und von denen gezeigt worden ist, dass sie eine immunologische Bindung an ein spezifiziertes Antigen zeigen, denen aber der Fc-Effektorabschnitt fehlt. "Fab" umfasst Aggregate von einer schweren und einer leichten Kette (üblicherweise als Fab' bekannt) wie auch Tetramere, welche die 2H- und 2L-Ketten enthalten (bezeichnet als $F(ab)_2$), die in der Lage sind, selektiv mit einem bezeichneten Antigen oder einer bezeichneten Antigenfamilie zu reagieren. "Fab"-Antikörper können in Untergruppen eingeteilt werden analog zu jenen, die oben beschrieben worden sind, d. h. "Vertebraten-Fab", "hybrides Fab", "chimäres Fab" und "verändertes Fab". Verfahren zur Herstellung von "Fab"-Fragmenten von Antikörpern sind in diesem Fachgebiet bekannt und umfassen beispielsweise Proteolyse und Synthese durch Rekombinationstechniken.

II.H. Diagnostische Oligonukleotidsonden und Kits

[0132] Unter Verwendung der offenbarten Abschnitte der isolierten HCV-cDNAs als Grundlage können Oligo-

mere von ungefähr 8 Nukleotiden oder mehr entweder durch Exzision oder synthetisch hergestellt werden, die mit dem HCV-Genom hybridisieren und nützlich sind bei der Identifizierung des bzw. der viralen Antigen(e), einer weitergehenden Charakterisierung des bzw. der Virusgenom(e) wie auch bei dem Nachweis des Virus bzw. der Viren in erkrankten Individuen. Die Sonden für HCV-Polynukleotide (natürlich oder abgeleitet) haben eine Länge, die den Nachweis von einzigartigen viralen Sequenzen durch Hybridisierung ermöglicht. Obwohl 6–8 Nukleotide eine praktikable Länge sein können, sind Sequenzen mit 10–12 Nukleotiden bevorzugt und ungefähr 20 Nukleotide erscheinen optimal. Diese Sequenzen werden sich vorzugsweise von Regionen ableiten, denen Heterogenität fehlt. Diese Sonden können durch Routinemethoden, einschließlich automatisierten Oligonukleotidsynthesemethoden, hergestellt werden. Unter nützlichen Sonden befinden sich beispielsweise jene, die von den hier offenbarten neu isolierten Klonen abgeleitet werden, wie auch die verschiedenen Oligomere, die beim Durchmustern von cDNA-Bibliotheken durch Hybridisierung ("probing"), das nachfolgend erläutert wird, nützlich sind. Eine komplementäre Sequenz zu einem jeglichen einzigartigen Abschnitt des HCV-Genoms wird zufriedenstellend sein. Für eine Verwendung als Sonden ist vollständige Komplementarität wünschenswert, obwohl diese möglicherweise nicht notwendig ist, wenn die Länge des Fragments erhöht wird.

[0133] Für eine Verwendung von solchen Sonden als Diagnostika kann die zu analysierende biologische Probe, wie Blut, oder Serum, behandelt werden, sofern gewünscht, um die darin enthaltenen Nukleinsäuren zu extrahieren. Die resultierende Nukleinsäure aus der Probe kann einer Gelelektrophorese oder anderen Größenauftrennungstechniken unterworfen werden; alternativ kann die Nukleinsäureprobe ohne Größenauftrennung mittels Dot-Blot geblottet werden. Die Sonden werden dann markiert. Geeignete Markierungen und Verfahren zur Markierung von Sonden sind in diesem Fachgebiet bekannt und umfassen beispielsweise radioaktive Markierungen eingebaut durch Nick-Translation oder Kinasierung, Biotin, fluoreszierende Sonden und chemolumineszierende Sonden. Die aus der Probe extrahierten Nukleinsäuren werden dann mit der markierten Sonde unter Hybridisierungsbedingungen von geeigneten Stringenzen behandelt und es werden Polynukleotid-Doppelstränge, welche die Sonde enthalten, nachgewiesen.

[0134] Die Sonden können vollständig komplementär zu dem HCV-Genom hergestellt werden. Dementsprechend sind üblicherweise Bedingungen hoher Stringenz wünschenswert, um falsche Positive zu verhindern. Bedingungen von hoher Stringenz sollten jedoch nur verwendet werden, wenn die Sonden komplementär zu Regionen des Virusgenoms sind, denen Heterogenität fehlt. Die Stringenz der Hybridisierung wird durch verschiedene Faktoren während der Hybridisierung und während der Waschvorgänge bestimmt, einschließlich Temperatur, Ionenstärke, Zeitdauer und Formamid-Konzentration. Diese Faktoren werden beispielsweise in Maniatis, T. (1982) erläutert.

[0135] Es wird im allgemeinen erwartet, dass die HCV-Genomsequenzen im Serum von infizierten Individuen in relativ geringen Konzentrationen, d. h. in einer Konzentration von ungefähr 10^2–10^3 Schimpansen-infektiösen Dosen (CID) pro ml vorhanden sein werden. Diese Konzentration kann es erforderlich machen, dass bei Hybridisierungsassays Amplifizierungstechniken verwendet werden. Solche Techniken sind in diesem Fachgebiet bekannt. Beispielsweise verwendet das "Bio-Bridge"-System der Enzo Biochemical Corporation terminale Desoxynukleotidtransferase, um unmodifizierte 3'-poly-dT-Schwänze an eine DNA-Sonde anzufügen. Die Sonde mit poly-dT-Schwanz wird mit der Zielnukleotidsequenz und dann mit einem Biotin-modifizierten poly-A hybridisiert. Die PCT-Anmeldung 84/03520 und EPA 124 221 beschreiben einen DNA-Hybridisierungsassay, in welchem: (1) Analyt über Hybridisierung an eine einzelsträngige DNA-Sonde, die zu einem Enzym-markierten Oligonukleotid komplementär ist, angelagert wird ("annealing"); und (2) der resultierende, mit einem Schwanz versehene Doppelstrang an ein Enzym-markiertes Oligonukleotid hybridisiert wird. EPA 204 510 beschreibt einen DNA-Hybridisierungsassay, in dem Analyt-DNA mit einer Sonde, die einen Schwanz, wie einen poly-dT-Schwanz, aufweist, einem Amplifizierungsstrang, der eine Sequenz, die mit dem Schwanz der Sonde hybridisiert, wie eine poly-A-Sequenz, aufweist und der in der Lage ist, eine Mehrzahl von markierten Strängen zu binden, in Kontakt gebracht wird. Eine besonders erstrebenswerte Technik könnte zuerst eine ungefähr 10000-fache Amplifizierung der Ziel-HCV-Sequenzen in Seren, d. h. auf ungefähr 10^6 Sequenzen/ml umfassen. Dies kann beispielsweise durch die Polymerasekettenreaktion (PCR)-Technik, die von Saiki et al. (1986), von Mullis, U.S.-Patent Nr. 4,683,195 und von Mullis et al., U.S.-Patent Nr. 4,683,202 beschrieben wird, erfolgen. Die amplifizierte(n) Sequenz(en) kann bzw. können dann unter Verwendung eines Hybridisierungsassays, der in EP 317 077, veröffentlicht am 24. Mai 1989, beschrieben wird, nachgewiesen werden. Diese Hybridisierungsassays, die Sequenzen in einer Konzentration von 10^6/ml nachweisen sollten, setzen Nukleinsäure-Multimere ein, die an einzelsträngige Analyt-Nukleinsäure binden und die auch an eine Mehrzahl von einzelsträngigen markierten Oligonukleotiden binden. Ein geeigneter, in Lösungsphase ausgeführter Sandwichassay, der mit markierten Polynukleotidsonden verwendet werden kann, und die Verfahren zur Herstellung von Sonden sind in EPA 225 807, veröffentlicht am 16. Juni 1987, beschrieben.

[0136] Die Sonden können zu diagnostischen Kits verpackt werden. Diagnostische Kits umfassen die Sonden-DNA, die markiert sein kann; alternativ kann die Sonden-DNA unmarkiert sein und die Bestandteile für die Markierung können in dem Kit in separaten Behältern enthalten sein. Der Kit kann auch andere geeignet verpackte Reagenzien und Materialien, welche für das spezielle Hybridisierungsprotokoll benötigt werden, beispielsweise Standards, wie auch Instruktionen für das Ausführen des Tests enthalten.

Immunoassay und diagnostische Kits

[0137] Sowohl die Polypeptide, die immunologisch mit HCV-Antikörper enthaltendem Serum reagieren, beispielsweise jene, die durch das nachfolgend in den Beispielen beschriebene Antigen-Screening-Verfahren nachgewiesen werden, als auch jene, die von den in den Beispielen beschriebenen isolierten Klonen abgeleitet oder innerhalb dieser kodiert werden, und zusammengesetzte Strukturen davon und die gegen die HCV-spezifischen Epitope in diesen Polypeptiden erzeugten Antikörper sind in Immunoassays nützlich, um das Vorhandensein von HCV-Antikörpern oder das Vorhandensein des Virus und/oder von viralen Antigenen in biologischen Proben nachzuweisen. Die Gestaltung der Immunoassays unterliegt einer großen Variabilität und Verschiedene von diesen sind in diesem Fachgebiet bekannt. Der Immunoassay kann beispielsweise ein virales Epitop einsetzen; alternativ kann der Immunoassay eine Kombination von viralen Epitopen, die aus diesen Quellen abgeleitet werden, verwenden; diese Epitope können von dem gleichen oder von unterschiedlichen viralen Polypeptiden abgeleitet sein und können in separaten rekombinanten oder natürlichen Polypeptiden oder zusammen in den gleichen rekombinanten Polypeptiden vorliegen. Er kann beispielsweise einen gegen ein oder mehrere virale(s) Epitop(e) gerichteten monoklonalen Antikörper, eine Kombination von gegen Epitope von einem viralen Antigen gerichteten monoklonalen Antikörpern, monoklonale Antikörper, die gegen Epitope von unterschiedlichen viralen Antigenen gerichtet sind, polyklonale Antikörper, die gegen das gleiche virale Antigen gerichtet sind, oder polyklonale Antikörper, die gegen unterschiedliche virale Antigene gerichtet sind, verwenden. Protokolle können beispielsweise auf einer Kompetition oder einer direkten Reaktion oder auf Assays vom Sandwich-Typ basieren. Protokolle können auch beispielsweise feste Träger verwenden oder können durch Immunpräzipitation erfolgen. Die meisten Assays umfassen die Verwendung von markiertem Antikörper oder Polypeptid; die Markierungen können beispielsweise fluoreszierend, chemolumineszierend, radioaktiv oder Farbstoffmoleküle sein. Assays, die die Signale von der Sonde amplifizieren, sind ebenfalls bekannt; Beispiele dafür sind Assays, die Biotin und Avidin einsetzen, und Enzym-markierte und -vermittelte Immunoassays, wie ELISA-Assays.

[0138] Einige der antigenen Regionen des mutmaßlichen Polyproteins sind kartiert und identifiziert worden durch Durchmustern der Antigenität von bakteriellen Expressionsprodukten von HCV-cDNAs, die Abschnitte des Polyproteins kodieren. Siehe die Beispiele. Andere antigene Regionen von HCV können nachgewiesen werden, indem die Abschnitte der HCV-cDNAs in anderen Expressionssystemen, einschließlich Hefesystemen und zellulären Systemen, die von Insekten und Vertebraten abgeleitet sind, exprimiert werden. Zusätzlich liefern Untersuchungen, die einen Antigenitäts-Index und ein Hydrophobie/Hydrophobie-Profil ergeben, Informationen bezüglich der Wahrscheinlichkeit der Antigenität einer Region.

[0139] Die Untersuchungen zur Antigenkartierung durch Expression von HCV-cDNAs zeigte, dass eine Anzahl von Klonen, die diese cDNAs enthielten, Polypeptide exprimierte, die immunologisch reaktiv mit Serum aus Individuen mit NANBH waren. Kein einziges Polypeptid war gegenüber allen Seren immunologisch reaktiv. Fünf von diesen Polypeptiden waren sehr immunogen, so dass Antikörper gegen die HCV-Epitope in diesen Polypeptiden in den Seren von vielen verschiedenen Patienten nachgewiesen wurden, obwohl die Überlappung beim Nachweis nicht vollständig war. Folglich legen die Ergebnisse hinsichtlich der Immunogenität der in den verschiedenen Klonen kodierten Polypeptide nahe, dass effiziente Detektionssysteme die Verwendung von Gruppen oder Panels von Epitopen umfassen sollten. Die Epitope in der Gruppe könnten zu einem oder mehreren Polypeptiden zusammengebaut oder -gefügt werden.

[0140] Kits, die für eine Immundiagnose geeignet sind und die geeignete markierte Reagenzien enthalten, werden konstruiert, indem die geeigneten Materialien, einschließlich der Polypeptide der Erfindung, die HCV-Epitope enthalten, oder gegen HCV-Epitope gerichtete Antikörper, in geeigneten Behältern verpackt werden zusammen mit den übrigen Reagenzien und Materialien, die für die Ausführung des Assays benötigt werden wie auch einem geeigneten Satz von Assayinstruktionen.

Weitere Charakterisierung des HCV-Genoms, von Virionen und von viralen Antigenen unter Verwendung von aus cDNA abgeleiteten Sonden für das Virusgenom

[0141] Die HCV-cDNA-Sequenzinformationen in den neu isolierten Klonen, die in den Beispielen beschrieben

sind, können verwendet werden, um weitere Informationen über die Sequenz des HCV-Genoms und zur Identifizierung und Isolierung des HCV-Agens zu erhalten, und werden folglich zu dessen Charakterisierung, einschließlich der Natur des Genoms, der Struktur des Viruspartikels und der Natur der Antigene, aus welchen es zusammengesetzt ist, beitragen. Diese Informationen können wiederum zu zusätzlichen Polynukleotidsonden, aus dem HCV-Genom abgeleiteten Polypeptiden und gegen HCV-Epitope gerichtete Antikörper, die für die Diagnose und/oder Behandlung von durch HCV verursachter NANBH nützlich sein würden, führen.

[0142] Die cDNA-Sequenzinformationen in den oben erwähnten Klonen ist nützlich für die Gestaltung von Sonden für die Isolierung von zusätzlichen cDNA-Sequenzen, die von bislang undefinierten Regionen des oder der HCV-Genom(e) abgeleitet sind, ausgehend von denen die cDNAs in Klonen, die hier und in EP 0,316,218 beschrieben werden, abgeleitet werden. Es können beispielsweise markierte Sonden, die eine Sequenz von ungefähr 8 oder mehr Nukleotiden und vorzugsweise 20 oder mehr Nukleotiden, die von Regionen nahe den 5'-Termini oder 3'-Termini der in **Fig.** 17 gezeigten zusammengesetzten HCV-cDNA-Sequenz abgeleitet ist, enthalten, verwendet werden, um überlappende cDNA-Sequenzen ausgehend von HCV-cDNA-Bibliotheken zu isolieren. Alternativ könnte eine Charakterisierung der genomischen Segmente ausgehend von dem oder den viralen Genom(en), welche(s) aus gereinigten HCV-Partikeln isoliert wird bzw. werden, erfolgen. Verfahren zur Reinigung von HCV-Partikeln und zum Nachweis von diesen während der Reinigungsprozedur werden hier, weiter unten, beschrieben. Vorgehensweisen zur Isolierung von Polynukleotidgenomen ausgehend von viralen Partikeln sind in diesem Fachgebiet bekannt und eine Vorgehensweise, die verwendet werden kann, ist jene, die in EP 0 218 316 beschrieben wird. Die isolierten genomischen Segmente könnten dann kloniert und sequenziert werden. Ein Beispiel für diese Technik, die eine Amplifizierung der zu klonierenden Sequenzen einsetzt, wird weiter unten angegeben, und lieferte den Klon 16jh.

[0143] Verfahren zum Konstruieren von cDNA-Bibliotheken sind in diesem Fachgebiet bekannt und werden weiter oben und weiter unten diskutiert; ein Verfahren zur Konstruktion von HCV-cDNA-Bibliotheken in lambda-gt11 wird in der EPA-Veröffentl. Nr. 318 216 diskutiert. cDNA-Bibliotheken, die zum Screenen mit Nukleinsäuresonden nützlich sind, können jedoch auch in anderen Vektoren, die in diesem Fachgebiet bekannt sind, beispielsweise lambda-gt10 (Huynh et al. (1985)) konstruiert werden.

Screening auf antivirale Mittel für HCV

[0144] Die Verfügbarkeit von Zellkultur- und Tiermodellsystemen für HCV macht es möglich, auf antivirale Mittel zu screenen, die die HCV-Replikation hemmen, und insbesondere auf jene Mittel, die präferentiell Zellwachstum und -vermehrung ermöglichen, während die Virusreplikation gehemmt wird. Diese Screeningverfahren sind den Fachleuten auf diesem Gebiet bekannt. Im allgemeinen werden die antiviralen Mittel in verschiedenen Konzentrationen auf ihre Wirkung auf die Verhütung einer Virusreplikation in Zellkultursystemen, die eine Virusreplikation unterstützen, und dann auf eine Hemmung von Infektiosität oder von viraler Pathogenität (und ein geringes Toxizitätsniveau) in einem Tiermodellsystem getestet.

[0145] Die Verfahren und Zusammensetzungen, die hier bereitgestellt werden, um HCV-Antigene und HCV-Polynukleotide nachzuweisen, sind nützlich zum Screenen von antiviralen Mitteln, indem sie ein alternatives und vielleicht empfindlicheres Mittel zum Nachweis der Wirkung des Mittels auf die Virusreplikation als der Zellplaque-Assay oder der ID_{50}-Assay bereitstellen. Die hier beschriebenen HCV-Polynukleotidsonden können beispielsweise verwendet werden, um die Menge von viraler Nukleinsäure, die in einer Zellkultur produziert wird, zu quantifizieren. Dies könnte beispielsweise durch Hybridisierung oder Kompetitionshybridisierung der Nukleinsäuren der infizierten Zelle mit einer markierten HCV-Polynukleotidsonde bewerkstelligt werden. Anti-HCV-Antikörper könnten beispielsweise ebenfalls verwendet werden, um ein oder mehrere HCV-Antigen(e) in der Zellkultur unter Verwendung der hier beschriebenen Immunoassays zu identifizieren und zu quantifizieren. Da es wünschenswert sein könnte, HCV-Antigene in der infizierten Zellkultur durch einen Kompetitionsassay zu quantifizieren, sind die innerhalb der hier beschriebenen HCV-cDNAs kodierten Polypeptide zusätzlich in diesen Kompetitionsassays nützlich. Im allgemeinen würde ein von der HCV-cDNA abgeleitetes rekombinantes HCV-Polypeptid markiert werden und die Hemmung der Bindung dieses markierten Polypeptids an ein HCV-Polypeptid aufgrund des in dem Zellkultursystem produzierten Antigens würde überwacht werden. Darüber hinaus sind diese Techniken besonders nützlich in Fällen, wo das HCV in der Lage sein könnte, sich in einer Zelllinie zu replizieren, ohne Zelltod zu verursachen.

[0146] Die antiviralen Mittel, die auf eine Wirksamkeit durch diese Verfahren getestet werden könnten, sind in diesem Fachgebiet bekannt und umfassen beispielsweise jene, die mit Virionenbestandteilen und/oder zellulären Bestandteilen, die für die Bindung und/oder die Replikation des Virus erforderlich sind, Wechselwirken. Typische antivirale Mittel können beispielsweise Inhibitoren der Virionenpolymerase und/oder der Protease(n),

die für die Spaltung der Vorläufer-Polypeptide erforderlich ist bzw. sind, umfassen. Andere antivirale Mittel können jene umfassen, die mit Nukleinsäuren zusammenwirken, um die Virusreplikation zu verhindern, beispielsweise Antisinn-Polynukleotide usw.

[0147] Antisinn-Polynukleotidmoleküle umfassen eine komplementäre Nukleotidsequenz, die es diesen ermöglicht, spezifisch mit bezeichneten Regionen von Genomen oder RNAs zu hybridisieren. Antisinn-Polynukleotide können beispielsweise Moleküle umfassen, welche die Proteintranslation durch Bindung an mRNA blockieren, oder können Moleküle sein, welche die Replikation von viraler RNA durch Transkriptase verhindern. Sie können auch Moleküle umfassen, die Mittel tragen (nicht-kovalent angefügt oder kovalent gebunden), die bewirken, dass die virale RNA inaktiv ist, indem beispielsweise Schnitte in der viralen RNA hervorgerufen werden. Sie können auch an zelluläre Polynukleotide binden, welche die Virusinfektiosität, das Replikationsvermögen oder die Chronizität verstärken und/oder für diese erforderlich sind. Antisinn-Moleküle, die mit von HCV abgeleiteten RNAs hybridisieren sollen, können basierend auf den Sequenzinformationen über die HCV-cDNAs, die hier bereitgestellt werden, gestaltet werden. Die auf Antisinn-Polynukleotiden für HCV basierenden antiviralen Mittel können so gestaltet werden, dass sie mit hoher Spezifität binden, eine erhöhte Löslichkeit aufweisen, stabil sind und geringe Toxizität aufweisen. Folglich können sie in spezialisierten Systemen, beispielsweise Liposomen, oder durch Gentherapie verabreicht werden. Zusätzlich können sie Analoga, angeheftete Proteine, substituierte oder veränderte Bindungen zwischen Basen usw. umfassen.

[0148] Andere Arten von Arzneimitteln können auf Polynukleotiden basieren, die wichtige Kontrollregionen des HCV-Genoms "nachahmen" und die aufgrund ihrer Wechselwirkungen mit Schlüsselkomponenten des für die Virusinfektiosität oder -replikation verantwortlichen Systems therapeutisch wirksam sein können.

Allgemeine Verfahren

[0149] Die allgemeinen Techniken, die bei der Extraktion des Genoms aus einem Virus, der Herstellung und der Durchmusterung einer cDNA-Bibliothek durch Hybridisierung ("probing"), der Sequenzierung von Klonen, der Konstruktion von Expressionsvektoren, der Transformation von Zellen, der Ausführung von immunologischen Assays, wie Radioimmunoassays und ELISA-Assays, zur Kultivierung bzw. Vermehrung von Zellen in Kultur und dergleichen verwendet werden, sind in diesem Fachgebiet bekannt und es stehen Laborhandbücher zur Verfügung, die diese Techniken beschreiben. Jedoch führt als allgemeiner Leitfaden das Folgende einige gegenwärtig verfügbare Quellen für derartige Prozeduren und für Materialien, die bei der Ausführung von diesen nützlich sind, auf.

[0150] Für die Expression von gewünschten kodierenden Sequenzen können sowohl prokaryotische als auch eukaryotische Wirtszellen verwendet werden, wenn geeignete Kontrollsequenzen, die mit dem zukünftigen Wirt verträglich sind, verwendet werden. Unter prokaryotischen Wirten wird E. coli am häufigsten verwendet. Expressionskontrollsequenzen für Prokaryoten umfassen Promotoren, die gegebenenfalls Operatorabschnitte enthalten, und Ribosomenbindungsstellen. Transfervektoren, die mit prokaryotischen Wirten verträglich sind, sind üblicherweise abgeleitet von beispielsweise pBR322, einem Plasmid, das Operons enthält, die Ampicillin- und Tetracyclinresistenz vermitteln, und den verschiedenen pUC-Vektoren, die ebenfalls Sequenzen enthalten, die Antibiotikaresistenzmarker verleihen. Diese Marker können verwendet werden, um erfolgreiche Transformanten durch Selektion zu erhalten. Üblicherweise verwendete prokaryotische Kontrollsequenzen umfassen die Beta-Lactamase (Penicillinase)- und Lactose-Promotorsysteme (Chang et al. (1977)), das Tryptophan(trp)-Promotorsystem (Goeddel et al. (1980)) und den von lambda abgeleiteten P_L-Promotor und die N-Gen-Ribosomenbindungsstelle (Shimatake et al. (1981)) und den hybriden tac-Promotor (De Boer et al. (1983)), der von Sequenzen der trp- und lac-UV5-Promotoren abgeleitet ist. Die vorangegangenen Systeme sind mit E. coli besonders verträglich; sofern gewünscht, können andere prokaryotische Wirte, wie Stämme von Bacillus oder Pseudomonas, mit entsprechenden Kontrollsequenzen verwendet werden.

[0151] Eukaryotische Wirte umfassen Hefe- und Säugetierzellen in Kultursystemen. Saccharomyces cerevisiae und Saccharomyces carlsbergensis sind die am häufigsten verwendeten Hefewirte und sind bequem einsetzbare pilzliche Wirte. Mit Hefe verträgliche Vektoren tragen Marker, die eine Selektion von erfolgreichen Transformanten ermöglichen, indem auxotrophen Mutanten Prototrophie oder Wildtyp-Stämmen Resistenz gegen Schwermetalle verliehen wird. Mit Hefe verträgliche Vektoren können den 2 Mikron-Replikationsstartpunkt (Broach et al. (1983)), die Kombination von CEN3 und ARS1 oder andere Mittel zur Sicherstellung der Replikation, wie Sequenzen, die zum Einbau eines geeigneten Fragments in das Wirtszellgenom führen werden, einsetzen. Kontrollsequenzen für Hefevektoren sind in diesem Fachgebiet bekannt und umfassen Promotoren für die Synthese von glykolytischen Enzymen (Hess et al. (1968); Holland et al. (1978)), einschließlich des Promotors für 3-Phosphoglyceratkinase (Hitzeman (1980)). Terminatoren können ebenfalls enthalten sein,

wie jene, die von dem Enolase-Gen abgeleitet sind (Holland (1981)). Besonders nützliche Kontrollsysteme sind jene, die den Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH)-Promotor oder den regulierbaren Alkoholdehydrogenase (ADH)-Promotor, ebenfalls von GAPDH abgeleitete Terminatoren und, wenn eine Sekretion gewünscht wird, die Leadersequenz aus dem Hefe-alpha-Faktor umfassen. Zusätzlich können die Transkriptionsregulationsregion und die Transkriptionsinitiationsregion, die funktionsfähig (operativ) verknüpft sind, derart sein, dass sie in dem Wildtyp-Organismus nicht natürlicherweise assoziiert sind. Diese Systeme werden im Detail in EPA 120 551, veröffentlicht am 03. Oktober 1984; EPA 116 201, veröffentlicht am 22. August 1984; und EPA 164 556, veröffentlicht am 18. Dezember 1985, beschrieben, die allesamt an den hiesigen Rechtsnachfolger abgetreten worden sind, und unter Bezugnahme in diese Unterlagen hierdurch aufgenommen werden.

[0152] Säugetierzelllinien, die als Wirte für eine Expression zur Verfügung stehen, sind in diesem Fachgebiet bekannt und umfassen viele immortalisierte Zelllinien, die von der American Type Culture Collection (ATCC) erhältlich sind, einschließlich HeLa-Zellen, Eierstockzellen des chinesischen Hamsters (CHO-Zellen), Nierenzellen vom Babyhamster (BHK-Zellen) und eine Anzahl von anderen Zelllinien. Geeignete Promotoren für Säugetierzellen sind in diesem Fachgebiet ebenfalls bekannt und umfassen virale Promotoren, wie jenen aus dem Simian Virus 40 (SV40) (Fiers (1978)), Rous-Sarkom-Virus (RSV), Adenovirus (ADV) und Rinderpapillomavirus (BPV). Säugetierzellen können auch Terminatorsequenzen und poly-A-Additionssequenzen benötigen; es können auch Enhancersequenzen, die die Expression verstärken, enthalten sein, und Sequenzen, die eine Amplifizierung des Gens bewirken, können ebenfalls wünschenswert sein. Diese Sequenzen sind in diesem Fachgebiet bekannt. Vektoren, die für eine Replikation in Säugetierzellen geeignet sind, können virale Replikons oder Sequenzen, die eine Integration der geeigneten Sequenzen, die NANBV-Epitope kodieren, in das Wirtsgenom sicherstellen, umfassen.

[0153] Die Transformation kann durch ein jegliches bekanntes Verfahren zur Einschleusung von Polynukleotiden in eine Wirtszelle erfolgen, einschließlich beispielsweise Verpackung des Polynukleotids in ein Virus und Transduzieren einer Wirtszelle mit dem Virus und durch direkte Aufnahme des Polynukleotids. Die verwendete Transformationsprozedur hängt von dem zu transformierenden Wirt ab. Beispielsweise wird die Transformation der E. coli-Wirtszellen mit lambda-gt11, der BB-NANBV-Sequenzen enthält, in dem Abschnitt mit den Beispielen weiter unten diskutiert. Eine bakterielle Transformation durch direkte Aufnahme setzt im allgemeinen eine Behandlung mit Calcium- oder Rubidiumchlorid ein (Cohen (1972); Maniatis (1982)). Eine Hefetransformation durch direkte Aufnahme kann unter Verwendung der Methode von Hinnen et al. (1978) ausgeführt werden. Säugetier-Transformationen durch direkte Aufnahme können unter Verwendung der Calciumphosphat-Präzipitationsmethode von Graham und Van der Eb (1978) oder durch verschiedene bekannte Modifizierungen davon ausgeführt werden.

[0154] Die Konstruktion von Vektoren setzt Techniken ein, die in diesem Fachgebiet bekannt sind. Eine ortsspezifische DNA-Spaltung wird ausgeführt, indem diese mit geeigneten Restriktionsenzymen unter Bedingungen, die im allgemeinen durch den Hersteller dieser kommerziell erhältlichen Enzyme spezifiziert werden, behandelt wird. Im allgemeinen wird ungefähr 1 Mikrogramm Plasmid oder DNA-Sequenz durch 1 Einheit Enzym in ungefähr 20 Mikrolitern Pufferlösung durch Inkubation für 1–2 h bei 37°C gespalten. Nach der Inkubation mit dem Restriktionsenzym wird Protein durch Phenol/Chloroformextraktion entfernt und die DNA durch Ausfällung mit Ethanol zurückgewonnen. Die gespaltenen Fragmente können unter Verwendung von Polyacrylamid- oder Agarose-Gelelektrophoresetechniken gemäß den allgemeinen Vorgehensweisen, die in Methods in Enzymology (1980) 65: 499–560, gefunden werden, aufgetrennt werden.

[0155] Spaltungsfragmente mit überhängenden Enden können mit stumpfen Enden versehen werden, indem E. coli-DNA-Polymerase I (Klenow) in Gegenwart der passenden Desoxynukleotidtriphosphate (dNPTs), die in der Mischung vorhanden sind, verwendet wird. Eine Behandlung mit S1-Nuklease kann auch verwendet werden, was zur Hydrolyse von jeglichen einzelsträngigen DNA-Abschnitten führt.

[0156] Ligationen werden unter Verwendung von Standardpuffer- und Temperaturbedingungen unter Verwendung von T4-DNA-Ligase und ATP ausgeführt; Ligationen von überhängenden Enden erfordern weniger ATP und weniger Ligase als Ligationen von stumpfen Enden. Wenn Vektorfragmente als Teil einer Ligationsmischung verwendet werden, wird das Vektorfragment oftmals mit bakterieller alkalischer Phosphatase (BAP) oder alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm behandelt, um das 5'-Phosphat zu entfernen und folglich eine Religation des Vektors zu verhindern; alternativ kann ein Restriktionsenzymverdau von unerwünschten Fragmenten verwendet werden, um eine Ligation zu verhindern.

[0157] Geeignete Klonierungswirte, wie E. coli, werden mit Ligationsmischungen transformiert und erfolgrei-

che Transformanten werden beispielsweise anhand von Antibiotikaresistenz ausgewählt und auf das korrekte Konstrukt durchmustert.

[0158] Synthetische Oligonukleotide können unter Verwendung eines automatisierten Oligonukleotidsynthetisiergeräts, wie von Warner (1984) beschrieben, hergestellt werden. Sofern gewünscht, können die synthetischen Stränge mit ^{32}P durch Behandlung mit Polynukleotidkinase in Gegenwart von ^{32}P-ATP unter Verwendung von Standardbedingungen für die Reaktion markiert werden.

[0159] DNA-Sequenzen, einschließlich jenen, die ausgehend von cDNA-Bibliotheken isoliert werden, können durch bekannte Techniken modifiziert werden, einschließlich beispielsweise ortsgerichtete Mutagenese, wie von Zoller (1982) beschrieben. Kurz zusammengefasst, wird die zu modifizierende DNA in einen Phagen als eine einzelsträngige Sequenz verpackt und mit DNA-Polymerase unter Verwendung eines synthetischen Oligonukleotids, das zu dem zu modifizierenden Abschnitt der DNA komplementär ist und das innerhalb von seiner eigenen Sequenz die gewünschte Modifizierung enthält, als Primer in eine doppelsträngige DNA überführt. Ein den Phagen unterstützendes Wirtsbakterium wird mit der resultierenden doppelsträngigen DNA transformiert. Kulturen der transformierten Bakterien, die Replikate von jedem Strang des Phagens enthalten, werden in Agar ausplattiert, um Plaques zu erhalten. Theoretisch enthalten 50% der neuen Plaques Phagen, welche die mutierte Sequenz aufweisen, und die restlichen 50% enthalten die ursprüngliche Sequenz. Replikate der Plaques werden mit markierten synthetischen Sonden bei Temperaturen und Bedingungen, die eine Hybridisierung mit dem korrekten Strang, nicht aber mit der unmodifizierten Sequenz erlauben, hybridisiert. Die Sequenzen, die durch Hybridisierung identifiziert worden sind, werden gewonnen und kloniert.

[0160] DNA-Bibliotheken können unter Verwendung der Prozedur von Grunstein und Hogness (1975) durch Hybridisierung getestet ("probed") werden. Kurz zusammengefasst, wird bei dieser Prozedur die durch Hybridisierung zu testende DNA auf Nitrocellulosefiltern immobilisiert, denaturiert und mit einem Puffer, der 0–50% Formamid, 0,75 M NaCl, 75 mM Na-Citrat, 0,02% (Gew./Vol.) von jeweils Rinderserumalbumin, Polyvinylpyrrolidon und Ficoll, 50 mM Na-Phosphat (pH 6,5), 0,1% SDS und 100 Mikrogramm/ml denaturierte Träger-DNA enthält, vorhybridisiert. Der Prozentsatz des Formamids in dem Puffer wie auch die Zeit- und Temperaturbedingungen der Vorhybridisierungs- und nachfolgenden Hybridisierungsschritte hängen von der benötigten Stringenz ab. Oligomere Sonden, die Bedingungen geringerer Stringenz erfordern, werden im allgemeinen mit niedrigen Prozentsätzen von Formamid, niedrigeren Temperaturen und längeren Hybridisierungszeiten verwendet. Sonden, die mehr als 30 oder 40 Nukleotide enthalten, wie jene, die von cDNA oder genomischen Sequenzen abgeleitet sind, setzen im allgemeinen höhere Temperaturen, z. B. ungefähr 40–42°C, und einen hohen Prozentsatz, z. B. 50%, Formamid ein. Nach der Vorhybridisierung wird eine 5'-^{32}P-markierte Oligonukleotidsonde zu dem Puffer hinzugegeben und die Filter werden in dieser Mischung unter Hybridisierungsbedingungen inkubiert. Nach dem Waschen werden die behandelten Filter einer Autoradiographie unterworfen, um die Lage der hybridisierten Sonde zu zeigen; DNA an entsprechenden Stellen auf den ursprünglichen Agarplatten wird als Quelle der gewünschten DNA verwendet.

[0161] Für routinemäßige Vektorkonstruktionen wird der E. coli-Stamm HB101 oder ein anderer geeigneter Wirt mit Ligationsmischungen transformiert und erfolgreiche Transformanten durch Antibiotikaresistenz oder andere Marker ausgewählt. Dann werden ausgehend von. den Transformanten Plasmide gemäß der Methode von Clewell et al. (1969) hergestellt, üblicherweise nach einer Chloramphenicol-Amplifizierung (Clewell (1972)). Die DNA wird isoliert und analysiert, üblicherweise durch Restriktionsenzymanalyse und/oder Sequenzierung. Die Sequenzierung kann das Didesoxy-Verfahren von Sauger et al. (1977), wie weitergehend von Messing et al. (1981) beschrieben, oder das Verfahren von Maxam et al. (1980) sein. Probleme mit einer Bandenkompression, die manchmal in GC-reichen Regionen beobachtet werden, wurden durch die Verwendung von T-Deazoguanosin gemäß Barr et al. (1986) überwunden.

[0162] Der Enzymimmunoassay (ELISA) kann verwendet werden, um entweder Antigen- oder Antikörperkonzentrationen zu messen. Diese Methode hängt von einer Konjugation eines Enzyms an entweder ein Antigen oder einen Antikörper ab und verwendet die gebundene Enzymaktivität als eine quantitative Markierung. Um Antikörper zu messen, wird das bekannte Antigen an einer festen Phase (z. B. einer Mikroplatte oder einem Kunststoffbecher) fixiert, mit Testserumverdünnungen inkubiert, gewaschen, mit mit einem Enzym markiertem anti-Immunglobulin inkubiert und erneut gewaschen. Für eine Markierung geeignete Enzyme sind in diesem Fachgebiet bekannt und umfassen beispielsweise Meerrettich-Peroxidase. An die feste Phase gebundene Enzymaktivität wird gemessen, indem das spezifische Substrat hinzugefügt wird und eine Produktbildung oder eine Substratverwertung kolorimetrisch bestimmt wird. Die gebundene Enzymaktivität ist eine direkte Funktion der Menge von gebundenem Antikörper.

[0163] Um Antigen zu messen, wird ein bekannter spezifischer Antikörper an der festen Phase fixiert, das Antigen enthaltende Testmaterial wird hinzugesetzt, nach einer Inkubation wird die feste Phase gewaschen und es wird ein zweiter Enzym-markierter Antikörper hinzugesetzt. Nach dem Waschen wird Substrat zugesetzt und Enzymaktivität wird kolorimetrisch abgeschätzt und zu der Antigenkonzentration in Beziehung gesetzt.

Beispiele

[0164] Nachfolgend werden Beispiele der Erfindung beschrieben, die nur zu Veranschaulichungszwecken angegeben werden und nicht, um den Umfang der Erfindung einzuschränken. Im Lichte der vorliegenden Offenbarung werden den Fachleuten auf diesem Gebiet zahlreiche Ausführungsformen innerhalb des Umfangs der Ansprüche ersichtlich sein.

Isolierung und Sequenz der überlappenden HCV-cDNA-Klone 13i, 26j, CA59a, CA84a, CA156e und CA167b

[0165] Die Klone 13i, 26j, CA59a, CA84a, CA156e und CA167b wurden ausgehend von der lambda-gt11-Bibliothek, die HCV-cDNA enthält (ATCC Nr. 40394), deren Herstellung in der EPA-Veröffentl. Nr. 318 216 (veröffentlicht am 31. Mai 1989) und in WO 89/04669 (veröffentlicht am 01. Juni 1989) beschrieben ist, isoliert. Das Durchmustern der Bibliothek erfolgte mit den weiter unten beschriebenen Sonden unter Verwendung der in Huynh (1985) beschriebenen Methode. Die Häufigkeit, mit der positive Klone mit den jeweiligen Sonden auftraten, betrug ungefähr 1 unter 50000.

[0166] Die Isolierung von Klon 13i gelang unter Verwendung einer synthetischen Sonde, die von der Sequenz von Klon 12f abgeleitet war. Die Sequenz der Sonde war:
5' GAA CGT TGC GAT CTG GAA GAC AGG GAC AGG 3'.

[0167] Die Isolierung von Klon 26j gelang unter Verwendung einer Sonde, die von der 5'-Region von Klon K9-1 abgeleitet war. Die Sequenz der Sonde war:
5' TAT CAG TTA TGC CAA CGG AAG CGG CCC CGA 3'.

[0168] Die Isolierungsprozeduren für Klon 12f und für Klon k9-1 (auch als K9-1 bezeichnet) sind in der EPA-Veröffentl. Nr. 318 216 beschrieben und ihre Sequenzen sind in den Fig. 1 bzw. 2 gezeigt. Die HCV-cDNA-Sequenzen der Klone 13i und 26j sind in den Fig. 4 bzw. Fig. 5 gezeigt. Ebenfalls gezeigt sind die darin kodierten Aminosäuren wie auch die Überlappung von Klon 13i mit Klon 12f und die Überlappung von Klon 26j mit Klon 13i. Die Sequenzen für diese Klone bestätigten die Sequenz von Klon K9-1. Klon K9-1 war aus einer unterschiedlichen HCV-cDNA-Bibliothek isoliert worden (siehe EP 0 218 316).

[0169] Klon CA59a wurde unter Einsatz einer Sonde, die auf der Sequenz der 5'-Region von Klon 26j basierte, isoliert. Die Sequenz dieser Sonde war:
5' CTG GTT AGC AGG GCT TTT CTA TCA CCA CAA 3'.

[0170] Eine von der Sequenz von Klon CA59a abgeleitete Sonde wurde verwendet, um Klon CA84a zu isolieren. Die Sequenz der für diese Isolierung verwendeten Sonde war:
5' AAG GTC CTG GTA GTG CTG CTG CTA TTT GCC 3'.

[0171] Klon CA156e wurde unter Verwendung einer Sonde, die von der Sequenz von Klon CA84a abgeleitet worden war, isoliert. Die Sequenz der Sonde war:
5' ACT GGA CGA CGC AAG GTT GCA ATT GCT CTA 3'.

[0172] Klon CA167b wurde unter Verwendung einer Sonde, die von der Sequenz von Klon CA156e abgeleitet worden war, isoliert. Die Sequenz der Sonde war:
5' TTC GAC GTC ACA TCG ATC TGC TTG TCG GGA 3'.

[0173] Die Nukleotidsequenzen der HCV-cDNAs in den Klonen CA59a, CA84a, CA156e und CA167b sind in den Fig. 6, Fig. 7, Fig. 8 bzw. Fig. 9 gezeigt. Die darin kodierten Aminosäuren wie auch die Überlappung mit den Sequenzen von relevanten Klonen sind in den Fig. ebenfalls gezeigt.

Erzeugung der "pi"-HCV-cDNA-Bibliothek

[0174] Eine HCV-cDNA-Bibliothek, die "pi"-Bibliothek, wurde ausgehend von der gleichen Charge von infektiösem Schimpansenplasma, die verwendet worden war, um die lambda-gt11-HCV-cDNA-Bibliothek (ATCC Nr.

40394), die in der EPA-Veröffentl. Nr. 318 216 beschrieben ist, zu konstruieren, und unter Einsatz von im wesentlichen den gleichen Techniken konstruiert. Jedoch wurde bei der Konstruktion der pi-Bibliothek ein Primer-Verlängerungs-Verfahren eingesetzt, bei dem der Primer für die reverse Transkriptase auf der Sequenz von Klon CA59A basierte. Die Sequenz des Primers war:
5' GGT GAC GTG GGT TTC 3'.

Isolierung und Sequenz von Klon pi14a

[0175] Ein Durchmustern der oben beschriebenen "pi"-HCV-cDNA-Bibliothek mit der Sonde, die verwendet worden war, um Klon CA167b zu isolieren (siehe oben), ergab den Klon pi14a. Der Klon enthält ungefähr 800 Basenpaare von cDNA, die mit den Klonen CA167b, CA156e, CA84a und CA59a, die ausgehend von der lambda-gt11-HCV-cDNA-Bibliothek (ATCC Nr. 40394) isoliert worden waren, überlappt. Zusätzlich enthält pi14a auch ungefähr 250 Basenpaare von DNA, die stromaufwärts von der HCV-cDNA in Klon CA167b liegen.

Isolierung und Sequenz der Klone CA216a, CA290a und ag30a

[0176] Basierend auf der Sequenz von Klon CA167b wurde eine synthetische Sonde hergestellt, welche die folgende Sequenz aufwies:
5' GGC TTT ACC ACG TCA CCA ATG ATT GCC CTA 3'.

[0177] Die obige Sonde wurde verwendet, um die lambda-gt11-Bibliothek (ATCC Nr. 40394) zu durchmustern, was den Klon CA216a ergab, dessen HCV-Sequenzen in Fig. 10 gezeigt sind.

[0178] Es wurde eine andere Sonde hergestellt, die auf der Sequenz von Klon CA216a basiert, mit der folgenden Sequenz:
5' TTT GGG TAA GGT CAT CGA TAC CCT TAC GTG 3'.

[0179] Ein Durchmustern der lambda-gt11-Bibliothek (ATCC Nr. 40394) mit dieser Sonde lieferte den Klon CA290a, wobei die HCV-Sequenzen darin in Fig. 11 gezeigt sind.

[0180] In einem parallelen Ansatz wurde eine Primer-Verlängerungs-cDNA-Bibliothek hergestellt unter Verwendung von Nukleinsäure, die aus dem gleichen infektiösen Plasma, das bei der oben beschriebenen ursprünglichen lambda-gt11-cDNA-Bibliothek verwendet worden war, extrahiert wurde. Der verwendete Primer basierte auf der Sequenz der Klone CA216a und CA290a:
5' GAA GCC GCA CGT AAG 3'.

[0181] Die cDNA-Bibliothek wurde hergestellt unter Verwendung von Verfahren ähnlich zu jenen, die zuvor für Bibliotheken, die bei der Isolierung der Klone pi14a und k9-1 verwendet worden waren, beschrieben worden waren. Die Sonde, die verwendet wurde, um diese Bibliothek zu durchmustern, basierte auf der Sequenz von Klon CA290a:
5' CCG GCG TAG GTC GCG CAA TTT GGG TAA 3'.

[0182] Klon ag30a wurde aus der neuen Bibliothek mit der obigen Sonde isoliert und enthielt ungefähr 670 Basenpaare HCV-Sequenz. Siehe **Fig.** 12. Ein Teil dieser Sequenz überlappt mit der HCV-Sequenz der Klone CA216a und CA290a. Ungefähr 300 Basenpaare der ag30a-Sequenz liegen jedoch stromaufwärts von der Sequenz aus Klon CA290a. Die nicht-überlappende Sequenz zeigt ein Startcodon (*) und Stopcodons, die möglicherweise den Beginn des HCV-ORF angeben. In **Fig.** 12 sind ebenfalls mutmaßliche kleine kodierte Peptide (#) angegeben, die eine Rolle bei der Regulierung der Translation spielen könnten, wie auch die mutmaßliche erste Aminosäure des mutmaßlichen Polypeptids (/) und stromabwärts liegende Aminosäuren, die darin kodiert werden.

Isolierung und Sequenz von Klon CA205a

[0183] Klon CA205a wurde ausgehend von der ursprünglichen lambda-gt-11-Bibliothek (ATCC Nr. 40394) unter Verwendung einer aus der HCV-Sequenz in Klon CA290a (Fig. 11) abgeleiteten synthetischen Sonde isoliert. Die Sequenz der Sonde war:
5' TCA GAT CGT TGG TGG AGT TTA CTT GTT GCC 3'.

[0184] Die Sequenz der HCV-cDNA in CA205a, die in Fig. 13 gezeigt ist, überlappt mit den cDNA-Sequenzen sowohl in Klon ag30a als auch in Klon CA290a. Die Überlappung der Sequenz mit jener von CA290a ist durch

die gestrichelte Linie oberhalb der Sequenz gezeigt (die Figur zeigt auch die in diesem Fragment kodierten mutmaßlichen Aminosäuren).

[0185] Wie ausgehend von den HCV-cDNA-Sequenzen in den Klonen CA205a und ag30a beobachtet, scheint das mutmaßliche HCV-Polyprotein bei dem ATG-Startcodon zu beginnen; die HCV-Sequenzen in beiden Klonen enthalten ein im Leseraster befindliches, angrenzendes, doppeltes Stopcodon (TGATAG) zweiundvierzig Nukleotide stromaufwärts von diesem ATG. Das HCV-ORF scheint nach diesen Stopcodons zu beginnen und sich über mindestens 8907 Nukleotide zu erstrecken (siehe die in **Fig.** 17 gezeigte zusammengesetzte HCV-cDNA).

Isolierung und Sequenz von Klon 18g

[0186] Basierend auf der Sequenz von Klon ag30a (siehe **Fig.** 12) und der eines überlappenden Klons aus der ursprünglichen lambda-gt-11-Bibliothek (ATCC Nr. 40394) CA230a, wurde eine synthetische Sonde mit der folgenden Sequenz hergestellt:
5' CCA TAG TGG TCT GCG GAA CCG GTG AGT ACA 3'.

[0187] Ein Durchmustern der ursprünglichen lambda-gt11-HCV-cDNA-Bibliothek mit der Sonde ergab den Klon 18g, dessen HCV-cDNA-Sequenz in **Fig. 14** gezeigt ist. In der Figur sind auch die Überlappung mit Klon ag30a und mutmaßliche Polypeptide, die innerhalb der HCV-cDNA kodiert werden, gezeigt.

[0188] Die cDNA in Klon 18g (C18g oder 18g) überlappt mit jener in den weiter oben beschriebenen Klonen ag30a und CA205a. Die Sequenz von C18g enthält ebenfalls die doppelte Stopcodonregion, die in Klon ag30a beobachtet wurde. Die Polynukleotidregion stromaufwärts von diesen Stopcodons stellt mutmaßlich einen Teil der 5'-Region des HCV-Genoms dar, der möglicherweise kurze ORFs enthält und der durch direkte Sequenzierung des gereinigten HCV-Genoms bestätigt werden kann. Diese mutmaßlichen kleinen kodierten Peptide könnten eine regulatorische Rolle bei der Translation spielen. Die Region des HCV-Genoms stromaufwärts von jener, die durch C18g repräsentiert wird, kann für eine Sequenzanalyse isoliert werden unter Verwendung von im wesentlichen der Technik, die in der EPA-Veröffentl. Nr. 318 216 für die Isolierung von cDNA-Sequenzen stromaufwärts von der HCV-cDNA-Sequenz in Klon 12f beschrieben worden ist. Im wesentlichen werden kleine synthetische Oligonukleotid-Primer für reverse Transkriptase, die auf der Sequenz von C18g basieren, synthetisiert und verwendet, um an die entsprechende Sequenz in genomischer HCV-RNA zu binden. Die Primersequenzen liegen proximal zu dem bekannten 5'-Terminus von C18g, aber ausreichend weit stromabwärts, um die Gestaltung von Sondensequenzen stromaufwärts von den Primersequenzen zu erlauben. Es werden bekannte Standardmethoden zum Starten der Transkription ("priming") und zur Klonierung verwendet. Die resultierenden cDNA-Bibliotheken werden mit Sequenzen stromaufwärts von den Primerbindungsstellen (wie abgeleitet aus der ermittelten Sequenz von C18g) durchmustert. Die genomische HCV-RNA wird entweder aus Plasma oder Leberproben von Individuen mit NANBH gewonnen. Da HCV ein Flavi-artiges Virus zu sein scheint, könnte der 5'-Terminus des Genoms mit einer "cap"-Struktur modifiziert sein. Es ist bekannt, dass Flavivirus-Genome 5'-terminale "cap"-Strukturen enthalten (Gelbfiebervirus, Rice et al. (1988); Dengue-Virus, Hahn et al. (1988); Japanische Enzephalitis-Virus (1987)).

Isolierung und Sequenz von Klonen aus der beta-HCV-cDNA-Bibliothek

[0189] Klone, die für die 3'-terminale Region des HCV-Genoms repräsentativ cDNA enthalten, wurden aus einer cDNA-Bibliothek isoliert, die ausgehend von dem ursprünglichen infektiösen Schimpansenplasmapool, der für die Erzeugung der HCV-cDNA-lambda-gt11-Bibliothek (ATCC Nr. 40394), die in der EPA-Veröffentl. Nr. 318 216 beschrieben ist, verwendet worden war, konstruiert wurde. Um die DNA-Bibliothek zu erzeugen, wurde aus dem Plasma extrahierte RNA unter Verwendung von poly(rA)-Polymerase mit einem poly-rA-Schwanz versehen ("tailed") und es wurde cDNA unter Verwendung von oligo$(dT)_{12\text{-}18}$ als Primer für die reverse Transkriptase synthetisiert. Das resultierende RNA:cDNA-Hybrid wurde mit RNAse H verdaut und in doppelsträngige HCV-cDNA umgewandelt. Die resultierende HCV-cDNA wurde in lambda-gt10 unter Verwendung von im wesentlichen der Technik, die in Huynh (1985) beschrieben worden ist, kloniert, was die beta (oder b)-HCV-cDNA-Bibliothek ergab. Die verwendeten Vorgehensweisen waren wie folgt.

[0190] Ein Aliquot (12 ml) des Plasmas wurde mit Proteinase K behandelt und mit einem gleichen Volumen von mit 0,05 M Tris-Cl, pH 7,5, 0,05% (Vol./Vol.) β-Mercaptoethanol, 0,1% (Gew./Vol.) Hydroxychinolon, 1 mM EDTA, gesättigtem Phenol extrahiert. Die resultierende wässrige Phase wurde mit der Phenolmischung erneut extrahiert, gefolgt von 3 Extraktionen mit einer 1 : 1-Mischung, die Phenol und Chloroform : Isoamylalkohol (24 : 1) enthielt, gefolgt von 2 Extraktionen mit einer Mischung von Chloroform und Isoamylalkohol (1 : 1). Nach-

folgend zu einer Einstellung der wässrigen Phase auf 200 mM bezüglich NaCl wurden Nukleinsäuren in der wässrigen Phase über Nacht bei –20°C mit 2,5 Volumen kaltem absolutem Ethanol ausgefällt. Die Niederschläge wurden durch Zentrifugation bei 10000 Upm für 40 min gesammelt, mit 70%-igem Ethanol, das 20 mM NaCl enthielt, und mit 100% kaltem Ethanol gewaschen, 5 min in einem Exsiccator getrocknet und in Wasser gelöst.

[0191] Die isolierten Nukleinsäuren aus dem infektiösen Schimpansenplasmapool wurden unter Verwendung von poly-A-Polymerase in Gegenwart von Ribonukleaseinhibitor aus menschlicher Plazenta (HPRI) (erworben von der Amersham Corp.) unter Einsatz von MS2-RNA als Träger mit einem poly-rA-Schwanz versehen. Isolierte Nukleinsäuren, die zu jener in 2 ml Plasma äquivalent waren, wurden in einer Lösung, die TMN (50 mM Tris HCl, pH 7,9, 10 mM $MgCl_2$, 250 mM NaCl, 2,5 mM $MnCl_2$, 2 mM Dithiothreitol (DTT)), 40 mikromolar alpha-[^{32}P]-ATP, 20 Einheiten HPRI (Amersham Corp.) und ungefähr 9 bis 10 Einheiten RNAse-freie poly-A-Polymerase (BRL) enthielt, inkubiert. Die Inkubation erfolgte für 10 min bei 37°C und die Reaktionen wurden mit EDTA (Endkonzentration ungefähr 250 mM) gestoppt. Die Lösung wurde mit einem gleichen Volumen von Phenol-Chloroform und mit einem gleichen Volumen Chloroform extrahiert und Nukleinsäuren wurden über Nacht bei –20°C mit 2,5 Volumen Ethanol in Gegenwart von 200 mM NaCl ausgefällt.

Isolierung von Klon b5a

[0192] Die beta-HCV-cDNA-Bibliothek wurde durch Hybridisierung unter Verwendung einer synthetischen Sonde, die eine auf der HCV-cDNA-Sequenz in Klon 15e basierende Sequenz aufwies, e, durchmustert. Die Isolierung von Klon 15e ist in der EPA-Veröffentl. Nr. 318 216 beschrieben und seine Sequenz ist in **Fig. 3** gezeigt. Die Sequenz der synthetischen Sonde war:
5' ATT GCG AGA TCT ACG GGG CCT GCT ACT CCA 3'.

[0193] Ein Durchmustern der Bibliothek lieferte Klon beta-5a (b5a), der eine HCV-cDNA-Region von ungefähr 1000 Basenpaaren enthält. Die 5'-Region dieser cDNA überlappt mit den Klonen 35f, 19g, 26g und 15e (diese Klone werden weiter oben beschrieben). Die Region zwischen der 3'-terminalen poly-A-Sequenz und der 3'-Sequenz, die mit Klon 15e überlappt, enthält ungefähr 200 Basenpaare. Dieser Klon ermöglicht die Identifizierung einer Region der 3'-terminalen Sequenz des HCV-Genoms.

[0194] Die Sequenz von b5a ist innerhalb der Sequenz der HCV-cDNA in Klon 16jh (weiter unten beschrieben) enthalten. Darüber hinaus ist die Sequenz auch in CC34a, der ausgehend von der ursprünglichen lambda-gt11-Bibliothek (ATCC Nr. 40394) isoliert worden war, enthalten. (Die ursprüngliche lambda-gt11-Bibliothek wird hier als die "C"-Bibliothek bezeichnet).

Isolierung und Sequenz von Klonen, die durch PCR-Amplifizierung der 3'-Region des HCV-Genoms erzeugt worden sind

[0195] Es ist eine Mehrzahl von cDNA-Klonen erzeugt worden, die von der 3'-Region des HCV-Genoms abgeleitete Nukleotidsequenzen enthalten. Dies wurde bewerkstelligt, indem eine Zielregion des Genoms durch eine in Saiki et al. (1986) und in Saiki et al. (1988) beschriebene Polymerasekettenreaktionstechnik, die wie nachfolgend beschrieben modifiziert worden war, amplifiziert wurde. Die HCV-RNA, die amplifiziert wurde, wurde ausgehend von dem ursprünglichen infektiösen Schimpansenplasmapool, der für die Erzeugung der in der EPA-Veröffentl. Nr. 318 216 beschriebenen HCV-cDNA-lambda-gt11-Bibliothek (ATCC Nr. 40394) verwendet worden war, erhalten. Die Isolierung der HCV-RNA erfolgte, wie weiter oben beschrieben. Die isolierte RNA wurde am 3'-Ende mit ATP durch E. coli-poly-A-Polymerase mit einem Schwanz versehen, wie in Sippel (1973) beschrieben, mit der Ausnahme, dass das Nukleinsäure-Substrat durch die aus Schimpansenserum isolierten Nukleinsäuren ersetzt wurde. Die mit einem Schwanz versehene RNA wurde dann durch reverse Transkriptase unter Verwendung eines oligo-dT-Primer-Adaptors revers transkribiert, im wesentlichen wie von Han (1987) beschrieben, mit der Ausnahme, dass die Komponenten und die Sequenz des Primer-Adaptors waren:

Stuffer	NotI	SP6-Promotor	Primer
AATTC	GCGGCCGC	CATACGATTTAGGTGACACTATAGAA	T_{15}

[0196] Die resultierende cDNA wurde einer Amplifizierung durch PCR unterworfen unter Verwendung von zwei Primern:

Primer	Sequenz
JH32 (30mer)	ATAGCGGCCGCCCTCGATTGCGAGATCTAC
JH11 (20mer)	AATTCGGGCGGCCGCCATACGA

[0197] Der JH32-Primer enthielt 20 Nukleotidsequenzen, die mit dem 5'-Ende der Zielregion in der cDNA mit einer geschätzten T_m von 66°C hybridisierbar waren. Der JH11 war von einem Abschnitt des oligo-dT-Primer-Adaptors abgeleitet; er ist folglich für das 3'-Ende der cDNA mit einer T_m von 64°C spezifisch. Beide Primer wurden so gestaltet, dass sie eine Erkennungsstelle für das Restriktionsenzym NotI am 5'-Ende für eine Verwendung bei einer nachfolgenden Klonierung der amplifizierten HCV-cDNA aufwiesen.

[0198] Die PCR-Reaktion wurde ausgeführt, indem die cDNA und die Primer in 100 Mikrolitern Reaktionsmischung, welche die vier Desoxynukleosidtriphosphate, Puffersalze und Metallionen und eine aus Thermus aquaticus isolierte thermostabile DNA-Polymerase (Taq-Polymerase), die sich in einem Perkin Elmer Cetus-PCR-Kit (N801-0043 oder N801-0055) befanden, enthielt, suspendiert wurden. Die PCR-Reaktion wurde für 35 Zyklen in einem Perkin Elmer Cetus-"DNA thermal cycler"-Gerät ausgeführt. Jeder Zyklus bestand aus einem 1,5-minütigen Denaturierungsschritt bei 94°C, einem Anlagerungsschritt ("annealing step") bei 60°C für 2 min und einem Primerverlängerungsschritt bei 72°C für 3 min. Die PCR-Produkte wurden einer Southern-Blot-Analyse unter Verwendung einer 30-meren Nukeotidsonde, JH34, deren Sequenz auf jener der 3'-terminalen Region von Klon 15e basierte, unterzogen. Die Sequenz von JH34 ist:
5' CTT GAT CTA CCT CCA ATC ATT CAA AGA CTC 3'.

[0199] Die durch die HCV-cDNA-Sonde nachgewiesenen PCR-Produkte reichten in der Größe von ungefähr 50 bis ungefähr 400 Basenpaare.

[0200] Um die amplifizierte HCV-cDNA zu klonieren, wurden die PCR-Produkte mit NotI gespalten und durch Polyacrylamidgelelektrophorese nach der Größe aufgetrennt. DNA, die größer als 300 Basenpaare war, wurde in die NotI-Stelle von pUC18S kloniert. Der Vektor pUC18S wird konstruiert, indem ein NotI-Polylinker hinzugefügt wird, der zwischen die EcoRI- und SalI-Stellen von pUC18 kloniert wird. Die Klone wurden unter Verwendung der JH34-Sonde auf HCV-cDNA durchmustert. Es wurde eine Anzahl von positiven Klonen erhalten und sequenziert. Die Nukleotidsequenz des HCV-cDNA-Inserts in einem dieser Klone, 16jh, und die darin kodierten Aminosäuren sind in **Fig. 15** gezeigt. In dieser Figur ist eine Nukleotidheterogenität, die in der Sequenz der HCV-cDNA in Klon 16jh verglichen mit einem anderen Klon dieser Region nachgewiesen wird, angegeben.

Zusammengestellte HCV-cDNA-Sequenzen

[0201] Aus einer Reihe von überlappenden Klonen, die aus den verschiedenen, weiter oben beschriebenen HCV-cDNA-Bibliotheken abgeleitet worden waren, ist eine HCV-cDNA-Sequenz zusammengestellt worden. In dieser Sequenz liegt die zusammengestellte HCV-cDNA-Sequenz, die ausgehend von den Klonen b114a, 18g, ag30a, CA205a, CA290a, CA216a, pi14a, CA167b, CA156e, CA84a und CA59a erhalten worden ist, stromaufwärts von der zusammengestellten, in der EPA-Veröffentl. Nr. 318 216 veröffentlichten HCV-cDNA-Sequenz, die in **Fig.** 16 gezeigt ist. Die zusammengestellte HCV-cDNA-Sequenz, die ausgehend von den Klonen b5a und 16j erhalten worden ist, (liegt) stromabwärts von der in der EPA-Veröffentl. Nr. 318 216 veröffentlichten zusammengestellten HCV-cDNA-Sequenz.

[0202] **Fig.** 17 zeigt die zusammengestellte HCV-cDNA-Sequenz, die aus den oben beschriebenen Klonen abgeleitet worden ist, und die zusammengestellte HCV-cDNA-Sequenz, die in der EPA-Veröffentl. Nr. 318 216 veröffentlicht worden ist. Die Klone, ausgehend von denen die Sequenz abgeleitet worden war, sind b114a, 18g, ag30a, CA205a, CA290a, CA216a, pi14a, CA167b, CA156e, CA84a, CA59a, K9-1 (auch bezeichnet als k9-1), 26j, 13i, 12f, 14i, 11b, 7f, 7e, 8h, 33c, 40b, 37b, 35, 36, 81, 32, 33b, 25c, 14c, 8f, 33f, 33g, 39c, 35f, 19g, 26g, 15e, b5a und 16jh. In der Figur geben die drei Striche oberhalb der Sequenz die Position des mutmaßlichen Methionin-Startcodons an.

[0203] Klon b114a wurde unter Verwendung der für Klon b5a weiter oben beschriebenen Klonierungsprozedur erhalten mit der Ausnahme, dass die Sonde die synthetische Sonde war, die verwendet worden war, um Klon 18g weiter oben nachzuweisen. Klon b114a überlappt mit den Klonen 18g, ag30a und CA205a mit der Ausnahme, dass Klon b114a zusätzlich zwei Nukleotide stromaufwärts von der Sequenz in Klon 18g (d. h. 5'-CA) aufweist. Diese beiden zusätzlichen Nukleotide sind in die in **Fig.** 17 gezeigte genomische HCV-Sequenz aufgenommen worden.

[0204] Es sollte festgehalten werden, dass, obwohl mehrere der weiter oben beschriebenen Klone ausgehend von anderen Bibliotheken als der ursprünglichen HCV-cDNA-lambda-gt11-C-Bibliothek (ATCC Nr. 40394) erhalten worden sind, diese Klone HCV-cDNA-Sequenzen enthalten, die mit HCV-cDNA-Sequenzen in der ursprünglichen Bibliothek überlappen. Dementsprechend ist im wesentlichen die gesamte HCV-Sequenz aus der ursprünglichen lambda-gt11-C-Bibliothek (ATCC Nr. 40394), die verwendet worden war, um den ersten HCV-cDNA-Klon (5-1-1) abzuleiten, ableitbar. Die Isolierung von Klon 5-1-1 ist in der EPA-Veröffentl. Nr. 318 216 beschrieben.

Aufreinigung des Fusionspolypeptids C100-3

Alternatives Verfahren

[0205] Das Fusionspolypeptid C100-3 (das auch als HCV c100-3 und alternativ c100-3 bezeichnet wird) umfasst Superoxiddismutase (SOD) am N-Terminus und ein C100-HCV-Polypeptid im Leseraster am C-Terminus. Ein Verfahren zur Herstellung des Polypeptids durch Expression in Hefe und differenzielle Extraktion der unlöslichen Fraktion der extrahierten Wirtshefezellen ist in der EPA-Veröffentl. Nr. 318 216 beschrieben. Ein alternatives Verfahren zur Herstellung dieses Fusionspolypeptids wird nachfolgend beschrieben. In diesem Verfahren wird das Antigen aus dem rohen Zelllysat mit Aceton ausgefällt; das mittels Aceton ausgefällte Antigen wird dann einer Ionenaustauschchromatographie unterzogen und durch Gelfiltration weiter gereinigt.

[0206] Das Fusionspolypeptid C100-3 (HCV c100-3) wird in dem Hefestamm JSC 308 (ATCC Nr. 20879), der mit pAB24C100-3 (ATCC Nr. 67976) transformiert ist, exprimiert; die transformierte Hefe wird unter Bedingungen kultiviert, die eine Expression erlauben (d. h. durch Kultivierung in 1% Glucose enthaltendem YEP). (Siehe EPA-Veröffentl. Nr. 318 216). Es wird ein Zelllysat hergestellt, indem die Zellen in Puffer A (20 mM Tris HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF) suspendiert werden. Die Zellen werden durch Mahlen mit Glaskügelchen in einem Homogenisator vom Typ Dynomill oder einem dazu äquivalenten Gerät aufgebrochen. Das Ausmaß des Aufbrechens der Zellen wird überwacht, indem Zellen unter einem Mikroskop mit Phasenoptik gezählt werden. Aufgebrochene Zellen erscheinen dunkel, während lebensfähige Zellen hell gefärbt sind. Es wird der Prozentsatz von aufgebrochenen Zellen bestimmt.

[0207] Wenn der Prozentsatz von aufgebrochenen Zellen ungefähr 90% oder mehr beträgt, wird der Rückstand aus aufgebrochenen Zellen von den Glaskügelchen durch Zentrifugation abgetrennt und die Glaskügelchen werden mit Puffer A gewaschen. Nach dem Vereinigen der Waschflüssigkeiten und des Homogenisats wird das unlösliche Material in dem Lysat durch Zentrifugation gewonnen. Das Material in dem Sediment ("pellet") wird gewaschen, um lösliche Proteine durch Suspension in Puffer B (50 mM Glycin, pH 12, 0, 1 mM DTT, 500 mM NaCl), gefolgt von Puffer C (50 mM Glycin, pH 10,0, 1 mM DTT) zu entfernen. Das unlösliche Material wird durch Zentrifugation rückgewonnen und durch Suspension in Puffer C, der SDS enthält, solubilisiert. Die extrahierte Lösung kann in Gegenwart von β-Mercaptoethanol erwärmt und durch Ultrafiltration auf konzentriert werden. Das HCV-c100-3 in dem Extrakt wird mit kaltem Aceton ausgefällt. Sofern gewünscht, kann der Niederschlag bei Temperaturen von ungefähr oder unter –15°C aufbewahrt werden.

[0208] Vor der Ionenaustauschchromatographie wird das durch Aceton ausgefällte Material durch Zentrifugation gewonnen und kann unter Stickstoff getrocknet werden. Der Niederschlag wird in Puffer D (50 mM Glycin, pH 10,0, 1 mM DTT, 7 M Harnstoff) suspendiert und zentrifugiert, um unlösliches Material zu sedimentieren. Das Material im Überstand wird auf eine zuvor mit Puffer D äquilibrierte Anionenaustauschersäule aufgetragen. Es werden Fraktionen gesammelt und durch Ultraviolett-Absorption oder Gelelektrophorese auf SDS-Polyacrylamidgelen analysiert. Jene Fraktionen, die das HCV-c100-3-Polypeptid enthalten, werden gepoolt.

[0209] Um das HCV-c100-3-Polypeptid durch Gelfiltration zu reinigen, werden die gepoolten Fraktionen aus der Ionenaustauschersäule in Gegenwart von β-Mercaptoethanol und SDS erwärmt und das Eluat wird durch Ultrafiltration aufkonzentriert. Das Konzentrat wird auf eine zuvor mit Puffer E (20 mM Tris HCl, pH 7,0, 1 mM DTT, 0,1% SDS) äquilibrierte Gelfiltrationssäule aufgetragen. Die Anwesenheit von HCV-c100-3 in den eluierten Fraktionen wie auch die Anwesenheit von Verunreinigungen werden durch Gelelektrophorese auf Polyacrylamidgelen in Gegenwart von SDS und Sichtbarmachung der Polypeptide bestimmt. Jene Fraktionen, die gereinigtes HCV-c100-3 enthalten, werden gepoolt. Fraktionen mit hohem HCV-c100-3-Gehalt können weiter gereinigt werden, indem das Gelfiltrationsverfahren wiederholt wird. Wenn die Entfernung von teilchenförmigem Material gewünscht wird, kann das HCV-c100-3 enthaltende Material durch einen 0,22 µm-Filter filtriert werden.

Expression und Antigenität von in HCV-cDNA kodierten Polypeptiden

In E. coli exprimierte Polypeptide

[0210] Die in einer Anzahl von HCV-cDNAs, die das genomische HCV-ORF überspannen, kodierten Polypeptide wurden in E. coli exprimiert und auf ihre Antigenität unter Verwendung von Serum, das aus einer Anzahl von Individuen mit NANBH erhalten worden war, getestet. Die die klonierten HCV-cDNAs enthaltenden Expressionsvektoren wurden ausgehend von pSODcf1 (Steimer et al. (1986)) konstruiert. Um sicher zu sein, dass ein korrektes Leseraster erzielt werden würde, wurden drei separate Expressionsvektoren, pcf1AB, pcf1CD und pcf1Ef, erzeugt, indem einer von drei Linkern, AB, CD und EF an ein BamHI-EcoRI-Fragment ligiert wurde, das durch Verdau des Vektors pSODcf1 mit EcoRI und BamHI bis zur Vollständigkeit gefolgt von einer Behandlung mit alkalischer Phosphatase abgeleitet worden war. Die Linker wurden ausgehend von sechs Oligomeren, A, B, C, D, E und F, erzeugt. Jedes Oligomer wurde durch Behandlung mit Kinase in Gegenwart von ATP phosphoryliert, bevor es an sein komplementäres Oligomer hybridisiert wurde. Die Sequenzen der synthetischen Linker waren die Folgenden:

Name	DNA-Sequenz (5' nach 3')
A	GATC CTG AAT TCC TGA TAA
B	GAC TTA AGG ACT ATT TTA A
C	GATC CGA ATT CTG TGA TAA
D	GCT TAA GAC ACT ATT TTA A
E	GATC CTG GAA TTC TGA TAA
F	GAC CTT AAG ACT ATT TTA A

[0211] Jeder der drei Linker zerstört die ursprüngliche EcoRI-Stelle und erzeugt eine neue EcoRI-Stelle innerhalb des Linkers, aber innerhalb eines unterschiedlichen Leserasters. Folglich befanden sich die HCV-cDNA-EcoRI-Fragmente, die aus diesen Klonen, wenn diese in den Expressionsvektor insertiert waren, isoliert wurden, in drei unterschiedlichen Leserastern.

[0212] Die HCV-cDNA-Fragmente in den bezeichneten lambda-gt11-Klonen wurden durch Verdau mit EcoRI ausgeschnitten; jedes Fragment wurde in pcf1AB, pcf1CD und pcf1EF insertiert. Mit diesen Expressionskonstrukten wurden dann D1210-E.coli-Zellen transformiert, die Transformanten wurden kloniert und rekombinante Bakterien ausgehend von jedem Klon wurden induziert, so dass sie die Fusionspolypeptide exprimierten, indem die Bakterien in Gegenwart von IPTG kultiviert wurden.

[0213] Expressionsprodukte der angegebenen HCV-cDNAs wurden auf Antigenität durch direktes immunologisches Durchmustern der Kolonien unter Verwendung einer Modifikation des in Helfman et al. (1983) beschriebenen Verfahrens getestet. Kurz zusammengefasst, wurden die Bakterien, wie in Fig. 18 gezeigt, auf auf Ampicillinplatten aufgelegte Nitrocellulosefilter ausplattiert, so dass man ungefähr 1000 Kolonien pro Filter erhielt. Kolonien wurden auf Nitrocellulosefilter replikaplattiert und die Replikate wurden erneut über Nacht in Gegenwart von 2 mM IPTG und Ampicillin kultiviert. Die Bakterienkolonien wurden lysiert, indem die Nitrocellulosefilter ungefähr 15 bis 20 min in einer mit $CHCl_3$-Dampf gesättigten Atmosphäre suspendiert wurden. Jeder Filter wurde in eine individuelle 100 mm-Petrischale gelegt, die 10 ml 50 mM Tris HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 3% (Gew./Vol.) BSA, 40 µg/ml Lysozym und 0,1 µg/ml DNase enthielt. Die Platten wurden für mindestens 8 h bei Raumtemperatur sanft bewegt. Die Filter wurden in TBST (50 mM Tris HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,005% Tween 20) gespült. Nach der Inkubation wurden die Zellreste gespült und in TBS (TBST ohne Tween), das 10% Schafsserum enthielt, inkubiert; die Inkubation erfolgte für 1 h. Die Filter wurden dann inkubiert mit vorbehandelten Seren in TBS aus Individuen mit NANBH, die umfassten: 3 Schimpansen; 8 Patienten mit chronischer NANBH, deren Seren hinsichtlich Antikörpern gegen HCV-C100-3-Polypeptid (beschrieben in der EPA-Veröffentl. Nr. 318 216 und weiter oben) (auch bezeichnet als C100) positiv waren; 8 Patienten mit chronischer NANBH, deren Seren hinsichtlich anti-C100-Antikörpern negativ waren; einen gene-

senden Patienten, dessen Serum hinsichtlich anti-C100-Antikörpern negativ war; und 6 Patienten mit in der Öffentlichkeit erworbener NANBH, einschließlich einem, dessen Serum hinsichtlich anti-C100-Antikörpern stark positiv war, und einem, dessen Serum hinsichtlich anti-C100-Antikörpern marginal positiv war. Die in TBS verdünnten Seren wurden durch Vorabsorption mit hSOD vorbehandelt. Die Inkubation der Filter mit den Seren dauerte wenigstens zwei Stunden. Nach der Inkubation wurden die Filter zweimal 30 min mit TBST gewaschen. Die Markierung von exprimierten Proteinen, an die Antikörper in den Seren banden, erfolgte durch Inkubation für 2 h mit ^{125}I-markiertem Schaf-antihuman-Antikörper. Nach dem Waschen wurden die Filter zweimal 30 min mit TBST gewaschen, getrocknet und einer Autoradiographie unterzogen.

[0214] Eine Anzahl von Klonen (siehe weiter unten) exprimierte HCV-Epitope enthaltende Polypeptide, die mit Serum aus Individuen mit NANBH immunologische Reaktivität zeigten. Fünf von diesen Polypeptiden waren sehr immunogen, indem Antikörper gegen HCV-Epitope in diesen Polypeptiden in vielen unterschiedlichen Patientenseren nachgewiesen wurden. Die diese Polypeptide kodierenden Klone und die Lage des Polypeptids in dem mutmaßlichen HCV-Polyprotein (wobei die Aminosäurenummern mit dem mutmaßlichen Startcodon beginnen) sind die Folgenden: Klon 5-1-1, Aminosäuren 1694–1735; Klon C100, Aminosäuren 1569–1931; Klon 33c, Aminosäuren 1192–1457; Klon CA279a, Aminosäuren 1–84; und Klon CA290a, Aminosäuren 9–177. Die Lage der immunogenen Polypeptide innerhalb des mutmaßlichen HCV-Polyproteins ist unmittelbar nachfolgend gezeigt.

Polypeptide mit erwiesener Reaktivität mit Seren von NANbH-Patienten kodierende Klone	
Klon	Lage innerhalb des HCV-Polyproteins (Aminosäure-Nr., beginnend mit mutmaßlichen Start-Methionin)
CA279a	1-84
CA290a	9-177

[0215] Die Ergebnisse hinsichtlich der Immunogenität der in den verschiedenen untersuchten Klonen kodierten Polypeptide legen einen effizienten Nachweis nahe und Immunisierungssysteme könnten Gruppen von HCV-Polypeptiden/Epitopen enthalten.

Expression von HCV-Epitopen in Hefe

[0216] Es werden drei unterschiedliche Hefe-Expressionsvektoren konstruiert, welche die Insertion von HCV-cDNA in drei unterschiedlichen Leserastern ermöglichen. Die Konstruktion von einem der Vektoren, pAB24C100-3, ist in der EPA-Veröffentl. Nr. 318 216 beschrieben. In den nachfolgenden Untersuchungen wird die C100-HCV-cDNA durch die HCV-cDNA aus den weiter oben in Zusammenhang mit der Antigenitätskartierungsstudie unter Verwendung der in E. coli exprimierten Produkte aufgelisteten Klonen ersetzt. Die Konstruktion der anderen Vektoren ersetzt den im Rahmen der obigen E. coli-Untersuchungen beschriebenen Adaptor durch einen der folgenden Adaptoren:

Adaptor 1

```
ATT TTG AAT TCC TAA TGA G
     AC TTA AGG ATT ACT CAG CT
```

Adaptor 2

```
AAT TTG GAA TTC TAA TGA G
     AC CTT AAG ATT ACT CAG CT.
```

[0217] Die insertierte HCV-cDNA wird in mit den Vektoren transformierten Hefen unter Verwendung der weiter oben für die Expression des Fusionspolypeptids C100-3 beschriebenen Bedingungen exprimiert. Die resultierenden Polypeptide werden unter Verwendung der Seren aus Individuen mit NANBH, die weiter oben für das Screenen auf immunogene, in HCV-cDNAs kodierte Polypeptide, die in E. coli exprimiert wurden, beschrieben worden sind, durchmustert.

Vergleich der Hydrophobieprofile von HCV-Polyproteinen mit dem West Nile-Virus-Polyprotein und mit Dengue-Virus-NS1

[0218] Das Hydrophobieprofil eines HCV-Polyprotein-Abschnitts wurde mit dem eines typischen Flavivirus, des West Nile-Virus, verglichen. Die Polypeptidsequenz des Polyproteins des West Nile-Virus wurde aus den bekannten Polynukleotidsequenzen, welche die Nicht-Struktur-Proteine von jenem Virus kodieren, abgeleitet. Die HCV-Polyproteinsequenz wurde aus der Sequenz von überlappenden cDNA-Klonen abgeleitet. Die Profile wurden unter Verwendung eines Antigenprogramms bestimmt, das ein Fenster von 7 Aminosäuren Breite (die fragliche Aminosäure und 3 Reste auf jeder Seite) verwendet, um die durchschnittliche Hydrophobie im Bereich eines gegebenen Aminosäurerests anzugeben. Die Parameter, welche die reaktive Hydrophobie für jeden Aminosäurerest liefern, stammen von Kyte und Doolittle (1982). **Fig.** 19 zeigt die Hydrophobieprofile der beiden Polyproteine; die den Nicht-Struktur-Proteinen des West Nile-Virus, ns1 bis ns5, entsprechenden Bereiche sind in der Figur angegeben. Wie in der Figur ersehen werden kann, gibt es eine allgemeine Ähnlichkeit bei den Profilen des HCV-Polyproteins und des Polyproteins des West Nile-Virus.

[0219] Die Sequenz der in der 5'-Region von HCV-cDNA kodierten Aminosäuren, die in **Fig.** 16 gezeigt ist, ist mit der entsprechenden Region von einem der Stämme von Dengue-Virus, die weiter oben beschrieben worden sind, hinsichtlich des Profils von Regionen von Hydrophobie und Hydrophilie verglichen worden (Daten nicht gezeigt). Dieser Vergleich zeigte, dass die Polypeptide aus HCV und Dengue, die in dieser Region, die der NS1 kodierenden Region (oder einem Abschnitt davon) entspricht, kodiert werden, ein ähnliches Hydrophobie/Hydrophilie-Profil aufweisen.

[0220] Die Ähnlichkeit bei den Hydrophobieprofilen in Verbindung mit den zuvor identifizierten Homologien bei den Aminosäuresequenzen von HCV und Dengue-Flavivirus in EP 0 218 316 legt nahe, dass HCV mit diesen Mitgliedern der Flavivirus-Familie verwandt ist.

Charakterisierung der mutmaßlichen Polypeptide, die innerhalb des HCV-ORF kodiert werden

[0221] Die in **Fig.** 17 gezeigte Sequenz des HCV-cDNA-Sinnstrangs wurde aus den überlappenden HCV-cDNAs in den verschiedenen, in der EPA-Veröffentl. Nr. 318 216 beschriebenen Klonen und jenen, die weiter oben beschrieben worden sind, abgeleitet. Es kann aus der Sequenz abgeleitet werden, dass das HCV-Genom primär ein langes kontinuierliches ORF enthält, das ein Polyprotein kodiert. In der Sequenz entspricht Nukleotidnummer 1 dem ersten Nukleotid des MET-Startcodons; Nummern mit negativem Vorzeichen geben an, dass die Nukleotide sich um diesen Abstand in der 5'-Richtung entfernt (stromaufwärts) befinden, während positive Nummern angeben, dass die Nukleotide sich um diesen Abstand in der 3'-Richtung entfernt (stromabwärts) befinden. Die zusammengesetzte Sequenz zeigt den "Sinn"-Strang der HCV-cDNA.

[0222] Die aus der HCV-cDNA-Sinnstrangsequenz abgeleitete Aminosäuresequenz des mutmaßlichen HCV-Polyproteins ist ebenfalls in **Fig.** 17 gezeigt, wobei Position 1 mit der mutmaßlichen Methionin-Startaminosäure beginnt.

[0223] Mögliche Proteindomänen des kodierten HCV-Polyproteins wie auch die ungefähren Grenzen sind die Folgenden (die innerhalb der Klammern angegebenen Polypeptide sind jene, die in der Flavivirus-Domäne kodiert werden):

Mutmaßliche Domäne	Ungefähre Grenze (Aminosäure-Nr.)
"C" (Nukleokapsid-Protein)	1-120
"E" (Virionenhüllprotein(e) und möglicherweise Matrix (M)-Proteine)	120-400
"NS1" (Komplement-Anheftungs-Antigen ?)	400-660
"NS2" (unbekannte Funktion)	660-1050
"NS3" (Protease ?)	1050-1640
"NS4" (unbekannte Funktion)	1640-2000
"NS5" (Polymerase)	2000 - ? Ende

[0224] Es sollte jedoch festgehalten werden, dass Hydrophobieprofile (die weiter unten beschrieben werden) anzeigen, dass HCV sich von dem Flavivirus-Modell insbesondere in Hinblick auf die Region stromaufwärts von NS2 unterscheidet. Darüber hinaus sollen die angegebenen Grenzen keine festen Abgrenzungen zwischen den mutmaßlichen Polypeptiden zeigen.

Das Hydrophilie- und Antigenitätsprofil des Polypeptids

[0225] Profile der Hydrophilie/Hydrophobie und des Antigen-Indexes des in der in **Fig.** 16 gezeigten HCV-cDNA-Sequenz kodierten mutmaßlichen Polyproteins wurden durch Computeranalyse bestimmt. Das Programm für Hydrophilie/Hydrophobie war, wie weiter oben beschrieben. Der Antigen-Index resultiert aus einem Computerprogramm, das auf den folgenden Kriterien beruht: 1) Oberflächenwahrscheinlichkeit, 2) Vorhersage von alpha-Helikalität durch zwei unterschiedliche Verfahren; 3) Vorhersage von beta-Faltblatt-Regionen durch zwei unterschiedliche Verfahren; 4) Vorhersage von U-Schleifen durch zwei unterschiedliche Verfahren; 5) Hydrophilie/Hydrophobie; und Flexibilität. Die Kurven der Profile, die durch die Computeranalysen erzeugt wurden, sind in **Fig.** 20 gezeigt. In dem Hydrophilieprofil gibt ein Ausschlag über die Abszisse hinaus Hydrophilie und unter die Abszisse Hydrophobie an. Es wird üblicherweise angenommen, dass die Wahrscheinlichkeit, dass eine Polypeptidregion antigen ist, zunimmt, wenn es in dem Hydrophilie- und/oder Antigenitätsprofil einen Ausschlag über die Abszisse hinaus nach oben gibt. Es sollte jedoch festgehalten werden, dass diese Profile nicht notwendigerweise Hinweise auf die Stärke der Immunogenität eines Polypeptids liefern.

Identifizierung von colinearen Peptiden in HCV und Flaviviren

[0226] Die Aminosäuresequenz des in dem HCV-cDNA-Sinnstrang kodierten mutmaßlichen Polyproteins wurde mit den bekannten Aminosäuresequenzen von mehreren Mitgliedern von Flaviviren verglichen. Der Vergleich zeigt, dass die Homologie nur gering ist, aber aufgrund der Regionen, in denen sie festgestellt wird, ist sie wahrscheinlich signifikant. Die konservierten colinearen Regionen sind in Fig. 21 gezeigt. Die unter den Sequenzen angegebenen Aminosäurenummern repräsentieren die Nummer in dem mutmaßlichen HCV-Polyprotein (siehe **Fig.** 17).

[0227] Der Abstand von diesen konservierten Motiven ist zwischen den Flaviviren und HCV ähnlich und impliziert, dass es einige Ähnlichkeit zwischen HCV und diesen flaviviralen Agentien gibt.

[0228] Die folgenden aufgelisteten Materialien sind unter den Maßgaben des Budapester Vertrags bei der American Type Culture Collection (ATCC), 12301 Parklawn Dr., Rockville, Maryland 20852, hinterlegt und ihnen sind die folgenden Aufnahmenummern zugewiesen worden.

lambda-gt11	ATCC-Nr.	Hinterlegungsdatum
HCV-cDNA-Bibliothek	40394	1. Dez. 1987
Klon 81	40388	17. Nov. 1987
Klon 91	40389	17. Nov. 1987
Klon 1-2	40390	17. Nov. 1987
Klon 5-1-1	40391	18. Nov. 1987
Klon 12f	40514	10. Nov. 1988
Klon 35f	40511	10. Nov. 1988
Klon 15e	40513	10. Nov. 1988
Klon K9-1	40512	10. Nov. 1988
JSC 308	20879	5. Mai 1988
pS356	67683	29. April 1988

[0229] Zusätzlich wurden am 11. Mai 1989 die folgenden Hinterlegungen vorgenommen.

Stamm	Linker	ATCC Nr.
D1210 (Cf1/5-1-1)	EF	67967
D1210 (Cf1/81)	EF	67968
D1210 (Cf1/CA74a)	EF	67969
D1210 (Cf1/35f)	AB	67970
D1210 (Cf1/279a)	EF	67971
D1210 (Cf1/C36)	CD	67972
D1210 (Cf1/13i)	AB	67973
D1210 (Cf1/C33b)	EF	67974
D1210 (Cf1/CA290a)	AB	67975
HB101 (AB24/C100 #3R)		67976

[0230] Die folgenden Derivate von Stamm D1210 wurden am 03. Mai 1989 hinterlegt.

Stamm-Derivat	ATCC Nr.
pCF1CS/C8f	67956
pCF1AB/C12f	67952
pCF1EF/14c	67949
pCF1EF/15a	67954
pCF1AB/C25c	67958
pCF1EF/C33c	67953
pCF1EF/C33f	67050
pCF1CD/33g	67951
pCF1CD/C39c	67955
pCF1EF/C40b	67957
pCF1EF/CA167b	67959

[0231] Die folgenden Stämme wurden am 12. Mai 1989 hinterlegt.

Stamm	ATCC Nr.
Lambda gt11(C35)	40603
Lambda gt10(beta-5a)	40602
D1210 (C40b)	67980
D1210 (M16)	67981

[0232] Die hier erwähnten hinterlegten Materialien sollen nur der Bequemlichkeit dienen und sind angesichts der hier gegebenen Erläuterungen nicht erforderlich, um die vorliegende Erfindung praktisch auszuführen, und diese Materialien werden zusätzlich unter Bezugnahme in diese Unterlagen aufgenommen.

Industrielle Anwendbarkeit

[0233] Die Erfindung hat in den verschiedenen hier offenbarten Manifestationen zahlreiche industrielle Verwendungen, von denen einige die Folgenden sind. Die HCV-cDNAs können für die Gestaltung von Sonden für den Nachweis von HCV-Nukleinsäuren in Proben verwendet werden. Die von den cDNAs abgeleiteten Sonden können verwendet werden, um HCV-Nukleinsäuren bei beispielsweise chemischen Synthesereaktionen nachzuweisen. Sie können auch in Screening-Programmen auf antivirale Mittel verwendet werden, um die Wirkung der Mittel bei der Hemmung der Virusreplikation in Zellkultursystemen und Tiermodellsystemen zu bestimmen. Die HCV-Polynukleotidsonden sind auch nützlich bei dem Nachweis von viralen Nukleinsäuren bei Menschen und können folglich als Grundlage für die Diagnose von HCV-Infektionen bei Menschen dienen.

[0234] Zusätzlich zu dem Obigen liefern die hier bereitgestellten cDNAs Informationen und ein Mittel für die Synthese von Polypeptiden, die Epitope von HCV enthalten. Diese Polypeptide sind beim Nachweis von Antikörpern gegen HCV-Antigene nützlich. Hier wird eine Reihe von Immunoassays für HCV-Infektionen basierend auf rekombinanten Polypeptiden, die HCV-Epitope enthalten, beschrieben und werden kommerzielle Anwendung finden bei der Diagnose von durch HCV induzierter NANBH, beim Durchmustern von Blutbankspendern auf durch HCV verursachte infektiöse Hepatitis und auch zum Nachweis von verunreinigtem Blut von infektiösen Blutspendern. Die viralen Antigene werden auch Nützlichkeit bei der Überwachung der Wirksamkeit von antiviralen Mitteln in Tiermodellsystemen haben. Zusätzlich werden die von den hier offenbarten von HCV-cDNAs abgeleiteten Polypeptide Nützlichkeit als Impfstoffe für eine Behandlung von HCV-Infektionen haben.

[0235] Die von den HCV-cDNAs abgeleiteten Polypeptide sind neben den oben angegebenen Verwendungen auch nützlich für die Erzeugung von anti-HCV-Antikörpern. Sie können folglich in anti-HCV-Impfstoffen verwendet werden. Die als Ergebnis einer Immunisierung mit den HCV-Polypeptiden erzeugten Antikörper sind jedoch auch nützlich beim Nachweis der Anwesenheit von viralen Antigenen in Proben. Sie können folglich verwendet werden, um die Produktion von HCV-Polypeptiden in chemischen Systemen zu bestimmen. Die anti-HCV-Antikörper können auch verwendet werden, um die Wirksamkeit von antiviralen Mitteln in Screeningprogrammen, wo diese Mittel in Gewebekultursystemen getestet werden, zu überwachen. Sie können auch für eine passive Immuntherapie verwendet werden, und um eine durch HCV verursachte NANBH zu diagnostizieren, indem der Nachweis von einem oder mehreren viralen Antigen(en) sowohl bei Blutspendern als auch -empfängern ermöglicht wird. Eine weitere wichtige Verwendung für anti-HCV-Antikörper besteht in der Affinitätschromatographie für die Reinigung von Viren und viralen Polypeptiden. Die gereinigten Virus- und viralen Polypeptid-Präparationen können in Impfstoffen verwendet werden. Das gereinigte Virus kann jedoch auch für die Entwicklung von Zellkultursystemen nützlich sein, in denen HCV repliziert.

[0236] Antisinn-Polynukleotide können als Inhibitoren der Virusreplikation verwendet werden.

[0237] Aus Bequemlichkeitsgründen können die anti-HCV-Antikörper und HCV-Polypeptide, seien sie natürlich oder rekombinant, in Kits verpackt werden.

Patentansprüche

1. Polypeptid in im Wesentlichen isolierter Form, das eine zusammenhängende Sequenz eines Hepatitis C Virus (HCV)-Polyproteins von mindestens 10 Aminosäuren umfasst, bei dem die zusammenhängende Sequenz im Bereich der Aminosäuren 1 bis 449 eines HCV-Polyproteins liegt, wobei HCV gekennzeichnet ist durch:
ein RNA-Genom mit Positivstrangordnung;
wobei das Genom einen für ein Polyprotein kodierenden offenen Leserahmen (ORF) umfasst; und

die Gesamtheit des kodierten Polyproteins mindestens 40% Homologie zu dem gesamten Polyprotein hat, das ausgewählt ist aus (i) dem wie in **Fig.** 17 gezeigten Polyprotein, oder (ii) dem Polyprotein eines viralen Isolates des Genoms, von dem die in einer Lambda gt-11 cDNA-Bibliothek bei der American Type Culture Collection (ATCC) mit der Zugangskodenummer 40394 hinterlegten cDNAs hergestellt wurden.

2. Polypeptid nach Anspruch 1, bei dem das Polyprotein mindestens 70% Homologie zu dem gesamten Polyprotein hat, das ausgewählt ist aus (i) dem wie in **Fig.** 17 gezeigten Polyprotein, oder (ii) dem Polyprotein eines viralen Isolates des Genoms, von dem die in einer Lambda gt-11 cDNA-Bibliothek bei der American Type Culture Collection (ATCC) mit der Zugangskodenummer 40394 hinterlegten cDNAs hergestellt wurden.

3. Polypeptid nach Anspruch 1, bei dem das Polyprotein mindestens 80% Homologie zu dem gesamten Polyprotein hat, das ausgewählt ist aus (i) dem wie in **Fig.** 17 gezeigten Polyprotein, oder (ii) dem Polyprotein eines viralen Isolates des Genoms, von dem die in einer Lambda gt-11 cDNA-Bibliothek bei der American Type Culture Collection (ATCC) mit der Zugangskodenummer 40394 hinterlegten cDNAs hergestellt wurden.

4. Polypeptid nach Anspruch 1, bei dem das Polyprotein mindestens 90% Homologie zu dem gesamten Polyprotein hat, das ausgewählt ist aus (i) dem wie in **Fig.** 17 gezeigten Polyprotein, oder (ii) dem Polyprotein eines viralen Isolates des Genoms, von dem die in einer Lambda gt-11 cDNA-Bibliothek bei der American Type Culture Collection (ATCC) mit der Zugangskodenummer 40394 hinterlegten cDNAs hergestellt wurden.

5. Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 4, bei dem die zusammenhängende Sequenz ausgewählt ist aus dem Bereich der Aminosäuren 1–84 oder dem Bereich der Aminosäuren 9–177 eines HCV-Polyproteins.

6. Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 5, bei dem die zusammenhängende Sequenz innerhalb der Sequenzen liegt, die aus der Gruppe ausgewählt sind bestehend aus **Fig. 4**, **Fig. 11**, 12 und 17.

7. Polypeptid nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die zusammenhängende Sequenz mindestens 15 Aminosäuren umfasst.

8. Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 7, bei dem die zusammenhängende Sequenz die Formel AAx-AAy hat, bei der x und y die in **Fig.** 17 dargestellten Aminosäurenummern angeben:
AA1-AA25, AA1-AA50, AA1-AA84, AA9-AA177, AA1-AA10, AA5-AA20, AA35-AA45, AA50-AA100, AA40-AA90, AA45-AA65, AA65-AA75, AA80-AA90, AA99-AA120, AA95-AA110, AA105-AA120, AA100-AA150, AA150-AA200, AA155-AA170, AA190-AA210, AA200-AA250, AA220-AA240, AA245-AA265, AA250-AA300, AA290–AA330, AA290-AA305, AA300-AA350, AA310-AA330, AA350-AA400, AA380-AA395, AA405-AA495, AA400-AA450, AA405-AA415, AA415-AA425, AA425-AA435, AA440-AA460, AA437-AA582.

9. Polypeptid nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem das Polypeptid immunologisch mit anti-HCV-Antikörpern reagiert.

10. Polypeptid, wie in einem der vorhergehenden Ansprüche definiert, gebunden an ein festes Substrat.

11. Immuntest-Kit, das ein Polypeptid gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche in einem geeigneten Behälter umfasst.

12. Immuntest-Verfahren zum Detektieren von gegen ein Hepatitis C-Virus (HCV)-Polypeptid gerichtete Antikörpern, das die Schritte umfasst:
(a) Bereitstellen eines ersten Polypeptids, das immunologisch reaktiv mit anti-HCV-Antikörpern ist, bestimmt durch Bindungskonkurrenz mit einem zweiten Polypeptid, das eine HCV-antigenische Sequenz von mindestens 10 zusammenhängenden Aminosäuren aus dem Bereich der Aminosäurenummern 1–449 eines HCV-Polyproteins umfasst.
(b) Inkubieren des ersten Polypeptids mit einer biologischen Probe unter Bedingungen, welche die Bildung eines Antikörper-Polypeptid-Komplexes ermöglichen; und
(c) Detektieren jedes das Polypeptid umfassenden Antikörper-Polypeptid-Komplexes, wobei HCV gekennzeichnet ist durch:
ein RNA-Genom mit Positivstrangordnung;
wobei das Genom einen für ein Polyprotein kodierenden offenen Leserahmen (ORF) umfasst; und
die Gesamtheit des kodierten Polyproteins mindestens 40% Homologie zu dem gesamten Polyprotein hat, das ausgewählt ist aus (i) dem wie in **Fig.** 17 gezeigten Polyprotein, oder (ii) dem Polyprotein eines viralen Isolates

des Genoms, von dem die in einer Lambda gt-11 cDNA-Bibliothek bei der American Type Culture Collection (ATCC) mit der Zugangskodenummer 40394 hinterlegten cDNAs hergestellt wurden.

13. Immuntest nach Anspruch 12, bei dem das Polyprotein mindestens 70% Homologie zu dem gesamten Polyprotein hat, das ausgewählt ist aus (i) dem wie in **Fig.** 17 gezeigten Polyprotein, oder (ii) dem Polyprotein eines viralen Isolates des Genoms, von dem die in einer Lambda gt-11 cDNA-Bibliothek bei der American Type Culture Collection (ATCC) mit der Zugangskodenummer 40394 hinterlegten cDNAs hergestellt wurden.

14. Immuntest nach Anspruch 12, bei dem das Polyprotein mindestens 80% Homologie zu dem gesamten Polyprotein hat, das ausgewählt ist aus (i) dem wie in **Fig.** 17 gezeigten Polyprotein, oder (ii) dem Polyprotein eines viralen Isolates des Genoms, von dem die in einer Lambda gt-11 cDNA-Bibliothek bei der American Type Culture Collection (ATCC) mit der Zugangskodenummer 40394 hinterlegten cDNAs hergestellt wurden.

15. Immuntest nach Anspruch 12, bei dem das Polyprotein mindestens 90% Homologie zu dem gesamten Polyprotein hat, das ausgewählt ist aus (i) dem wie in **Fig.** 17 gezeigten Polyprotein, oder (ii) dem Polyprotein eines viralen Isolates des Genoms, von dem die in einer Lambda gt-11 cDNA-Bibliothek bei der American Type Culture Collection (ATCC) mit der Zugangskodenummer 40394 hinterlegten cDNAs hergestellt wurden.

16. Immuntest nach einem der Ansprüche 12 bis 15, bei dem die Aminosäuren aus dem Bereich der Aminosäurenummern 1–449 des HCV-Polyproteins aus **Fig.** 17 ausgewählt sind.

17. Immuntest nach einem der Ansprüche 12 bis 16, bei dem das erste Polypeptid eine HCV-antigenische Sequenz aus dem Bereich der Aminosäurennummern 1–449 des HCV-Polyproteins aus **Fig.** 17 umfasst.

18. Immuntest nach einem der Ansprüche 12 bis 17, bei dem die biologische Probe menschliches Blut, Serum oder Plasma ist.

19. Polynukleotid in im Wesentlichen isolierter Form, das eine HCV-genomische Sequenz oder deren Komplement umfasst, die selektiv an ein Polynukleotid hybridisierbar ist, das im Bereich der Nukleotide –319 bis 1348 eines HCV-Genoms oder dem Komplement davon vorkommt, wobei HCV gekennzeichnet ist durch:
ein RNA-Genom mit Positivstrangordnung;
wobei das Genom einen für ein Polyprotein kodierenden offenen Leserahmen (ORF) umfasst; und
die Gesamtheit des kodierten Polyproteins mindestens 40% Homologie zu dem gesamten Polyprotein hat, das ausgewählt ist aus (i) dem wie in **Fig.** 17 gezeigten Polyprotein, oder (ii) dem Polyprotein eines viralen Isolates des Genoms, von dem die in einer Lambda gt-11 cDNA-Bibliothek bei der American Type Culture Collection (ATCC) mit der Zugangskodenummer 40394 hinterlegten cDNAs hergestellt wurden.

20. Polynukleotid nach Anspruch 19, bei dem das Polyprotein mindestens 70% Homologie zu dem gesamten Polyprotein hat, das ausgewählt ist aus (i) dem wie in **Fig.** 17 gezeigten Polyprotein, oder (ii) dem Polyprotein eines viralen Isolates des Genoms, von dem die in einer Lambda gt-11 cDNA-Bibliothek bei der American Type Culture Collection (ATCC) mit der Zugangskodenummer 40394 hinterlegten cDNAs hergestellt wurden.

21. Polynukleotid nach Anspruch 19, bei dem das Polyprotein mindestens 80% Homologie zu dem gesamten Polyprotein hat, das ausgewählt ist aus (i) dem wie in **Fig.** 17 gezeigten Polyprotein, oder (ii) dem Polyprotein eines viralen Isolates des Genoms, von dem die in einer Lambda gt-11 cDNA-Bibliothek bei der American Type Culture Collection (ATCC) mit der Zugangskodenummer 40394 hinterlegten cDNAs hergestellt wurden.

22. Polynukleotid nach Anspruch 19, bei dem das Polyprotein mindestens 90% Homologie zu dem gesamten Polyprotein hat, das ausgewählt ist aus (i) dem wie in **Fig.** 17 gezeigten Polyprotein, oder (ii) dem Polyprotein eines viralen Isolates des Genoms, von dem die in einer Lambda gt-11 cDNA-Bibliothek bei der American Type Culture Collection (ATCC) mit der Zugangskodenummer 40394 hinterlegten cDNAs hergestellt wurden.

23. Polynukleotid nach einem der Ansprüche 19 bis 22, bei dem die HCV-genomische Sequenz oder das Komplement davon innerhalb der Nukleotide –319 bis 1348 oder innerhalb der Nukleotide –319 bis –1 eines HCV-Genoms vorkommt.

24. Polynukleotid nach einem der Ansprüche 19 bis 23, bei dem die HCV-genomische Sequenz oder das Komplement davon ausgewählt ist aus der Gruppe von Sequenzen; die innerhalb der **Fig. 11**, 12 und 17 gefunden wird.

25. Polynukleotid nach einem der Ansprüche 19 bis 24, das DNA ist.

26. Polynukleotid nach einem der Ansprüche 19 bis 25, das eine Sonde oder ein Primer für die DNA-Synthese ist.

27. Polynukleotid nach Anspruch 26, bei dem die Sonde markiert ist.

28. Kit zur Analyse biologischer Proben auf die Anwesenheit von HCV-Polynukleotiden, das ein Polynukleotid gemäß einem der Ansprüche 19 bis 27 in einem geeigneten Behälter umfasst.

29. Verfahren zum Detektieren von HCV-Nukleinsäuren in einer Probe, das die Schritte umfasst:
a. Bereitstellen eines Polynukleotids, wie es in einem der Ansprüche 19 bis 27 definiert ist;
b. Umsetzen des Polynukleotids mit der Probe unter Bedingungen, welche die selektive Bildung von Polynukleotidduplexen zwischen dem Polynukleotid und jeder HCV-Nukleinsäure oder HCV-cDNA in der Probe erlauben; und
c. Detektieren jedes der das Polynukleotid enthaltenden Polynukleotidduplexe.

30. Verfahren zum Amplifizieren eines Polynukleotids des HCV in einer Probe, das die Schritte umfasst:
a. Amplifizieren des Polynukleotids des HCV unter Verwendung einer DNA-Polymerase und mindestens eines in einem der Ansprüche 19 bis 27 definierten Polynukleotids; und
b. Detektieren des amplifizierten Polynukleotids.

31. Verfahren nach Anspruch 29 oder 30, bei dem die Probe menschliches Blut, Serum oder Plasma ist.

32. Rekombinanter Vektor, der eine Polynukleotidsequenz umfasst, die für ein Polypeptid wie in einem der Ansprüche 1 bis 9 definiert kodiert, wobei die Sequenz, die für das Polypeptid kodiert, funktional an eine Kontrollsequenz gekoppelt ist, die zur Expression des Polypeptids befähigt ist.

33. Rekombinanter Vektor nach Anspruch 32, bei dem das Polynukleotid DNA ist.

34. Wirtszelle, die mit dem Vektor gemäß Anspruch 32 oder 33 transformiert ist.

35. Verfahren zum Herstellen eines HCV-Polypeptids, das Inkubieren einer Wirtszelle gemäß Anspruch 34 unter Bedingungen umfasst, welche die Expression der Sequenz, die für ein Polypeptid kodiert, und Gewinnung des Polypeptids erlauben.

36. Verfahren zum Herstellen eines HCV-Polypeptids, das chemisches Synthetisieren eines Polypeptids gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9 umfasst.

37. Pharmazeutische Zusammensetzung, die
a. ein Polynukleotid wie in einem der Ansprüche 19 bis 25 definiert; oder
b. ein Polypeptid wie in einem der Ansprüche 1 bis 9 definiert; und
c. einen pharmazeutisch verträglichen Träger
umfasst.

38. Verfahren zum Herstellen einer mit einem rekombinanten Vektor gemäß Anspruch 32 oder 33 transformierten Wirtszelle, das die Schritte umfasst:
a. Bereitstellen einer zur Transformation befähigten Wirtszelle;
b. Bereitstellen des rekombinanten Vektors; und
c. Inkubieren von (a) mit (b) unter Bedingungen, welche die Transformation der Wirtszelle mit dem Vektor ermöglichen.

39. Verfahren zum Herstellen eines rekombinanten Vektors gemäß Anspruch 32 oder 33, das die Schritte umfasst:
a. Bereitstellen einer mit einem rekombinanten Polynukleotid gemäß einem der Ansprüche 19 bis 27 transformierten Wirtszelle; und
b. Isolieren des Polynukleotids aus der Wirtszelle.

40. Verfahren zum Erzeugen einer Polynukleotidsonde, das chemisches Synthetisieren eines Polynukleotids gemäß einem der Ansprüche 19 bis 27 umfasst.

41. Verfahren zum Herstellen eines Vorrats von humanen biologischen Proben vor deren Verwendung, wobei das Verfahren die Schritte umfasst:
(a) Bereitstellen eines Vorrats von humanen biologischen Proben; und
(b) Entfernen solcher Proben aus dem Vorrat von humanen biologischen Proben, die:
(i) zur Detektierung in einem Verfahren gemäß Anspruch 29 oder 30 befähigte Polynukleotide;
(ii) zur Bildung detektierbarer Polypeptid-Antikörper-Komplexe in einem Immuntest gemäß einem der Ansprüche 12 bis 18 befähigte Antikörper
enthalten.

42. Verfahren nach Anspruch 41, bei dem die humanen biologischen Proben Blut, Plasma oder Seren sind.

43. Verwendung einer biologischen Probe, die gemäß dem Verfahren aus Anspruch 41 oder 42 hergestellt wurde, für die Herstellung von Produkten, die im Zusammenhang mit Blut stehen.

Es folgen 40 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

FIG. 1 Translation von DNA 12f

```
     IlePheLysIleArgMetTyrValGlyGlyValGluHisArgLeuGluAlaAlaCysAsn
1    CCATATTTAAAATCAGGATGTACGTGGGAGGGGTCGAACACAGGCTGGAAGCTGCCTGCA
     GGTATAAATTTTAGTCCTACATGCACCCTCCCCAGCTTGTGTCCGACCTTCGACGGACGT

     TrpThrArgGlyGluArgCysAspLeuGluAspArgAspArgSerGluLeuSerProLeu
61   ACTGGACGCGGGGCGAACGTTGCGATCTGGAAGACAGGGACAGGTCCGAGCTCAGCCCGT
     TGACCTGCGCCCCGCTTGCAACGCTAGACCTTCTGTCCCTGTCCAGGCTCGAGTCGGGCA

     LeuLeuThrThrThrGlnTrpGlnValLeuProCysSerPheThrThrLeuProAlaLeu
121  TACTGCTGACCACTACACAGTGGCAGGTCCTCCCGTGTTCCTTCACAACCCTACCAGCCT
     ATGACGACTGGTGATGTGTCACCGTCCAGGAGGGCACAAGGAAGTGTTGGGATGGTCGGA

     SerThrGlyLeuIleHisLeuHisGlnAsnIleValAspValGlnTyrLeuTyrGlyVal
181  TGTCCACCGGCCTCATCCACCTCCACCAGAACATTGTGGACGTGCAGTACTTGTACGGGG
     ACAGGTGGCCGGAGTAGGTGGAGGTGGTCTTGTAACACCTGCACGTCATGAACATGCCCC

                                                  ----------
     GlySerSerIleAlaSerTrpAlaIleLysTrpGluTyrValValLeuLeuPheLeuLeu
241  TGGGGTCAAGCATCGCGTCCTGGGCCATTAAGTGGGAGTACGTCGTTCTCCTGTTCCTTC
     ACCCCAGTTCGTAGCGCAGGACCCGGTAATTCACCCTCATGCAGCAAGAGGACAAGGAAG

     ------------------------------------------------------------
     LeuAlaAspAlaArgValCysSerCysLeuTrpMetMetLeuLeuIleSerGlnAlaGlu
301  TGCTTGCAGACGCGCGCGTCTGCTCCTGCTTGTGGATGATGCTACTCATATCCCAAGCGG
     ACGAACGTCTGCGCGCGCAGACGAGGACGAACACCTACTACGATGAGTATAGGGTTCGCC

     AlaAlaLeuGluAsnLeuValIleLeuAsnAlaAlaSerLeuAlaGlyThrHisGlyLeu
361  AGGCGGCTTTGGAGAACCTCGTAATACTTAATGCAGCATCCCTGGCCGGGACGCACGGTC
     TCCGCCGAAACCTCTTGGAGCATTATGAATTACGTCGTAGGGACCGGCCCTGCGTGCCAG

     -------
     Val
421  TTGTATC
     AACATAG
```

FIG. 2-1 Translation von DNA k9-1

```
    GlyCysProGluArgLeuAlaSerCysArgProLeuThrAspPheAspGlnGlyTrpGly
1   CAGGCTGTCCTGAGAGGCTAGCCAGCTGCCGACCCCTTACCGATTTTGACCAGGGCTGGG
    GTCCGACAGGACTCTCCGATCGGTCGACGGCTGGGGAATGGCTAAAACTGGTCCCGACCC

    ProIleSerTyrAlaAsnGlySerGlyProAspGlnArgProTyrCysTrpHisTyrPro
61  GCCCTATCAGTTATGCCAACGGAAGCGGCCCCGACCAGCGCCCCTACTGCTGGCACTACC
    CGGGATAGTCAATACGGTTGCCTTCGCCGGGGCTGGTCGCGGGGATGACGACCGTGATGG

    ProLysProCysGlyIleValProAlaLysSerValCysGlyProValTyrCysPheThr
121 CCCCAAAACCTTGCGGTATTGTGCCCGCGAAGAGTGTGTGTGGTCCGGTATATTGCTTCA
    GGGGTTTTGGAACGCCATAACACGGGCGCTTCTCACACACACCAGGCCATATAACGAAGT

    ProSerProValValValGlyThrThrAspArgSerGlyAlaProThrTyrSerTrpGly
181 CTCCCAGCCCCGTGGTGGTGGGAACGACCGACAGGTCGGGCGCGCCCACCTACAGCTGGG
    GAGGGTCGGGGCACCACCACCCTTGCTGGCTGTCCAGCCCGCGCGGGTGGATGTCGACCC

    GluAsnAspThrAspValPheValLeuAsnAsnThrArgProProLeuGlyAsnTrpPhe
241 GTGAAAATGATACGGACGTCTTCGTCCTTAACAATACCAGGCCACCGCTGGGCAATTGGT
    CACTTTTACTATGCCTGCAGAAGCAGGAATTGTTATGGTCCGGTGGCGACCCGTTAACCA

    GlyCysThrTrpMetAsnSerThrGlyPheThrLysValCysGlyAlaProProCysVal
301 TCGGTTGTACCTGGATGAACTCAACTGGATTCACCAAAGTGTGCGGAGCGCCTCCTTGTG
    AGCCAACATGGACCTACTTGAGTTGACCTAAGTGGTTTCACACGCCTCGCGGAGGAACAC

    IleGlyGlyAlaGlyAsnAsnThrLeuHisCysProThrAspCysPheArgLysHisPro
361 TCATCGGAGGGGCGGGCAACAACACCCTGCACTGCCCCACTGATTGCTTCCGCAAGCATC
    AGTAGCCTCCCCGCCCGTTGTTGTGGGACGTGACGGGGTGACTAACGAAGGCGTTCGTAG

    AspAlaThrTyrSerArgCysGlySerGlyProTrpIleThrProArgCysLeuValAsp
421 CGGACGCCACATACTCTCGGTGCGGCTCCGGTCCCTGGATCACACCCAGGTGCCTGGTCG
    GCCTGCGGTGTATGAGAGCCACGCCGAGGCCAGGGACCTAGTGTGGGTCCACGGACCAGC

                                                    ----------
    TyrProTyrArgLeuTrpHisTyrProCysThrIleAsnTyrThrIlePheLysIleArg
481 ACTACCCGTATAGGCTTTGGCATTATCCTTGTACCATCAACTACACTATATTTAAAATCA
    TGATGGGCATATCCGAAACCGTAATAGGAACATGGTAGTTGATGTGATATAAATTTTAGT

    ----------
    MetTyrValGlyGlyValGluHisArgLeuGluAlaAlaCysAsnTrpThrArgGlyGlu
541 GGATGTACGTGGGAGGGGTCGAGCACAGGCTGGAAGCTGCCTGCAACTGGACGCGGGGCG
    CCTACATGCACCCTCCCCAGCTCGTGTCCGACCTTCGACGGACGTTGACCTGCGCCCCGC

    ----------
    ArgCysAspLeuGluAspArgAspArgSerGluLeuSerProLeuLeuLeuThrThrThr
601 AACGTTGCGATCTGGAAGATAGGGACAGGTCCGAGCTCAGCCCGTTACTGCTGACCACTA
    TTGCAACGCTAGACCTTCTATCCCTGTCCAGGCTCGAGTCGGGCAATGACGACTGGTGAT

    ----------
    GlnTrpGlnValLeuProCysSerPheThrThrLeuProAlaLeuSerThrGlyLeuIle
661 CACAGTGGCAGGTCCTCCCGTGTTCCTTCACAACCCTGCCAGCCTTGTCCACCGGCCTCA
    GTGTCACCGTCCAGGAGGGCACAAGGAAGTGTTGGGACGGTCGGAACAGGTGGCCGGAGT

    HisLeuHisGlnAsnIleValAspValGlnTyrLeuTyrGlyValGlySerSerIleAla
721 TCCACCTCCACCAGAACATTGTGGACGTGCAGTACTTGTACGGGGTGGGGTCAAGCATCG
    AGGTGGAGGTGGTCTTGTAACACCTGCACGTCATGAACATGCCCCACCCCAGTTCGTAGC

    ----------
    SerTrpAlaIleLysTrpGluTyrValValLeuLeuPheLeuLeuLeuAlaAspAlaArg
781 CGTCCTGGGCCATTAAGTGGGAGTACGTCGTCCTCCTGTTCCTTCTGCTTGCAGACGCGC
    GCAGGACCCGGTAATTCACCCTCATGCAGCAGGAGGACAAGGAAGACGAACGTCTGCGCG

    ----------
```

```
                ValCysSerCysLeuTrpMetMetLeuLeuIleSerGlnAlaGluAlaAlaLeuGluAsn
841   GCGTCTGCTCCTGCTTGTGGATGATGCTACTCATATCCCAAGCGGAAGCGGCTTTGGAGA
      CGCAGACGAGGACGAACACCTACTACGATGAGTATAGGGTTCGCCTTCGCCGAAACCTCT

      ------------------------------------------------------------

                LeuValIleLeuAsnAlaAlaSerLeuAlaGlyThrHisGlyLeuValSerPheLeuVal
901   ACCTCGTAATACTTAATGCAGCATCCCTGGCCGGGACGCACGGTCTTGTATCCTTCCTCG
      TGGAGCATTATGAATTACGTCGTAGGGACCGGCCCTGCGTGCCAGAACATAGGAAGGAGC

      ------------------------------------------------------------

                PhePheCysPheAlaTrpTyrLeuLysGlyLysTrpValProGlyAlaValTyrThrPhe
961   TGTTCTTCTGCTTTGCATGGTATCTGAAGGGTAAGTGGGTGCCCGGAGCGGTCTACACCT
      ACAAGAAGACGAAACGTACCATAGACTTCCCATTCACCCACGGGCCTCGCCAGATGTGGA

      ------------------------------------------------------------

                TyrGlyMetTrpProLeuLeuLeuLeuLeuAlaLeuProGlnArgAlaTyrAlaLeu
1021  TCTACGGGATGTGGCCTCTCCTCCTGCTCCTGTTGGCGTTGCCCCAGCGGGCGTACGCGC
      AGATGCCCTACACCGGAGAGGAGGACGAGGACAACCGCAACGGGGTCGCCCGCATGCGCG

      ------------------------------------------------------------

                AspThrGluValAlaAlaSerCysGlyGlyValValLeuValGlyLeuMetAlaLeuThr
1081  TGGACACGGAGGTGGCCGCGTCGTGTGGCGGTGTTGTTCTCGTCGGGTTGATGGCGCTAA
      ACCTGTGCCTCCACCGGCGCAGCACACCGCCACAACAAGAGCAGCCCAACTACCGCGATT

      ------------------------------------------------------------

                LeuSerProTyrTyrLysArgTyrIleSerTrpCysLeuTrpTrpLeuGlnTyrPheLeu
1141  CTCTGTCACCATATTACAAGCGCTATATCAGCTGGTGCTTGTGGTGGCTTCAGTATTTTC
      GAGACAGTGGTATAATGTTCGCGATATAGTCGACCACGAACACCACCGAAGTCATAAAAG

      ------------------------------------------------------------

                ThrArgValGluAlaGlnLeuHisValTrpIleProProLeuAsnValArgGlyGlyArg
1201  TGACCAGAGTGGAAGCGCAACTGCACGTGTGGATTCCCCCCCTCAACGTCCGAGGGGGGC
      ACTGGTCTCACCTTCGCGTTGACGTGCACACCTAAGGGGGGGAGTTGCAGGCTCCCCCCG

      ------------------------------------------------------------

                AspAlaValIleLeuLeuMetCysAlaValHisProThrLeuValPheAspIleThrLys
1261  GCGACGCTGTCATCTTACTCATGTGTGCTGTACACCCGACTCTGGTATTTGACATCACCA
      CGCTGCGACAGTAGAATGAGTACACACGACATGTGGGCTGAGACCATAAACTGTAGTGGT

      ------------------------------------------
                LeuLeuLeuAlaValPheGlyProLeuTrpIleLeuGlnAla
1321  AATTGCTGCTGGCCGTCTTCGGACCCCTTTGGATTCTTCAAGCCAG
      TTAACGACGACCGGCAGAAGCCTGGGGAAACCTAAGAAGTTCGGTC
```

FIG. 2-2

FIG. 3 Translation von DNA 15e

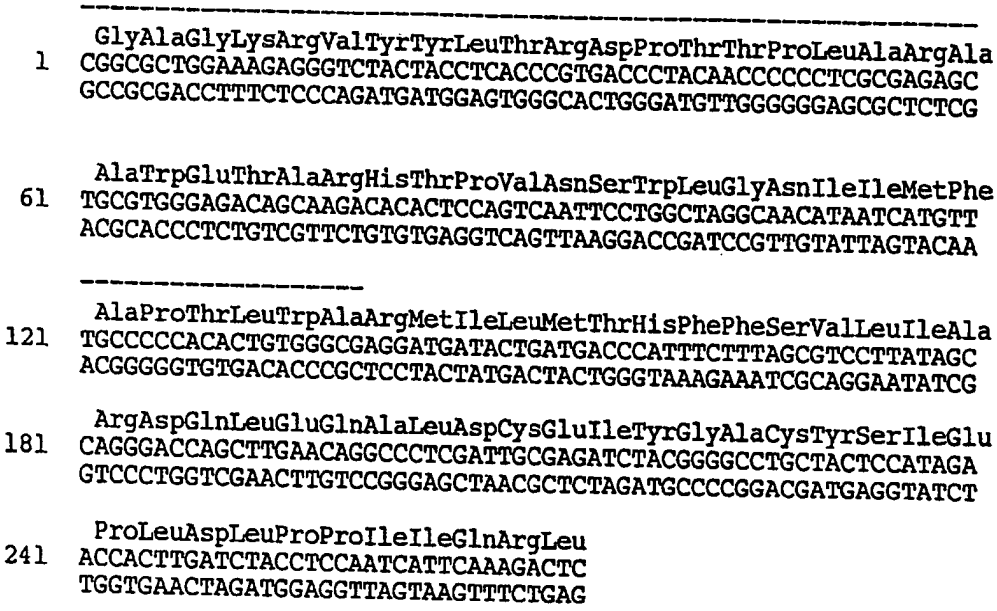


FIG. 5

Translation von DNA 26-j

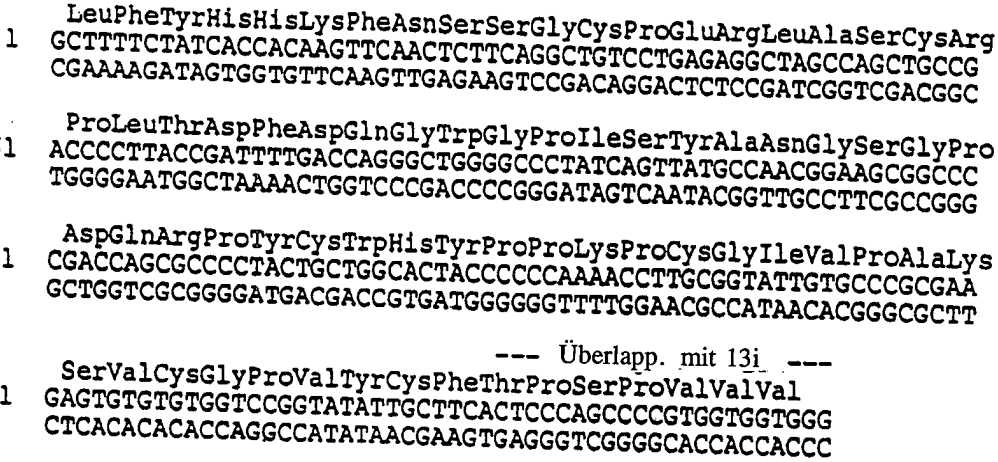


FIG. 4

Translation von DNA 13i

```
      ProSerProValValValGlyThrThrAspArgSerGlyAlaProThrTyrSerTrpGly
1     CTCCCAGCCCCGTGGTGGTGGGAACGACCGACAGGTCGGGCGCGCCTACCTACAGCTGGG
      GAGGGTCGGGGCACCACCACCCTTGCTGGCTGTCCAGCCCGCGCGGATGGATGTCGACCC

      GluAsnAspThrAspValPheValLeuAsnAsnThrArgProProLeuGlyAsnTrpPhe
61    GTGAAAATGATACGGACGTCTTCGTCCTTAACAATACCAGGCCACCGCTGGGCAATTGGT
      CACTTTTACTATGCCTGCAGAAGCAGGAATTGTTATGGTCCGGTGGCGACCCGTTAACCA

      GlyCysThrTrpMetAsnSerThrGlyPheThrLysValCysGlyAlaProProCysVal
121   TCGGTTGTACCTGGATGAACTCAACTGGATTCACCAAAGTGTGCGGAGCGCCTCCTTGTG
      AGCCAACATGGACCTACTTGAGTTGACCTAAGTGGTTTCACACGCCTCGCGGAGGAACAC

      IleGlyGlyAlaGlyAsnAsnThrLeuHisCysProThrAspCysPheArgLysHisPro
181   TCATCGGAGGGGCGGGCAACAACACCCTGCACTGCCCCACTGATTGCTTCCGCAAGCATC
      AGTAGCCTCCCCGCCCGTTGTTGTGGGACGTGACGGGGTGACTAACGAAGGCGTTCGTAG

      AspAlaThrTyrSerArgCysGlySerGlyProTrpLeuThrProArgCysLeuValAsp
241   CGGACGCCACATACTCTCGGTGCGGCTCCGGTCCCTGGCTCACACCCAGGTGCCTGGTCG
      GCCTGCGGTGTATGAGAGCCACGCCGAGGCCAGGGACCGAGTGTGGGTCCACGGACCAGC

                                                    ---------------
      TyrProTyrArgLeuTrpHisTyrProCysThrIleAsnTyrThrIlePheLysIleArg
301   ACTACCCGTATAGGCTTTGGCATTATCCTTGTACCATCAACTACACCATATTTAAAATCA
      TGATGGGCATATCCGAAACCGTAATAGGAACATGGTAGTTGATGTGGTATAAATTTTAGT

      ------------------------------------------------------------
      MetTyrValGlyGlyValGluHisArgLeuGluAlaAlaCysAsnTrpThrArgGlyGlu
361   GGATGTACGTGGGAGGGGTCGAGCACAGGCTGGAAGCTGCCTGCAACTGGACGCGGGGCG
      CCTACATGCACCCTCCCCAGCTCGTGTCCGACCTTCGACGGACGTTGACCTGCGCCCCGC

      ---------- Überlapp. mit 12f ----------------------------
      ArgCysAspLeuGluAspArgAspArgSerGluLeuSerProLeuLeuLeuThrThrThr
421   AACGTTGCGATCTGGAAGACAGGGACAGGTCCGAGCTCAGCCCGTTACTGCTGACCACTA
      TTGCAACGCTAGACCTTCTGTCCCTGTCCAGGCTCGAGTCGGGCAATGACGACTGGTGAT

      ------------------------------------------------------------
      GlnTrpGlnValLeuProCysSerPheThrThrLeuProAlaLeuSerThrGlyLeu
481   CACAGTGGCAGGTCCTCCCGTGTTCCTTCACAACCCTGCCAGCCTTGTCCACCGGCCTCA
      GTGTCACCGTCCAGGAGGGCACAAGGAAGTGTTGGGACGGTCGGAACAGGTGGCCGGAGT
```

FIG. 6

Translation von DNA CA59a

```
    LeuValMetAlaGlnLeuLeuArgIleProGlnAlaIleLeuAspMetIleAlaGlyAla
 1  TTGGTAATGGCTCAGCTGCTCCGGATCCCACAAGCCATCTTGGACATGATCGCTGGTGCT
    AACCATTACCGAGTCGACGAGGCCTAGGGTGTTCGGTAGAACCTGTACTAGCGACCACGA

    HisTrpGlyValLeuAlaGlyIleAlaTyrPheSerMetValGlyAsnTrpAlaLysVal
61  CACTGGGGAGTCCTGGCGGGCATAGCGTATTTCTCCATGGTGGGGAACTGGGCGAAGGTC
    GTGACCCCTCAGGACCGCCCGTATCGCATAAAGAGGTACCACCCCTTGACCCGCTTCCAG

    LeuValValLeuLeuLeuPheAlaGlyValAspAlaGluThrHisValThrGlyGlySer
121 CTGGTAGTGCTGCTGCTATTTGCCGGCGTCGACGCGGAAACCCACGTCACCGGGGGAAGT
    GACCATCACGACGACGATAAACGGCCGCAGCTGCGCCTTTGGGTGCAGTGGCCCCCTTCA

    AlaGlyHisThrValSerGlyPheValSerLeuLeuAlaProGlyAlaLysGlnAsnVal
181 GCCGGCCACACTGTGTCTGGATTTGTTAGCCTCCTCGCACCAGGCGCCAAGCAGAACGTC
    CGGCCGGTGTGACACAGACCTAAACAATCGGAGGAGCGTGGTCCGCGGTTCGTCTTGCAG

    GlnLeuIleAsnThrAsnGlySerTrpHisLeuAsnSerThrAlaLeuAsnCysAsnAsp
241 CAGCTGATCAACACCAACGGCAGTTGGCACCTCAATAGCACGGCCCTGAACTGCAATGAT
    GTCGACTAGTTGTGGTTGCCGTCAACCGTGGAGTTATCGTGCCGGGACTTGACGTTACTA

                                                              -----
    SerLeuAsnThrGlyTrpLeuAlaGlyLeuPheTyrHisHisLysPheAsnSerSerGly
301 AGCCTCAACACCGGCTGGTTGGCAGGGCTTTTCTATCACCACAAGTTCAACTCTTCAGGC
    TCGGAGTTGTGGCCGACCAACCGTCCCGAAAAGATAGTGGTGTTCAAGTTGAGAAGTCCG
                                  ------ Überlapp. mit 26j ----------

    ------ Überlapp mit K9-1 --------
    CysProGluArgLeuAlaSerCysArgPro
361 TGTCCTGAGAGGCTAGCCAGCTGCCGACCCC
    ACAGGACTCTCCGATCGGTCGACGGCTGGGG
    ------------------------------
```

Translation von DNA CA84a

FIG. 7

```
      GlnGlyCysAsnCysSerIleTyrProGlyHisIleThrGlyHisArgMetAlaTrpAsp
  1   CGCAAGGTTGCAATTGCTCTATCTATCCCGGCCATATAACGGGTCACCGCATGGCATGGG
      GCGTTCCAACGTTAACGAGATAGATAGGGCCGGTATATTGCCCAGTGGCGTACCGTACCC

                                          ---------------------------
      MetMetMetAsnTrpSerProThrThrAlaLeuValMetAlaGlnLeuLeuArgIlePro
 61   ATATGATGATGAACTGGTCCCCTACGACGGCGTTGGTAATGGCTCAGCTGCTCCGGATCC
      TATACTACTACTTGACCAGGGGATGCTGCCGCAACCATTACCGAGTCGACGAGGCCTAGG

      ------------------------------------------------------------
      GlnAlaIleLeuAspMetIleAlaGlyAlaHisTrpGlyValLeuAlaGlyIleAlaTyr
121   CACAAGCCATCTTGGACATGATCGCTGGTGCTCACTGGGGAGTCCTGGCGGGCATAGCGT
      GTGTTCGGTAGAACCTGTACTAGCGACCACGAGTGACCCCTCAGGACCGCCCGTATCGCA

      ------------Überlapp. mit CA59a ------------------------------
      PheSerMetValGlyAsnTrpAlaLysValLeuValValLeuLeuLeuPheAlaGlyVal
181   ATTTCTCCATGGTGGGGAACTGGGCGAAGGTCCTGGTAGTGCTGCTGCTATTTGCCGGCG
      TAAAGAGGTACCACCCCTTGACCCGCTTCCAGGACCATCACGACGACGATAAACGGCCGC

      --------------------------
      AspAlaGluThrHisValThrGly
241   TCGACGCGGAAACCCACGTCACCGGGG
      AGCTGCGCCTTTGGGTGCAGTGGCCCC
```

Translation von DNA CA156e

FIG. 8

```
      CysTrpValAlaMetThrProThrValAlaThrArgAspGlyLysLeuProAlaThrGln
  1   GTGTTGGGTGGCGATGACCCCTACGGTGGCCACCAGGGATGGCAAACTCCCCGCGACGCA
      CACAACCCACCGCTACTGGGGATGCCACCGGTGGTCCCTACCGTTTGAGGGGCGCTGCGT

      LeuArgArgHisIleAspLeuLeuValGlySerAlaThrLeuCysSerAlaLeuTyrVal
 61   GCTTCGACGTCACATCGATCTGCTTGTCGGGAGCGCCACCCTCTGTTCGGCCCTCTACGT
      CGAAGCTGCAGTGTAGCTAGACGAACAGCCCTCGCGGTGGGAGACAAGCCGGGAGATGCA

      GlyAspLeuCysGlySerValPheLeuValGlyGlnLeuPheThrPheSerProArgArg
121   GGGGGACCTATGCGGGTCTGTCTTTCTTGTCGGCCAACTGTTCACCTTCTCTCCCAGGCG
      CCCCCTGGATACGCCCAGACAGAAAGAACAGCCGGTTGACAAGTGGAAGAGAGGGTCCGC

                  ------------------------------------------------
      HisTrpThrThrGlnGlyCysAsnCysSerIleTyrProGlyHisIleThrGlyHisArg
181   CCACTGGACGACGCAAGGTTGCAATTGCTCTATCTATCCCGGCCATATAACGGGTCACCG
      GGTGACCTGCTGCGTTCCAACGTTAACGAGATAGATAGGGCCGGTATATTGCCCAGTGGC

      --------------------Überlapp. mit CA84a ----------------------
      MetAlaTrpAspMetMetMetAsnTrpSerProThrThrAlaLeuValValAlaGlnLeu
241   CATGGCATGGGATATGATGATGAACTGGTCCCCTACGACGGCGTTGGTAGTGGCTCAGCT
      GTACCGTACCCTATACTACTACTTGACCAGGGGATGCTGCCGCAACCATCACCGAGTCGA

      --------------------
      LeuArgIleProGlnAla
301   GCTCCGGATCCCACAAGCC
      CGAGGCCTAGGGTGTTCGG
```

FIG. 9

Translation von DNA CA167b

```
     SerThrGlyLeuTyrHisValThrAsnAspCysProAsnSerSerIleValTyrGluAla
1    CTCCACGGGGCTTTACCACGTCACCAATGATTGCCCTAACTCGAGTATTGTGTACGAGGC
     GAGGTGCCCCGAAATGGTGCAGTGGTTACTAACGGGATTGAGCTCATAACACATGCTCCG

     AlaAspAlaIleLeuHisThrProGlyCysValProCysValArgGluGlyAsnAlaSer
61   GGCCGATGCCATCCTGCACACTCCGGGGTGCGTCCCTTGCGTTCGTGAGGGCAACGCCTC
     CCGGCTACGGTAGGACGTGTGAGGCCCCACGCAGGGAACGCAAGCACTCCCGTTGCGGAG

       ------------------------------------------------------------
     ArgCysTrpValAlaMetThrProThrValAlaThrArgAspGlyLysLeuProAlaThr
121  GAGGTGTTGGGTGGCGATGACCCCTACGGTGGCCACCAGGGATGGCAAACTCCCCGCGAC
     CTCCACAACCCACCGCTACTGGGGATGCCACCGGTGGTCCCTACCGTTTGAGGGGCGCTG

     ------------------ Überlapp. mit CA156e ----------------------
     GlnLeuArgArgHisIleAspLeuLeuValGlySerAlaThrLeuCysSerAlaLeuTyr
181  GCAGCTTCGACGTCACATCGATCTGCTTGTCGGGAGCGCTACCCTCTGTTCGGCCCTCTA
     CGTCGAAGCTGCAGTGTAGCTAGACGAACAGCCCTCGCGATGGGAGACAAGCCGGGAGAT

     --------------------------------
     ValGlyAspLeuCysGlySerValPheLeu
241  CGTGGGGGACTTGTGCGGGTCTGTCTTTCTTG
     GCACCCCCTGAACACGCCCAGACAGAAAGAAC
```

FIG. 10

Translation von DNA ssCA216a



FIG. 11

Translation von DNA ssCA290a

```
     LysLysAsnLysArgAsnThrAsnArgArgProGlnAspValLysPheProGlyGlyGly
1    AAAAAAAAAACAAACGTAACACCAACCGTCGCCCACAGGACGTCAAGTTCCCGGGTGGCG
     TTTTTTTTTTGTTTGCATTGTGGTTGGCAGCGGGTGTCCTGCAGTTCAAGGGCCCACCGC

     GlnIleValGlyGlyValTyrLeuLeuProArgArgGlyProArgLeuGlyValArgAla
61   GTCAGATCGTTGGTGGAGTTTACTTGTTGCCGCGCAGGGGCCCTAGATTGGGTGTGCGCG
     CAGTCTAGCAACCACCTCAAATGAACAACGGCGCGTCCCCGGGATCTAACCCACACGCGC

     ThrArgLysThrSerGluArgSerGlnProArgGlyArgArgGlnProIleProLysAla
121  CGACGAGAAAGACTTCCGAGCGGTCGCAACCTCGAGGTAGACGCCAGCCTATCCCCAAGG
     GCTGCTCTTTCTGAAGGCTCGCCAGCGTTGGAGCTCCATCTGCGGTCGGATAGGGGTTCC

     ArgArgProGluGlyArgThrTrpAlaGlnProGlyTyrProTrpProLeuTyrGlyAsn
181  CTCGTCGGCCCGAGGGCAGGACCTGGGCTCAGCCCGGGTACCCTTGGCCCCTCTATGGCA
     GAGCAGCCGGGCTCCCGTCCTGGACCCGAGTCGGGCCCATGGGAACCGGGGAGATACCGT

     GluGlyCysGlyTrpAlaGlyTrpLeuLeuSerProArgGlySerArgProSerTrpGly
241  ATGAGGGCTGCGGGTGGGCGGGATGGCTCCTGTCTCCCCGTGGCTCTCGGCCTAGCTGGG
     TACTCCCGACGCCCACCCGCCCTACCGAGGACAGAGGGGCACCGAGAGCCGGATCGACCC

                  ----------------------------------------------------
     ProThrAspProArgArgArgSerArgAsnLeuGlyLysValIleAspThrLeuThrCys
301  GCCCCACAGACCCCCGGCGTAGGTCGCGCAATTTGGGTAAGGTCATCGATACCCTTACGT
     CGGGGTGTCTGGGGGCCGCATCCAGCGCGTTAAACCCATTCCAGTAGCTATGGGAATGCA

     ----------------------------------------------------------------
     GlyPheAlaAspLeuMetGlyTyrIleProLeuValGlyAlaProLeuGlyGlyAlaAla
361  GCGGCTTCGCCGACCTCATGGGGTACATACCGCTCGTCGGCGCCCCTCTTGGAGGCGCTG
     CGCCGAAGCGGCTGGAGTACCCCATGTATGGCGAGCAGCCGCGGGGAGAACCTCCGCGAC

     ----------------------Überlapp. mit CA216a ------------------
     ArgAlaLeuAlaHisGlyValArgValLeuGluAspGlyValAsnTyrAlaThrGlyAsn
421  CCAGGGCCCTGGCGCATGGCGTCCGGGTTCTGGAAGACGGCGTGAACTATGCAACAGGGA
     GGTCCCGGGACCGCGTACCGCAGGCCCAAGACCTTCTGCCGCACTTGATACGTTGTCCCT

     ----------------------------
     LeuProGlyCysSerPheSerThrPhe
481  ACCTTCCTGGTTGCTCTTTCTCTACCTTC
     TGGAAGGACCAACGAGAAAGAGATGGAAG
```

Translation von DNA ag30a

FIG. 12-1

```
                                    #MetSerValValGlnProProGlyProProLeu
                    #MetAlaLeuValOP
  1  CGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTCGTGCAGCCTCCAGGACCCCCCC
     GCGTCTTTCGCAGATCGGTACCGCAATCATACTCACAGCACGTCGGAGGTCCTGGGGGGG

       ProGlyGluProAM

 61  TCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCCAGGACGAC
     AGGGCCCTCTCGGTATCACCAGACGCCTTGGCCACTCATGTGGCCTTAACGGTCCTGCTG

                                 #MetProGlyAspLeuGlyValProProGlnAsp
121  CGGGTCCTTTCTTGGATCAACCCGCTCAATGCCTGGAGATTTGGGCGTGCCCCCGCAAGA
     GCCCAGGAAAGAACCTAGTTGGGCGAGTTACGGACCTCTAAACCCGCACGGGGGCGTTCT

                                                   OP AM GlyAlaCys
      CysAM                                                 *
181  CTGCTAGCCGAGTAGTGTTGGGTCGCGAAAGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAGGGTGCTT
     GACGATCGGCTCATCACAACCCAGCGCTTTCCGGAACACCATGACGGACTATCCCACGAA

                                          |
       GluCysProGlyArgSerArgArgProCysThrMetSerThrAsnProLysProGlnLys
                                                                 -
241  GCGAGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCACCATGAGCACGAATCCTAAACCTCAAA
     CGCTCACGGGGCCCTCCAGAGCATCTGGCACGTGGTACTCGTGCTTAGGATTTGGAGTTT

       LysAsnLysArgAsnThrAsnArgArgProGlnAspValLysPheProGlyGlyGlyGln
     ------------------------------------------------------------
301  AAAAAAACAAACGTAACACCAACCGTCGCCCACAGGACGTCAAGTTCCCGGGTGGCGGTC
     TTTTTTTGTTTGCATTGTGGTTGGCAGCGGGTGTCCTGCAGTTCAAGGGCCCACCGCCAG

       IleValGlyGlyValTyrLeuLeuProArgArgGlyProArgLeuGlyValArgAlaThr
     ------------------------------------------------------------
361  AGATCGTTGGTGGAGTTTACTTGTTGCCGCGCAGGGGCCCTAGATTGGGTGTGCGCGCGA
     TCTAGCAACCACCTCAAATGAACAACGGCGCGTCCCCGGGATCTAACCCACACGCGCGCT

       ArgLysThrSerGluArgSerGlnProArgGlyArgArgGlnProIleProLysAlaArg
     ------------------------------------------------------------
421  CGAGAAAGACTTCCGAGCGGTCGCAACCTCGAGGTAGACGTCAGCCTATCCCCAAGGCTC
     GCTCTTTCTGAAGGCTCGCCAGCGTTGGAGCTCCATCTGCAGTCGGATAGGGGTTCCGAG

       ArgProGluGlyArgThrTrpAlaGlnProGlyTyrProTrpProLeuTyrGlyAsnGlu
     ------------------------Überlapp. mit CA290a ------------------
481  GTCGGCCCGAGGGCAGGACCTGGGCTCAGCCCGGGTACCCTTGGCCCCTCTATGGCAATG
     CAGCCGGGCTCCCGTCCTGGACCCGAGTCGGGCCCATGGGAACCGGGGAGATACCGTTAC

       GlyCysGlyTrpAlaGlyTrpLeuLeuSerProArgGlySerArgProSerTrpGlyPro
     ------------------------------------------------------------
541  AGGGCTGCGGGTGGGCGGGATGGCTCCTGTCTCCCCGTGGCTCTCGGCCTAGCTGGGGCC
     TCCCGACGCCCACCCGCCCTACCGAGGACAGAGGGGCACCGAGAGCCGGATCGACCCCGG

       ThrAspProArgArgArgSerArgAsnLeuGlyLysValIleAspThrLeuThrCysGly
```

```
601  CCACAGACCCCCGGCGTAGGTCGCGCAATTTGGGTAAGGTCATCGATACCCTTACGTGCG
     GGTGTCTGGGGGCCGCATCCAGCGCGTTAAACCCATTCCAGTAGCTATGGGAATGCACGC

       Phe

     -----
661  GCTTC
     CGAAG
```

* = Start des langen HCV ORF
| = Mutmaßliche erste Aminosäure des großen HCV Polyproteins
= Mutmaßliches kleines kodiertes Peptid (welches eine Rolle bei der Regulierung der Translation spielen könnte)

FIG. 12-2

FIG. 13

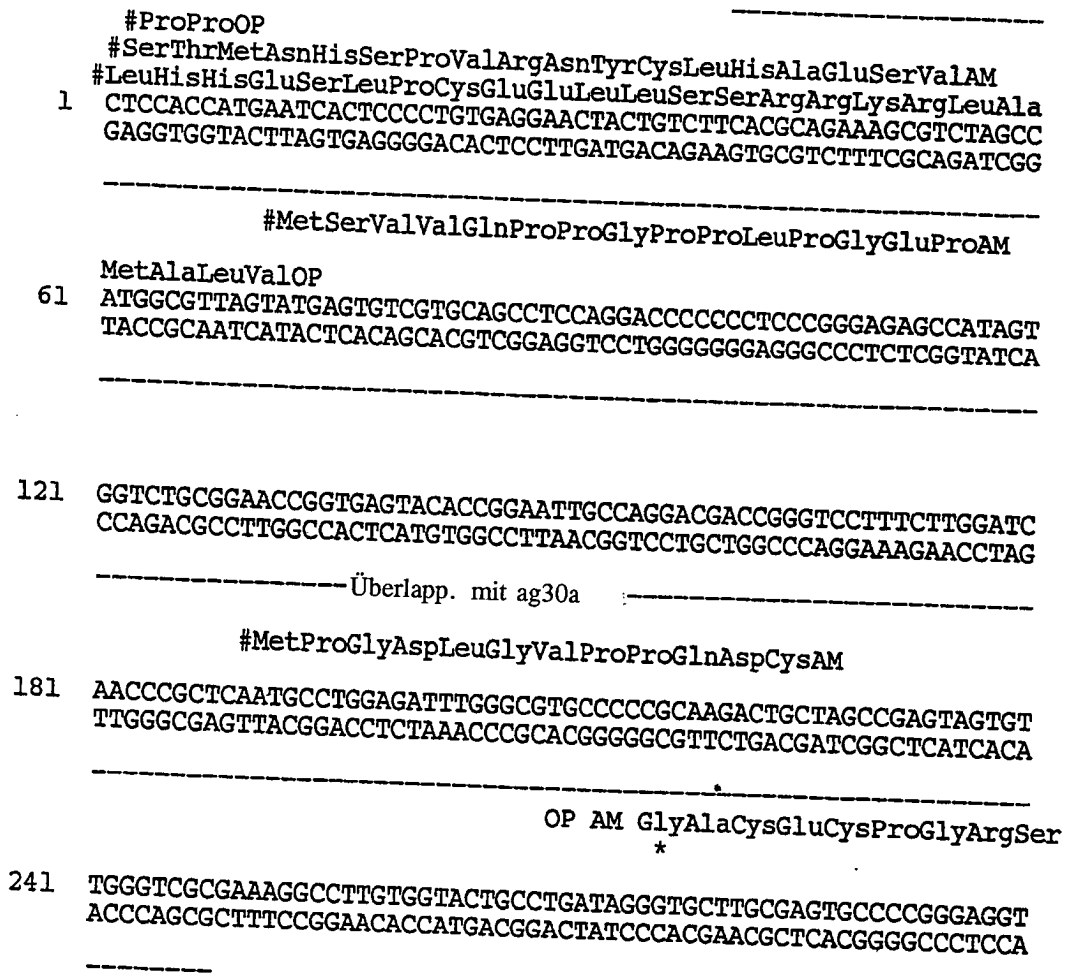
Translation von DNA CA205a



* = Mutmaßliches Methionin-Initiationskodon

FIG. 14

Translation von DNA 18g



* = Start des langen HCV ORF

\# = Mutmaßliches kleines kodiertes Peptid (welches eine Rolle bei der Regulierung der Translation spielen könnte)

FIG. 15

Translation von DNA 16jh

------ Überlapp. mit 15e ----------

```
      GlyAlaCysTyrSerIleGluProLeuAspLeuProProIleIleGlnArgLeuHisGly
1     GGGGCCTGCTACTCCATAGAACCACTGGATCTACCTCCAATCATTCAAAGACTCCATGGC
      CCCCGGACGATGAGGTATCTTGGTGACCTAGATGGAGGTTAGTAAGTTTCTGAGGTACCG

      LeuSerAlaPheSerLeuHisSerTyrSerProGlyGluIleAsnArgValAlaAlaCys
61    CTCAGCGCATTTTCACTCCACAGTTACTCTCCAGGTGAAATTAATAGGGTGGCCGCATGC
      GAGTCGCGTAAAAGTGAGGTGTCAATGAGAGGTCCACTTTAATTATCCCACCGGCGTACG

                                                Gly*
                                                G
      LeuArgLysLeuGlyValProProLeuArgAlaTrpArgHisArgAlaArgSerValArg
121   CTCAGAAAACTTGGGGTACCGCCCTTGCGAGCTTGGAGACACCGGGCCCGGAGCGTCCGC
      GAGTCTTTTGAACCCCATGGCGGGAACGCTCGAACCTCTGTGGCCCGGGCCTCGCAGGCG

      AlaArgLeuLeuAlaArgGlyGlyArgAlaAlaIleCysGlyLysTyrLeuPheAsnTrp
181   GCTAGGCTTCTGGCCAGAGGAGGCAGGGCTGCCATATGTGGCAAGTACCTCTTCAACTGG
      CGATCCGAAGACCGGTCTCCTCCGTCCCGACGGTATACACCGTTCATGGAGAAGTTGACC

      AlaValArgThrLysLeuLys
241   GCAGTAAGAACAAAGCTCAAAC
      CGTCATTCTTGTTTCGAGTTTG
```

* = Nukleotidheterogenität

Kombiniertes ORF von DNAs pi14a BIS 15e

FIG. 16-1

(pi14a/CA167b/CA156e/CA84a/CA59a/K9-1/12f/14i/11b/7f/7e/
8h/33c/40b/37b/35/36/81/32/33b/25c/14c/8f/33f/33g/39c/
35f/19g/26g & 15e)

```
                ArgSerArgAsnLeuGlyLysValIleAspThrLeuThrCysGlyPheAlaAspLeuMet
    1   AGGTCGCGCAATTTGGGTAAGGTCATCGATACCCTTACGTGCGGCTTCGCCGACCTCATG
        TCCAGCGCGTTAAACCCATTCCAGTAGCTATGGGAATGCACGCCGAAGCGGCTGGAGTAC

                GlyTyrIleProLeuValGlyAlaProLeuGlyGlyAlaAlaArgAlaLeuAlaHisGly
   61   GGGTACATACCGCTCGTCGGCGCCCCTCTTGGAGGCGCTGCCAGGGCCCTGGCGCATGGC
        CCCATGTATGGCGAGCAGCCGCGGGGAGAACCTCCGCGACGGTCCCGGGACCGCGTACCG

                ValArgValLeuGluAspGlyValAsnTyrAlaThrGlyAsnLeuProGlyCysSerPhe
  121   GTCCGGGTTCTGGAAGACGGCGTGAACTATGCAACAGGGAACCTTCCTGGTTGCTCTTTC
        CAGGCCCAAGACCTTCTGCCGCACTTGATACGTTGTCCCTTGGAAGGACCAACGAGAAAG

                SerIlePheLeuLeuAlaLeuLeuSerCysLeuThrValProAlaSerAlaTyrGlnVal
  181   TCTATCTTCCTTCTGGCCCTGCTCTCTTGCTTGACTGTGCCCGCTTCGGCCTACCAAGTG
        AGATAGAAGGAAGACCGGGACGAGAGAACGAACTGACACGGGCGAAGCCGGATGGTTCAC

                ArgAsnSerThrGlyLeuTyrHisValThrAsnAspCysProAsnSerSerIleValTyr
  241   CGCAACTCCACGGGGCTTTACCACGTCACCAATGATTGCCCTAACTCGAGTATTGTGTAC
        GCGTTGAGGTGCCCCGAAATGGTGCAGTGGTTACTAACGGGATTGAGCTCATAACACATG

                GluAlaAlaAspAlaIleLeuHisThrProGlyCysValProCysValArgGluGlyAsn
  301   GAGGCGGCCGATGCCATCCTGCACACTCCGGGGTGCGTCCCTTGCGTTCGTGAGGGCAAC
        CTCCGCCGGCTACGGTAGGACGTGTGAGGCCCCACGCAGGGAACGCAAGCACTCCCGTTG

                AlaSerArgCysTrpValAlaMetThrProThrValAlaThrArgAspGlyLysLeuPro
  361   GCCTCGAGGTGTTGGGTGGCGATGACCCCTACGGTGGCCACCAGGGATGGCAAACTCCCC
        CGGAGCTCCACAACCCACCGCTACTGGGGATGCCACCGGTGGTCCCTACCGTTTGAGGGG

                AlaThrGlnLeuArgArgHisIleAspLeuLeuValGlySerAlaThrLeuCysSerAla
  421   GCGACGCAGCTTCGACGTCACATCGATCTGCTTGTCGGGAGCGCCACCCTCTGTTCGGCC
        CGCTGCGTCGAAGCTGCAGTGTAGCTAGACGAACAGCCCTCGCGGTGGGAGACAAGCCGG

                LeuTyrValGlyAspLeuCysGlySerValPheLeuValGlyGlnLeuPheThrPheSer
  481   CTCTACGTGGGGGACCTATGCGGGTCTGTCTTTCTTGTCGGCCAACTGTTCACCTTCTCT
        GAGATGCACCCCCTGGATACGCCCAGACAGAAAGAACAGCCGGTTGACAAGTGGAAGAGA

                ProArgArgHisTrpThrThrGlnGlyCysAsnCysSerIleTyrProGlyHisIleThr
  541   CCCAGGCGCCACTGGACGACGCAAGGTTGCAATTGCTCTATCTATCCCGGCCATATAACG
        GGGTCCGCGGTGACCTGCTGCGTTCCAACGTTAACGAGATAGATAGGGCCGGTATATTGC

                GlyHisArgMetAlaTrpAspMetMetMetAsnTrpSerProThrThrAlaLeuValMet
  601   GGTCACCGCATGGCATGGGATATGATGATGAACTGGTCCCCTACGACGGCGTTGGTAATG
        CCAGTGGCGTACCGTACCCTATACTACTACTTGACCAGGGGATGCTGCCGCAACCATTAC

                AlaGlnLeuLeuArgIleProGlnAlaIleLeuAspMetIleAlaGlyAlaHisTrpGly
  661   GCTCAGCTGCTCCGGATCCCACAAGCCATCTTGGACATGATCGCTGGTGCTCACTGGGGA
        CGAGTCGACGAGGCCTAGGGTGTTCGGTAGAACCTGTACTAGCGACCACGAGTGACCCCT

                ValLeuAlaGlyIleAlaTyrPheSerMetValGlyAsnTrpAlaLysValLeuValVal
  721   GTCCTGGCGGGCATAGCGTATTTCTCCATGGTGGGGAACTGGGCGAAGGTCCTGGTAGTG
        CAGGACCGCCCGTATCGCATAAAGAGGTACCACCCCTTGACCCGCTTCCAGGACCATCAC

                LeuLeuLeuPheAlaGlyValAspAlaGluThrHisValThrGlyGlySerAlaGlyHis
  781   CTGCTGCTATTTGCCGGCGTCGACGCGGAAACCCACGTCACCGGGGGAAGTGCCGGCCAC
        GACGACGATAAACGGCCGCAGCTGCGCCTTTGGGTGCAGTGGCCCCCTTCACGGCCGGTG
```

FIG. 16-2

```
                ThrValSerGlyPheValSerLeuLeuAlaProGlyAlaLysGlnAsnValGlnLeuIle
841             ACTGTGTCTGGATTTGTTAGCCTCCTCGCACCAGGCGCCAAGCAGAACGTCCAGCTGATC
                TGACACAGACCTAAACAATCGGAGGAGCGTGGTCCGCGGTTCGTCTTGCAGGTCGACTAG

                AsnThrAsnGlySerTrpHisLeuAsnSerThrAlaLeuAsnCysAsnAspSerLeuAsn
901             AACACCAACGGCAGTTGGCACCTCAATAGCACGGCCCTGAACTGCAATGATAGCCTCAAC
                TTGTGGTTGCCGTCAACCGTGGAGTTATCGTGCCGGGACTTGACGTTACTATCGGAGTTG

                ThrGlyTrpLeuAlaGlyLeuPheTyrHisHisLysPheAsnSerSerGlyCysProGlu
961             ACCGGCTGGTTGGCAGGGCTTTTCTATCACCACAAGTTCAACTCTTCAGGCTGTCCTGAG
                TGGCCGACCAACCGTCCCGAAAAGATAGTGGTGTTCAAGTTGAGAAGTCCGACAGGACTC

                ArgLeuAlaSerCysArgProLeuThrAspPheAspGlnGlyTrpGlyProIleSerTyr
1021            AGGCTAGCCAGCTGCCGACCCCTTACCGATTTTGACCAGGGCTGGGGCCCTATCAGTTAT
                TCCGATCGGTCGACGGCTGGGGAATGGCTAAAACTGGTCCCGACCCCGGGATAGTCAATA

                AlaAsnGlySerGlyProAspGlnArgProTyrCysTrpHisTyrProProLysProCys
1081            GCCAACGGAAGCGGCCCCGACCAGCGCCCCTACTGCTGGCACTACCCCCCAAAACCTTGC
                CGGTTGCCTTCGCCGGGGCTGGTCGCGGGGATGACGACCGTGATGGGGGGTTTTGGAACG

                GlyIleValProAlaLysSerValCysGlyProValTyrCysPheThrProSerProVal
1141            GGTATTGTGCCCCGCGAAGAGTGTGTGTGGTCCGGTATATTGCTTCACTCCCAGCCCCGTG
                CCATAACACGGGCGCTTCTCACACACACCAGGCCATATAACGAAGTGAGGGTCGGGGCAC

                ValValGlyThrThrAspArgSerGlyAlaProThrTyrSerTrpGlyGluAsnAspThr
1201            GTGGTGGGAACGACCGACAGGTCGGGCGCGCCCACCTACAGCTGGGGTGAAAATGATACG
                CACCACCCTTGCTGGCTGTCCAGCCCGCGCGGGTGGATGTCGACCCCACTTTTACTATGC

                AspValPheValLeuAsnAsnThrArgProProLeuGlyAsnTrpPheGlyCysThrTrp
1261            GACGTCTTCGTCCTTAACAATACCAGGCCACCGCTGGGCAATTGGTTCGGTTGTACCTGG
                CTGCAGAAGCAGGAATTGTTATGGTCCGGTGGCGACCCGTTAACCAAGCCAACATGGACC

                MetAsnSerThrGlyPheThrLysValCysGlyAlaProProCysValIleGlyGlyAla
1321            ATGAACTCAACTGGATTCACCAAAGTGTGCGGAGCGCCTCCTTGTGTCATCGGAGGGGCG
                TACTTGAGTTGACCTAAGTGGTTTCACACGCCTCGCGGAGGAACACAGTAGCCTCCCCGC

                GlyAsnAsnThrLeuHisCysProThrAspCysPheArgLysHisProAspAlaThrTyr
1381            GGCAACAACACCCTGCACTGCCCCACTGATTGCTTCCGCAAGCATCCGGACGCCACATAC
                CCGTTGTTGTGGGACGTGACGGGGTGACTAACGAAGGCGTTCGTAGGCCTGCGGTGTATG

                SerArgCysGlySerGlyProTrpIleThrProArgCysLeuValAspTyrProTyrArg
1441            TCTCGGTGCGGCTCCGGTCCCTGGATCACACCCAGGTGCCTGGTCGACTACCCGTATAGG
                AGAGCCACGCCGAGGCCAGGGACCTAGTGTGGGTCCACGGACCAGCTGATGGGCATATCC

                LeuTrpHisTyrProCysThrIleAsnTyrThrIlePheLysIleArgMetTyrValGly
1501            CTTTGGCATTATCCTTGTACCATCAACTACACCATATTTAAAATCAGGATGTACGTGGGA
                GAAACCGTAATAGGAACATGGTAGTTGATGTGGTATAAATTTTAGTCCTACATGCACCCT

                GlyValGluHisArgLeuGluAlaAlaCysAsnTrpThrArgGlyGluArgCysAspLeu
1561            GGGGTCGAACACAGGCTGGAAGCTGCCTGCAACTGGACGCGGGGCGAACGTTGCGATCTG
                CCCCAGCTTGTGTCCGACCTTCGACGGACGTTGACCTGCGCCCCGCTTGCAACGCTAGAC

                GluAspArgAspArgSerGluLeuSerProLeuLeuLeuThrThrThrGlnTrpGlnVal
1621            GAAGACAGGGACAGGTCCGAGCTCAGCCCGTTACTGCTGACCACTACACAGTGGCAGGTC
                CTTCTGTCCCTGTCCAGGCTCGAGTCGGGCAATGACGACTGGTGATGTGTCACCGTCCAG

                LeuProCysSerPheThrThrLeuProAlaLeuSerThrGlyLeuIleHisLeuHisGln
1681            CTCCCGTGTTCCTTCACAACCCTACCAGCCTTGTCCACCGGCCTCATCCACCTCCACCAG
                GAGGGCACAAGGAAGTGTTGGGATGGTCGGAACAGGTGGCCGGAGTAGGTGGAGGTGGTC

                AsnIleValAspValGlnTyrLeuTyrGlyValGlySerSerIleAlaSerTrpAlaIle
1741            AACATTGTGGACGTGCAGTACTTGTACGGGGTGGGGTCAAGCATCGCGTCCTGGGCCATT
                TTGTAACACCTGCACGTCATGAACATGCCCCACCCCAGTTCGTAGCGCAGGACCCGGTAA

                LysTrpGluTyrValValLeuLeuPheLeuLeuLeuAlaAspAlaArgValCysSerCys
1801            AAGTGGGAGTACGTCGTTCTCCTGTTCCTTCTGCTTGCAGACGCGCGCGTCTGCTCCTGC
```

FIG. 16-3

```
                TTCACCCTCATGCAGCAAGAGGACAAGGAAGACGAACGTCTGCGCGCGCAGACGAGGACG

                LeuTrpMetMetLeuLeuIleSerGlnAlaGluAlaAlaLeuGluAsnLeuValIleLeu
1861            TTGTGGATGATGCTACTCATATCCCAAGCGGAGGCGGCTTTGGAGAACCTCGTAATACTT
                AACACCTACTACGATGAGTATAGGGTTCGCCTCCGCCGAAACCTCTTGGAGCATTATGAA

                AsnAlaAlaSerLeuAlaGlyThrHisGlyLeuValSerPheLeuValPhePheCysPhe
1921            AATGCAGCATCCCTGGCCGGGACGCACGGTCTTGTATCCTTCCTCGTGTTCTTCTGCTTT
                TTACGTCGTAGGGACCGGCCCTGCGTGCCAGAACATAGGAAGGAGCACAAGAAGACGAAA

                AlaTrpTyrLeuLysGlyLysTrpValProGlyAlaValTyrThrPheTyrGlyMetTrp
1981            GCATGGTATTTGAAGGGTAAGTGGGTGCCCGGAGCGGTCTACACCTTCTACGGGATGTGG
                CGTACCATAAACTTCCCATTCACCCACGGGCCTCGCCAGATGTGGAAGATGCCCTACACC

                ProLeuLeuLeuLeuLeuAlaLeuProGlnArgAlaTyrAlaLeuAspThrGluVal
2041            CCTCTCCTCCTGCTCCTGTTGGCGTTGCCCCAGCGGGCGTACGCGCTGGACACGGAGGTG
                GGAGAGGAGGACGAGGACAACCGCAACGGGGTCGCCCGCATGCGCGACCTGTGCCTCCAC

                AlaAlaSerCysGlyGlyValValLeuValGlyLeuMetAlaLeuThrLeuSerProTyr
2101            GCCGCGTCGTGTGGCGGTGTTGTTCTCGTCGGGTTGATGGCGCTGACTCTGTCACCATAT
                CGGCGCAGCACACCGCCACAACAAGAGCAGCCCAACTACCGCGACTGAGACAGTGGTATA

                TyrLysArgTyrIleSerTrpCysLeuTrpTrpLeuGlnTyrPheLeuThrArgValGlu
2161            TACAAGCGCTATATCAGCTGGTGCTTGTGGTGGCTTCAGTATTTTCTGACCAGAGTGGAA
                ATGTTCGCGATATAGTCGACCACGAACACCACCGAAGTCATAAAAGACTGGTCTCACCTT

                AlaGlnLeuHisValTrpIleProProLeuAsnValArgGlyGlyArgAspAlaValIle
2221            GCGCAACTGCACGTGTGGATTCCCCCCCTCAACGTCCGAGGGGGGCGCGACGCCGTCATC
                CGCGTTGACGTGCACACCTAAGGGGGGGAGTTGCAGGCTCCCCCCGCGCTGCGGCAGTAG

                LeuLeuMetCysAlaValHisProThrLeuValPheAspIleThrLysLeuLeuLeuAla
2281            TTACTCATGTGTGCTGTACACCCGACTCTGGTATTTGACATCACCAAATTGCTGCTGGCC
                AATGAGTACACACGACATGTGGGCTGAGACCATAAACTGTAGTGGTTTAACGACGACCGG

                ValPheGlyProLeuTrpIleLeuGlnAlaSerLeuLeuLysValProTyrPheValArg
2341            GTCTTCGGACCCCTTTGGATTCTTCAAGCCAGTTTGCTTAAAGTACCCTACTTTGTGCGC
                CAGAAGCCTGGGGAAACCTAAGAAGTTCGGTCAAACGAATTTCATGGGATGAAACACGCG

                ValGlnGlyLeuLeuArgPheCysAlaLeuAlaArgLysMetIleGlyGlyHisTyrVal
2401            GTCCAAGGCCTTCTCCGGTTCTGCGCGTTAGCGCGGAAGATGATCGGAGGCCATTACGTG
                CAGGTTCCGGAAGAGGCCAAGACGCGCAATCGCGCCTTCTACTAGCCTCCGGTAATGCAC

                GlnMetValIleIleLysLeuGlyAlaLeuThrGlyThrTyrValTyrAsnHisLeuThr
2461            CAAATGGTCATCATTAAGTTAGGGGCGCTTACTGGCACCTATGTTTATAACCATCTCACT
                GTTTACCAGTAGTAATTCAATCCCCGCGAATGACCGTGGATACAAATATTGGTAGAGTGA

                ProLeuArgAspTrpAlaHisAsnGlyLeuArgAspLeuAlaValAlaValGluProVal
2521            CCTCTTCGGGACTGGGCGCACAACGGCTTGCGAGATCTGGCCGTGGCTGTAGAGCCAGTC
                GGAGAAGCCCTGACCCGCGTGTTGCCGAACGCTCTAGACCGGCACCGACATCTCGGTCAG

                ValPheSerGlnMetGluThrLysLeuIleThrTrpGlyAlaAspThrAlaAlaCysGly
2581            GTCTTCTCCCAAATGGAGACCAAGCTCATCACGTGGGGGGCAGATACCGCCGCGTGCGGT
                CAGAAGAGGGTTTACCTCTGGTTCGAGTAGTGCACCCCCCGTCTATGGCGGCGCACGCCA

                AspIleIleAsnGlyLeuProValSerAlaArgArgGlyArgGluIleLeuLeuGlyPro
2641            GACATCATCAACGGCTTGCCTGTTTCCGCCCGCAGGGGCCGGGAGATACTGCTCGGGCCA
                CTGTAGTAGTTGCCGAACGGACAAAGGCGGGCGTCCCCGGCCCTCTATGACGAGCCCGGT

                AlaAspGlyMetValSerLysGlyTrpArgLeuLeuAlaProIleThrAlaTyrAlaGln
2701            GCCGATGGAATGGTCTCCAAGGGGTGGAGGTTGCTGGCGCCCATCACGGCGTACGCCCAG
                CGGCTACCTTACCAGAGGTTCCCCACCTCCAACGACCGCGGGTAGTGCCGCATGCGGGTC

                GlnThrArgGlyLeuLeuGlyCysIleIleThrSerLeuThrGlyArgAspLysAsnGln
2761            CAGACAAGGGGCCTCCTAGGGTGCATAATCACCAGCCTAACTGGCCGGGACAAAAACCAA
                GTCTGTTCCCCGGAGGATCCCACGTATTAGTGGTCGGATTGACCGGCCCTGTTTTTGGTT
```

FIG. 16-4

```
                ValGluGlyGluValGlnIleValSerThrAlaAlaGlnThrPheLeuAlaThrCysIle
2821            GTGGAGGGTGAGGTCCAGATTGTGTCAACTGCTGCCCAAACCTTCCTGGCAACGTGCATC
                CACCTCCCACTCCAGGTCTAACACAGTTGACGACGGGTTTGGAAGGACCGTTGCACGTAG

                AsnGlyValCysTrpThrValTyrHisGlyAlaGlyThrArgThrIleAlaSerProLys
2881            AATGGGGTGTGCTGGACTGTCTACCACGGGGCCGGAACGAGGACCATCGCGTCACCCAAG
                TTACCCCACACGACCTGACAGATGGTGCCCCGGCCTTGCTCCTGGTAGCGCAGTGGGTTC

                GlyProValIleGlnMetTyrThrAsnValAspGlnAspLeuValGlyTrpProAlaPro
2941            GGTCCTGTCATCCAGATGTATACCAATGTAGACCAAGACCTTGTGGGCTGGCCCGCTCCG
                CCAGGACAGTAGGTCTACATATGGTTACATCTGGTTCTGGAACACCCGACCGGGCGAGGC

                GlnGlySerArgSerLeuThrProCysThrCysGlySerSerAspLeuTyrLeuValThr
3001            CAAGGTAGCCGCTCATTGACACCCTGCACTTGCGGCTCCTCGGACCTTTACCTGGTCACG
                GTTCCATCGGCGAGTAACTGTGGGACGTGAACGCCGAGGAGCCTGGAAATGGACCAGTGC

                ArgHisAlaAspValIleProValArgArgArgGlyAspSerArgGlySerLeuLeuSer
3061            AGGCACGCCGATGTCATTCCCGTGCGCCGGCGGGGTGATAGCAGGGGCAGCCTGCTGTCG
                TCCGTGCGGCTACAGTAAGGGCACGCGGCCGCCCCACTATCGTCCCCGTCGGACGACAGC

                ProArgProIleSerTyrLeuLysGlySerSerGlyGlyProLeuLeuCysProAlaGly
3121            CCCCGGCCCATTTCCTACTTGAAAGGCTCCTCGGGGGGTCCGCTGTTGTGCCCCGCGGGG
                GGGGCCGGGTAAAGGATGAACTTTCCGAGGAGCCCCCCAGGCGACAACACGGGGCGCCCC

                HisAlaValGlyIlePheArgAlaAlaValCysThrArgGlyValAlaLysAlaValAsp
3181            CACGCCGTGGGCATATTTAGGGCCGCGGTGTGCACCCGTGGAGTGGCTAAGGCGGTGGAC
                GTGCGGCACCCGTATAAATCCCGGCGCCACACGTGGGCACCTCACCGATTCCGCCACCTG

                PheIleProValGluAsnLeuGluThrThrMetArgSerProValPheThrAspAsnSer
3241            TTTATCCCTGTGGAGAACCTAGAGACAACCATGAGGTCCCCGGTGTTCACGGATAACTCC
                AAATAGGGACACCTCTTGGATCTCTGTTGGTACTCCAGGGGCCACAAGTGCCTATTGAGG

                SerProProValValProGlnSerPheGlnValAlaHisLeuHisAlaProThrGlySer
3301            TCTCCACCAGTAGTGCCCCAGAGCTTCCAGGTGGCTCACCTCCATGCTCCCACAGGCAGC
                AGAGGTGGTCATCACGGGGTCTCGAAGGTCCACCGAGTGGAGGTACGAGGGTGTCCGTCG

                GlyLysSerThrLysValProAlaAlaTyrAlaAlaGlnGlyTyrLysValLeuValLeu
3361            GGCAAAAGCACCAAGGTCCCGGCTGCATATGCAGCTCAGGGCTATAAGGTGCTAGTACTC
                CCGTTTTCGTGGTTCCAGGGCCGACGTATACGTCGAGTCCCGATATTCCACGATCATGAG

                AsnProSerValAlaAlaThrLeuGlyPheGlyAlaTyrMetSerLysAlaHisGlyIle
3421            AACCCCTCTGTTGCTGCAACACTGGGCTTTGGTGCTTACATGTCCAAGGCTCATGGGATC
                TTGGGGAGACAACGACGTTGTGACCCGAAACCACGAATGTACAGGTTCCGAGTACCCTAG

                AspProAsnIleArgThrGlyValArgThrIleThrThrGlySerProIleThrTyrSer
3481            GATCCTAACATCAGGACCGGGGTGAGAACAATTACCACTGGCAGCCCCATCACGTACTCC
                CTAGGATTGTAGTCCTGGCCCCACTCTTGTTAATGGTGACCGTCGGGGTAGTGCATGAGG

                ThrTyrGlyLysPheLeuAlaAspGlyGlyCysSerGlyGlyAlaTyrAspIleIleIle
3541            ACCTACGGCAAGTTCCTTGCCGACGGCGGGTGCTCGGGGGGCGCTTATGACATAATAATT
                TGGATGCCGTTCAAGGAACGGCTGCCGCCCACGAGCCCCCCGCGAATACTGTATTATTAA

                CysAspGluCysHisSerThrAspAlaThrSerIleLeuGlyIleGlyThrValLeuAsp
3601            TGTGACGAGTGCCACTCCACGGATGCCACATCCATCTTGGGCATCGGCACTGTCCTTGAC
                ACACTGCTCACGGTGAGGTGCCTACGGTGTAGGTAGAACCCGTAGCCGTGACAGGAACTG

                GlnAlaGluThrAlaGlyAlaArgLeuValValLeuAlaThrAlaThrProProGlySer
3661            CAAGCAGAGACTGCGGGGGCGAGACTGGTTGTGCTCGCCACCGCCACCCCTCCGGGCTCC
                GTTCGTCTCTGACGCCCCCGCTCTGACCAACACGAGCGGTGGCGGTGGGGAGGCCCGAGG

                ValThrValProHisProAsnIleGluGluValAlaLeuSerThrThrGlyGluIlePro
3721            GTCACTGTGCCCCATCCCAACATCGAGGAGGTTGCTCTGTCCACCACCGGAGAGATCCCT
                CAGTGACACGGGGTAGGGTTGTAGCTCCTCCAACGAGACAGGTGGTGGCCTCTCTAGGGA

                PheTyrGlyLysAlaIleProLeuGluValIleLysGlyGlyArgHisLeuIlePheCys
3781            TTTTACGGCAAGGCTATCCCCCTCGAAGTAATCAAGGGGGGGAGACATCTCATCTTCTGT
```

FIG. 16-5

```
      AAAATGCCGTTCCGATAGGGGGAGCTTCATTAGTTCCCCCCCTCTGTAGAGTAGAAGACA

      HisSerLysLysLysCysAspGluLeuAlaAlaLysLeuValAlaLeuGlyIleAsnAla
3841  CATTCAAAGAAGAAGTGCGACGAACTCGCCGCAAAGCTGGTCGCATTGGGCATCAATGCC
      GTAAGTTTCTTCTTCACGCTGCTTGAGCGGCGTTTCGACCAGCGTAACCCGTAGTTACGG

      ValAlaTyrTyrArgGlyLeuAspValSerValIleProThrSerGlyAspValValVal
3901  GTGGCCTACTACCGCGGTCTTGACGTGTCCGTCATCCCGACCAGCGGCGATGTTGTCGTC
      CACCGGATGATGGCGCCAGAACTGCACAGGCAGTAGGGCTGGTCGCCGCTACAACAGCAG

      ValAlaThrAspAlaLeuMetThrGlyTyrThrGlyAspPheAspSerValIleAspCys
3961  GTGGCAACCGATGCCCTCATGACCGGCTATACCGGCGACTTCGACTCGGTGATAGACTGC
      CACCGTTGGCTACGGGAGTACTGGCCGATATGGCCGCTGAAGCTGAGCCACTATCTGACG

      AsnThrCysValThrGlnThrValAspPheSerLeuAspProThrPheThrIleGluThr
4021  AATACGTGTGTCACCCAGACAGTCGATTTCAGCCTTGACCCTACCTTCACCATTGAGACA
      TTATGCACACAGTGGGTCTGTCAGCTAAAGTCGGAACTGGGATGGAAGTGGTAACTCTGT

      IleThrLeuProGlnAspAlaValSerArgThrGlnArgArgGlyArgThrGlyArgGly
4081  ATCACGCTCCCCCAGGATGCTGTCTCCCGCACTCAACGTCGGGGCAGGACTGGCAGGGGG
      TAGTGCGAGGGGGTCCTACGACAGAGGGCGTGAGTTGCAGCCCCGTCCTGACCGTCCCCC

      LysProGlyIleTyrArgPheValAlaProGlyGluArgProSerGlyMetPheAspSer
4141  AAGCCAGGCATCTACAGATTTGTGGCACCGGGGGAGCGCCCCTCCGGCATGTTCGACTCG
      TTCGGTCCGTAGATGTCTAAACACCGTGGCCCCCTCGCGGGGAGGCCGTACAAGCTGAGC

      SerValLeuCysGluCysTyrAspAlaGlyCysAlaTrpTyrGluLeuThrProAlaGlu
4201  TCCGTCCTCTGTGAGTGCTATGACGCAGGCTGTGCTTGGTATGAGCTCACGCCCGCCGAG
      AGGCAGGAGACACTCACGATACTGCGTCCGACACGAACCATACTCGAGTGCGGGCGGCTC

      ThrThrValArgLeuArgAlaTyrMetAsnThrProGlyLeuProValCysGlnAspHis
4261  ACTACAGTTAGGCTACGAGCGTACATGAACACCCCGGGGCTTCCCGTGTGCCAGGACCAT
      TGATGTCAATCCGATGCTCGCATGTACTTGTGGGGCCCCGAAGGGCACACGGTCCTGGTA

      LeuGluPheTrpGluGlyValPheThrGlyLeuThrHisIleAspAlaHisPheLeuSer
4321  CTTGAATTTTGGGAGGGCGTCTTTACAGGCCTCACTCATATAGATGCCCACTTTCTATCC
      GAACTTAAAACCCTCCCGCAGAAATGTCCGGAGTGAGTATATCTACGGGTGAAAGATAGG

      GlnThrLysGlnSerGlyGluAsnLeuProTyrLeuValAlaTyrGlnAlaThrValCys
4381  CAGACAAAGCAGAGTGGGGAGAACCTTCCTTACCTGGTAGCGTACCAAGCCACCGTGTGC
      GTCTGTTTCGTCTCACCCCTCTTGGAAGGAATGGACCATCGCATGGTTCGGTGGCACACG

      AlaArgAlaGlnAlaProProProSerTrpAspGlnMetTrpLysCysLeuIleArgLeu
4441  GCTAGGGCTCAAGCCCCTCCCCCATCGTGGGACCAGATGTGGAAGTGTTTGATTCGCCTC
      CGATCCCGAGTTCGGGGAGGGGGTAGCACCCTGGTCTACACCTTCACAAACTAAGCGGAG

      LysProThrLeuHisGlyProThrProLeuLeuTyrArgLeuGlyAlaValGlnAsnGlu
4501  AAGCCCACCCTCCATGGGCCAACACCCCTGCTATACAGACTGGGCGCTGTTCAGAATGAA
      TTCGGGTGGGAGGTACCCGGTTGTGGGGACGATATGTCTGACCCGCGACAAGTCTTACTT

      IleThrLeuThrHisProValThrLysTyrIleMetThrCysMetSerAlaAspLeuGlu
4561  ATCACCCTGACGCACCCAGTCACCAAATACATCATGACATGCATGTCGGCCGACCTGGAG
      TAGTGGGACTGCGTGGGTCAGTGGTTTATGTAGTACTGTACGTACAGCCGGCTGGACCTC

      ValValThrSerThrTrpValLeuValGlyGlyValLeuAlaAlaLeuAlaAlaTyrCys
4621  GTCGTCACGAGCACCTGGGTGCTCGTTGGCGGCGTCCTGGCTGCTTTGGCCGCGTATTGC
      CAGCAGTGCTCGTGGACCCACGAGCAACCGCCGCAGGACCGACGAAACCGGCGCATAACG

      LeuSerThrGlyCysValValIleValGlyArgValValLeuSerGlyLysProAlaIle
4681  CTGTCAACAGGCTGCGTGGTCATAGTGGGCAGGGTCGTCTTGTCCGGGAAGCCGGCAATC
      GACAGTTGTCCGACGCACCAGTATCACCCGTCCCAGCAGAACAGGCCCTTCGGCCGTTAG

      IleProAspArgGluValLeuTyrArgGluPheAspGluMetGluGluCysSerGlnHis
4741  ATACCTGACAGGGAAGTCCTCTACCGAGAGTTCGATGAGATGGAAGAGTGCTCTCAGCAC
      TATGGACTGTCCCTTCAGGAGATGGCTCTCAAGCTACTCTACCTTCTCACGAGAGTCGTG
```

FIG. 16-6

```
    LeuProTyrIleGluGlnGlyMetMetLeuAlaGluGlnPheLysGlnLysAlaLeuGly
4801TTACCGTACATCGAGCAAGGGATGATGCTCGCCGAGCAGTTCAAGCAGAAGGCCCTCGGC
  AATGGCATGTAGCTCGTTCCCTACTACGAGCGGCTCGTCAAGTTCGTCTTCCGGGAGCCG

    LeuLeuGlnThrAlaSerArgGlnAlaGluValIleAlaProAlaValGlnThrAsnTrp
4861CTCCTGCAGACCGCGTCCCGTCAGGCAGAGGTTATCGCCCCTGCTGTCCAGACCAACTGG
  GAGGACGTCTGGCGCAGGGCAGTCCGTCTCCAATAGCGGGGACGACAGGTCTGGTTGACC

    GlnLysLeuGluThrPheTrpAlaLysHisMetTrpAsnPheIleSerGlyIleGlnTyr
4921CAAAAACTCGAGACCTTCTGGGCGAAGCATATGTGGAACTTCATCAGTGGGATACAATAC
  GTTTTTGAGCTCTGGAAGACCCGCTTCGTATACACCTTGAAGTAGTCACCCTATGTTATG

    LeuAlaGlyLeuSerThrLeuProGlyAsnProAlaIleAlaSerLeuMetAlaPheThr
4981TTGGCGGGCTTGTCAACGCTGCCTGGTAACCCCGCCATTGCTTCATTGATGGCTTTTACA
  AACCGCCCGAACAGTTGCGACGGACCATTGGGGCGGTAACGAAGTAACTACCGAAAATGT

    AlaAlaValThrSerProLeuThrThrSerGlnThrLeuLeuPheAsnIleLeuGlyGly
5041GCTGCTGTCACCAGCCCACTAACCACTAGCCAAACCCTCCTCTTCAACATATTGGGGGGG
  CGACGACAGTGGTCGGGTGATTGGTGATCGGTTTGGGAGGAGAAGTTGTATAACCCCCCC

    TrpValAlaAlaGlnLeuAlaAlaProGlyAlaAlaThrAlaPheValGlyAlaGlyLeu
5101TGGGTGGCTGCCCAGCTCGCCGCCCCCGGTGCCGCTACTGCCTTTGTGGGCGCTGGCTTA
  ACCCACCGACGGGTCGAGCGGCGGGGGCCACGGCGATGACGGAAACACCCGCGACCGAAT

    AlaGlyAlaAlaIleGlySerValGlyLeuGlyLysValLeuIleAspIleLeuAlaGly
5161GCTGGCGCCGCCATCGGCAGTGTTGGACTGGGGAAGGTCCTCATAGACATCCTTGCAGGG
  CGACCGCGGCGGTAGCCGTCACAACCTGACCCCTTCCAGGAGTATCTGTAGGAACGTCCC

    TyrGlyAlaGlyValAlaGlyAlaLeuValAlaPheLysIleMetSerGlyGluValPro
5221TATGGCGCGGGCGTGGCGGGAGCTCTTGTGGCATTCAAGATCATGAGCGGTGAGGTCCCC
  ATACCGCGCCCGCACCGCCCTCGAGAACACCGTAAGTTCTAGTACTCGCCACTCCAGGGG

    SerThrGluAspLeuValAsnLeuLeuProAlaIleLeuSerProGlyAlaLeuValVal
5281TCCACGGAGGACCTGGTCAATCTACTGCCCGCCATCCTCTCGCCCGGAGCCCTCGTAGTC
  AGGTGCCTCCTGGACCAGTTAGATGACGGGCGGTAGGAGAGCGGGCCTCGGGAGCATCAG

    GlyValValCysAlaAlaIleLeuArgArgHisValGlyProGlyGluGlyAlaValGln
5341GGCGTGGTCTGTGCAGCAATACTGCGCCGGCACGTTGGCCCGGGCGAGGGGGCAGTGCAG
  CCGCACCAGACACGTCGTTATGACGCGGCCGTGCAACCGGGCCCGCTCCCCCGTCACGTC

    TrpMetAsnArgLeuIleAlaPheAlaSerArgGlyAsnHisValSerProThrHisTyr
5401TGGATGAACCGGCTGATAGCCTTCGCCTCCCGGGGGAACCATGTTTCCCCCACGCACTAC
  ACCTACTTGGCCGACTATCGGAAGCGGAGGGCCCCCTTGGTACAAAGGGGGTGCGTGATG

    ValProGluSerAspAlaAlaAlaArgValThrAlaIleLeuSerSerLeuThrValThr
5461GTGCCGGAGAGCGATGCAGCTGCCCGCGTCACTGCCATACTCAGCAGCCTCACTGTAACC
  CACGGCCTCTCGCTACGTCGACGGGCGCAGTGACGGTATGAGTCGTCGGAGTGACATTGG

    GlnLeuLeuArgArgLeuHisGlnTrpIleSerSerGluCysThrThrProCysSerGly
5521CAGCTCCTGAGGCGACTGCACCAGTGGATAAGCTCGGAGTGTACCACTCCATGCTCCGGT
  GTCGAGGACTCCGCTGACGTGGTCACCTATTCGAGCCTCACATGGTGAGGTACGAGGCCA

    SerTrpLeuArgAspIleTrpAspTrpIleCysGluValLeuSerAspPheLysThrTrp
5581TCCTGGCTAAGGGACATCTGGGACTGGATATGCGAGGTGTTGAGCGACTTTAAGACCTGG
  AGGACCGATTCCCTGTAGACCCTGACCTATACGCTCCACAACTCGCTGAAATTCTGGACC

    LeuLysAlaLysLeuMetProGlnLeuProGlyIleProPheValSerCysGlnArgGly
5641CTAAAAGCTAAGCTCATGCCACAGCTGCCTGGGATCCCCTTTGTGTCCTGCCAGCGCGGG
  GATTTTCGATTCGAGTACGGTGTCGACGGACCCTAGGGGAAACACAGGACGGTCGCGCCC

    TyrLysGlyValTrpArgValAspGlyIleMetHisThrArgCysHisCysGlyAlaGlu
5701TATAAGGGGGTCTGGCGAGTGGACGGCATCATGCACACTCGCTGCCACTGTGGAGCTGAG
  ATATTCCCCCAGACCGCTCACCTGCCGTAGTACGTGTGAGCGACGGTGACACCTCGACTC

    IleThrGlyHisValLysAsnGlyThrMetArgIleValGlyProArgThrCysArgAsn
5761ATCACTGGACATGTCAAAAACGGGACGATGAGGATCGTCGGTCCTAGGACCTGCAGGAAC
```

FIG. 16-7

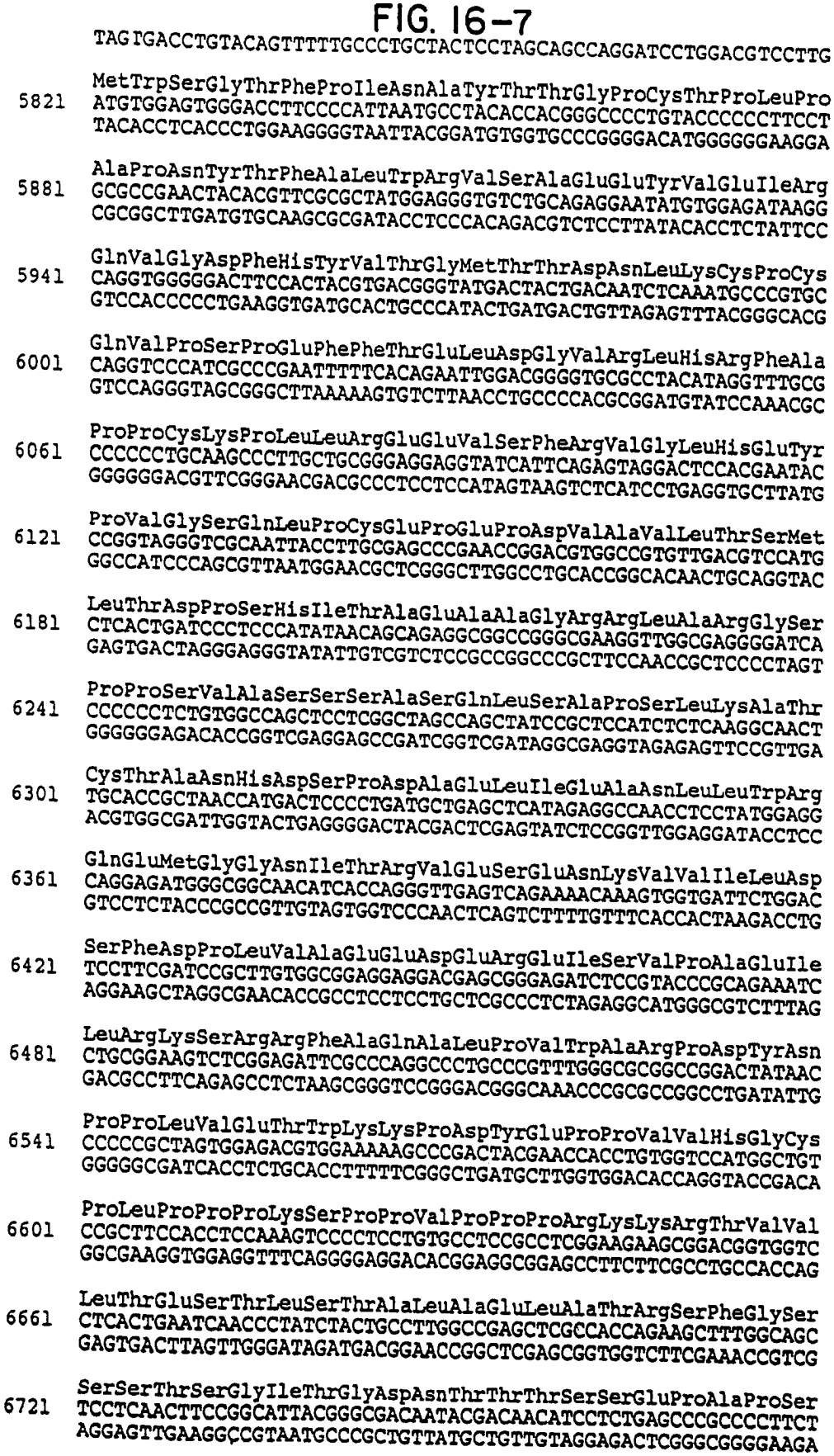

TAGTGACCTGTACAGTTTTTGCCCTGCTACTCCTAGCAGCCAGGATCCTGGACGTCCTTG
MetTrpSerGlyThrPheProIleAsnAlaTyrThrThrGlyProCysThrProLeuPro
5821 ATGTGGAGTGGGACCTTCCCCATTAATGCCTACACCACGGGCCCCTGTACCCCCCTTCCT
TACACCTCACCCTGGAAGGGGTAATTACGGATGTGGTGCCCGGGGACATGGGGGGAAGGA
AlaProAsnTyrThrPheAlaLeuTrpArgValSerAlaGluGluTyrValGluIleArg
5881 GCGCCGAACTACACGTTCGCGCTATGGAGGGTGTCTGCAGAGGAATATGTGGAGATAAGG
CGCGGCTTGATGTGCAAGCGCGATACCTCCCACAGACGTCTCCTTATACACCTCTATTCC
GlnValGlyAspPheHisTyrValThrGlyMetThrThrAspAsnLeuLysCysProCys
5941 CAGGTGGGGGACTTCCACTACGTGACGGGTATGACTACTGACAATCTCAAATGCCCGTGC
GTCCACCCCCTGAAGGTGATGCACTGCCCATACTGATGACTGTTAGAGTTTACGGGCACG
GlnValProSerProGluPhePheThrGluLeuAspGlyValArgLeuHisArgPheAla
6001 CAGGTCCCATCGCCCGAATTTTTCACAGAATTGGACGGGGTGCGCCTACATAGGTTTGCG
GTCCAGGGTAGCGGGCTTAAAAAGTGTCTTAACCTGCCCCACGCGGATGTATCCAAACGC
ProProCysLysProLeuLeuArgGluGluValSerPheArgValGlyLeuHisGluTyr
6061 CCCCCCTGCAAGCCCTTGCTGCGGGAGGAGGTATCATTCAGAGTAGGACTCCACGAATAC
GGGGGGACGTTCGGGAACGACGCCCTCCTCCATAGTAAGTCTCATCCTGAGGTGCTTATG
ProValGlySerGlnLeuProCysGluProGluProAspValAlaValLeuThrSerMet
6121 CCGGTAGGGTCGCAATTACCTTGCGAGCCCGAACCGGACGTGGCCGTGTTGACGTCCATG
GGCCATCCCAGCGTTAATGGAACGCTCGGGCTTGGCCTGCACCGGCACAACTGCAGGTAC
LeuThrAspProSerHisIleThrAlaGluAlaAlaGlyArgArgLeuAlaArgGlySer
6181 CTCACTGATCCCTCCCATATAACAGCAGAGGCGGCCGGGCGAAGGTTGGCGAGGGGATCA
GAGTGACTAGGGAGGGTATATTGTCGTCTCCGCCGGCCCGCTTCCAACCGCTCCCCTAGT
ProProSerValAlaSerSerSerAlaSerGlnLeuSerAlaProSerLeuLysAlaThr
6241 CCCCCCTCTGTGGCCAGCTCCTCGGCTAGCCAGCTATCCGCTCCATCTCTCAAGGCAACT
GGGGGGAGACACCGGTCGAGGAGCCGATCGGTCGATAGGCGAGGTAGAGAGTTCCGTTGA
CysThrAlaAsnHisAspSerProAspAlaGluLeuIleGluAlaAsnLeuLeuTrpArg
6301 TGCACCGCTAACCATGACTCCCCTGATGCTGAGCTCATAGAGGCCAACCTCCTATGGAGG
ACGTGGCGATTGGTACTGAGGGGACTACGACTCGAGTATCTCCGGTTGGAGGATACCTCC
GlnGluMetGlyGlyAsnIleThrArgValGluSerGluAsnLysValValIleLeuAsp
6361 CAGGAGATGGGCGGCAACATCACCAGGGTTGAGTCAGAAAACAAAGTGGTGATTCTGGAC
GTCCTCTACCCGCCGTTGTAGTGGTCCCAACTCAGTCTTTTGTTTCACCACTAAGACCTG
SerPheAspProLeuValAlaGluGluAspGluArgGluIleSerValProAlaGluIle
6421 TCCTTCGATCCGCTTGTGGCGGAGGAGGACGAGCGGGAGATCTCCGTACCCGCAGAAATC
AGGAAGCTAGGCGAACACCGCCTCCTCCTGCTCGCCCTCTAGAGGCATGGGCGTCTTTAG
LeuArgLysSerArgArgPheAlaGlnAlaLeuProValTrpAlaArgProAspTyrAsn
6481 CTGCGGAAGTCTCGGAGATTCGCCCAGGCCCTGCCCGTTTGGGCGCGGCCGGACTATAAC
GACGCCTTCAGAGCCTCTAAGCGGGTCCGGGACGGGCAAACCCGCGCCGGCCTGATATTG
ProProLeuValGluThrTrpLysLysProAspTyrGluProProValValHisGlyCys
6541 CCCCCGCTAGTGGAGACGTGGAAAAAGCCCGACTACGAACCACCTGTGGTCCATGGCTGT
GGGGGCGATCACCTCTGCACCTTTTTCGGGCTGATGCTTGGTGGACACCAGGTACCGACA
ProLeuProProProLysSerProProValProProProArgLysLysArgThrValVal
6601 CCGCTTCCACCTCCAAAGTCCCCTCCTGTGCCTCCGCCTCGGAAGAAGCGGACGGTGGTC
GGCGAAGGTGGAGGTTTCAGGGGAGGACACGGAGGCGGAGCCTTCTTCGCCTGCCACCAG
LeuThrGluSerThrLeuSerThrAlaLeuAlaGluLeuAlaThrArgSerPheGlySer
6661 CTCACTGAATCAACCCTATCTACTGCCTTGGCCGAGCTCGCCACCAGAAGCTTTGGCAGC
GAGTGACTTAGTTGGGATAGATGACGGAACCGGCTCGAGCGGTGGTCTTCGAAACCGTCG
SerSerThrSerGlyIleThrGlyAspAsnThrThrThrSerSerGluProAlaProSer
6721 TCCTCAACTTCCGGCATTACGGGCGACAATACGACAACATCCTCTGAGCCCGCCCCTTCT
AGGAGTTGAAGGCCGTAATGCCCGCTGTTATGCTGTTGTAGGAGACTCGGGCGGGGAAGA

FIG. 16-8

```
      GlyCysProProAspSerAspAlaGluSerTyrSerSerMetProProLeuGluGlyGlu
6781  GGCTGCCCCCCCCGACTCCGACGCTGAGTCCTATTCCTCCATGCCCCCCCCTGGAGGGGGAG
      CCGACGGGGGGGGCTGAGGCTGCGACTCAGGATAAGGAGGTACGGGGGGGGACCTCCCCCTC

      ProGlyAspProAspLeuSerAspGlySerTrpSerThrValSerSerGluAlaAsnAla
6841  CCTGGGGATCCGGATCTTAGCGACGGGTCATGGTCAACGGTCAGTAGTGAGGCCAACGCG
      GGACCCCTAGGCCTAGAATCGCTGCCCAGTACCAGTTGCCAGTCATCACTCCGGTTGCGC

      GluAspValValCysCysSerMetSerTyrSerTrpThrGlyAlaLeuValThrProCys
6901  GAGGATGTCGTGTGCTGCTCAATGTCTTACTCTTGGACAGGCGCACTCGTCACCCCGTGC
      CTCCTACAGCACACGACGAGTTACAGAATGAGAACCTGTCCGCGTGAGCAGTGGGGCACG

      AlaAlaGluGluGlnLysLeuProIleAsnAlaLeuSerAsnSerLeuLeuArgHisHis
6961  GCCGCGGAAGAACAGAAACTGCCCATCAATGCACTAAGCAACTCGTTGCTACGTCACCAC
      CGGCGCCTTCTTGTCTTTGACGGGTAGTTACGTGATTCGTTGAGCAACGATGCAGTGGTG

      AsnLeuValTyrSerThrThrSerArgSerAlaCysGlnArgGlnLysLysValThrPhe
7021  AATTTGGTGTATTCCACCACCTCACGCAGTGCTTGCCAAAGGCAGAAGAAAGTCACATTT
      TTAAACCACATAAGGTGGTGGAGTGCGTCACGAACGGTTTCCGTCTTCTTTCAGTGTAAA

      AspArgLeuGlnValLeuAspSerHisTyrGlnAspValLeuLysGluValLysAlaAla
7081  GACAGACTGCAAGTTCTGGACAGCCATTACCAGGACGTACTCAAGGAGGTTAAAGCAGCG
      CTGTCTGACGTTCAAGACCTGTCGGTAATGGTCCTGCATGAGTTCCTCCAATTTCGTCGC

      AlaSerLysValLysAlaAsnLeuLeuSerValGluGluAlaCysSerLeuThrProPro
7141  GCGTCAAAAGTGAAGGCTAACTTGCTATCCGTAGAGGAAGCTTGCAGCCTGACGCCCCCA
      CGCAGTTTTCACTTCCGATTGAACGATAGGCATCTCCTTCGAACGTCGGACTGCGGGGGT

      HisSerAlaLysSerLysPheGlyTyrGlyAlaLysAspValArgCysHisAlaArgLys
7201  CACTCAGCCAAATCCAAGTTTGGTTATGGGGCAAAAGACGTCCGTTGCCATGCCAGAAAG
      GTGAGTCGGTTTAGGTTCAAACCAATACCCCGTTTTCTGCAGGCAACGGTACGGTCTTTC

      AlaValThrHisIleAsnSerValTrpLysAspLeuLeuGluAspAsnValThrProIle
7261  GCCGTAACCCACATCAACTCCGTGTGGAAAGACCTTCTGGAAGACAATGTAACACCAATA
      CGGCATTGGGTGTAGTTGAGGCACACCTTTCTGGAAGACCTTCTGTTACATTGTGGTTAT

      AspThrThrIleMetAlaLysAsnGluValPheCysValGlnProGluLysGlyGlyArg
7321  GACACTACCATCATGGCTAAGAACGAGGTTTTCTGCGTTCAGCCTGAGAAGGGGGGTCGT
      CTGTGATGGTAGTACCGATTCTTGCTCCAAAAGACGCAAGTCGGACTCTTCCCCCCAGCA

      LysProAlaArgLeuIleValPheProAspLeuGlyValArgValCysGluLysMetAla
7381  AAGCCAGCTCGTCTCATCGTGTTCCCCGATCTGGGCGTGCGCGTGTGCGAAAAGATGGCT
      TTCGGTCGAGCAGAGTAGCACAAGGGGCTAGACCCGCACGCGCACACGCTTTTCTACCGA

      LeuTyrAspValValThrLysLeuProLeuAlaValMetGlySerSerTyrGlyPheGln
7441  TTGTACGACGTGGTTACAAAGCTCCCCTTGGCCGTGATGGGAAGCTCCTACGGATTCCAA
      AACATGCTGCACCAATGTTTCGAGGGGAACCGGCACTACCCTTCGAGGATGCCTAAGGTT

      TyrSerProGlyGlnArgValGluPheLeuValGlnAlaTrpLysSerLysLysThrPro
7501  TACTCACCAGGACAGCGGGTTGAATTCCTCGTGCAAGCGTGGAAGTCCAAGAAAACCCCA
      ATGAGTGGTCCTGTCGCCCAACTTAAGGAGCACGTTCGCACCTTCAGGTTCTTTTGGGGT

      MetGlyPheSerTyrAspThrArgCysPheAspSerThrValThrGluSerAspIleArg
7561  ATGGGGTTCTCGTATGATACCCGCTGCTTTGACTCCACAGTCACTGAGAGCGACATCCGT
      TACCCCAAGAGCATACTATGGGCGACGAAACTGAGGTGTCAGTGACTCTCGCTGTAGGCA

      ThrGluGluAlaIleTyrGlnCysCysAspLeuAspProGlnAlaArgValAlaIleLys
7621  ACGGAGGAGGCAATCTACCAATGTTGTGACCTCGACCCCCAAGCCCGCGTGGCCATCAAG
      TGCCTCCTCCGTTAGATGGTTACAACACTGGAGCTGGGGGTTCGGGCGCACCGGTAGTTC

      SerLeuThrGluArgLeuTyrValGlyGlyProLeuThrAsnSerArgGlyGluAsnCys
7681  TCCCTCACCGAGAGGCTTTATGTTGGGGGCCCTCTTACCAATTCAAGGGGGGAGAACTGC
      AGGGAGTGGCTCTCCGAAATACAACCCCCGGGAGAATGGTTAAGTTCCCCCCTCTTGACG

      GlyTyrArgArgCysArgAlaSerGlyValLeuThrThrSerCysGlyAsnThrLeuThr
7741  GGCTATCGCAGGTGCCGCGCGAGCGGCGTACTGACAACTAGCTGTGGTAACACCCTCACT
```

FIG. 16-9

```
        CCGATAGCGTCCACGGCGCGCTCGCCGCATGACTGTTGATCGACACCATTGTGGGAGTGA

        CysTyrIleLysAlaArgAlaAlaCysArgAlaAlaGlyLeuGlnAspCysThrMetLeu
7801    TGCTACATCAAGGCCCGGGCAGCCTGTCGAGCCGCAGGGCTCCAGGACTGCACCATGCTC
        ACGATGTAGTTCCGGGCCCGTCGGACAGCTCGGCGTCCCGAGGTCCTGACGTGGTACGAG

        ValCysGlyAspAspLeuValValIleCysGluSerAlaGlyValGlnGluAspAlaAla
7861    GTGTGTGGCGACGACTTAGTCGTTATCTGTGAAAGCGCGGGGGTCCAGGAGGACGCGGCG
        CACACACCGCTGCTGAATCAGCAATAGACACTTTCGCGCCCCCAGGTCCTCCTGCGCCGC

        SerLeuArgAlaPheThrGluAlaMetThrArgTyrSerAlaProProGlyAspProPro
7921    AGCCTGAGAGCCTTCACGGAGGCTATGACCAGGTACTCCGCCCCCCCTGGGGACCCCCCA
        TCGGACTCTCGGAAGTGCCTCCGATACTGGTCCATGAGGCGGGGGGGACCCCTGGGGGGT

        GlnProGluTyrAspLeuGluLeuIleThrSerCysSerSerAsnValSerValAlaHis
7981    CAACCAGAATACGACTTGGAGCTCATAACATCATGCTCCTCCAACGTGTCAGTCGCCCAC
        GTTGGTCTTATGCTGAACCTCGAGTATTGTAGTACGAGGAGGTTGCACAGTCAGCGGGTG

        AspGlyAlaGlyLysArgValTyrTyrLeuThrArgAspProThrThrProLeuAlaArg
8041    GACGGCGCTGGAAAGAGGGTCTACTACCTCACCCGTGACCCTACAACCCCCCTCGCGAGA
        CTGCCGCGACCTTTCTCCCAGATGATGGAGTGGGCACTGGGATGTTGGGGGGAGCGCTCT

        AlaAlaTrpGluThrAlaArgHisThrProValAsnSerTrpLeuGlyAsnIleIleMet
8101    GCTGCGTGGGAGACAGCAAGACACACTCCAGTCAATTCCTGGCTAGGCAACATAATCATG
        CGACGCACCCTCTGTCGTTCTGTGTGAGGTCAGTTAAGGACCGATCCGTTGTATTAGTAC

        PheAlaProThrLeuTrpAlaArgMetIleLeuMetThrHisPhePheSerValLeuIle
8161    TTTGCCCCCACACTGTGGGCGAGGATGATACTGATGACCCATTTCTTTAGCGTCCTTATA
        AAACGGGGGTGTGACACCCGCTCCTACTATGACTACTGGGTAAAGAAATCGCAGGAATAT

        AlaArgAspGlnLeuGluGlnAlaLeuAspCysGluIleTyrGlyAlaCysTyrSerIle
8221    GCCAGGGACCAGCTTGAACAGGCCCTCGATTGCGAGATCTACGGGGCCTGCTACTCCATA
        CGGTCCCTGGTCGAACTTGTCCGGGAGCTAACGCTCTAGATGCCCCGGACGATGAGGTAT

        GluProLeuAspLeuProProIleIleGlnArgLeu
8281    GAACCACTTGATCTACCTCCAATCATTCAAAGACTC
        CTTGGTGAACTAGATGGAGGTTAGTAAGTTTCTGAG
```

FIG. 17-1

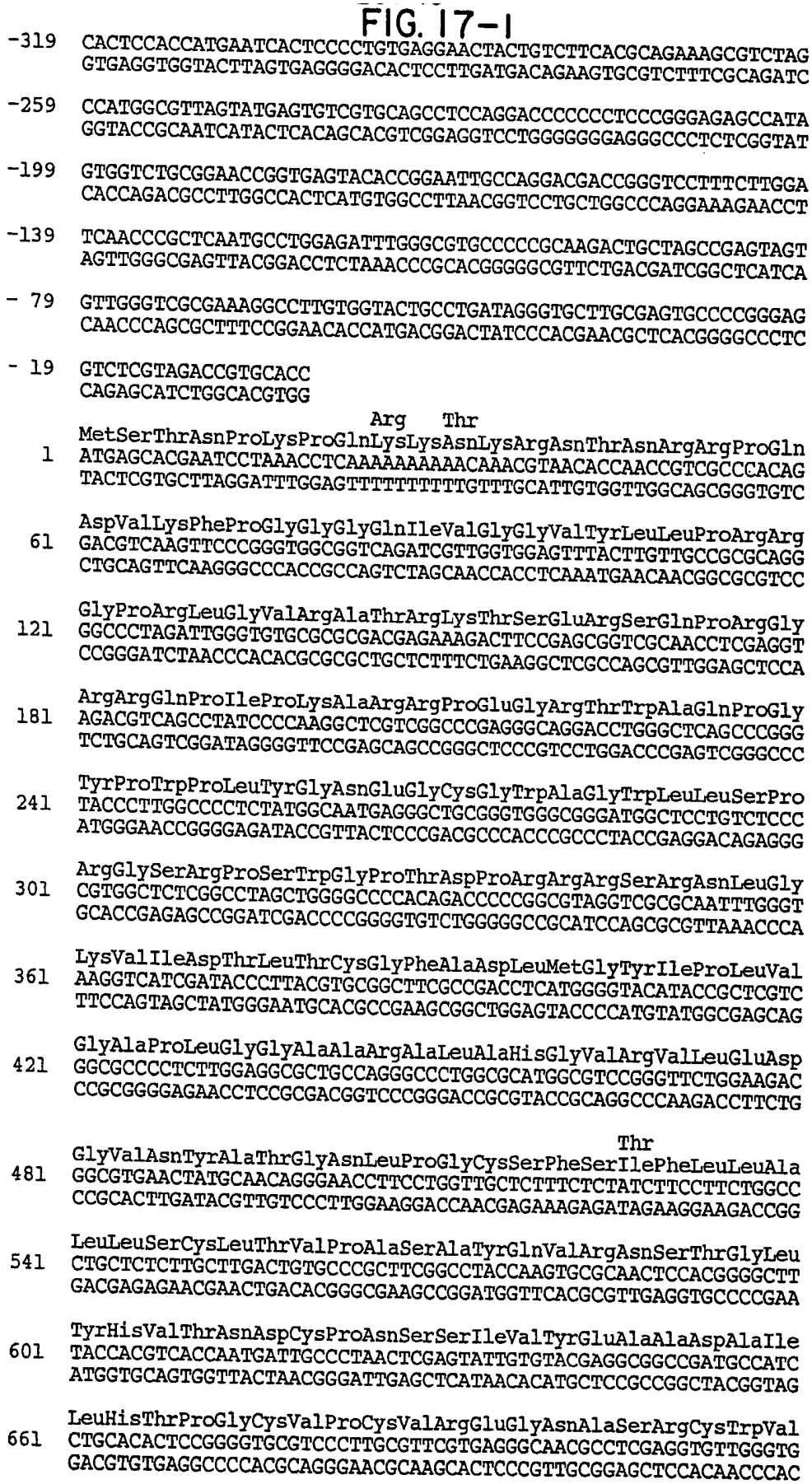

-319 CACTCCACCATGAATCACTCCCCTGTGAGGAACTACTGTCTTCACGCAGAAAGCGTCTAG
GTGAGGTGGTACTTAGTGAGGGGACACTCCTTGATGACAGAAGTGCGTCTTTCGCAGATC
-259 CCATGGCGTTAGTATGAGTGTCGTGCAGCCTCCAGGACCCCCCCTCCCGGGAGAGCCATA
GGTACCGCAATCATACTCACAGCACGTCGGAGGTCCTGGGGGGGAGGGCCCTCTCGGTAT
-199 GTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCCTTTCTTGGA
CACCAGACGCCTTGGCCACTCATGTGGCCTTAACGGTCCTGCTGGCCCAGGAAAGAACCT
-139 TCAACCCGCTCAATGCCTGGAGATTTGGGCGTGCCCCCGCAAGACTGCTAGCCGAGTAGT
AGTTGGGCGAGTTACGGACCTCTAAACCCGCACGGGGGCGTTCTGACGATCGGCTCATCA
- 79 GTTGGGTCGCGAAAGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAGGGTGCTTGCGAGTGCCCCGGGAG
CAACCCAGCGCTTTCCGGAACACCATGACGGACTATCCCACGAACGCTCACGGGGCCCTC
- 19 GTCTCGTAGACCGTGCACC
CAGAGCATCTGGCACGTGG
Arg Thr
MetSerThrAsnProLysProGlnLysLysAsnLysArgAsnThrAsnArgArgProGln
1 ATGAGCACGAATCCTAAACCTCAAAAAAAAAAACAAACGTAACACCAACCGTCGCCCACAG
TACTCGTGCTTAGGATTTGGAGTTTTTTTTTTGTTTGCATTGTGGTTGGCAGCGGGTGTC
AspValLysPheProGlyGlyGlyGlnIleValGlyGlyValTyrLeuLeuProArgArg
61 GACGTCAAGTTCCCGGGTGGCGGTCAGATCGTTGGTGGAGTTTACTTGTTGCCGCGCAGG
CTGCAGTTCAAGGGCCCACCGCCAGTCTAGCAACCACCTCAAATGAACAACGGCGCGTCC
GlyProArgLeuGlyValArgAlaThrArgLysThrSerGluArgSerGlnProArgGly
121 GGCCCTAGATTGGGTGTGCGCGCGACGAGAAAGACTTCCGAGCGGTCGCAACCTCGAGGT
CCGGGATCTAACCCACACGCGCGCTGCTCTTTCTGAAGGCTCGCCAGCGTTGGAGCTCCA
ArgArgGlnProIleProLysAlaArgArgProGluGlyArgThrTrpAlaGlnProGly
181 AGACGTCAGCCTATCCCCAAGGCTCGTCGGCCCGAGGGCAGGACCTGGGCTCAGCCCGGG
TCTGCAGTCGGATAGGGGTTCCGAGCAGCCGGGCTCCCGTCCTGGACCCGAGTCGGGCCC
TyrProTrpProLeuTyrGlyAsnGluGlyCysGlyTrpAlaGlyTrpLeuLeuSerPro
241 TACCCTTGGCCCCTCTATGGCAATGAGGGCTGCGGGTGGGCGGGATGGCTCCTGTCTCCC
ATGGGAACCGGGGAGATACCGTTACTCCCGACGCCCACCCGCCCTACCGAGGACAGAGGG
ArgGlySerArgProSerTrpGlyProThrAspProArgArgArgSerArgAsnLeuGly
301 CGTGGCTCTCGGCCTAGCTGGGGCCCCACAGACCCCCGGCGTAGGTCGCGCAATTTGGGT
GCACCGAGAGCCGGATCGACCCCGGGGTGTCTGGGGGCCGCATCCAGCGCGTTAAACCCA
LysValIleAspThrLeuThrCysGlyPheAlaAspLeuMetGlyTyrIleProLeuVal
361 AAGGTCATCGATACCCTTACGTGCGGCTTCGCCGACCTCATGGGGTACATACCGCTCGTC
TTCCAGTAGCTATGGGAATGCACGCCGAAGCGGCTGGAGTACCCCATGTATGGCGAGCAG
GlyAlaProLeuGlyGlyAlaAlaArgAlaLeuAlaHisGlyValArgValLeuGluAsp
421 GGCGCCCCTCTTGGAGGCGCTGCCAGGGCCCTGGCGCATGGCGTCCGGGTTCTGGAAGAC
CCGCGGGGAGAACCTCCGCGACGGTCCCGGGACCGCGTACCGCAGGCCCAAGACCTTCTG
Thr
GlyValAsnTyrAlaThrGlyAsnLeuProGlyCysSerPheSerIlePheLeuLeuAla
481 GGCGTGAACTATGCAACAGGGAACCTTCCTGGTTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTCTGGCC
CCGCACTTGATACGTTGTCCCTTGGAAGGACCAACGAGAAAGAGATAGAAGGAAGACCGG
LeuLeuSerCysLeuThrValProAlaSerAlaTyrGlnValArgAsnSerThrGlyLeu
541 CTGCTCTCTTGCTTGACTGTGCCCGCTTCGGCCTACCAAGTGCGCAACTCCACGGGGCTT
GACGAGAGAACGAACTGACACGGGCGAAGCCGGATGGTTCACGCGTTGAGGTGCCCCGAA
TyrHisValThrAsnAspCysProAsnSerSerIleValTyrGluAlaAlaAspAlaIle
601 TACCACGTCACCAATGATTGCCCTAACTCGAGTATTGTGTACGAGGCGGCCGATGCCATC
ATGGTGCAGTGGTTACTAACGGGATTGAGCTCATAACACATGCTCCGCCGGCTACGGTAG
LeuHisThrProGlyCysValProCysValArgGluGlyAsnAlaSerArgCysTrpVal
661 CTGCACACTCCGGGGTGCGTCCCTTGCGTTCGTGAGGGCAACGCCTCGAGGTGTTGGGTG
GACGTGTGAGGCCCCACGCAGGGAACGCAAGCACTCCCGTTGCGGAGCTCCACAACCCAC

FIG. 17-2

```
                AlaMetThrProThrValAlaThrArgAspGlyLysLeuProAlaThrGlnLeuArgArg
721             GCGATGACCCCTACGGTGGCCACCAGGGATGGCAAACTCCCCGCGACGCAGCTTCGACGT
                CGCTACTGGGGATGCCACCGGTGGTCCCTACCGTTTGAGGGGCGCTGCGTCGAAGCTGCA

                HisIleAspLeuLeuValGlySerAlaThrLeuCysSerAlaLeuTyrValGlyAspLeu
781             CACATCGATCTGCTTGTCGGGAGCGCCACCCTCTGTTCGGCCCTCTACGTGGGGGACCTA
                GTGTAGCTAGACGAACAGCCCTCGCGGTGGGAGACAAGCCGGGAGATGCACCCCCTGGAT

                CysGlySerValPheLeuValGlyGlnLeuPheThrPheSerProArgArgHisTrpThr
841             TGCGGGTCTGTCTTTCTTGTCGGCCAACTGTTCACCTTCTCTCCCAGGCGCCACTGGACG
                ACGCCCAGACAGAAAGAACAGCCGGTTGACAAGTGGAAGAGAGGGTCCGCGGTGACCTGC

                ThrGlnGlyCysAsnCysSerIleTyrProGlyHisIleThrGlyHisArgMetAlaTrp
901             ACGCAAGGTTGCAATTGCTCTATCTATCCCGGCCATATAACGGGTCACCGCATGGCATGG
                TGCGTTCCAACGTTAACGAGATAGATAGGGCCGGTATATTGCCCAGTGGCGTACCGTACC

                                                        Val
                AspMetMetMetAsnTrpSerProThrThrAlaLeuValMetAlaGlnLeuLeuArgIle
961             GATATGATGATGAACTGGTCCCCTACGACGGCGTTGGTAATGGCTCAGCTGCTCCGGATC
                CTATACTACTACTTGACCAGGGGATGCTGCCGCAACCATTACCGAGTCGACGAGGCCTAG

                ProGlnAlaIleLeuAspMetIleAlaGlyAlaHisTrpGlyValLeuAlaGlyIleAla
1021            CCACAAGCCATCTTGGACATGATCGCTGGTGCTCACTGGGGAGTCCTGGCGGGCATAGCG
                GGTGTTCGGTAGAACCTGTACTAGCGACCACGAGTGACCCCTCAGGACCGCCCGTATCGC

                TyrPheSerMetValGlyAsnTrpAlaLysValLeuValValLeuLeuLeuPheAlaGly
1081            TATTTCTCCATGGTGGGGAACTGGGCGAAGGTCCTGGTAGTGCTGCTGCTATTTGCCGGC
                ATAAAGAGGTACCACCCCTTGACCCGCTTCCAGGACCATCACGACGACGATAAACGGCCG

                ValAspAlaGluThrHisValThrGlyGlySerAlaGlyHisThrValSerGlyPheVal
1141            GTCGACGCGGAAACCCACGTCACCGGGGGAAGTGCCGGCCACACTGTGTCTGGATTTGTT
                CAGCTGCGCCTTTGGGTGCAGTGGCCCCCTTCACGGCCGGTGTGACACAGACCTAAACAA

                SerLeuLeuAlaProGlyAlaLysGlnAsnValGlnLeuIleAsnThrAsnGlySerTrp
1201            AGCCTCCTCGCACCAGGCGCCAAGCAGAACGTCCAGCTGATCAACACCAACGGCAGTTGG
                TCGGAGGAGCGTGGTCCGCGGTTCGTCTTGCAGGTCGACTAGTTGTGGTTGCCGTCAACC

                HisLeuAsnSerThrAlaLeuAsnCysAsnAspSerLeuAsnThrGlyTrpLeuAlaGly
1261            CACCTCAATAGCACGGCCCTGAACTGCAATGATAGCCTCAACACCGGCTGGTTGGCAGGG
                GTGGAGTTATCGTGCCGGGACTTGACGTTACTATCGGAGTTGTGGCCGACCAACCGTCCC

                LeuPheTyrHisHisLysPheAsnSerSerGlyCysProGluArgLeuAlaSerCysArg
1321            CTTTTCTATCACCACAAGTTCAACTCTTCAGGCTGTCCTGAGAGGCTAGCCAGCTGCCGA
                GAAAAGATAGTGGTGTTCAAGTTGAGAAGTCCGACAGGACTCTCCGATCGGTCGACGGCT

                ProLeuThrAspPheAspGlnGlyTrpGlyProIleSerTyrAlaAsnGlySerGlyPro
1381            CCCCTTACCGATTTTGACCAGGGCTGGGGCCCTATCAGTTATGCCAACGGAAGCGGCCCC
                GGGGAATGGCTAAAACTGGTCCCGACCCCGGGATAGTCAATACGGTTGCCTTCGCCGGGG

                AspGlnArgProTyrCysTrpHisTyrProProLysProCysGlyIleValProAlaLys
1441            GACCAGCGCCCCTACTGCTGGCACTACCCCCCAAAACCTTGCGGTATTGTGCCCGCGAAG
                CTGGTCGCGGGGATGACGACCGTGATGGGGGGTTTTGGAACGCCATAACACGGGCGCTTC

                SerValCysGlyProValTyrCysPheThrProSerProValValValGlyThrThrAsp
1501            AGTGTGTGTGGTCCGGTATATTGCTTCACTCCCAGCCCCGTGGTGGTGGGAACGACCGAC
                TCACACACACCAGGCCATATAACGAAGTGAGGGTCGGGGCACCACCACCCTTGCTGGCTG

                ArgSerGlyAlaProThrTyrSerTrpGlyGluAsnAspThrAspValPheValLeuAsn
1561            AGGTCGGGCGCGCCCACCTACAGCTGGGGTGAAAATGATACGGACGTCTTCGTCCTTAAC
                TCCAGCCCGCGCGGGTGGATGTCGACCCCACTTTTACTATGCCTGCAGAAGCAGGAATTG

                AsnThrArgProProLeuGlyAsnTrpPheGlyCysThrTrpMetAsnSerThrGlyPhe
1621            AATACCAGGCCACCGCTGGGCAATTGGTTCGGTTGTACCTGGATGAACTCAACTGGATTC
                TTATGGTCCGGTGGCGACCCGTTAACCAAGCCAACATGGACCTACTTGAGTTGACCTAAG
```

FIG. 17-3

```
                ThrLysValCysGlyAlaProProCysValIleGlyGlyAlaGlyAsnAsnThrLeuHis
1681            ACCAAAGTGTGCGGAGCGCCTCCTTGTGTCATCGGAGGGGCGGGCAACAACACCCTGCAC
                TGGTTTCACACGCCTCGCGGAGGAACACAGTAGCCTCCCCGCCCGTTGTTGTGGGACGTG

                CysProThrAspCysPheArgLysHisProAspAlaThrTyrSerArgCysGlySerGly
1741            TGCCCCACTGATTGCTTCCGCAAGCATCCGGACGCCACATACTCTCGGTGCGGCTCCGGT
                ACGGGGTGACTAACGAAGGCGTTCGTAGGCCTGCGGTGTATGAGAGCCACGCCGAGGCCA

                     Leu
                ProTrpIleThrProArgCysLeuValAspTyrProTyrArgLeuTrpHisTyrProCys
1801            CCCTGGATCACACCCAGGTGCCTGGTCGACTACCCGTATAGGCTTTGGCATTATCCTTGT
                GGGACCTAGTGTGGGTCCACGGACCAGCTGATGGGCATATCCGAAACCGTAATAGGAACA

                ThrIleAsnTyrThrIlePheLysIleArgMetTyrValGlyGlyValGluHisArgLeu
1861            ACCATCAACTACACCATATTTAAAATCAGGATGTACGTGGGAGGGGTCGAACACAGGCTG
                TGGTAGTTGATGTGGTATAAATTTTAGTCCTACATGCACCCTCCCCAGCTTGTGTCCGAC

                GluAlaAlaCysAsnTrpThrArgGlyGluArgCysAspLeuGluAspArgAspArgSer
1921            GAAGCTGCCTGCAACTGGACGCGGGGCGAACGTTGCGATCTGGAAGACAGGGACAGGTCC
                CTTCGACGGACGTTGACCTGCGCCCCGCTTGCAACGCTAGACCTTCTGTCCCTGTCCAGG

                GluLeuSerProLeuLeuLeuThrThrThrGlnTrpGlnValLeuProCysSerPheThr
1981            GAGCTCAGCCCGTTACTGCTGACCACTACACAGTGGCAGGTCCTCCCGTGTTCCTTCACA
                CTCGAGTCGGGCAATGACGACTGGTGATGTGTCACCGTCCAGGAGGGCACAAGGAAGTGT

                ThrLeuProAlaLeuSerThrGlyLeuIleHisLeuHisGlnAsnIleValAspValGln
2041            ACCCTACCAGCCTTGTCCACCGGCCTCATCCACCTCCACCAGAACATTGTGGACGTGCAG
                TGGGATGGTCGGAACAGGTGGCCGGAGTAGGTGGAGGTGGTCTTGTAACACCTGCACGTC

                TyrLeuTyrGlyValGlySerSerIleAlaSerTrpAlaIleLysTrpGluTyrValVal
2101            TACTTGTACGGGGTGGGGTCAAGCATCGCGTCCTGGGCCATTAAGTGGGAGTACGTCGTT
                ATGAACATGCCCCACCCCAGTTCGTAGCGCAGGACCCGGTAATTCACCCTCATGCAGCAA

                LeuLeuPheLeuLeuLeuAlaAspAlaArgValCysSerCysLeuTrpMetMetLeuLeu
2161            CTCCTGTTCCTTCTGCTTGCAGACGCGCGCGTCTGCTCCTGCTTGTGGATGATGCTACTC
                GAGGACAAGGAAGACGAACGTCTGCGCGCGCAGACGAGGACGAACACCTACTACGATGAG

                IleSerGlnAlaGluAlaAlaLeuGluAsnLeuValIleLeuAsnAlaAlaSerLeuAla
2221            ATATCCCAAGCGGAGGCGGCTTTGGAGAACCTCGTAATACTTAATGCAGCATCCCTGGCC
                TATAGGGTTCGCCTCCGCCGAAACCTCTTGGAGCATTATGAATTACGTCGTAGGGACCGG

                GlyThrHisGlyLeuValSerPheLeuValPhePheCysPheAlaTrpTyrLeuLysGly
2281            GGGACGCACGGTCTTGTATCCTTCCTCGTGTTCTTCTGCTTTGCATGGTATTTGAAGGGT
                CCCTGCGTGCCAGAACATAGGAAGGAGCACAAGAAGACGAAACGTACCATAAACTTCCCA

                LysTrpValProGlyAlaValTyrThrPheTyrGlyMetTrpProLeuLeuLeuLeuLeu
2341            AAGTGGGTGCCCGGAGCGGTCTACACCTTCTACGGGATGTGGCCTCTCCTCCTGCTCCTG
                TTCACCCACGGGCCTCGCCAGATGTGGAAGATGCCCTACACCGGAGAGGAGGACGAGGAC

                LeuAlaLeuProGlnArgAlaTyrAlaLeuAspThrGluValAlaAlaSerCysGlyGly
2401            TTGGCGTTGCCCCAGCGGGCGTACGCGCTGGACACGGAGGTGGCCGCGTCGTGTGGCGGT
                AACCGCAACGGGGTCGCCCGCATGCGCGACCTGTGCCTCCACCGGCGCAGCACACCGCCA

                ValValLeuValGlyLeuMetAlaLeuThrLeuSerProTyrTyrLysArgTyrIleSer
2461            GTTGTTCTCGTCGGGTTGATGGCGCTGACTCTGTCACCATATTACAAGCGCTATATCAGC
                CAACAAGAGCAGCCCAACTACCGCGACTGAGACAGTGGTATAATGTTCGCGATATAGTCG

                                  Asn
                TrpCysLeuTrpTrpLeuGlnTyrPheLeuThrArgValGluAlaGlnLeuHisValTrp
2521            TGGTGCTTGTGGTGGCTTCAGTATTTTCTGACCAGAGTGGAAGCGCAACTGCACGTGTGG
                ACCACGAACACCACCGAAGTCATAAAAGACTGGTCTCACCTTCGCGTTGACGTGCACACC

                IleProProLeuAsnValArgGlyGlyArgAspAlaValIleLeuLeuMetCysAlaVal
2581            ATTCCCCCCCTCAACGTCCGAGGGGGGCGCGACGCCGTCATCTTACTCATGTGTGCTGTA
                TAAGGGGGGGAGTTGCAGGCTCCCCCCGCGCTGCGGCAGTAGAATGAGTACACACGACAT
```

FIG. 17-4

```
                HisProThrLeuValPheAspIleThrLysLeuLeuLeuAlaValPheGlyProLeuTrp
2641            CACCCGACTCTGGTATTTGACATCACCAAATTGCTGCTGGCCGTCTTCGGACCCCTTTGG
                GTGGGCTGAGACCATAAACTGTAGTGGTTTAACGACGACCGGCAGAAGCCTGGGGAAACC

                IleLeuGlnAlaSerLeuLeuLysValProTyrPheValArgValGlnGlyLeuLeuArg
2701            ATTCTTCAAGCCAGTTTGCTTAAAGTACCCTACTTTGTGCGCGTCCAAGGCCTTCTCCGG
                TAAGAAGTTCGGTCAAACGAATTTCATGGGATGAAACACGCGCAGGTTCCGGAAGAGGCC

                PheCysAlaLeuAlaArgLysMetIleGlyGlyHisTyrValGlnMetValIleIleLys
2761            TTCTGCGCGTTAGCGCGGAAGATGATCGGAGGCCATTACGTGCAAATGGTCATCATTAAG
                AAGACGCGCAATCGCGCCTTCTACTAGCCTCCGGTAATGCACGTTTACCAGTAGTAATTC

                LeuGlyAlaLeuThrGlyThrTyrValTyrAsnHisLeuThrProLeuArgAspTrpAla
2821            TTAGGGGCGCTTACTGGCACCTATGTTTATAACCATCTCACTCCTCTTCGGGACTGGGCG
                AATCCCCGCGAATGACCGTGGATACAAATATTGGTAGAGTGAGGAGAAGCCCTGACCCGC

                HisAsnGlyLeuArgAspLeuAlaValAlaValGluProValValPheSerGlnMetGlu
2881            CACAACGGCTTGCGAGATCTGGCCGTGGCTGTAGAGCCAGTCGTCTTCTCCCAAATGGAG
                GTGTTGCCGAACGCTCTAGACCGGCACCGACATCTCGGTCAGCAGAAGAGGGTTTACCTC

                ThrLysLeuIleThrTrpGlyAlaAspThrAlaAlaCysGlyAspIleIleAsnGlyLeu
2941            ACCAAGCTCATCACGTGGGGGGCAGATACCGCCGCGTGCGGTGACATCATCAACGGCTTG
                TGGTTCGAGTAGTGCACCCCCCGTCTATGGCGGCGCACGCCACTGTAGTAGTTGCCGAAC

                ProValSerAlaArgArgGlyArgGluIleLeuLeuGlyProAlaAspGlyMetValSer
3001            CCTGTTTCCGCCCGCAGGGGCCGGGAGATACTGCTCGGGCCAGCCGATGGAATGGTCTCC
                GGACAAAGGCGGGCGTCCCCGGCCCTCTATGACGAGCCCGGTCGGCTACCTTACCAGAGG

                LysGlyTrpArgLeuLeuAlaProIleThrAlaTyrAlaGlnGlnThrArgGlyLeuLeu
3061            AAGGGGTGGAGGTTGCTGGCGCCCATCACGGCGTACGCCCAGCAGACAAGGGGCCTCCTA
                TTCCCCACCTCCAACGACCGCGGGTAGTGCCGCATGCGGGTCGTCTGTTCCCCGGAGGAT

                GlyCysIleIleThrSerLeuThrGlyArgAspLysAsnGlnValGluGlyGluValGln
3121            GGGTGCATAATCACCAGCCTAACTGGCCGGGACAAAAACCAAGTGGAGGGTGAGGTCCAG
                CCCACGTATTAGTGGTCGGATTGACCGGCCCTGTTTTTGGTTCACCTCCCACTCCAGGTC

                IleValSerThrAlaAlaGlnThrPheLeuAlaThrCysIleAsnGlyValCysTrpThr
3181            ATTGTGTCAACTGCTGCCCAAACCTTCCTGGCAACGTGCATCAATGGGGTGTGCTGGACT
                TAACACAGTTGACGACGGGTTTGGAAGGACCGTTGCACGTAGTTACCCCACACGACCTGA

                ValTyrHisGlyAlaGlyThrArgThrIleAlaSerProLysGlyProValIleGlnMet
3241            GTCTACCACGGGGCCGGAACGAGGACCATCGCGTCACCCAAGGGTCCTGTCATCCAGATG
                CAGATGGTGCCCCGGCCTTGCTCCTGGTAGCGCAGTGGGTTCCCAGGACAGTAGGTCTAC

                                                    Ser       Thr
                TyrThrAsnValAspGlnAspLeuValGlyTrpProAlaProGlnGlySerArgSerLeu
3301            TATACCAATGTAGACCAAGACCTTGTGGGCTGGCCCGCTCCGCAAGGTAGCCGCTCATTG
                ATATGGTTACATCTGGTTCTGGAACACCCGACCGGGCGAGGCGTTCCATCGGCGAGTAAC

                ThrProCysThrCysGlySerSerAspLeuTyrLeuValThrArgHisAlaAspValIle
3361            ACACCCTGCACTTGCGGCTCCTCGGACCTTTACCTGGTCACGAGGCACGCCGATGTCATT
                TGTGGGACGTGAACGCCGAGGAGCCTGGAAATGGACCAGTGCTCCGTGCGGCTACAGTAA

                ProValArgArgArgGlyAspSerArgGlySerLeuLeuSerProArgProIleSerTyr
3421            CCCGTGCGCCGGCGGGGTGATAGCAGGGGCAGCCTGCTGTCGCCCCGGCCCATTTCCTAC
                GGGCACGCGGCCGCCCCACTATCGTCCCCGTCGGACGACAGCGGGGCCGGGTAAAGGATG

                LeuLysGlySerSerGlyGlyProLeuLeuCysProAlaGlyHisAlaValGlyIlePhe
3481            TTGAAAGGCTCCTCGGGGGGTCCGCTGTTGTGCCCCGCGGGGCACGCCGTGGGCATATTT
                AACTTTCCGAGGAGCCCCCCAGGCGACAACACGGGGCGCCCCGTGCGGCACCCGTATAAA

                ArgAlaAlaValCysThrArgGlyValAlaLysAlaValAspPheIleProValGluAsn
3541            AGGGCCGCGGTGTGCACCCGTGGAGTGGCTAAGGCGGTGGACTTTATCCCTGTGGAGAAC
                TCCCGGCGCCACACGTGGGCACCTCACCGATTCCGCCACCTGAAATAGGGACACCTCTTG
```

FIG. 17-5

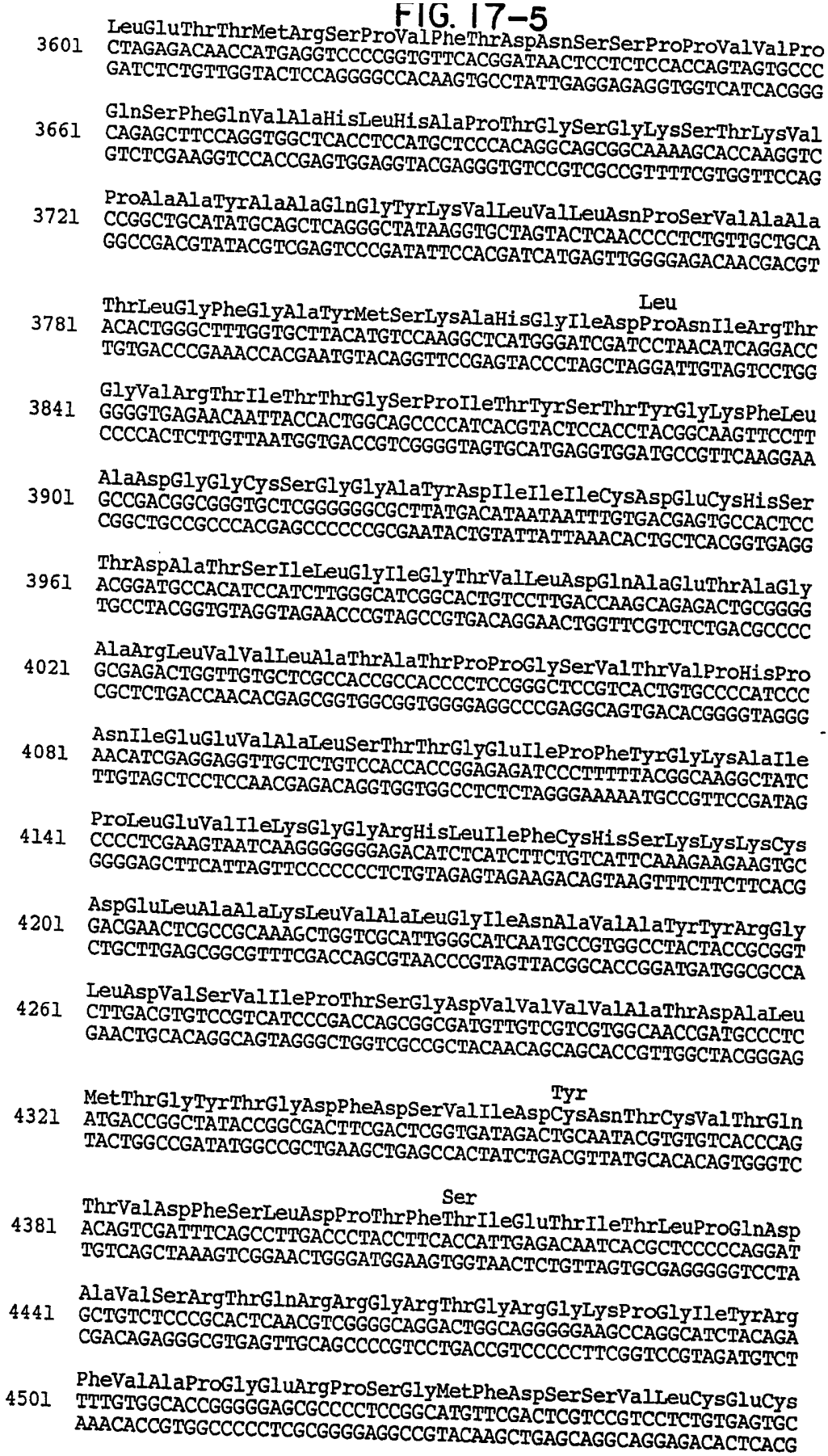

LeuGluThrThrMetArgSerProValPheThrAspAsnSerSerProProValValPro
3601 CTAGAGACAACCATGAGGTCCCCGGTGTTCACGGATAACTCCTCTCCACCAGTAGTGCCC
GATCTCTGTTGGTACTCCAGGGGCCACAAGTGCCTATTGAGGAGAGGTGGTCATCACGGG
GlnSerPheGlnValAlaHisLeuHisAlaProThrGlySerGlyLysSerThrLysVal
3661 CAGAGCTTCCAGGTGGCTCACCTCCATGCTCCCACAGGCAGCGGCAAAAGCACCAAGGTC
GTCTCGAAGGTCCACCGAGTGGAGGTACGAGGGTGTCCGTCGCCGTTTTCGTGGTTCCAG
ProAlaAlaTyrAlaAlaGlnGlyTyrLysValLeuValLeuAsnProSerValAlaAla
3721 CCGGCTGCATATGCAGCTCAGGGCTATAAGGTGCTAGTACTCAACCCCTCTGTTGCTGCA
GGCCGACGTATACGTCGAGTCCCGATATTCCACGATCATGAGTTGGGGAGACAACGACGT
Leu
ThrLeuGlyPheGlyAlaTyrMetSerLysAlaHisGlyIleAspProAsnIleArgThr
3781 ACACTGGGCTTTGGTGCTTACATGTCCAAGGCTCATGGGATCGATCCTAACATCAGGACC
TGTGACCCGAAACCACGAATGTACAGGTTCCGAGTACCCTAGCTAGGATTGTAGTCCTGG
GlyValArgThrIleThrThrGlySerProIleThrTyrSerThrTyrGlyLysPheLeu
3841 GGGGTGAGAACAATTACCACTGGCAGCCCCATCACGTACTCCACCTACGGCAAGTTCCTT
CCCCACTCTTGTTAATGGTGACCGTCGGGGTAGTGCATGAGGTGGATGCCGTTCAAGGAA
AlaAspGlyGlyCysSerGlyGlyAlaTyrAspIleIleIleCysAspGluCysHisSer
3901 GCCGACGGCGGGTGCTCGGGGGGCGCTTATGACATAATAATTTGTGACGAGTGCCACTCC
CGGCTGCCGCCCACGAGCCCCCCGCGAATACTGTATTATTAAACACTGCTCACGGTGAGG
ThrAspAlaThrSerIleLeuGlyIleGlyThrValLeuAspGlnAlaGluThrAlaGly
3961 ACGGATGCCACATCCATCTTGGGCATCGGCACTGTCCTTGACCAAGCAGAGACTGCGGGG
TGCCTACGGTGTAGGTAGAACCCGTAGCCGTGACAGGAACTGGTTCGTCTCTGACGCCCC
AlaArgLeuValValLeuAlaThrAlaThrProProGlySerValThrValProHisPro
4021 GCGAGACTGGTTGTGCTCGCCACCGCCACCCCTCCGGGCTCCGTCACTGTGCCCCATCCC
CGCTCTGACCAACACGAGCGGTGGCGGTGGGGAGGCCCGAGGCAGTGACACGGGGTAGGG
AsnIleGluGluValAlaLeuSerThrThrGlyGluIleProPheTyrGlyLysAlaIle
4081 AACATCGAGGAGGTTGCTCTGTCCACCACCGGAGAGATCCCTTTTTACGGCAAGGCTATC
TTGTAGCTCCTCCAACGAGACAGGTGGTGGCCTCTCTAGGGAAAAATGCCGTTCCGATAG
ProLeuGluValIleLysGlyGlyArgHisLeuIlePheCysHisSerLysLysLysCys
4141 CCCCTCGAAGTAATCAAGGGGGGGAGACATCTCATCTTCTGTCATTCAAAGAAGAAGTGC
GGGGAGCTTCATTAGTTCCCCCCCTCTGTAGAGTAGAAGACAGTAAGTTTCTTCTTCACG
AspGluLeuAlaAlaLysLeuValAlaLeuGlyIleAsnAlaValAlaTyrTyrArgGly
4201 GACGAACTCGCCGCAAAGCTGGTCGCATTGGGCATCAATGCCGTGGCCTACTACCGCGGT
CTGCTTGAGCGGCGTTTCGACCAGCGTAACCCGTAGTTACGGCACCGGATGATGGCGCCA
LeuAspValSerValIleProThrSerGlyAspValValValValAlaThrAspAlaLeu
4261 CTTGACGTGTCCGTCATCCCGACCAGCGGCGATGTTGTCGTCGTGGCAACCGATGCCCTC
GAACTGCACAGGCAGTAGGGCTGGTCGCCGCTACAACAGCAGCACCGTTGGCTACGGGAG
Tyr
MetThrGlyTyrThrGlyAspPheAspSerValIleAspCysAsnThrCysValThrGln
4321 ATGACCGGCTATACCGGCGACTTCGACTCGGTGATAGACTGCAATACGTGTGTCACCCAG
TACTGGCCGATATGGCCGCTGAAGCTGAGCCACTATCTGACGTTATGCACACAGTGGGTC
Ser
ThrValAspPheSerLeuAspProThrPheThrIleGluThrIleThrLeuProGlnAsp
4381 ACAGTCGATTTCAGCCTTGACCCTACCTTCACCATTGAGACAATCACGCTCCCCCAGGAT
TGTCAGCTAAAGTCGGAACTGGGATGGAAGTGGTAACTCTGTTAGTGCGAGGGGGTCCTA
AlaValSerArgThrGlnArgArgGlyArgThrGlyArgGlyLysProGlyIleTyrArg
4441 GCTGTCTCCCGCACTCAACGTCGGGGCAGGACTGGCAGGGGGAAGCCAGGCATCTACAGA
CGACAGAGGGCGTGAGTTGCAGCCCCGTCCTGACCGTCCCCCTTCGGTCCGTAGATGTCT
PheValAlaProGlyGluArgProSerGlyMetPheAspSerSerValLeuCysGluCys
4501 TTTGTGGCACCGGGGGAGCGCCCCTCCGGCATGTTCGACTCGTCCGTCCTCTGTGAGTGC
AAACACCGTGGCCCCCTCGCGGGGAGGCCGTACAAGCTGAGCAGGCAGGAGACACTCACG

FIG. 17-6

```
                TyrAspAlaGlyCysAlaTrpTyrGluLeuThrProAlaGluThrThrValArgLeuArg
4561            TATGACGCAGGCTGTGCTTGGTATGAGCTCACGCCCGCCGAGACTACAGTTAGGCTACGA
                ATACTGCGTCCGACACGAACCATACTCGAGTGCGGGCGGCTCTGATGTCAATCCGATGCT

                AlaTyrMetAsnThrProGlyLeuProValCysGlnAspHisLeuGluPheTrpGluGly
4621            GCGTACATGAACACCCCGGGGCTTCCCGTGTGCCAGGACCATCTTGAATTTTGGGAGGGC
                CGCATGTACTTGTGGGGCCCCGAAGGGCACACGGTCCTGGTAGAACTTAAAACCCTCCCG

                ValPheThrGlyLeuThrHisIleAspAlaHisPheLeuSerGlnThrLysGlnSerGly
4681            GTCTTTACAGGCCTCACTCATATAGATGCCCACTTTCTATCCCAGACAAAGCAGAGTGGG
                CAGAAATGTCCGGAGTGAGTATATCTACGGGTGAAAGATAGGGTCTGTTTCGTCTCACCC

                GluAsnLeuProTyrLeuValAlaTyrGlnAlaThrValCysAlaArgAlaGlnAlaPro
4741            GAGAACCTTCCTTACCTGGTAGCGTACCAAGCCACCGTGTGCGCTAGGGCTCAAGCCCCT
                CTCTTGGAAGGAATGGACCATCGCATGGTTCGGTGGCACACGCGATCCCGAGTTCGGGGA

                ProProSerTrpAspGlnMetTrpLysCysLeuIleArgLeuLysProThrLeuHisGly
4801            CCCCCATCGTGGGACCAGATGTGGAAGTGTTTGATTCGCCTCAAGCCCACCCTCCATGGG
                GGGGGTAGCACCCTGGTCTACACCTTCACAAACTAAGCGGAGTTCGGGTGGGAGGTACCC

                ProThrProLeuLeuTyrArgLeuGlyAlaValGlnAsnGluIleThrLeuThrHisPro
4861            CCAACACCCCTGCTATACAGACTGGGCGCTGTTCAGAATGAAATCACCCTGACGCACCCA
                GGTTGTGGGGACGATATGTCTGACCCGCGACAAGTCTTACTTTAGTGGGACTGCGTGGGT

                ValThrLysTyrIleMetThrCysMetSerAlaAspLeuGluValValThrSerThrTrp
4921            GTCACCAAATACATCATGACATGCATGTCGGCCGACCTGGAGGTCGTCACGAGCACCTGG
                CAGTGGTTTATGTAGTACTGTACGTACAGCCGGCTGGACCTCCAGCAGTGCTCGTGGACC

                ValLeuValGlyGlyValLeuAlaAlaLeuAlaAlaTyrCysLeuSerThrGlyCysVal
4981            GTGCTCGTTGGCGGCGTCCTGGCTGCTTTGGCCGCGTATTGCCTGTCAACAGGCTGCGTG
                CACGAGCAACCGCCGCAGGACCGACGAAACCGGCGCATAACGGACAGTTGTCCGACGCAC

                ValIleValGlyArgValValLeuSerGlyLysProAlaIleIleProAspArgGluVal
5041            GTCATAGTGGGCAGGGTCGTCTTGTCCGGGAAGCCGGCAATCATACCTGACAGGGAAGTC
                CAGTATCACCCGTCCCAGCAGAACAGGCCCTTCGGCCGTTAGTATGGACTGTCCCTTCAG

                LeuTyrArgGluPheAspGluMetGluGluCysSerGlnHisLeuProTyrIleGluGln
5101            CTCTACCGAGAGTTCGATGAGATGGAAGAGTGCTCTCAGCACTTACCGTACATCGAGCAA
                GAGATGGCTCTCAAGCTACTCTACCTTCTCACGAGAGTCGTGAATGGCATGTAGCTCGTT

                GlyMetMetLeuAlaGluGlnPheLysGlnLysAlaLeuGlyLeuLeuGlnThrAlaSer
5161            GGGATGATGCTCGCCGAGCAGTTCAAGCAGAAGGCCCTCGGCCTCCTGCAGACCGCGTCC
                CCCTACTACGAGCGGCTCGTCAAGTTCGTCTTCCGGGAGCCGGAGGACGTCTGGCGCAGG

                ArgGlnAlaGluValIleAlaProAlaValGlnThrAsnTrpGlnLysLeuGluThrPhe
5221            CGTCAGGCAGAGGTTATCGCCCCTGCTGTCCAGACCAACTGGCAAAAACTCGAGACCTTC
                GCAGTCCGTCTCCAATAGCGGGGACGACAGGTCTGGTTGACCGTTTTTGAGCTCTGGAAG

                TrpAlaLysHisMetTrpAsnPheIleSerGlyIleGlnTyrLeuAlaGlyLeuSerThr
5281            TGGGCGAAGCATATGTGGAACTTCATCAGTGGGATACAATACTTGGCGGGCTTGTCAACG
                ACCCGCTTCGTATACACCTTGAAGTAGTCACCCTATGTTATGAACCGCCCGAACAGTTGC

                LeuProGlyAsnProAlaIleAlaSerLeuMetAlaPheThrAlaAlaValThrSerPro
5341            CTGCCTGGTAACCCCGCCATTGCTTCATTGATGGCTTTTACAGCTGCTGTCACCAGCCCA
                GACGGACCATTGGGGCGGTAACGAAGTAACTACCGAAAATGTCGACGACAGTGGTCGGGT

                LeuThrThrSerGlnThrLeuLeuPheAsnIleLeuGlyGlyTrpValAlaAlaGlnLeu
5401            CTAACCACTAGCCAAACCCTCCTCTTCAACATATTGGGGGGGTGGGTGGCTGCCCAGCTC
                GATTGGTGATCGGTTTGGGAGGAGAAGTTGTATAACCCCCCCACCCACCGACGGGTCGAG

                AlaAlaProGlyAlaAlaThrAlaPheValGlyAlaGlyLeuAlaGlyAlaAlaIleGly
5461            GCCGCCCCCGGTGCCGCTACTGCCTTTGTGGGCGCTGGCTTAGCTGGCGCCGCCATCGGC
                CGGCGGGGGCCACGGCGATGACGGAAACACCCGCGACCGAATCGACCGCGGCGGTAGCCG

                SerValGlyLeuGlyLysValLeuIleAspIleLeuAlaGlyTyrGlyAlaGlyValAla
```

FIG. 17-7

```
5521  AGTGTTGGACTGGGGAAGGTCCTCATAGACATCCTTGCAGGGTATGGCGCGGGCGTGGCG
      TCACAACCTGACCCCTTCCAGGAGTATCTGTAGGAACGTCCCATACCGCGCCCGCACCGC

                                                              Gly
5581  GlyAlaLeuValAlaPheLysIleMetSerGlyGluValProSerThrGluAspLeuVal
      GGAGCTCTTGTGGCATTCAAGATCATGAGCGGTGAGGTCCCCTCCACGGAGGACCTGGTC
      CCTCGAGAACACCGTAAGTTCTAGTACTCGCCACTCCAGGGGAGGTGCCTCCTGGACCAG

5641  AsnLeuLeuProAlaIleLeuSerProGlyAlaLeuValValGlyValValCysAlaAla
      AATCTACTGCCCGCCATCCTCTCGCCCGGAGCCCTCGTAGTCGGCGTGGTCTGTGCAGCA
      TTAGATGACGGGCGGTAGGAGAGCGGGCCTCGGGAGCATCAGCCGCACCAGACACGTCGT

5701  IleLeuArgArgHisValGlyProGlyGluGlyAlaValGlnTrpMetAsnArgLeuIle
      ATACTGCGCCGGCACGTTGGCCCGGGCGAGGGGGCAGTGCAGTGGATGAACCGGCTGATA
      TATGACGCGGCCGTGCAACCGGGCCCGCTCCCCCGTCACGTCACCTACTTGGCCGACTAT

5761  AlaPheAlaSerArgGlyAsnHisValSerProThrHisTyrValProGluSerAspAla
      GCCTTCGCCTCCCGGGGGAACCATGTTTCCCCCACGCACTACGTGCCGGAGAGCGATGCA
      CGGAAGCGGAGGGCCCCCTTGGTACAAAGGGGGTGCGTGATGCACGGCCTCTCGCTACGT

                                HisCys
5821  AlaAlaArgValThrAlaIleLeuSerSerLeuThrValThrGlnLeuLeuArgArgLeu
      GCTGCCCGCGTCACTGCCATACTCAGCAGCCTCACTGTAACCCAGCTCCTGAGGCGACTG
      CGACGGGCGCAGTGACGGTATGAGTCGTCGGAGTGACATTGGGTCGAGGACTCCGCTGAC

5881  HisGlnTrpIleSerSerGluCysThrThrProCysSerGlySerTrpLeuArgAspIle
      CACCAGTGGATAAGCTCGGAGTGTACCACTCCATGCTCCGGTTCCTGGCTAAGGGACATC
      GTGGTCACCTATTCGAGCCTCACATGGTGAGGTACGAGGCCAAGGACCGATTCCCTGTAG

5941  TrpAspTrpIleCysGluValLeuSerAspPheLysThrTrpLeuLysAlaLysLeuMet
      TGGGACTGGATATGCGAGGTGTTGAGCGACTTTAAGACCTGGCTAAAAGCTAAGCTCATG
      ACCCTGACCTATACGCTCCACAACTCGCTGAAATTCTGGACCGATTTTCGATTCGAGTAC

6001  ProGlnLeuProGlyIleProPheValSerCysGlnArgGlyTyrLysGlyValTrpArg
      CCACAGCTGCCTGGGATCCCCTTTGTGTCCTGCCAGCGCGGGTATAAGGGGGTCTGGCGA
      GGTGTCGACGGACCCTAGGGGAAACACAGGACGGTCGCGCCCATATTCCCCCAGACCGCT

      Gly
      ValAspGlyIleMetHisThrArgCysHisCysGlyAlaGluIleThrGlyHisValLys
6061  GTGGACGGCATCATGCACACTCGCTGCCACTGTGGAGCTGAGATCACTGGACATGTCAAA
      CACCTGCCGTAGTACGTGTGAGCGACGGTGACACCTCGACTCTAGTGACCTGTACAGTTT

6121  AsnGlyThrMetArgIleValGlyProArgThrCysArgAsnMetTrpSerGlyThrPhe
      AACGGGACGATGAGGATCGTCGGTCCTAGGACCTGCAGGAACATGTGGAGTGGGACCTTC
      TTGCCCTGCTACTCCTAGCAGCCAGGATCCTGGACGTCCTTGTACACCTCACCCTGGAAG

6181  ProIleAsnAlaTyrThrThrGlyProCysThrProLeuProAlaProAsnTyrThrPhe
      CCCATTAATGCCTACACCACGGGCCCCTGTACCCCCCTTCCTGCGCCGAACTACACGTTC
      GGGTAATTACGGATGTGGTGCCCGGGGACATGGGGGGAAGGACGCGGCTTGATGTGCAAG

6241  AlaLeuTrpArgValSerAlaGluGluTyrValGluIleArgGlnValGlyAspPheHis
      GCGCTATGGAGGGTGTCTGCAGAGGAATATGTGGAGATAAGGCAGGTGGGGGACTTCCAC
      CGCGATACCTCCCACAGACGTCTCCTTATACACCTCTATTCCGTCCACCCCCTGAAGGTG

6301  TyrValThrGlyMetThrThrAspAsnLeuLysCysProCysGlnValProSerProGlu
      TACGTGACGGGTATGACTACTGACAATCTCAAATGCCCGTGCCAGGTCCCATCGCCCGAA
      ATGCACTGCCCATACTGATGACTGTTAGAGTTTACGGGCACGGTCCAGGGTAGCGGGCTT

6361  PhePheThrGluLeuAspGlyValArgLeuHisArgPheAlaProProCysLysProLeu
      TTTTTCACAGAATTGGACGGGGTGCGCCTACATAGGTTTGCGCCCCCCTGCAAGCCCTTG
      AAAAAGTGTCTTAACCTGCCCCACGCGGATGTATCCAAACGCGGGGGGACGTTCGGGAAC

      LeuArgGluGluValSerPheArgValGlyLeuHisGluTyrProValGlySerGlnLeu
6421  CTGCGGGAGGAGGTATCATTCAGAGTAGGACTCCACGAATACCCGGTAGGGTCGCAATTA
      GACGCCCTCCTCCATAGTAAGTCTCATCCTGAGGTGCTTATGGGCCATCCCAGCGTTAAT
```

FIG. 17-8

```
                ProCysGluProGluProAspValAlaValLeuThrSerMetLeuThrAspProSerHis
6481            CCTTGCGAGCCCGAACCGGACGTGGCCGTGTTGACGTCCATGCTCACTGATCCCTCCCAT
                GGAACGCTCGGGCTTGGCCTGCACCGGCACAACTGCAGGTACGAGTGACTAGGGAGGGTA

                IleThrAlaGluAlaAlaGlyArgArgLeuAlaArgGlySerProProSerValAlaSer
6541            ATAACAGCAGAGGCGGCCGGGCGAAGGTTGGCGAGGGGATCACCCCCCTCTGTGGCCAGC
                TATTGTCGTCTCCGCCGGCCCGCTTCCAACCGCTCCCCTAGTGGGGGGAGACACCGGTCG

                SerSerAlaSerGlnLeuSerAlaProSerLeuLysAlaThrCysThrAlaAsnHisAsp
6601            TCCTCGGCTAGCCAGCTATCCGCTCCATCTCTCAAGGCAACTTGCACCGCTAACCATGAC
                AGGAGCCGATCGGTCGATAGGCGAGGTAGAGAGTTCCGTTGAACGTGGCGATTGGTACTG

                SerProAspAlaGluLeuIleGluAlaAsnLeuLeuTrpArgGlnGluMetGlyGlyAsn
6661            TCCCCTGATGCTGAGCTCATAGAGGCCAACCTCCTATGGAGGCAGGAGATGGGCGGCAAC
                AGGGGACTACGACTCGAGTATCTCCGGTTGGAGGATACCTCCGTCCTCTACCCGCCGTTG

                IleThrArgValGluSerGluAsnLysValValIleLeuAspSerPheAspProLeuVal
6721            ATCACCAGGGTTGAGTCAGAAAACAAAGTGGTGATTCTGGACTCCTTCGATCCGCTTGTG
                TAGTGGTCCCAACTCAGTCTTTTGTTTCACCACTAAGACCTGAGGAAGCTAGGCGAACAC

                AlaGluGluAspGluArgGluIleSerValProAlaGluIleLeuArgLysSerArgArg
6781            GCGGAGGAGGACGAGCGGGAGATCTCCGTACCCGCAGAAATCCTGCGGAAGTCTCGGAGA
                CGCCTCCTCCTGCTCGCCCTCTAGAGGCATGGGCGTCTTTAGGACGCCTTCAGAGCCTCT

                PheAlaGlnAlaLeuProValTrpAlaArgProAspTyrAsnProProLeuValGluThr
6841            TTCGCCCAGGCCCTGCCCGTTTGGGCGCGGCCGGACTATAACCCCCCGCTAGTGGAGACG
                AAGCGGGTCCGGGACGGGCAAACCCGCGCCGGCCTGATATTGGGGGGCGATCACCTCTGC

                TrpLysLysProAspTyrGluProProValValHisGlyCysProLeuProProProLys
6901            TGGAAAAAGCCCGACTACGAACCACCTGTGGTCCATGGCTGTCCGCTTCCACCTCCAAAG
                ACCTTTTTCGGGCTGATGCTTGGTGGACACCAGGTACCGACAGGCGAAGGTGGAGGTTTC

                SerProProValProProProArgLysLysArgThrValValLeuThrGluSerThrLeu
6961            TCCCCTCCTGTGCCTCCGCCTCGGAAGAAGCGGACGGTGGTCCTCACTGAATCAACCCTA
                AGGGGAGGACACGGAGGCGGAGCCTTCTTCGCCTGCCACCAGGAGTGACTTAGTTGGGAT

                                        Ser
                SerThrAlaLeuAlaGluLeuAlaThrArgSerPheGlySerSerSerThrSerGlyIle
7021            TCTACTGCCTTGGCCGAGCTCGCCACCAGAAGCTTTGGCAGCTCCTCAACTTCCGGCATT
                AGATGACGGAACCGGCTCGAGCGGTGGTCTTCGAAACCGTCGAGGAGTTGAAGGCCGTAA

                ThrGlyAspAsnThrThrThrSerSerGluProAlaProSerGlyCysProProAspSer
7081            ACGGGCGACAATACGACAACATCCTCTGAGCCCGCCCCTTCTGGCTGCCCCCCCGACTCC
                TGCCCGCTGTTATGCTGTTGTAGGAGACTCGGGCGGGGAAGACCGACGGGGGGGCTGAGG

                        PheAla
                AspAlaGluSerTyrSerSerMetProProLeuGluGlyGluProGlyAspProAspLeu
7141            GACGCTGAGTCCTATTCCTCCATGCCCCCCCTGGAGGGGGAGCCTGGGGATCCGGATCTT
                CTGCGACTCAGGATAAGGAGGTACGGGGGGGACCTCCCCCTCGGACCCCTAGGCCTAGAA

                SerAspGlySerTrpSerThrValSerSerGluAlaAsnAlaGluAspValValCysCys
7201            AGCGACGGGTCATGGTCAACGGTCAGTAGTGAGGCCAACGCGGAGGATGTCGTGTGCTGC
                TCGCTGCCCAGTACCAGTTGCCAGTCATCACTCCGGTTGCGCCTCCTACAGCACACGACG

                SerMetSerTyrSerTrpThrGlyAlaLeuValThrProCysAlaAlaGluGluGlnLys
7261            TCAATGTCTTACTCTTGGACAGGCGCACTCGTCACCCCGTGCGCCGCGGAAGAACAGAAA
                AGTTACAGAATGAGAACCTGTCCGCGTGAGCAGTGGGGCACGCGGCGCCTTCTTGTCTTT

                LeuProIleAsnAlaLeuSerAsnSerLeuLeuArgHisHisAsnLeuValTyrSerThr
7321            CTGCCCATCAATGCACTAAGCAACTCGTTGCTACGTCACCACAATTTGGTGTATTCCACC
                GACGGGTAGTTACGTGATTCGTTGAGCAACGATGCAGTGGTGTTAAACCACATAAGGTGG

                ThrSerArgSerAlaCysGlnArgGlnLysLysValThrPheAspArgLeuGlnValLeu
7381            ACCTCACGCAGTGCTTGCCAAAGGCAGAAGAAAGTCACATTTGACAGACTGCAAGTTCTG
                TGGAGTGCGTCACGAACGGTTTCCGTCTTCTTTCAGTGTAAACTGTCTGACGTTCAAGAC
```

FIG. 17-9

```
                AspSerHisTyrGlnAspValLeuLysGluValLysAlaAlaAlaSerLysValLysAla
7441            GACAGCCATTACCAGGACGTACTCAAGGAGGTTAAAGCAGCGGCGTCAAAAGTGAAGGCT
                CTGTCGGTAATGGTCCTGCATGAGTTCCTCCAATTTCGTCGCCGCAGTTTTCACTTCCGA

                   Phe
                AsnLeuLeuSerValGluGluAlaCysSerLeuThrProProHisSerAlaLysSerLys
7501            AACTTGCTATCCGTAGAGGAAGCTTGCAGCCTGACGCCCCCACACTCAGCCAAATCCAAG
                TTGAACGATAGGCATCTCCTTCGAACGTCGGACTGCGGGGGTGTGAGTCGGTTTAGGTTC

                PheGlyTyrGlyAlaLysAspValArgCysHisAlaArgLysAlaValThrHisIleAsn
7561            TTTGGTTATGGGGCAAAAGACGTCCGTTGCCATGCCAGAAAGGCCGTAACCCACATCAAC
                AAACCAATACCCCGTTTTCTGCAGGCAACGGTACGGTCTTTCCGGCATTGGGTGTAGTTG

                SerValTrpLysAspLeuLeuGluAspAsnValThrProIleAspThrThrIleMetAla
7621            TCCGTGTGGAAAGACCTTCTGGAAGACAATGTAACACCAATAGACACTACCATCATGGCT
                AGGCACACCTTTCTGGAAGACCTTCTGTTACATTGTGGTTATCTGTGATGGTAGTACCGA

                LysAsnGluValPheCysValGlnProGluLysGlyGlyArgLysProAlaArgLeuIle
7681            AAGAACGAGGTTTTCTGCGTTCAGCCTGAGAAGGGGGGTCGTAAGCCAGCTCGTCTCATC
                TTCTTGCTCCAAAAGACGCAAGTCGGACTCTTCCCCCCAGCATTCGGTCGAGCAGAGTAG

                ValPheProAspLeuGlyValArgValCysGluLysMetAlaLeuTyrAspValValThr
7741            GTGTTCCCCGATCTGGGCGTGCGCGTGTGCGAAAAGATGGCTTTGTACGACGTGGTTACA
                CACAAGGGGCTAGACCCGCACGCGCACACGCTTTTCTACCGAAACATGCTGCACCAATGT

                LysLeuProLeuAlaValMetGlySerSerTyrGlyPheGlnTyrSerProGlyGlnArg
7801            AAGCTCCCCTTGGCCGTGATGGGAAGCTCCTACGGATTCCAATACTCACCAGGACAGCGG
                TTCGAGGGGAACCGGCACTACCCTTCGAGGATGCCTAAGGTTATGAGTGGTCCTGTCGCC

                ValGluPheLeuValGlnAlaTrpLysSerLysLysThrProMetGlyPheSerTyrAsp
7861            GTTGAATTCCTCGTGCAAGCGTGGAAGTCCAAGAAAACCCCAATGGGGTTCTCGTATGAT
                CAACTTAAGGAGCACGTTCGCACCTTCAGGTTCTTTTGGGGTTACCCCAAGAGCATACTA

                ThrArgCysPheAspSerThrValThrGluSerAspIleArgThrGluGluAlaIleTyr
7921            ACCCGCTGCTTTGACTCCACAGTCACTGAGAGCGACATCCGTACGGAGGAGGCAATCTAC
                TGGGCGACGAAACTGAGGTGTCAGTGACTCTCGCTGTAGGCATGCCTCCTCCGTTAGATG

                GlnCysCysAspLeuAspProGlnAlaArgValAlaIleLysSerLeuThrGluArgLeu
7981            CAATGTTGTGACCTCGACCCCCAAGCCCGCGTGGCCATCAAGTCCCTCACCGAGAGGCTT
                GTTACAACACTGGAGCTGGGGGTTCGGGCGCACCGGTAGTTCAGGGAGTGGCTCTCCGAA

                                        Gly
                TyrValGlyGlyProLeuThrAsnSerArgGlyGluAsnCysGlyTyrArgArgCysArg
8041            TATGTTGGGGGCCCTCTTACCAATTCAAGGGGGGAGAACTGCGGCTATCGCAGGTGCCGC
                ATACAACCCCCGGGAGAATGGTTAAGTTCCCCCCTCTTGACGCCGATAGCGTCCACGGCG

                AlaSerGlyValLeuThrThrSerCysGlyAsnThrLeuThrCysTyrIleLysAlaArg
8101            GCGAGCGGCGTACTGACAACTAGCTGTGGTAACACCCTCACTTGCTACATCAAGGCCCGG
                CGCTCGCCGCATGACTGTTGATCGACACCATTGTGGGAGTGAACGATGTAGTTCCGGGCC

                AlaAlaCysArgAlaAlaGlyLeuGlnAspCysThrMetLeuValCysGlyAspAspLeu
8161            GCAGCCTGTCGAGCCGCAGGGCTCCAGGACTGCACCATGCTCGTGTGTGGCGACGACTTA
                CGTCGGACAGCTCGGCGTCCCGAGGTCCTGACGTGGTACGAGCACACACCGCTGCTGAAT

                ValValIleCysGluSerAlaGlyValGlnGluAspAlaAlaSerLeuArgAlaPheThr
8221            GTCGTTATCTGTGAAAGCGCGGGGGTCCAGGAGGACGCGGCGAGCCTGAGAGCCTTCACG
                CAGCAATAGACACTTTCGCGCCCCCAGGTCCTCCTGCGCCGCTCGGACTCTCGGAAGTGC

                GluAlaMetThrArgTyrSerAlaProProGlyAspProProGlnProGluTyrAspLeu
8281            GAGGCTATGACCAGGTACTCCGCCCCCCCTGGGGACCCCCCACAACCAGAATACGACTTG
                CTCCGATACTGGTCCATGAGGCGGGGGGGACCCCTGGGGGGTGTTGGTCTTATGCTGAAC

                GluLeuIleThrSerCysSerSerAsnValSerValAlaHisAspGlyAlaGlyLysArg
8341            GAGCTCATAACATCATGCTCCTCCAACGTGTCAGTCGCCCACGACGGCGCTGGAAAGAGG
                CTCGAGTATTGTAGTACGAGGAGGTTGCACAGTCAGCGGGTGCTGCCGCGACCTTTCTCC
```

```
                ValTyrTyrLeuThrArgAspProThrThrProLeuAlaArgAlaAlaTrpGluThrAla
8401            GTCTACTACCTCACCCGTGACCCTACAACCCCCCTCGCGAGAGCTGCGTGGGAGACAGCA
                CAGATGATGGAGTGGGCACTGGGATGTTGGGGGGAGCGCTCTCGACGCACCCTCTGTCGT

                ArgHisThrProValAsnSerTrpLeuGlyAsnIleIleMetPheAlaProThrLeuTrp
8461            AGACACACTCCAGTCAATTCCTGGCTAGGCAACATAATCATGTTTGCCCCCACACTGTGG
                TCTGTGTGAGGTCAGTTAAGGACCGATCCGTTGTATTAGTACAAACGGGGGTGTGACACC

                AlaArgMetIleLeuMetThrHisPhePheSerValLeuIleAlaArgAspGlnLeuGlu
8521            GCGAGGATGATACTGATGACCCATTTCTTTAGCGTCCTTATAGCCAGGGACCAGCTTGAA
                CGCTCCTACTATGACTACTGGGTAAAGAAATCGCAGGAATATCGGTCCCTGGTCGAACTT

                GlnAlaLeuAspCysGluIleTyrGlyAlaCysTyrSerIleGluProLeuAspLeuPro
8581            CAGGCCCTCGATTGCGAGATCTACGGGGCCTGCTACTCCATAGAACCACTTGATCTACCT
                GTCCGGGAGCTAACGCTCTAGATGCCCCGGACGATGAGGTATCTTGGTGAACTAGATGGA

                ProIleIleGlnArgLeuHisGlyLeuSerAlaPheSerLeuHisSerTyrSerProGly
8641            CCAATCATTCAAAGACTCCATGGCCTCAGCGCATTTTCACTCCACAGTTACTCTCCAGGT
                GGTTAGTAAGTTTCTGAGGTACCGGAGTCGCGTAAAAGTGAGGTGTCAATGAGAGGTCCA

                GluIleAsnArgValAlaAlaCysLeuArgLysLeuGlyValProProLeuArgAlaTrp
8701            GAAATTAATAGGGTGGCCGCATGCCTCAGAAAACTTGGGGTACCGCCCTTGCGAGCTTGG
                CTTTAATTATCCCACCGGCGTACGGAGTCTTTTGAACCCCATGGCGGGAACGCTCGAACC

                Gly
                ArgHisArgAlaArgSerValArgAlaArgLeuLeuAlaArgGlyGlyArgAlaAlaIle
8761            AGACACCGGGCCCGGAGCGTCCGCGCTAGGCTTCTGGCCAGAGGAGGCAGGGCTGCCATA
                TCTGTGGCCCGGGCCTCGCAGGCGCGATCCGAAGACCGGTCTCCTCCGTCCCGACGGTAT

                CysGlyLysTyrLeuPheAsnTrpAlaValArgThrLysLeuLys
8821            TGTGGCAAGTACCTCTTCAACTGGGCAGTAAGAACAAAGCTCAAAC
                ACACCGTTCATGGAGAAGTTGACCCGTCATTCTTGTTTCGAGTTTG
```

FIG. 17-10

FIG. 18

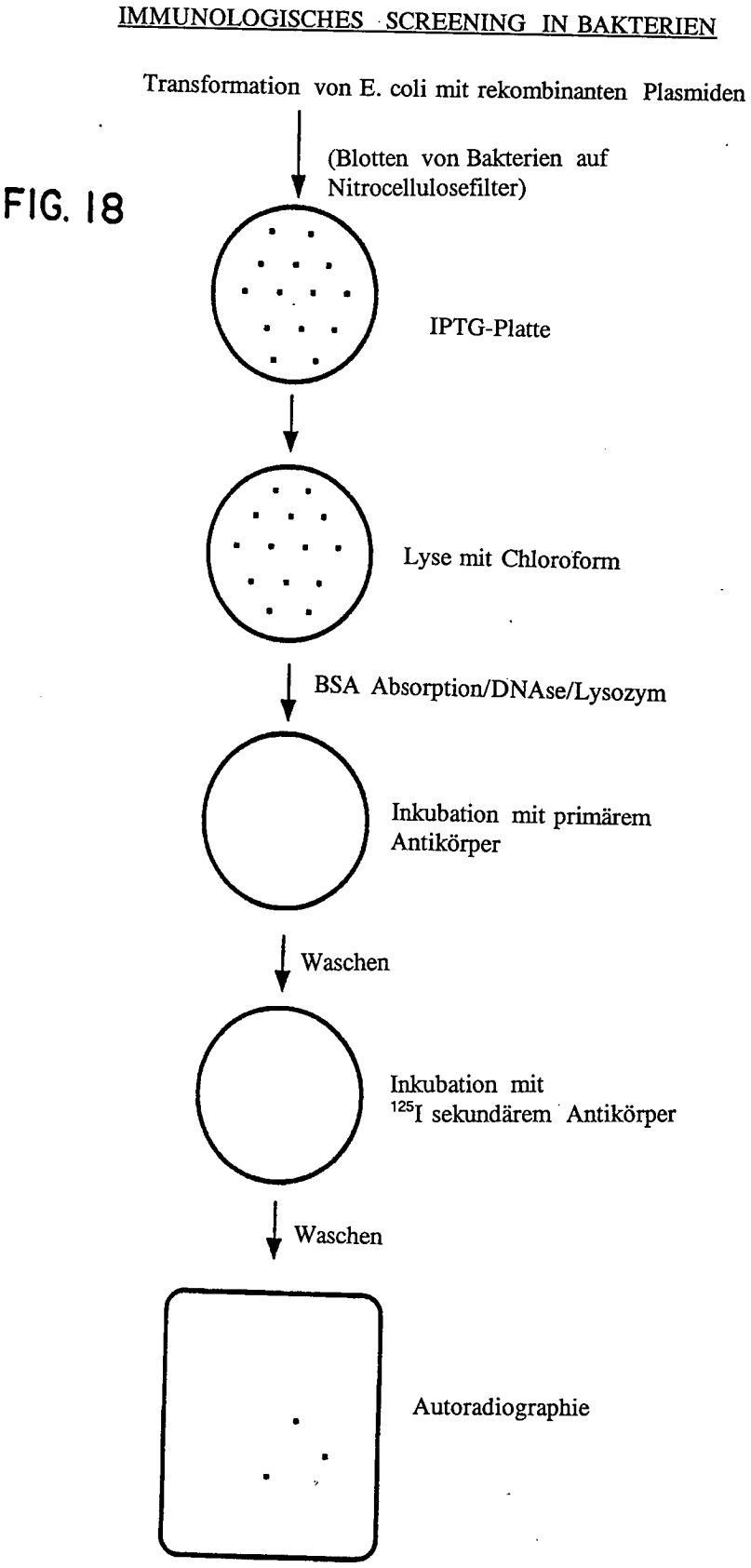

IMMUNOLOGISCHES SCREENING IN BAKTERIEN
Transformation von E. coli mit rekombinanten Plasmiden
(Blotten von Bakterien auf Nitrocellulosefilter)
IPTG-Platte
Lyse mit Chloroform
BSA Absorption/DNAse/Lysozym
Inkubation mit primärem Antikörper
Waschen
Inkubation mit 125I sekundärem Antikörper
Waschen
Autoradiographie

FIG. 19-1

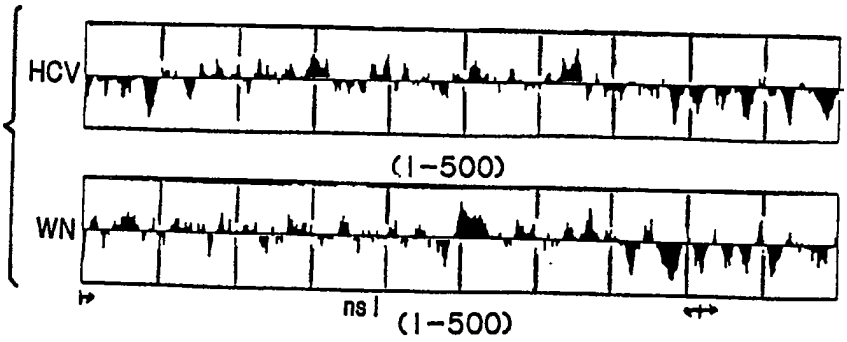


FIG. 19-2

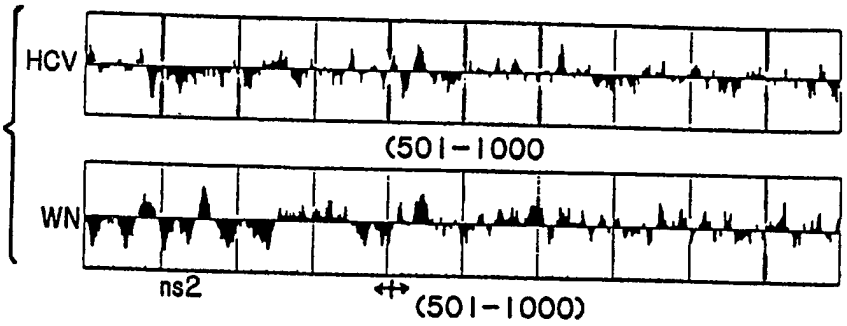


FIG. 19-3

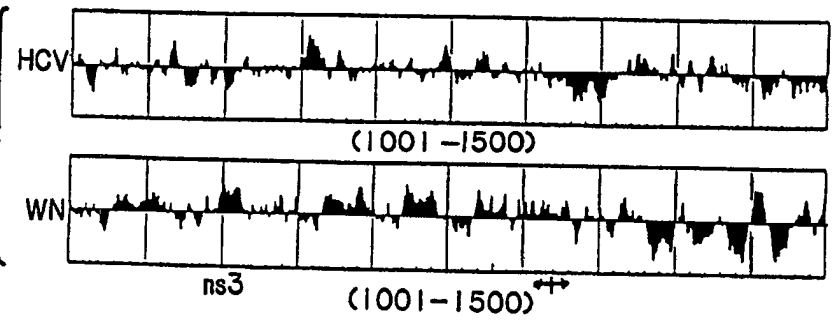


FIG. 19-4

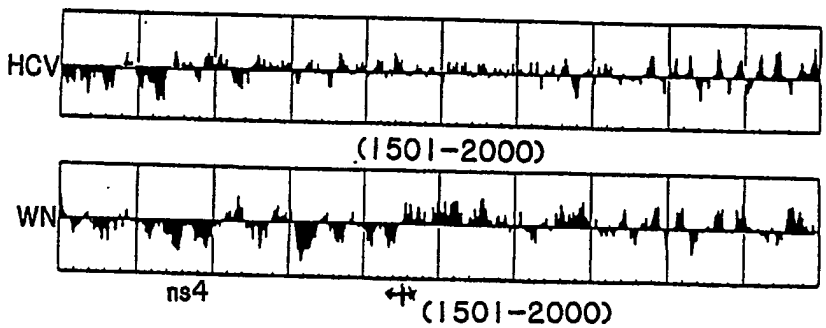
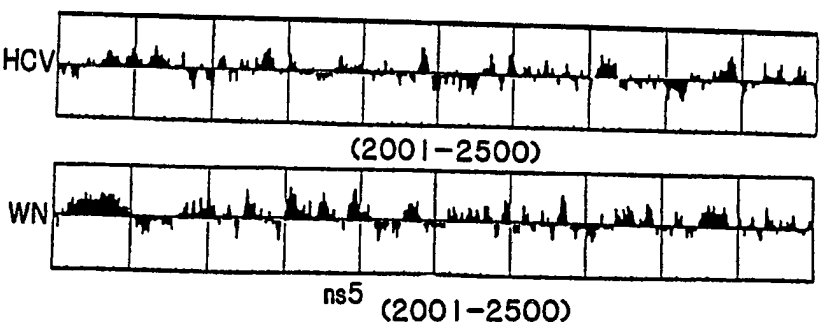


FIG. 19-5



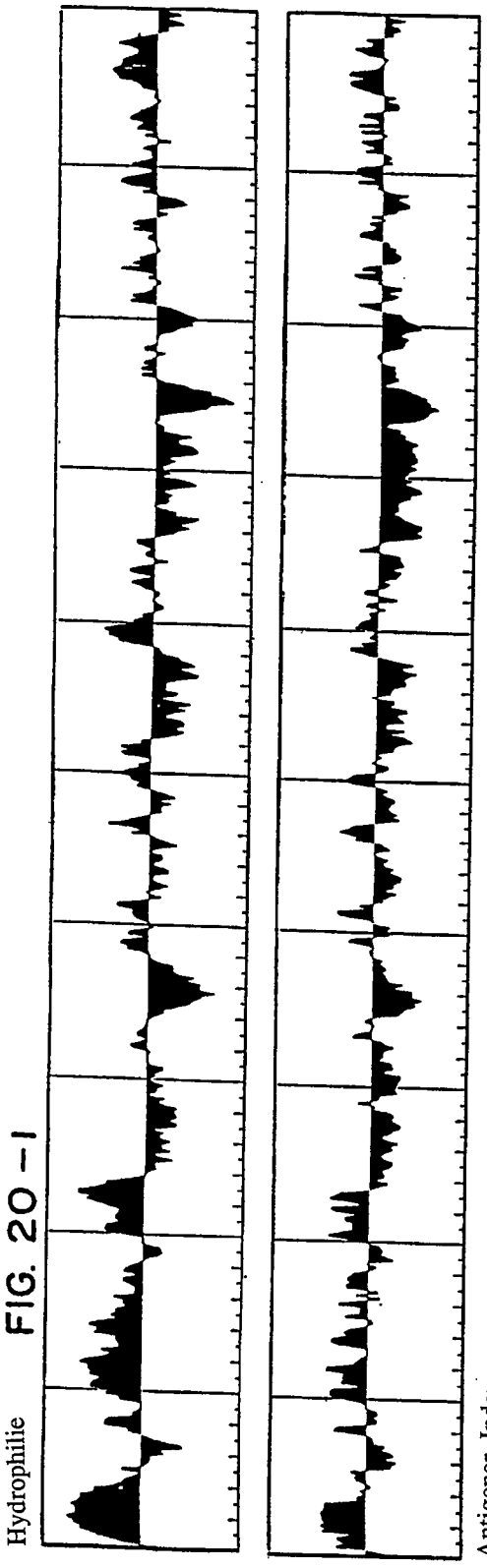


FIG. 20-1

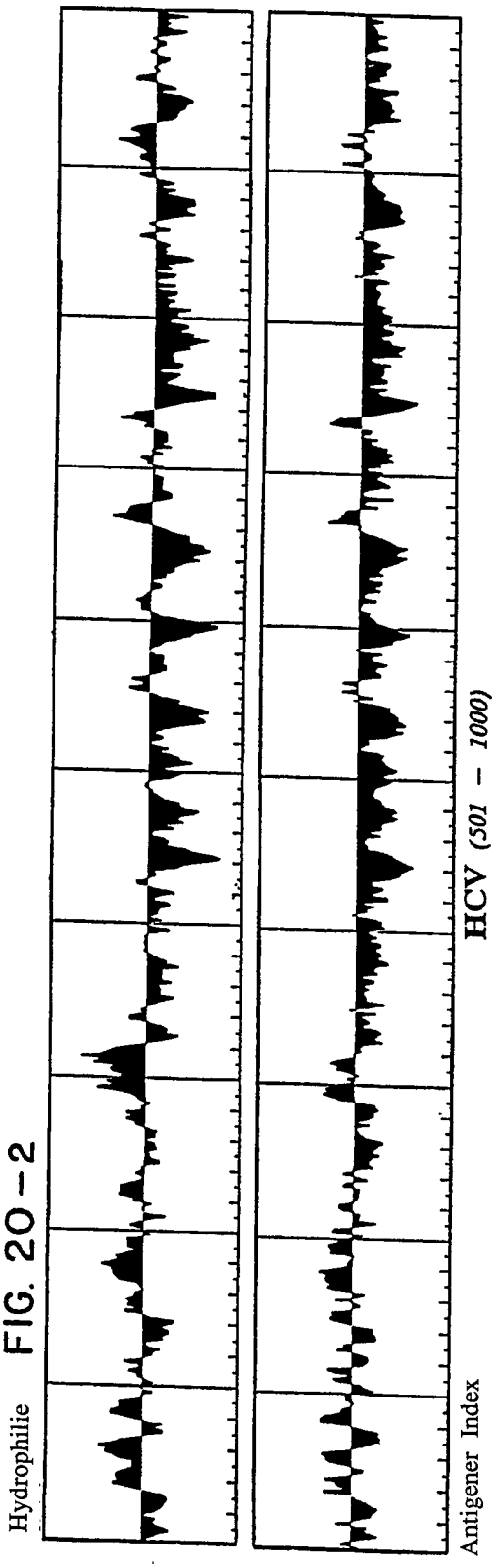


FIG. 20-2

FIG. 20-3

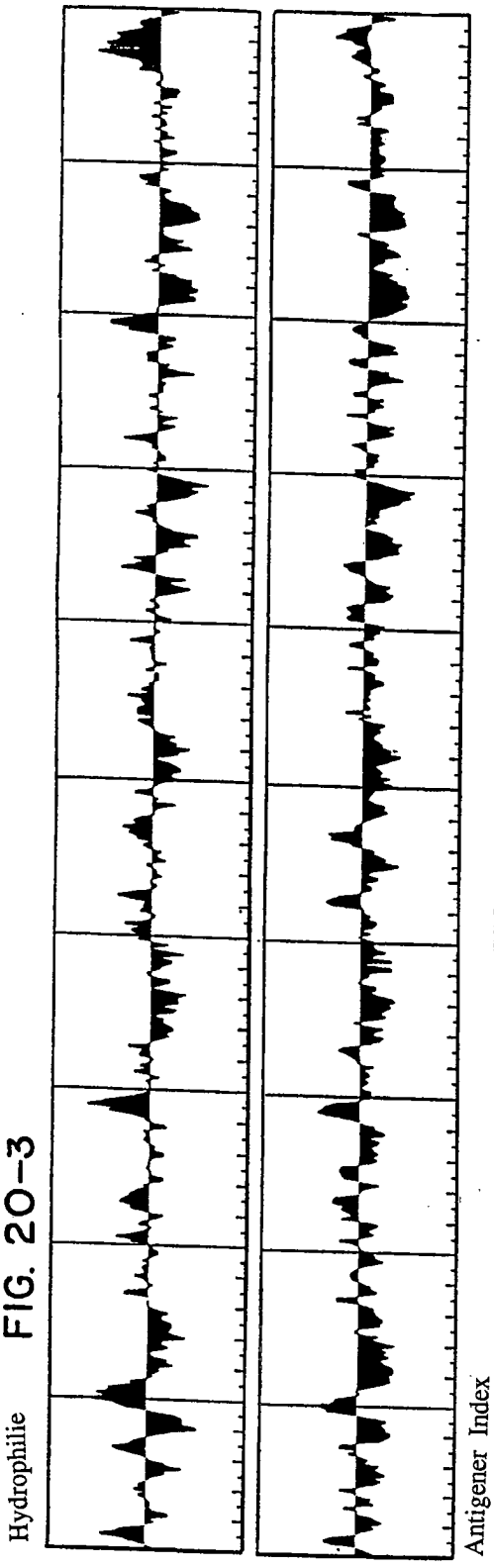
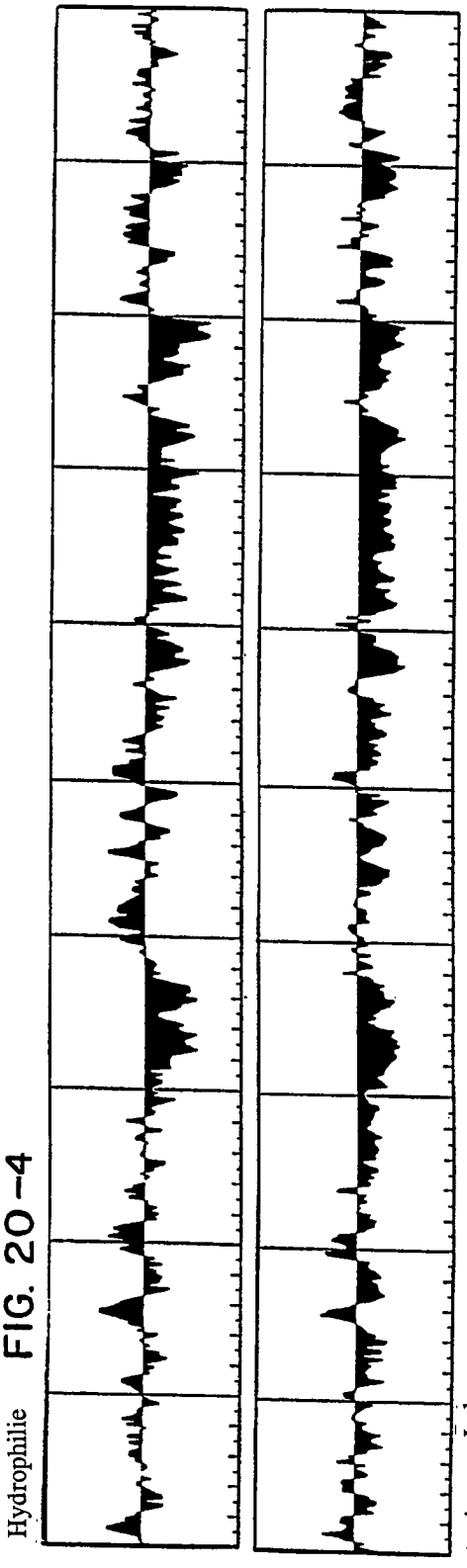


FIG. 20-4



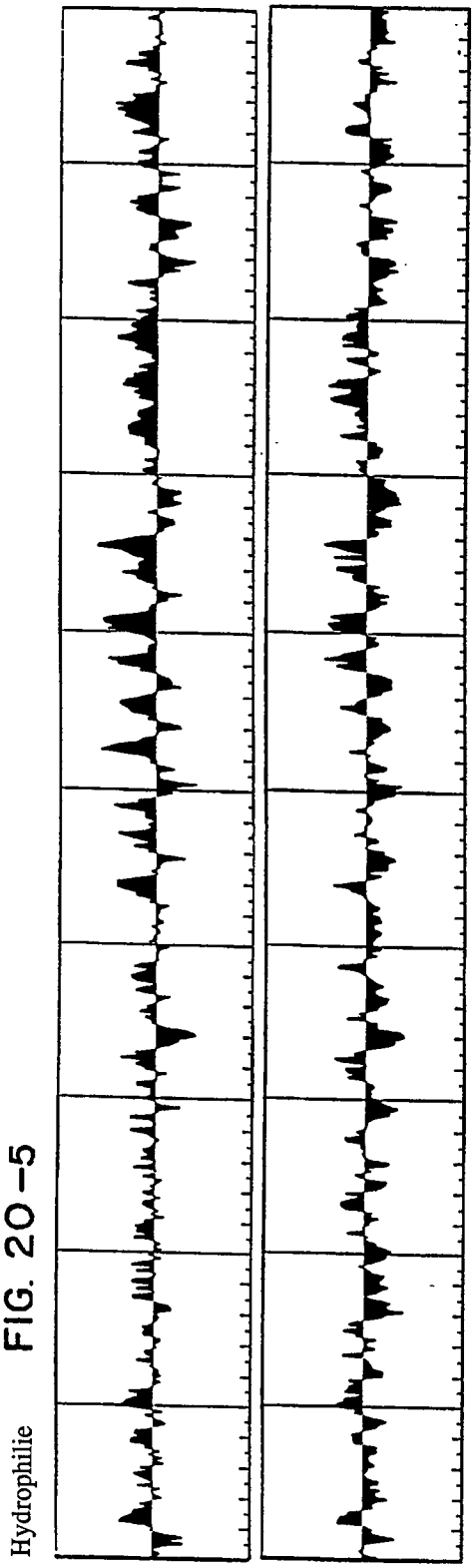


FIG. 20–5

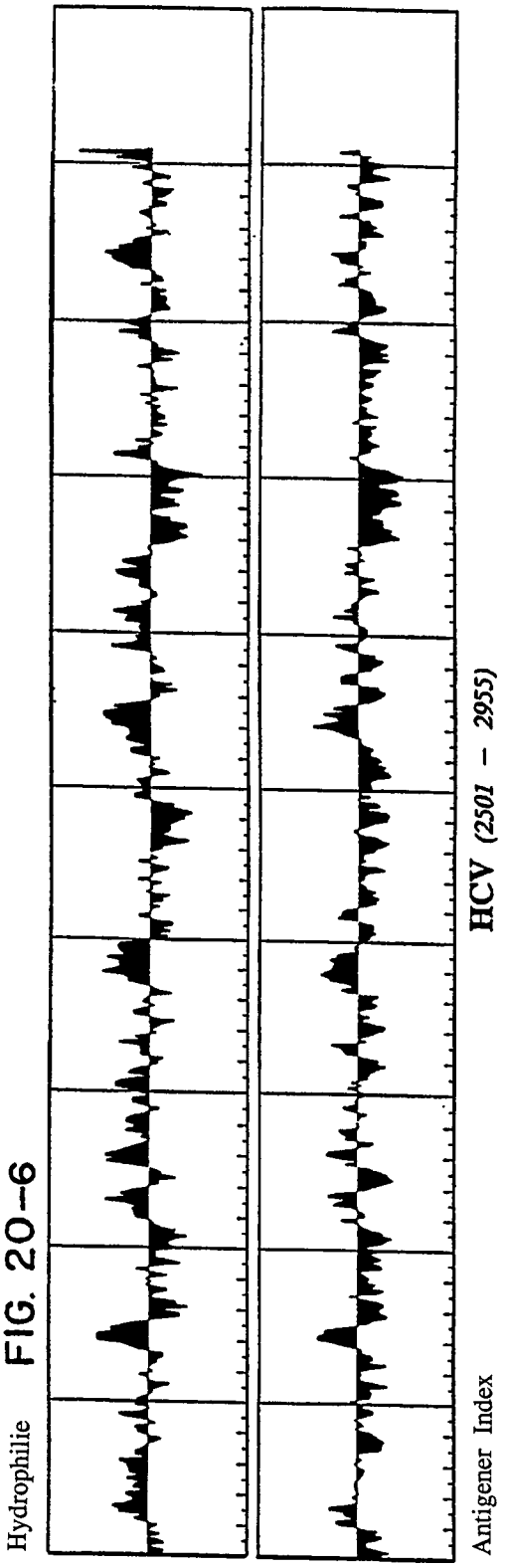


FIG. 20–6

Einige konservierte co-lineare Peptide in HCV und Flaviviren

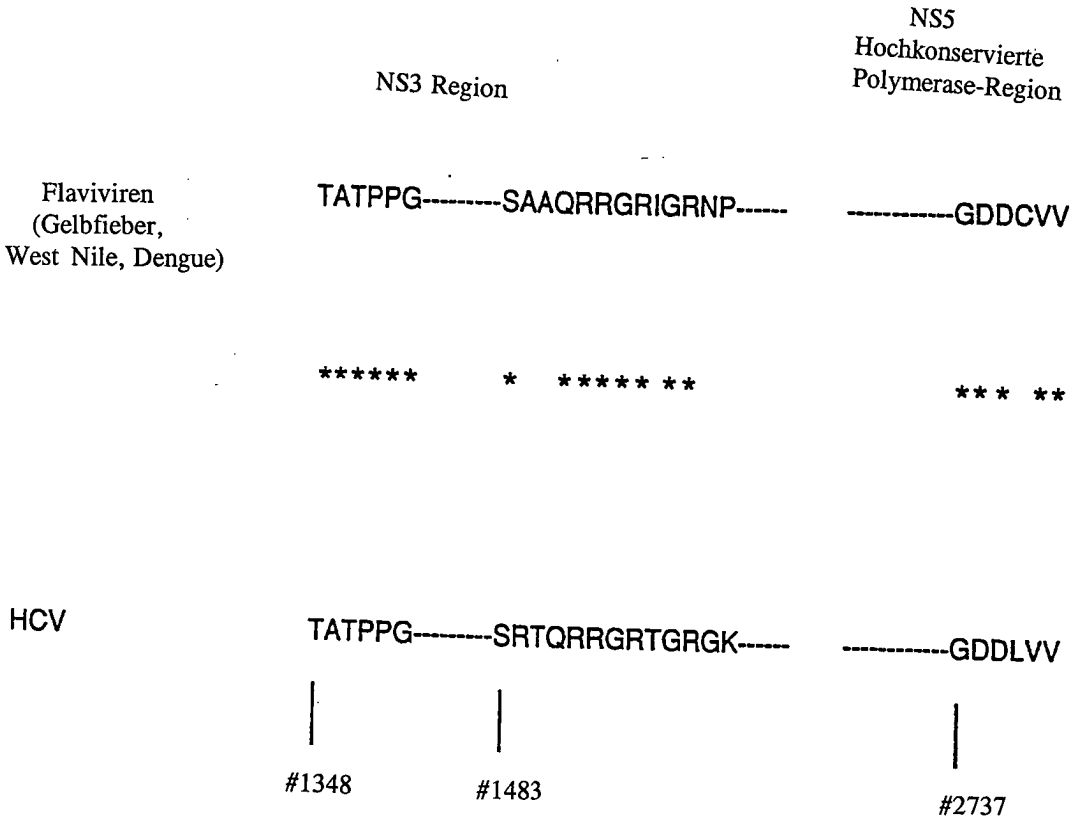


FIG. 21