



(12) Ausschließungspatent

(11) DD 298 527 A5

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1
Patentgesetz der DDR
vom 27.10.1983
in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) C 12 N 15/51
C 12 P 21/00
C 07 K 15/00
A 61 K 39/29

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) DD C 12 N / 344 404 3
(31) 122714
161072
263584
139886
191263
271450

(22) 18.11.88
(32) 18.11.87
26.02.98
26.10.88
30.12.87
06.05.88
14.11.88

(44) 27.02.92
(33) US

(71) siehe (73)
(72) Houghton, Michael; Choo, Qui-Lim; Kuo, George, . US
(73) Chiron Corporation, 4560 Horton Street, Emeryville, California 94608-2916, US
(74) Glawe, Delfs, Moll u. Partner, Patentanwälte, Rothenbaumchaussee 58, PF 25 70, W - 2000 Hamburg 13, DE

(54) Verfahren zur Herstellung HCV-Epitope enthaltender Polypeptide und HCV-freier Blutzubereitungen

(55) Hepatitis-C-Virus; Nicht-A-Nicht-B-Hepatitis; cDNA-Sequenzen; Flaviviren; flaviartige Viren; Polynucleotide; Polynucleotidsonden; Polypeptide; HCV-Epitope; Antikörper; HCV-Antigene; Inkubation einer transformierten Wirtszelle; Expression eines HCV-Polypeptids; Herstellung HCV-freier Blutzubereitungen

(57) Es wird eine Familie von cDNA-Sequenzen, die von Hepatitis-C-Virus (HCV) abgeleitet wird, zur Verfügung gestellt. Diese Sequenzen codieren für Antigene, die immunologisch mit Antikörpern reagieren, die in Individuen mit Nicht-A-Nicht-B-Hepatitis (NANBH) vorhanden sind, die aber im allgemeinen nicht in Individuen vorkommen, die mit dem Hepatitis-A-Virus (HAV) oder Hepatitis-B-Virus (HBV) infiziert sind und die auch in Kontrollindividuen fehlen. Ein Vergleich dieser cDNA-Sequenzen mit den Sequenzen auf der Genbank und mit den Sequenzen des Hepatitis-Delta-Virus (HDV) und des HBV zeigt ein Fehlen an substantieller Homologie. Ein Vergleich der Sequenz von Aminosäuren, die in der cDNA codiert sind mit den Sequenzen von Flaviviren zeigt, daß das HCV ein Flavivirus oder ein flaviartiges Virus ist. Die HCV-cDNA-Sequenzen sind beim Entwurf von Polynucleotidsonden und für die Synthese von Polypeptiden, die in Immunoassays angewandt werden können, nützlich. Sowohl die Polynucleotidsonden als auch die Polynucleotide können für die Diagnose von HCV-induzierter NANBH und zum Screenen von Blutbankproben und Spendern nach HCV-Infektion nützlich sein. Außerdem können diese cDNA-Sequenzen für die Synthese von immunogenen Polypeptiden, die in Vakzinen für die Behandlung, Prophylaxe und/oder Therapie bei einer HCV-Infektion verwendet werden können, nützlich sein. Die in den cDNA-Sequenzen codierten Polypeptide können auch zur Entwicklung von Antikörpern gegen HCV-Antigene und für die Reinigung der gegen die HCV-Antigene gerichteten Antikörper verwendet werden. Diese Antikörper können in Immunoassays zum Nachweis von HCV-Antigenen, die im Zusammenhang mit NANBH in Individuen sowie in Blutspendebanken stehen, nützlich sein. Darüber hinaus können diese Antikörper für die Behandlung von NANBH in Individuen angewandt werden. Die erfindungsgemäß zur Verfügung gestellten Reagenzien ermöglichen auch die Isolierung von NANBH-Erreger(n) und die Reproduktion dieser(s) Erreger(s) in Gewebekultursystemen. Weiterhin stellen sie Reagenzien zur Verfügung, die beim Screenen nach antiviralen Erregern von HCV, insbesondere in Gewebekultur- oder Tiermodellsystemen nützlich sind.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung eines ein HCV-Epitop enthaltenden Polypeptids mit den Schritten:
 - a) Auswahl einer Wirtszelle, die mit einem rekombinanten Expressionssystem transformiert ist, das einen offenen Leserahmen (ORF) eines von HCV cDNA abgeleiteten Polynukleotids umfaßt, wobei der ORF operativ mit einer mit der Wirtszelle verträglichen Kontrollsequenz verbunden ist, und
 - b) Inkubation der transformierten Wirtszelle unter Bedingungen, die die Expression des HCV-Polypeptids erlauben.
2. Verfahren zur Herstellung HCV-freier Blutzubereitungen mit den Schritten:
 - a) Auswahl einer Blutprobe, bei der der Verdacht besteht, daß sie anti-HCV-Antikörper enthält;
 - b) Auswahl eines ein HCV-Epitop enthaltenden Polypeptids, hergestellt gemäß Anspruch 1;
 - c) Inkubierung der Probe gemäß a) mit dem immunogenen Polypeptid gemäß b) unter Bedingungen, die die Bildung von Antikörper-Polypeptid-Komplexen erlauben;
 - d) Bestimmung der in Stufe c) gebildeten Komplexe und
 - e) Sammeln des Blutes, in dem keine Komplexe gemäß d) festgestellt wurden.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Polypeptid ein HCV-Epitop umfaßt, das in der HCV-cDNA-Sequenz gemäß Fig. 47 codiert ist.
4. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Polypeptid ein HCV-Epitop umfaßt, das in einer HCV-cDNA-Sequenz in ATCC-Nr. 40388, ATCC-Nr. 40389, ATCC-Nr. 40390, ATCC-Nr. 40391, ATCC-Nr. 40394, ATCC-Nr. 40511, ATCC-Nr. 40512, ATCC-Nr. 40513 oder ATCC-Nr. 40514 codiert ist.
5. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Polypeptid ein Epitop von C100-3 umfaßt.
6. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Polypeptid C100-3 umfaßt.

Hierzu 63 Zeichnungen

Technisches Gebiet

Die Erfindung betrifft Materialien und Methodologien zur Beherrschung der Verbreitung der Infektion durch das Nicht-A-Nicht-B-Hepatitisvirus (NANBV). Genauer gesagt, betrifft sie diagnostische DNA-Fragmente, diagnostische Proteine, diagnostische Antikörper und Schutzantigene und Antikörper für einen Krankheitserreger von NANB-Hepatitis, d. h. das Hepatitis-C-Virus.

In der Anmeldung zitierte Literatur

- Barr und Mitarbeiter (1986), *Biotechniques* 4:428.
 Botstein (1979), *Gene* 8:17.
 Brinton, M.A. (1986) in: *The Viruses: The Togaviridae and Flaviviridae*, (Serien herausgegeben von Fraenkel-Conrat und Wagner, Band herausgegeben von Schlesinger und Schlesinger, Plenum Press), S.327-374.
 Broach (1981) in: *Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces* (Molekularbiologie der Saccharomyces), Band 1, S.445, Cold Spring Harbor Press.
 Broach und Autorenkollektiv (1983), *Meth. Enz.* 101:307.
 Chang und Autorenkollektiv (1977), *Nature* 198:1056.
 Chirgwin und Autorenkollektiv (1979), *Biochemistry* 18, 5294.
 Chomczynski und Sacchi (1987), *Analytical Biochemistry* 162:156.
 Clewell und Autorenkollektiv (1969), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 62:1159.
 Clewell (1972), *J. Bacteriol.* 110:667.
 Cohen (1972), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69:2110.
 Cousens und Autorenkollektiv (1987), *Gene* 61:265.
 De Boer und Autorenkollektiv (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 292:128.
 Dreesman und Autorenkollektiv (1985), *J. Infect. Disease* 151:761.
 Feinstone, S.M., und Hoofnagle, J.H. (1984), *New England, J. Med.* 311:185.
 Fields und Knipe (1986), *Fundamental Virology* (Grundlagen der Virologie), (Raven Press, New York).
 Fiers und Autorenkollektiv (1978), *Nature* 273:113.
 Gerety, R.J., und Autorenkollektiv, in *Viral Hepatitis and Liver Disease* (Virus-Hepatitis und Leberkrankheit) (Vyas, B.N., Dienstag, J.L., und Hoofnagle, J.H., herausgegeben von Grune und Stratton, Inc., 1984), S.23-47.
 Goeddel und Autorenkollektiv (1980), *Nucleic Acids Res.* 8:4057.
 Graham and Van der Eb (1978), *Virology* 52:546.
 Grunstein und Hogness (1975), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73:3961.
 Grych u. Autorenkollektiv (1985), *Nature* 316:74.
 Gubler und Hoffman (1983) *Gene*, 25:263.
 Hammerling und Autorenkollektiv (1981), *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* (Monoklonale Antikörper und T-Zellen-Hybridome).

- Hess u. Autorenkollektiv (1968), *J. Adv. Enzyme Reg.* 7:149.
- Hinnen u. Autorenkollektiv (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75:1929.
- Hitzemann u. Autorenkollektiv (1980), *J. Biol. Chem.* 255:2073.
- Holland u. Autorenkollektiv (1978), *Biochemistry* 17:4900.
- Holland (1981), *J. Biol. Chem.* 256:1385.
- Houghton u. Autorenkollektiv (1981), *Nucleic Acids Res.* 9:247.
- Hunyh, T. V., u. Autorenkollektiv (1985) in: *DNA Cloning Techniques; A Practical Approach* (Verfahren zur DNA-Clonierung; Praktisches Herangehen), (herausgegeben von D. Glover, IRL Press, Oxford, Großbritannien), S.49-78.
- Immun. Rev. (1982) 62:185.
- Iwarson (1987), *British Medical J.* 295, 946.
- Kennett u. Autorenkollektiv (1980), *Monoclonal Antibodies. (Monoklonale Antikörper)*
- Laemmli (1970), *Nature* 227, C90.
- Lee u. Autorenkollektiv (1988), *Science* 239:1288.
- Maniatis, T., u. Autorenkollektiv (1982), *Molecular Cloning; A Laboratory manual* (Molekularclonierung, ein Laborhandbuch) (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York).
- Mayer und Walker, Herausgeber (1987), *Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology* (Immunochemische Methoden in der Zell- und Molekularbiologie), (Academic Press, London).
- Maxam u. Autorenkollektiv (1980), *Methods in Enzymology* 65:499.
- MacNamara u. Autorenkollektiv (1984), *Science* 226:1325.
- Messing u. Autorenkollektiv (1981), *Nucleic Acids Res.* 9:309.
- Messing (1983), *Methods in Enzymology* 101:20-37.
- Methods in Enzymology* (Academic Press).
- Michelle u. Autorenkollektiv, Internationales Symposium über Virushepatitis.
- Monath (1986) in: *The Viruses: The Togaviridae and Flaviviridae* (Serie herausgegeben von Fraenkel-Conrat und Wagner, Band herausgegeben von Schlesinger u. Schlesinger, Plenum Press), S. 375-440.
- Nagahuma u. Autorenkollektiv (1984), *Anal. Biochem.* 141:74.
- Neurath u. Autorenkollektiv (1984), *Science* 224:392.
- Nisonoff u. Autorenkollektiv (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 Shepits (1974), in: *Comprehensive Virology* (Allgemeine Virologie), Bd. 2 (herausgegeben von Fraenkel-Conrat u. Wagner, Plenum Press, New York) S. 171-230.
- Prince, A. M. (1983), *Annu. Rev. Microbiol.* 37:217.
- Rice u. Autorenkollektiv (1986) in: *The Viruses: Togaviridae and Flaviviridae* (Serie herausgegeben von Fraenkel-Conrat und Wagner, Band herausgegeben von Schlesinger und Schlesinger, Plenum Press), S. 213-328.
- Roehrig (1986) in: *The Viruses: The Togaviridae and Flaviviridae* (Serie herausgegeben von Fraenkel-Conrat und Wagner, Band herausgegeben von Schlesinger u. Schlesinger, Plenum Press).
- Sadler u. Autorenkollektiv (1980), *Gene* 8, 279.
- Saiki u. Autorenkollektiv (1986), *Nature* 324:163.
- Sanger u. Autorenkollektiv (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463.
- Schlesinger u. Autorenkollektiv (1986), *J. Virol.* 60:1153.
- Schreier, M., u. Autorenkollektiv (1980), *Hybridoma Techniques. (Hybridom-Techniken)*
- Scopes (1984), *Protein Purification, Principles and Practice, Second Edition* (Protein, Reinigung, Prinzipien und Praxis, 2. Ausgabe) (Springer-Verlag, New York).
- Shimatake u. Autorenkollektiv (1981), *Nature* 292:128.
- Steimer u. Autorenkollektiv (1986), *J. Virol.* 58:9.
- Stoller (1980) in: *Die Togaviren* (Herausgeber: R. W. Schlesinger, Academic Press, New York) S.584-622.
- Taylor u. Autorenkollektiv (1976), *Biochem. Biophys. Acta* 442:324.
- Towbin u. Autorenkollektiv (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4350.
- Tsu und Herzenberg (1980), in: *Selected Methods in Cellular Immunology* (Ausgewählte Methoden in der Zellimmunologie) (W. H. Freeman u. Co.) S.373-391.
- Vytdehaag u. Autorenkollektiv (1985), *J. Immunol.* 134:1225.
- Valenzuela, P., u. Autorenkollektiv (1982), *Nature* 298:344.
- Valenzuela, P., u. Autorenkollektiv (1984), in: *Hepatitis B* (Millman, I., u. Autorenkollektiv, Herausgeber: Plenum Press) S. 225-236.
- Warner (1984), *DNA* 3:401.
- Wu und Grossman (1987), *Methods in Enzymology*, Bd. 154, *Recombinant DNA*, Teil E.
- Wu (1987), *Methods in Enzymology*, Bd. 155, *Recombinant DNA*, Teil F. Zoller (1982), *Nucleic Acids Res.* 10:6487.

Zitierte Patent-Nr.

- US-Patent Nr. 4,341,761
- US-Patent Nr. 4,399,121
- US-Patent Nr. 4,427,783
- US-Patent Nr. 4,444,887
- US-Patent Nr. 4,466,917
- US-Patent Nr. 4,472,500
- US-Patent Nr. 4,491,632
- US-Patent Nr. 4,493,890

Vorgeschichte der Erfindung

Nicht-A-Nicht-B-Hepatitis (NANBH) ist eine übertragbare Krankheit oder Familie von Krankheiten, von der angenommen wird, daß sie durch ein Virus induziert wird, und die sich von anderen Formen Virus-begleiteter Leberkrankheiten, einschließlich derjenigen, die durch die bekannten Hepatitisviren, d.h. Hepatitis-A-Virus (HAV), Hepatitis-B-Virus (HBV) und Delta-Hepatitis-Virus (HDV) verursacht werden, wie auch von der durch das Zytomegalie-Virus (CMV) oder das Epstein-Barr-Virus (EBV) induzierten Hepatitis unterscheidet. NANBH wurde erstmals bei Menschen mit Bluttransfusionen identifiziert. Die Übertragung vom Menschen auf Schimpansen und Serienpassagen in Schimpansen lieferten den Nachweis, daß NANBH auf (einen) übertragbare(n) Infektionserreger zurückzuführen ist. Das für NANBH verantwortliche Übertragungsmittel ist jedoch immer noch nicht identifiziert und die Zahl der diese Krankheit verursachenden Erreger ist unbekannt. Die epidemiologischen Beweise lassen darauf schließen, daß es drei Typen NANBH geben kann: den durch Wasser übertragenen epidemischen Typ, den Blut- oder Nadeltyp und den sporadisch auftretenden (in der Gemeinschaft erworbenen) Typ. Die Anzahl der die NANBH verursachenden Erreger ist jedoch unbekannt.

Die klinische Diagnose und der Nachweis von NANBH erfolgte bis jetzt hauptsächlich durch Ausschluß anderer Virusmarker. Zu den Verfahren, die zum Nachweis mutmaßlicher NANBV-Antigene oder -Antikörper angewandt werden, gehören Agar-Gel-Diffusion, Überwanderungselektrophorese, Immunfluoreszenzmikroskopie, Immunelektronenmikroskopie, Radioimmunoassay und Enzymimmunoassay. Keiner dieser Assays hat sich jedoch als ausreichend empfindlich, spezifisch und reproduzierbar erwiesen, um als Diagnostest für NANBH anwendbar sein zu können.

Bis jetzt gibt es weder Klarheit noch Übereinstimmung in bezug auf die Identität oder die Spezifität der Antigen-Antikörper-Systeme, die mit den Erregern von NANBH in Beziehung stehen. Das ist zumindest teilweise auf eine vorherige oder gleichzeitige HBV-Infektion bei Individuen mit NANBV und auf die bekannte Komplexität der mit HBV assoziierten löslichen und feinverteilten Antigene sowie auch auf die Integration der HBV-DNA in das Genom der Leberzellen zurückzuführen. Weiterhin besteht die Möglichkeit, daß NANBH durch mehr als einen Infektionserreger verursacht wird und es könnte außerdem eine Fehldiagnose von NANBH vorliegen. Es ist außerdem gar nicht klar, was die serologischen Assays im Serum von Patienten mit NANBH entdecken. Es wurde postuliert, daß die Agar-Gel-Diffusion und das Überwanderungselektrophoreseassay Autoimmunreaktionen oder unspezifische Proteinwechselwirkungen, die manchmal zwischen Serumproben vorkommen, nachweisen, und daß sie keine spezifischen NANBV-Antigen-Antikörper-Reaktionen darstellen. Immunfluoreszenz, Enzymimmunoassay und Radioimmunoassay scheinen geringe Anteile eines rheumafaktorartigen Materials, das häufig im Serum von Patienten mit NANBH und auch von Patienten mit anderen Hepatitis- und Nicht-Hepatitisserkrankungen vorkommt, nachzuweisen. Ein Teil der festgestellten Reaktivität kann ein Antikörper zu wirtsdeterminierten Zytoplasmaantigenen sein. Es gibt eine Reihe von NANBV-Anwärttern. Siehe z.B. die Zusammenfassungen von Prince (1983), Feinstone und Hoofnagle (1984), Overby (1985, 1986, 1987) und die Artikel von Iwarson (1987). Es gibt jedoch keinen Beweis, daß einer dieser Kandidaten der ätiologische Erreger von NANBH ist.

Die Forderung nach sensitiven, spezifischen Screening- und Nachweisverfahren für NANBV-Träger und für mit NANBV kontaminiertes Blut oder Blutprodukte ist von großer Bedeutung. Posttransfusionshepatitis (PTH) tritt bei fast 10% der Transfusionspatienten auf, wobei NANBH für bis zu 90% dieser Fälle verantwortlich ist. Das Hauptproblem bei dieser Krankheit ist die häufige Verschlimmerung bis zu chronischer Leberschädigung (25–55%).

Die Patientenbehandlung wie auch die Vermeidung der Übertragung von NANBH durch Blut und Blutprodukte oder durch enge persönliche Kontakte erfordern zuverlässige diagnostische und prognostische Mittel zum Nachweis von Nucleinsäuren, Antigenen und Antikörpern, die mit dem NANBV in Verbindung stehen. Außerdem besteht ein dringender Bedarf an wirksamen Vakzinen und immunotherapeutischen Mitteln zur Vorbeugung und/oder Behandlung der Krankheit.

Offenbarung der Erfindung

Die Erfindung betrifft die Isolierung und Charakterisierung eines neu entdeckten ätiologischen Erregers von NANBH, das Hepatitis-C-Virus (HCV). Genauer gesagt, stellt die Erfindung eine Familie von cDNA-Kopien von Teilen des HCV-Genoms zur Verfügung. Diese cDNA-Kopien wurden durch eine Technik isoliert, die folgendes umfaßt: eine neuartige Stufe des Screenings von Expressionsproduktion aus cDNA-Bibliotheken, die aus einem feinverteilten Erreger in infiziertem Gewebe mit Seren von Patienten mit NANBH geschaffen wurden, um neu synthetisierte Antigene, die aus dem Genom des bisher nicht isolierten und nicht charakterisierten Viruserregers abgeleitet wurden, nachzuweisen, und die Selektion von Clonen, die Produkte herstellen, die immunologisch nur mit Seren von infizierten Individuen im Vergleich zu nichtinfizierten Individuen reagierten. Untersuchungen der Natur des HCV-Genoms unter Verwendung von aus der HCV-cDNA entwickelten Sonden wie auch der Sequenzinformation, die in der HCV-cDNA enthalten ist, weisen darauf hin, daß das HCV ein Flavivirus oder ein flavartiges Virus ist.

Teile der cDNA-Sequenzen, die aus dem HCV abgeleitet wurden, sind als Sonden nützlich, um die Anwesenheit des Virus in Proben nachzuweisen, und um natürlich vorkommende Varianten des Virus zu isolieren. Diese cDNAs machen auch Polypeptidsequenzen von HCV-Antigenen verfügbar, die in dem (den) HCV-Genom(en) codiert sind, und gestatten die Produktion von Polypeptiden, die als Standards oder als Reagenzien in diagnostischen Tests und/oder als Komponenten von Vakzinen nützlich sind. Antikörper, und zwar sowohl polyclonale als auch monoclonale, die gegen die HCV-Epitope gerichtet sind, die in diesen Polypeptidsequenzen enthalten sind, sind ebenfalls für diagnostische Tests und für therapeutische Mittel für das Screening von antiviralen Mitteln und für die Isolierung des NANBV-Erregers, aus dem diese cDNAs abgeleitet werden, nützlich. Außerdem wird es durch Anwendung der aus diesen cDNAs abgeleiteten Sonden möglich, andere Teile des HCV-Genoms zu isolieren und zu sequenzieren, so daß weitere Sonden und Polypeptide entstehen, die für die Diagnose und/oder prophylaktische als auch therapeutische Behandlung von NANBH nützlich sind.

In bezug auf die Polynucleotide betreffen dementsprechend einige Aspekte der Erfindung: ein gereinigtes HCV-Polynucleotid; ein rekombinantes HCV-Polynucleotid; ein rekombinantes Polynucleotid, das eine aus einem HCV-Genom oder aus HCV-cDNA abgeleitete Sequenz enthält; ein rekombinantes Polynucleotid, das für ein Epitop ein HCV codiert; einen rekombinanten Vektor, der beliebige der oben genannten rekombinanten Polynucleotide enthält, und eine Wirtszelle, die mit beliebigen dieser Vektoren transformiert wird. Andere erfindungsgemäße Aspekte sind: ein rekombinantes Expressionssystem, das einen offenen Leserahmen (ORF) der aus einem HCV-Genom oder aus HCV-cDNA abgeleiteten DNA umfaßt, wobei der ORF an eine

Kontrollsequenz operabel gebunden ist, die mit einem erwünschten Wirt kompatibel ist; eine Zelle, die mit dem rekombinanten Expressionssystem transformiert wird; und ein Polypeptid, das von der transformierten Zelle produziert wird.
Weitere erfindungsgemäße Aspekte sind: gereinigtes HCV, ein Präparat von Polypeptiden aus dem gereinigten HCV; ein gereinigtes HCV-Polypeptid; ein gereinigtes Polypeptid, das ein Epitop enthält, das immunologisch mit einem in HCV-enthaltenem Epitop identifizierbar ist.

In die erfindungsgemäßen Aspekte sind eingeschlossen: ein rekombinantes HCV-Polypeptid; ein rekombinantes Polypeptid, das aus einer Sequenz besteht, die aus einem HCV-Genom oder aus HCV-cDNA gewonnen wurde; ein rekombinantes Polypeptid, das aus einem HCV-Epitop besteht; und ein Fusionspolypeptid, das aus einem HCV-Polypeptid besteht.

In die Erfindung sind weiterhin eingeschlossen: ein monoklonaler Antikörper, der gegen ein HCV-Epitop gerichtet ist; und ein gereinigtes Präparat von polyclonalen Antikörpern, die gegen ein HCV-Epitop gerichtet sind. Ein weiterer erfindungsgemäßer Aspekt ist ein Partikel das gegen HCV-Infektion immunogen wirkt und ein Nicht-HCV-Polypeptid enthält, das eine Aminosäuresequenz besitzt, die ein Partikel bilden kann, wenn diese Sequenz in einem eukaryontischen Wirt erzeugt wird, und ein HCV-Epitop.

Ein weiterer erfindungsgemäßer Aspekt ist eine Polynucleotidsonde für das HCV. Erfindungsgemäße Aspekte, die zu Analysekiten gehören, sind diejenigen für: Analyse von Proben auf die Anwesenheit von Polynucleotiden, die aus dem HCV abgeleitet wurden mittels einer Polynucleotidsonde, welche eine Nucleotidsequenz aus dem HCV von etwa 8 oder mehr Nucleotiden enthält, in einem geeigneten Behälter (engl. container); Analyse von Proben auf die Anwesenheit eines HCV-Antigens mittels eines gegen das nachzuweisende HCV-Antigen gerichteten Antikörpers in einem geeigneten Behälter; Analyse von Proben auf die Anwesenheit eines gegen ein HCV-Antigen gerichteten Antikörpers mittels eines Polypeptids, das ein in dem HCV-Antigen vorhandenes HCV-Epitop enthält, in einem geeigneten Behälter.

Andere erfindungsgemäße Aspekte sind: ein Polypeptid, das aus einem HCV-Epitop besteht, das an ein festes Substrat geknüpft ist; und ein Antikörper gegen ein HCV-Epitop, der an ein festes Substrat geknüpft ist.

Weitere erfindungsgemäße Aspekte sind: ein Verfahren zur Erzeugung eines Polypeptids, das ein HCV-Epitop enthält, indem mit einem Expressionsvektor transformierte Wirtszellen, wobei der Vektor eine Sequenz enthält, die für ein ein HCV-Epitop enthaltendes Polypeptid codiert, unter Bedingungen inkubiert werden, die die Expression des Polypeptids erlauben; und ein Polypeptid, das ein HCV-Epitop enthält, das durch dieses Verfahren erzeugt wurde.

Die Erfindung umfaßt auch ein Verfahren zum Nachweis von HCV-Nucleinsäuren in einer Probe, wobei die Nucleinsäuren der Probe mit einer Sonde für ein HCV-Polynucleotid unter Bedingungen miteinander reagieren, die die Bildung eines Polynucleotidduplexes zwischen der Sonde und der HCV-Nucleinsäure aus der Probe erlauben; und zum Nachweis eines Polynucleotidduplexes, der die Sonde enthält.

Immunoassays sind ebenfalls in die Erfindung eingeschlossen. Dazu gehören ein Immunoassay zum Nachweis eines HCV-Antigens, wobei eine Probe, die vermutlich ein HCV-Antigen enthält, mit einem Sondenantikörper, der gegen das nachzuweisende HCV-Antigen gerichtet ist, unter Bedingungen inkubiert wird, die die Bildung eines Antigen-Antikörper-Komplexes gestatten; und zum Nachweis eines Antigen-Antikörper-Komplexes, der den Sondenantikörper enthält. Ein Immunoassay zum Nachweis von Antikörpern, die gegen ein HCV-Antigen gerichtet sind, wobei eine Probe, die vermutlich Anti-HCV-Antikörper enthält, mit einem Sondenpolypeptid, das ein Epitop des HCV enthält, unter Bedingungen inkubiert wird, die die Bildung eines Antikörper-Antigen-Komplexes gestatten; und zum Nachweis des Antikörper-Antigen-Komplexes, der das Sondenantigen enthält.

In die Erfindung sind auch Vakzine zur Behandlung der HCV-Infektion eingeschlossen, die ein immunogenes Peptid, das ein HCV-Epitop enthält, oder ein inaktiviertes HCV-Präparat oder ein abgeschwächtes HCV-Präparat umfassen.

Ein weiterer erfindungsgemäßer Aspekt ist eine mit HCV infizierte Gewebekultur.

Ein noch weiterer erfindungsgemäßer Aspekt ist ein Verfahren zur Erzeugung von Antikörpern gegen das HCV, indem einem Individuum ein isoliertes immunogenes Polypeptid, das ein HCV-Epitop enthält, in einer Menge verabreicht wird, die ausreicht, eine Immunreaktion hervorzurufen.

Ein noch weiterer erfindungsgemäßer Aspekt ist ein Verfahren zur Isolierung von cDNA, die aus dem Genom eines nicht identifizierten Infektionserregers abgeleitet wurde, indem (a) Wirtszellen bereitgestellt werden, die mit Expressionsvektoren transformiert wurden, die eine cDNA-Bibliothek enthalten, welche aus Nucleinsäuren hergestellt wurde, die aus dem mit dem Erreger infizierten Gewebe isoliert wurden und man diese Wirtszellen unter Bedingungen wachsen läßt, die die Expression von in der cDNA codiertem(n) Polypeptid(en) gestatten; (b) eine Wechselwirkung der Expressionsprodukte der cDNA mit einer Antikörper enthaltenden Körperkomponente eines mit dem Infektionserreger infizierten Individuums unter Bedingungen besteht, die eine Immunreaktion erlauben, und die im Ergebnis der Wechselwirkung gebildeten Antikörper-Antigen-Komplexe nachgewiesen werden; (c) Wirtszellen gezüchtet werden, die Polypeptide exprimieren, die Antikörper-Antigen-Komplexe gemäß Stufe (b) unter Bedingungen bilden, die ihr Wachstum als individuelle Clone erlauben und diese Clone isoliert werden; (d) Zellen aus den Clonen gemäß (c) unter Bedingungen gezüchtet werden, die die Expression von Polypeptid(en), die in der cDNA codiert sind, gestatten, und die Expressionsprodukte mit Antikörper enthaltenden Körperkomponenten von anderen als in Stufe (a) genannten Individuen, die mit dem Infektionserreger infiziert sind, und mit Kontrollindividuen, die nicht mit dem Erreger infiziert sind, in Wechselwirkung stehen, und die im Ergebnis dieser Wechselwirkung gebildeten Antikörper-Antigen-Komplexe nachgewiesen werden; (e) Wirtszellen gezüchtet werden, die Polypeptide exprimieren, die Antikörper-Antigen-Komplexe mit Antikörper enthaltenden Körperkomponenten von infizierten Individuen und von Individuen, die vermutlich infiziert sind, und nicht mit den Komponenten von Kontrollindividuen, unter Bedingungen bilden, die ihr Wachstum als individuelle Clone erlauben, und diese Clone isoliert werden; und (f) die cDNA aus den Wirtszellclonen aus Stufe (e) isoliert wird.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

Fig. 1: zeigt die doppelsträngige Nucleotidsequenz des HCV-cDNA-Inserts in Clon 5-1-1 und die vermutliche Aminosäuresequenz des darin codierten Polypeptids.

Fig. 2: zeigt die Homologien der überlappenden HCV-cDNA-Sequenzen in den Clonen 5-1-1-, 81, 1-2 und 91.

- Fig. 3: zeigt eine zusammengesetzte Sequenz von HCV-cDNA, die aus den überlappenden Clonen 81, 1–2 und 91 abgeleitet wurde, und die darin codierte Aminosäuresequenz.
- Fig. 4: zeigt die doppelsträngige Nucleotidsequenz des HCV-cDNA-Inserts in Clon 81 und die vermutliche Aminosäuresequenz des darin codierten Polypeptids.
- Fig. 5: zeigt die HCV-cDNA-Sequenz in Clon 36, das Segment, das die NANBV-cDNA von Clon 81 überlappt und die in Clon 36 codierte Polypeptidsequenz.
- Fig. 6: zeigt die kombinierten offenen Leserahmen (ORF) von HCV-cDNAs in den Clonen 36 und 81 und das darin codierte Polypeptid.
- Fig. 7: zeigt die HCV-cDNA-Sequenz in Clon 32, das Segment, das Clon 81 überlappt und das darin codierte Polypeptid.
- Fig. 8: zeigt die HCV-cDNA-Sequenz in Clon 35, das Segment, das Clon 36 überlappt und das darin codierte Polypeptid.
- Fig. 9: zeigt die kombinierten offenen Leserahmen (ORF) von HCV-cDNAs in den Clonen 35, 36, 81 und 32 und das darin codierte Polypeptid.
- Fig. 10: zeigt die HCV-cDNA-Sequenz in Clon 37 b, das Segment, das Clon 35 überlappt und das darin codierte Polypeptid.
- Fig. 11: zeigt die HCV-cDNA-Sequenz in Clon 33 b, das Segment, das Clon 32 überlappt und das darin codierte Polypeptid.
- Fig. 12: zeigt die HCV-cDNA-Sequenz in Clon 40 b, das Segment, das Clon 37 b überlappt und das darin codierte Polypeptid.
- Fig. 13: zeigt die HCV-cDNA-Sequenz in Clon 25 c, das Segment, das Clon 33 b überlappt und das darin codierte Polypeptid.
- Fig. 14: zeigt die Nucleotidsequenz und das darin codierte Polypeptid des offenen Leserahmens (ORF), der durch die HCV-cDNAs in den Clonen 40 b, 37 b, 35, 36, 81, 32, 33 b und 25 c erweitert ist.
- Fig. 15: zeigt die HCV-cDNA-Sequenz in Clon 33 c, das Segment, das die Clone 40 b und 33 c überlappt und die darin codierten Aminosäuren.
- Fig. 16: zeigt die HCV-cDNA-Sequenz in Clon 8 h, das Segment, das Clon 33 c überlappt und die darin codierten Aminosäuren.
- Fig. 17: zeigt die HCV-cDNA-Sequenz in Clon 7 e, das Segment, das Clon 8 h überlappt und die darin codierten Aminosäuren.
- Fig. 18: zeigt die HCV-cDNA-Sequenz in Clon 14 c, das Segment, das Clon 25 c überlappt und die darin codierten Aminosäuren.
- Fig. 19: zeigt die HCV-cDNA-Sequenz in Clon 8 f, das Segment, das Clon 14 c überlappt und die darin codierten Aminosäuren.
- Fig. 20: zeigt die HCV-cDNA-Sequenz in Clon 33 f, das Segment, das Clon 8 f überlappt und die darin codierten Aminosäuren.
- Fig. 21: zeigt die HCV-cDNA-Sequenz in Clon 33 g, das Segment, das Clon 33 f überlappt und die darin codierten Aminosäuren.
- Fig. 22: zeigt die HCV-cDNA-Sequenz in Clon 7 f, das Segment, das die Sequenz in Clon 7 e überlappt und die darin codierten Aminosäuren.
- Fig. 33: zeigt die HCV-cDNA-Sequenz in Clon 11 b, das Segment, das die Sequenz in Clon 7 f überlappt und die darin codierten Aminosäuren.
- Fig. 24: zeigt die HCV-cDNA-Sequenz in Clon 14 i, das Segment, das die Sequenz in Clon 11 b überlappt und die darin codierten Aminosäuren.
- Fig. 25: zeigt die HCV-cDNA-Sequenz in Clon 39 c, das Segment, das die Sequenz in Clon 33 g überlappt und die darin codierten Aminosäuren.
- Fig. 26: zeigt eine zusammengesetzte HCV-cDNA-Sequenz, die aus ausgerichteten (engl. aligned) cDNAs in den Clonen 14 i, 11 b, 7 f, 7 e, 8 h, 33 c, 40 b, 37 b, 35, 36, 81, 32, 33 b, 25 c, 14 c, 8 f, 33 f und 33 g abgeleitet wurden; weiter wird die im erweiterten ORF in der abgeleiteten Sequenz codierte Aminosäuresequenz des Polypeptids gezeigt.
- Fig. 27: zeigt die Sequenz der HCV-cDNA in Clon 12 f, das Segment, das Clon 14 i überlappt und die darin codierten Aminosäuren.
- Fig. 28: zeigt die Sequenz der HCV-cDNA in Clon 35 f, das Segment, das Clon 39 c überlappt und die darin codierten Aminosäuren.
- Fig. 29: zeigt die Sequenz der HCV-cDNA in Clon 19 g, das Segment, das Clon 35 f überlappt und die darin codierten Aminosäuren.
- Fig. 30: zeigt die Sequenz von Clon 26 g, das Segment, das Clon 19 g überlappt und die darin codierten Aminosäuren.
- Fig. 31: zeigt die Sequenz von Clon 15 e, das Segment, das Clon 26 g überlappt und die darin codierten Aminosäuren.
- Fig. 32: zeigt die Sequenz in einer zusammengesetzten cDNA, die durch Ausrichten (engl. aligning) der Clone 12 f bis 15 e in der 5'-3'-Richtung abgeleitet wurden, sowie die im kontinuierlichen (engl. continuous) ORF codierten Aminosäuren.
- Fig. 33: zeigt ein Foto von Western blots eines Fusionsproteins, SOD-NANB₅₋₁₋₁, mit Schimpansenserum aus mit BB-NANB, HAV und HBV infizierten Schimpansen.
- Fig. 34: zeigt ein Foto von Western blots eines Fusionsproteins, SOD-NANB₅₋₁₋₁, mit Serum aus mit NANBV, HAV und HBV infizierten Menschen und aus Kontrollpersonen.
- Fig. 35: zeigt in einer Karte die signifikanten Merkmale des Vektors pAB24.
- Fig. 36: zeigt die vermutliche Aminosäuresequenz des Carboxy-Terminus des Fusionspolypeptids C 100-3 und die dafür codierende Nucleotidsequenz.
- Fig. 37 A: ist ein Foto eines Coomassieblau-gefärbten Polyacrylamidgels, das in Hefe exprimierten C 100-3 identifiziert.
- Fig. 37 B: zeigt ein Western blot von C 100-3 mit Serum aus einem mit NANBV infizierten Menschen.
- Fig. 38: zeigt ein Autoradiogramm eines Northern blot von RNA, die aus der Leber eines mit BB-NANBV infizierten Schimpansen isoliert und mit BB-NANBV-cDNA von Clon 81 sondiert worden war.
- Fig. 3: zeigt ein Autoradiogramm von NANBV-Nucleinsäure, die mit RNase A oder DNase I behandelt und mit BB-NANBV-cDNA von Clon 81 sondiert worden war.
- Fig. 40: zeigt ein Autoradiogramm von Nucleinsäuren, die aus NAN-Partikeln extrahiert wurden, die mit Anti-NANB₅₋₁₋₁ aus infiziertem Plasma eingefangen und mit ³²p-markierter NANBV-cDNA aus Clon 81 sondiert worden waren.
- Fig. 41: zeigt Autoradiogramme von Filtern, die isolierte NANBV-Nucleinsäuren enthielten, welche mit ³²p-markierten plus- und minussträngigen DNA-Sonden, die aus NANBV-cDNA in Clon 81 abgeleitet worden waren, sondiert wurden.
- Fig. 42: zeigt die Homologien zwischen einem in HCV-cDNA codierten Polypeptid und einem NS-Protein aus dem Dengue-Flavivirus.

- Fig. 43: zeigt ein Histogramm der Verteilung von HCV-Infektion in Stichproben nach einer Bestimmung durch ein ELISA-Screening.
- Fig. 44: zeigt ein Histogramm der Verteilung von HCV-Infektion in Stichproben mittels zweier Konfigurationen von Immunoglobulin-Enzym-Konjugat in einem ELISA-Assay.
- Fig. 45: zeigt die Sequenzen in einer Startermischung, die aus einer konservierten Sequenz in NSI von Flaviviren abgeleitet worden waren.

Wege zur erfindungsgemäßen Ausführung

I. Definitionen

Der Begriff Hepatitis-C-Virus wurde von den auf diesem Gebiet arbeitenden Wissenschaftlern für einen bisher unbekannten Erreger von NANBH reserviert. Dementsprechend bezieht sich der Begriff „Hepatitis-C-Virus“ (HCV) in der hier gebrauchten Bedeutung auf einen Erreger, der NANBH verursacht, der früher als NANBV und/oder BB-NANBV bezeichnet wurde. Die Begriffe, HCV, NANBV und BB-NANBV werden hier austauschbar gebraucht. Als Erweiterung dieser Terminologie wird die durch das HCV verursachte Krankheit, früher als NANB-Hepatitis (NANBH) bezeichnet, jetzt Hepatitis C genannt. Die Begriffe NANBH und Hepatitis C können hier austauschbar gebraucht werden.

Der Begriff „HCV“ bezeichnet in der hier gebrauchten Bedeutung eine Virusspezies, die NANBH verursacht, sowie geschwächte Stämme oder davon gewonnene unvollständige, interferierende (defective interfering) Partikel. Wie im folgenden gezeigt wird, besteht das HCV-Genom aus RNA. Es ist bekannt, daß RNA-haltige Viren relativ hohe, spontane Mutationsraten, die im Bereich von 10^{-3} bis 10^{-4} pro Nucleotid liegen sollen (Fields & Knipe [1986]), aufweisen. Es gibt daher vielfältige Stämme innerhalb der im folgenden beschriebenen HCV-Spezies. Die hier beschriebenen Zusammensetzungen und Verfahren ermöglichen Vermehrung, Identifizierung, Nachweis und Isolierung der verschiedenen verwandten Stämme. Darüber hinaus erlauben sie auch die Durchführung von Diagnosen und Herstellung von Vakzinen für die verschiedenen Stämme und sind für Screening-Untersuchungen nach antiviralen Mitteln für pharmakologische Zwecke nützlich, indem sie die Replikation des HCV hemmen. Die hier zur Verfügung gestellte Information, obwohl sie von einem HCV-Stamm gewonnen wurde, im folgenden als CDC/HCV1 bezeichnet, reicht für einen Virustaxonomisten aus, andere, zu dieser Spezies gehörende Stämme zu identifizieren. Wie hier beschrieben wird, haben wir entdeckt, daß das HCV ein Flavivirus oder flaviartiges Virus ist. Morphologie und Zusammensetzung von Flaviviruspartikeln sind bekannt und wurden in Brinton (1986) besprochen. Im Hinblick auf die Morphologie enthalten die Flaviviren allgemein gesagt in der Mitte ein Nucleokapsid, das von einer lipoidhaltigen Doppelschicht umgeben ist. Die Virionen sind kugelförmig und haben einen Durchmesser von etwa 40–50 nm. Ihre Kerne haben einen Durchmesser von etwa 25–30 nm. Auf der Außenfläche der Virionhülle befinden sich Projektionen mit einer Länge von etwa 5–10 nm mit terminalen Knöpfen (knobs) von etwa 2 nm Durchmesser.

Das HCV codiert für ein Epitop, das immunologisch mit einem Epitop im HCV-Genom identifizierbar ist, aus dem die hier beschriebenen cDNAs abgeleitet wurden, das Epitop ist vorzugsweise in einer hier beschriebenen cDNA codiert. Im Vergleich zu anderen bekannten Flaviviren ist das Epitop einzigartig zum HCV. Diese Einzigartigkeit des Epitops kann durch seine immunologische Reaktivität mit dem HCV und der fehlenden immunologischen Reaktivität mit anderen Flaviviruspezies bestimmt werden. Verfahren zur Bestimmung der immunologischen Reaktivität sind im Fachgebiet bekannt, beispielsweise durch Radiimmunoassay, durch ELISA, durch Hämagglutination, wobei mehrere Beispiele geeigneter Techniken für Assays hier vorgestellt werden.

Zusätzlich zu dem oben Gesagten sind die folgenden Parameter entweder allein oder in Kombination miteinander bei der Identifizierung eines Stammes als HCV anwendbar. Da HCV-Stämme evolutionsmäßig verwandt sind, wird erwartet, daß die Gesamthomologie der Genome auf Nucleotidebene mindestens etwa 40%, vorzugsweise etwa 60% oder mehr, und noch besser etwa 80% oder mehr beträgt. Außerdem werden die entsprechenden angrenzenden Sequenzen von mindestens etwa 13 Nucleotiden erwartet. Die Übereinstimmung zwischen der vermutlichen Genomsequenz des HCV-Stammes und der CDC/CH1-HCV-cDNA-Sequenz läßt sich durch im Fachgebiet bekannte Techniken feststellen. Beispielsweise können sie durch einen direkten Vergleich der Sequenzinformation des Polynucleotids aus dem vermutlichen HCV und der (den) hier beschriebenen HCV-cDNA-Sequenz(en) bestimmt werden. Zum Beispiel können sie auch durch Hybridisierung der Polynucleotide unter Bedingungen, unter denen sich stabile Duplexe zwischen homologen Regionen (z. B. solchen, die vor der S_1 -Digestion angewandt werden würden) herausbilden, bestimmt werden, dann schließt sich eine Digestion mit einzelsträngiger(n) spezifischer(n) Nuclease(n) und danach eine Größenbestimmung der digerierten Fragmente an.

Wegen der evolutionären Verwandtschaft der HCV-Stämme sind die vermutlichen HCV-Stämme durch ihre Homologie auf der Polypeptidebene identifizierbar. Allgemein gesagt, sind über 40%, vorzugsweise über etwa 60% und noch besser über etwa 80% der HCV-Stämme auf der Polypeptidebene homolog. Die Techniken zur Bestimmung der Aminosäuresequenzhomologie sind im Fachgebiet bekannt. Die Aminosäuresequenz kann beispielsweise direkt bestimmt und mit den hier vorgestellten Sequenzen verglichen werden. Beispielsweise kann auch die Nucleotidsequenz des Genommaterials des vermutlichen HCV bestimmt werden (gewöhnlich durch eine cDNA-Zwischenverbindung); die darin codierte Aminosäuresequenz kann bestimmt und die entsprechenden Regionen können verglichen werden.

In der hier gebrauchten Bedeutung bezieht sich ein Polynucleotid, „das abgeleitet wird von“ einer bezeichneten Sequenz, z. B. der HCV-cDNA, insbesondere die in den Fig. 1–32 dargestellten, oder von einem HCV-Genom, auf eine Polynucleotidsequenz, die sich aus einer Sequenz von mindestens etwa 6 Nucleotiden, vorzugsweise mindestens etwa 8 Nucleotiden und besser mindestens etwa 10–12 Nucleotiden und am besten mindestens etwa 15–20 Nucleotiden zusammensetzt, die einer Region der bezeichneten Nucleotidsequenz entsprechen, d. h. homolog oder komplementär zu ihr sind. Vorzugsweise ist die Sequenz der Region, aus der das Polynucleotid abgeleitet wird, zu einer Sequenz, die zu einem HCV-Genom einzigartig ist, homolog oder komplementär. Ob eine Sequenz zu dem HCV-Genom einzigartig ist oder nicht, läßt sich durch den Fachleuten auf diesem Gebiet bekannte Techniken feststellen. Beispielsweise kann die Sequenz mit Sequenzen in Datenbanken, z. B. Genbank, verglichen werden, um festzustellen, ob sie im nicht infizierten Wirt oder in anderen Organismen vorhanden ist. Die Sequenz kann auch mit bekannten Sequenzen anderer Virusagenzien, einschließlich derjenigen, die bekannterweise Hepatitis induzieren, wie z. B. HAV, HBV und HDV, sowie mit anderen Mitgliedern der Flaviviridae verglichen werden. Die Übereinstimmung oder Nicht-Übereinstimmung der abgeleiteten Sequenz mit anderen Sequenzen kann auch durch Hybridisierung unter geeigneten strengen Bedingungen festgestellt werden. Hybridisierungstechniken zur Bestimmung der Komplementarität der Nucleinsäuresequenzen sind

im Fachgebiet bekannt und werden im folgenden erläutert. Siehe beispielsweise auch Maniatis und Mitarbeiter (1982). Weiterhin können durch Hybridisierung entstandene Fehlbildungen von Duplexpolynucleotiden durch bekannte Techniken, wie z. B. Digestion mit einer Nuclease wie S1, die speziell einsträngige Gebiete in Duplexpolynucleotiden digeriert, festgestellt werden. Regionen, aus denen typische DNA-Sequenzen „abgeleitet“ werden können, umfassen, sind jedoch nicht auf diese beschränkt, beispielsweise Regionen, die für spezifische Epitope codieren, sowie auch nichttranskribierte und/oder nichttranslatierte Regionen.

Das abgeleitete Polynucleotid wird nicht unbedingt physikalisch aus der gezeigten Nucleotidsequenz gewonnen, sondern kann auf verschiedene Weise, einschließlich z. B. chemischer Synthese oder DNA-Replikation oder Reverser Transkription oder Transkription, die auf den durch die Basensequenz in der(n) Region(en), aus der (denen) das Polynucleotid gewonnen wird, gegebenen Informationen beruhen, erzeugt werden. Weiterhin können Kombinationen von Regionen, die der der bezeichneten Sequenz entsprechen, auf im Fachgebiet bekannte Weise modifiziert werden, damit sie dem beabsichtigten Zweck entsprechen.

In gleicher Weise bezieht sich ein Polypeptid oder eine Aminosäuresequenz, die „abgeleitet werden von“ einer bezeichneten Nucleinsäuresequenz, z. B. den in Fig. 1–32 gezeigten Sequenzen, oder von einem HCV-Genom, auf ein Polypeptid, das eine Aminosäuresequenz aufweist, die mit der eines Polypeptids identisch ist, die in der Sequenz codiert ist, oder auf einen Teil davon, wobei der Teil aus mindestens 3–5 Aminosäuren, vorzugsweise aus mindestens 8–10 Aminosäuren und noch besser aus mindestens 11–15 Aminosäuren besteht, oder der immunologisch mit einem in der Sequenz codierten Polypeptid identifizierbar ist.

Ein rekombinantes oder abgeleitetes Polypeptid ist nicht unbedingt aus einer bezeichneten Nucleinsäuresequenz, z. B. den in Fig. 1–32 gezeigten Sequenzen, oder aus einem HCV-Genom translatiert, es kann auf verschiedene Weisen erzeugt werden, einschließlich z. B. chemischer Synthese oder Expression eines Rekombinant-Expressionssystems, oder Isolierung aus mutiertem HCV.

Der Begriff „rekombinantes Polynucleotid“ bezeichnet in der hier gebrauchten Bedeutung ein Polynucleotid von genomischem, cDNA-, semisynthetischem oder synthetischem Ursprung, welches dank seines Ursprungs oder seiner Manipulation (1) nicht mit dem gesamten oder einem Teil des Polynucleotids verknüpft ist, mit dem es in Natur oder in Form einer Bibliothek verknüpft ist; und/oder (2) mit einem anderen Polynucleotid verbunden ist als es in der Natur verbunden wäre.

Der Begriff „Polynucleotid“ in der hier gebrauchten Bedeutung bezieht sich auf eine polymere Form von Nucleotiden beliebiger Länge, und zwar entweder Ribonucleotide oder Desoxyribonucleotide. Dieser Begriff bezieht sich nur auf die Primärstruktur des Moleküls. Dieser Begriff schließt somit sowohl doppel- und einsträngige DNA wie auch doppel- und einsträngige RNA ein. Er umfaßt auch beispielsweise durch Methylierung und/oder „capping“ modifizierte und nicht modifizierte Formen des Polynucleotids.

In dem hier gebrauchten Sinn bedeutet der Begriff „HCV, das eine einer cDNA entsprechenden Sequenz enthält“, daß das HCV eine Polynucleotidsequenz enthält, die zu einer Sequenz in der bezeichneten DNA homolog oder komplementär ist; der Grad der Homologie oder Komplementarität zur cDNA wird etwa 50% oder mehr, vorzugsweise etwa mindestens 70% und noch besser etwa mindestens 90% betragen. Die entsprechenden Sequenzen werden in der Länge etwa mindestens 70 Nucleotide, vorzugsweise etwa mindestens 80 Nucleotide und noch besser etwa mindestens 90 Nucleotide betragen. Die Übereinstimmung zwischen der HCV-Sequenz und der cDNA kann durch im Fachgebiet bekannte Techniken bestimmt werden, wie beispielsweise durch einen direkten Vergleich des sequenzierten Materials mit den beschriebenen cDNAs oder durch Hybridisierung und Digestion mit einzelsträngigen Nucleasen und anschließender Bestimmung der digerierten Fragmente.

Der Begriff „gereinigt von Virusnucleotid“ bezieht sich auf ein HCV-Genom oder Fragment davon, das im wesentlichen frei von, d. h. es enthält weniger als etwa 50%, vorzugsweise weniger als etwa 70% und noch besser weniger als etwa 90% an Polypeptiden, mit denen das Viruspolynucleotid natürlicherweise verbunden ist. Die Techniken zur Reinigung der Viruspolynucleotide von den viralen Partikeln sind im Fachgebiet bekannt und schließen z. B. das Auseinanderreißen (engl. disruption) der Partikel mit einem chaotropen Mittel und Trennung des (der) Polynucleotids(e) und Polypeptids(e) durch Ionenaustauschchromatographie, Affinitätschromatographie und Sedimentation nach der Dichte ein.

Der Begriff „gereinigtes Viruspolypeptid“ bezieht sich auf ein HCV-Polypeptid oder Fragment davon, das im wesentlichen frei von, d. h. es enthält weniger als 50%, vorzugsweise weniger als etwa 70% und noch besser weniger als etwa 90% an zellulären Komponenten, mit denen das Viruspolypeptid natürlicherweise verbunden ist. Die Techniken zur Reinigung der Viruspolypeptide sind im Fachgebiet bekannt und Beispiele dieser Techniken werden im folgenden erläutert.

„Rekombinante Wirtszellen“, „Wirtszellen“, „Zellen“, „Zelllinien“, „Zellkulturen“ und andere derartige Begriffe, die Mikroorganismen oder höhere eukaryontische Zelllinien, die als unizelluläre Einheiten in Kultur genommen wurden, bezeichnen, beziehen sich auf Zellen, die als Rezipienten für einen rekombinanten Vektor oder eine andere Transfer-DNA verwendet werden können oder verwendet wurden und schließen auch die Nachkommenschaft der Originalzelle, die transfiziert wurde, ein. Es versteht sich, daß die Nachkommenschaft einer einzelnen Elternzelle nicht notwendigerweise in Morphologie oder als Genom- oder Gesamt-DNA-Komplement infolge einer zufälligen oder beabsichtigten Mutation mit der Originalzellenzelle identisch sein muß. Die Nachkommenschaft der Elternzelle, die zur Elternzelle ausreichende Ähnlichkeit aufweist und durch relevante Eigenschaften, wie die Anwesenheit einer Nucleotidsequenz, die für ein gewünschtes Peptid codiert, charakterisiert ist, ist in der durch diese Definition erläuterten Nachkommenschaft inbegriffen und durch die oben genannten Begriffe erfaßt.

Ein „Replicon“ ist jedes genetische Element, d. h. ein Plasmid, ein Chromosom, ein Virus, das sich als eine autonome Einheit der Polynucleotidreplikation innerhalb einer Zelle verhält, d. h. daß es unter eigener Steuerung zur Replikation fähig ist.

Ein „Vektor“ ist ein Replicon, an den ein anderes Polynucleotidsegment geknüpft ist, um so die Replikation und/oder Expression des angeknüpften Segments zu bewirken.

„Kontrollsequenz“ bezieht sich auf Polynucleotidsequenzen, die notwendig sind, um die Expression der Codiersequenzen, an die sie ligiert sind, zu bewirken. Die Art dieser Kontrollsequenzen unterscheidet sich je nach Wirtsorganismus; in Prokaryonten sind diese Kontrollsequenzen im allgemeinen Promoter, Ribosombindestellen und Terminatoren; in Eukaryonten sind diese Kontrollsequenzen Promoter, Terminatoren und in einigen Fällen Verstärker. Der Begriff „Kontrollsequenzen“ soll mindestens alle Komponenten umfassen, deren Anwesenheit für die Expression notwendig ist und kann auch zusätzliche Komponenten umfassen, deren Anwesenheit vorteilhaft ist, wie z. B. Leaderssequenzen. „Operably linked“ (operabel geknüpft) bezieht sich auf eine Juxtaposition, in der die so beschriebenen Komponenten in einer Beziehung miteinander stehen, die ihre Funktion in der beabsichtigten Weise erlaubt. Eine Kontrollsequenz, die an eine Codiersequenz „operabel geknüpft“ ist, ist auf eine solche Weise ligiert, daß die Expression der Codiersequenz unter Bedingungen erreicht wird, die für die Kontrollsequenzen verträglich sind.

Ein „offener Leserahmen“ (ORF) ist eine Region einer Polynucleotidsequenz, die für ein Polypeptid codiert; diese Region kann einen Teil einer Codiersequenz oder eine vollständige Codiersequenz darstellen.

Eine „Codiersequenz“ ist eine Polynucleotidsequenz, die in mRNA transkribiert und/oder in ein Polypeptid translatiert wird, wenn sie sich unter der Kontrolle von geeigneten Regulationssequenzen befindet. Die Grenzen der Codiersequenz werden durch ein Translationsstartcodon am 5'-Terminus und durch ein Translationsstopcodon am 3'-Terminus bestimmt. Eine Codiersequenz kann mRNA, cDNA und rekombinante Polynucleotidsequenzen umfassen, ist aber nicht auf diese beschränkt.

„Immunologisch identifizierbar mit/als“ bezieht sich auf das Vorhandensein eines (von) Epitops (Epitopen) und Polypeptides (Polypeptiden), die in dr.m (den) bezeichneten Polypeptid(en), gewöhnlich HCV-Proteinen, vorhanden und zu diesen einzigartig sind. Immunologische Identität kann durch Antikörperbindung und/oder Bindungskonkurrenz bestimmt werden; diese Techniken sind den Fachleuten auf diesem Gebiet bekannt und werden auch weiter unten illustriert. Die Einzigartigkeit eines Epitops kann auch durch Computerforschungen in bekannten Datenbanken, z. B. Genbank, nach den Polynucleotidsequenzen, die für das Epitop codieren, sowie durch Aminosäuresequenzvergleiche mit anderen bekannten Proteinen bestimmt werden. Im hier gebrauchten Sinn bezieht sich „Epitop“ auf eine Antigen determinante eines Polypeptids; ein Epitop könnte 3 Aminosäuren in einer räumlichen Anordnung umfassen, die für das Epitop einzigartig ist, im allgemeinen besteht ein Epitop aus mindestens 5 solcher Aminosäuren, und noch allgemeiner besteht es aus mindestens 8–10 solcher Aminosäuren. Die Verfahren zur Bestimmung der räumlichen Anordnung der Aminosäuren sind im Fachgebiet bekannt und umfassen beispielsweise Röntgenkristallographie und zweidimensionale magnetische Kernresonanz.

Ein Polypeptid ist mit einem Antikörper „immunologisch reaktiv“, wenn es an einen Antikörper bindet aufgrund der Tatsache, daß der Antikörper ein spezifisches Epitop, das im Polypeptid enthalten ist, erkennt. Die immunologische Reaktivität kann bestimmt werden durch die Antikörperbindung, insbesondere durch die Kinetik der Antikörperbindung, und/oder durch Bindungskonkurrenz, indem ein bekanntes Polypeptid oder bekannte Polypeptide, das/die ein Epitop enthält/enhalten, gegen das/die der Antikörper gerichtet ist, als Konkurrent(en) verwendet wird/werden. Die Techniken zur Bestimmung, ob ein Polypeptid mit einem Antikörper immunologisch reaktiv ist, sind im Fachgebiet bekannt.

In der hier gebrauchten Bedeutung beinhaltet der Begriff „ein HCV enthaltendes immunogenes Polypeptid“ natürlich vorkommende HCV-Polypeptide oder Fragmente davon ebenso wie Polypeptide, die durch andere Maßnahmen hergestellt wurden, wie beispielsweise chemische Synthese, oder die Expression des Polypeptids in einem rekombinanten Organismus. Der Begriff „Polypeptid“ bezieht sich auf eine Molekülkette von Aminosäuren und nicht auf eine spezifische Länge des Produktes, so daß Peptide, Oligopeptide und Proteine in die Definition des Polypeptids eingeschlossen sind. Der Begriff bezieht sich auch nicht auf die Modifikationen des Polypeptids nach der Expression wie beispielsweise Glycosylierungen, Acetylierungen, Phosphorylierungen und dergleichen.

„Transformation“ in der hier gebrauchten Bedeutung bezieht sich auf die Insertion eines exogenen Polynucleotids in eine Wirtszelle ungeachtet des für die Insertion angewandten Verfahrens, wie beispielsweise direkte Aufnahme, Transduktion oder „f-mating“. Das exogene Polynucleotid kann als nicht integrierter Vektor erhalten bleiben, wie z. B. ein Plasmid, oder kann auf eine andere Weise in das Wirtsgenom integriert werden.

„Behandlung“ in dem hier gebrauchten Sinn bezieht sich auf Prophylaxe und/oder Therapie.

Ein „Individuum“ im hier gebrauchten Sinn bezieht sich auf Vertebraten, insbesondere Mitglieder der Säugetierspezies und schließt Haustiere, Sporttiere, Primaten und Menschen ein, ist jedoch nicht darauf beschränkt. In der hier gebrauchten Bedeutung enthält der „Plus-Strang“ einer Nucleinsäure die Sequenz, die für das Polypeptid codiert.

Der „Minus-Strang“ enthält eine Sequenz, die zu der des „Plus-Strangs“ komplementär ist.

In der hier gebrauchten Bedeutung ist ein „positiv-strängiges Genom“ eines Virus eines, in dem das Genom, ob RNA oder DNA, einsträngig ist und für ein Viruspolypeptid/Viruspolypeptide codiert. Beispiele positiv-strängiger RNA-Viren sind Togaviridae, Coronaviridae, Retroviridae, Picornaviridae und Caliciviridae. Ebenfalls eingeschlossen sind die Flaviviridae, die früher als Togaviridae klassifiziert waren. Siehe Fields & Knipe (1986).

In der hier gebrauchten Bedeutung bezieht sich „Antikörper enthaltende Körperkomponente“ auf eine Komponente des Körpers eines Individuums, der eine Quelle für die in Frage kommenden Antikörper ist. Antikörper enthaltende Körperkomponenten sind im Fachgebiet bekannt und umfassen z. B. Plasma, Serum, Liquor, Lymphe, die äußeren Abschnitte des Respirations-, Verdauungs- und Urogenitaltraktes, Tränen, Speichel, Milch, weiße Blutzellen und Myelomzellen.

In der hier gebrauchten Bedeutung bezieht sich „gereinigtes HCV-Präparat“ auf ein HCV-Präparat, das aus den zellularen Bestandteilen, mit denen das Virus normalerweise assoziiert ist und aus anderen Viruspezies, die im infizierten Gewebe vorkommen können, isoliert wurde. Die Techniken zur Isolierung der Viren sind den Fachleuten auf diesem Gebiet bekannt und schließen z. B. Zentrifugierung und Affinitätschromatographie ein; ein Verfahren zur Herstellung von gereinigtem HVC wird im folgenden erläutert.

II. Beschreibung der Erfindung

Für die Durchführung der vorliegenden Erfindung werden, wenn nicht anders angegeben, herkömmliche Techniken der Molekularbiologie, Mikrobiologie, Rekombinant-DNA-Technik und Immunologie angegeben, die im Fachbereich üblich sind. Diese Techniken werden in der Literatur ausführlich erklärt. Siehe z. B. Maniatis, Fritsch & Sambrook, MOLECULAR CLONING; A LABORATORY MANUAL (Molekulare Clonierung, ein Laborhandbuch) (1982); DNA CLONING, VOLUMES 1 AND 2 (DNA-Clonierung, Band I und II) (Herausgeber D. N. Glover, 1985); OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS (Oligonucleotidsynthese) (Herausgeber M. J. Gait, 1984); NUCLEIC ACID HYBRIDIZATION (Nucleinsäurehybridisierung) (Herausgeber B. D. Hames & S. J. Higgins, 1984); TRANSCRIPTION AND TRANSLATION (Transkription und Translation) Herausgeber B. D. Hames & S. J. Higgins, 1984); ANIMAL CELL CULTURE (Tierzellenkultur) (Herausgeber R. I. Freshney, 1986); IMMOBILIZED CELLS AND ENZYMES (Immobilisierte Zellen und Enzyme) (IRL Press, 1986); B. Perbal, A PRACTICAL GUIDE TO MOLECULAR CLONING (Eine praktische Führung für die molekulare Clonierung) (1984); die Serien: METHODES IN ENZYMOLOGY (Methoden der Enzymologie) (Academic Press, Inc.); GENE TRANSFER VECTORS FOR MAMMALIAN CELLS (Gentransfervektoren für Säugetierzellen) (Herausgeber J. H. Miller und M. P. Calos, 1987, Cold Spring Harbor Laboratory), Methods in Enzymology Vol. 154 and Vol. 155 (Methoden der Enzymologie, Band 154 und Band 155) (Herausgeber Wu und Grossman bzw. Wu), Herausgeber Mayer und Walker (1987), IMMUNOCHEMICAL METHODS IN CELL AND MOLECULAR BIOLOGY (Immunologische Verfahren in der Zell- und Molekularbiologie) (Academic Press, London), Scopes (1987), PROTEIN PURIFICATION: PRINCIPLES AND PRACTICE (Proteinreinigung: Prinzipien und Praxis), zweite Auflage, (Springer-Verlag, N. Y.) und HANDBOOK OF EXPERIMENTAL

IMMUNOLOGY, VOLUMES I-IV (Handbuch der experimentellen Immunologie, Band I-IV), (Herausgeber D. M. Weir und C. C. Blackwell, 1986).

Alle hier im vorangegangenen und im folgenden erwähnten Patente, Patentanmeldungen und Publikationen werden durch Bezugnahme darauf hierin eingeschlossen.

Die nützlichen Materialien und Prozesse der vorliegenden Erfindung werden ermöglicht durch die Bereitstellung einer Familie von eng homologen Nucleotidsequenzen, die aus einer cDNA-Bibliothek isoliert wurden, welche aus Nucleinsäuresequenzen abgeleitet wurden, die im Plasma eines HCV-infizierten Schimpansen vorhanden waren. Diese Familie von Nucleotidsequenzen hat ihren Ursprung weder beim Menschen noch beim Schimpansen, da sie weder an Human- noch an Schimpansen-Genom-DNA von nicht infizierten Individuen hybridisiert und da Nucleotide dieser Sequenzfamilie nur in der Leber und im Plasma von Schimpansen mit HCV-Infektion vorkommen und da die Sequenz auf der Genbank nicht vorhanden ist. Außerdem zeigt diese Sequenzfamilie keine signifikante Homologie zu Sequenzen, die im HBV-Genom enthalten sind.

Die Sequenz eines Mitgliedes der Familie, die im Clon 5-1-1 enthalten ist, hat einen kontinuierlichen offenen Leserahmen (ORF), der für ein Polypeptid von etwa 50 Aminosäuren codiert. Die Seren von HCV-infizierten Menschen enthalten Antikörper, die an dieses Polypeptid binden, während die Seren von nicht infizierten Menschen keine Antikörper enthalten, die an dieses Polypeptid binden. Während schließlich die Seren von nicht infizierten Schimpansen keine Antikörper enthalten, die an dieses Polypeptid binden, werden die Antikörper in Schimpansen nach einer akuten NANBH-Infektion induziert. Darüber hinaus werden Antikörper, die an dieses Polypeptid binden in Schimpansen und Menschen, die mit HAV und HBV infiziert sind, nicht nachgewiesen. Nach diesen Kriterien ist die Sequenz eine cDNA gegen eine Virussequenz, wobei das Virus die NANBH verursacht oder damit verbunden ist; diese cDNA-Sequenz wird in Fig. 1 gezeigt. Wie weiter unten diskutiert wird, unterscheidet sich die cDNA-Sequenz in Clon 5-1-1 von der der anderen isolierten cDNAs darin, daß sie 28 extra Basenpaare enthält.

Eine Zusammensetzung anderer identifizierter Mitglieder der cDNA-Familie, die isoliert wurden, indem eine synthetische Sequenz, die einem Fragment der cDNA in Clon 5-1-1 entspricht, als Sonde verwendet wurde, wird in Fig. 3 gezeigt. Ein Mitglied der cDNA-Familie, die isoliert wurde, indem eine aus der cDNA in Clon 81 abgeleitete synthetische Sequenz verwendet wurde, wird in Fig. 5 gezeigt, und eine Zusammensetzung dieser Sequenz mit der von Clon 81 wird in Fig. 6 gezeigt. Andere Mitglieder der cDNA-Familie, einschließlich derjenigen, die in den Clonen 17f, 14i, 11b, 7f, 7e, 8h, 33c, 40b, 37b, 35, 36, 81, 32, 33b, 25c, 14c, 8f, 33f, 35f, 19g, 26g, 15c, 33g und 39c vorhanden sind, werden im Abschnitt IV. A. beschrieben. Eine Zusammensetzung der cDNAs in diesen Clonen wird in Abschnitt IV. A. 9. beschrieben und in Fig. 39 gezeigt. Die zusammengesetzte cDNA zeigt, daß sie einen kontinuierlichen offenen Leserahmen enthält und damit für ein Polyprotein codiert. Diese Daten stimmen mit der im folgenden erörterten Vermutung überein, daß HCV ein Flavivirus oder flaviartiges Virus ist.

Die Verfügbarkeit dieser in den Fig. 1-32 gezeigten Familie von cDNAs gestattet die Konstruktion von DNA-Sonden und Polypeptiden, die für die Diagnostizierung von NANBH infolge einer HCV-Infektion und für Screening-Untersuchungen bei Blutspendern sowie auch bei Spenderblut und Blutprodukten auf eine Infektion nützlich sind. Zum Beispiel ist es möglich, aus den Sequenzen DNA-Oligomere von etwa 8-10 Nucleotiden oder mehr zu synthetisieren, die als Hybridisierungs-sonden nützlich sind, um das Vorhandensein des Virusgenoms in beispielsweise Seren von Individuen, die möglicherweise das Virus beherbergen, nachzuweisen, oder die zum Screening von Spenderblut auf das Vorhandensein des Virus nützlich sind. Die Familie von cDNA-Sequenzen erlaubt auch den Entwurf und die Erzeugung von HCV-spezifischen Polypeptiden, die als Diagnosemittel für die Anwesenheit von Antikörpern, die während der NANBH entstanden, nützlich sind. Antikörper gegen gereinigte Polypeptide, die aus den cDNAs abgeleitet wurden, können ebenfalls zum Nachweis viraler Antigene in infizierten Individuen und in Blut verwendet werden.

Die Kenntnis dieser cDNA-Sequenzen erlaubt auch den Entwurf und die Produktion von Polypeptiden, die als Vakzine gegen das HCV und auch für die Produktion von Antikörpern, die wiederum als Schutz vor dieser Krankheit verwendet werden können, und/oder für die Therapie von mit HCV infizierten Individuen eingesetzt werden können.

Darüber hinaus erlaubt die Familie von cDNA-Sequenzen die weitere Charakterisierung des HCV-Genoms.

Die von diesen Sequenzen abgeleiteten Polynucleotidsonden können zum Screening von cDNA-Bibliotheken nach zusätzlichen überlappenden cDNA-Sequenzen genutzt werden, welche wiederum dazu verwendet werden können, noch mehr überlappende Sequenzen zu erhalten. Falls nicht das Genom segmentiert wird und den Segmenten gemeinsame Sequenzen fehlen, kann diese Technik verwendet werden, um die Sequenz des gesamten Genoms zu erhalten. Wenn das Genom jedoch segmentiert wird, können andere Segmente des Genoms durch Wiederholung des Lambda-gt11-serologischen Screening-Verfahrens zur Isolierung der hier beschriebenen cDNA-Clone oder auf eine alternative Weise durch Isolierung des Genoms aus gereinigten HCV-Partikeln gewonnen werden.

Die Familie von cDNA-Sequenzen und die aus diesen Sequenzen abgeleiteten Polypeptide wie auch die gegen diese Polypeptide gerichteten Antikörper sind bei der Isolierung und Identifizierung der (des) BB-NANBV-Erreger(s) nützlich. Beispielsweise können Antikörper, die gegen HCV-Epitope gerichtet sind, die in aus den cDNAs gewonnenen Polypeptiden enthalten sind, in Prozessen eingesetzt werden, die auf der Affinitätschromatographie zur Isolierung des Virus beruhen. Alternativ können die Antikörper verwendet werden, um die durch andere Techniken isolierten Viruspartikel zu identifizieren. Die viralen Antigene und das genomische Material innerhalb der isolierten Viruspartikel können dann weiter charakterisiert werden.

Die aus der weiteren Sequenzierung des (der) HCV-Genoms (Genome) sowie aus der weiteren Charakterisierung der HCV-Antigene und der Charakterisierung des Genoms gewonnenen Informationen erlauben den Entwurf und die Synthese von zusätzlichen Sonden und Polypeptiden und Antikörpern, die für die Diagnose, Vorbeugung und Therapie von HCV-induzierter NANBH sowie zum Screening von infiziertem Blut und blutähnlichen Produkten eingesetzt werden können.

Die Verfügbarkeit von Sonden für HCV, einschließlich Antigenen und Antikörpern, sowie Polynucleotiden, die aus dem Genom abgeleitet wurden, aus dem die Familie von cDNAs abgeleitet wurde, erlaubt auch die Entwicklung von Gewebekultursystemen, die für die Aufhellung der Biologie des HCV von größtem Nutzen sein werden. Dies wiederum kann zur Entwicklung neuer Behandlungsmethoden auf der Grundlage antiviraler Komponenten, die vorzugsweise die Replikation des oder die Infektion durch das HCV hemmen, führen.

Die zur Identifizierung und Isolierung des Erregers von NANBH angewandte Methode ist neuartig und kann angewandt werden bei der Identifizierung und/oder Isolierung von zuvor nicht charakterisierten Erregern, die ein Genom enthalten, und die mit einer Vielzahl von Krankheiten, einschließlich solcher, die durch Viren, Viroide, Bakterien, Pilze und Parasiten induziert werden, verbunden sind. Bei dieser Methode wurde eine cDNA-Bibliothek aus den im infizierten Gewebe aus einem infizierten Individuum vorhandenen Nucleinsäuren geschaffen. Die Bibliothek wurde in einem Vektor geschaffen, der die Expression der in der cDNA codierten Polypeptide erlaubte. Clone von Wirtszellen, die den Vektor enthielten, der ein immunologisch reaktives Fragment eines Polypeptids des Krankheitserregers exprimiert, wurden durch immunologisches Screening der Expressionsprodukte der Bibliothek mit einer Antikörper enthaltenden Körperkomponente aus einem anderen, zuvor mit dem vermutlichen Erreger infizierten Individuum selektioniert. Die Stufen des immunologischen Screening-Verfahrens schlossen die Wechselwirkung der Expressionsprodukte der cDNA enthaltenden Vektoren mit der Antikörper enthaltenden Körperkomponente eines zweiten infizierten Individuums und den Nachweis der Bildung von Antikörper-Antigen-Komplexen zwischen dem (den) Expressionsprodukt(en) und Antikörpern des zweiten infizierten Individuums ein. Die isolierten Clone werden weiterhin immunologischen Screening-Verfahren unterzogen, indem ihre Expressionsprodukte mit den Antikörper enthaltenden Körperkomponenten der anderen mit dem vermutlichen Erreger infizierten Individuen und mit Kontrollindividuen, die mit dem vermutlichen Erreger nicht infiziert wurden, in Wechselwirkung traten und die Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen mit Antikörpern aus den infizierten Individuen nachgewiesen wurde; und die cDNA enthaltenden Vektoren, die für Polypeptide codieren, die immunologisch mit Antikörpern aus infizierten Individuen und aus Individuen, die vermutlich mit dem Erreger infiziert sind, jedoch nicht mit Kontrollindividuen, reagieren, isoliert werden. Die für die Konstruktion der cDNA-Bibliothek und für das immunologische Screening benutzten infizierten Individuen müssen nicht von der gleichen Spezies sein. Die im Ergebnis dieser Methode isolierten cDNAs und ihre Expressionsprodukte und die gegen die Expressionsprodukte gerichteten Antikörper sind für die Charakterisierung und/oder das Einfangen des ätiologischen Erregers nützlich. Wie im folgenden ausführlicher beschrieben wird, wurde diese Methode erfolgreich zur Isolierung einer aus dem HCV-Genom gewonnenen Familie von cDNAs genutzt.

II. A. Herstellung der cDNA-Sequenz

Von einem Schimpansen mit chronischer HCV-Infektion gesammeltes Serum, das einen hohen Virustiter enthält, das heißt mindestens eine 10^6 Schimpanse-Infektionsdosis/ml (CID/ml), wurde zur Isolierung von viralen Partikeln verwendet; die aus diesen Partikeln isolierten Nucleinsäuren wurden als Matrize bei der Konstruktion einer cDNA-Bibliothek zum viralen Genom verwendet. Die Verfahren zur Isolierung von putativen HVC-Partikeln und für die Konstruktion der cDNA-Bibliothek in Lambda-gt 11 werden in Abschnitt IV. A. 1. diskutiert. Lambda-gt 11 ist ein Vektor, der speziell entwickelt wurde, um inserierte cDNAs als Fusionspolypeptide mit Beta-Galactosidase zu exprimieren und eine große Zahl rekombinante Phage mit spezifischen Antiseren gegen ein bestimmtes Antigen zu bilden. Die Lambda-gt 11-cDNA-Bibliothek, hergestellt aus einer cDNA-Ansammlung, die cDNA von ungefähr mittlerer Größe von 200 Basenpaaren enthält, wurde bezüglich codierter Epitope gescreent, die speziell Seren binden könnten, die von zuvor mit NANB-Hepatitis erkrankten Patienten stammten. Huynh, T. V. et al. (1985). Es wurden ungefähr 10^6 Phagen gescreent, und fünf positive Phagen wurden identifiziert, gereinigt und anschließend hinsichtlich der Spezifität der Bindung an Seren von verschiedenen Menschen und Schimpansen, die zuvor mit HCV-Agens infiziert wurden, getestet. Eine der Phagen, 5-1-1, hatte 5 der 8 getesteten menschlichen Seren gebunden. Diese Bindung schien für Seren von zuvor NANB-Hepatitisinfektionen ausgesetzten Patienten selektiv zu erfolgen, da 7 normale Blutspenderseren eine derartige Bindung nicht aufwiesen.

Die Sequenz der cDNA in dem rekombinanten Phage 5-1-1 wurde ermittelt und in Fig. 1 dargestellt. Das durch diese klonierte cDNA codierte Polypeptid, das in dem gleichen translationalen Raster wie die N-terminale Beta-Galactosidasekomponente des Fusionspolypeptids ist, wird über der Nucleotidsequenz gezeigt. Daher codiert dieses translationale offene Leseraster ein Epitop oder Epitope, die speziell durch die Seren von Patienten mit NANB-Hepatitisinfektionen erkannt werden.

Die Verfügbarkeit der cDNA in rekombinantem Phage 5-1-1 gestattete die Isolierung anderer Clone, die zusätzliche Segmente und/oder alternative Segmente der cDNA für das virale Genom enthielten. Die oben beschriebene Lambda-gt 11-cDNA-Bibliothek wurde unter Verwendung eines aus der Sequenz der klonierten 5-1-1 cDNA abgeleiteten synthetischen Polynucleotids gescreent. Dieses Screening ergab drei andere Clone, die als 81, 1-2 und 91 identifiziert wurden; die in diesen Clonen enthaltenen cDNAs wurden sequenziert. Siehe Abschnitt IV. A. 3. und IV. A. 4. Die Homologien zwischen den vier unabhängigen Clonen werden in Fig. 2 gezeigt, wo die Homologien durch vertikale Linien angezeigt werden. Nucleotidsequenzen sind ausschließlich in den Clonen 5-1-1, 81 und 91 vorhanden und werden durch kleine Buchstaben bezeichnet.

Die in den rekombinanten Phagen in den Clonen 5-1-1, 81, 1-2 vorhandenen klonierten cDNAs sind äußerst homolog und unterscheiden sich nur in zwei Regionen. Erstens ist die Nucleotidzahl 67 in Clon 1-2 ein Thyridin, während die anderen drei Clone in dieser Stellung einen Cytidinrest enthalten. Diese Substitution verändert jedoch nicht die Natur der codierten Aminosäure.

Der zweite Unterschied zwischen den Clonen besteht darin, daß Clon 5-1-1 28 Basenpaare an seinem 5'-Terminus enthält, die in anderen Clonen nicht vorhanden sind. Diese zusätzliche Sequenz kann ein 5'-terminales kloniertes Artefakt sein; 5'-terminale klonierte Artefakte werden im allgemeinen in den Produkten von cDNA-Verfahren beobachtet.

Von der 5'-Region und 3'-Region der HCV-cDNA in Clon 81 abgeleitete synthetische Sequenzen wurden zum Screenen und Isolieren von cDNAs aus der Lambda-gt 11-NANBV-cDNA-Bibliothek verwendet, die die Clon-81-cDNA (Abschnitt IV. A. 5.) überlappen. Die Sequenzen der resultierenden cDNAs, die in Clon 36 bzw. Clon 32 vorhanden sind, werden in Fig. 5 und Fig. 7 gezeigt.

Ein auf der 5'-Region von Clon 36 basierendes synthetisches Polynucleotid wurde gleichfalls zum Screenen und Isolieren von cDNAs aus der Lambda-gt 11-NANBV-cDNA-Bibliothek verwendet, die die Clon-36-cDNA (Abschnitt IV. A. 8.) überlappen. Ein gereinigter Clon von rekombinante Phage enthaltender cDNA, das an die synthetische Polynucleotidsonde hybridisierte, wurde als Clon 35 bezeichnet und die NANBV-cDNA-Sequenz, die in diesem Clon enthalten ist, wird in Fig. 8 gezeigt.

Durch Anwendung des Verfahrens zur Isolierung überlappender cDNA-Sequenzen erhielt man zusätzliche upstream- und downstream-HCV-cDNA-Sequenzen. Die Isolierung dieser Clone wird später in Abschnitt IV. A. beschrieben. Die Analyse der Nucleotidsequenzen von innerhalb der isolierten Clone codierten HCV-cDNAs zeigen, daß die zusammengesetzte cDNA ein langes kontinuierliches offenes Leseraster enthält. Fig. 26 zeigt die Sequenz der zusammengesetzten cDNA aus diesen Clonen gemeinsam mit dem darin codierten mutmaßlichen HCV-Polypeptid. Die Beschreibung des Verfahrens zur Gewinnung der cDNA-Sequenzen ist meistens von historischem Interesse. Die resultierenden Sequenzen (und ihre Komplemente) sind hierin bereitgestellt, und die Sequenzen, oder irgendein Teil davon, können unter Verwendung von synthetischen Verfahren oder durch eine Kombination der synthetischen Verfahren mit Wiederherstellung von Teilsequenzen unter Verwendung ähnlicher wie der hierin beschriebenen Verfahren hergestellt werden. Lambda-gt 11-Stämme, die aus der HCV-cDNA-Bibliothek und aus den Clonen 5-1-1, 81, 1-2 und 91 repliziert wurden, wurden entsprechend den Bestimmungen des Budapester Vertrags bei der American-Type Culture Collection (ATCC), 12301 Parklawn Dr., Rockville, Maryland 20852 hinterlegt und mit den folgenden Zugriffsnummern bezeichnet.

Lambda-gt 11	ATCC-Nr.	Hinterlegungsdatum
HCV-cDNA-Bibliothek	40394	1. Dez. 1987
Clon 81	40388	17. Nov. 1987
Clon 91	40389	17. Nov. 1987
Clon 1-2	40390	17. Nov. 1987
Clon 5-1-1	40391	18. Nov. 1987

Bei der Bewilligung und Ausgabe dieser Anmeldung als ein Patent der Vereinigten Staaten worden alle Beschränkungen bezüglich der Verfügbarkeit dieser Hinterlegungen unwiderruflich aufgehoben; der Zugang zu den designierten Hinterlegungen wird während des Anhängigseins der obigen Anmeldung demjenigen ermöglicht, der durch den dafür unter 37 CFR 1.14 und 35 USC 1.22 berechtigten Patentbeauftragten bestimmt wird. Darüber hinaus werden die bezeichneten Hinterlegungen über einen Zeitraum von dreißig (30) Jahren vom Datum der Hinterlegung an, oder für fünf (5) Jahre nach der letzten Anforderung an die Hinterlegung aufbewahrt; oder über die geltende Lebensdauer des US-Patents, je nachdem, was länger ist. Diese Hinterlegungen und andere hierin erwähnte hinterlegte Materialien sind nur der Zweckdienlichkeit halber beabsichtigt und nicht erforderlich, um die vorliegende Erfindung im Sinne der Beschreibung in die Praxis umzusetzen. Die HCV-cDNA-Sequenzen in allen der hinterlegten Materialien sind darin unter Bezugnahme darauf eingeschlossen.

Die obige Beschreibung, die sich mit dem „walking“ eines Genoms durch Isolieren überlappender cDNA-Sequenzen aus der HCV-Lambda-gt 11-Bibliothek befaßt, stellt ein Verfahren zur Verfügung, durch das cDNAs entsprechend dem gesamten HCV-Genom isoliert werden können. Für Fachleute ist jedoch klar, daß die darin bereitgestellte Information andere Verfahren für die Isolierung dieser cDNAs ermöglicht. Einige dieser Verfahren werden in Abschnitt IV. A., siehe unten, beschrieben.

II. B. Herstellung von viralen Polypeptiden und Fragmenten

Die Verfügbarkeit von cDNA-Sequenzen, entweder von jenen, die durch Nutzung der in den Fig. 1 bis 26 dargestellten cDNA-Sequenzen isoliert wurden, wie weiter unten ausgeführt wird, wie auch der cDNA-Sequenzen in diesen Figuren, gestattet die Konstruktion der Expressionsvektoren, die die antigenwirksamen Regionen des in jedem Strang codierten Polypeptids codieren. Diese antigenwirksamen Regionen können aus den Überzugs- oder Hüllantigenen oder aus Kernantigenen einschließlich z. B. Polynucleotidbindungsproteinen, Polynucleotidpolymerase(n) und anderen viralen Proteinen hergeleitet werden, die für die Replikation und/oder Assemblierung (assembly) der Viruspartikel erforderlich sind. Die gewünschten Polypeptide codierenden Fragmente werden aus cDNA-Clonen unter Verwendung herkömmlicher Restriktionsdigestion oder synthetischer Verfahren abgeleitet und in Vektoren ligiert, die z. B. Teile von Fusionssequenzen wie Beta-Galactosidase oder Superoxiddismutase (SOD), vorzugsweise SOD, enthalten. Verfahren und Vektoren, die für die Erzeugung von Polypeptiden nützlich sind, die Fusionssequenzen von SOD enthalten, werden in der EPO-Veröffentlichungs-Nr. 0196056, veröffentlicht am 10. Oktober 1986, beschrieben. Vektoren, die Fusionspolypeptide von SOD- und HCV-Polypeptiden, d. h. NANB₅₋₁₋₁, NANB₈₁ und C 100-3 codieren, die in einer Zusammensetzung von HCV-cDNAs codiert sind, werden in den Abschnitten IV. B. 1, IV. B. 2 bzw. IV. B. 4 beschrieben. Jeder gewünschte Abschnitt der HCV-cDNA, die ein offenes Leseraster in jedem der beiden codierenden Stränge enthält, kann als rekombinantes Polypeptid, z. B. als matures oder Fusionsprotein, gewonnen werden; alternativ dazu kann ein in der cDNA codiertes Polypeptid durch chemische Synthese hergestellt werden.

Die das gewünschte Polypeptid codierende DNA, ganz gleich, ob in fusionierter oder maturer Form, und je nachdem, ob eine Signalsequenz, die Sekretion gestattet, enthalten ist oder nicht, kann in Expressionsvektoren ligiert werden, die für jeden Wirt geeignet sind. Sowohl eukaryontische als auch prokaryontische Wirtssysteme werden gegenwärtig bei der Bildung von rekombinanten Polypeptiden verwendet, und eine Zusammenfassung von einigen der üblichen Kontrollsysteme und Wirtszelllinien wird in Abschnitt III. A., siehe unten, gegeben. Das Polypeptid wird dann aus lysierten Zellen oder aus dem Kulturmedium isoliert und in dem Umfang gereinigt, wie es für den beabsichtigten Verwendungszweck erforderlich ist. Die Reinigung kann nach im Fachgebiet bekannten Verfahren, z. B. Salzfraktionierung, Chromatographie auf Ionenaustauschharzen, Affinitätschromatographie, Zentrifugation usw. erfolgen.

Bezüglich der Vielfalt von Verfahren für die Reinigung von Proteinen siehe z. B. „Methods in Enzymology“ (Verfahren in der Enzymologie). Derartige Polypeptide können als Diagnosen verwendet werden, oder diejenigen, die Neutralisation von Antikörpern bewirken, können in Vakzine formuliert werden. Die gegen diese Polypeptide wirkenden Antikörper können auch als Diagnosen oder für die passive Immuntherapie verwendet werden. Daneben sind, wie hier in Abschnitt II. J. später erörtert wird, die Antikörper zu diesen Polypeptiden für das Isolieren und Identifizieren der HCV-Partikel nützlich.

Die HCV-Antigene können auch aus HCV-Virionen isoliert werden. Die Virionen können in HCV-infizierten Zellen in der Gewebekultur oder in einem infizierten Wirt gezüchtet werden.

II. C. Herstellung von antigenen Polypeptiden und Konjugation mit Trägermitteln

Eine antigene Region eines Polypeptids ist im allgemeinen relativ klein, typisch sind 8 bis 10 Aminosäuren oder eine geringere Länge. Fragmente von nur 5 Aminosäuren können eine antigene Region charakterisieren. Diese Segmente können Regionen des HCV-Antigens entsprechen. Demzufolge können, bei Verwendung der cDNAs von HCV als Basis, DNAs, die kurze Segmente von HCV-Polypeptiden codieren, rekombinant entweder als Fusionsproteine oder als isolierte Polypeptide exprimiert werden.

Außerdem können kurze Aminosäuresequenzen bequem durch chemische Synthese gewonnen werden. Zum Beispiel in dem Falle, wo das synthetisierte Polypeptid korrekt konfiguriert wird, um das richtige Epitop zu liefern, jedoch zu klein ist, um immunisierend zu wirken, kann es an einen geeigneten Trägerstoff gebunden werden.

Eine Reihe von Techniken für die Erzielung derartiger Verbindungen sind den Fachleuten bekannt einschließlich der Bildung von Disulfidverbindungen unter Verwendung von N-Succinimidyl-3-(2-pyridylthio)propionat (SPDP) und Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexan-1-carboxylat (SMCC), die von der Pierce Company, Rockford, Illinois, erworben wurden. (Falls das Peptid keine Sulfhydrylgruppe aufweist, kann dieses durch Addition eines Cystein-Restes bereitgestellt werden.) Diese Reagenzien bewirken eine Disulfidbildung zwischen ihnen und den Peptidcystein-Resten an einem Protein sowie eine Amidbindung durch das Epsilon-Amino an ein Lysin, oder andere freie Aminogruppen in anderen. Die Vielfalt derartiger Disulfid/Amid-bildender Agenzien ist bekannt, siehe zum Beispiel Immun. Rev. (1982) 62:185.

Andere bifunktionelle Kopplungsagenzien bilden eher eine Thioether- als eine Disulfidverbindung. Viele diese Thioether-bildenden Agenzien stehen handelsüblich zur Verfügung und umfassen wirksame Ester von 6-Maleinsäurecapronsäure, 2-Bromessigsäure, 2-Jodessigsäure, 4-(N-Maleimidomethyl)-cyclohexan-1-carbonsäure und dergleichen. Die Carboxylgruppen können durch Kombination mit Succinimid oder 1-Hydroxyl-2-nitro-4-sulfonsäure-Natriumsalz aktiviert werden. Die vorstehende Aufzählung ist als nicht erschöpfend anzusehen und Modifikationen der genannten Verbindungen können natürlich verwendet werden.

Es kann jede Trägersubstanz verwendet werden, die selbst nicht die Erzeugung von für den Wirt schädlichen Antikörpern induziert. Geeignete Trägermittel sind typischerweise große, langsam metabolisierte Makromoleküle wie Proteine; Polysaccharide wie Latex-funktionalisierte Sepharose, Agarose, Cellulose, Celluloseperlen und dergleichen; polymere Aminosäuren wie Polyglutaminsäure, Polylysin und dergleichen; Aminosäurecopolymere; und inaktive Viruspartikel, siehe z. B. Abschnitt II. D. Besonders nützliche Proteinsubstrate sind Serumalbumine, „keyhole limpet“ Hämocyanin, Immunglobulinmoleküle, Thyroglobulin, Eialbumin, Tetanustoxoid und andere den Fachleuten allgemein bekannte Proteine.

II. D. Herstellung von HCV-Epitope enthaltenden Hybridpartikelimmunogenen

Die Immunogenizität der Epitope von HCV kann auch durch die Herstellung derselben in Säugetier- oder Hefesystemen, die mit Partikel-bildenden Proteinen fusionieren und assemblieren, wie z. B. das mit Hepatitis-B-Oberflächenantigen assoziierte, verstärkt werden. Die Konstrukte, in denen das NANBV-Epitop direkt an Partikel-bildende Protein-codierende Sequenzen gebunden ist, erzeugen Hybride, die bezüglich des HCV-Epitops immunisierend sind. Außerdem enthalten alle der hergestellten Vektoren gegenüber HBV spezifische Epitope mit verschiedenen Immunogenizitätsgraden wie z. B. das pre-S-Peptid. Somit sind aus Partikel-bildendem Protein konstruierte Partikel, die HCV-Sequenzen einschließen, bezüglich dem HCV und HBV immunisierend. Das Hepatitisoberflächenantigen (HBsAg) wurde in *S. cerevisiae* (Valenzuela u. a. [1982]) wie z. B. auch in Säuretierzellen (Valenzuela, P., u. a. [1984]) vorhandenen Partikeln gebildet und assembliert. Die Bildung derartiger Partikel ergab, daß die Immunogenizität der Monomeruntereinheit verstärkt wird. Die Konstrukte können auch das immunodominante Epitop von HBsAg enthalten, die 55 Aminosäuren der presurface (pre-S)-Region umfassen, Neurath u. a. (1985). Konstrukte der pre-S-HBsAg-Partikel, die in Hefe exprimierbar sind, werden in der EPO 174 444, veröffentlicht am 19. März 1986, offenbart; Hybride einschließlich heterologer viraler Sequenzen für die Hefeexpression werden in der EPO 175 261, veröffentlicht am 26. März 1986, offenbart. Beide Anmeldungen werden hierin an den genannten Zessionär abgetreten und sind hierin durch Bezugnahme darauf eingeschlossen. Diese Konstrukte können auch in Säugetierzellen, wie in China-Hamster-Ovarium (CHO)-Zellen, unter Verwendung eines SV40-Dihydrofolat-Reduktasevektors (Michelle u. a. [1984]) exprimiert werden. Außerdem können Teile der Partikel-bildenden Protein-codierenden Sequenz durch ein HCV-Epitop codierende Codone ausgetauscht werden. Bei diesem Austausch können Regionen, die bei der Vermittlung der Aggregation der Einheiten nicht erforderlich sind, um immunisierende Partikel in Hefe oder Säugetieren zu bilden, getilgt werden, so daß auf diese Weise zusätzliche mit dem HCV-Epitop konkurrierende HBV-antigenische Stellen eliminiert werden.

II. E. Herstellung von Vakzinen

Vakzine können aus einem oder mehreren immunisierenden Polypeptiden hergestellt werden, die aus einer HCV-cDNA wie auch aus den in den Fig. 1 bis 32 dargestellten cDNA-Sequenzen oder aus dem HCV-Genom, dem sie entsprechen, gewonnen werden. Die zwischen HCV und Flaviviren beobachtete Homologie liefert die Polypeptide betreffende Information, welche als Vakzine höchstwahrscheinlich am effektivsten sind wie auch hinsichtlich der Regionen des Genoms, in die sie codiert sind. Die allgemeine Struktur des Flavivirusgenoms wird bei Rice u. a. (1986) diskutiert. Es wird angenommen, daß die Flavivirusgenomische RNA die einzige Virus-spezifische mRNA-Spezies ist und sie wird in drei virale Strukturproteine translatiert, d. h. C, M und E wie auch in zwei große nichtstrukturelle Proteine, NV4 und NV5, und in eine Komplexgruppe kleinerer nichtstruktureller Proteine. Es ist bekannt, daß sich die Hauptneutralisierungsepitope für Flaviviren im E-(Hüll)-Protein befinden (Roehring [1986]). Die das entsprechende HCV-E-Gen und Polypeptid codierende Region kann aufgrund der Homologie zum Flavivirus vorausgesagt werden. Somit können rekombinante Polypeptide umfassende Vakzine Epitope von HCV-E enthalten. Diese Polypeptide können in Bakterien-, Hefe- oder Säugetierzellen exprimiert werden, oder können wahlweise aus viralen Präparationen isoliert werden. Es wird auch angenommen, daß die anderen strukturellen Proteine ebenfalls Epitope enthalten, die schützende Anti-HCV-Antikörper bewirken. Folglich können auch in HCV-Vakzinen Polypeptide verwendet werden, die entweder einzeln oder in Kombination die Epitope E, C und M enthalten. Zusätzlich zu dem obigen wurde nachgewiesen, daß die Immunisierung mit NS1 (nichtstrukturelles Protein 1) in Schutz gegen Gelbfieber resultiert (Schlesinger u. a. [1986]). Dieses ist wahr, wenn auch die Immunisierung nicht die Entstehung von neutralisierenden Antikörpern bewirkte. Somit ist wahrscheinlich, besonders da dieses Protein unter den Flaviviren äußerst konserviert zu sein scheint, daß HCV-NS1 ebenfalls gegen HCV-Infektion schützt. Darüber hinaus ist auch bekannt, daß nichtstrukturelle Proteine Schutz gegen virale Pathogenität bewirken, auch wenn sie nicht die Erzeugung von neutralisierenden Antikörpern verursachen.

Angesichts der obigen Ausführungen können multivalente Vakzine gegen HCV ein oder mehrere strukturelle Proteine, und/oder ein oder mehrere nichtstrukturelle Proteine einschließen. Diese Vakzine können zum Beispiel rekombinante HCV-Polypeptide und/oder aus Virionen isolierte Polypeptide enthalten. Außerdem ist es möglich, inaktiviertes HCV in Vakzinen zu verwenden; die Inaktivierung kann durch die Herstellung von Viruslysaten oder durch anderen den Fachleuten bekannte Mittel erfolgen, die die Inaktivierung der Flaviviren bewirken, zum Beispiel durch die Behandlung mit organischen Lösungsmitteln oder

Detergenzien, oder durch die Behandlung mit Formalin. Daneben können Vakzine auch aus abgeschwächten HCV-Stämmen hergestellt werden. Die Herstellung der abgeschwächten HCV-Stämme wird später beschrieben.

Es ist bekannt, daß einige der in Flaviviren vorhandenen Proteine äußerst konservierte Regionen enthalten, so daß einige immunologische Quer-Reaktivität zwischen HCV und anderen Flaviviren angenommen werden muß. Es ist möglich, daß zwischen den Flaviviren und HCV geteilte Epitope schützende Antikörper gegen eine oder mehrere Erkrankungen, die durch diese pathogenen Agenzien hervorgerufen wurden, bewirken. Daher könnte es möglich sein, Mehrzweckvakzine auf der Grundlage dieses Wissens zu entwickeln.

Die Herstellung von Vakzinen, die ein immunisierendes Polypeptid(e) als wirksamen Bestandteil enthalten, ist den Fachleuten bekannt. Typisch ist die Herstellung derartiger Vakzine als injizierbare Stoffe, entweder als flüssige Lösungen oder Suspensionen; feste Formen, die für die Lösung oder Suspension in einer Flüssigkeit vor der Injektion geeignet sind, können ebenfalls hergestellt werden. Das Präparat kann auch emulgiert werden, oder das Protein kann in Liposome eingekapselt werden. Die immunisierenden Wirkstoffe werden oftmals mit pharmazeutisch annehmbaren und mit dem Wirkstoff verträglichen Trägersubstanzen gemischt. Geeignete Trägersubstanzen sind z. B. Wasser, physiologische Kochsalzlösung, Dextrose, Glycerol, Ethanol usw. und Kombinationen davon. Falls gewünscht, können die Vakzine kleine Mengen von Hilfssubstanzen wie Benetzung- oder Emulgiermittel, pH-Puffermittel und/oder Adjuvanzen enthalten, die die Wirksamkeit der Vakzine verstärken. Beispiele für wirksame Adjuvanzen schließen ein, sind jedoch darauf nicht beschränkt Aluminiumhydroxid, N-Acetylmuramyl-L-threonyl-D-isoglutamin (thr-MPD), 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-glycero-3-hydroxyphosphoryl-oxy)ethylamin (CGP 19835A, bezeichnet als MTP-PE) und RIBI, das drei aus Bakterien extrahierte Bestandteile enthält, Monophosphoryllipid A, Trehalosedimycolat und Zellwandskeletton (MPL + TDM + CWS) in 2% Squalene/Tween-80-Emulsion. Die Wirksamkeit eines Adjuvans kann durch Messen der Antikörpermengen ermittelt werden, die gegen ein immunisierendes Polypeptid gerichtet ist, das eine HCV-antigene Sequenz enthält, die sich aus der Verabreichung dieses Polypeptids in Vakzinen ergibt, die ebenfalls aus verschiedenen Adjuvanzen bestehen.

Die Vakzine werden üblicherweise parenteral, durch Injektion zum Beispiel subkutan oder intramuskulär verabreicht. Weitere Rezepturen, die für andere Verabreichungsformen geeignet sind, schließen Suppositorien und in einigen Fällen orale Rezepturen ein. Suppositorien können traditionelle Binde- und Trägermittel, z. B. Polyalkylenglycole oder Triglyceride umfassen; derartige Suppositorien können aus Gemischen gebildet werden, die einen Wirkstoffanteil im Bereich von 0,5% bis 10%, vorzugsweise von 1% bis 2%, enthalten. Orale Rezepturen schließen solche normalerweise angewandten Trägersubstanzen ein wie z. B. pharmazeutische Qualitäten von Mannitol, Lactose, Stärke, Magnesiumstearat, Natriumsaccharin, Cellulose, Magnesiumcarbonat und dergleichen. Diese Zusammensetzungen können die Form von Lösungen, Suspensionen, Tabletten, Pillen, Kapseln, langzeitwirkenden Rezepturen oder Pulvern aufweisen und 10% bis 95% des Wirkstoffs, vorzugsweise 25% bis 70%, enthalten.

Die Proteine können in neutraler oder salziger Form in die Vakzine formuliert werden. Pharmazeutisch annehmbare Salze umfassen Säureadditionssalze (die mit freien Aminogruppen des Peptids gebildet werden) und die mit anorganischen Säuren, z. B. Chlorwasserstoff- oder Phosphorsäuren, oder solchen organischen Säuren wie Essig-, Oxal-, Tartar-, Maleinsäure usw., gebildet werden. Die mit den freien Carboxylgruppen gebildeten Salze können auch von anorganischen Basen, z. B. Natrium-, Kalium-, Ammonium-, Calcium- oder Eisen(III)-hydroxiden, oder solchen anorganischen Basen wie Isopropylamin, Trimethylamin, 2-Ethylaminoethanol, Histidin, Procain und dergleichen abgeleitet werden.

II.F. Dosierung und Verabreichung von Vakzinen

Die Vakzine werden in einer mit der Dosierungsformulierung kompatiblen Weise verabreicht und in einer solchen Menge, die prophylaktisch und/oder therapeutisch wirksam ist. Die zu verabreichende Menge liegt im allgemeinen im Bereich von 5 Mikrogramm bis 250 Mikrogramm Antigen pro Dosis und hängt von der zu behandelnden Person ab, der Fähigkeit des Immunsystems der Person Antikörper zu synthetisieren und dem gewünschten Schutzgrad ab. Genaue Mengen des erforderlichen Wirkstoffs, der verabreicht werden soll, hängen von der Beurteilung des Arztes ab und können für jede Person unterschiedlich sein.

Das Vakzin kann als Einzeldosis oder vorzugsweise als mehrfache Dosis verabreicht werden. Eine Mehrfachdosisverordnung bedeutet, daß ein Hauptvakzinationsverlauf aus 1 bis 10 einzelnen Dosen bestehen kann, an die sich andere Dosen anschließen, die während nachfolgender Zeitintervalle, die erforderlich sind, um die Immunitätsreaktion aufrechtzuerhalten oder wieder zu verstärken, z. B. in 1 bis 4 Monat(en) eine zweite Dosis und, falls erforderlich, nach mehreren Monaten eine weitere Dosis oder mehrere Dosen, verabreicht werden. Das Dosierungsschema wird auch, d. h. mindestens teilweise, anhand des Bedarfs des Individuums ermittelt und hängt von der Einschätzung des Arztes ab.

Darüber hinaus kann das immunisierende HCV-Antigen(e) enthaltende Vakzin in Verbindung mit anderen immuno-regulierenden Mitteln, z. B. Immunglobulinen, verabreicht werden.

II.G. Herstellung von Antikörpern gegen HCV-Epitope

Die wie zuvor geschildert hergestellten immunisierenden Polypeptide werden zur Erzeugung von Antikörpern, und zwar sowohl von polyclonalen als auch von monoclonalen, verwendet. Wenn polyclonale Antikörper gewünscht werden, wird ein ausgewähltes Säugetier (z. B. eine Maus, Ziege, ein Kaninchen, Pferd usw.) mit einem Immunität erzeugenden Polypeptid, das ein oder mehrere HCV-Epitop(e) trägt, immunisiert. Das Serum des immunisierten Tieres wird gesammelt und entsprechend den bekannten Prozeduren behandelt. Wenn das polyclonale Antikörper gegenüber HCV-Epitop enthaltende Serum Antikörper gegen andere Antigene enthält, können die polyclonalen Antikörper durch Immunoaffinitätschromatographie gereinigt werden. Techniken für die Erzeugung und Verarbeitung polyclonaler Antiseren sind im Fachgebiet bekannt, siehe z. B. Mayer und Walker (1987).

Im anderen Falle können polyclonale Antikörper von einem Säugetier isoliert werden, das sich zuvor mit HCV infiziert hatte. Ein Beispiel für ein Reinigungsverfahren von Antikörpern gegen HCV-Epitope aus Serum von einem infizierten Individuum, das auf Affinitätschromatographie und unter Nutzung eines Fusionspolypeptids von SOD und eines innerhalb cDNA-Clon 5-1-1 codierten Polypeptids basiert, wird in Abschnitt V.E. dargestellt.

Monoclonale Antikörper, die gegen HCV-Epitope gerichtet sind, können durch einen Fachmann ebenfalls leicht hergestellt werden. Die generelle Verfahrensweise für die Herstellung monoclonaler Antikörper durch Hybridomas ist allgemein bekannt. Immortale Antikörper-produzierende Zelllinien können durch Zellfusion und auch durch andere Techniken, wie direkte

Transformation von B-Lymphocyten mit geschwulstbildender DNA oder Transfektion mit dem Epstein-Barr-Virus, erzeugt werden. Siehe z. B. M. Schreier u. a., (1980); Hammerling u. a. (1981); Kennett u. a. (1980); siehe auch US-Patent-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. Gegen HCV-Epitope hergestellte monoclonale Antikörper können hinsichtlich ihrer unterschiedlichen Eigenschaften, d. h. Isotyps, Epitopaffinität usw. anhand von Listen gescreent werden.

Antikörper, sowohl monoclonale als auch polyclonale, die gegen HCV-Epitope gerichtet sind, sind besonders nützlich bei der Diagnose, und jene, die neutralisierend wirken, sind bei der passiven Immunotherapie nützlich. Monoclonale Antikörper können speziell dazu verwendet werden, Anti-Idiotypus-Antikörper zu entwickeln.

Anti-Idiotypus-Antikörper sind Immunoglobuline, die ein „inneres Ebenbild“ des Antigens des infektiösen Agens, gegen das der Schutz gewünscht wird, tragen. Siehe z. B. Nisonoff, A., u. a. (1981) und Dreesman u. a. (1985).

Techniken für die Züchtung von Anti-Idiotypus-Antikörpern sind im Fachgebiet allgemein bekannt. Siehe z. B. Grzych (1985), MacNamara u. a. (1984) und Uytdehaag u. a. (1985). Diese Anti-Idiotypus-Antikörper können auch für die Behandlung von NANBH wie auch für eine Aufhellung der immunisierenden Regionen des HCV-Antigens nützlich sein.

II.H. Diagnostische Oligonucleotidsonden und -kits

Unter Verwendung der offenbaren Teile der isolierten HCV-cDNAs als Grundlage, einschließlich jener in den Fig. 1 bis 32, können Oligomere von ungefähr 8 Nucleotiden oder mehr, entweder durch Exzision oder synthetisch, hergestellt werden, die mit dem HCV-Genom hybridieren und bei der Identifikation des Virusagens bzw. der Virusagenzien, sowie bei der Charakterisierung der Virusgenome wie auch beim Nachweis der Viren in erkrankten Menschen nützlich ist. Die Sonden für HCV-Polynucleotide (natürliche oder abgeleitete) sind von einer Länge, die den Nachweis von einzigartigen Virussequenzen durch Hybridisierung gestatten. Während 6 bis 8 Nucleotide eine bearbeitungsfähige Länge darstellen, werden Sequenzen von 10 bis 12 Nucleotiden bevorzugt, und etwa 20 Nucleotide erscheinen eine optimale Länge zu sein. Diese Sequenzen werden vorzugsweise aus Regionen abgeleitet, denen es an Heterogenität mangelt. Diese Sonden können unter Verwendung von Routinemethoden, einschließlich automatisierter Oligonucleotidsyntheseverfahren hergestellt werden. Unter den nützlichen Sonden sind z. B. der Clon 5-1-1 und die hierin offenbaren zusätzlichen Clone wie auch die verschiedenen Oligomere, die bei der Sondierung der cDNA-Bibliotheken, die im weiteren Text bekanntgegeben werden, nützlich sind. Ein Komplement zu irgendeinem einzigartigen Teil des HCV-Genoms wird ausreichend sein. Für die Verwendung als Sonden ist die vollständige Komplementarität wünschenswert, obgleich dieses unnötig sein kann, da sich die Länge des Fragments vergrößert.

Für die Verwendung derartiger Sonden als Diagnosemittel wird die zu analysierende biologische Probe wie Blut oder Serum, falls gewünscht, behandelt, um die darin enthaltenen Nucleinsäuren zu extrahieren. Die aus der Probe resultierende Nucleinsäure kann der Gelelektrophorese oder anderen Größentrennungsvorgängen unterzogen werden; im anderen Falle können die Nucleinsäureproben ohne Größentrennung punktförmig aufgebracht werden. Anschließend werden die Proben markiert.

Geeignete Markierungen und Methoden für die Markierung der Proben sind im Fachgebiet bekannt und schließen z. B. durch nick-Translation oder Kinase, Biotin, fluoreszierende Sonden und chemilumineszente Sonden eingefügte radioaktive Markierungen ein. Die aus der Probe extrahierten Nucleinsäuren werden dann mit der markierten Sonde unter Hybridisierungsbedingungen, die geeigneten Kontrollen unterworfen sind, behandelt.

Die Sonden können zu dem HCV-Genom vollständig komplementär gemacht werden. Daher sind gewöhnlich sehr strenge Kontrollbedingungen wünschenswert, um falsch-positive Resultate zu verhindern. Die strengen Kontrollbedingungen sollten jedoch nur angewendet werden, wenn die Sonden zu Regionen des Virusgenoms mit mangelnder Heterogenität komplementär sind.

Die stringenter Kontrolle unterworfenen Hybridisierung wird durch eine Anzahl Faktoren während der Hybridisierung und während des Waschverfahrens bestimmt, einschließlich der Temperatur, Ionenstärke, Zeitdauer und Formamidkonzentration. Diese Faktoren werden z. B. von Maniatis, T. (1982) umrissen.

Im allgemeinen wird davon ausgegangen, daß die HCV-Genomsequenzen im Serum von infizierten Individuen in relativ niedrigen Anteilen, d. h. von ungefähr 10^2 bis 10^3 Sequenzen pro ml vorhanden sind. Diese Größenordnung kann es erforderlich machen, daß bei den Hybridisierungsassays Verstärkungstechniken angewendet werden. Derartige Techniken sind im Fachgebiet bekannt. Das von der Enzo Biochemical Corporation zur Verfügung gestellte „Bio-Bridge“-System verwendet z. B. terminale Desoxynucleotidtransferase, um an eine DNA-Sonde nichtmodifizierte 3'-poly-dT-Schwänze anzufügen. Die poly-dT-tailed Sonde wird zur Targetnucleotidsequenz hybridisiert und anschließend zu einem Biotin-modifizierten poly-A. Die PCT-Anmeldung 84/03520 und EPA 124221 beschreiben ein DNA-Hybridisierungsassay, indem: (1) Analyt zu einer einzelsträngigen DNA-Sonde hybridisiert wird, die zu einem Enzym-markierten Oligonucleotid komplementär ist; und (2) das resultierende „tailed“ Duplex wird zu einem Enzym-markierten Oligonucleotid hybridisiert. Die EPA 204510 beschreibt einen DNA-Hybridisierungsassay, bei dem Analyt-DNA mit einer Sonde in Berührung gebracht wird, die einen Schwanz hat, wie einen poly-dT-Schwanz, einen Verstärkerstrang, der eine Sequenz hat, die an den Schwanz der Sonde, wie eine poly-A-Sequenz, hybridisiert und in der Lage ist, eine Vielzahl markierter Stränge zu binden. Eine besonders wünschenswerte Technik kann zuerst die Amplifizierung der Target-HCV-Sequenzen in Seren auf ungefähr das 10000fache beinhalten, d. h. auf ungefähr 10^6 Sequenzen/ml. Dieses kann z. B. durch die Technik von Saiki u. a. (1986) erreicht werden. Die amplifizierte(n) Sequenz(en) kann bzw. können dann unter Nutzung eines Hybridisierungsassays, der in der gleichfalls anhängigen US-Anmeldung, Anwalt Docket-Nr. 2300-0171, die am 15. Oktober 1987 eingereicht und an den darin genannten Zessionär abgetreten wurde und hiermit unter Bezugnahme darauf eingeschlossen ist, nachgewiesen werden. Dieser Hybridisierungsassay, der Sequenzen in einer Höhe von 10^6 /ml nachweisen soll, nutzt Nucleinsäuremultimere, die sich an die einzelsträngige Analyt-Nucleinsäure und ebenfalls an eine Vielzahl einzelsträngiger markierter Oligonucleotide binden. Ein geeigneter Lösungsphase-Sandwich-Assay, bei dem markierte Polynucleotidsonden verwendet werden können, und die Methoden für die Herstellung von Sonden werden in der EPO 225307 (?), veröffentlicht am 16. Juni 1987, Anmeldeaktenzeichen-Nr. 807,624 beschrieben, die an den hierin genannten Zessionär abgetreten und hiermit unter Bezugnahme darauf eingeschlossen wird.

Die Sonden können in Diagnose-Kits verpackt werden. Diagnose-Kits beinhalten die Sonden-DNA, die markiert sein kann; im anderen Fall kann die Sonden-DNA nicht markiert sein und die Zusatzstoffe für die Markierung können in dem Kit enthalten sein. Der Kit kann auch andere geeignete verpackte Reagenzien und Materialien enthalten, die für das spezielle Hybridisierungsprotokoll benötigt werden, wie z. B. Standards und auch Vorschriften für die Durchführung des Tests.

II.I. Immunoassay und Diagnose-Kits

Beide Polypeptide, die immunologisch mit HCV-Antikörper enthaltendem Serum reagieren, z. B. jene, die von den Clonen abgeleitet oder in diesen codiert wurden und in Abschnitt IV.A. beschrieben sind, sowie deren Zusammensetzungen (siehe Abschnitt IV.A.) und die Antikörper, die gegen die HCV-spezifischen Epitope in diesen Polypeptiden entwickelt wurden, siehe z. B. Abschnitt IV.E., sind bei Immunoassays zum Nachweis der Anwesenheit von HCV-Antikörpern, oder hinsichtlich der Anwesenheit des Virus und/oder viralen Antigenen in biologischen Proben, einschließlich z. B. Blut- oder Serumproben nützlich. Die Gestaltung der Immunoassays wird häufig verändert und eine Vielzahl davon ist im Fachgebiet bekannt. Der Immunoassay kann z. B. ein Virusantigen nutzen, z. B. ein Polypeptid, das von irgendeinem der HCV-cDNA enthaltenden Clonen abgeleitet wurde, siehe Abschnitt IV.A., oder von den zusammengesetzten cDNAs, die von den cDNAs in diesen Clonen abgeleitet wurden, oder vom HCV-Genom, von dem die cDNA in diesen Clonen abgeleitet wurden; im anderen Falle kann der Immunoassay eine Kombination der aus diesen Quellen abgeleiteten Virusantigene verwenden. Es kann z. B. verwendet werden: ein monoklonaler Antikörper, der gegen ein Virusantigen(e) gerichtet ist, eine Kombination von monoklonalen Antikörpern, die gegen ein Virusantigen gerichtet ist, monoklonale Antikörper, die gegen unterschiedliche Virusantigene gerichtet sind, polyclonale Antikörper, die gegen das gleiche Virusantigen gerichtet sind, oder polyclonale Antikörper, die gegen unterschiedliche Virusantigene gerichtet sind. Die Protokolle können z. B. auf Konkurrenz-, oder auf direkten Reaktions- oder auf Sandwich-artigen Assays basieren. Die Protokolle können z. B. auch feste Unterlagen verwendet, oder können durch Immunopräzipitation zustande kommen. Die meisten Assays beinhalten die Verwendung eines markierten Antikörpers oder Polypeptids; die Markierungen können z. B. durch fluoreszierende, chemilumineszente, radioaktive oder Farbmoleküle erfolgen. Assays, die die Signale aus der Sonde verstärken, sind ebenfalls bekannt; Beispiele dafür sind Assays, die Biotin und Avidin nutzen sowie Enzym-markierte und indirekte Immunoassays wie die ELISA-Assays.

Das Flavivirusmodell für HCV gestattet Voraussagen bezüglich der wahrscheinlichen Lokalisation von Diagnose-Epitopen für Virion-Strukturproteine. Die C-, pre-M-, M- und E-Domänen enthalten wahrscheinlich alle Epitope signifikanten Potentials für den Nachweis von Virusantigenen und besonders für Diagnosen. Desgleichen wird angenommen, daß die Domänen der nichtstrukturellen Proteine wichtige Diagnoseepitope (z. B. NS5, das eine mutmaßliche Polymerase codiert; und NS1, das ein mutmaßliches Komplement-bindendes Antigen codiert) enthalten.

Rekombinante Polypeptide, oder virale Polypeptide, die Epitope aus diesen spezifischen Domänen einschließen, können für den Nachweis von Virusantikörpern in infizierten Blutspendern und infizierten Patienten nützlich sein.

Außerdem können die gegen B- und/oder M-Proteine gerichteten Antikörper bei Immunoassays für den Nachweis von Virusantigenen in Patienten mit HCV-verursachter NANBH und bei infizierten Blutspendern verwendet werden. Darüber hinaus können diese Antikörper besonders nützlich sein beim Aufsprühen von Spendern und Patienten in der akuten Phase.

Kits, die für die Immundiagnose geeignet sind und die die entsprechenden markierten Reagenzien enthalten, werden durch Verpackung der zweckdienlichen Materialien, einschließlich der erfindungsgemäßen Polypeptide, die HCV-Epitope oder Antikörper, die gegen HCV-Epitope gerichtet sind, in geeigneten Containern enthalten, gemeinsam mit den verbleibenden Reagenzien und Stoffen, die für die Durchführung des Assays erforderlich sind, wie auch einem geeigneten Satz Assayvorschriften konsultiert.

II.J. Weitere Charakterisierung des HCV-Genoms, der Virionen und Virusantigene unter Verwendung von aus der cDNA vom Virusgenom abgeleiteten Sonden

Die HCV-cDNA-Sequenzinformation in den Clonen, die in Abschnitt IV.A. beschrieben und in den Fig. 1 bis 32 dargestellt werden, richtet sich gegen HCV-Epitope, die bei der Diagnose und/oder Behandlung von HCV-verursachter NANBH nützlich sein würden. Die cDNA-Sequenzinformation in den zuvor erwähnten Clonen ist für das Design von Sonden für die Isolierung von zusätzlichen cDNA-Sequenzen nützlich, die von bis jetzt undefinierten Regionen des HCV-Genoms bzw. der HCV-Genome abgeleitet werden, von denen die in Abschnitt IV.A. beschriebenen cDNAs in Clonen gewonnen wurden. Zum Beispiel können die markierten Sonden, die eine Sequenz von ungefähr 8 oder mehr Nucleotide und vorzugsweise 20 oder mehr Nucleotide enthalten, die aus Regionen in der Nähe der 5'-Termini oder 3'-Termini der Familie der HCV-cDNA-Sequenzen abgeleitet wurden und in den Fig. 1, 3, 6, 9, 14 und 32 gezeigt werden, zur Isolierung überlappender cDNA-Sequenzen aus HCV-cDNA-Bibliotheken verwendet werden.

Diese Sequenzen, die die cDNAs in den zuvor erwähnten Clonen überlappen, die aber auch Sequenzen enthalten, die aus den Regionen des Genoms, aus dem die cDNAs in den zuvor erwähnten Clonen nicht abgeleitet werden herrühren, können dann zum Synthetisieren von Sonden für die Identifikation der anderen überlappenden Fragmente, die nicht notwendigerweise die cDNAs in den in Abschnitt IV.A. beschriebenen Clonen überlappen, verwendet werden. Sofern das HCV-Genom segmentiert wird und die Segmente keine gemeinsamen Sequenzen aufweisen, ist es möglich, das gesamte bzw. die gesamten

Virusgenom(en) unter Verwendung der Technik der Isolierung von überlappenden cDNAs, die von dem bzw. den Virusgenom(en) abgeleitet sind, zu sequenzieren. Obgleich es unwahrscheinlich ist, falls das Genom ein segmentiertes Genom ist, das keine gemeinsame Sequenzen aufweist, kann die Sequenz des Genoms durch serologisches Screening der Lambda-gt11-HCV-cDNA-Bibliotheken ermittelt werden, wie bei der Isolierung von Clon 5-1-1, durch Sequenzieren von cDNA-Isolaten und durch Verwendung der isolierten cDNAs zum Isolieren überlappender Fragmente, indem die für die Isolierung und Sequenzierung der

Clone in Abschnitt IV.A. beschriebene Technik angewandt wurde. Im anderen Falle könnte die Charakterisierung der Genomsegmente aus dem aus den gereinigten HCV-Partikeln isolierten Virusgenom(en) stammen. Verfahren für die Reinigung der HCV-Partikel und für den Nachweis derselben während des Reinigungsverfahrens werden hier weiter untenstehend beschrieben. Verfahren für die Isolierung der Polynucleotidgenome aus Viruspartikeln sind im Fachgebiet bekannt, und ein anwendbares Verfahren wird in Beispiel IV.A.1. dargestellt. Die isolierten Genomsegmente könnten anschließend doniert und sequenziert werden. Somit ist es mit der darin bereitgestellten Information möglich, das bzw. die gesamten HCV-Genom(e) ungeachtet seiner bzw. ihrer Natur zu klonen und zu sequenzieren.

Methoden für die Konstruktion von cDNA-Bibliotheken sind im Fachgebiet bekannt und werden im vorstehenden wie auch weiter unten erörtert; eine Methode für die Konstruktion von HCV-cDNA-Bibliotheken in Lambda-gt11 wird in Abschnitt IV.A. im weiteren Text erörtert. Die für das Screening mit Nucleinsäuresonden nützlichen cDNA-Bibliotheken können auch in anderen im Fachgebiet bekannten Vektoren konstruiert werden, z. B. Lambda-gt10 (Huynh u. a. [1985]). Die HCV-abgeleitete cDNA, die durch aus den cDNAs in den Fig. 1 bis 32 abgeleitete Sonden nachgewiesen wurde und aus den aus diesen cDNAs abgeleiteten

Polynucleotiden synthetisierten Sonden, kann aus dem Clon durch Digestion des isolierten Polynucleotids mit dem bzw. den geeigneten Restriktionsenzym(en) isoliert und sequenziert werden. Siehe z. B. Abschnitt IV.A.3. und IV.A.4. bezüglich der für die Isolierung und Sequenzierung der HCV-cDNA, die die HCV-cDNA in Clon 5-1-1 überlappt, verwendeten Techniken; die

Abschnitte IV.A.5. bis IV.A.7. bezüglich der Isolierung und Sequenzierung von HCV-cDNA, die die in Clon 81 überlappt, und Abschnitt IV.A.8 und IV.A.9 bezüglich der Isolierung und Sequenzierung eines Clons, der einen anderen Clon (Clon 36) überlappt, der Clon 81 überlappt.

Die aus diesen überlappenden HCV-cDNAs abgeleitete Sequenzinformation ist für die Bestimmung von Homologie und Heterogenitätsgebiet innerhalb des bzw. der Virusgenom(e) nützlich, die wiederum auf die Anwesenheit von unterschiedlichen Genomstämmen hinweisen könnten, und/oder auf Populationen von defekten Partikeln. Sie sind ebenfalls für das Design der Hybridisierungssonden nützlich, um HCV oder HCV-Antigene oder HCV-Nucleinsäuren in biologischen Proben festzustellen, und während der Isolierung von HCV (wird weiter unten erörtert) die in Abschnitt II.G beschriebenen Techniken zu nutzen. Darüber hinaus können die überlappenden cDNAs verwendet werden, um Expressionsvektoren für aus dem bzw. den HCV-Genom(en) abgeleitete Polypeptide zu erzeugen, die auch die in den Clonen 5-1-1, 36, 81, 91 und 1-2 und in den anderen in Abschnitt IV.A beschriebenen Clonen codierten Polypeptide codieren. Diese Techniken für die Erzeugung dieser HCV-Epitope enthaltenden Polypeptide und für Antikörper, die gegen die in ihnen enthaltenen HCV-Epitope gerichtet sind wie auch ihre Verwendungsmöglichkeiten werden analog zu jenen für Polypeptide beschrieben, die aus NANBV-cDNA-Sequenzen abgeleitet wurden und in den Clonen 5-1-1, 32, 35, 36, 1-2, 81 und 91 enthalten sind und im vorstehenden sowie im nachstehenden Text erörtert werden.

In der Familie der cDNA-Sequenzen codierte, in den Clonen 5-1-1, 32, 35, 36, 81, 91, 1-2 und in den anderen in Abschnitt IV.A. beschriebenen Clonen ist Antigen bzw. sind Antigene enthalten, die Epitope aufweisen, die gegenüber HCV einzigartig erscheinen, d. h. Antikörper, die gegen diese Antigene gerichtet sind, sind bei den mit HAV oder HBV infizierten Individuen und bei nicht mit HCV infizierten Individuen abwesend (siehe in Abschnitt IV.B. aufgeführte serologische Daten). Darüber hinaus zeigt ein Vergleich der Sequenzinformation dieser cDNAs mit den Sequenzen von HAV, HBV, HDV und mit den genomischen Sequenzen in der Genbank, daß zwischen diesen cDNAs und den Polynucleotidsequenzen dieser Quellen eine minimale Homologie besteht. Folglich können Antikörper, die gegen innerhalb der cDNAs dieser Clone codierten Antigene gerichtet sind, zur Identifizierung von BB-NANBV-Partikeln verwendet werden, die aus infizierten Individuen isoliert wurden. Außerdem sind sie auch für die Isolierung von NANBH-Wirkstoff(en) nützlich.

HCV-Partikel können aus den Seren von BB-NANBV-infizierten Individuen oder aus Zellkulturen durch im Fachgebiet bekannte Methoden, einschließlich z. B. auf der Größendiskriminierung basierende Techniken wie Sedimentations- oder Exclusionsmethoden oder auf der Dichte basierende Techniken wie Ultrazentrifugieren in Dichtegradienten, oder Präzipitation mit Agenzien wie Polyethylenglycol oder Chromatographie auf einer Vielzahl von Materialien wie anionische oder kationische Austauschmaterialien, und Materialien, die aufgrund von Hydrophobie binden, wie auch Affinitätsäulen isoliert werden. Während der Isolierungsprozedur kann die Anwesenheit von HCV durch die Hybridisierungsanalyse des extrahierten Genoms ermittelt werden, wobei Sonden verwendet werden, die von im vorstehenden beschriebenen HCV-cDNAs abgeleitet wurden, oder durch Immunoassay (siehe Abschnitt II.I.), wobei als Sonden gegen HCV-Antigene gerichtete Antikörper genutzt werden, die innerhalb der Familie der in den Fig. 1 bis 32 gezeigten cDNA-Sequenzen codiert sind, und auch gegen HCV-Antigene gerichtet sind, die innerhalb der im vorstehenden erörterten überlappenden HCV-cDNA-Sequenzen codiert sind. Die Antikörper können monoklonal oder polyclonal sein, und es kann wünschenswert sein, die Antikörper vor ihrer Verwendung im Immunoassay zu reinigen. Ein Reinigungsverfahren für polyclonale Antikörper, die gegen Antigen(e) gerichtet sind, die innerhalb Clon 5-1-1 codiert sind, wird in Abschnitt IV.E. beschrieben; analoge Reinigungsverfahren können für gegen andere HCV-Antigene gerichtete Antikörper eingesetzt werden.

Antikörper, die gegen HCV-Antigene gerichtet sind, die innerhalb der Familie von in den Fig. 1 bis 32 gezeigten cDNAs codiert sind wie auch jene, die innerhalb überlappender HCV-cDNAs codiert und die an feste Unterlagen geheftet sind, sind für die Isolierung von HCV durch die Immunoaffinitätschromatographie nützlich. Techniken für die Immunoaffinitätschromatographie sind im Fachgebiet bekannt, einschließlich Techniken, für die Anheftung von Antikörpern an feste Unterlagen, so daß sie ihre immunoselektive Aktivität behalten; die Techniken können aus jenen bestehen, in denen die Antikörper an die Unterlage adsorbiert werden (siehe z. B. Kurstak in „Enzyme Immunodiagnosis“, Seite 31 bis 37) wie auch aus jenen, in denen die Antikörper kovalent an die Unterlage gebunden werden. Im allgemeinen ähneln die Techniken jenen, die für die kovalente Bindung von Antigenen an eine feste Unterlage verwendet werden und die in Abschnitt II.C. allgemein beschrieben werden, Spacer-Gruppen können jedoch in die bifunktionellen Kupplungsmittel eingeschlossen werden, so daß die Antigenbindungsstelle des Antikörpers zugänglich bleibt.

Während der Reinigungsprozedur kann die Anwesenheit von HCV durch Nucleinsäurehybridisierung nachgewiesen und/oder überprüft werden, indem als Sonden von der Familie der HCV-cDNA-Sequenzen, dargestellt in den Fig. 1 bis 32, abgeleitete Polynucleotide verwendet werden wie auch solche, die von überlappenden HCV-cDNA-Sequenzen abgeleitet und im vorstehenden Text beschrieben wurden. In diesem Falle würden die Fraktionen unter Bedingungen behandelt, die Auseinanderreißen der Viruspartikel bewirken, z. B. mit Detergenzien in Anwesenheit von Chelatbildnern und in Anwesenheit von viralen Nucleinsäuren, die durch in Abschnitt II.H. beschriebene Hybridisierungstechniken ermittelt wurden. Weitere Bestätigung, daß die isolierten Partikel die Wirkstoffe sind, die HCV induzieren, können durch Infizieren von Schimpansen mit den isolierten Viruspartikeln mit anschließender Bestimmung, ob die NANBH-Symptome aus der Infektion herrühren, gewonnen werden.

Virale Partikel aus den gereinigten Präparationen können dann weiterhin charakterisiert werden. Die genomische Nucleinsäure wurde gereinigt. Auf der Grundlage ihrer Sensitivität zu RNase, und nicht DNase I, sieht es so aus, als ob das Virus aus einem RNA-Genom zusammengesetzt ist. Siehe Beispiel IV.C.2., weiter unten. Die Strängigkeit und Zirkularität oder Nichtzirkularität kann durch im Fachgebiet bekannte Techniken, einschließlich z. B. ihrer Sichtbarmachung durch Elektronenmikroskopie, ihrer Migration bei den Dichtegradienten und ihrer Sedimentationscharakteristika ermittelt werden. Auf der Grundlage der Hybridisierung des eingefangenen (captured) HCV-Genoms an die negativen Stränge von HCV-cDNAs scheint es, daß das HCV aus einem positiv-strängigen RNA-Genom (siehe Abschnitt IV.H.1) besteht. Techniken wie diese werden z. B. in „Methods in Enzymology“ beschrieben. Außerdem kann die gereinigte Nucleinsäure cloniert und sequenziert werden mittels bekannter Techniken, einschließlich Reverse Transkriptase, da das genomische Material RNA ist. Siehe z. B. Maniatis (1982) und Glover (1985). Bei Verwendung der aus den viralen Partikeln abgeleiteten Nucleinsäuren ist es möglich, das gesamte Genom zu sequenzieren, je nachdem, ob es oder ob es nicht segmentiert ist.

Die Untersuchung der Homologie des innerhalb des kontinuierlichen offenen Leserahmens von kombinierten Clonen 141 bis 390 (siehe Fig. 26) codierten Polypeptids zeigt, daß das HCV-Polypeptid Homologieregionen bei den entsprechenden Proteinen in den konservierten Regionen der Flaviviren enthält. Ein Beispiel wird dazu im Abschnitt IV.H.3 beschrieben. Diese Feststellung

weist viele wichtige Aspekte auf. Erstens steht dieser Beweis in Verbindung mit den Ergebnissen, daß das HCV ein positiv-strängiges Genom enthält, dessen Größe ungefähr 10 000 Nucleotide umfaßt, in Einklang mit der Vermutung, daß das HCV ein Flavivirus oder ein flaviartiges Virus ist. Im allgemeinen weisen Flavivirus-Partikeln und ihre Genome eine relativ konsistente Struktur und Organisation auf, die bekannt sind. Siehe Rice u. a. (1988) sowie Brinton, M. A. (1988). Folglich können die die strukturellen Gene codierenden Polypeptide C, pre-M/M und E im 5'-Terminus des Genoms upstream von Clon 14i lokalisiert werden. Darüber hinaus können unter Einbeziehung des Vergleichs mit anderen Flaviviren Voraussagen hinsichtlich der genauen Lokalisation der diese Proteine codierenden Sequenzen gemacht werden.

Die Isolierung der Sequenzen upstream von jenen in Clon 14i kann auf vielfache Weise erfolgen und die hierin zur Verfügung gestellten Informationen sind für einen Fachmann einleuchtend. Zum Beispiel kann die Genom-„walking“-Technik zur Isolierung anderer Sequenzen angewendet werden, die 5' zu jenen in Clon 14i sind, die jedoch jenen Clon überlappen; dieses führt wiederum zur Isolierung zusätzlicher Sequenzen. Diese Technik ist ausführlich in Abschnitt IV. A., siehe weiter unten, dargestellt. Es ist z. B. bekannt, daß die Flaviviren konservierte Epitope und Regionen von konservierten Nucleinsäuresequenzen besitzen. Polynucleotide, die die konservierten Sequenzen enthalten, können als Sonden verwendet werden, die das HCV-Genom binden und somit seine Isolierung gestatten. Daneben können diese konservierten Sequenzen in Verbindung mit den aus den HCV-cDNAs, siehe Fig. 22, abgeleiteten zum Design von Startern für die Verwendung in Systemen eingesetzt werden, die Genomsequenzen upstream von denen in Clon 14i unter Verwendung der Polymerasekettenreaktionstechnologie amplifizierten. Ein Beispiel dafür wird im weiteren Text beschrieben.

Die Struktur des HCV kann ebenfalls ermittelt und seine Komponenten isoliert werden. Die Morphologie und Größe kann zum Beispiel durch Elektronenmikroskopie bestimmt werden. Die Identifizierung und Lokalisierung von spezifischen Viruspolypeptidantigenen wie „coat“ oder Hüllantigene, oder innere Antigene wie Nucleinsäurebindungsproteine, Kernantigene und Polynucleotidpolymerase(n) können ebenfalls ermittelt werden durch z. B. Bestimmung, ob die Antigene als größte oder kleinste Viruskomponenten vorhanden sind, wie auch durch die Nutzung der gegen die spezifischen Antigene, die innerhalb von isolierten cDNAs als Sonden codiert sind, gerichteten Antikörper. Diese Information ist für das Design von Vakzinen nützlich, z. B. kann es günstig sein, ein äußeres Antigen in ein Vakzinpräparat einzubeziehen. Multivalente Vakzine können z. B. ein aus dem Genom, das ein Strukturprotein codiert, z. B. E, abgeleitetes Polypeptid wie auch ein Polypeptid aus einem anderen Teil des Genoms, z. B. ein nicht-strukturelles oder strukturelles Polypeptid enthalten.

II.K. Zellkultursysteme und tierische Modellsysteme für die HCV-Replikation

Die Ausnahme, daß HCV ein Flavivirus oder ein flaviartiges Virus ist, liefert auch Informationen über Methoden für das wachsende HCV. Der Terminus „flaviartig“ bedeutet, daß das Virus einen signifikanten Anteil an Homologie gegenüber den bekannten konservierten Regionen der Flaviviren aufweist und daß der größere Teil des Genoms ein einzelner offener Leserahmen ist. Methoden für die Züchtung von Flaviviren sind den Fachleuten bekannt (siehe z. B. die Reviews von Branton [1986] Sollar, V. [1980]). Im allgemeinen können geeignete Zellen oder Zelllinien für die Züchtung von HCV diejenigen einschließen, die dafür bekannt sind, daß sie die Flavivirus-Replikation unterstützen, z. B. folgende: Affennieren-Zelllinien (z. B. HK₂, VERO); Schweinenieren-Zelllinien (z. B. PS); Baby-Hamsternieren-Zelllinien (z. B. BHK); Mäuse-Makrophage-Zelllinien (z. B. P38801, MK1, M. 1); Human-Makrophagezelllinien (z. B. U-937); periphere Humanblutleucocyten, adhärenz Humanmonocyten; Hepatocyten oder Hepatocyt-Zelllinien (z. B. HUH7, HEPC2); Embryo- oder embryonale Zellen (z. B. Hühnerembryofibroblasten oder Zelllinien, die von wirbellosen Tieren vorzugsweise von Insekten (z. B. Drosophila-Zelllinien), oder besonders bevorzugt von Gliederfüßlern, z. B. Moskito-Zelllinien (z. B. Albopictus, Aedes aegypti, Cutax tritaeniorhynchus) oder Zecken-Zelllinien (z. B. RML-14, Dermacentor parumaportus) abgeleitet sind.

Es ist möglich, daß primäre Hepatocyten gezüchtet werden können und anschließend mit HCV infiziert werden; oder im anderen Falle könnten die Hepatocytulturen aus den Lebern der infizierten Individuen (z. B. Menschen oder Schimpansen) gewonnen werden.

Im letzteren Falle ist ein Beispiel das einer Zelle, die in vivo infiziert und in vitro übertragen wird.

Darüber hinaus können verschiedene Immortalisationsmethoden eingesetzt werden, um von Hepatocytulturen abgeleitete Zelllinien zu gewinnen. Zum Beispiel können primäre Leberkulturen (vor und nach Anreicherung der Hepatocyt-Population) mit einer Anzahl Zellen fusionieren, um ihre Stabilität aufrechtzuerhalten. Es können z. B. auch Kulturen mit transformierenden Viren infiziert werden, oder mit transformierenden Genen transfiziert werden, um permanente oder semipermanente Zelllinien zu erzeugen. Außerdem können z. B. Zellen in Leberkulturen zu etablierten Zelllinien verschmolzen werden (z. B. HepG2). Methoden für die Zellfusion sind im Fachgebiet bekannt und schließen z. B. die Verwendung von Fusionsagenzien, wie auch Polyethylenglycol, Sendai-Virus und Epstein-Barr-Virus ein.

Wie bereits erörtert, ist das HCV ein Flavivirus oder ein flaviartiges Virus. Daher ist wahrscheinlich, daß die HCV-Infektion von Zelllinien durch im Fachgebiet bekannte Techniken für die Infizierung der Zellen im Flaviviren durchgeführt werden kann. Diese umfassen z. B. Inkubieren der Zellen mit Viruspräparaten unter Bedingungen, die den Viruseintritt in die Zelle gestatten. Darüber hinaus ist es möglich, die Virusproduktion durch Transfizieren der Zellen mit isolierten Viruspolynucleotiden zu erreichen. Es ist bekannt, daß Togavirus- und Flavivirus-RNAs bei einer Anzahl von Wirbeltier-Zelllinien (Pfefferkorn und Shapiro [1974]) und in einer Moskito-Zelllinie (Peleg [1969]) übertragbar sind.

Methoden für das Transfizieren von Gewebekulturzellen mit RNA-Duplexen, positiv-strängigen RNAs und DNAs (einschließlich cDNAs) sind im Fachgebiet bekannt und schließen z. B. Techniken ein, wie die Elektroporation und Präzipitation mit DEAE-Dextran oder Calciumphosphat. Eine ergiebige Quelle für HCV-RNA kann mittels der Durchführung der in vitro-Transkription einer dem vollständigen Genom entsprechenden HCV-gewonnen werden. Die Transfektion mit diesem Material oder mit clonierter HCV-cDNA müßte in die Virusreplikation und in die in vitro-Propagation des Virus resultieren.

Zu den gezüchteten Zellen können zusätzlich tierische Modellsysteme für die virale Replikation eingesetzt werden; tierische Systeme, in denen Flaviviren vorkommen, sind den Fachleuten bekannt (siehe z. B. „Review“ von Monath [1986]). Somit kann die HCV-Replikation nicht nur in Schimpansen auftreten, sondern z. B. auch in Krallenaffen und säugenden Mäusen.

II.L. Screening hinsichtlich Antiviralsagenzien für HCV

Die Verfügbarkeit von Zellkulturen und tierischen Modellsystemen für HCV gestattet auch das Screening hinsichtlich Antiviralsagenzien, die die HCV-Replikation inhibieren und besonders hinsichtlich jener Agenzien, die vorzugsweise Zellwachstum und -multiplikation erlauben, während die virale Replikation inhibiert wird. Diese Screening-Methoden sind den Fachleuten bekannt. Im allgemeinen werden die Antiviralsagenzien in einer Anzahl von Konzentrationen hinsichtlich ihres

Effekts, die virale Replikation unterstützen, und dann hinsichtlich einer Inhibierung der Infektiosität oder viralen Pathogenität (und einem geringen Anteil von Toxizität) in einem tierischen Modellsystem getestet. Die darin für den Nachweis von HCV-Antigenen und HCV-Polynucleotiden zur Verfügung gestellten Methoden und Zusammensetzungen sind für das Screening von Antivirusediensten insofern nützlich, als sie eine Alternative und vielleicht ein sensitiveres Mittel für den Nachweis des Einflusses des Agens auf die virale Replikation bereitstellen als der Zell-Plaque-Assay oder ID₅₀-Assay. Die hierin beschriebenen HCV-Polynucleotidsonden können zum Beispiel zum Quantifizieren der Menge erzeugter viraler Nucleinsäuren in einer Zellkultur verwendet werden. Dieses könnte z. B. durch Hybridisierung oder „competition“ (Konkurrenz)-Hybridisierung der infizierten Zellnucleinsäuren mit einer markierten HCV-Polynucleotidsonde durchgeführt werden. Anti-HCV-Antikörper können z. B. auch zur Identifizierung und Quantifizierung von HCV-Antigen(en) in den Zellkulturen unter Verwendung des hierin beschriebenen Immunoassay eingesetzt werden. Da es außerdem wünschenswert sein kann, HCV-Antigene in den infizierten Zellkulturen durch einen „competition“-Assay zu quantifizieren, sind die in den hierin beschriebenen cDNAs codierten Polypeptide bei diesen „competition“-Assays nützlich. Im allgemeinen würde ein aus der HCV-cDNA abgeleitetes rekombinantes HCV-Polypeptid markiert sein, um die Inhibierung der Bindung dieses markierten Polypeptids an ein HCV-Polypeptid infolge des in dem Zellkultursystem erzeugten Antigens würde überwacht werden. Darüber hinaus sind die Techniken besonders in Fällen nützlich, wo das HCV in der Lage sein kann, in einer Zelllinie zu replizieren ohne Zelltod zu verursachen.

II.M. Präparation von abgeschwächten HCV-Stämmen

Zusätzlich zu dem obigen und unter Verwendung der Gewebekultursysteme und/oder tierischer Modellsysteme kann es möglich sein, abgeschwächte HCV-Stämme zu isolieren. Diese Stämme würden sich für Vakzine eignen oder für das Isolieren von Virusantigenen. Abgeschwächte Stämme sind nach mehrfachen Passagen in Zellkulturen und/oder einem tierischen Modell isolierbar. Der Nachweis eines abgeschwächten Stammes in einem infizierten Kalb oder Individuum wird durch im Fachgebiet bekannte Techniken erreicht und könnte z. B. die Verwendung von Antikörpern zu einem oder mehreren in HCV als Sonde codierten Epitopen für die Verwendung eines Polynucleotids einschließen, das eine HCV-Sequenz von mindestens etwa 8 Nucleotiden als eine Sonde erhält. Im anderen Falle oder außerdem kann ein abgeschwächter Stamm unter Verwendung der hierin zur Verfügung gestellten genomischen Information von HCV und unter Verwendung rekombinanter Techniken konstruiert werden. Im allgemeinen würde man versuchen, eine Region des Genoms auszulöschen, die z. B. eine Polypeptid-bezogene Pathogenizität codiert, die aber virale Replikation erlaubt. Außerdem würde die Genomkonstruktion die Expression eines Epitops gestatten, das die Neutralisierung der Antikörper für das HCV bewirkt. Das veränderte Genom könnte dann zum Transformieren von Zellen genutzt werden, die die HCV-Replikation erlauben, und die unter diesen Bedingungen gewachsenen Zellen gestatten die virale Replikation.

Die abgeschwächten HCV-Stämme sind nicht nur für Vakzinzwecke nützlich, sondern auch als Quellen für die kommerzielle Produktion von Virusantigenen, da die Verarbeitung dieser Viren weniger stringente Schutzmaßnahmen für die in der Virusproduktion und/oder Produktion viraler Produkte involvierten Mitarbeiter erfordern würde.

III. Allgemeine Methoden

Die allgemeinen Techniken, die für das Extrahieren des Genoms aus einem Virus verwendet werden, für das Herstellen und Sondieren einer cDNA-Bibliothek, Sequenzieren der Clone, Konstruieren von Expressionsvektoren, Transformieren der Zellen, für das Durchführen immunologischer Tests wie Radioimmunoassays und ELISA-Assays, für das Züchten von Zellen in Kulturen und dergleichen sind im Fachgebiet bekannt, und es stehen Laborhandbücher zur Verfügung, die diese Techniken beschreiben. Der folgende Text stellt einen allgemeinen Leitfaden dar, der einige gegenwärtig verfügbare Quellen für solche Prozeduren und Materialien, die bei der Ausführung derselben nützlich sind, aufzeigt.

III.A. Wirte und Expressionskontrollsequenzen

Sowohl prokaryontische als auch eukaryontische Wirtszellen können für die Expression der gewünschten codierenden Sequenzen verwendet werden, wenn geeignete Kontrollsequenzen, die mit dem gekennzeichneten Wirt kompatibel sind, verwendet werden. Unter den prokaryontischen Wirten ist *E. coli* der am häufigsten verwendete. Expressionskontrollsequenzen für Prokaryonten beinhalten Promotoren, die teilweise Operatorportionen enthalten und Ribosombildungsstellen. Transfervektoren, die mit den prokaryontischen Wirten kompatibel sind, werden üblicherweise von z. B. pBR322, einem Operone enthaltenden Plasmid abgeleitet, die Ampicillin- und Tetracyclinresistenz verleihen, und verschiedenen pUC-Vektoren, die auch Sequenzen enthalten, die antibiotische Resistenzmarker übertragen. Diese Marker können dazu eingesetzt werden, erfolgreiche Transformanten durch Selektion zu gewinnen. Die üblicherweise verwendeten prokaryontischen Kontrollsequenzen beinhalten Beta-Lactamase (Penicillinase) und Lactose-Promotorsysteme (Chang, u. a. [1977]), Tryptophan-(trp)-Promotorsystem (Goeddel u. a. [1980]) und den Lambda-abgeleiteten P_L-Promotor und die N-Gen-Ribosom-Bindungsstelle (Shimatake u. a. [1981]) und den Hybrid-tac-Promotor (De Boer u. a. [1983]), der von den Sequenzen der trp- und lac-UV5-Promotoren abgeleitet ist. Die vorstehenden Systeme sind besonders kompatibel mit *E. coli*; wenn gewünscht, können andere prokaryontische Wirte wie Stämme von *Bacillus* oder *Pseudomonas* mit den entsprechenden Kontrollsequenzen verwendet werden. Eukaryontische Wirte enthalten in den Kultursystemen Hefe- und Säugetierzellen. *Saccharomyces cerevisiae* und *Saccharomyces carlsbergensis* sind die am meisten verwendeten Hefewirte und sind auch günstige Pilzwirte. Hefekompatible Vektoren tragen Marker, die die Selektion von erfolgreichen Transformanten durch Übertragen von Prototropie auf auxotrophe Mutanten oder Resistenz gegenüber Schwermetallen auf wilde Stämme gestatten. Hefekompatible Vektoren können den 2 Mikron-Replikationsstartpunkt (Broach u. a. [1983]), die Kombination von CDN3 und ARS1 oder andere Mittel für die Sicherstellung der Replikation einsetzen, wie auch Sequenzen, die in die Inkorporation eines geeigneten Fragments in das Wirtszellengenom resultieren. Kontrollsequenzen für Hefevektoren sind im Fachgebiet bekannt und umfassen Promotoren für die Synthese von glycolytischen Enzymen (Hess u. a. [1968]; Holland u. a. [1978]), einschließlich des Promotors für 3 Phosphoglyceratkinasen (Hitzeman [1980]). Terminatoren können ebenfalls einbezogen werden, wie jene, die aus dem Enolasegen abgeleitet wurden (Holland [1981]). Besonders nützlich sind Kontrollsysteme, die Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase-(GAPDH)-Promotor oder Alcoholdehydrogenase-(ADH)-regulierbaren Promotor, ebenfalls von GAPDH abgeleitete Terminatoren, und wenn Sekretion gewünscht wird, „Leader“-Sequenz aus Hefe-Alpha-Faktoren umfassen. Außerdem können die transkriptionale Regulatorregion und die transkriptionale Initiierungsregion, die operabel miteinander verbunden sind, von der Art sein, daß sie natürlicherweise nicht in dem Wildtyp-Organismus assoziiert sind. Diese Systeme

werden ausführlich in der EPO 120551, veröffentlicht am 3. Oktober 1984; EPO 11620i, veröffentlicht am 22. August 1984 und EPO 164446, veröffentlicht am 18. Dezember 1985, beschrieben, die alle an den hierin genannten Zessionär abgetreten werden und hierdurch unter Bezugnahme darauf eingeschlossen sind.

Säugetierzelllinien, die als Wirte für die Expression zur Verfügung stehen, sind im Fachgebiet bekannt und schließen viele immortalisierte Zelllinien ein, die von der American Type Culture Collection (ATCC) zur Verfügung gestellt werden einschließlich HeLa-Zellen, China-Hamster-Ovarium-(CHO)-Zellen, Baby-Hamsterniere-(BHK)-Zellen und eine Reihe anderer Zelllinien. Geeignete Promotoren für Säugetierzellen sind im Fachgebiet bekannt und schließen virale Promotoren ein wie jene aus Simian-Virus 40 (SV40) (Fiers [1978]), Rous sarcoma-Virus (RSV), Adenovirus (ADV) und Bovine-Papillom-Virus (BPV). Säugetierzellen können auch Terminatorsequenzen und Poly(A)-Additionssequenzen erfordern; Verstärkersequenzen, die die Expression erhöhen, können ebenfalls eingeschlossen werden sowie Sequenzen, die die Amplifizierung der Gene bewirken, können auch wünschenswert sein. Diese Sequenzen sind im Fachgebiet bekannt. Für die Replikation in Säugetierzellen geeignete Vektoren können virale Replikone oder Sequenzen enthalten, die die Integration geeigneter Sequenzen garantieren, die NANBV-Epitope in das Wirtsgenom codieren.

III.B. Transformationen

Die Transformation kann durch irgendeine bekannte Methode für die Einführung von Polynucleotiden in eine Wirtszelle, einschließlich z. B. Verpacken des Polynucleotids in ein Virus und Transduktion einer Wirtszelle mit dem Virus, und durch direkte Aufnahme des Polynucleotids erfolgen. Die angewendete Transformationsprozedur hängt von dem zu transformierenden Wirt ab.

Die Transformation von E. coli-Wirtszellen mit Lambda-gt 11, die BB-NANBV-Sequenzen enthalten, wird z. B. in dem später folgenden Abschnitt „Beispiele“ erörtert. Die bakterielle Transformation durch direkte Aufnahme beinhaltet im allgemeinen die Behandlung mit Calcium oder Rubidiumchlorid (Cohen [1972]; Maniatis [1982]). Die Hefetransformation durch direkte Aufnahme kann unter Verwendung der Methode von Hinnen u. a. (1978) durchgeführt werden. Die Säugetierzellentransformation durch direkte Aufnahme kann unter Verwendung der Calcium-Asphat-Präzipitationsmethode von Graham und Van der Eb (1978) oder den verschiedenen bekannten Modifikationen davon durchgeführt werden.

III.C. Vektorkonstruktion

Die Vektorkonstruktion erfolgt mit Techniken, die im Fachgebiet bekannt sind. Das sequenzspezifische Schneiden wird durch die Behandlung mit geeigneten Restriktionsenzymen unter Bedingungen durchgeführt, die generell durch den Hersteller dieser kommerziell verfügbaren Enzyme spezifiziert werden. Im allgemeinen werden etwa 1 Mikrogramm Plasmid oder DNA-Sequenz durch 1 Einheit Enzym in etwa 20 Mikroliter Pufferlösung durch Inkubation über 1 bis 2 Stunden bei 37°C geschnitten. Nach der Inkubation mit dem Restriktionsenzym wird das Protein durch Phenol/Chloroform-Extraktion entfernt und die DNA durch Präzipitation mit Ethanol zurückgewonnen. Die geschnittenen Fragmente können unter Verwendung von Polyacrylamid oder Agarosegel-Elektrophoresetechniken entsprechend den allgemeinen Prozeduren, die in „Methods in Enzymology“ (1980) 65:499–560 dargestellt sind, getrennt werden.

Geschnittene Fragmente mit kohäsiven Enden können bei Verwendung von E. coli-DNA-Polymerase I (Klenow) in Anwesenheit geeigneter Desoxynucleotidtriphosphaten (dNTPs), die in dem Gemisch vorhanden sind, glatte Enden aufweisen. Die Behandlung mit S1-Nuclease, die in die Hydrolyse beliebiger einzelsträngiger DNA-Abschnitte resultiert, kann auch durchgeführt werden.

Ligationen werden unter Verwendung von Standardpuffern und Temperaturbedingungen durchgeführt, die T4-DNA-Ligase und ATP verwenden; Ligationen von kohäsiven Enden erfordern weniger ATP und weniger Ligase als Ligationen von glatten Enden. Wenn Vektorfragmente als Teil eines Ligationsgemisches verwendet werden, wird das Vektorfragment oftmals mit bakterieller alkalischer Phosphatase (BAP) oder alkalischer Kälberdarm-Phosphatase behandelt, um das 5'-Phosphat zu entfernen und somit die Re-Ligation des Vektors zu verhindern; im anderen Falle kann die Restriktionsenzym-Digestion ungewünschter Fragmente zur Verhinderung der Ligation eingesetzt werden. Ligationsgemische werden in geeignete Clonierungswirte wie E. coli transformiert, und erfolgreiche Transformanten werden z. B. durch antibiotische Resistenz selektioniert und für die korrekte Konstruktion gescreent.

III.D. Konstruktion von gewünschten DNA-Sequenzen

Synthetische Oligonucleotide können unter Verwendung automatischer Oligonucleotidsynthesizer wie von Warner (1984) beschrieben, hergestellt werden. Falls gewünscht, können die synthetischen Stränge mit ³²P durch die Behandlung mit Polynucleotidkinase in Anwesenheit von ³²P-ATP, unter Anwendung von Standardbedingungen für die Reaktion markiert werden.

DNA-Sequenzen, einschließlich der aus den cDNA-Bibliotheken isolierten, können durch bekannte Techniken, einschließlich zum Beispiel gerichteter Mutagenese wie von Zoller (1982) beschrieben, modifiziert werden. Kurzum, die zu modifizierende DNA wird in ein Phage als eine einzelsträngige Sequenz verpackt und in eine doppelsträngige DNA mit DNA-Polymerase umgewandelt, wobei als Starter ein synthetisches Oligonucleotid verwendet wird, das zu dem Teil der DNA komplementär ist, das modifiziert werden soll, und das die gewünschte Modifikation in seiner eigenen Sequenz enthält. Die sich ergebende doppelsträngige DNA wird in ein Phage transformiert, der das Wirtsbakterium unterstützt. Die Kulturen der transformierten Bakterien, die Replikationen jeden Stranges des Phage enthalten, werden in Agar plattiert, um Plaques zu erhalten. Theoretisch enthalten 50% der neuen Plaques Phage mit mutierter Sequenz. Die restlichen 50% weisen die ursprüngliche Sequenz auf. Replikate der Plaques werden an die markierte synthetische Sonde bei Temperaturen und Bedingungen hybridisiert, die die Hybridisierung mit dem korrekten Strang gestatten, jedoch nicht mit der unveränderten Sequenz. Die durch Hybridisierung identifizierten Sequenzen werden wiedergewonnen und cloniert.

III.E. Hybridisierung mit Sonden

DNA-Bibliotheken können unter Verwendung des Verfahrens von Grunstein und Hogness (1975) sondiert werden. Kurz gesagt, bei diesem Verfahren wird die zu sondierende DNA auf Nitrocellulosefiltern immobilisiert, denaturiert und pre-hybridisiert mit einem Puffer, der 0 bis 50% Formamid, 0,75M NaCl, 75mM Na-Citrat, 0,02% (M/V) von jeweils Rinderserumalbumin, Polyvinylpyrrolidon sowie Ficoll, 50mM Na-Phosphat (pH = 6,5), 0,1% SDA und 100 Mikrogramm/ml „carrier“-denaturierte DNA enthält. Der Prozentanteil Formamid in dem Puffer wie auch die Zeit- und Temperaturbedingungen der Pre-Hybridisierung

und anschließende Hybridisierungsschritte hängen von der erforderlichen Stringenz ab. Oligomere Sonden, die weniger stringente Bedingungen erfordern, werden im allgemeinen mit niedrigeren prozentualen Anteilen von Formamid, niedrigeren Temperaturen und längeren Hybridisierungszeiten eingesetzt. Sonden, die über 30 bis 40 Nucleotide wie die aus cDNA oder genomischen Sequenzen abgeleiteten enthalten, verlangen im allgemeinen höhere Temperaturen, z. B. etwa 40°C bis 42°C, und einen hohen Formamidanteil, z. B. 50%. Anschließend an die Pre-Hybridisierung wird die 5'-³²P-markierte Oligonucleotidsonde zu dem Puffer zugesetzt, und die Filter werden unter Hybridisierungsbedingungen in diesem inkubiert. Nach dem Waschen werden die behandelten Filter Autoradiographie unterzogen, um die Lage der hybridisierten Sonde zu zeigen; die DNA in entsprechenden Lokalisationen auf den originalen Agarplatten wird als Quelle der gewünschten DNA verwendet.

III.F. Verifizierung von Konstruktion und Sequenzierung

Für Routinevektorkonstruktionen werden Ligationsgemische im *E. coli*-Stamm HB 101 oder einem anderen geeigneten Wirt transformiert, und erfolgreiche Transformationen werden durch antibiotische Resistenz oder andere Marker selektioniert. Plasmide aus den Transformanten werden dann entsprechend der Methode von Clewell u. a. (1969), üblicherweise durch Verfolgung der Chloramphenicol-Amplifizierung (Clewell [1972]) hergestellt. Die DNA wird isoliert und analysiert auf der Grundlage der Restriktionsenzymanalyse und/oder Sequenzierung. Die Sequenzierung kann mittels der Dideoxy-Methode von Sanger u. a. (1977) durchgeführt werden, die weiterhin von Messing u. a. (1981) oder durch die Methode von Maxam u. a. (1980) beschrieben wurde. Probleme mit der Bandenkompression, die manchmal in den GC-reichen Regionen beobachtet werden, wurden durch die Verwendung von T-Deazoguanosin entsprechend Barr u. a. (1986) überwunden.

III.G. Enzym-gekoppelter Immunosorbent Assay

Der Enzym-gekoppelte immunologische Test (ELISA) kann eingesetzt werden, um entweder Antigen- oder Antikörperkonzentrationen zu messen. Diese Methode hängt von der Konjugation eines Enzyms entweder zu einem Antigen oder Antikörper ab und nutzt die gebundene Enzymaktivität als quantitative Markierung. Um den Antikörper zu messen, wird das bekannte Antigen an eine feste Phase fixiert (z. B. eine Mikroplatte oder einen Kunststoffiegel), mit Testserumverdünnungen inkubiert, gewaschen, mit Antiimmunoglobulin inkubiert, das mit einem Enzym markiert ist, und wiederum gewaschen. Für die Markierung geeignete Enzyme sind im Fachgebiet bekannt und umfassen z. B. Meerrettichperoxidase. Die an die feste Phase gebundene Enzymaktivität wird durch die Zugabe des spezifischen Substrats gemessen, und die Bestimmung der Produktbildung oder Substratverwertung erfolgt kolorimetrisch. Die gebundene Enzymaktivität ist eine direkte Funktion der Menge gebundenen Antikörpers.

Zur Messung des Antigens wird ein bekannter spezifischer Antikörper an die feste Phase fixiert, das das Antigen enthaltende Testmaterial wird zugesetzt, nach Inkubierung der festen Phase gewaschen und ein zweiter Enzym-markierter Antikörper zugegeben. Nach dem Waschen wird das Substrat zugefügt, und die Enzymaktivität wird kolorimetrisch bewertet und zur Antigenkonzentration in Beziehung gesetzt.

IV. Beispiele

Im untenstehenden werden erfindungsgemäße Beispiele beschrieben, die nur zur Veranschaulichung dienen und den Geltungsbereich der vorliegenden Erfindung nicht einschränken. Angesichts der vorliegenden Erfindung sind den ständig auf diesem Gebiet arbeitenden Fachleuten zahlreiche Ausführungsformen im Geltungsbereich der Ansprüche offenbar. Die z. B. in Abschnitt IV.A. geschilderten Prozeduren können, falls gewünscht, müssen jedoch nicht wiederholt werden, da für die Konstruktion der gewünschten Nucleotidsequenzen Techniken auf der Grundlage der durch die Erfindung gelieferten Informationen zur Verfügung stehen. Die Expression wird in *E. coli* veranschaulicht, es stehen jedoch auch andere Systeme zur Verfügung, die in Abschnitt III.A. ausführlicher geschildert werden. Zusätzliche von der genomischen Struktur abgeleitete Epitope können ebenfalls produziert und dazu verwendet werden, Antikörper wie im weiteren Text beschrieben zu erzeugen.

IV.A. Herstellung, Isolierung und Sequenzierung von HCV-cDNA

IV.A.1. Herstellung von HCV-cDNA

Die Quelle des NANB-Agens war ein von einem Schimpansen mit chronischer NANBH abgeleiteter Plasma-Pool. Der Schimpanse wurde experimentell mit Blut von einem anderen Schimpansen mit chronischer NANBH infiziert, die wiederum aus der Infektion mit HCV in einer kontaminierten Konzentrationsmenge mit Faktor 8, das von gesammeltem Human-Serum abgeleitet wurde, herrührte. Der Schimpansen-Plasma-Pool wurde durch Kombinieren vieler individueller Plasmaproben, die einen hohen Grad von Alaninaminotransferaseaktivität aufwiesen, hergestellt, diese Aktivität resultierte aus der hepatitischen Schädigung infolge der HCV-Infektion. Da 1 ml einer 10⁻⁶-Verdünnung dieses gesammelten und intravenös verabreichten Serums in anderen Schimpansen NANBH verursachte, sein CID (Zytomegaliesyndrom) war mindestens 10⁶/ml, d. h. es hatte einen hohen infektiösen Virustiter.

Eine cDNA-Bibliothek aus dem Plasma-Pool mit hohem Titer wurde wie folgt erzeugt. Zuerst wurden virale Partikel aus dem Plasma isoliert; eine 90-ml-Aliquote wurde mit 310 ml einer 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl enthaltenden Lösung verdünnt. Reste wurden durch 20 min Zentrifugieren bei 15000 × g bei 20°C entfernt. Virale Partikel in dem resultierenden Überstehenden wurden anschließend pelletiert durch Zentrifugieren in einem Beckman-SW28-Rotor bei 28000 U/min über 5 Stunden bei 20°C. Zur Freisetzung des viralen Genoms wurden die Partikel durch Suspendieren der Pellets in 15 ml Lösung, die 1% Natriumdodecylsulfat (SDS), 10 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, enthielt sowie auch 2 mg/ml Proteinase K aufgetroffen und anschließend bei 45°C über 90 min inkubiert. Die Nucleinsäuren wurden durch Zugabe von 0,8 Mikrogramm MS2 Bakteriophage RNA als Trägersubstanz isoliert und das Gemisch wurde viermal mit einem 1:1-Gemisch von Phenol-Chloroform (Phenol gesättigt mit 0,5 M Tris-HCl, pH 7,5, 0,1% (V/V) Beta-Mercaptoethanol, 0,1% (M/V) Hydroxychinolin extrahiert, und anschließend zweimal mit Chloroform extrahiert. Die wäßrige Phase wurde vor der Präzipitation mit 2,5 Volumen absolutes Ethanol und Stehenlassen über Nacht bei -20°C mit 1-Butanol konzentriert. Die Nucleinsäure wurde durch Zentrifugieren in einem Beckman-SW41-Rotor bei 40000 U/min über 90 min bei 4°C zurückgewonnen und in Wasser gelöst, das mit 0,05% (V/V) Diethylpyrocarbonat behandelt und im Autoklaven gekocht wurde.

Die durch das oben geschilderte Verfahren gewonnene Nucleinsäure (<2 Mikrogramm) wurde mit 17,5 mM CH₃HgOH denaturiert; cDNA wurde unter Verwendung dieser denaturierten Nucleinsäure als Matrize synthetisiert und in die EcoRI-Stelle von Phage Lambda-gt11 unter Verwendung von durch Huynh (1985) beschriebenen Methoden cloniert, außer daß die zufälligen Starter Oligo(dT)-12-18 während der Synthese des ersten cDNA-Stranges durch Umkehrtranskriptase ersetzt (Taylor u. a.

[1976]). Die resultierenden doppelsträngigen cDNAs wurden entsprechend der Größe auf einer Sepharose-CL-4B-Säule fraktioniert; eluiertes Material von ungefähr mittlerer Größe 400, 300, 200 und 100 Basenpaaren wurden in den cDNA-Pools 1, 2, 3 bzw. 4 gepoolt. Die Lambda-gt11-cDNA-Bibliothek wurde aus der cDNA in Pool 3 erzeugt. Die Lambda-gt11-cDNA-Bibliothek, die aus Pool 3 erzeugt wurde, wurde auf Epitope gescreent, die spezifisch von einem zuvor an NANBH erkrankten Patienten abgeleitetes Serum binden können. Unter Verwendung der Methoden von Huynh u. a. (1985) wurden etwa 10^6 Phagen mit Patientenserum gescreent, außer daß gebundene Human-Antikörper mit Schaf-Anti-Human-IG-Antiseren, die mit ^{125}I radioaktiv markiert wurden, nachgewiesen werden konnten. Fünf positive Phagen wurden identifiziert und gereinigt. Die fünf positiven Phagen wurden anschließend hinsichtlich Spezifität der Bindung an Seren von 8 unterschiedlichen, zuvor mit der NANBH-Agens infizierten Menschen unter Verwendung der gleichen Methode getestet. Vier der Phagen codierten ein Polypeptid, das immunologisch mit nur einem Human-Serum reagierte, d. h. dem einen, das für das primäre Screening der Phage-Bibliothek eingesetzt wurde. Der fünfte Phage (5-1-1) codierte ein Polypeptid, das immunologisch mit 5 der 8 getesteten Seren reagierte. Darüber hinaus reagierte dieses Polypeptid immunologisch nicht mit Seren von 7 normalen Blutspendern. Deshalb sieht es so aus, als ob Clon 5-1-1 ein Polypeptid codiert, das immunologisch speziell durch Seren von NANBH-Patienten erkannt wird.

IV.A.2. Sequenzen der HCV-cDNA in rekombinantem Phage 5-1-1 und vom innerhalb der Sequenz codierten Polypeptid

Die cDNA in rekombinantem Phage 5-1-1 wurde nach einer Methode von Sanger u. a. (1977) sequenziert. Die cDNA wurde im wesentlichen mit EcoRI ausgeschnitten und unter Verwendung von Gelelektrophorese durch Größenfraktionierung isoliert. Die EcoRI-Restriktionsfragmente wurden subcloniert in die M13-Vektoren mp18 und mp19 (Messing [1983]) und unter Verwendung der Dideoxyketten-terminationsmethode von Sanger u. a. (1977) sequenziert. Die gewonnene Sequenz wird in Fig. 1 gezeigt. Das in Fig. 1 codierte Polypeptid, das in der HCV-cDNA codiert ist, befindet sich in dem gleichen translationalen Rahmen wie die N-terminale Beta-Galactosidasekomponente, an die es fusioniert ist. Wie in Abschnitt IV.A. gezeigt wird, codiert der translationale offene Leserahmen (ORF) von 5-1-1 ein Epitop bzw. Epitope, die speziell von Seren von mit NANBH-Infektionen konfrontierten Patienten und Schimpansen erkannt werden.

IV.A.3. Isolierung von HCV-cDNA, die die cDNA in Clon 5-1-1 überlappt

Zur cDNA in Clon 5-1-1 überlappende HCV-cDNA wurde durch Screening der gleichen Lambda-gt11-Bibliothek, die wie in Abschnitt IV.A.1 beschrieben geschaffen wurde, mit einem aus der Sequenz der HCV-cDNA in den Clonen 5-1-1, wie in Fig. 1 dargestellt, abgeleiteten synthetischen Polynucleotid gewonnen. Die Sequenz des für das Screening verwendeten Polynucleotids war:

5'-TCC CTT GCT CGA TGT ACG GTA AGT CCT GAG AGC ACT CTT CCA TCT CAT CGA ACT CTC GGT
AGA GGA CTT CCC TGT GAG GT-3'.

Die Lambda-gt11-Bibliothek wurde mit dieser Sonde unter Verwendung der bei Huynh (1985) beschriebenen Methode gescreent. Ungefähr 1 in 50000 Clonen hybridisierte mit dieser Sonde. Drei Clone, die cDNAs enthielten, hybridisierten mit der synthetischen Sonde, die mit 81, 1-2 und 91 numeriert ist.

IV.A.4. Nucleotid-Sequenzen von überlappenden HCV-cDNAs zur cDNA in Clon 5-1-1

Die Nucleotid-Sequenzen der drei cDNAs in den Clonen 81, 1-2 und 91 wurden im wesentlichen wie in Abschnitt IV.A.2. beschrieben ermittelt. Die Sequenzen dieser Clone im Verhältnis zur HCV-cDNA-Sequenz in Phage 5-1-1 werden in Fig. 2 dargestellt, die den Strang zeigt, der das nachgewiesene HCV-Epitop codiert und wo die Homologien in den Nucleotidsequenzen durch vertikale Linien zwischen den Sequenzen angedeutet werden.

Die Sequenzen der clonierten HCV-cDNAs sind äußerst homolog in den überlappenden Regionen (siehe Fig. 2). In zwei Regionen bestehen jedoch Unterschiede. Nucleotid 67 in Clon 1-2 ist ein Thymidin, wohingegen die anderen drei Clone einen Cytidin-Rest an dieser Stelle enthalten. Es ist jedoch festzustellen, daß die gleiche Aminosäure codiert wird, wenn entweder C oder T diese Position einnehmen.

Der zweite Unterschied besteht darin, daß Clon 5-1-1 28 Basenpaare enthält, die in den anderen drei Clonen nicht vorhanden sind. Diese Basenpaare treten am Start der cDNA-Sequenz in 5-1-1 auf und werden durch kleine Buchstaben angezeigt. Auf der Grundlage der Radioimmunoassay-Daten, die im folgenden in Abschnitt IV.D. erörtert werden, ist es möglich, daß ein HCV-Epitop in dieser 28bp-Region codiert werden kann.

Die Anwesenheit der 28 Basenpaare von 5-1-1 aus den Clonen 81, 1-2 und 91 kann bedeuten, daß die cDNA in diesen Clonen aus defekten HCV-Genomen abgeleitet wurde; alternativ dazu könnte die 28-bp-Region ein terminaler Artefakt in Clon 5-1-1 sein. Die mit den kleinen Buchstaben gekennzeichneten Sequenzen in der Nucleotidsequenz von Clon 81 und 91 zeigen einfach an, daß diese Sequenzen nicht in anderen cDNAs gefunden wurden, da cDNAs, die diese Regionen überlappen, bis jetzt noch nicht isoliert wurden.

Eine aus den überlappenden cDNAs in den Clonen 5-1-1, 81, 1-2 und 91 abgeleitete zusammengesetzte HCV-cDNA-Sequenz wird in Fig. 3 dargestellt. In dieser Fig. sind jedoch die einzigartigen 28 Basenpaare von Clon 5-1-1 weggelassen worden. Die Figur zeigt auch die Sequenz des in dem ORF der zusammengesetzten HCV-cDNA codierten Polypeptids.

IV.A.5. Isolierung von HCV-cDNAs, die die cDNA in Clon 81 überlappen

Die Isolierung der HCV-cDNA-Sequenz upstream von, und die jene in Clon-81-cDNA überlappen, wurde wie folgt durchgeführt. Die Lambda-gt11-cDNA-Bibliothek, die entsprechend Abschnitt IV.A.1. hergestellt wurde, wurde durch Hybridisierung mit einer synthetischen Polynucleotidsonde, die zu einer 5'-terminalen Sequenz von Clon 81 homolog war, gescreent. Die Sequenz von Clon 81 wird in Fig. 4 dargestellt. Die Sequenz des für das Screening verwendeten synthetischen Polynucleotids lautete:

5' CTG TCA GGT ATG ATT GCC GGC TTC CCG GAC 3'.

Die Methoden waren im wesentlichen die von Huynh (1985) beschriebenen, außer daß die Bibliothekfilter zwei Waschungen unter stringenter Bedingungen unterzogen wurden, d. h. die Waschungen wurden in $5 \times \text{SSC}$, 0,1% SDS bei 55°C und jeweils

über 30 min durchgeführt. Ungefähr 1 in 50000 Clonen hybridisierte mit der Sonde. Ein positiver rekombinanter Phage, der cDNA enthielt, die mit der Sequenz hybridisierte, wurde isoliert und gereinigt.

Dieser Phage wurde mit Clon 36 numeriert.

Downstream-cDNA-Sequenzen, die die Carboxyl-Ende-Sequenzen in Clon-81-cDNA überlappen, wurden unter Verwendung eines Verfahrens, das dem für die Isolierung von upstream-cDNA-Sequenzen ähnelt, isoliert, außer daß eine synthetische Oligonucleotid-Sonde, die zu einer 3'-terminalen Sequenz von Clon 81 homolog ist, hergestellt wurde. Die Sequenz des synthetischen Polynucleotids, die für das Screening eingesetzt wurde, lautete:

5' TTT GGC TAG TGG TTA GTG GGC TGG TGA CAG 3'.

Ein positiver rekombinanter Phage, der cDNA enthielt, die mit dieser letzteren Sequenz hybridisierte, wurde isoliert und gereinigt und mit Clon 32 numeriert.

IV.A.6. Nucleotid-Sequenz von HCV-cDNA in Clon 36

Die Nucleotid-Sequenz der cDNA in Clon 36 wurde im wesentlichen wie in Abschnitt IV.A.2. beschrieben ermittelt. Die doppelsträngige Sequenz dieser cDNA, ihre Überlappingsregion mit der HCV-cDNA in Clon 81 und das durch den ORF codierte Polypeptid werden in Fig. 5 dargestellt.

Der ORF in Clon 36 befindet sich in dem gleichen translationalen Rahmen wie das in Clon 81 codierte HCV-Antigen. Somit codieren die ORFs in den Clonen 36 und 81 in Kombination ein Polypeptid, das einen Teil eines großen HCV-Antigens repräsentiert. Die Sequenz dieses mutmaßlichen HCV-Polypeptids und die es codierende doppelsträngige DNA-Sequenz, die aus den kombinierten ORFs der HCV-cDNAs der Clone 36 und 81 abgeleitet ist, wird in Fig. 6 gezeigt.

IV.A.7. Nucleotid-Sequenzen von HCV-cDNA in Clon 32

Die Nucleotid-Sequenz der cDNA in Clon 32 wurde im wesentlichen nach der in Abschnitt IV.A.2. beschriebenen Methode für die Sequenz von Clon 5-1-1 ermittelt. Die Sequenzdaten zeigten, daß die cDNA in Clon-32-rekombinante-Phage aus zwei unterschiedlichen Quellen abgeleitet wurde. Ein Fragment der cDNA enthielt 418 aus dem HCV-Genom abgeleitete Nucleotide; das andere Fragment umfaßte 172 aus dem Bacteriophage-MS2-Genom abgeleitete Nucleotide, das während der Präparation der Lambda-gt11-Plasma-cDNA-Bibliothek als Träger verwendet wurde.

Die dem HCV-Genom entsprechende Sequenz der cDNA in Clon 32 wird in Fig. 7 gezeigt. Die Region der Sequenzen, die die von Clon 81 überlappt, und das durch den ORF codierte Polypeptid werden ebenfalls in dieser Fig. dargestellt. Diese Sequenz enthält ein kontinuierliches ORF, das sich in dem gleichen translationalen Rahmen befindet wie das durch Clon 81 codierte HCV-Antigen.

IV.A.8. Isolierung von HCV-cDNA, die die cDNA in Clon 36 überlappt

Die Isolierung von HCV-cDNA-Sequenzen upstream von, und die jene in Clon-36-cDNA überlappen, wurde wie in Abschnitt IV.A.5. beschrieben, für jene, die Clon-81-cDNA überlappen, durchgeführt, außer daß das synthetische Polynucleotid auf der 5'-Region von Clon 36 basierte. Die Sequenz des für das Screening verwendeten synthetischen Polynucleotids war:

5' AAG CCA CCG TGT GCG CTA GGG CTC AAG CCC 3'.

Ungefähr 1 in 50000 Clonen hybridisierte mit der Sonde. Der isolierte, gereinigte Clon des rekombinanten Phage, die cDNA enthielt, die an diese Sequenz hybridisierte, wurde Clon 35 genannt.

IV.A.9. Nucleotid-Sequenz von HCV-cDNA in Clon 35

Die Nucleotid-Sequenz der cDNA in Clon 35 wurde im wesentlichen wie in Abschnitt IV.A.2. beschrieben ermittelt. Die Sequenz, ihre Überlappingsregion mit der der cDNA in Clon 36 und das darin codierte mutmaßliche Polypeptid, werden in Fig. 8 gezeigt.

Clon 35 enthält offensichtlich einen einzelnen kontinuierlichen ORF, der in den gleichen translationalen Rahmen ein Polypeptid codiert wie das durch Clon 36, Clon 81 und Clon 32 codierte. Fig. 9 zeigt die Sequenz des langen kontinuierlichen ORFs, die durch die Clone 35, 36, 81 und 32 reicht und gemeinsam mit dem mutmaßlichen HCV-Polypeptid darin codiert ist. Diese kombinierte Sequenz ist unter Verwendung anderer unabhängiger cDNA-Clone, die aus der gleichen Lambda-gt 11-cDNA-Bibliothek abgeleitet wurden, bestätigt worden.

IV.A.10. Isolierung von HCV-cDNA, die die cDNA in Clon 35 überlappt

Die Isolierung von HCV-cDNA-Sequenzen upstream von, und die jene in Clon-35-cDNA überlappen, wurde wie in Abschnitt IV.A.8. beschrieben für jene durchgeführt, die Clon-36-cDNA überlappen, außer daß das synthetische Polynucleotid auf der 5'-Region von Clon 35 basierte. Die Sequenz des für das Screening verwendeten synthetischen Polynucleotids war:

5' CAG GAT GCT GTG TCC CGC ACT CAA CGT 3'.

Ungefähr 1 in 50000 Clonen hybridisiert mit der Sonde. Der isolierte, gereinigte Clon von rekombinanter Phage, der cDNA enthielt, die an diese Sequenz hybridisierte, wurde Clon 37b genannt.

IV.A.11. Nucleotid-Sequenz von HCV in Clon 37b

Die Nucleotid-Sequenz der cDNA in Clon 37b wurde im wesentlichen wie in Abschnitt IV.A.2. beschrieben ermittelt. Die Sequenz, ihre Überlappingsregion mit der der cDNA in Clon 35 und das darin codierte mutmaßliche Polypeptid werden in Fig. 10 dargestellt.

Das 5'-terminale Nucleotid von Clon 35 ist ein T, wohingegen das entsprechende Nucleotid in Clon 37b ein A ist. Die cDNAs aus drei anderen unabhängigen Clonen, die während der Prozedur isoliert wurden, in der Clon 37b entsprechend der Beschreibung in Abschnitt IV.A.10 isoliert wurde, wurden ebenfalls sequenziert. Die cDNAs aus diesen Clonen enthalten ebenfalls ein A in dieser Position. Somit kann das 5'-terminale T in Clon 35 ein Artefakt der Clonierungsprozedur sein. Es ist bekannt, daß Artefakte oftmals an den 5'-Termini von cDNA-Molekülen auftreten.

Clon 37b enthält offensichtlich einen kontinuierlichen offenen Leserahmen (ORF), der ein Polypeptid codiert, welches eine Fortsetzung des Polypeptids ist, das in dem sich durch die überlappenden Clone, 35, 36, 81 und 32 erstreckenden offenen Leserahmen codiert ist.

IV.A.12. Isolierung von HCV-cDNA, die cDNA in Clon 32 überlappen

Die Isolierung von HCV-cDNA-Sequenzen „downstream“ von Clon 32 wurde wie folgt durchgeführt. Zuerst wurde Clon cla isoliert, wobei eine synthetische Hybridisierungsprobe verwendet wurde, die auf der Nucleotidsequenz der HCV-cDNA-Sequenz in Clon 32 basierte. Die Methode entsprach im wesentlichen der in Abschnitt IV.A.5. beschriebenen, nur daß die Sequenz der synthetischen Sonde so aussah:

5' AGT GCA GTG GAT GAA CCG GCT GAT AGC CTT 3'.

Unter Verwendung der Nucleotidsequenz von Clon cla wurde ein weiteres synthetisches Nucleotid synthetisiert, das die folgende Sequenz hatte:

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

Screening der Lambda-gt 11-Bibliothek unter Verwendung der von Clon cla abgeleiteten Sequenz als Sonde ergab ungefähr 1 in 50000 positiven Kolonien. Ein isolierter gereinigter Clon, der mit dieser Sonde hybridisierte, wurde Clon 33b genannt.

IV.A.13. Nucleotidsequenz von HCV-cDNA in Clon 33b

Die Nucleotidsequenz der cDNA in Clon 33b wurde im wesentlichen wie in Abschnitt IV.A.2. beschrieben bestimmt. Die Sequenz, ihre Region der Überlappung mit der der cDNA in Clon 32 und das darin codierte putative Polypeptid sind in Fig. 11 dargestellt. Clon 33b enthält augenscheinlich einen kontinuierlichen offenen Leserahmen, der eine Erweiterung der offenen Leserahmen in den überlappenden Clonen, 37b, 35, 36, 81 und 32 ist. Das in Clon 33b codierte Polypeptid befindet sich im gleichen translationalen Rahmen wie das im erweiterten offenen Leserahmen dieser überlappenden Clone codierte.

IV.A.14. Isolierung von HCV-cDNAs, die cDNA in Clon 37b und cDNA in Clon 33b überlappen

Zur Isolierung von HCV-cDNAs, die die cDNAs in Clon 37b und in Clon 33b überlappen, wurden die folgenden synthetischen Oligonucleotidsonden, die von den cDNAs in jenen Clonen abgeleitet wurden, verwendet, um die Lambda-gt 11-Bibliothek zu „screenen“, wobei im wesentlichen die in Abschnitt IV.A.3. beschriebene Methode angewendet wurde. Die Sonden:

5' CAG GAT GCT GTC TCC CGC ACT CAA CCT C 3'

und

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

wurden verwendet, um Kolonien zu finden, die HCV-cDNA-Sequenzen enthalten, die jene in den Clonen 37b bzw. 3b überlappen. Etwa 1 in 50000 Kolonien wurde mit jeder Sonde festgestellt. Ein Clon, der cDNA enthielt, die „upstream“ von der cDNA in Clon 37b war und diese überlappte, wurde Clon 40b genannt. Ein Clon, der cDNA enthielt, die „downstream“ von der cDNA in Clon 33b war und diese überlappte, wurde Clon 25c genannt.

IV.A.15. Nucleotidsequenzen von HCV-cDNA in Clon 40b und in Clon 25c

Die Nucleotidsequenzen der cDNAs in Clon 40b und in Clon 25c wurden im wesentlichen wie in Abschnitt IV.A.2. beschrieben bestimmt. Die Sequenzen von 40b und 25c, ihre Überlappingsregionen mit den cDNAs in den Clonen 37b und 33b und die darin codierten putativen Polypeptide werden in Fig. 12 (Clon 40b) und in Fig. 13 (Clon 25c) dargestellt.

Das 5'-terminale Nucleotid von Clon 40b ist ein G. Jedoch wurden die cDNAs von fünf anderen unabhängigen Clonen, die während der Prozedur isoliert wurden, in der Clon 40b isoliert wurde, Beschreibung in Abschnitt IV.A.14., ebenfalls sequenziert. Die cDNAs von diesen Clonen enthalten auch ein T in dieser Position. Somit kann das G ein Clonierungsartefakt darstellen (siehe Diskussion in Abschnitt IV.A.11.).

Das 5'-Ende von Clon 25c ist ACT, aber die Sequenz dieser Region in Clon cla (Sequenz nicht dargestellt) und in Clon 33b ist TCA. Diese Differenz kann auch ein Clonierungsartefakt darstellen, wie die 28 extra 5'-terminalen Nucleotide in Clon 5-1-1.

Die Clone 40b und 25c enthalten augenscheinlich jeweils einen offenen Leserahmen (ORF), der eine Erweiterung des kontinuierlichen offenen Leserahmens in den vorher sequenzierten Clonen ist. Die Nucleotidsequenz des offenen Leserahmens, die durch die Clone 40b, 37b, 35, 36, 81, 32, 33b und 25c verläuft und die Aminosäuresequenz des darin codierten putativen Polypeptids werden in Fig. 14 dargestellt. In der Fig. wurden die potentiellen Artefakte von der Sequenz weggelassen, und statt dessen sind die entsprechenden Sequenzen in nicht-5'-terminalen Regionen multipler Überlappingsclone dargestellt.

IV.A.16. Herstellung einer zusammengesetzten HCV-cDNA aus den cDNAs in den Clonen 36, 81 und 32

Die zusammengesetzte HCV-cDNA, C 100, wurde wie folgt konstruiert. Zuerst wurden die cDNAs aus den Clonen 36, 81 und 32 mit EcoRI ausgeschnitten. Das EcoRI-Fragment der cDNA von jedem Clon wurde individuell in die EcoRI-Stelle des Vektors pGEM3-blue (Promega Biotec) cloniert. Die entstehenden rekombinanten Vektoren, die die cDNAs der Clone 36, 81 und 32 enthielten, wurden pGEM3-blue/36, pGEM3-blue/81 bzw. pGEM3-blue/3 genannt. Die angemessen orientierte pGEM3-blue/81-Rekombinante wurde mit NaeI und NarI digeriert, und das große (~2850 bp) Fragment wurde gereinigt und mit dem kleinen (~570 bp) NaeI/NarI-gereinigten Restriktionsfragment von pGEM3-blue/36 ligiert. Diese Zusammensetzung der cDNAs der Clone 36 und 81 wurde verwendet, um einen weiteren pGEM3-blue-Vektor zu erzeugen, der den kontinuierlichen HCV-ORF enthielt, der in der Überlappings-cDNA innerhalb dieser Clone enthalten war. Dieses neue Plasmid wurde dann mit PvuII und EcoRI digeriert, um ein Fragment von etwa 680 bp freizusetzen, das dann mit dem kleinen (580 bp) PvuII/EcoRI-Fragment ligiert wurde, welches von dem entsprechend orientierten pGEM3-blue/32-Plasmid isoliert wurde, und die zusammengesetzte cDNA aus den Clonen 36, 81 und 32 wurde in den EcoRI-linearisierten Vektor pSODc1 ligiert, der in Abschnitt IV.B.1. beschrieben wird, und der verwendet wurde, um Clon 5-1-1 in Bakterien zu exprimieren. Rekombinanten, die das ~1270 bp-EcoRI-Fragment von zusammengesetzter HCV-cDNA (C 100) enthalten, wurden selektioniert, und die cDNA von den Plasmiden wurde mit EcoRI ausgeschnitten und gereinigt.

IV.A.17. Isolierung und Nucleotidsequenzen von HCV-cDNAs in Clon 14i, 11b, 7f, 7e, 8h, 33c, 14c, 8f, 33f, 33g und 39c

Die HCV-cDNAs in Clon 14i, 11b, 7f, 7e, 8h, 33c, 14c, 8f, 33f, 33g und 39c wurden durch die Technik der Isolierung überlappender cDNA-Fragmente aus der Lambda-gt11-Bibliothek von HCV-cDNAs isoliert, die in Abschnitt IV.A.1. beschrieben werden.

Die angewendete Technik entsprach im wesentlichen der Beschreibung in Abschnitt IV.A.3., ausgenommen, daß die verwendeten Sonden aus der Nucleotidsequenz der zuletzt isolierten Clone des 5'- und des 3'-Endes der kombinierten HCV-Sequenzen entworfen wurden. Die Frequenz der Clone, die mit den nachstehend beschriebenen Sonden hybridisierten, betrug etwa jeweils 1 in 50000.

Die Nucleotidsequenzen der HCV-cDNAs in den Clonen 14i, 7f, 7e, 8h, 33c, 14c, 8f, 33f, 33g und 39c wurden im wesentlichen entsprechend der Beschreibung in Abschnitt IV.A.2. bestimmt, ausgenommen, daß die aus diesen Phagen ausgeschnittene cDNA an die Stelle der aus Clon 5-1-1 isolierten cDNA gesetzt wurde.

Clon 33c wurde unter Verwendung einer Hybridisierungssonde isoliert, die auf der Sequenz von Nucleotiden in Clon 40b basierte. Die Nucleotidsequenz von Clon 40b wird in Fig. 12 dargestellt. Die Nucleotidsequenz der zur Isolierung von 33c verwendeten Sonde war:

5' ATC AGG ACC GGG GTG AGA ACA ATT ACC ACT 3'.

Die Sequenz der HCV-cDNA in Clon 33c und die Überlappung mit der in Clon 40b sind in Fig. 15 dargestellt, die auch die darin codierten Aminosäuren zeigt.

Clon 8h wurde mit einer Sonde isoliert, die auf der Sequenz der Nucleotide in Clon 33c basierte. Die Nucleotidsequenz der Sonde war

5' AGA GAC AAC CAT GAG GTC CCC GGT GTT C 3'.

Die Sequenz der HCV-cDNA in Clon 8h und die Überlappung mit der in Clon 33c und die darin codierten Aminosäuren sind in Fig. 16 gezeigt.

Clon 7e wurde unter Verwendung einer Sonde isoliert, die auf der Sequenz der Nucleotide in Clon 8h basierte. Die Nucleotidsequenz der Sonde war

5' TCG GAC CTT TAC CTG GTC ACG AGG CAC 3'.

Die Sequenz der HCV-cDNA in Clon 7e, die Überlappung mit Clon 8h sowie die darin codierten Aminosäuren sind in Fig. 17 dargestellt.

Clon 14c wurde mit einer Sonde isoliert, die auf der Sequenz der Nucleotide in Clon 25c basierte. Die Sequenz von Clon 25c ist in Fig. 13 dargestellt. Die Sonde hatte bei der Isolierung von Clon 14c die Sequenz

5' ACC TTC CCC ATT AAT GCC TAC ACC ACG GGC 3'.

Die Sequenz der HCV-cDNA in Clon 14c, ihre Überlappung mit der in Clon 25c und die darin codierten Aminosäuren sind in Fig. 18 dargestellt.

Clon 8f wurde unter Verwendung einer Sonde isoliert, die auf der Sequenz von Nucleotiden in Clon 14c basierte. Die Nucleotidsequenz der Sonde war

5' TCC ATC TCT CAA GGC AAC TTG CAC CGC TAA 3'.

Die Sequenz von HCV-cDNA in Clon 8f, ihre Überlappung mit der in Clon 14c und die darin codierten Aminosäuren sind in Fig. 19 dargestellt.

Clon 33f wurde unter Einsatz einer Sonde isoliert, die auf der in Clon 8f vorhandenen Nucleotidsequenz basierte. Die Nucleotidsequenz der Sonde war

5' TCC ATG GCT GTC CGC TTC CAC CTG CAA AGT 3'.

Die Sequenz von HCV-cDNA in Clon 33f, ihre Überlappung mit der in Clon 8f und die darin codierten Aminosäuren werden in Fig. 20 gezeigt.

Clon 33g wurde unter Verwendung einer Sonde isoliert, die auf der Sequenz von Nucleotiden in Clon 33f basierte. Die Nucleotidsequenz der Sonde war

5' GCG ACA ATA CGA CAA CAT CCT CTG AGC CCG 3'.

Die Sequenz von HCV-cDNA in Clon 33g, ihre Überlappung mit der in Clon 33f und die darin codierten Aminosäuren sind in Fig. 21 dargestellt.

Clon 7f wurde unter Einsatz einer Sonde isoliert, die auf der Sequenz von Nucleotiden in Clon 7e basierte. Die Nucleotidsequenz der Sonde war

5' AGC AGA CAA GGG GCC TCC TAG GGT GCA TAA T 3'.

Die Sequenz von HCV-cDNA in Clon 7f, ihre Überlappung mit Clon 7e und die darin codierten Aminosäuren sind in Fig. 22 dargestellt.

Clon 11b wurde unter Verwendung einer Sonde isoliert, die auf der Sequenz von Clon 7f basierte. Die Nucleotidsequenz war

5' CAC CTA TGT TTA TAA CCA TGT CAC TCC TCT 3'.

Die Sequenz der HCV-cDNA in Clon 11 b, ihre Überlappung mit Clon 7 f und die darin codierten Aminosäuren sind in Fig. 23 dargestellt.
Clon 14 i wurde unter Verwendung einer Sonde isoliert, die auf der Sequenz von Nucleotiden in Clon 11 b basierte. Die Nucleotidsequenz der Sonde war:

5' CTC TGT CAC CAT ATT ACA AGC GCT ATA TCA 3'.

Die Sequenz der HCV-cDNA in Clon 14 i, ihre Überlappung mit Clon 11 b und die darin codierten Aminosäuren sind in Fig. 24 dargestellt.
Clon 39 c wurde unter Einsatz einer Sonde isoliert, die auf der Sequenz von Nucleotiden in Clon 33 g basierte. Die Nucleotidsequenz der Sonde war

5' CTC GTT GCT ACG TCA CCA CAA TTT GGT GTA 3'.

Die Sequenz von HCV-cDNA in Clon 39 c, ihre Überlappung mit Clon 33 g und die darin codierten Aminosäuren sind in Fig. 25 dargestellt.

IV.A.18. Die von isolierten, HCV-cDNA enthaltenden Clonen abgeleitete zusammengesetzte HCV-cDNA-Sequenz

Die HCV-cDNA-Sequenzen in den oben beschriebenen isolierten Clonen wurden in einer Linie angeordnet, um eine zusammengesetzte HCV-cDNA-Sequenz zu schaffen. Die in der 5'–3'-Richtung angeordneten isolierten Clone sind: 14 i, 7 f, 7 e, 8 h, 33 c, 40 b, 37 b, 35, 36, 81, 32, 33 b, 25 c, 14 c, 8 f, 33 f, 33 g und 39 c. Eine von den isolierten Clonen abgeleitete zusammengesetzte HCV-cDNA-Sequenz und die darin codierten Aminosäuren sind in Fig. 26 dargestellt.
Bei der Schaffung der zusammengesetzten Sequenz wurden die folgenden Sequenzheterogenitäten berücksichtigt. Clon 33 c enthält eine HCV-cDNA von 800 Basenpaaren, die die cDNAs in den Clonen 40 b und 37 c überlappt. In Clon 33 c sowie in 5 anderen überlappenden Clonen ist Nucleotid 789 ein G. In Clon 37 b (siehe Abschnitt IV.A.11.) ist das entsprechende Nucleotid jedoch ein A. Diese Sequenzdifferenz schafft in den darin codierten Aminosäuren eine augenscheinliche Heterogenität, und zwar CYS oder TYR für G bzw. A. Diese Heterogenität kann hinsichtlich der Proteinfaltung wichtige Verzweigungen (ramifications) haben.

Nucleotidrest 2 in Clon-8 h-HCV-cDNA ist ein T. Wie jedoch nachstehend aufgezeigt wird, ist der entsprechende Rest in Clon 7 e ein A. Außerdem wird ein A in dieser Position auch in 3 anderen isolierten überlappenden Clonen gefunden. So kann der T-Rest in Clon 8 h ein Clonierungsartefact darstellen. Deshalb wird der Rest in dieser Position in Fig. 26 als ein A bezeichnet.

Das 3'-terminale Nucleotid in Clon-8 f-HCV-cDNA ist ein G. Der entsprechende Rest in Clon 33 f und in zwei anderen überlappenden Clonen ist jedoch ein T. Deshalb wird der Rest in dieser Position in Fig. 26 als ein T bezeichnet.

Die 3'-terminale Sequenz in Clon-33 f-HCV-cDNA ist TTGC. Die entsprechende Sequenz in Clon 33 g und in zwei anderen überlappenden Clonen ist jedoch ATTC. Deshalb ist in Fig. 26 die entsprechende Region als ATTC dargestellt.

Nucleotidrest 4 in Clon-33 g-HCV-cDNA ist ein T. In Clon 33 f und in zwei anderen überlappenden Clonen ist der entsprechende Rest jedoch ein A. Deshalb wird der entsprechende Rest in Fig. 26 als ein A bezeichnet.

Das 3'-Ende von Clon 14 i ist AA, während das entsprechende Dinucleotid in Clon 11 b und in drei anderen Clonen TA ist. Deshalb wird in Fig. 26 der TA-Rest dargestellt.

Die Auflösung der anderen Sequenzheterogenitäten wird vorstehend diskutiert.

Eine Untersuchung der zusammengesetzten HCV-cDNA zeigt, daß sie einen großen offenen Leserahmen enthält. Das deutet darauf hin, daß das Virusgenom in ein großes Polypeptid translatiert wird, das gleichzeitig mit oder anschließend an die Translation prozessiert wird.

IV.A.19. Isolierung und Nucleotidsequenzen von HCV-cDNAs in den Clonen 12 f, 35 f, 19 g, 26 g und 15 a

Die HCV-cDNAs in den Clonen 12 f, 35 f, 19 g, 26 g und 15 a wurden im wesentlichen nach der in Abschnitt IV.A.17. beschriebenen Technik isoliert, ausgenommen, daß die Sonden wie unten angegeben waren. Die Frequenz von Clonen, die mit den Sonden hybridisierten, betrug in jedem Fall etwa 1 in 50000. Die Nucleotidsequenzen der HCV-cDNAs in diesen Clonen wurde im wesentlichen gemäß der Beschreibung in Abschnitt IV.A.2. bestimmt, ausgenommen, daß die cDNA aus den angegebenen Clonen anstelle der aus Clon 5-1-1 isolierten cDNA eingesetzt wurde.

Die Isolierung von Clon 12 f, der cDNA „upstream“ von der HCV-cDNA in Fig. 26 enthält, erfolgte unter Verwendung einer Hybridisierungssonde, die auf der Sequenz von Nucleotiden in Clon 14 i basierte. Die Nucleotidsequenz der Sonde war

5' TGC TTG TGG ATG ATG CTA CTC ATA TCC CTA 3'.

Die HCV-cDNA-Sequenz von Clon 12 f, ihre Überlappung mit Clon 14 i und die darin codierten Aminosäuren werden in Fig. 27 dargestellt.

Die Isolierung von Clon 35 f, der cDNA „downstream“ von der HCV-cDNA in Fig. 26 enthält, wurde unter Verwendung einer Hybridisierungssonde durchgeführt, die auf der Sequenz der Nucleotide in Clon 39 c basierte. Die Nucleotidsequenz der Sonde war

5' AGC AGC GGC GTC AAA AGT GAA GGC TAA CTT 3'.

Die Sequenz von Clon 35 f, ihre Überlappung mit der Sequenz in Clon 39 c und die darin codierten Aminosäuren sind in Fig. 28 dargestellt.

Die Isolierung von Clon 19 g erfolgte unter Einsatz einer Hybridisierungssonde, die auf der 3'-Sequenz von Clon 35 f basierte. Die Nucleotidsequenz der Sonde war

5' TTC TCG TAT GAT ACC CGC TGC TTT GAC TCC 3'.

Die HCV-cDNA-Sequenz von Clon 19g, ihre Überlappung mit der Sequenz in Clon 35f und die darin codierten Aminosäuren werden in Fig. 29 dargestellt.
Die Isolierung von Clon 26g erfolgte unter Verwendung einer Hybridisierungs-sonde, die auf der 3'-Sequenz von Clon 19g basierte. Die Nucleotidsequenz der Sonde war

5' TGT GTG GCG ACG ACT TAG TCG TTA TCT GTG 3'.

Die HCV-cDNA-Sequenz von Clon 26g, ihre Überlappung mit der Sequenz in Clon 19g und die darin codierten Aminosäuren werden in Fig. 30 dargestellt.
Clon 15e wurde unter Verwendung einer Hybridisierungs-sonde isoliert, die auf der 3'-Sequenz von Clon 26g basierte. Die Nucleotidsequenz der Sonde war

5' CAC ACT CCA GTC AAT TCC TGG CTA GGC AAC 3'.

Die HCV-cDNA-Sequenz von Clon 15e, ihre Überlappung mit der Sequenz in Clon 26g und die darin codierten Aminosäuren werden in Fig. 31 dargestellt.
Die in diesem Abschnitt beschriebenen Clone wurden unter den in Abschnitt II.A. beschriebenen Bedingungen bei der ATCC hinterlegt und erhielten die folgenden Zugriffsnummern:

Lambda-gt 11	ATCC-Nr.	Hinterlegungsdatum
Clon 12f	40514	10. Nov. 1988
Clon 35f	40511	10. Nov. 1988
Clon 15e	40513	10. Nov. 1988
Clon K9-1	40512	10. Nov. 1988

Die HCV-cDNA-Sequenzen in den oben beschriebenen isolierten Clonen wurden in einer Linie angeordnet, um die zusammengesetzte HCV-cDNA-Sequenz zu schaffen. Die in der 5'-3'-Richtung angeordneten isolierten Clone sind: 12f, 14i, 7f, 7e, 8h, 33c, 40b, 37b, 35, 36, 81, 32, 33b, 25c, 14c, 8f, 33f, 33g, 39c, 35f, 19g, 26g und 15e.
Eine von den isolierten Clonen abgeleitete zusammengesetzte HCV-cDNA-Sequenz und die darin codierten Aminosäuren sind in Fig. 32 dargestellt.

IV.A.20. Alternative Methode der Isolierung von cDNA-Sequenzen „upstream“ von der HCV-cDNA-Sequenz in Clon 12f
Auf der Basis der größten 3'-HCV-Sequenz in Fig. 32, die von der HCV-cDNA in Clon 12f abgeleitet ist, werden kleine synthetische Oligonucleotidprimer von Reverse Transkriptase synthetisiert und zur Bindung an die entsprechende Sequenz in HCV-genomischer RNA, zum Starten der Reverse Transkription der „upstream“ Sequenzen, verwendet. Die Primer-Sequenzen sind proximal zu der bekannten 5'-terminalen Sequenz von Clon 12f, aber ausreichend „downstream“, um den Entwurf von Sondensequenzen „upstream“ von den Primer-Sequenzen zu gestatten. Bekannte Standardmethoden des Startens und Clonierens werden angewendet. Die entstehenden cDNA-Bibliotheken werden mit Sequenzen „upstream“ von den Bindungsorten (priming sites) gescreent (wie von der erläuterten Sequenz bei Clon 12f hergeleitet). Die HCV-genomische RNA wird entweder aus Plasma- oder Leberproben von Schimpansen mit NANBH oder aus analogen Proben von Menschen mit NANBH gewonnen.

IV.A.21. Alternative Methode unter Ausnutzung von „Tailen“ zur Isolierung von Sequenzen aus der 5'-terminalen Region des HCV-Genoms

Zur Isolierung der extremen 5'-terminalen Sequenzen des HCV-RNA-Genoms wird das cDNA-Produkt der ersten Runde der Reversen Transkription, die mit der Template-RNA duplexiert wird, mit Oligo-C „tailed“. Das wird erreicht, indem das Produkt in Anwesenheit von CTP mit terminaler Transferase inkubiert wird. Die zweite Runde der cDNA-Synthese, die das Komplement des ersten cDNA-Stranges liefert, erfolgt unter Verwendung von Oligo-G als Primer für die Reverse-Transkriptase-Reaktion. Die Quellen für genomische HCV-RNA werden in Abschnitt IV.A.20. beschrieben. Die Methoden für „tailing“ mit Terminal-Transferase sind wie in Maniatis et al. (1982). Die cDNA-Produkte werden dann cloniert, gescreent und sequenziert.

IV.A.22. Alternative Methode unter Ausnutzung von „Tailen“ zur Isolierung

Diese Methode basiert auf früher angewendeten Methoden zur Clonierung von cDNAs von Flavivirus-RNA. Bei dieser Methode wird die RNA denaturierenden Bedingungen unterzogen, um sekundäre Strukturen am 3'-Ende zu entfernen, und wird dann unter Verwendung von rATP als Substrat mit Poly-A-Polymerase „tailed“. Die Reverse Transkription der Poly-A-„tailed“-RNA wird durch Reverse Transkriptase katalysiert, wobei Oligo-dT als Primer eingesetzt wird. Die zweiten cDNA-Stränge werden synthetisiert, die cDNA-Produkte werden cloniert, gescreent und sequenziert.

IV.A.23. Schaffung von Lambda-gt 11-HCV-cDNA-Bibliotheken, die größere cDNA-Inserts enthalten

Die zur Schaffung und zum Screening der Lambda-gt 11-Bibliothek angewendete Methode entspricht im wesentlichen der Beschreibung in Abschnitt IV.A.1., ausgenommen, daß die Bibliothek aus einem Pool größerer cDNAs erzeugt wird, die aus der Sepharose-CL-4B-Säule eluiert wurden.

IV.A.24. Schaffung von HCV-cDNA-Bibliotheken unter Verwendung synthetischer Oligomere als Primer

Neue HCV-cDNA-Bibliotheken wurden aus der RNA hergestellt, die von dem in Abschnitt IV.A.1. beschriebenen infektiösen Schimpansenplasmapool gewonnen wurde, und aus der Poly-A⁺-Fraktion, die von der Leber dieses infizierten Tieres gewonnen wurde. Die cDNA wurde im wesentlichen gemäß der Beschreibung von Gubler und Hoffman (1983) konstruiert, ausgenommen, daß die Primer für die Synthese des ersten cDNA-Stranges zwei synthetische Oligomere waren, die auf der Sequenz des oben beschriebenen HCV-Genoms basierten. Primer, die auf der Sequenz von Clon 11b und 7e basierten, waren

5' CTG GCT TGA AGA ATC 3'
bzw.
5' AGT TAG GCT GGT GAT TAT GC 3'.

Die entstehenden cDNAs wurden in Lambda-Bakteriophage-Vektoren cloniert und mit verschiedenen anderen synthetischen Oligomeren, deren Sequenz auf der HCV-Sequenz, in Fig. 32, basierte, gescreent.

IV.B. Expression von in HCV-cDNAs codierten Polypeptiden und Identifizierung der exprimierten Produkte als HCV-induzierte Antigene

IV.B.1. Expression des in Clon 5-1-1 codierten Polypeptids

Das in Clon 5-1-1 codierte HCV-Polypeptid (siehe Abschnitt IV.A.2. oben) wurde als ein Fusionspolypeptid mit Superoxiddismutase (SOD) exprimiert. Das erfolgte durch Subclonieren des Clon 5-1-1-cDNA-Inserts in den Expressionsvektor pSODcf1 (Steimer et al. [1986]) auf folgende Weise.

Zuerst wurde von pSODcf1 isolierte DNA mit BamH1 und EcoRI behandelt, und der folgende Linker wurde in die lineare DNA ligiert, die durch die Restriktionsenzyme geschaffen wurde:

5' GAT CCT GGA ATT CTG ATA A 3'
3' GA CCT TAA GAC TAT TTT AA 5'.

Nach der Clonierung wurde das das Insert enthaltende Plasmid isoliert.

Das das Insert enthaltende Plasmid wurde mit EcoRI restringiert (restricted). Das HCV-cDNA-Insert in Clon 5-1-1 wurde mit EcoRI ausgeschnitten und in diese EcoRI-linearisierte Plasmid-DNA ligiert. Das DNA-Gemisch wurde verwendet, um den *E. coli*-Stamm D 1210 (Sadler et al. [1980]) zu transformieren. Rekombinanten mit der 5-1-1-cDNA in der richtigen Orientierung für die Expression des ORF, siehe Fig. 1, wurden durch Restriktionskartierung und Nucleotidsequenzierung identifiziert. Rekombinante Bakterien von einem Clon wurden durch Züchten der Bakterien in Anwesenheit von IPTG zur Expression des SOD-NANB₅₋₁₋₁-Polypeptids induziert.

IV.B.2. Expression des in Clon 81 codierten Polypeptids

Die in Clon 81 enthaltene HCV-cDNA wurde als ein SOD-NANB₈₁-Fusionspolypeptid exprimiert. Die Methode zur Herstellung des dieses Fusionspolypeptid codierenden Vektors war analog zu der Methode, die für die Schaffung des SOD-NANB₅₋₁₋₁ codierenden Vektors eingesetzt wurde, mit dem Unterschied, daß die Quelle der HCV-cDNA Clon 81 war, der gemäß der Beschreibung in Abschnitt IV.A.3. isoliert wurde und für den die DNA-Sequenz gemäß der Beschreibung in Abschnitt IV.A.4. ermittelt wurde. Die Nucleotidsequenz der HCV-cDNA in Clon 81 und die putative Aminosäuresequenz des darin codierten Polypeptids sind in Fig. 4 dargestellt.

Das HCV-cDNA-Insert in Clon 81 wurde mit EcoRI ausgeschnitten und in pSODcf1 ligiert, das den Linker (siehe IV.B.1.) enthielt und durch Behandlung mit EcoRI linearisiert wurde. Das DNA-Gemisch wurde zur Transformierung des *E. coli*-Stamms D 1210 verwendet. Rekombinanten mit der Clon-81-HCV-cDNA in der richtigen Orientierung für die Expression des in Fig. 4 dargestellten ORF (offener Leserahmen) wurden durch Restriktionskartierung und Nucleotidsequenzierung identifiziert.

Rekombinante Bakterien von einem Clon wurden durch Züchten der Bakterien in Anwesenheit von IPTG zur Expression des SOD-NANB₈₁-Polypeptids induziert.

IV.B.3. Identifizierung des in Clon 5-1-1 codierten Polypeptids als ein HCV- und NANBH-assoziiertes Antigen

Das in der HCV-cDNA von Clon 5-1-1 codierte Polypeptid wurde als ein NANBH-assoziiertes Antigen identifiziert, indem demonstriert wurde, daß Seren von mit NANBH infizierten Schimpansen und Menschen immunologisch mit dem Fusionspolypeptid, SOD-NANB₅₋₁₋₁, reagierten, welches zusammengesetzt ist aus Superoxiddismutase an seinem N-Terminus und dem „in-frame“ 5-1-1-Antigen an seinem C-Terminus. Das erfolgte durch „Western blotting“ (Towbin et al. [1979]) in folgender Weise.

Ein rekombinanter Bakterienstamm, der mit einem das SOD-NANB₅₋₁₋₁-Polypeptid codierenden Expressionsvektor transformiert war, siehe Beschreibung in Abschnitt IV.B.1., wurde durch Züchtung in Anwesenheit von IPTG zur Expression des Fusionspolypeptids induziert. Das gesamte Bakterienlysat wurde der Elektrophorese durch Polyacrylamidgele in Anwesenheit von SDS nach Laemmli (1970) unterzogen. Die separierten Polypeptide wurden auf Nitrocellulosefilter übertragen (Towbin et al. [1979]). Die Filter wurden dann in dünne Streifen geschnitten, und die Streifen wurden einzeln mit den unterschiedlichen Schimpansen- und Humansen inkubiert. Gebundene Antikörper wurden durch weitere Inkubation mit ¹²⁵I-markiertem Schaf-Anti-Human-IG, gemäß der Beschreibung in Abschnitt IV.A.1., nachgewiesen.

Die Charakterisierung der für die „Western blots“ verwendeten Schimpansenseren und die Ergebnisse, dargestellt in der Fotografie der autoradiografisch aufgenommenen Streifen, sind in Fig. 33 zu sehen. Polypeptide enthaltende Nitrocellulosestreifen wurden mit Seren inkubiert, die von Schimpansen zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der akuten NANBH-(Hutchinson-Stamm)-Infektionen (Spur [lane] 1-16), Hepatitis-A-Infektionen (Spur 17-24 und 26-33) und Hepatitis-B-Infektionen (Spur 34-44) gewonnen wurden. Die Spuren 25 und 45 zeigen positive Kontrollen, bei denen die Immunoblots mit Serum von dem Patienten inkubiert wurden, der zur Identifizierung des rekombinanten Clons 5-1-1 beim ursprünglichen Screening der Lambda-gt11-cDNA-Bibliothek (siehe Abschnitt IV.A.1.) genommen wurde.

Die in den Kontrollspuren 25 und 45 in Fig. 23 sichtbare Bande widerspiegelt die Bindung von Antikörpern an die NANB₅₋₁₋₁-Komponente des SOD-Fusionspolypeptids. Diese Antikörper weisen nicht nur eine Bindung an SOD auf, da dieses ebenfalls als negative Kontrolle in diese Proben eingeschlossen wurde, sie wären als eine Bande erschienen, die signifikant schneller als das SOD-NANB₅₋₁₋₁-Fusionspolypeptid migriert.

Die Spuren 1-16 von Fig. 33 zeigen die Antikörperbindung in Serumproben von 4 Schimpansen. Die Proben wurden unmittelbar vor der Infektion mit NANBH und dann während der akuten Infektion gewonnen. Die Fig. vermittelt folgendes: Während in den Serumproben, die vor der Verabreichung des infektiösen HCV-Inoculums und während der frühen akuten Phase der Infektion gewonnen wurden, Antikörper, die immunologisch mit dem SOD-NANB₅₋₁₋₁-Polypeptid reagierten, fehlten, induzierten alle 4 Tiere schließlich während des letzten Teils der akuten Phase oder im Anschluß daran zirkulierende Antikörper gegen dieses

Polypeptid. Zusätzliche Bande, die bei den Schimpansen Nr. 3 und 4 auf den Immunoblots beobachtet wurden, waren auf Hintergrundbindung (background binding) an Wirtsbakterienproteine zurückzuführen.

Im Gegensatz zu den Resultaten, die mit Seren von mit NANBH infizierten Schimpansen gewonnen wurden, wurde die Entwicklung von Antikörpern gegen die NANB_{5.1.1}-Komponente des Fusionspolypeptids bei 4 Schimpansen, die mit HAV infiziert waren, bzw. 3 Schimpansen, die mit HBV infiziert waren, nicht beobachtet. Die einzige Bindung war in diesen Fällen Hintergrundbindung an Wirtsbakterienproteine, die auch bei den HCV-infizierten Proben auftrat.

Die Charakterisierung der für die „Western blots“ verwendeten Humansen und die Ergebnisse, die in der Fotografie der autoradiografisch aufgenommenen Streifen gezeigt sind, sind in Fig. 34 zu sehen. Polypeptide enthaltende Nitrocellulosestreifen wurden mit Seren inkubiert, die von Menschen zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Infektion mit NANBH (Spur 1–21), HAV (Spur 33–40) und HBV (Spur 41–49) gewonnen wurden. Die Spuren 25 und 50 zeigen positive Kontrollen, bei denen die Immunoblots mit Patientenserum inkubiert wurden, das beim ursprünglichen Screening der oben beschriebenen Lambda-gt 11-Bibliothek verwendet wurde. Die Spuren 22–24 und 26–32 zeigen „nicht infizierte“ Kontrollen, bei denen die Seren von „normalen“ Blutspendern stammten.

Wie aus Fig. 34 ersichtlich ist, enthielten die Seren von neun NANBH-Patienten, einschließlich das zum Screening der Lambda-gt 11-Bibliothek verwendete Serum, Antikörper gegen die NANB_{5.1.1}-Komponente des Fusionspolypeptids. Die Seren von drei Patienten mit NANBH enthielten diese Antikörper nicht. Es ist möglich, daß sich die Anti-NANB_{5.1.1}-Antikörper bei diesen Patienten zu einem späteren Zeitpunkt entwickeln. Es ist auch möglich, daß dieser Reaktionsmangel von einem unterschiedlichen NANBV-Agens resultierte, das bei den Individuen, von denen das nicht-ansprechende Serum genommen wurde, auslösend für die Krankheit war.

Fig. 34 zeigt auch, daß Seren von vielen mit HAV und HBV infizierten Patienten keine Anti-NANB_{5.1.1}-Antikörper enthielten, und daß diese Antikörper auch nicht in den Seren von „normalen“ Kontrollen vorhanden waren. Obgleich ein HAV-Patient (Spur 36) augenscheinlich Anti-NANB_{5.1.1}-Antikörper hat, ist es möglich, daß dieser Patient vorher mit HCV infiziert war, die die Inzidenz von NANBH sehr hoch ist und da sie oft subklinisch verläuft.

Diese serologischen Untersuchungen zeigen, daß die cDNA in Clon 5-1-1 Epitope codiert, die von Seren von mit BB-NANBV infizierten Patienten und Tieren spezifisch erkannt werden. Außerdem wird die cDNA augenscheinlich nicht von dem Primatengenom hergeleitet. Eine von Clon 5-1-1 oder von Clon 81 hergestellte Hybridisierungs-sonde hybridisierte unter Bedingungen, wo einzigartige, „single-copy“-Gene nachweisbar waren, nicht an „Southern blots“ von Kontroll-Human- und -Schimpansen-genomischer DNA von nicht infizierten Individuen. Diese Sonden hybridisierten auch nicht an „Southern blots“ von Kontroll-Rinder-genomischer DNA.

IV.B.4. Expression des in einer Zusammensetzung der HCV-DNAs in Clon 36, 81 und 32 codierten Polypeptids

Das HCV-Polypeptid, welches in dem offenen Leserahmen codiert ist, der sich durch Clon 36, 81 und 32 erstreckt, wurde mit SOD als ein Fusionspolypeptid exprimiert. Das erfolgte durch Inserieren der zusammengesetzten cDNA (composite cDNA), C 100, in eine Expressionskassette, die das Human-Superoxiddismutase-Gen enthält, Inserieren der Expressionskassette in einen Hefeexpressionsvektor und Exprimieren des Polypeptids in Hefe.

Eine Expressionskassette, die die von Clon 36, 81 und 32 abgeleitete C 100-cDNA enthielt, wurde konstruiert, indem das ~ 1270bp-EcoRI-Fragment in die EcoRI-Stelle des Vektors pS3-56 (auch pS356 genannt) inseriert wurde, wobei das Plasmid pS3-56_{C100} gewonnen wurde. Die Konstruktion von C 100 ist in vorstehendem Abschnitt IV.A.16. beschrieben.

Vektor pS3-56, der ein pBR322-Derivat ist, enthält eine Expressionskassette, die aus dem ADH2/GAPDH-Hybrid-Hefepromotor „upstream“ von dem Human-Superoxiddismutasegen und einem „downstream“ GAPDH-Transkriptionsterminator zusammengesetzt ist. Eine ähnliche Kassette, die diese Kontrollelemente und das Superoxiddismutase-Gen enthält, ist bei Cousens et al. (1987) und in der gleichfalls anhängigen Anmeldung GPO 196056, veröffentlicht am 1. Oktober 1986, die gemeinschaftliches Eigentum des Zessionärs dieser Anmeldung ist, beschrieben. Die Kassette in pS3-56 unterscheidet sich jedoch von der bei Cousens et al. (1987), wo das heterologe Proinsulingen und das Immunoglobulin „hinge“ (Scharnier) deletiert werden, und wo sich an gl_{N154} der Superoxiddismutase eine Adaptorsequenz anschließt, die eine EcoRI-Stelle enthält. Die Sequenz des Adaptors ist:

5'-AAT TTG GGA ATT CCA TAA TGA G 3'
AC CCT TAA GGT ATT ACT CAG CT

Die EcoRI-Stelle gestattet die Insertion von heterologen Sequenzen, die bei Expression von einem die Kassette enthaltenden Vektor Polypeptide liefern, die über einen die Aminosäuresequenz:

-asn-leu-gly-ile-ar-

enthaltenden Oligopeptidlinker an Superoxiddismutase fusioniert werden.

Eine Probe von pS356 wurde am 29. April 1988 unter den Bedingungen des Budapestervertrages bei der American Type Culture Collection (ATCC), 12301 Parklawn Dr., Rockville, Maryland 20853, hinterlegt und erhielt die Zugriffsnummer 67683. Die Bedingungen bezüglich Verfügbarkeit und Zugriff zu dem hinterlegten Material und bezüglich Erhaltung des hinterlegten Materials entsprechen den in Abschnitt II.A. spezifizierten für Stämme, die NANBV-cDNAs enthalten. Diese Hinterlegung soll nur eine Erleichterung bieten, aber nicht die praktische Ausführung der Erfindung im Hinblick auf die hier gegebene Beschreibung darstellen. Das hinterlegte Material ist hierin durch Bezugnahme eingeschlossen.

Nach der Isolierung von Rekombinanten, die das C100-cDNA-Insert in der richtigen Orientierung enthalten, wurde die die C100-cDNA enthaltende Expressionskassette mit BamHI aus pS3-56_{C100} ausgeschnitten, und ein die Kassette enthaltendes Fragment von ~ 3400 bp wurde isoliert und gereinigt. Dieses Fragment wurde dann in die BamHI-Stelle des Hefevektors pAB24 inseriert.

Plasmid pAB24, dessen signifikante Merkmale in Figur 35 dargestellt sind, ist ein Hefe-„shuttle“-Vektor, der die komplette 2-Mikrometer-Sequenz für Replikation (Broach [1981]) und pBR322-Sequenzen enthält. Er enthält auch das von Plasmid YEp24 (Bostein et al. [1979]) abgeleitete Hefe-URA3-Gen und das von Plasmid pCI/1 abgeleitete Hefe-LEU^{2d}-Gen. EPO Veröffentlichungs-Nr. 116.201. Plasmid pAB24 wurde beschrieben in US-Anmeldeaktenzeichen 138.894, dessen Eigentümer der hier angegebene Zessionär ist. Plasmid pAB24 wurde konstruiert, indem YEp24 mit EcoRI digeriert wurde und der Vektor religiert

wurde, um die partielle 2-Mikrometer-Sequenz zu entfernen. Das entstehende Plasmid, YEP24deltaRI wurde durch Digestion mit ClaI linearisiert und mit dem kompletten 2-Mikrometer-Plasmid, das mit ClaI linearisiert worden war, ligiert. Das resultierende Plasmid, pCBou wurde dann mit SbaI digeriert, und das 8605bp-Vektorfragment wurde gel-isoliert. Dieses isolierte XbaI-Fragment wurde mit einem 4460bp-SbaI-Fragment, welches das von pCI/1-isolierte LEU^{2d}-Gen enthielt, ligiert. Die Orientierung des LEU^{2d}-Gens hat die gleiche Richtung wie das URA3-Gen. Die Insertion der Expression erfolgte an der einzigartigen EcoRI-Stelle der pBR322-Sequenz (? unleserliche Stelle), wodurch das Gen bezüglich bakterieller Resistenz gegenüber Tetracyclin unterbrochen wurde.

Das rekombinante Plasmid, das die SOD-C100-Expressionskassette, pAB24100-3, enthielt, wurde in den Hefestamm JSC 308 sowie in andere Hefestämme transformiert. Die Zellen wurden nach der Beschreibung von Hinnen et al. (1978) transformiert und auf ura-selektive Platten plattiert. Einzelne Kolonien wurden in leu-selektive Medien inokuliert und bis zur Sättigung gezüchtet. Die Kultur wurde durch Züchten in YEP mit Gehalt von 1 % Glucose zur Expression des SOD-Polypeptids (genannt C100-3) induziert.

Stamm JSC 308 ist vom Genotyp MAT, leu2, ura3(del) DM15 (GAP/ADR1), der am ADR1-Locus integriert ist. Bei JSC 308 resultiert Überexpression des positiven Aktivatorgenproduktes ADR1 in Hyperderepression (im Verhältnis zu einer ADR1-Wildtyp-Kontrolle) und signifikant höheren Ausbeuten an exprimierten heterologen Proteinen, wenn solche Proteine über ein ADH2-UAS-Reguliersystem synthetisiert werden. Die Konstruktion des Hefestammes JSC 308 wird in der gleichfalls anhängigen Anmeldung, US-Anmeldeaktenzeichen (Attorney Docket No. [Anwaltsaktennummer] 2300-0229), offenbart, die gleichzeitig hiermit eingereicht wurde und hier durch Bezugnahme eingeschlossen ist. Eine Probe von JSC 308 wurde am 5. Mai 1988 beim ATCC unter den Bedingungen des Budapester Vertrages hinterlegt und erhielt die Zugriffsnummer 20879. Die Bedingungen bezüglich Verfügbarkeit und Zugriff zu dem hinterlegten Material und bezüglich Erhaltung der Hinterlegung sind die gleichen wie die in Abschnitt II.A. für HCV-cDNAs enthaltende Stämme spezifizierten.

Das in pAB24C 100-3 codierte komplette C100-3-Fusionspolypeptid sollte 154 Aminosäuren von Human-SOD am Amino-Terminus, 5 vom die EcoRI-Stelle enthaltenden synthetischen Adaptor abgeleiteten Aminosäurereste, 363 von C100-cDNA abgeleitete Aminosäurereste und 5 Carboxy-terminale Aminosäuren enthalten, die von der MS2-Nucleotidsequenz abgeleitet sind, die der HCV-cDNA-Sequenz in Clon 32 benachbart ist. (Siehe Abschnitt IV.A.7.) Die putative Aminosäuresequenz des Carboxy-Terminus dieses Polypeptids, beginnend am vorletzten Ala-Rest von SOD, wird in Figur 34 dargestellt. Ebenfalls dargestellt ist die diesen Abschnitt des Polypeptids codierende Nucleotidsequenz.

IV.B.5. Identifizierung des in C100 codierten Polypeptids als ein NANBH-assoziiertes Antigen

Das aus Plasmid pAB24C100-3 in Hefestamm JSC308 exprimierte C100-3-Fusionspolypeptid wurde in bezug auf Größe charakterisiert, und das in C100 codierte Polypeptid wurde aufgrund seiner immunologischen Reaktionsfähigkeit mit Serum von einem Menschen mit chronischer NANBH als ein NANBH-assoziiertes Antigen identifiziert. Das C100-3-Polypeptid, das gemäß der Beschreibung in Abschnitt IV.B.4. exprimiert wurde, wurde folgendermaßen analysiert. Hefe- JSC-308-Zellen wurden mit pAB24 oder mit pAB24C100-3 transformiert und wurden zur Expression des heterologen Plasmid-codierten Polypeptids induziert. Die induzierten Hefezellen in 1 ml Kultur ($OD_{650nm} \sim 20$) wurden durch einminütige Zentrifugation bei 10000 U/min pelletiert und wurden lysiert, indem sie kräftig (10×1 min) mit 2 Volumen Lösung und 1 Volumen Glasperlen (0,2 Nanometer Durchmesser) verwirbelt wurden. Die Lösung enthielt 50 mM Tris-HCl, pH 0,8, 1 mM EDTA, 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) und 1 Mikrogramm/ml Pepstatin. Unlösliches Material im Lysat, das das C100-3-Polypeptid enthielt, wurde durch Zentrifugation gesammelt (10000 U/min über einen Zeitraum von 5 Minuten) und durch 5minütiges Sieden in Laemmli-SDS-Probenpuffer gelöst. (Siehe Laemmli [1970]). Eine Polypeptidmenge, die der in 0,3 ml der induzierten Hefekultur äquivalent war, wurde Elektrophorese durch 10%ige Polyacrylamidgele in Anwesenheit von SDS nach Laemmli (1970) unterzogen. Proteinstandards wurden auf den Gelen co-elektrophoretisiert. Die exprimierten Polypeptide enthaltende Gele wurden entweder mit Coomassie-Brilliantblau gefärbt oder „Western blotting“ nach der Beschreibung in Abschnitt IV.B.2. unterzogen, wobei Serum von einem Patienten mit chronischer NANBH genommen wurde, um die immunologische Reaktionsfähigkeit der aus pAB24 und aus pAB24C100-3 exprimierten Polypeptide zu bestimmen. Die Resultate sind in Figur 37 dargestellt. In Figur 37A wurden die Polypeptide mit Coomassie-Brilliantblau gefärbt. Die unlöslichen Polypeptide von mit pAB24 transformiertem JSC 308 und von zwei weiteren Kolonien von mit pAB24C100-3 sind in den Spuren 1 (pAB24) bzw. 2 und 3 zu sehen. Ein Vergleich von Spur 2 und 3 mit Spur 1 zeigt die induzierte Expression eines Polypeptids entsprechend einer relativen Molekülmasse von ~ 54000 Dalton aus mit pAB24C100-3 transformiertem JSC 308, die nicht in mit pAB24 transformiertem JSC 308 induziert wird. Dieses Polypeptid wird durch den Pfeil angezeigt. Figur 37B zeigt die Resultate der „Western blots“ der in mit pAB24 (Spur 1) oder mit pAB24C100-3 (Spur 2) transformiertem Hefestamm JSC 308 exprimierten unlöslichen Polypeptide. Die aus pAB24 exprimierten Polypeptide waren mit Serum von einem Menschen mit NANBH immunologisch nicht reaktionsfähig. Wie jedoch durch den Pfeil angegeben wird, exprimierte mit pAB24C100-3 transformierter JSC 308 ein Polypeptid mit einer relativen Molekülmasse von ~ 54000 Dalton, das mit dem Human-NANBH-Serum reagierte. Die anderen immunologisch reaktionsfähigen Polypeptide in Spur 2 können Degradations- und/oder Aggregationsprodukte dieses ~ 54000 -Dalton-Polypeptids sein.

IV.B.6. Reinigung von Fusionspolypeptid C100-3

Das aus SOD am N-Terminus und „in-frame“ C100-HCV-Polypeptid am C-Terminus zusammengesetzte Fusionspolypeptid C100-3 wurde durch differentielle Extraktion der unlöslichen Fraktion der extrahierten Wirtshefezellen, in denen das Polypeptid exprimiert wurde, gereinigt.

Das Fusionspolypeptid C100-3 wurde, wie in Abschnitt IV.B.4. beschrieben, in mit pAB24C100-3 transformiertem Hefestamm JSC 308 exprimiert. Die Hefezellen wurden dann durch Homogenisierung lysiert, das unlösliche Material im Lysat wurde bei pH 12,0 extrahiert, und C100-3 in der verbleibenden unlöslichen Fraktion wurde in Puffer mit SDS-Gehalt löslich gemacht. Das Hefelysat wurde im wesentlichen nach Nagahuma et al. (1984) hergestellt. Es wurde eine Hefezellensuspension hergestellt. Sie bestand aus 33% Zellen (Vol./Vol.), die in einer Lösung (Puffer A) suspendiert waren, die 20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM Dithiothreitol und 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) enthielt. Eine aliquote Menge der Suspension (15 ml) wurde mit einem gleichen Volumen Glasperlen (0,45 bis 0,50 mm Durchmesser) gemischt, und das Gemisch wurde bei

Höchstgeschwindigkeit 8 Minuten lang in einem Super-Mixer (Lab Line Instruments, Inc.) verwirbelt. Homogenat und Glasperlen wurden getrennt, und die Glasperlen wurden dreimal mit dem gleichen Volumen von Puffer A wie die anfänglich eingesetzten Zellen gewaschen. Nach der Vereinigung von Waschabgängen und Homogenat wurde das unlösliche Material im Lysat gewonnen, indem das Homogenat 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert wurde, die Pellets im doppelten Volumen von Puffer A wie die anfänglich eingesetzten Zellen resuspendiert wurden, und das Material durch 15minütiges Zentrifugieren bei 7000 × g repelletiert wurde. Dieser Waschvorgang wurde dreimal wiederholt.

Das unlösliche Material aus dem Lysat wurde bei pH 12,0 wie folgt extrahiert. Das Pellet wurde in Puffer, der 0,5M NaCl, 1 mM EDTA enthielt, suspendiert, wobei das Suspensionsvolumen 1,8mal der anfänglich eingesetzten Zellen entsprach. Der pH-der Suspension wurde durch Zusatz von 0,2 Volumen 0,4 M Na-Phosphatpuffer, pH 12,0 eingestellt. Nach dem Mischen wurde die Suspension 15 Minuten bei 4°C bei 7000 × g zentrifugiert, und die überstehende Flüssigkeit wurde entfernt. Die Extraktion wurde zweimal wiederholt. Die extrahierten Pellets wurden gewaschen, indem sie in 0,5M NaCl, 1 mM EDTA, suspendiert wurden, wobei ein Suspensionsvolumen verwendet wurde, das zweimal dem der anfänglich eingesetzten Zellen entsprach. Daran schloß sich 15minütiges Zentrifugieren bei 4°C bei 7000 × g an.

Das C100-3-Polypeptid in dem extrahierten Pellet wurde durch Behandlung mit SDS löslich gemacht. Die Pellets wurden in einer Puffer-A-Menge suspendiert, die 0,9 Volumen des Volumens der anfänglich eingesetzten Zellen entsprach, und 0,1 Volumen 2%iges SDS wurde zugesetzt. Nach dem Mischen der Suspension wurde sie 15 Minuten lang bei 4°C bei 7000 × g zentrifugiert. Das entstehende Pellet wurde weitere 3mal mit SDS extrahiert. Die entstehenden Überstände, die C100-3 enthielten, wurden gesammelt.

Diese Verfahrensweise reinigt C100-3 mehr als 10fach von der unlöslichen Fraktion des Hefehomogenats, und die Rückgewinnung des Polypeptids beträgt mehr als 50%.

Das gereinigte Fusionspolypeptidpräparat wurde durch Polyacrylamidelektrophorese nach Laemmli (1970) analysiert. Auf Basis dieser Analyse war das Polypeptid zu mehr als 80% rein und hatte eine scheinbare relative Molekülmasse von ~54000 Dalton.

IV.C. Identifizierung von an HCV-cDNA hybridisierender RNA in infizierten Individuen

IV.C.1. Identifizierung von an HCV-cDNA hybridisierender RNA in der Leber eines Schimpansen mit NANBH

Es wurde nachgewiesen, daß RNA aus der Leber eines Schimpansen, der NANBH hatte, eine RNA-Spezies enthielt, die an in Clon81 enthaltene HCV-cDNA hybridisierte, und zwar durch „Northern blotting“ auf folgende Weise.

RNA wurde aus Leberbiopsiematerial des Schimpansen isoliert, wovon das Plasma mit dem hohen Titer (siehe Abschnitt IV.A.1.) unter Anwendung von Techniken gewonnen wurde, die bei Maniatis et al. (1982) für die Isolierung von totaler RNA aus Säugetierzellen und für ihre Trennung in Poly-A⁻- und Poly-A⁺-Fraktionen beschrieben wurden. Diese RNA-Fraktionen wurden Elektrophorese auf einem Formaldehyd/Agarose-Gel (1% Masse/Vol.) unterzogen und auf Nitrocellulose transferiert. (Maniatis et al. [1982]). Die Nitrocellulosefilter wurden mit radioaktiv markierter HCV-cDNA von Clon 81 hybridisiert (siehe Fig. 4 bezüglich der Nucleotidsequenz des Inserts). Zur Herstellung der radioaktiv markierten Sonde wurde das aus Clon 81 isolierte HCV-cDNA-Insert durch „nick“-Translation unter Verwendung von DNA-Polymerase I (Maniatis et al. [1982]) radioaktiv markiert. Die Hybridisierung erfolgte 18 Stunden bei 42°C in einer Lösung, die 10% (Masse/Vol.) Dextransulfat, 50% (Masse/Vol.) deionisiertes Formamid, 750mM NaCl, 75mM Na-Citrat, 20mM Na₂HPO₄, pH 6,5, 0,1% SDS, 0,02% (Masse/Vol.) Rinderserumalbumin (BSA = bovine serum albumin), 0,02% (Masse/Vol.) Ficoll-400, 0,02% (Masse/Vol.) Polyvinylpyrrolidon, 100 Mikrogramm/ml Salmispermien-DNA, die durch Beschallung gesichert und denaturiert worden war, und 10⁶ CPM/ml der „nick“-translatierten cDNA-Sonde enthielt.

Eine autoradiografische Aufnahme des gesonderten Filters wird in Fig. 38 gezeigt. Spur 1 enthält ³²p-markierte Restriktionsfragmentmarker. Die Spuren 2–4 enthalten Schimpansenleber-RNA wie folgt: Spur 2 enthält 30 Mikrogramm totale RNA; Spur 3 enthält 30 Mikrogramm Poly-A⁻-RNA; und Spur 4 enthält 20 Mikrogramm Poly-A⁺-RNA. Wie in Fig. 32 gezeigt, enthält die Leber des Schimpansen mit NANBH eine heterogene Population von verwandten Poly-A⁻-RNA-Molekülen, die an die HCV-DNA-Sonde hybridisiert und die augenscheinlich etwa 5000 bis 11 000 Nucleotide groß ist. Diese RNA, die an die HCV-cDNA hybridisiert, könnte Virusgenome und/oder spezifische Transkriptase des Virusgenoms darstellen. Das in nachstehendem Abschnitt IV.C.2. beschriebene Experiment bestätigt die Vermutung, daß HCV ein RAN-Genom enthält.

IV.C.2. Identifizierung von HCV-abgeleiteter RNA im Serum von infizierten Individuen

Nucleinsäuren wurden aus Partikeln isoliert, die, wie in Abschnitt IV.A.1. beschrieben, aus Schimpansen-NANBH-Plasma mit hohem Titer isoliert wurden. Aliquoten (die 1 ml Originalplasma äquivalent waren) der isolierten Nucleinsäuren wurden in 20 Mikroliter 50mM Hepes, pH 7,5, 1mM EDTA und 16 Mikrogramm/ml hefelöslicher RNA resuspendiert. Die Proben wurden durch 5minütiges Sieden mit anschließendem sofortigen Frosten denaturiert und mit RNase (5 Mikroliter mit Gehalt an 0,1 mg/ml RNase in 25mM EDTA, 40mM Hepes, pH 7,5) oder mit DNase I (5 Mikroliter mit Gehalt von 1 Einheit DNase I in 10mM MgCl₂, 25mM Hepes, pH 7,5) behandelt. Kontrollproben wurden ohne Enzym inkubiert. Nach der Inkubation wurden 230 Mikroliter eiskaltes 2XSSC mit Gehalt an 2 Mikrogramm/ml hefelöslicher RNA zugesetzt und die Proben wurden auf einem Nitrocellulosefilter filtriert. Die Filter wurden mit einer cDNA-Sonde von Clon 81 hybridisiert, die durch „nick“-Translation ³²p-markiert worden war. Fig. 39 zeigt eine autoradiografische Aufnahme des Filters. Hybridisierungssignale wurden in den DNase-behandelten Proben und Kontrollproben (Spuren 2 bzw. 1) nachgewiesen, aber nicht in der RNase-behandelten Probe (Spur 3). Da also RNase-A-Behandlung die von den Partikeln isolierten Nucleinsäuren zerstörte und DNase-Behandlung keinen Effekt hatte, kann man als erwiesen annehmen, daß das HCV-Genom aus RNA besteht.

IV.C.3. Nachweis von HCV-Nucleinsäuresequenzen in Leber- und Plasmaproben von Schimpansen mit NANBH abgeleiteten amplifizierten Nucleinsäuresequenzen

In der Leber und im Plasma von Schimpansen mit NANBH und bei Kontrollschimpansen HCV-Nucleinsäuren wurden im wesentlichen unter Anwendung der von Saiki et al. (1986) beschriebenen PCR-Technik (PCR = polymerase chain reaction) amplifiziert. Die Primer-Oligonucleotide wurden von den HCV-cDNA-Sequenzen in Clon 81 oder Clon 36 und 37 abgeleitet. Die amplifizierten Sequenzen wurden durch Gelelektrophorese und „Southern blotting“ nachgewiesen, wobei als Sonden das geeignete cDNA-Oligomer mit einer Sequenz von der Region zwischen, aber nicht einschließlich, der beiden Primer verwendet wurde.

Proben von RNA mit HCV-Sequenzen, die durch das Amplifikationssystem untersucht werden sollten, wurden aus Leberbiopsienmaterial von drei Schimpansen mit NANBH und von zwei Kontrollschimpansen isoliert. Die Isolierung der RNA-Fraktion erfolgte durch die in Abschnitt IV.C.1. beschriebene Guanidiniumthiocyanatprozedur.

Durch das Amplifikationssystem zu untersuchende RNA-Proben wurden auch aus dem Plasma von zwei Schimpansen mit NANBH und von einem Kontrollschimpansen sowie von einem Pool von Plasmen von Kontrollschimpansen isoliert. Ein infizierter Schimpanse hatte einen CID/ml gleich oder größer als 10^6 , und der andere infizierte Schimpanse hatte einen CID/ml gleich oder größer als 10^5 .

Die Nucleinsäuren wurden folgendermaßen aus dem Plasma extrahiert. Entweder 0,1 ml oder 0,01 ml Plasma wurden auf ein Endvolumen von 1,0 ml verdünnt, und zwar mit einer TENB/Proteinase-K/SDS-Lösung (0,05 M Tris-HCl, pH 9,0, 0,001 M EDTA, 0,1 M NaCl, 1 mg/ml Proteinase K und 0,5% SDS) mit einem Gehalt von 10 Mikrogramm/ml Polydenylsäure, und 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach dieser Proteinase-K-Digestion wurden resultierenden Plasmafraktionen durch Extraktion mit TE-(10,0 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA)-gesättigtem Phenol deproteinisiert. Die Phenolphase wurde durch Zentrifugation abgetrennt und mit 0,1% SDS enthaltendem TENB reextrahiert. Die entstehenden wäßrigen Phasen von jeder Extraktion wurden gepoolt und zweimal mit einem gleichen Volumen von Phenol/Chloroform/Isoamylalcohol (1:1 [99:2]) und dann zweimal mit einem gleichen Volumen eines 99:1-Gemisches aus Chloroform/Isoamylalcohol extrahiert. Nach der Phasentrennung durch Zentrifugation wurde die wäßrige Phase auf eine Endkonzentration von 0,2 M Na-Acetat gebracht, und die Nucleinsäuren wurden durch den Zusatz von zwei Volumen Ethanol ausgefällt. Die ausgefallenen Nucleinsäuren wurden durch Ultrazentrifugation in einem SW-41-Rotor bei 38 K 60 Minuten lang bei 4°C rückgewonnen.

Außerdem wurden das Schimpansenplasma mit dem hohen Titer und das gesammelte Kontrollplasma abwechselnd nach dem Verfahren von Chomczynski und Sacchi (1987) mit 50 Mikrogramm Poly-A-Träger extrahiert. Bei dieser Verfahrensweise wird eine Säureguanidiniumthiocyanatextraktion angewendet. RNA wurde durch 10 Minuten lange Zentrifugation bei 10000 U/min bei 4°C in einer Eppendorf-Microfuge rückgewonnen.

In zwei Fällen wurden vor der Synthese von cDNA in der PCR-Reaktion die durch die Proteinase-K/SDS/Phenol-Methode aus dem Plasma extrahierten Nucleinsäuren weiter gereinigt, indem sie an S- und S-Elutip-R-Säulen gebunden und aus ihnen eluiert werden. Das Verfahren wurde nach den Richtlinien des Herstellers durchgeführt.

Die als Matrice für die PCR-Reaktion verwendete cDNA wurde von den nach vorstehender Beschreibung hergestellten Nucleinsäuren (entweder totale Nucleinsäuren oder RNA) abgeleitet. Im Anschluß an die Ethanolpräzipitation wurde die präzipitierten Nucleinsäure getrocknet und in DEPC-behandeltem destilliertem Wasser resuspendiert. Sekundäre Strukturen in den Nucleinsäuren wurden durch 10minütiges Halten bei 65°C getrennt, und die Proben wurden sofort auf Eis gekühlt. cDNA wurde unter Verwendung von 1 bis 3 Mikrogramm totaler Schimpansen-RNA aus der Leber oder von aus 10 bis 100 Mikrolitern Plasma extrahierten Nucleinsäuren (oder RNA) synthetisiert. Bei der Synthese wurde Reverse Transkriptase verwendet, und sie erfolgte in einem 25-Mikroliter-Reaktionsgefäß nach dem vom Hersteller, BRL, spezifizierten Protokoll. Bei den Primern für die cDNA-Synthese handelte es sich um diejenigen, die auch bei der nachstehend beschriebenen PCR-Reaktion verwendet wurden. Alle Reaktionsgemische für die cDNA-Synthese enthielten 23 Einheiten des RNase-Inhibitors RNASINTM (Fisher/Promega). Im Anschluß an die cDNA-Synthese wurden die Reaktionsgemische mit Wasser verdünnt, 10 Minuten gekocht und schnell auf Eis gekühlt.

Die PCR-Reaktionen wurden im wesentlichen nach den Richtlinien des Herstellers ausgeführt (Cetus-Perkin-Elmer), mit Ausnahme des Zusatzes von 1 Mikrogramm RNase A. Die Reaktionen wurden in einem Endvolumen von 100 Mikroliter durchgeführt. Die PCR-Technik erfolgte in 35 Zyklen mit einem Temperaturregime von 37°C, 72°C und 94°C.

Die Primer für die cDNA-Synthese und für die PCR-Reaktionen wurden von den HCV-cDNA-Sequenzen in Clon 81, Clon 36 oder Clon 37 b abgeleitet. (Die HCV-cDNA-Sequenzen von Clon 81, 36 und 37 b sind in den Figuren 4, 5 bzw. 10 dargestellt.) Die Sequenzen der beiden von Clon 81 abgeleiteten 16-mer Primer waren:

5' CAA TCA TAC CTG ACA G 3' und
5' GAT AAC CTC TGC CTG A 3'.

Die Sequenz des Primers von Clon 36 war:

5' GCA TGT CAT GAT GTA T 3'.

Die Sequenz des Primers von Clon 37 b war:

5' ACA ATA CGT GTG TCA C 3'.

Bei den PCR-Reaktionen bestanden die Primerpaare entweder aus den beiden von Clon 81 abgeleiteten 16-mer von Clon 36 und dem 16-mer von Clon 37 b.

Die Produkte der PCR-Reaktion wurden durch Trennung der Produkte durch Alkaligelelektrophorese, gefolgt von „Southern blotting“ und Nachweis der amplifizierten HCV-cDNA-Sequenzen mit einer ³²P-markierten internen Oligonucleotidsonde, die von einer nicht die Primer überlappenden Region der HCV-cDNA abgeleitet worden war, analysiert. Die PCR-Reaktionsgemische wurden mit Phenol/Chloroform extrahiert, und die Nucleinsäuren wurden aus der wäßrigen Phase mit Salz und Ethanol präzipitiert. Die präzipitierten Nucleinsäuren wurden durch Zentrifugation gesammelt und in destilliertem Wasser gelöst. Aliquoten der Proben wurden auf 1,8%igen alkalischen Agarosegelen der Elektrophorese unterzogen. Einzelsträngige DNAs mit einer Länge von 60, 108 und 161 Nucleotiden wurden auf Gelen als „Marker“ für die relative Molekülmasse co-elektrophoretisiert. Nach der Elektrophorese wurden die DNAs in dem Gel auf Biorad-Zeta-SondenTM-Papier transferiert. Prähybridisierung und Hybridisierung sowie Waschbedingungen entsprachen der Spezifikation des Herstellers (Biorad).

Die für Hybridisierung/Nachweis der amplifizierten HCV-cDNA-Sequenzen verwendeten Sonden waren die folgenden. Wurde das PCR-Primerpaar von Clon 81 gewonnen, war die Sonde ein 108-mer mit einer Sequenz, die der in der Region zwischen den Sequenzen der beiden Primer gelegenen entsprach. Wurde das PCR-Primerpaar von Clon 36 und Clon 37 b abgeleitet, war die Sonde das von Clon 35 abgeleitete „nick“-translatierte HCV-cDNA-Insert. Die Primer werden von den Nucleotiden 155–170 des Clon-37 b-Inserts und den Nucleotiden 206–268 des Clon-36-Inserts abgeleitet. Das 3'-Ende des HCV-cDNA-Inserts in Clon 35 überlappt die Nucleotide 1–186 des Inserts in Clon 36; und das 5'-Ende des Clon-35-Inserts überlappt die Nucleotide 207–269 des

Inserts in Clon 37 b. (Vergleiche Figuren 5, 8 und 10). So überspannt das cDNA-Insert in Clon 35 einen Teil der Region zwischen den Sequenzen der von Clon 36 und Clon 37 b abgeleiteten Primer und ist nützlich als Sonde für die amplifizierten Sequenzen, die diese Primer einschließen.

Die Analyse der RNA aus den Leberproben erfolgte nach der obigen Prozedur unter Einsatz beider Gruppen Primer und Sonden. Die RNA aus der Leber der drei Schimpansen mit NANBH lieferte positive Hybridisierungsergebnisse für Amplifikationssequenzen der erwarteten Größe (161 und 586 Nucleotide für 81 bzw. 36 und 37 b), während die Kontrollschimpansen negative Hybridisierungsergebnisse lieferten. Die gleichen Ergebnisse wurden erzielt, wenn das Experiment dreimal wiederholt wurde.

Die Analyse der Nucleinsäuren und RNA aus dem Plasma erfolgte ebenfalls nach der obigen Prozedur unter Einsatz der Primer und der Sonde von Clon 81. Die Plasmen stammten von zwei Schimpansen mit NANBH, von einem Kontrollschimpansen und gepoolten Plasmen von Kontrollschimpansen. Beide NANBH-Plasmen enthielten Nucleinsäuren/RNA, was bei dem PCR-amplifizierten Assay zu positiven Ergebnissen führte, während beide Kontrollplasmen negative Resultate lieferten. Diese Resultate wurden mehrere Male in Wiederholungstests erzielt.

IV. D. Radioimmunoassay zum Nachweis von HCV-Antikörpern im Serum von Infizierten Individuen

Festphasen-Radioimmunoassays zum Nachweis von Antikörpern gegen HCV-Antigene wurden auf der Basis von TSU und Herzenberg (1980) entwickelt. Mikrotiterplatten (Immulon 2, Removawell-Streifen) werden mit HCV-Epitope enthaltenden gereinigten Polypeptiden beschichtet. Die beschichteten Platten werden mit Humanserumproben inkubiert, von denen angenommen wird, daß sie Antikörper gegen die HCV-Epitope enthalten, oder mit geeigneten Kontrollen. Während der Inkubation wird der Antikörper, sofern vorhanden, immunologisch an das Festphasen-Antigen gebunden. Nach Entfernen des ungebundenen Materials und Waschen der Mikrotiterplatten werden Komplexe von Human-Antikörper-NANBV-Antigen durch Inkubation mit ¹²⁵I-markiertem Schaf-Anti-Human-Immunglobulin nachgewiesen. Ungebundener markierter Antikörper wird durch Aspiration entfernt, und die Platten werden gewaschen. Die Radioaktivität in einzelnen Vertiefungen wird bestimmt; die Menge an gebundenen Human-Anti-HCV-Antikörpern ist proportional zur Radioaktivität in der Vertiefung.

IV. D. 1. Reinigung von Fusionspolypeptid SOD-NANB₅₋₁₋₁

Das Fusionspolypeptid SOD-NANB₅₋₁₋₁, exprimiert in rekombinanten Bakterien, wie in Abschnitt IV. B. 1. beschrieben, wurde aus den rekombinanten E. coli durch differentielle Extraktion der Zellenextrakte mit Harnstoff und anschließender Chromatografie auf Anionen- und Kationenaustauschersäulen wie folgt gereinigt.

Aufgetaute Zellen von 1 Liter Kultur wurden in 10 ml 20%iger (Masse/Vol.) Sucrose mit Gehalt von 0,01 M Tris-HCl, pH 8,0, resuspendiert, und 0,4 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0 wurden zugesetzt. Nach 5 Minuten bei 0°C wurde das Gemisch 10 Minuten bei 4000 x g zentrifugiert. Das entstehende Pellet wurde in 10 ml 24%iger (Masse/Vol.) Sucrose mit einem Gehalt von 0,05 N Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) und 1 Mikrogramm/ml Pepstatin A suspendiert, woran sich die Zugabe von 0,5 ml Lysozym (10 mg/ml) und Inkubation bei 0°C über einen Zeitraum von 10 Minuten anschlossen. Nach dem Zusatz von 10 ml 1%igem (Vol./Vol.) Triton X-100 in 0,05 M Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, wurde das Gemisch weitere 10 Minuten bei 0°C unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Die entstehende viskose Lösung wurde homogenisiert, indem sie 6mal durch eine sterile hypoderme Nadel mit einer Feinheit von 20 Gauge geleitet und 20 Minuten bei 13000 x g zentrifugiert wurde. Das pelletierte Material wurde in 5 ml 0,01 M Tris-HCl, pH 8,0, suspendiert, und die Suspension wurde 10 Minuten lang bei 4000 x g zentrifugiert. Das Pellet, das SOD-NANB₅₋₁₋₁-Fusionsprotein enthielt, wurde in 5 ml 6 M Harnstoff in 0,02 M Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM Dithiothreitol (Puffer A) gelöst und auf eine mit Puffer A ausgeglichene Säule von Q-Sepharose Fast Flow gegeben. Polypeptide wurden mit einem linearen Gradienten von 0,0 bis 0,3 M NaCl in Puffer A eluiert. Nach der Elution wurden die Fraktionen durch Polyacrylamidgelelektrophorese in Anwesenheit von SDS zur Bestimmung ihres Gehaltes an SOD-NANB₅₋₁₋₁ analysiert. Fraktionen, die dieses Polypeptid enthielten, wurden gesammelt und gegen 5 M Harnstoff in 0,02 M Natriumphosphatpuffer, pH 6,0, 1 mM Dithiothreitol (Puffer B) dialysiert. Die dialysierte Probe wurde auf eine mit Puffer B ausgeglichene Säule von S-Sepharose Fast Flow gegeben, und Polypeptide wurden mit einem linearen Gradienten von 0,0 bis 0,3 M NaCl in Puffer B eluiert. Die Fraktionen wurden durch Polyacrylamidgelelektrophorese auf die Anwesenheit von SOD-NANB₅₋₁₋₁ hin analysiert, und die geeigneten Fraktionen wurden gepoolt.

Das fertige SOD-NANB₅₋₁₋₁-Polypeptidpräparat wurde durch Elektrophorese auf Polyacrylamidgelen in Anwesenheit von SDS untersucht. Auf der Basis dieser Analyse war das Präparat zu mehr als 80% rein.

IV. D. 2. Reinigung von Fusionspolypeptid SOD-NANB₈₁

Das Fusionspolypeptid SOD-NANB₈₁, exprimiert in rekombinanten Bakterien, wie in Abschnitt IV. B. 2. beschrieben, wurde aus rekombinanten E. coli durch differentielle Extraktion der Zellenextrakte mit Harnstoff, gefolgt von Chromatografie auf Anionen- und Kationenaustauschersäulen unter Anwendung der für die Isolierung von Fusionspolypeptid SOD-NANB₅₋₁₋₁ beschriebenen Prozedur (siehe Abschnitt IV. D. 1.), gereinigt.

Das fertige SOD-NANB₈₁-Polypeptidpräparat wurde durch Elektrophorese auf Polyacrylamidgelen in Anwesenheit von SDS untersucht. Auf der Basis dieser Analyse war das Präparat zu mehr als 50% rein.

IV. D. 3. Nachweis von Antikörpern gegen HCV-Epitope durch Festphasen-Radioimmunoassay

Serumproben von 32 Patienten, bei denen NANBH diagnostiziert worden war, wurden durch Radioimmunoassay (RIA) analysiert, um zu ermitteln, ob Antikörper gegen in Fusionspolypeptiden SOD-NANB₅₋₁₋₁ vorhandene HCV-Epitope nachweisbar waren.

Mikrotiterplatten wurden mit SOD-NANB₅₋₁₋₁ oder SOD-NANB₈₁ beschichtet, die nach den Abschnitten IV. D. 1. bzw. IV. D. 2. partiell gereinigt worden waren. Die Assays wurden wie folgt ausgeführt. 100-Milliliter-Aliquoten mit einem Gehalt von 0,1 bis 0,5 Mikrogramm SOD-NANB₅₋₁₋₁ oder SOD-NANB₈₁ in 0,125 M Na-Boratpuffer, pH 8,3, 0,075 M NaCl (BBS) wurden in jede Vertiefung einer Mikrotiterplatte (Dynatech Immulon 2, Removawell-Streifen) gegeben. Die Platte wurde über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert, wonach die Proteinlösung entfernt wurde und die Vertiefungen dreimal mit BBS mit einem Gehalt von 0,02% Triton X-100 (BBST) gewaschen wurden. Zur Verhinderung nichtspezifischer Bindung wurden die Vertiefungen mit Rinderserumalbumin (BSA) unter Zusatz von 100 Mikrolitern einer 5-mg/ml-Lösung von BSA in BBS überzogen, woran sich Inkubation bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von einer Stunde anschloß. Nach dieser Inkubation wurde die BSA-Lösung entfernt. Die Polypeptide in den beschichteten Vertiefungen wurden mit Serum zur Reaktion gebracht,

indem 100 Mikroliter Serumproben, verdünnt im Verhältnis 1:100 in 0,01 M Na-Phosphatpuffer, pH 7,2, 0,15 M NaCl (PBS) mit einem Gehalt von 10mg/ml BSA, zugesetzt wurden und die Vertiefungen mit dem Serum 1 Stunde bei 37°C inkubiert wurden. Nach der Inkubation wurden die Serumproben durch Aspiration entfernt, und die Vertiefungen wurden 5 mal mit BBST gewaschen. An die Fusionspolypeptide gebundenes Anti-NANB₅₋₁₋₁ und Anti-NANB₈₁ wurde durch die Bindung von ¹²⁵I-markiertem F(ab)₂-Schaf-Anti-Human-IgG an die beschichteten Vertiefungen bestimmt. Aliquote Mengen von 100 Mikrolitern der markierten Sonde (spezifische Aktivität 5–20 Mikrocurie/Mikrogramm) wurden in jede Vertiefung gegeben, und die Platten wurden eine Stunde lang bei 37°C inkubiert, woran sich Entfernung von überschüssiger Sonde durch Aspiration und 5 Wäschen mit BBST anschlossen. Die Menge Radioaktivität, die in jeder Vertiefung gebunden war, wurde durch Zählen in einem Zähler, der Gammastrahlung nachweist, bestimmt.

Die Ergebnisse des Nachweises von Anti-NANB₅₋₁₋₁ und Anti-NANB₈₁ in Individuen mit NANBH sind in Tabelle 1 angegeben.

Tabelle 1

Nachweis von Anti-5-1-1 und Anti-81 in Seren von NANB-, HAV- und HBV-Hepatitis-Patienten

Patienten- bezugs- nummer	Diagnose	S/N	
		Anti-5-1-1	Anti-81
1. 28 ¹	Chronische NANB, IVD ²⁾	0,77	4,20
	Chronische NANB, IVD	1,44	5,14
	Chronische NANB, IVD	2,11	4,05
2. 29 ¹	AVH ³⁾ , NANB, sporadisch	1,09	1,05
	Chronisch, NANB	33,89	11,39
	Chronisch, NANB	36,22	13,67
3. 30 ¹	AVH, NANB, IVD	1,90	1,54
	Chronische NANB, IVD	34,17	30,28
	Chronische NANB, IVD	32,45	30,84
4. 31	Chronische NANB, PT ⁴⁾	16,09	8,05
5. 32 ¹	Späte AVH NANB, IVD	0,69	0,94
	Späte AVH, NANB, IVD	0,73	0,68
6. 33 ¹	AVH, NANB, IVD	1,66	1,96
	AVH, NANB, IVD	1,53	0,56
7. 34 ¹	Chronische NANB, PT	34,40	7,55
	Chronische NANB, PT	45,55	13,11
	Chronische NANB, PT	41,58	13,45
	Chronische NANB, PT	44,20	15,48
8. 35 ¹	AVH NANB, IVD	31,92	31,95
	„Geheilte“ rezente NANB, AVH	6,87	4,45
9. 36	Späte AVH NANB PT	11,84	5,79
10. 37	AVH NANB, IVD	6,52	1,33
11. 38	Späte AVH NANB, PT	39,44	39,18
12. 39	Chronische NANB, PT	42,22	37,54
13. 40	AVH, NANB, PT	1,35	1,17
14. 41	Chronische NANB, PT	0,35	0,28
15. 42	AVH, NANB, IVD	6,25	2,34
16. 43	Chronische NANB, PT	0,74	0,61
17. 44	AVH, NANB, PT	5,40	1,83
18. 45	Chronisch, NANB, PT	0,52	0,32
19. 46	AVH, NANB	23,35	4,15
20. 47	AVH, Typ A	1,60	1,35
21. 48	AVH, Typ A	1,30	0,66
22. 49	AVH, Typ A	1,44	0,74
23. 50	Gelöste (resolved)	0,48	0,56
	rezente AVH, Typ A		
24. 51	AVH, Typ A	0,68	0,64
	Gelöste AVH, Typ A	0,80	0,65
25. 52	Gelöste rezente AVH, Typ A	1,38	1,04
	Gelöste rezente AVH, Typ A	0,80	0,65
26. 53	AVH, Typ A	1,85	1,16
	Gelöste rezente AVH, Typ A	1,02	0,88
27. 54	AVH, Typ A	1,35	0,74
28. 55	Späte AVH, HBV	0,58	0,55
29. 56	Chronisch, HBV	0,84	1,06
30. 57	Späte AVH, HBV	3,20	1,60
31. 58	Chronisch, HBV	0,47	0,46
32. 59 ¹	AVH, HBV	0,73	0,60
	Geheilte AVH, HBV	0,43	0,44
33. 60 ¹	AVH, HBV	1,06	0,92
	Geheilte AVH, HBV	0,75	0,68
34. 61 ¹	AVH, HBV	1,66	0,61
	Geheilte AVH, HBV	0,63	0,36

Tabelle 1 (Fortsetzung)

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

1) Von diesen Patienten stehen sequentielle Serumproben zur Verfügung.

2) IVD = Intravenous Drug User (Benutzer intravenöser Drogen).

3) AVH = Akute Virushepatitis.

4) PT = Post transfusion (nach Transfusion).

Wie aus Tabelle 1 ersichtlich ist, waren 19 von 32 Seren von Patienten, bei denen NANBH diagnostiziert worden war, in bezug auf Antikörper, die gegen in SOD-NANB₅₋₁₋₁ und SOD-NANB₈₁ vorhandene HCV Epitope gerichtet waren, positiv. Die positiven Serumproben waren jedoch nicht gleichermaßen immunologisch reaktionsfähig mit SOD-NANB₅₋₁₋₁ und SOD-NANB₈₁. Serumproben von Patient Nr. 1 waren positiv gegenüber SOD-NANB₈₁, aber nicht gegenüber SOD-NANB₅₋₁₋₁. Serumproben von den Patienten Nr. 10, 15 und 17 waren positiv gegenüber SOD-NANB₅₋₁₋₁, aber nicht gegenüber SOD-NANB₈₁. Serumproben von den Patienten Nr. 3, 8, 11 und 12 reagierten gleichermaßen mit beiden Fusionspolypeptiden, während Serumproben von den Patienten Nr. 2, 4, 7 und 9 gegenüber SOD-NANB₅₋₁₋₁ eine 2- bis 3mal stärkere Reaktion aufwiesen als gegenüber SOD-NANB₈₁. Diese Resultate lassen schließen, daß NANB₅₋₁₋₁ und NANB₈₁ mindestens drei verschiedene Epitope enthalten können, d.h., es ist möglich, daß jedes Polypeptid mindestens ein einzigartiges Epitop enthält und daß die beiden Polypeptide mindestens ein Epitop teilen.

IV.D.4. Spezifität der Festphasen-RIA bezüglich NANBH

Die Spezifität der Festphasen-Radioimmunoassays bezüglich NANBH wurde getestet, indem man den Assay auf der Basis von Serum von mit HAV oder mit HBV infizierten Patienten und Seren von Kontrollindividuen durchführte. Die Assays unter Einsatz von teilweise gereinigtem SOD-NANB₅₋₁₋₁ und SOD-NANB₈₁ wurden im wesentlichen gemäß der Beschreibung in Abschnitt IV.D.3. durchgeführt, mit dem Unterschied, daß die Seren von Patienten stammten, bei denen vorher HAV oder HBV diagnostiziert worden war, oder von Individuen, die Blutspender waren. Die Resultate für Seren von HAV- und HBV-infizierten Patienten sind in Tabelle 1 dargestellt. Der Radioimmunoassay wurde unter Verwendung von 11 Serumproben von HAV-infizierten Patienten und 20 Serumproben von HBV-infizierten Patienten getestet. Wie in Tabelle 1 dargestellt, zeigte keines dieser Seren eine positive immunologische Reaktion mit den BB-NANBV-Epitope enthaltenden Fusionspolypeptiden. Der RIA unter Verwendung des NANB₅₋₁₋₁-Antigens wurde benutzt, um die immunologische Reaktionsfähigkeit von Serum von Kontrollindividuen zu bestimmen. Von 230 Serumproben, die von den normalen Blutspendern stammten, zeigten nur zwei positive Reaktionen bei der RIA (Daten nicht dargestellt). Es ist möglich, daß die beiden Blutspender, von denen diese Serumproben stammten, früher einmal HCV ausgesetzt waren.

IV.D.5. Reaktionsfähigkeit von NANB₅₋₁₋₁ im Verlaufe der NANBH-Infektion

Die Anwesenheit von Anti-NANB₅₋₁₋₁-Antikörpern im Verlaufe der NANBH-Infektion von zwei Patienten und vier Schimpansen wurde mit RIA gemäß der Beschreibung in Abschnitt IV.D.3. verfolgt. Außerdem wurde der Radioimmunoassay zur Bestimmung der Anwesenheit oder Abwesenheit von Anti-NANB₅₋₁₋₁-Antikörpern im Verlaufe der HAV- und HBV-Infektion bei infizierten Schimpansen angewendet.

Die in Tabelle 2 dargestellten Ergebnisse zeigen, daß bei Schimpansen und bei Menschen Anti-NANB₅₋₁₋₁-Antikörper nach Einsetzen der akuten Phase der NANBH-Infektion nachgewiesen wurden. In Serumproben von mit HAV oder HBV infizierten Schimpansen wurden keine Anti-NANB₅₋₁₋₁-Antikörper nachgewiesen. Somit dienen Anti-NANB₅₋₁₋₁-Antikörper als Anzeiger (marker) für die HCV-Exposition eines Individuums.

Tabelle 2

Seroconversion in sequentiellen Serumproben von Hepatitispatienten und -schimpansen unter Verwendung von 5-1-1-Antigen

Patient/ Schimpanse	Probendatum (Tag) (0 = Impfungstag)	Hepatitis- viren	Anti-5-1-1 (S/N)	ALT (mu/ml)
Patient 29	T*	NANB	1,09	1180
	T + 180		33,89	425
	T + 208		36,22	—
Patient 30	T	NANB	1,90	1830
	T + 307		34,17	290
	T + 799		32,45	276
Schimp 1	0	NANB	0,87	9
	76		0,93	71
	118		23,67	19
	154		32,41	—
Schimp 2	0	NANB	1,00	5
	21		1,08	52
	73		4,64	13
	138		23,01	—
Schimp 3	0	NANB	1,08	8
	43		1,44	205
	53		1,82	14
	159		11,87	6
Schimp 4	-3	NANB	1,12	11
	55		1,25	132
	83		6,60	—
	140		17,51	—
Schimp 5	0	HAV	1,50	4
	25		2,39	147
	40		1,92	18
	268		1,53	5
Schimp 6	-8	HAV	0,85	—
	15		—	106
	41		0,81	10
	129		1,33	—
Schimp 7	0	HAV	1,17	7
	22		1,60	83
	115		1,55	5
	139		1,60	—
Schimp 8	0	HAV	0,77	15
	26		1,98	130
	74		1,77	8
	205		1,27	5
Schimp 9	-290	HBV	0,77	15
	379		3,29	9
	435		2,77	6
Schimp 10	0	HBV	2,35	8
	111-118 (Pool)		2,74	96-155 (Pool)
	205		2,05	9
	240		1,78	13
Schimp 11	0	HBV	1,82	11
	28-56 (Pool)		1,26	8-100 (Pool)
	169		1,00	9
	223		0,52	10

* = Tag der anfänglichen Probenahme

IV.E. Reinigung von polyclonalen Serumantikörpern gegen NANB₅₋₁₋₁

Auf der Grundlage der spezifischen immunologischen Reaktivität des SOD-NANB₅₋₁₋₁-Polypeptids mit den Antikörpern in Serumproben von Patienten mit NANBH wurde ein Verfahren zur Reinigung der Serumantikörper, die immunologisch mit dem (den) Epitop(en) in NANB₅₋₁₋₁ reagieren, entwickelt.

Bei diesem Verfahren wird die Affinitätschromatographie ausgenutzt. Gereinigtes SOD-NANB₅₋₁₋₁-Polypeptid (siehe Abschnitt IV.D.I.) wurde an eine unlösliche Unterlage geknüpft, wobei das immobilisierte Polypeptid seine Affinität für den Antikörper gegen NANB₅₋₁₋₁ behält. Der Antikörper in Serumproben wird an dem matrixgebundenen Polypeptid absorbiert. Nach dem Waschen zum Entfernen der unspezifisch gebundenen Materialien und ungebundenen Materialien wird der

gebundene Antikörper durch Änderung des pH-Wertes und/oder chaotrope Reagenzien, wie z. B. Harnstoff, aus dem gebundenen SOD-HCV-Polypeptid freigesetzt.

Nitrocellulosemembranen, die gebundenes SOD-NANB₅₋₁₋₁ enthalten, wurden folgendermaßen hergestellt. Eine Nitrocellulosemembran, 2,1 cm Sartorius mit einer Porengröße von 0,2 µm, wurde dreimal 3 Minuten lang mit BBS gewaschen. SOD-NANB₅₋₁₋₁ wurde durch Inkubation des gereinigten Präparats in BBS bei Raumtemperatur für 2 Stunden an die Membran gebunden; bei einer alternativen Art und Weise wurde über Nacht bei 4°C inkubiert. Die das gebundene Antigen enthaltende Lösung wurde entfernt, und der Filter wurde dreimal jeweils drei Minuten lang mit BBS gewaschen. Die verbliebenen aktiven Stellen auf der Membran wurden durch 30minütige Inkubation mit einer BSA-Lösung von 5 mg/ml blockiert. Überschüssige BSA wurde durch fünfmaliges Waschen der Membran mit BBS und dreimaliges Waschen mit destilliertem Wasser entfernt. Die das Virusantigen und BSA enthaltende Membran wurde anschließend mit 0,05 M Glycinhydrochlorid, pH 2,5, 0,10 M NaCl (GlyHCl) 15 Minuten lang behandelt und anschließend durch drei dreiminütige Waschungen mit PBS weiterbehandelt.

Die polyclonalen Anti-NANB₅₋₁₋₁-Antikörper wurden durch zweistündige Inkubation der das Fusionspolypeptid enthaltenden Membranen mit Serum aus einem Individuum mit NANBH isoliert. Nach der Inkubation wurden die Filter fünfmal mit BBS und zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen. Die gebundenen Antikörper wurden dann durch 5 Elutionen von GlyHCl, wobei jede Elution 3 Minuten dauerte, aus jedem Filter entfernt. Der pH-Wert der Eluate wurde auf 8,0 eingestellt, indem jedes Eluat in einem Reagenzglas gesammelt wurde, das 2,0 M Tris HCl mit einem pH-Wert von 8,0 enthielt. Die Rückgewinnung des Anti-NANB₅₋₁₋₁-Antikörpers nach der Affinitätschromatographie betrug etwa 50%.

Die das gebundene Virusantigen enthaltenden Nitrocellulosemembranen können mehrmals ohne nennenswerte Abnahme der Bindungskapazität verwendet werden. Zur Wiederverwendung werden die Membranen, nachdem die Antikörper eluiert worden sind, dreimal jeweils 3 Minuten lang mit BBS gewaschen. Anschließend werden sie bei 4°C in BBS aufbewahrt.

IV.F. Das Einfangen von HCV-Partikeln aus infiziertem Plasma mittels gereinigter Human-polyclonaler-Anti-HCV-Antikörper; Hybridisierung der Nucleinsäure in den eingefangenen Partikeln an HCV-cDNA

IV.F.1. Das Einfangen von HCV-Partikeln aus infiziertem Plasma mittels Human-polyclonaler-Anti-HCV-Antikörper

Protein-nucleinsäurekomplexe, die im infektiösen Plasma eines Schimpansen mit NANBH vorhanden waren, wurden mittels gereinigter Human-polyclonaler-Anti-HCV-Antikörper, die an Polystyrenperlen gebunden waren, isoliert.

Polyclonale Anti-NANB₅₋₁₋₁-Antikörper wurden aus dem Serum eines Menschen mit NANBH gereinigt, indem das in Clon 5-1-1 codierte Polypeptid SOD-HCV verwendet wurde. Zur Reinigung wurde das in Abschnitt IV.E. beschriebene Verfahren angewandt.

Die gereinigten Anti-NANB₅₋₁₋₁-Antikörper wurden an Polystyrenperlen (Durchmesser 1/4 Zoll, spiegelglatte Oberfläche, Precision Plastic Ball Co., Chicago, Illinois) gebunden, indem jede Perle über Nacht bei Raumtemperatur mit 1 ml Antikörper (1 Mikrogramm/ml in borat-gepufferter Salzlösung, pH 8,5) inkubiert wurde. Nach der Inkubation über Nacht wurden die Perlen einmal mit TBST (50 mM Tris HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,05% [V/V] Tween 20) und anschließend mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS), die 10 mg/ml BSA enthielt, gewaschen.

Kontrollperlen wurden auf gleiche Art und Weise hergestellt, mit der Ausnahme, daß die gereinigten Anti-NANB₅₋₁₋₁-Antikörper durch Gesamt-Human-Immunglobulin ersetzt wurden.

Das Einfangen des HCV aus mit NANBH infiziertem Schimpansenplasma mittels der an die Perlen gebundenen Anti-NANB₅₋₁₋₁-Antikörper erfolgte so: Das aus einem Schimpansen mit NANBH verwendete Plasma wird in Abschnitt IV.A.1. beschrieben. Eine aliquote Menge (1 ml) des mit NANBV infizierten Schimpansenplasmas wurde 3 Stunden lang bei 37°C mit je 5 Perlen, die entweder mit Anti-NANB₅₋₁₋₁-Antikörpern oder mit Kontrollimmunoglobulinen beschichtet waren, inkubiert. Die Perlen wurden dreimal mit TBST gewaschen.

IV.F.2. Hybridisierung der Nucleinsäure in den eingefangenen Partikeln an NANBV-cDNA

Die aus den mit Anti-NANB₅₋₁₋₁-Antikörpern eingefangenen Partikeln freigesetzte Nucleinsäurekomponente wurden auf Hybridisierung an HCV-cDNA, die aus Clon 81 abgeleitet worden war, analysiert.

HCV-Partikel wurden aus mit NANBH infiziertem Schimpansenplasma wie in Abschnitt IV.F.1. beschrieben eingefangen. Zur Freisetzung der Nucleinsäuren aus den Partikeln wurden die gewaschenen Perlen 60 Minuten bei 37°C mit 0,2 ml Lösung pro Perle inkubiert, wobei die Lösung Proteinase K (1 mg/ml), 10 mM Tris HCl, pH 7,5, 10 mM EDTA, 0,25% (M/V) SDS, 10 Mikrogramm/ml lösliche Hefe-RNA enthielt, die überstehende Lösung wurde entfernt. Das Überstehende wurde mit Phenol und Chloroform extrahiert, und die Nucleinsäuren wurden über Nacht bei -20°C präzipitiert. Das Nucleinsäurepräzipitat wurde durch Zentrifugieren gesammelt, getrocknet und in 50 mM Hepes, pH 7,5, gelöst. Genau gleiche Mengen der löslichen Nucleinsäuren aus den Proben, die von den mit Anti-NANB₅₋₁₋₁-Antikörpern beschichteten Perlen und von den Gesamt-Human-Immunglobulin enthaltenden Kontrollperlen stammten, wurden auf die Nitrocellulosefilter filtriert. Die Filter wurden mit einer ³²P-markierten, „nick“-translatierten Sonde, die aus dem gereinigten HCV-cDNA-Fragment in Clon 81 hergestellt worden war, hybridisiert. Die Verfahren zur Herstellung der Sonde und zur Hybridisierung sind in Abschnitt IV.C.1. beschrieben. Autoradiogramme eines sondierten Filters, der die Nucleinsäuren aus Partikeln enthielt, die durch die Perlen, die Anti-NANB₅₋₁₋₁-Antikörper enthielten, eingefangen wurden, werden in Figur 34 gezeigt. Das mit Hilfe des Anti-NANB₅₋₁₋₁-Antikörpers (A₁, A₂) gewonnene Extrakt ergab im Verhältnis zu dem Kontroll-Antikörperextrakt (A₃, A₄) und zur Kontroll-Hefe-RNA (B₁, B₂) klare Hybridisierungssignale. Die aus 1 pg, 5 pg und 10 pg des gereinigten cDNA-Fragmentes von Clon 81 bestehenden Standards werden in C1-3 gezeigt.

Diese Ergebnisse zeigen, daß die aus NANBH-Plasma durch Anti-NANB₅₋₁₋₁-Antikörper eingefangenen Partikel Nucleinsäuren enthalten, die mit HCV-cDNA in Clon 81 hybridisieren und liefern somit einen weiteren Beweis, daß die cDNAs in diesen Clonen aus dem ätiologischen Erreger von NANBH abgeleitet wurden.

IV.G. Immunologische Reaktivität von C100-3 mit gereinigten Anti-NANB₅₋₁₋₁-Antikörpern

Die immunologische Reaktivität des C100-3-Fusionspolypeptids mit Anti-NANB₅₋₁₋₁-Antikörpern wurde durch ein Radioimmunoassay bestimmt, wobei die an eine feste Phase gebundenen Antigene mit gereinigten Anti-NANB₅₋₁₋₁-Antikörpern geprüft wurden und der Antigen-Antikörper-Komplex mit ¹²⁵I-markierten Schaf-Anti-Human-Antikörpern nachgewiesen wurde. Die immunologische Reaktivität von C100-3-Polypeptid wurde mit der von SOD-NANB₅₋₁₋₁-Antigen verglichen.

Das Fusionspolypeptid C100-3 wurde synthetisiert und gereinigt wie in Abschnitt IV.B.5. bzw. in Abschnitt IV.B.6. beschrieben.

Das Fusionspolypeptid SOD-NANB₅₋₁₋₁ wurde wie in Abschnitt IV.B.1. bzw. in Abschnitt IV.D.1. beschrieben synthetisiert und gereinigt. Die gereinigten Anti-NANB₅₋₁₋₁-Antikörper wurden wie in Abschnitt IV.E. beschrieben gewonnen. Aliquote Mengen von 100 Mikrolitern, die unterschiedliche Mengen gereinigtes C 100-3-Antigen in 0,125 M Na Boratpuffer, pH 8,3, 0,075 M NaCl (BBS) enthielten, wurden in jede Vertiefung einer Mikrotiterplatte gegeben (Dynatech Immolon 2 Removawell Strips). Die Platte wurde über Nacht in einer Feuchtekammer bei 4°C inkubiert, danach wurde die Proteinlösung entfernt, und die Vertiefungen wurden dreimal mit BBS, die 0,02% Triton X-100 (BBST) enthielt, gewaschen. Zur Vermeidung von unspezifischen Bindungen wurden die Vertiefungen mit BSA beschichtet, indem 100 Mikroliter einer 5 mg/ml-Lösung BSA in BBS zugegeben wurden und anschließend 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert wurde, wonach die überschüssige BSA-Lösung entfernt wurde. Die Polypeptide in den beschichteten Vertiefungen wurden mit gereinigten Anti-NANB₅₋₁₋₁-Antikörpern zur Reaktion gebracht, indem 1 Mikrogramm Antikörper/Vertiefung zugefügt wurde, und die Proben 1 Stunde bei 37°C inkubiert wurden. Nach der Inkubation wurde die überschüssige Lösung durch Ansaugen entfernt, und die Vertiefungen wurden fünfmal mit BBST gewaschen. An die Fusionspolypeptide gebundener Anti-NANB₅₋₁₋₁ wurde durch die Bindung von ¹²⁵I-markiertem F(ab)₂-Schaf-Anti-Human-IgG an die beschichteten Vertiefungen nachgewiesen. Aliquote Mengen von 100 Mikrolitern markierter Sonde (spezifische Aktivität 5–20 Mikrocuries/Mikrogramm) wurden in jede Vertiefung gegeben, die Platten wurden 1 Stunde bei 37°C inkubiert, und danach wurde die überschüssige Sonde durch Ansaugen entfernt, und es wurde fünfmal mit BBST gewaschen. Die in jeder Vertiefung gebundene Radioaktivität wurde durch Zählen in einem Gammastrahlenszähler bestimmt.

In Tabelle 3 werden die Ergebnisse der immunologischen Reaktivität von C 100 mit gereinigtem Anti-NANB₅₋₁₋₁ im Vergleich zu derjenigen von Anti-NANB₅₋₁₋₁ mit gereinigten Antikörpern gezeigt.

Tabelle 3

Immunologische Reaktivität von C 100-3 im Vergleich zu Anti-NANB₅₋₁₋₁ durch Radioimmunassay (RIA) festgestellt

AG (ng)	RIA (Zählung pro Minute/Assay)					
	400	320	240	160	60	0
NANB ₅₋₁₋₁	7332	6732	4954	4050	3051	57
C 100-3	7450	6985	5920	5593	4096	67

Die Ergebnisse in Tabelle 3 zeigen, daß Anti-NANB₅₋₁₋₁ ein Epitop (bzw. Epitope) in der C 100-Komponente des C 100-3-Polypeptids erkennt. Somit teilen sich NANB₅₋₁₋₁ und C 100 ein gemeinsames Epitop (Epitope). Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß die cDNA-Sequenz, die für diese(s) NANBV-Epitop(e) codiert, sowohl in Clon 5-1-1 als auch in Clon 81 vorhanden ist.

IV.H. Charakterisierung des HCV

IV.H.1. Charakterisierung der Strängigkeit des HCV-Genoms

Das HCV-Genom wurde in bezug auf seine Strängigkeit charakterisiert, indem die Nucleinsäurefraktion aus den Partikeln, die an den mit Anti-NANB₅₋₁₋₁-Antikörpern beschichteten Polystyrenperlen eingefangen wurden, isoliert wurde und festgestellt wurde, ob die isolierte Nucleinsäure mit Plus- und/oder Minus-Strängen der HCV-cDNA hybridisierte.

Wie in Abschnitt IV.F.1. beschrieben, wurden Partikel aus dem mit HCV infizierten Schimpansenplasma unter Verwendung von mit immunogereinigtem Anti-NANB₅₋₁₋₁-Antikörper beschichteten Polystyrenperlen eingefangen. Die Nucleinsäurekomponente der Partikel wurde mittels des in Abschnitt IV.F.2. beschriebenen Verfahrens freigesetzt. Aliquote Mengen der isolierten genomischen Nucleinsäure, die 3 ml des Hochtitersplasmas entsprachen, wurden auf Nitrocellulosefilter übertragen. Als Kontrollen wurden aliquote Mengen von denaturierter HCV-cDNA aus Clon 81 (2 Picogramm) ebenfalls auf die gleichen Filter übertragen. Die Filter wurden mit einem ³²P-markierten Gemisch von Plus- oder einem Gemisch von Minus-Strängen von einzelsträngiger DNA, die aus HCV-cDNAs cloniert wurde, sondiert; die cDNAs wurden aus den Clonen 40b, 81 und 25c ausgeschnitten.

Die einzelsträngigen Sonden wurden gewonnen, indem die HCV-cDNAs durch EcoRI aus den Clonen 81, 40b und 25c ausgeschnitten wurden und die cDNA-Fragmente in M13-Vektoren, mp18 und mp19 cloniert wurden (Messing [1983]). Die M13-Clone wurden sequenziert, um zu bestimmen, ob sie die Plus- oder Minus-Stränge der DNA, die aus den HCV-cDNAs abgeleitet waren, enthielten. Die Sequenzierung erfolgte mit dem Didesoxy-Kettenabbruch-Verfahren nach Sanger und Mitarbeitern (1977).

Aus einem Satz von Duplikatfiltern, die aliquote Mengen des HCV-Genoms enthielt, das aus den eingefangenen Partikeln isoliert worden war, wurde jeder Filter entweder mit Plus- oder mit Minus-Strang-Sonden, die aus den HCV-cDNAs abgeleitet worden waren, hybridisiert. Figur 41 zeigt die beim Sondieren des NANBV-Genoms gewonnenen Autoradiogramme, wobei das Sondenngemisch aus den Clonen 81, 40b und 25c abgeleitet war. Dieses Gemisch wurde zur Erhöhung der Sensitivität des Hybridisierungsassays benutzt. Die Proben in Liste I wurden mit dem Plus-Strang-Sonden-Gemisch hybridisiert. Die Proben in Liste II wurden durch Hybridisierung mit dem Minus-Strang-Sonden-Gemisch hybridisiert. Die Zusammensetzung der Proben in den Listen des Immunoblots wird in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4

Spur	A	B
1	HCV-Genom	*
2	—	*
3	*	cDNA 81
4	—	cDNA 81

* ist eine nicht beschriebene Probe.

Wie aus den Ergebnissen der Figur 41 ersichtlich wird, hybridisiert nur die Minus-Strang-DNA-Sonde mit dem isolierten HCV-Genom. Dieses Ergebnis läßt in Verbindung mit dem Ergebnis, daß das Genom gegenüber RNase und nicht gegenüber DNase (siehe Abschnitt IV.C.2.) sensitiv ist, darauf schließen, daß das Genom von NANBV eine positiv-strängige RNA ist. Diese Daten sowie die Daten aus den anderen Labors in bezug auf die physikalisch-chemischen Eigenschaften eines vermutlichen NANBV stimmen mit der Möglichkeit überein, daß das HCV zu den Flaviviridae gehört. Die Möglichkeit, daß das HCV eine neue Klasse eines Viruserregers darstellt, ist jedoch noch nicht ausgeschaltet.

IV.H.2. Nachweis von Sequenzen in eingefangenen Partikeln, die bei Amplifikation durch PCR an aus Clon 81 abgeleiteter HCV-cDNA hybridisieren

Die RNA in eingefangenen Partikeln wurde wie in Abschnitt IV.H.1. beschrieben gewonnen. Die Analyse nach Sequenzen, die an der aus Clon 81 abgeleiteten HCV-cDNA hybridisieren, erfolgte unter Anwendung des PCR-Amplifikationsverfahrens, wie es in Abschnitt IV.C.3. beschrieben ist, mit der Ausnahme, daß die Hybridisierungsprobe ein Kinase-Oligonucleotid, das aus der cDNA-Sequenz von Clon 81 abgeleitet worden war, war. Die Ergebnisse zeigten, daß die amplifizierten Sequenzen mit der von Clon 81 abgeleiteten HCV-cDNA-Sonde hybridisieren.

IV.H.3. Homologie zwischen dem Nicht-Struktur-Protein des Dengue-Flavivirus (MNWVD 1) und den HCV-Polypeptiden, die durch den kombinierten ORF der Clone 14i bis 39c codiert sind

Wie in Figur 26 gezeigt, enthalten die kombinierten HCV-cDNAs der Clone 14i bis 39c einen kontinuierlichen ORF. Das darin codierte Polypeptid wurde auf Sequenzhomologie mit der Region des Nicht-Struktur-Polypeptids bzw. der Nicht-Struktur-Polypeptide im Dengue-Flavivirus (MNWVD 1) analysiert. Für die auf dem Computer durchgeführte Analyse wurde die Dayhoffsche Protein-Datenbank verwendet. Die Ergebnisse werden in Figur 47 gezeigt, in der das Symbol (:) eine exakte Homologie und das Symbol (.) einen konservativen Ersatz in der Sequenz angibt; die Striche zeigen Räume an, die in die Sequenz inseriert wurden, um die größte Homologie zu erreichen. Wie aus der Figur ersichtlich wird, gibt es zwischen der in der HCV-cDNA codierten Sequenz und dem (den) Nicht-Struktur-Polypeptid(en) des Dengue-Virus eine signifikante Homologie. Zusätzlich zu der in Figur 42 gezeigten Homologie enthielt die Analyse des Polypeptidsegmentes, das in einer Region in Richtung des 3'-Endes der cDNA codiert ist, ebenfalls Sequenzen, die zu Sequenzen in der Dengue-Polymerase homolog sind. Von Folgen ist auch die Entdeckung, daß die vorschrittmäßige Gly-Asp-Asp- (GDD)-Sequenz, von der man glaubte, daß sie RNA-abhängigen RNA-Polymerasen wichtig sei, in dem in HCV-cDNA codierten Polypeptid enthalten ist, und zwar an einem Ort, der mit dem im Dengue-2-Virus übereinstimmt. (Diese Daten werden nicht gezeigt.)

IV.H.4. HCV-DNA ist in mit NANBH infiziertem Gewebe nicht feststellbar

Zwei Arten von Untersuchungen liefern Ergebnisse, die darauf hindeuten, daß HCV-DNA in Gewebe aus einem Individuum mit NANBH nicht nachweisbar ist. Diese Ergebnisse liefern zusammen mit denen in den Abschnitten IV.C. und IV.H.2. den Beweis, daß das HCV kein DNA-enthaltendes Virus ist, und daß seine Replikation ohne Einbeziehung von cDNA abläuft.

IV.H.4.a. Southern-blotting-Verfahren

Zur Feststellung, ob NANBH-infizierte Schimpansenleber nachweisbare HCV-DNA (oder HCV-cDNA) enthält, wurden Restriktionsenzymfragmente von DNA mittels Southern „blotting“ aus dieser Quelle isoliert und die „blots“ wurden mit ³²P-markierter HCV-cDNA sondiert. Die Ergebnisse zeigten, daß die markierte HCV-cDNA nicht an der aus der infizierten Schimpansenleber übertragenen DNA hybridisierte. Sie hybridisierte auch nicht an der zur Kontrolle aus normaler Schimpansenleber übertragenen DNA. Im Gegenteil, in einer positiven Kontrolle hybridisierte eine markierte Sonde des Beta-Interferon-Gens stark an Southern „blots“ von Restriktionsenzym-digester Human-Plazenta-DNA. Diese Systeme waren dazu gedacht, eine Einzelkopie des Gens nachzuweisen, das mit der markierten Sonde nachgewiesen werden sollte. Aus der Leber von zwei Schimpansen mit NANBH wurden DNAs isoliert. Aus nicht infizierter Schimpansenleber und aus Humanplazentas wurden Kontroll-DNAs isoliert. Das Verfahren zur Extraktion von DNA wurde im wesentlichen nach Maniatis und Mitarbeitern (1988) durchgeführt, und die Proben wurden während des Isolierungsprozesses mit RNase behandelt. Beide DNA-Proben wurden entweder mit EcoRI, MboI oder HincII (12 Mikrogramm) nach der Vorschrift des Herstellers behandelt. Die digestierten DNAs wurden dann weiter durch Elektrophorese auf 1%igen neutralen Agarosegelen, durch Southern „blotting“ auf Nitrocellulose behandelt, und das übertragene Material hybridisierte mit der entsprechenden „nick“-translatierten Sonden-cDNA (3 × 10⁶ Zählungen pro Minute/ml Hybridisierungsmischung). Die DNA aus infizierter Schimpansenleber und normaler Leber wurde mit ³²P-markierter HCV-cDNA aus den Clonen 36 und 81 hybridisiert; die DNA aus Humanplazenta wurde mit ³²P-markierter DNA des Beta-Interferon-Gen hybridisiert. Nach der Hybridisierung wurden die „blots“ unter strengen Bedingungen gewaschen, d.h. mit einer Lösung, die 0,1 × SSC, 0,1% SDS enthielt und bei einer Temperatur von 69°C. Die Beta-Interferon-Gen-DNA wurde wie von Houghton und Mitarbeitern (1981) beschrieben hergestellt.

IV.H.4.b. Amplifikation durch die PCR-Technik

Um festzustellen, ob die HCV-DNA in Leber aus Schimpansen mit NANBH nachzuweisen sei, wurde DNA aus dem Gewebe isoliert und dem PCR-Amplifikations-Nachweisverfahren unter Verwendung von Primern und Sondenpolynucleotiden, die aus HCV-cDNA aus Clon 81 abgeleitet worden waren, unterzogen. Als negative Kontrollen wurden DNA-Proben, die aus nicht infizierten HepG2-Gewebekulturzellen und aus voraussichtlich nicht infizierter Humanplazenta isoliert worden war, verwendet. Als positive Kontrollen erwiesen sich Proben der negativen Kontroll-DNAs, denen eine bekannte relativ kleine Menge (250 Moleküle) des HCV-cDNA-Inserts aus Clon 81 zugefügt worden war. Um zusätzlich zu bestätigen, daß RNA-Fractionen, die aus der gleichen Leber von Schimpansen mit NANBH isoliert worden waren, Sequenzen enthielten, die zur HCV-cDNA-Sonde komplementär sind, wurde das PCR-Amplifikations-Nachweissystem auch an den isolierten RNA-Proben angewandt. Bei diesen Untersuchungen wurden die DNAs durch das in Abschnitt IV.H.4.a. beschriebene Verfahren isoliert, und die RNAs wurden im wesentlichen nach der Beschreibung von Chirgwin und Mitarbeitern (1981) extrahiert. DNA-Proben wurden aus 2 infizierten Schimpansenlebern, aus nicht infizierten HepG2-Zellen und aus Humanplazenta isoliert. Ein Mikrogramm jeder DNA wurde mit HindIII nach den Anweisungen des Herstellers digestiert. Die digestierten Proben wurden durch PCR amplifiziert, und der Nachweis der amplifizierten HCV-cDNA erfolgte im wesentlichen nach der Beschreibung in Abschnitt IV.C.3., mit der Ausnahme, daß die Reverse Transkriptasestufe weggelassen wurde. Die PCR-Primer und die Sonde wurden aus HCV-cDNA-Clon-81 gewonnen und sind in Abschnitt IV.C.3. beschrieben. Vor der Amplifikation wurde für positive

Kontrollen eine 1-Mikrogramm-Probe jeder DNA durch den Zusatz von 250 Molekülen von aus Clon 81 isoliertem HCV-cDNA-Insert „spiked“. Zur Feststellung, ob HCV-Sequenzen in RNA, die aus den Lebern von Schimpansen mit NANBH isoliert worden waren, vorhanden waren, wurden Proben mit einem Gehalt von 0,4 Mikrogramm Gesamt-RNA einem im wesentlichen wie in Abschnitt IV.C.3. beschriebenen Amplifikationsprozeß unterzogen, wobei jedoch bei einigen Proben als eine negative Kontrolle die Reverse Transkriptase weggelassen wurde. Die PCR-Primer und die Sonde wurden aus HCV-cDNA-Clon 81 wie im vorangegangenen beschrieben, gewonnen.

Die Ergebnisse zeigten, daß die amplifizierten Sequenzen, die zu der HCV-cDNA-Sonde komplementär sind, weder in den DNAs aus infizierter Schimpansenleber noch in den negativen Kontrollen nachweisbar waren. Im Gegenteil, wenn die Proben, einschließlich der DNA aus infizierter Schimpansenleber vor der Amplifikation mit der HCV-cDNA „spiked“ wurde, wurden die Sequenzen aus Clon 81 in allen positiven Kontrollproben nachgewiesen. Außerdem wurden in den RNA-Untersuchungen amplifizierte HCV-cDNA-Sequenzen aus Clon 81 nur nachgewiesen, wenn Reverse Transkriptase verwendet wurde, was stark darauf hindeutet, daß die Ergebnisse nicht durch eine DNA-Kontamination herbeigeführt wurden.

Diese Ergebnisse zeigen, daß Hepatozyten aus Schimpansen mit NANBH keine oder nicht nachweisbare Anteile von HCV-DNA enthalten. Auf der Grundlage der „Spiking“-Untersuchung kann man sagen, falls HCV-DNA vorhanden ist, dann zu einem Anteil von weit unter 0,06 Kopien pro Hepatozyte. Im Gegenteil, die HCV-Sequenzen in der Gesamt-RNA aus den gleichen Leberproben ließen sich mit der PCR-Technik leicht nachweisen.

IV.1. ELISA-Tests bei HCV-Infektion mit HCV-c100-3 als Testantigen

Alle Proben wurden mit Hilfe von HCV-c100-3 mit ELISA getestet. Dieser Assay benutzt das HCV-c100-3-Antigen (das wie im Abschnitt IV.B.5. beschrieben synthetisiert und gereinigt wurde) und ein Meerrettich-Peroxidase-(HRP)-Konjugat von Maus-monoclonalem Anti-Human-IgG.

Die mit dem HCV-c100-3-Antigen beschriebenen Platten wurden folgendermaßen vorbereitet. Eine Lösung aus Beschichtungspuffer (50mM Na Borat, pH 9,0), 21 ml/Platte, BSA (25 Mikrogramm/ml). c100-3 (2,50 Mikrogramm/ml) wurde unmittelbar vor Zugabe auf die Removeawell-Immulon-I-Platten (Dynatech Corp.) zubereitet. Nach fünfminütigem Mischen wurden 0,2 ml/Vertiefung der Lösung auf die Platten gegeben, sie wurden abgedeckt und 2 Stunden bei 37°C inkubiert, wonach die Lösung durch Absaugen entfernt wurde. Die Vertiefungen wurden einmal mit 400 Mikrolitern Waschpuffer (100 mM Natriumphosphat, pH 7,4, 140 mM Natriumchlorid, 0,1% [M/V] Casein, 1% [M/V] Triton X-100, 0,01% [M/V] Thimerosal) gewaschen. Nach Entfernung der Waschlösung wurden 200 Mikroliter/Vertiefung Postcoat-Lösung (10 mM Natriumphosphat, pH 7,2, 150 mM Natriumchlorid, 0,1% [M/V] Casein und mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) zugegeben, die Platten wurden lose abgedeckt, um eine Verdunstung zu vermeiden, und wurden 30 Minuten bei Raumtemperatur so stehengelassen.

Anschließend wurden die Vertiefungen zur Entfernung der Lösung abgesaugt und trocken über Nacht ohne Erhitzen lyophilisiert. Die vorbereiteten Platten können bei 2–8°C in verschlossenen Aluminiumbehältern aufbewahrt werden.

Zur Durchführung des ELISA-Tests wurden 20 Mikroliter Serumprobe oder Kontrollprobe in eine Vertiefung gegeben, die 200 Mikroliter Probenverdünnungsmittel (100 mM Natriumphosphat, pH 7,4, 500 mM Natriumchlorid, 1 mM EDTA, 0,1% [M/V] Casein, 0,015% [M/V] Thimerosal, 1% [M/V] Triton X-100, 100 Mikrogramm/ml Hefeextrakt) enthält. Die Platten wurden verschlossen und zwei Stunden bei 37°C inkubiert, wonach die Lösung durch Absaugen entfernt wurde. Die Vertiefungen wurden mit 400 Mikrolitern Waschpuffer (Phosphat-gepufferte Salzlösung [PBS], die 0,05% Tween 20 enthält) gewaschen. Die gewaschenen Vertiefungen wurden mit 200 Mikrolitern Maus-Anti-Human-IgG-HRP-Konjugat, das in einer Lösung aus Ortho-Konjugat-Verdünnungsmittel (10 mM Natriumphosphat, pH 7,2 150 mM Natriumchlorid, 50% [V/V] Fötalserserum, 1% [V/V] wärmebehandeltes Pferdeserum, 1 mM K₃Fe(CN)₆, 0,05% [M/V] Tween 20, 0,02% [M/V] Thimerosal) enthalten war, behandelt. Die Behandlung dauerte 1 Stunde bei 37°C, danach wurde die Lösung durch Absaugen entfernt und die Vertiefungen wurden mit Waschpuffer gewaschen, der ebenfalls wieder durch Absaugen entfernt wurde. Zur Bestimmung der Menge des gebundenen Enzymkonjugats wurden 200 Mikroliter der Substratlösung (10 mg O-Phenylendiamindihydrochlorid pro 5 ml Developer-Lösung) zugegeben. Die Developer-Lösung enthält 50 mM Natriumcitrat, das mit Phosphorsäure auf pH 5,1 eingestellt war, und 0,6 Mikroliter/ml 30%iges H₂O₂. Die Platten mit der Substratlösung wurden im Dunkeln 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, die Reaktionen wurden durch Zugabe von 50 Mikrolitern 4 N Schwefelsäure gestoppt und die Extinktionswerte (OD) wurden bestimmt.

Die im folgenden vorgestellten Beispiele zeigen, daß der Screening-ELISA mit Mikrotiterplatte unter Verwendung von HCV-c100-3-Antigen einen hohen Spezifitätsgrad aufweist, wie durch die Anfangsrate der Reaktivität von etwa 1% mit einer Wiederholungsreaktivitätsrate von etwa 0,5% an Zufallsspendern bewiesen wird. Der Assay ist in der Lage, die Immunreaktion sowohl in der postakuten Phase der Infektion als auch während der chronischen Krankheitsphase nachzuweisen. Außerdem kann dieser Test zum Nachweis bei einigen Proben angewandt werden, die in den Surrogattests für NANBH negativ bewertet wurden. Diese Proben stammen von Individuen mit einer NANBH-Vorgeschichte oder von Spendern, die von einer NANBH-Übertragung betroffen sind (engl. donors implicated in NANBH transmission). In den im folgenden beschriebenen Beispielen werden die folgenden Abkürzungen verwendet:

ALT	Alanin-Amino-Transferase
Anti-HBc	Antikörper gegen HBc
Anti-HBsAg	Antikörper gegen HBsAg
HBc	Hepatitis-B-Kernantigen
ABsAg	Hepatitis-B-Oberflächenantigen
IgG	Immunoglobulin G
IgM	Immunoglobulin M
IU/L	Internationale Einheiten/Liter
NA	steht nicht zur Verfügung
NT	wurde nicht getestet
N	Probengröße
Neg	negativ
OD	Extinktion
Pos	positiv
S/C0	Signal/Abschneidewert (engl. signal/cutoff)

SD Standardabweichung
 x Durchschnitt oder Mittel
 WNL innerhalb normaler Grenzen

IV.1.1. HCV-Infektion in einer Population von Zufallsblutspendern

Eine Gruppe von 1056 Proben (Frischseren) von stichprobenmäßig ausgewählten Blutspendern wurde von der Irwin Memorial Blood Bank, San Francisco, Kalifornien, erhalten. Die Testergebnisse aus diesen Proben werden in einem Histogramm zusammengefaßt, das die Verteilung der Extinktionswerte (Figur 37) zeigt. Wie aus Figur 37 ersichtlich wird, liegen 4 Proben bei >3, eine Probe zwischen 1 und 3, 5 Proben zwischen 0,4 und 1 und die restlichen 1046 Proben liegen bei <0,4, wobei über 90% dieser Proben <0,1 anzeigen.

Die Ergebnisse der reaktiven Stichproben werden in Tabelle 5 aufgeführt. Wendet man einen Abschneidewert an, der den Standardabweichungen Mittelwert plus 5 entspricht, dann waren 10 Proben von 1056 (0,95%) anfangs reaktiv. Davon erwiesen sich fünf Proben (0,47%) wiederholt als reaktiv, als sie ein zweites Mal mit ELISA getestet wurden. Tabelle 5 zeigt auch den ALT- und den Anti-HBc-Status für jede der wiederholt reaktiven Proben. Von besonderem Interesse ist die Tatsache, daß alle fünf wiederholt reaktiven Proben in den beiden Surrogattests für NANBH negativ, im HCV-ELISA jedoch positiv waren.

Tabelle 5
 Ergebnisse an reaktiven Stichproben

N = 1051
 $\bar{x}$ = 0,049*
 SD = $\pm 0,074$

Abschneidewert: $\bar{x} + 5SD = 0,419$ (0,400 + negative Kontrolle)

Proben	OD der anfangs reaktiven Proben	OD der wiederholt reaktiven Proben	ALT** (IU/L)	Anti-Hbc*** (OD)
4 227	0,462	0,084	NA	NA
6 292	0,569	0,294	NA	NA
6 188	0,699	0,328	NA	NA
6 157	0,735	0,187	NA	NA
6 277	0,883	0,152	NA	NA
6 397	1,567	1,392	30,14	1,433
6 019	> 3,000	> 3,000	46,48	1,057
6 651	> 3,000	> 3,000	48,53	1,343
6 669	> 3,000	> 3,000	60,53	1,165
4 003	> 3,000	3,000	WNL****	Negativ

10/1056 = 0,95% 5/1056 = 0,47%

* Probenanzeigen > 1,5 wurden nicht in die Berechnung des Mittelwerts und der statistischen Abweichung einbezogen.

** ALT < 68 IU/L liegen über den normalen Grenzen.

*** Anti-HBc $\leq 0,535$ (Konkurrenz-Assay) wird als positiv angesehen.

**** WNL: innerhalb normaler Grenzen

IV.1.2. Schimpansen-Serumproben

Mittels HCV-c100-3-ELISA wurden Serumproben aus 11 Schimpansen getestet. 4 dieser Schimpansen waren nach einem eingeführten Verfahren in Zusammenarbeit mit Dr. Daniel Bradley von Centers of Disease Control mit NANBH aus einer kontaminierten Charge Faktor VIII (wahrscheinlich Hutchinson-Stamm) infiziert. Als Kontrollen wurden 4 andere Schimpansen mit HAV und 3 mit HBV infiziert. Die Serumproben wurden zu verschiedenen Zeiten nach der Infektion genommen. Die in Tabelle 6 zusammengefaßten Ergebnisse zeigen dokumentierte Antikörperserokonversion in allen mit dem Hutchinson-Stamm von NANBH infizierten Schimpansen. Nach der akuten Phase der Infektion (wie durch den signifikanten Anstieg und die anschließende Rückkehr zu normalen ALT-Werten bewiesen wurde) ließen sich die Antikörper gegen HCV-c100-3 in den Seren der 4/4 NANBH-infizierten Schimpansen nachweisen. Diese Proben haben sich kürzlich wie in Abschnitt IV.B.3. diskutiert wurde, durch die Western-Analyse und ein Radioimmunassay als positiv erwiesen. Im Gegensatz dazu zeigte keiner der Kontrollschimpansen, die mit HAV oder HBV infiziert waren, bei ELISA ein Zeichen von Reaktivität.

Tabelle 6
 Schimpansen-Serumproben

	OD	S/CO	Inokulation Datum	Blut Datum	ALT (IU/L)	Transfusion
Positive Kontrolle	1,504					
Abschaltung	0,401					
Negative Kontrolle	0,001					
Schimpanse 1	0,007	0,00	24.05.84	24.05.84	9	NANB
	0,003	0,01		07.08.84	71	
	3,000	7,48		18.09.84	19	
	3,000	7,48		24.10.84	-	

Fortsetzung Tabelle 6

	OD	S/CO	Inokulation Datum	Blut Datum	ALT (IU/L)	Trans- fusion
Schimpanse 2	—	—	07.06.84	—	—	NANB
	0,003	0,00		31.05.84	5	
	0,005	0,00		28.06.84	52	
	0,945	2,36		20.08.84	13	
	3,000	7,48		24.10.84	—	
Schimpanse 3	0,005	0,01	14.03.85	14.03.85	8	NANB
	0,017	0,04		26.04.85	205	
	0,006	0,01		06.05.85	14	
	1,010	2,52		20.08.85	6	
Schimpanse 4	0,006	0,00	11.03.85	11.03.85	11	NANB
	0,003	0,01		09.05.85	132	
	0,523	1,31		06.06.85	—	
	1,574	3,93		01.08.85	—	
Schimpanse 5	0,006	0,00	21.11.70	21.11.80	4	HAV
	0,001	0,00		16.12.80	147	
	0,033	0,01		30.12.80	18	
	0,006	0,01		29.07.— 21.08.81	5	
Schimpanse 6	—	—	25.05.82	—	—	HAV
	0,005	0,00		17.05.82	—	
	0,001	0,00		10.06.82	106	
	0,004	0,00		06.07.82	10	
	0,290	0,72		01.10.82	—	
Schimpanse 7	0,008	0,00	25.05.82	25.05.82	7	HAV
	0,004	0,00		17.06.82	83	
	0,006	0,00		16.09.82	5	
	0,005	0,01		09.10.82	—	
Schimpanse 8	0,007	0,00	21.11.80	21.11.80	15	HAV
	0,000	0,00		16.12.80	130	
	0,004	0,01		03.02.81	8	
	0,000	0,00		03.06.— 10.06.81	4,5	
Schimpanse 9	—	—	24.07.80	—	—	HBV
	0,019	0,05		22.08.— 10.10.79	—	
	—	—		11.03.81	57	
	0,015	0,04		01.07.— 05.08.81	9	
	0,008	0,02		01.10.81	6	
Schimpanse 10	—	—	12.05.82	—	—	HBV
	0,011	0,03		21.04.— 12.05.82	9	
	0,015	0,04		01.09.— 08.09.82	126	
	0,008	0,02		02.12.82	9	
	0,010	0,02		06.01.83	13	
Schimpanse 11	—	—	12.05.82	—	—	HBV
	0,000	0,00		06.01.— 12.05.82	11	
	—	—		23.06.82	100	
	0,003	0,00		09.06.— 07.07.82	—	
	0,003	0,00		28.10.82	9	
	0,003	0,00		20.12.82	10	

IV.1.3. Liste 1: Nachgewiesen infektiöse Seren von menschlichen Trägern chronischer NANBH

Eine verschlüsselte Liste bestand aus 22 einmaligen Proben, jede als Duplikat, d. h. insgesamt 44 Proben. Die Proben stammten von nachgewiesenen infektiösen Seren aus chronischen NANBH-Trägern, infektiösen Seren von betroffenen Spendern und infektiösen Seren von NANBH-Patienten in der akuten Phase. Zusätzlich stammten die Proben von lange zurückverfolgten negativen Kontrollen und anderen Krankheitskontrollen. Diese Liste wurde von Dr. H. Alter vom Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, zur Verfügung gestellt. Die Liste wurde von Dr. Alter vor

mehreren Jahren aufgestellt und wurde seither von ihm als qualifizierende Liste für Tests auf vermutliche NANBH benutzt. (Siehe zitierte Bezugnahme auf Dr. Alters Artikel).

Die gesamte Liste wurde zweimal durch das ELISA-Verfahren getestet, und die Ergebnisse wurden zur Auswertung an Dr. Alter gesandt. Die Ergebnisse dieser Auswertung sind in Tabelle 7 gezeigt. Obwohl die Tabelle die Ergebnisse von nur einem Duplikatsatz enthält, wurden die gleichen Werte bei jeder der Duplikatproben erreicht.

Wie in Tabelle 7 gezeigt wird, waren 6 Seren, die in einem Schimpansenmodell erwiesen infektiös waren, stark positiv. Das siebente infektiöse Serum entsprach einer Probe in einem akuten NANBH-Fall und war bei dieser ELISA-Untersuchung nicht reaktiv. Eine Probe aus einem betroffenen Spender mit normalen ALT-Werten und zweideutigen Ergebnissen in den Schimpansenuntersuchungen war bei diesem Test nicht reaktiv. Drei andere Serienproben aus einem Individuum mit akuter NANBH waren ebenfalls nicht reaktiv. Alle Proben, die aus den lange zurückverfolgten negativen Kontrollen stammten, wurden von Spendern erhalten, die mindestens 10mal ohne Hepatitisimplikation Blut gespendet hatten, und waren in der ELISA-Untersuchung nicht reaktiv. Schließlich wurden 4 der getesteten Proben zuvor in von anderen Wissenschaftlern entwickelten Tests auf vermutliche NANBH als positiv bewertet, diese Tests wurden aber nicht bestätigt.

Tabelle 7
Liste 1 von H. Alter

Liste	1. Ergebnis	2. Ergebnis
1) Durch Schimpansen-Übertragung nachgewiesenermaßen infektiös		
a. Chronische NANB; Post-Tx		
Ji	+	+
EB	+	+
PG	+	+
b. Betroffene Spender mit erhöhter ALT		
BC	+	+
JJ	+	+
BB	+	+
c. Akute NANB; Post-tx		
WII	—	—
2) Durch Schimpansenübertragung nicht eindeutig infektiös		
a. Betroffene Spender mit normaler ALT		
CC	—	—
3) Akute NANB; Post-TX		
JL 1. Woche	—	—
JL 2. Woche	—	—
JL 3. Woche	—	—
4) Krankheitskontrollen		
Primary biliäre Leberzirrhose		
EK	—	—
b. Alkoholhepatitis in Rekonvaleszenz		
HB	—	—
5) Negative Kontrollen mit Vorgeschichte		
DH	—	—
OC	—	—
LV	—	—
HL	—	—
All	—	—
6) Potentielle NANB-„Antigene“		
JS-80-01T-O (ISHIDA)	—	—
Asterix (TREPO)	—	—
Zurtz (ARNOLD)	—	—
Becassdine (TREPO)	—	—

IV.1.4. Liste 2: Spender/Empfänger-NANBH

Die verschlüsselte Liste bestand aus 10 unzweideutigen, mit Transfusionen im Zusammenhang stehenden Spender/Empfänger-NANBH-Fällen mit insgesamt 188 Proben. Jeder dieser Fälle bestand aus Proben von einigen oder allen Spendern an den Empfänger und aus Serienproben (die 3, 6 und 12 Monate nach der Transfusion genommen wurden) aus dem Empfänger. Auch eine vor der Transfusion aus dem Empfänger entnommene Blutprobe gehörte dazu. Die verschlüsselte Liste wurde von Dr. H. Alter von NIH aufgestellt, und die Ergebnisse wurde ihm zur Auswertung zugesandt.

Die in Tabelle 8 zusammengefaßten Ergebnisse zeigen, daß das ELISA-Verfahren Antikörper-Serokonversion in 9 von 10 Fällen von mit Transfusion in Zusammenhang stehender NANBH nachwies. Proben aus Fall 4 (wo keine Serokonversion nachgewiesen wurde) reagierten im ELISA beständig schlecht. 2 von den 10 Empfängerproben waren 3 Monate nach der Transfusion reaktiv. Nach 6 Monaten waren 8 Empfängerproben reaktiv und nach 12 Monaten waren mit Ausnahme von Fall 4 alle Proben reaktiv. Außerdem wurde mindestens 1 antikörperpositiver Spender in 7 von 10 Fällen gefunden, wobei mit Fall 10 2 positive Spender vorliegen. In Fall 10 war die Vortransfusions-Blutprobe des Empfängers ebenfalls positiv für HCV-Antikörper. Die Blutprobe

dieses Empfängers nach einem Monat fiel unter die Grenzlinie der reaktiven Werte, während die Blutproben nach 4 und 10 Monaten auf positive Werte stiegen.

Im allgemeinen wird ein S/CO von 0,4 als positiv angesehen.

Dieser Fall kann somit eine frühere Infektion des Individuums mit HCV sein.

Der ALT- und HBc-Status für alle reaktiven, d. h. positiven, Proben ist in Tabelle 9 zusammengefaßt. Wie in der Tabelle ersichtlich ist, waren die 1/8 Spenderproben für die Surrogatmarker negativ und im HCV-Antikörper-ELISA-Verfahren reaktiv. Andererseits wiesen die Empfängerproben (12 Monate nach der Transfusion) entweder erhöhte ALT-Werte oder positive Anti-HBc-Werte oder beides auf.

Tabelle 8

Liste von Spender/Empfänger-NANB nach H. Alter

Fall	Spender		Empfänger Blutprobe vor Transfusion		3 Monate		Post-TX 6 Monate		12 Monate	
	OD	S/CO	OD	S/CO	OD	S/CO	OD	S/CO	OD	S/CO
1.	–	–	0,032	0,07	0,112	0,26	> 3,000	6,96	> 3,000	> 6,96
2.	–	–	0,059	0,14	0,050	0,12	1,681	3,90	> 3,000	> 6,96
3.	0,403	0,94	0,049	0,11	0,057	0,13	> 3,000	6,96	> 3,000	> 6,96
4.	–	–	0,065	0,15	0,073	0,17	0,067	0,16	> 0,217	0,50
5.	> 3,000	> 6,96	0,034	0,08	0,096	0,22	> 3,000	6,96	> 3,000	> 6,96
6.	> 3,000	> 6,96	0,056	0,13	1,475	3,44	> 3,000	6,96	> 3,000	> 6,96
7.	> 3,000	> 6,96	0,034	0,08	0,056	0,13	> 3,000	6,96	> 3,000	> 6,96
8.	> 3,000	> 6,96	0,061	0,14	0,078	0,18	2,262	5,28	> 3,000	> 6,96
9.	> 3,000	> 6,96	0,080	0,19	0,127	0,30	0,055	0,13	> 3,000	> 6,96
10.	> 3,000	> 6,96	> 3,000	> 6,96	0,317*	0,74	> 3,000**	6,96	> 3,000***	> 6,96
	> 3,000	> 6,96								

* – 1 Monat; ** – 4 Monate; *** – 10 Monate.

Tabelle 9

ALT- und HBc-Status für reaktive Proben in Liste 1 nach H. Alter

Proben			Anti-ALT*	HBC**
Spender				
Fall 3			normal	negativ
Fall 5			erhöht	positiv
Fall 6			erhöht	positiv
Fall 7			nicht verfügbar	negativ
Fall 8			normal	positiv
Fall 9			erhöht	nicht verfügbar
Fall 10			normal	positiv
Fall 10			normal	positiv
Empfänger				
Fall 1		6 Mon.	erhöht	positiv
	12 Mon.	erhöht	nicht getestet	
Fall 2		6 Mon.	erhöht	negativ
	12 Mon.	erhöht	nicht getestet	
Fall 3		6 Mon.	normal	nicht getestet***
	12 Mon.	erhöht	nicht getestet***	
Fall 5		6 Mon.	erhöht	nicht getestet
	12 Mon.	erhöht	nicht getestet	
Fall 6		3 Mon.	erhöht	negativ
	6 Mon.	erhöht	negativ	
	12 Mon.	erhöht	nicht getestet	
Fall 7		6 Mon.	erhöht	negativ
	12 Mon.	erhöht	negativ	
Fall 8		6 Mon.	normal	positiv
	12 Mon.	erhöht	nicht getestet	
Fall 9		12 Mon.	erhöht	nicht getestet
Fall 10		4 Mon.	erhöht	nicht getestet
	10 Mon.	erhöht	nicht getestet	

* ALT $\geq$ 45 IU/L liegt über dem normalen Grenzwert.

** Anti-HBc $\geq$ 50% (Konkurrenz-Assay) wird als positiv angesehen.

*** Blutprobe vor der Transfusion und 3 Monate danach waren HBc-negativ.

IV.I.5. Bestimmung von HCV-Infektion in Proben von risikoreichen Gruppen

Proben von risikoreichen Gruppen wurden mittels ELISA überwacht, um die Reaktivität gegenüber HCV-c100-3-Antigen zu bestimmen. Diese Proben wurden von D. Gary Tegtmeier, Community Blood Bank, Kansas City, bereitgestellt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 zusammengefaßt.

Wie aus der Tabelle ersichtlich wird, wurden die Proben mit der höchsten Reaktivität von Hämophilen erhalten (76%).

Weiter erwiesen sich Proben von Individuen mit erhöhter ALT und Anti-HBc-positiv zu 51 % als reaktiv, ein Wert, der mit dem von klinischen Daten und NANBH-Prävalenz in dieser Gruppe erwarteten Wert übereinstimmt. Das Vorkommen von Antikörpern gegen HCV war auch höher bei Blutspendern mit erhöhter ALT allein, bei Blutspendern, die nur für Antikörper gegen Hepatitis-B-Kern positiv waren und bei Blutspendern, die aus anderen Gründen als hohen ALT-Werten oder Anti-Kern-Antikörpern im Vergleich zu zufälligen freiwilligen Blutspendern abgelehnt wurden.

Tabelle 10

Proben von gegenüber NANBH risikoreichen Gruppen

Gruppe		N	Verteilung		% reaktiv
			N	OD	
Erhöhte ALT		35	3	3,000	11,4%
	1	0,728	5		
Anti-HBc		24	5	3,000	20,8%
		33	12	3,000	51,5%
Erhöhte ALT, Anti-HBc		2,768			
	1	2,324			
	1	2,939			
	1	0,951			
	1	0,906			
Zurückgewiesene Spender		25	5	3,000	20,0%
		150	19	3,000	14,7%
Spender mit Hepatitis-Vorgeschichte	1	0,837			
	1	0,714			
	1	0,469			
Hämophile		50	31	3,000	76,0%
	1	2,568			
	1	2,483			
	1	2,000			
	1	1,979			
	1	1,495			
	1	1,209			
	1	0,809			

IV.I.6. Vergleichende Untersuchungen mittels Anti-IgG- oder Anti-IgM-monoclonaler Antikörper oder polyclonaler Antikörper oder polyclonaler Antikörper als zweitem Antikörper im HCV-c100-3-ELISA

Die Sensitivität der ELISA-Messung, bei der Anti-IgG-monoclonales-Konjugat verwendet wurde, wurde mit derjenigen verglichen, die erreicht wurde, wenn entweder ein Anti-IgM-monoclonales-Konjugat verwendet wird, oder wenn beide durch ein polyclonales Antiserum ersetzt werden, welches sowohl schwer- als auch leichtkettenspezifisch sein soll. Es wurden die folgenden Untersuchungen durchgeführt.

IV.I.6.a. Serienproben aus Serokonvertern

Serienproben aus drei Fällen NANB-Serokonvertern wurden im HCV-c100-ELISA-Test untersucht, indem im Enzymkonjugat entweder das Anti-IgG-monoclonale-Antiserum allein oder in Kombination mit einem Anti-IGM-monoclonalen-Antiserum verwendet wurde, oder ein polyclonales Antiserum eingesetzt wurde. Die Proben wurden von Dr. Cladd Stevens, N.Y. Blood Center, N.Y.C., N.Y. bereitgestellt. Die Probenvorgeschichten sind in Tabelle 11 aufgeführt.

Die mit einem Anti-IgG-monoclonalen-Antikörper/Enzymkonjugat erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 12 enthalten. Die Daten zeigen, daß eine starke Reaktivität zu Anfang in den Proben 1 – 4, 2 – 8 und 3 – 5 der Fälle 1, 2 bzw. 3 nachgewiesen wurde. Die Ergebnisse, die mittels einer Kombination eines Anti-IgG-monoclonalen-Konjugats und eines Anti-IgM-Konjugats erhalten wurden, sind in Tabelle 13 aufgeführt. Es wurden 3 verschiedene Verhältnisse von Anti-IgG zu Anti-IgM getestet. Die Verdünnung 1:10000 von Anti-IgG war während der gesamten Tests konstant. Die bei dem Anti-IgM monoclonalen-Konjugat getesteten Verdünnungen betrugen 1:30000, 1:60000 und 1:120000. Die Daten zeigen, daß in Übereinstimmung mit den Untersuchungen mit Anti-IgG allein die anfängliche starke Reaktivität in den Proben 1 – 4, 2 – 8 und 3 – 5 nachgewiesen wurde. Die Ergebnisse, die mit dem ELISA-Test mit Anti-IgG-monoclonalem-Konjugat (Verdünnung 1:100000), oder mit Tago-polyclonalem-Konjugat (Verdünnung 1:80000) oder mit Jackson-polyclonalem-Konjugat (Verdünnung 1:80000) gewonnen wurden, sind in Tabelle 14 aufgeführt. Die Daten zeigen, daß die anfängliche starke Reaktivität in den Proben 1 – 4, 2 – 8 und 3 – 5 bei allen drei Konfigurationen nachgewiesen wurde. Die Tago-polyclonalen-Antikörper lieferten die niedrigsten Signale. Die oben vorgelegten Ergebnisse zeigen, daß alle drei Konfigurationen reaktive Proben zur gleichen Zeit nach der akuten Krankheitsphase nachweisen (wie durch die Erhöhung der ALT-Werte angezeigt wird). Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse, daß die Sensitivität des HCV-c100-3-ELISA-Tests mittels Anti-IgG-monoclonalem-Enzymkonjugat gleich oder besser ist, als diejenigen, die bei den anderen getesteten Konfigurationen des Enzymkonjugats erhalten wurde.

Tabelle 11
Beschreibung der Proben nach der Liste von Cladd Stevens

	Datum	HBsAG	Anti-HBs	Anti-HBc	ALT	Bilirubin
Fall 1						
1-1	05.08.81	1,0	91,7	12,9	40,0	-1,0
1-2	02.09.81	1,0	121,0	15,1	274,0	1,4
1-3	07.10.81	1,0	64,0	23,8	261,0	0,9
1-4	19.11.81	1,0	67,3	33,8	75,0	0,9
1-5	15.12.81	1,0	50,5	27,6	71,0	1,0
Fall 2						
2-1	19.10.81	1,0	1,0	116,2	17,0	-1,0
2-2	17.11.81	1,0	0,8	89,5	46,0	1,1
2-3	02.12.81	1,0	1,2	78,3	63,0	1,4
2-4	14.12.81	1,0	0,9	90,6	152,0	1,4
2-5	23.12.81	1,0	0,8	93,6	624,0	1,7
2-6	20.01.82	1,0	0,8	92,9	66,0	1,5
2-7	15.02.82	1,0	0,8	86,7	70,0	1,3
2-8	17.03.82	1,0	0,9	69,8	24,0	-1,0
2-9	21.04.82	1,0	0,9	67,1	53,0	1,5
2-10	19.05.82	1,0	0,5	74,8	95,0	1,6
2-11	14.06.82	1,0	0,8	82,9	37,0	-1,0
Fall 3						
3-1	07.04.81	1,0	1,2	88,4	13,0	-1,0
3-2	12.05.81	1,0	1,1	162,2	236,0	0,4
3-3	30.05.81	1,0	0,7	99,9	471,0	0,2
3-4	09.06.81	1,0	1,2	110,8	315,0	0,4
3-5	06.07.81	1,0	1,1	89,9	273,0	0,4
3-6	10.08.81	1,0	1,0	118,2	158,0	0,4
3-7	08.09.81	1,0	1,0	112,3	84,0	0,3
3-8	14.10.81	1,0	0,9	102,5	180,0	0,5
3-9	11.11.81	1,0	1,0	84,6	154,0	0,3

Tabelle 12
ELISA-Testergebnisse, die bei Verwendung von Anti-IgG-monoclonalem-Konjugat erhalten wurden

Probe	Datum	ALT	OD	S/CO
Neg. Kontrolle			0,076	
Abschneidewert			0,476	
PC (1:128)			1,390	
Fall 1				
1-1	05.08.81	40,0	0,178	0,37
1-2	02.09.81	274,0	0,154	0,32
1-3	07.10.81	261,0	0,129	0,27
1-4	19.11.81	75,0	0,937	1,97
1-5	15.12.81	71,0	3,000	6,30
Fall 2				
2-1	19.10.81	17,0	0,058	0,12
2-2	17.11.81	46,0	0,050	0,11
2-3	02.12.81	63,0	0,047	0,10
2-4	14.12.81	152,0	0,059	0,12
2-5	23.12.81	624,0	0,070	0,15
2-6	20.01.82	66,0	0,051	0,11
2-7	15.02.82	70,0	0,139	0,29
2-8	17.03.82	24,0	1,867	3,92
2-9	21.04.82	53,0	3,000	6,30
2-10	19.05.82	95,0	3,000	6,30
2-11	14.06.82	37,0	3,000	6,30
Fall 3				
3-1	07.04.81	13,0	0,090	0,19
3-2	12.05.81	236,0	0,064	0,13
3-3	30.05.81	471,0	0,079	0,17
3-4	09.06.81	315,0	0,211	0,44

Fortsetzung Tabelle 12

Probe	Datum	ALT	OD	S/CO
3-5	06.07.81	273,0	1,707	5,59
3-6	10.08.81	158,0	3,000	6,30
3-7	08.09.81	84,0	3,000	6,30
3-8	14.10.81	180,0	3,000	6,30
3-9	11.11.81	154,0	3,000	6,30

Tabelle 13

ELISA-Testergebnisse, die bei Verwendung von Anti-IgG- und Anti-IgM-monoconalem-Konjugat erhalten wurden

Probe	Datum	ALT	ELISA-Tests an NANB					
			Monoclonales IgG 1:10K IgM 1:30K		Monoclonales IgG 1:10K IgM 1:60K		Monoclonales IgG 1:10K IgM 1:120K	
			OD	S/CO	OD	S/CO	OD	S/CO
Neg. Kontrolle			0,100		0,080		0,079	
Abschneidewert PC (1:128)			1,083		1,328		1,197	
Fall 1								
1-1	05.08.81	40	0,173		0,162		0,070	
1-2	02.09.81	274	0,194		0,141		0,079	
1-3	07.10.81	261	0,162		0,129		0,063	
1-4	19.11.81	75	0,812		0,85		0,709	
1-5	15.12.81	71	> 3,00		> 3,00		> 3,00	
Fall 2								
2-1	19.10.81	17	0,442		0,045		0,085	
2-2	17.11.81	46	0,102		0,029		0,030	
2-3	02.12.81	63	0,059		0,036		0,027	
2-4	14.12.81	152	0,065		0,041		0,025	
2-5	23.12.81	624	0,082		0,033		0,032	
2-6	20.01.82	66	0,102		0,042		0,027	
2-7	15.02.82	70	0,188		0,068		0,096	
2-8	17.03.82	24	1,728		1,668		1,541	
2-9	21.04.82	53	> 3,00		2,443		> 3,00	
2-10	19.05.82	95	> 3,00		> 3,00		> 3,00	
2-11	14.06.82	37	> 3,00		> 3,00		> 3,00	
Fall 3								
3-1	07.04.81	13	0,193		0,076		0,049	
3-2	12.05.81	236	0,201		0,051		0,038	
3-3	30.05.81	471	0,132		0,067		0,052	
3-4	09.06.81	315	0,175		0,155		0,140	
3-5	06.07.81	273	1,335		1,238		1,260	
3-6	10.08.81	158	> 3,00		> 3,00		> 3,00	
3-7	08.09.81	84	> 3,00		> 3,00		> 3,00	
3-8	14.10.81	180	> 3,00		> 3,00		> 3,00	
3-9	11.11.81	154	> 3,00		> 3,00		> 3,00	

Tabelle 14
ELISA-Testergebnisse, die bei Verwendung von polyclonalen Konjugaten erhalten wurden

Probe	Datum	ALT	ELISA-Tests an NANB Monoclonal 1:10K		TAGO 1:80K		Jackson 1:80K	
			OD	S/CO	OD	S/CO	OD	S/CO
Neg. Kontrolle			0,076		0,045		0,154	
Abschneidewert			0,476		0,545		0,654	
PC (1:128)			1,390		0,727		2,154	
Fall 1								
1-1	05.08.81	40	0,178	0,37	0,067	0,12	0,153	0,23
1-2	02.09.81	274	0,154	0,32	0,097	0,18	0,225	0,34
1-3	07.10.81	261	0,129	0,27	0,026	0,05	0,167	0,26
1-4	19.11.81	75	0,937	1,97	0,324	0,60	0,793	1,21
1-5	15.12.81	71	> 3,00	6,30	1,778	3,27	> 3,00	4,59
Fall 2								
2-1	19.10.81	17	0,058	0,12	0,023	0,04	0,052	0,08
2-2	17.11.81	46	0,050	0,11	0,018	0,03	0,058	0,09
2-3	02.12.81	63	0,047	0,10	0,020	0,04	0,060	0,09
2-4	14.12.81	152	0,059	0,12	0,025	0,05	0,054	0,08
2-5	23.12.81	624	0,070	0,15	0,026	0,05	0,074	0,11
2-6	20.01.82	66	0,051	0,11	0,018	0,03	0,058	0,09
2-7	15.02.82	70	0,139	0,29	0,037	0,07	0,146	0,22
2-8	17.03.82	24	1,867	3,92	0,355	0,65	1,429	2,19
2-9	21.04.82	53	> 3,00	> 6,30	0,748	1,37	> 3,00	> 4,59
2-10	19.05.82	95	> 3,00	> 6,30	1,025	1,88	> 3,00	> 4,59
2-11	14.06.82	37	> 3,00	> 6,30	0,917	1,68	> 3,00	> 4,59
Fall 3								
3-1	07.04.81	13	0,090	0,19	0,049	0,09	0,138	0,21
3-2	12.05.81	236	0,064	0,13	0,040	0,07	0,094	0,14
3-3	30.05.81	471	0,079	0,17	0,045	0,08	0,144	0,22
3-4	09.06.81	315	0,211	0,44	0,085	0,16	0,275	0,42
3-5	06.07.81	273	1,707	0,59	0,272	0,50	1,773	2,71
3-6	10.08.81	158	> 3,00	> 6,30	1,347	2,47	> 3,00	> 4,59
3-7	08.09.81	84	> 3,00	> 6,30	2,294	4,21	> 3,00	> 4,59
3-8	14.10.81	180	> 3,00	> 6,30	> 3,00	> 5,50	> 3,00	> 4,59
3-9	11.11.81	154	> 3,00	> 6,30	> 3,00	> 5,50	> 3,00	> 4,59

IV.1.6.b. Proben von Zufallsblutspendern

Proben von Zufallsblutspendern (siehe Abschnitt IV.1.1.) wurden mittels HCV-c100-3-ELISA auf HCV-Infektion gescreent, wobei das Antikörper/Enzymkonjugat entweder ein Anti-IgG-monoclonales-Konjugat oder ein polyclonales Konjugat war. Die Gesamtanzahl der gescreenten Proben betrug 1077 bei polyclonalem Konjugat bzw. 1056 bei monoclonalem Konjugat. Eine Zusammenfassung der Screeningergebnisse erfolgt in Tabelle 15 und die Probenverteilungen werden im Histogramm in Fig. 44 gezeigt.

Die Berechnung der durchschnittlichen und der Standardabweichung erfolgte unter Ausschluß der Proben, die ein Signal über 1,5 ergaben, d. h. es wurden 1073 OD-Werte für die Berechnungen bei polyclonalem Konjugat und 1051 bei Anti-IgG-monoclonalem-Konjugat verwendet. Wie in Tabelle 15 zu erkennen ist, verschob sich der Durchschnittswert von 0,0493 auf 0,0931, und die Standardabweichung stieg von 0,074 auf 0,0933, wenn das polyclonale Konjugat verwendet wurde. Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse auch, daß, wenn die Kriterien von $x + 5SD$ angewandt werden, um den Assay-Abschneidewert zu definieren, die polyclonal/Enzymkonjugat-Konfiguration im ELISA-Test einen höheren Abschneidewert gefordert. Dies zeigt eine geringere Assay-Spezifität im Vergleich zum monoclonalen System an. Außerdem tritt, wie aus dem Histogramm in Fig. 44 zu entnehmen ist, eine größere Trennung der Ergebnisse zwischen negativer und positiver Verteilung ein, wenn Zufallsblutspender in einem ELISA-Test unter Verwendung des Anti-IgG-monoclonalen-Konjugats im Vergleich zu einem Assay mittels einer herkömmlichen polyclonalen Markierung gescreent werden.

Tabelle 15

Vergleich von zwei ELISA-Konfigurationen in Testproben von Zufallsblutspendern

Konjugat	Polyclonal (Jackson)	Anti-IgG-monoclonal
Anzahl der Proben	1 073	1 051
Durchschnitt (x)	0,0931	0,04926
Standardabweichung (SD)	0,0933	0,07427
5 SD	0,4666	0,3714
Abschneidewert (5 SD + x)	0,5596	0,4206

IV.J. Nachweis der HCV-Serokonversion in NANBH-Patienten aus vielen geographischen Gegenden

Seren von Patienten, bei denen aufgrund erhöhter ALT-Werte NANBH vermutet wurde, bei denen HAV- und HBV-Tests negativ gewesen waren, wurden mittels Radioimmunassay im wesentlichen nach dem im Abschnitt IV.D. beschriebenen Verfahren gescreent, wobei jedoch das HCV-C100-3-Antigen als Screening-Antigen auf den Mikrotiterplatten verwendet wurde. Wie aus den in Tabelle 16 dargestellten Ergebnissen ersichtlich wird, wies das Radioimmunassay in einem hohen Prozentsatz der Fälle positive Proben nach.

Tabelle 16

Häufigkeit der Serokonversion bei Anti-c100-3 unter NANBH-Patienten aus verschiedenen Ländern

Land	Niederlande	Italian	Japan
Anzahl der untersuchten Fälle	5	36	26
Positive Anzahl	3	29	19
% positiv	60	80	73

IV.K. Nachweis der HCV-Serokonversion in Patienten mit „In der Gemeinschaft erworbener“ NANBH

Von Dr. H. Alter vom Center of Disease Control und von Dr. J. Dienstag von der Harvard University wurden Seren zur Verfügung gestellt, die von 100 Patienten mit NANBH stammten, bei denen kein offensichtlicher Übertragungsweg zu erkennen war (d.h. keine Transfusionen, kein Benutzer intravenöser Drogen, keine Promiskuität usw. wurden als Risikofaktoren festgestellt). Diese Proben wurden mittels Radioimmunassay im wesentlichen nach dem im Abschnitt IV.D. beschriebenen Verfahren gescreent, mit der Ausnahme, daß das HCV-c100-3-Antigen als Screeningantigen auf den Mikrotiterplatten verwendet wurde. Die Ergebnisse zeigten, daß von den 100 Serumproben 55 Antikörper enthielten, die mit dem HCV-c100-3-Antigen immunologisch reagierten. Die oben beschriebenen Ergebnisse deuten darauf hin, daß die „in der Gemeinschaft erworbene“ NANBH ebenfalls durch das HCV verursacht wird.

Da hier außerdem gezeigt wurde, daß das HCV mit den Flaviviren verwandt ist, von denen die meisten durch Arthropoden übertragen werden, läßt dies darauf schließen, daß die HCV-Übertragung der „in der Gemeinschaft erworbenen“ Fälle ebenfalls durch Arthropoden erfolgte.

IV.L. Vergleich des Auftretens von HCV-Antikörpern und Surrogatmarkern bei Spendern, die von einer NANBH-Übertragung betroffen sind

Es wurde eine prognostische Untersuchung durchgeführt, um festzustellen, ob bei Empfängern von Blut von vermutlich NANBH-positiven Spendern, bei denen sich eine NANBH entwickelt hatte, eine Serokonversion zu Anti-HCV-Antikörper-positiv stattgefunden hat. Die Blutspender wurden auf abnorme Surrogatmarker getestet, die jetzt als Marker bei NANBH-Infektion eingesetzt werden, d.h. erhöhte ALT-Werte und das Vorhandensein von Anti-Kern-Antikörpern. Außerdem wurden die Spender auch auf das Vorhandensein von Anti-HCV-Antikörpern getestet. Die Feststellung, ob Anti-HCV-Antikörper vorhanden sind, erfolgte mit Hilfe eines in Abschnitt IV.K. beschriebenen Radioimmunassays. Die Untersuchungsergebnisse sind in Tabelle 17 aufgeführt, die folgendes zeigt: die Patientennummer (Spalte 1); das Vorhandensein von Anti-HCV-Antikörpern im Patientenserum (Spalte 2); die Anzahl von Blutspenden, die der Patient erhalten hatte, wobei jede Spende von einem anderen Spender stammte (Spalte 3); das Vorhandensein von Anti-HCV-Antikörpern im Spenderserum (Spalte 4); und die Surrogatabnormalität des Spenders (Spalte 5). (NT oder – bedeutet nicht getestet.) (ALT bedeutet erhöhte Transaminase und Anti-HBc bedeutet Anti-Kern-Antikörper.)

Die Ergebnisse in Tabelle 17 zeigen, daß der HCV-Antikörpertest beim Auffinden von infizierten Blutspendern genauer ist als die Surrogatmarkertests. Neun von 10 Patienten, bei denen sich NANBH-Symptome entwickelten, waren im Test auf Anti-HCV-Antikörper-Serokonversion positiv. Von den 11 vermutlich infizierten Individuen (Patient 6 erhielt Spenden von zwei verschiedenen Spendern, die vermutlich NANBH-Träger sind) waren 9 bei Anti-HCV-Antikörpern positiv und 1 war knapp über der Grenzwertlinie positiv und deshalb nicht eindeutig (Spender von Patient 1). Nutzt man dagegen den Test auf erhöhte ALT-Werte, so sind 6 von den 10 getesteten Spendern negativ und nutzt man den Antikern-Antikörper-Test, so sind 5 von den getesteten 10 Spendern negativ. Von größeren Auswirkungen ist jedoch die Tatsache, daß der ALT-Test und der Anti-HBc-Test in 3 Fällen (Spender für die Patienten 8, 9 und 10) keine übereinstimmenden Ergebnisse brachte.

Tabelle 17

Entwicklung von Anti-HCV-Antikörpern in Patienten, die Blut von Spendern erhielten, die vermutlich NANBH-Träger sind

Patient	Anti-HCV-Serokonversion im Patienten	Anzahl der Spenden/Spender	Anti-HCV-positiver Spender	Surrogatabnormalität ALT	Anti-HB
1	ja	18	zweideutig	nein	nein
2	ja	18	ja	NT	ja
3	ja	13	ja	nein	nein
4	nein	18	nein	—	—
5	ja	16	ja	ja	ja
6	ja	11	ja (2)	nein	nein
				ja	ja
7	ja	15	ja	NT	nein
8	ja	20	ja	nein	ja
9	ja	5	ja	ja	nein
10	ja	15	ja	nein	ja

* Derselbe Spender wie bei Anti-NANBH-positiv

IV.M. Amplifikation zum Clonieren von HCV-cDNA-Sequenzen mittels PCR und Primern, die aus konservierten Regionen von Flavivirus-Genom-Sequenzen abgeleitet wurden

Die im vorangegangenen dargestellten Ergebnisse, die darauf schließen lassen, daß das HCV ein Flavivirus oder ein flaviartiges Virus ist, erlauben eine Strategie zum Clonieren von uncharakteristischen HCV-cDNA-Sequenzen mittels der PCR-Technik und mit Primern, die aus den Regionen abgeleitet wurden, die für konservierte Aminosäuresequenzen in den Flaviviren codieren. Im allgemeinen wird einer der Primär aus einer definierten HCV-Genomsequenz abgeleitet, und der andere Primer, der eine Region von nicht sequenziertem HCV-Polynucleotid flankiert, wird aus einer konservierten Region des Flavivirusgenoms abgeleitet. Die Flavivirusgenome enthalten bekannterweise konservierte Sequenzen innerhalb der NS 1- und E-Polypeptide, die in der 5'-Region des Flavivirusgenoms codiert sind. Die für diese Regionen codierenden entsprechenden Sequenzen liegen „upstream“ der HCV-cDNA-Sequenz, wie in Fig. 26 gezeigt wird. Um somit die aus dieser Region des HCV-Genoms abgeleiteten cDNA-Sequenzen zu isolieren, werden „Upstream“-Primer entworfen, die von den konservierten Sequenzen innerhalb dieser Flaviviruspolypeptide abgeleitet werden. Die „Downstream“-Primer werden aus einem „Upstream“-Ende des bekannten Teils der HCV-cDNA abgeleitet.

Wegen der Degeneration des Codes ist es möglich, daß es zwischen den Flavivirussonden und der entsprechenden HCV-Genomsequenz zu Fehlanpassungen kommen wird. Deshalb wird eine Strategie angewandt, die ähnlich der von Lee (1988) beschrieben ist. Das Leesche Verfahren nutzt gemischte Oligonucleotidprimer aus, die zu den Produkten der Reversen Translation einer Aminosäuresequenz komplementär sind, die Sequenzen in den gemischten Primern tragen jeder Codondegeneration der konservierten Aminosäuresequenz Rechnung. Es wurden drei Sätze von Primergemischen geschaffen, die auf den Aminosäurehomologien beruhen, die in mehreren Flaviviren, einschließlich Dengue-2,4 (D-2,4), Japan-Enzephalitis-Virus (JEV), Gelbfieber (YF) und West-Nile-Virus (WN), gefunden wurden. Die aus der am meisten „upstream“ konservierten Sequenzen (5'-1) abgeleitete Primermischung beruht auf der Aminosäuresequenz Gly-Trp-Gly, die ein Teil der konservierten Sequenz Asp-Arg-Gly-Trp-Gly-AspN ist, die sich im E-Protein von D-2, JEV, YF und WN befindet. Die nächste Primermischung (5'-2) beruht auf einer „downstream“ konservierten Sequenz im E-Protein, Phe-Asp-Gly-Asp-Ser-Tyr-Ileu-Phe-Gly-Asp-Ser-Tyr-Ileu und ist abgeleitet von Phe-Gly-Asp; die konservierte Sequenz ist in D-2, JEV, YF und WN vorhanden. Die dritte Primermischung (5'-3) beruht auf der Aminosäuresequenz Arg-Ser-Cys, die Teil der konservierten Sequenz Cys-Cys-Arg-Ser-Cys im NS 1-Protein von D-2, D-4, JEV, YF und WN ist. Die einzelnen Primer, die das Gemisch in 5'-3 bilden, sind in Fig. 45 dargestellt. Zusätzlich zu den unterschiedlichen Sequenzen, die von der konservierten Region abgeleitet werden, enthält jeder Primer in jeder Mischung auch eine konstante Region am 5'-Ende, die eine Sequenz enthält, die für Stellen für die Restriktionsenzyme HindIII, MboI und EcoRI, codieren.

Der „downstream“-Primer, ssc5h20A, wird von einer Nucleotidsequenz in Clon 5h abgeleitet, die HCV-cDNA mit Sequenzen enthält, die sich mit Sequenzen in den Clonen 14i und 11b überlappen. Die Sequenz von ssc5h20A ist

5' GTA ATA TGG TGA CAG AGT CA 3'.

Es kann auch ein alternativer Primer, ssc5h34A, benutzt werden. Dieser Primer wird von einer Sequenz in Clon 5h abgeleitet und enthält zusätzlich Nucleotide am 5'-Ende, die eine Restriktionsenzymstelle bilden, so daß das Clonieren ermöglicht wird. Die Sequenz von ssc5h34A lautet

5' GAT CTC TAG AGA AAT CAA TAT GGT GAC AGA GTC A 3'

Die PCR-Reaktion, die erstmals von Saiki und Mitarbeitern (1986) beschrieben wurde, wird im wesentlichen wie von Lee und Mitarbeitern (1988) beschrieben durchgeführt, mit der Ausnahme, daß die Matrize für die cDNA RNA ist, die aus HCV-infizierter Schimpansenleber isoliert wurde, wie in Abschnitt IV.C.2. beschrieben wurde, oder aus viralen Partikeln stammt, die aus HCV-infiziertem Schimpansen Serum isoliert wurde, wie in Abschnitt IV.A.1 beschrieben wurde. Außerdem sind die „Annealing“-Bedingungen in der ersten Runde der Amplifikation weniger streng (0,6 M NaCl und 25°C), da der Teil des Primers, der an die HCV-Sequenz hybridisiert (anneal) nur 9 Nucleotide beträgt und es zu Fehlanpassungen kommen könnte. Darüber hinaus, wenn ssc5h34A verwendet wird, neigen die zusätzlichen Sequenzen, die nicht vom HCV-Genom abgeleitet sind, dazu, das Primer-Matrizen-Hybrid zu destabilisieren. Nach der ersten Runde der Amplifikation können die „Annealing“-Bedingungen strenger sein (0,066 M NaCl und 32°C bis 37°C), da amplifizierte Sequenzen jetzt Regionen enthalten, die komplementär zu den Primern oder deren Duplikate sind. Außerdem werden die ersten 10 Zyklen der Amplifikation mit dem Klenow-Enzym I unter den für dieses Enzym geeigneten PCR-Bedingungen durchgeführt. Nach Beendigung dieser Zyklen werden die Proben extrahiert und entsprechend den Kit-Anweisungen, wie von Cetus/Perkin-Elmer vorgesehen, mit Taq-Polymerase behandelt.

Nach der Amplifikation werden die amplifizierten HCV-cDNA-Sequenzen durch Hybridisierung mittels einer aus Clon 5h abgeleiteten Sonde nachgewiesen. Diese Sonde wird aus Sequenzen abgeleitet, die „upstream“ von denen liegen, von denen der Primer abgeleitet wurde, und überlappt nicht die Sequenzen der von Clon 5h abgeleiteten Primer. Die Sequenz der Sonde lautet

5' CCC AGC GGC GTA CGC GCT GGA CAC GGA GGT GGC CGC GTC
GTG TGG CGG TGT TGT TCT CGT CGG GTT GAT GGC GC 3'.

IV.N.1. Schaffung einer HCV-cDNA-Bibliothek aus der Leber eines Schimpansen mit infektiöser NANBH

Es wurde eine HCV-cDNA-Bibliothek aus der Leber des Schimpansen, von dem die HCV-cDNA-Bibliothek in Abschnitt IV.A.1. geschaffen worden war, erzeugt. Die Technik zur Schaffung der Bibliothek war ähnlich der von Abschnitt IV.A.24., mit der Ausnahme, daß eine andere RNA-Quelle und daß ein Primer, der auf der Sequenz von HCV-cDNA in Clon 11b beruhte, benutzt wurde. Die Sequenz des Primers lautet

5' CTG GCT TGA AGA ATC 3'.

IV.N.2. Isolierung und Nucleotidsequenz der überlappenden HCV-cDNA in Clon K9-1 bis cDNA in Clon 11b

Clon K9-1 wurde aus der HCV-cDNA-Bibliothek isoliert, die aus der Leber eines NANBH-infizierten Schimpansen geschaffen worden war, wie in Abschnitt IV.A.25. beschrieben wurde. Die Bibliothek wurde nach Clonen gescreent, die die Sequenz in Clon 11b überlappen, indem ein Clon verwendet wurde, der Clon 11b am 5'-Terminus überlappt, Clon 11e. Die Sequenz von Clon 11b wird in Fig. 23 gezeigt. Positive Clone wurden mit einer Häufigkeit von 1 bis 500 000 isoliert. Ein isolierter Clon, K9-1, wurde weiteren Untersuchungen unterzogen. Die überlappende Art der HCV-cDNA in Clon k9-1 bis zum 5'-Ende der HCV-cDNA-Sequenz in Fig. 26 wurde durch Sondieren des Clons mit Clon Alex46 bestätigt, dieser letztere Clon enthält eine HCV-cDNA-Sequenz von 30 Basenpaaren, die den Basenpaaren am 5'-Terminus der HCV-cDNA in Clon 14i entsprechen, wie im vorangegangenen beschrieben wurde.

Die Nucleotidsequenz der HCV-cDNA, die aus Clon k9-1 isoliert wurde, wurde mit den im vorangegangenen beschriebenen Techniken bestimmt. Die Sequenzen der HCV-cDNA in Clon k9-1, die Überlappung mit der HCV-cDNA in Fig. 26 und die darin codierten Aminosäuren werden in Fig. 46 gezeigt.

Die HCV-cDNA-Sequenz in Clon k9-1 wurde mit denen der im Abschnitt IV.A.19. beschriebenen Clone ausgerichtet (aligned), um eine zusammengesetzte HCV-cDNA-Sequenz zu schaffen, wobei die k9-1-Sequenz „upstream“ von der in Fig. 32 gezeigten Sequenz plziert wurde. Die zusammengesetzte HCV-cDNA, die die k9-1-Sequenz enthält, sowie die darin codierten Aminosäuren, wird in Fig. 47 gezeigt.

Die Sequenz der Aminosäuren, die in der 5'-Region der in Fig. 47 gezeigten HCV-cDNA codiert sind, wurde mit der entsprechenden Region in einem der Stämme des Dengue-Virus, oben beschrieben, in bezug auf das Profil der Regionen für Hydrophobie und Hydrophilie verglichen. Dieser Vergleich zeigte, daß die in dieser Region codierten Polypeptide aus HCV und Dengue-Virus, wobei diese Region der Region entspricht, die für NS1 (oder einem Teil davon) codiert, ein ähnliches hydrophobes/hydrophiles Profil haben.

Die im folgenden zur Verfügung gestellte Information erlaubt die Identifikation von HCV-Stämmen. Die Isolierung und Charakterisierung anderer HCV-Stämme kann durch Isolierung der Nucleinsäuren aus Körperkomponenten, die virale Partikel enthalten, durch Schaffung von cDNA-Bibliotheken mittels Polynucleotidsonden, die auf der Grundlage der im folgenden beschriebenen HCV-cDNA-Sonden beruhen, durch Screenen der Bibliotheken nach Clonen, die die unten beschriebenen HCV-cDNA-Sequenzen enthalten, und durch Vergleichen der HCV-cDNAs aus den neuen Isolaten mit den im folgenden beschriebenen cDNAs, erfolgen. Die darin oder im Virusgenom codierten Polypeptide können durch Ausnutzung der im vorangegangenen beschriebenen Polypeptide und Antikörper auf immunologische Kreuz-Reaktivität überwacht werden. Stämme, die den im Abschnitt Definitionen im vorangegangenen beschriebenen Parametern des HCV entsprechen, sind leicht identifizierbar. Weitere Verfahren zur Identifizierung von HCV-Stämmen werden den Fachleuten auf diesem Gebiet auf der Grundlage der hier bereitgestellten Informationen klar sein.

Fortsetzung der Beschreibung der Figuren

Fig. 36 zeigt die HCV-cDNA-Sequenz in Clon k9-1, das Segment, das die cDNA in Fig. 26 überlappt sowie die darin codierten Aminosäuren. Fig. 47 zeigt die Sequenz in einer zusammengesetzten cDNA, die durch Ausrichten der Clone k9-1 bis 15e in der 5'-bis 3'-Richtung abgeleitet wurde; sie zeigt auch die im kontinuierlichen ORF codierten Aminosäuren.

Industrielle Anwendbarkeit

Die hier in vielfältigen Offenbarungen vorgelegte Erfindung hat viele industrielle Anwendungen, von denen einige im folgenden vorgestellt werden. Die HCV-cDNAs können für den Entwurf von Sonden zum Nachweis von HCV-Nucleinsäuren in Proben verwendet werden. Die aus den cDNAs abgeleiteten Sonden können zum Nachweis von HCV-Nucleinsäuren z. B. in chemischen Synthesereaktionen eingesetzt werden. Sie können auch in Screening-Programmen nach Anti-Virus-Agenzien, zur Bestimmung der Wirkung von Mitteln zur Hemmung viraler Replikation in Zellkultursystemen und in Tiermodellsystemen verwendet werden. Die HCV-Polynucleotidsonden sind auch beim Nachweis von Virus-Nucleinsäuren im Menschen nützlich und können somit als eine Grundlage bei der Diagnose von HCV-Infektionen im Menschen dienen.

Zusätzlich zu dem oben Gesagten liefern die hier zur Verfügung gestellten cDNAs Informationen und stellen ein Mittel dar zur Synthesisierung von Polypeptiden, die Epitope des HCV enthalten. Diese Polypeptide sind beim Nachweis von Antikörpern gegen HCV-Antigene nützlich. Es wird hier eine Serie von Immunoassays bei HCV-Infektion auf der Grundlage von rekombinanten Polypeptiden, die HCV-Epitope enthalten, beschrieben, die kommerzielle Anwendung bei der Diagnose von HCV-induzierter NANBH, beim Screenen von Blutspendern nach HCV-verursachter infektiöser Hepatitis und auch beim Nachweis von kontaminiertem Blut von infektiösen Blutspendern finden werden. Die viralen Antigene werden auch in der Überwachung

der Wirksamkeit von Anti-Virusagenzien in Tiermodellen nützlich sein. Außerdem werden die von den hier offenbarten HCV-cDNAs abgeleiteten Polypeptide als Vakzine für die Behandlung von HCV-Infektionen nützlich sein.

Die von den HCV-cDNAs abgeleiteten Polypeptide sind außer den oben genannten Verwendungszwecken auch zum Entwickeln von Anti-HCV-Antikörpern nützlich. Sie können deshalb in Anti-HCV-Vakzinen verwendet werden. Die infolge der Immunisierung mit dem HCV-Polypeptiden erzeugten Antikörper sind auch beim Nachweis auf Vorhandensein von viralem Antigen in Proben nützlich. Sie können somit dazu verwendet werden, die Produktion von HCV-Polypeptiden in chemischen Systemen zu testen. Die Anti-HCV-Antikörper können auch zur Überwachung der Wirksamkeit anti-viraler Agenzien in Screening-Programmen, in denen diese Agenzien in Gewebekultursystemen getestet werden, dienen. Weiterhin können sie auch zur passiven Immuntherapie und zur Diagnose von HCV-verursachter NANBH genutzt werden, indem das (die) Virus-Antigen(e) sowohl im Blutspender als auch im -empfänger nachgewiesen werden kann. Eine weitere wichtige Verwendung von Anti-HCV-Antikörpern liegt in der Affinitätschromatographie für die Reinigung von Virus- und viralen Polypeptiden. Die gereinigten Virus- und viralen Polypeptidpräparate können in Vakzinen verwendet werden. Außerdem kann das gereinigte Virus auch bei der Entwicklung von Zellkultursystemen, in denen das HCV repliziert, nützlich sein.

Zellkultursysteme, die HCV-infizierte Zellen enthalten, können vielfältig verwendet werden. Sie können für eine Produktion von HCV, das in der Regel ein Niedrig-Titer-Virus ist, in relativ großem Maßstab verwendet werden. Diese Systeme werden auch bei der Aufhellung der Molekularbiologie des Virus nützlich sein und zur Entwicklung von anti-viralen Agenzien führen. Die Zellkultursysteme werden auch beim Screenen nach der Wirksamkeit der antiviralen Agenzien nützlich sein. Außerdem sind HCV-permissive Zellkultursysteme bei der Produktion von abgeschwächten HCV-Stämmen nützlich.

Praktischerweise können die Anti-HCV-Antikörper und die HCV-Polypeptide, ob natürliche oder rekombinante, in Kits verpackt werden.

Das Verfahren, das zur Isolierung von HCV-cDNA genutzt wird und aus der Herstellung einer cDNA-Bibliothek, die aus dem infizierten Gewebe eines Individuums abgeleitet wird, in einem Expressionsvektor, und in der Selektionierung von Clonen, die die Expressionsprodukte erzeugen, die immunologisch mit Antikörpern in Antikörper enthaltenden Körperkomponenten aus anderen infizierten Individuen, nicht aber mit denen von nicht infizierten Individuen reagieren, besteht, kann auch angewandt werden bei der Isolierung von cDNAs, die abgeleitet wurden aus anderen, hier im vorangegangenen nicht charakterisierten Krankheits-begleiteten Agenzien, die aus einer genomischen Komponente bestehen.

Dies wiederum könnte zur Isolierung und Charakterisierung dieser Agenzien sowie zu diagnostischen Reagenzien und Vakzinen für diese anderen Krankheits-begleiteten Agenzien führen.

FIG. 1

AlaSerCysLeuAsnCysSerAlaSerIleIleProAspArgGluValLeuTyrArgGlu
 1 GGCCTCCTGCTTGAACCTGCTCGGCGAGCATCATACCTGACAGGGAAGTCCTCTACCGAGA
 CCGGAGGACGAACCTTGACGAGCCGCTCGTAGTATGGACTGTCCCTTCAGGAGATGGCTCT

PheAspGluMetGluGluCysSerGlnHisLeuProTyrIleGluGlnGlyMetMetLeu
 61 GTTCGATGAGATGGAAGAGTGTCTCTCAGCACTTACCGTACATCGAGCAAGGGATGATGCT
 CAAGCTACTCTACCTTCTCAGGAGAGTCGTGAATGGCATGTAGCTCGTTCCTACTACGA

AlaGluGlnPheLysGlnLysAlaLeuGlyLeu
 121 CGCCGAGCAGTTCAAGCAGAAGGCCCTCGGCCCTCC
 GCGGCTCGTCAAGTTCGTCTTCCGGGAGCCGGAGG

FIG. 3

GlyCysValValIleValGlyArgValValLeuSerGlyLysProAlaIleIleProAsp
 1 CTGGCTGCGTGGTCATAGTGGGCAGGGTCGTCTTGTCGGGAAGCCGGCAATCATACCTG
 GACCGACGCACCACTATCACCCGTCCCAGCAGAACAGGCCCTTCGGCCGTAGTATGGAC

T

ArgGluValLeuTyrArgGluPheAspGluMetGluGluCysSerGlnHisLeuProTyr
 61 ACAGGGAAGTCCTCTACCGAGAGTTTCGATGAGATGGAAGAGTGTCTCAGCACTTACCGT
 TGTCCTTCAGGAGATGGCTCTCAAGCTACTCTACCTTCTCAGGAGAGTCGTGAATGGCA

A

IleGluGlnGlyMetMetLeuAlaGluGlnPheLysGlnLysAlaLeuGlyLeuLeuGln
 121 ACATCGAGCAAGGGATGATGCTCGCCGAGCAGTTCAAGCAGAAGGCCCTCGGCCCTCCTGC
 TGTAGCTCGTTCCCTACTACGAGCGGCTCGTCAAGTTCGTCTTCCGGGAGCCGGAGGACG

ThrAlaSerArgGlnAlaGluValIleAlaProAlaValGlnThrAsnTrpGlnLysLeu
 181 AGACCGCGTCCCGTCAGGCAGAGGTTATCGCCCCGTGTGCCAGACCAACTGGCAAAAAC
 TCTGGCGCAGGGCAGTCCGTCTCCAATAGCGGGACGACAGGTCTGGTTGACCGTTTTTG

GluThrPheTrpAlaLysHisMetTrpAsnPheIleSerGlyIleGlnTyrLeuAlaGly
 241 TCGAGACCTTCTGGGCGAAGCATATGTGGAACATTCATCAGTGGGATACAATACTTGGCGG
 AGCTCTGGAAGACCCGCTTCGTATACACCTTGAAGTAGTCACCCATATGTTATGAACCGCC

LeuSerThrLeuProGlyAsnProAlaIleAlaSerLeuMetAlaPheThrAlaAlaVal
 301 GCTTGTCAACGCTGCCTGGTAACCCCGCCATTGCTTCATTGATGGCTTTTACAGCTGCTG
 CGAACAGTTGCGACGGACCATTGGGGCGGTAACGAAGTAACCTACCGAAAATGTCGACGAC

ThrSerProLeuThrThrSerGln
 361 TCACCAGCCCACTAACCCTAGCCAAA
 AGTGGTCCGGTGATTGGTGATCGGTTT

```

5-1-1 1 [ggcctcctgttgaactgtctcgcgagc] ATCATACCTGACAGGGAAG
81 1 GTCCGGGAAGCCGGCAATCATACCTGACAGGGAAG
91 1 ctggctgogtGGTCATAGTGGGACGGTCTGTTCGGGAAGCCGGCAATCATACCTGACAGGGAAG
1-2 1 GGTTCATAGTGGGACGGTCTGTTCGGGAAGCCGGCAATCATACCTGACAGGGAAG

5-1-1 48 TCCTCTACCGAGAGTTCGATGAGATGGAAGAGTCTCTCAGCACTTACCGTACATCGAGCAAGGGATGATGC
81 36 TCCTCTACCGAGAGTTCGATGAGATGGAAGAGTCTCTCAGCACTTACCGTACATCGAGCAAGGGATGATGC
91 70 TCCTCTACCGAGAGTTCGATGAGATGGAAGAGTCTCTCAGCACTTACCGTACATCGAGCAAGGGATGATGC
1-2 60 TCCTCTACCGAGAGTTCGATGAGATGGAAGAGTCTCTCAGCACTTACCGTACATCGAGCAAGGGATGATGC

5-1-1 120 TCGCCGAGCAGTTCAAGCAGAAGGCCCTCGGCCCTCC
81 108 TCGCCGAGCAGTTCAAGCAGAAGGCCCTCGGCCCTCTCTGCAGACCGCGTCCCGTTCAGGCAGAGGTTATCGCCCC
91 142 TCGCCGAGCAGTTCAAGCAGAAGGCCCTCGGCCCTCTCTGCAGACCGCGTCCCGTTCAGGCAGAGGTTATCGCCCC
1-2 132 TCGCCGAGCAGTTCAAGCAGAAGGCCCTCGGCC

81 180 CTGCTGTCCAGACCAACTGGCAAAAACTCGAGACCTTCTGGGCGAAGCATATGTGGAACCTTCATCAGTGGGA
91 214 CT*CTGTCCAGACCAACTGGCAAAAACTCGAGACCTTCTGGGCGAAGCATATGTGGAACCTTCATCAGTGGGA
81 252 TACAATACTTGGCGGGCTTGTCAACGCTGCGCTGGTaaaccccgccattgcttcattgatggttttacagctg
91 286 TACAATACTTGGCGGGCTTGTCAACGCTGCGCTGG

81 324 ctgtcaccagcccactaaccactagccaaa

```

FIG. 2

FIG. 4

SerGlyLysProAlaIleIleProAspArgGluValLeuTyrArgGluPheAspGluMet
 1 GTCCGGGAAGCCGGCAATCATACCTGACAGGGAAGTCCTCTACCGAGAGTTGATGAGAT
 CAGGCCCTTCGGCCGTTAGTATGGACTGTCCCTTCAGGAGATGGCTCTCAAGCTACTCTA

 GluGluCysSerGlnHisLeuProTyrIleGluGlnGlyMetMetLeuAlaGluGlnPhe
 61 GGAAGAGTGCTCTCAGCACTTACCGTACATCGAGCAAGGGATGATGCTCGCCGAGCAGTT
 CCTTCTCACGAGAGTCGTGAATGGCATGTAGCTCGTTCCCTACTACGAGCGGCTCGTCAA

 LysGlnLysAlaLeuGlyLeuLeuGlnThrAlaSerArgGlnAlaGluValIleAlaPro
 121 CAAGCAGAAGGCCCTCGGCCCTCTGCAGACCGCTCCCGTCAGGCAGAGGTTATCGCCCC
 GTTCGTCTTCCGGGAGCCGGAGGACGCTCGGCGCAGGGCAGTCCGTCTCCAATAGCGGGG

 AlaValGlnThrAsnTrpGlnLysLeuGluThrPheTrpAlaIysHisMetTrpAsnPhe
 181 TGCTGTCCAGACCAACTGGCAAAAACTCGAGACCTTCTCGCGAAGCATATGTGGAACTT
 ACGACAGGTCTGGTTGACCGTTTGTGAGCTCTGGAAGACCCGCTTCGTATACACCTTGAA

 IleSerGlyIleGlnTyrLeuAlaGlyLeuSerThrLeuProGlyAsnProAlaIleAla
 241 CATCAGTGGGATACAATACTTGGCGGGCTTGTC AACCGCTGCCTGGTAACCCCGCCATTGC
 GTAGTCACCCATATGTTATGAACCGCCCGAACAGTTGCGACGGACCATTTGGGGCGGTAACG

 SerLeuMetAlaPheThrAlaAlaValThrSerProLeuThrThrSerGln
 301 TTCATTGATGGCTTTTACAGCTGCTGTACACAGCCCACTAACCACTAGCCAAA
 AAGTAACTACCGAAAATGTCGACGACAGTGGTCGGGTGATTGGTGATCGGTTT

FIG. 5

AspAlaHisPheLeuSerGlnThrLysGlnSerGlyGluAsnLeuProTyrLeuValAla
 1 GATGCCCCACTTTCTATCCCAGACAAAGCAGAGTGGGGAGAACCCTCCTTACCTGGTAGCG
 CTACGGGTGAAAGATAGGGTCTGTTTCGTCTCACCCCTCTTGGAAGGAATGGACCATCGC

 TyrGlnAlaThrValCysAlaArgAlaGlnAlaProProPrcSerTrpAspGlnMetTrp
 61 TACCAAGCCACCGTGTGCGCTAGGGCTCAAGCCCCTCCCCATCGTGGGACCAGATGTGG
 ATGGTTCCGGTGGCACACGCGATCCCGAGTTCCGGGGAGGGGTAGCACCCCTGGTCTACACC

 LysCysLeuIleArgLeuLysProThrLeuHisGlyProThrProLeuLeuTyrArgLeu
 121 AAGTGTTTGATTGCGCTCAAGCCCACCCTCCATGGGCCAACACCCCTGCTATACAGACTG
 TTCACAAACTAAGCGGAGTTCGGGTGGGAGGTACCCGGTTGTGGGGACGATATGTCTGAC

 GlyAlaValGlnAsnGluIleThrLeuThrHisProValThrLysTyrIleMetThrCys
 181 GGCCTGTTCAGAATGTAATCACCCCTGACGCACCCAGTCACCAAATACATCATGACATGC
 CCGCGACAAGTCTTACTTTAGTGGGACTGCGTGGGTGAGTGGTTTATGTAGTACTGTACG

 MetSerAlaAspLeuGluValValThrSerThrTrpValLeuValGlyGlyValLeuAla
 241 ATGTCGGCCACCTGGAGGTGCTCACGAGCACCTGGGTGCTCGTTGGCGGCTCCTGGCT
 TACAGCCGGCTGGACCTCCAGCAGTGCTCGTGGACCCACGAGCAACCGCCGAGGACCGA

 AlaLeuAlaAlaTyrCysLeuSerThrGlyCysValValIleValGlyArgValValLeu
 301 GCTTTGGCCGCGTATTGCTGTCAACAGGCTGCGTGGTTCATAGTGGGCAGGGTCGTCTTG
 CGAAACCGGCGCATAACGACAGTTGTCCGACGCACCAAGTATCACCCGTCCAGCAGAAC

 SerGlyLysProAlaIleIleProAspArgGluValLeuTyrArg
 361 TCCGGGAAGCCGGCAATCATACCTGACAGGGAAGTCCTCTACCGAG
 AGGCCCTTCGGCCGTTAGTATGGACTGTCCCTTCAGGAGATGGCTC

FIG. 6

AspAlaHisPheLeuSerGlnThrLysGlnSerGlyGluAsnLeuProTyrLeuValAla
 1 GATGCCCACTTCTATCCCAGACAAAGCAGAGTGGGGAGAACCCTTCCTTACCTGGTAGCG
 CTACGGGTGAAAGATAGGGTCTGTTTCGTCTCACCCCTCTTGAAGGAATGGACCATCGC

TyrGlnAlaThrValCysAlaArgAlaGlnAlaProProProSerTrpAspGlnMetTrp
 61 TACCAAGCCACCGTGTGCGCTAGGGCTCAAGCCCCTCCCCATCGTGGGACCAGATGTGG
 ATGGTTCGGTGGCACACGCGATCCCGAGTTCGGGGAGGGGGTAGCACCTGGTCTACACC

LysCysLeuIleArgLeuLysProThrLeuHisGlyProThrProLeuLeuTyrArgLeu
 121 AAGTGTTTGATTGCGCTCAAGCCCACCTCCATGGGCCAACACCCCTGCTATACAGACTG
 TTCACAAACTAAGCGGAGTTCGGGTGGGAGGTACCCGGTTGTGGGGACGATATGTCTGAC

GlyAlaValGlnAsnGluIleThrLeuThrHisProValThrLysTyrIleMetThrCys
 181 GCGCTGTTCAGAATGAAATCACCTGACGCACCCAGTCACCAAATACATCATGACATGC
 CCGGACAAGTCTTACTTTAGTGGGACTGCGTGGGTGAGTGGTTTATGTAGTACTGTACG

MetSerAlaAspLeuGluValValThrSerThrTrpValLeuValGlyGlyValLeuAla
 241 ATGTCGGCCGACCTGGAGGTCCGTCACGAGCACCTGGGTGCTCGTTGGCGCGCTCCTGGCT
 TACAGCCGGCTGGACCTCCAGCAGTGCTCGTGGACCCACGAGCAACCGCCGAGGACCGA

AlaLeuAlaAlaTyrCysLeuSerThrGlyCysValValIleValGlyArgValValLeu
 301 GCTTTGGCCGCGTATTGCTGTCAACAGGCTGCGTGGTCATAGTGGGCAGGGTCGTCTTG
 CGAAACCGCGCATAACGGACAGTTGTCCGACGCACCAAGTATCACCCGTCCCAGCAGAAC

SerGlyLysProAlaIleIleProAspArgGluValLeuTyrArgGluPheAspGluMet
 361 TCCGGGAAGCCGGCAATCATACCTGACAGGGAAGTCCTCTACCGAGAGTTCGATGAGATG
 AGGCCCTTCGGCCGTAGTATGGACTGTCCCTTCAGGAGATGGCTCTCAAGTACTCTAC

GluGluCysSerGlnHisLeuProTyrIleGluGlnGlyMetMetLeuAlaGluGlnPhe
 421 GAAGAGTGCTCTCAGCACTTACCGTACATCGAGCAAGGGATGATGCTCGCCGAGCAGTTC
 CTTCTCACGAGAGTCGTGAATGGCATGTAGCTCGTTCCCTACTACGAGCGGCTCGTCAAG

LysGlnLysAlaLeuGlyLeuLeuGlnThrAlaSerArgGlnAlaGluValIleAlaPro
 481 AAGCAGAAGGCCCTCGGCCTCTGCAGACCGCGTCCCGTCAGGCAGAGGTTATCGCCCCCT
 TTCGTCTTCCGGGAGCCGGAGGACGTCTGGCGCAGGGCAGTCCGTCTCCAATAGCGGGGA

AlaValGlnThrAsnTrpGlnLysLeuGluThrPheTrpAlaLysHisMetTrpAsnPhe
 541 GCTGTCCAGACCAACTGGCAAAACTCGAGACCTTCTGGGGCAAGCATATGTGGAACCTTC
 CGACAGGTCTGGTTGACCGTTTTTGTAGCTCTGGAAGACCCGCTTCGTATACACCTTGAAG

IleSerGlyIleGlnTyrLeuAlaGlyLeuSerThrLeuProGlyAsnProAlaIleAla
 601 ATCAGTGGGATACAATACTTGGCGGGCTTGTCATCTGCTGGTAACCCCGCCATTGCT
 TAGTCAACCTATGTTATGAACCGCCCCAACAGTTGCGACGGACCATTTGGGGCGGTAACGA

SerLeuMetAlaPheThrAlaAlaValThrSerProLeuThrThrSerGln
 661 TCATTGATGGCTTTTACAGCTGCTGTACCAGCCCACTAACCACTAGCCAAA
 AGTAACTACCGAAAATGTGACGACAGTGGTGGGTGATTGGTGATCGGTTT

FIG. 7

PheThrAlaAlaValThrSerProLeuThrThrSerGlnThrLeuLeuPheAsnIleLeu
1 CTTTTACAGCTGCTGTCAACAGCCCACTAACCCTAGCCAAACCCTCCTCTTCAACATAT
GAAAATGTCGACGACAGTGGTCGGGTGATTGGTGATCGGTTTGGGAGGAGAAGTTGTATA

GlyGlyTrpValAlaAlaGlnLeuAlaAlaProGlyAlaAlaThrAlaPheValGlyAla
61 TGGGGGGGTGGGTGGCTGCCCAGCTCGCCGCCCCCGGTGCCGCTACTGCCCTTTGTGGGCG
ACCCCCCACCACCGACGGGTCGAGCGGGGGGCCACGGCGATGACGGAAACACCCGC

GlyLeuAlaGlyAlaAlaIleGlySerValGlyLeuGlyLysValLeuIleAspIleLeu
121 CTGGCTTAGCTGGCGCCGCCATCGGCAGTGTGGACTGGGGAAGGTCCTCATAGACATCC
GACCGAATCGACCGCGGCGGTAGCCGTCACAACCTGACCCCTTCCAGGAGTATCTGTAGG

AlaGlyTyrGlyAlaGlyValAlaGlyAlaLeuValAlaPheLysIleMetSerGlyGlu
181 TTGCAGGGTATGGCGCGGGCGTGGCGGGAGCTCTTGTGGCATTCAAGATCATGAGCGGTG
AACGTCCCATACCGCGCCCGCACCGCCCTCGAGAACACCGTAAGTTCTAGTACTCGCCAC

ValProSerThrGluAspLeuValAsnLeuLeuProAlaIleLeuSerProGlyAlaLeu
241 AGGTCCCCTCCACGGAGGACCTGGTCAATCTACTGCCCCGCCATCCTCTCGCCCGGAGCCC
TCCAGGGGAGGTGCCTCCTGGACCAGTTAGATGACGGGCGGTAGGAGAGCGGGCCTCCGG

ValValGlyValValCysAlaAlaIleLeuArgArgHisValGlyProGlyGluGlyAla
301 TCGTAGTCGGCGTGGTCTGTGCAGCAATACTGCGCCGGCACGTTGGCCCGGGCGAGGGGG
AGCATCAGCCGCACCAGACACGTCGTTATGACGCGGCCGTGCAACCGGGCCCGCTCCCCC

ValGlnTrpMetAsnArgLeuIleAlaPheAlaSerArgGlyAsnHisValSer
361 CAGTGCAGTGGATGAACCGGCTGATAGCCTTCGCCTCCCGGGGGAACCATGTTTCCCC
GTACGTCACCTACTTGGCCGACTATCGGAAGCGGAGGGCCCCCTTGGTACAAAGGGG

FIG. 8

SerIleGluThrIleThrLeuProGlnAspAlaValSerArgThrGlnArgArgGlyArg
 1 TCCATTGAGACAATCACGCTCCCCCAGGATGCTGTCTCCCGCACTCAACGTCGGGGCAGG
 AGGTAACCTCTGTTAGTGCAGGGGGTCTACGACAGAGGGCGTGAGTTGCAGCCCCGTCC

 ThrGlyArgGlyLysProGlyIleTyrArgPheValAlaProGlyGluArgProSerGly
 61 ACTGGCAGGGGGAAGCCAGGCATCTACAGATTTGTGGCACCAGGGGAGCGCCCCCTCCGGC
 TGACCGTCCCCCTTCGGTCCGTAGATGTCTAAACACCGTGCCCCCTCGCGGGGAGGGCCG

 MetPheAspSerSerValLeuCysGluCysTyrAspAlaGlyCysAlaTrpTyrGluLeu
 121 ATGTTGACTCGTCCGTCCTCTGTGAGTGTATGACGCAGGCTGTGCTTGGTATGACCTC
 TACAAGCTGAGCAGGCAGGAGACACTCACGATACTGCGTCCGACACGAACCATACTCGAG

 ThrProAlaGluThrThrValArgLeuArgAlaTyrMetAsnThrProGlyLeuProVal
 181 ACGCCCGCCGAGACTACAGTTAGGCTACCAGCGTACATGAACACCCCGGGGCTTCCCGTG
 TGCGGGCGGCTCTGATGTCAATCCGATGCTCGCATGTACTTGTGGGGCCCCGAAGGGCAC

 CysGlnAspHisLeuGluPheTrpGluGlyValPheThrGlyLeuThrHisIleAspAla
 241 TGCCAGGACCATCTTGA/TTTGGGAGGGCGTCTTTACAGGCCTCACTCATATAGATGCC
 ACGGTCCTGGTAGAACTTAAACCCCTCCCGCAGAAATGTCCGGAGTGAGTATATCTACGG

 HisPheLeuSerGlnThrLysGlnSerGlyGluAsnLeuProTyrLeuValAlaTyrGln
 301 CACTTTCTATCCCAGACAAAGCAGAGTGGGGAGAACCTTCCTTACCTGGTAGCGTACCAA
 GTGAAAGATAGGGTCTGTTCGTCTCACCCCTCTTGAAGGAATGGACCATCGCATGGTT

 AlaThrValCysAlaArgAlaGlnAlaProProProSerTrpAspGlnMetTrpLysCys
 361 GCCACCGTGTGCGCTAGGGCTCAAGCCCCCTCCCCATCGTGGGACCAGATGTGGAAGTGT
 CGGTGGCACACGCGATCCCGAGTTCGGGGAGGGGGTAGCACCTGGTCTACACCTTACA

 LeuIleArgLeuLysProThrLeuHisGlyProThrProLeuLeuTyrArgLeuGlyAla
 421 TTGATTCGCCTCAAGCCCACCCTCCATGGGCCAACACCCCTGCTATAACAGACTGGGCGCT
 AACTAAGCGGAGTTCGGGTGGGAGGTACCCGGTTGTGGGGACGATATGTCGACCCGCGA

FIG. 9-1

1 SerIleGluThrIleThrLeuProGlnAspAlaValSerArgThrGlnArgArgGlyArg
 TCCATTGAGACAATCACGCTCCCCCAGGATGCTGTCTCCCGCACTCAACGTCGGGGCAGG
 AGGTAACCTCTGTTAGTGCGAGGGGGTCTACGACAGAGGGCGTGAGTTGCAGCCCCGTCC
 61 ThrGlyArgGlyLysProGlyIleTyrArgPheValAlaProGlyGluArgProSerGly
 ACTGGCAGGGGGAAGCCAGGCATCTACAGATTTGTGGCACCGGGGGAGCGCCCCCTCCGGC
 TGACCGTCCCCCTTCGGTCCGTAGATGTCTAAACACCGTGGCCCCCTCGCGGGGAGGCCG
 121 MetPheAspSerSerValLeuCysGluCysTyrAspAl lyCysAlaTrpTyrGluLeu
 ATGTTCTGACTCGTCCGTCTCTGTGAGTGCTATGACGCAGGCTGTGCTTGGTATGAGCTC
 TACAAGCTGAGCAGGCAGGAGACACTCAGATACTGCGTCCGACACGAACCATACTCGAG
 181 ThrProAlaGluThrThrValArgLeuArgAlaTyrMetAsnThrProGlyLeuProVal
 ACGCCCGCCGAGACTACAGTTAGGCTACGAGCGTACATGAACACCCCGGGGCTTCCCGTG
 TGCGGGCGGCTCTGATGTCAATCCGATGCTCGCATGTACTTGTGGGGCCCCGAAGGGCAC
 241 CysGlnAspHisLeuGluPheTrpGluGlyValPheThrGlyLeuThrHisIleAspAla
 TGCCAGGACCATCTTGAATTTTGGGAGGGCGTCTTTACAGGCCTCACTCATATAGATGCC
 ACGGTCTGTGTAAGCTTAAACCCCTCCCGCAGAAATGTCCGGAGTGAGTATATCTACGG
 301 HisPheLeuSerGlnThrLysGlnSerGlyGlnAsnLeuProTyrLeuValAlaTyrGln
 CACTTTCTATCCCAGACAAAGCAGAGTGGGGAGAACCTTCCTTACCTGGTAGCGTACCAA
 GTGAAAGATAGGGTCTGTTTCGTCTCACCCCTCTTGAAGGAATGGACCATCGCATGGTT
 361 AlaThrValCysAlaArgAlaGlnAlaProProProSerTrpAspGlnMetTrpLysCys
 GCCACCGTGTGCGCTAGGGCTCAAGCCCTCCCCATCGTGGGACCAGATGTGGAAGTGT
 CCGTGGCACACGCGATCCCGAGTTCCGGGAGGGGGTAGCACCCCTGGTCTACACCTTACA
 421 LeuIleArgLeuLysProThrLeuHisGlyProThrProLeuLeuTyrArgLeuGlyAla
 TTGATTGCGCTCAAGCCACCCCTCCATGGGCCAACACCCCTGCTATACAGACTGGGCGCT
 AACTAAGCGGAGTTCCGGTGGGAGGTACCCGGTGTGTTGGGACGATATGTCTGACCCGCA
 481 ValGlnAsnGluIleThrLeuThrHisProValThrLysTyrIleMetThrCysMetSer
 GTTCAGAATGAAATCACCCTGACGCACCCAGTCACCAAATACATCATGACATGCATGTGCG
 CAAGTCTTACTTTAGTGGGACTGCGTGGGTGAGTGGTTTATGTAGTACTGTACGTACAGC
 541 AlaAspLeuGluValValThrSerThrTrpValLeuValGlyGlyValLeuAlaAlaLeu
 GCCGACCTGGAGGTCCTCACGAGCACCTGGGTGCTCGTTGGCGGCGTCTGGCTGCTTTG
 CGGCTGGACCTCCAGCAGTGCTCGTGGACCCACGAGCAACCGCCGAGGACCGACGAAAC
 601 AlaAlaTyrCysLeuSerThrGlyCysValValIleValGlyArgValValLeuSerGly
 GCCGCGTATTGCCGTGCAACAGGCTGCGTGGTCATAGTGGGCAGGGTCTGTGTCGGGG
 CGGCGCATAACGGACAGTTGTCCGACGCACCAAGTATCACCCGTCCAGCAGAACAGGCCC
 661 LysProAlaIleIleProAspArgGluValLeuTyrArgGluPheAspGluMetGluGlu
 AAGCCGGCAATCTTACCTGACAGGGAAGTCCTCTACCGAGAGTTCGATGAGATGGAAGAG
 TTCGCCCGTTTGTATGGACTGTCTCTTCCAGGAGATGGCTCTCAAGCTACTCTACCTTCTC
 721 CysSerGlnHisLeuProTyrIleGluGlnGlyMetMetLeuAlaGluGlnPheLysGln
 TGCTCTCTGCACTTACCGTACATCGTCAAGGGATGATGCTCGCCGAGCAGTTCAAGCAG
 ACGAAGTCTGTAATGGCATGTAGCTGTTCCCTACTACGAGCGGCTCGTCAAGTTCGTCTC
 781 LysAlaLeuGlyLeuLeuGlnThrAlaSerArgGlnAlaGluValIleAlaProAlaVal
 AAGGCCCTCGGCCTCTGCAGACCGCGTCCCGTCAGGCAGAGGTTATCGCCCCCTGCTGTC
 TTCGCGGAGCCGGAGGACGTCTGGCGCAGGGCAGTCCGTCTCCAATAGCGGGACGACAG

- 59 -

841 GlnThrAsnTrpGlnLysLeuGluThrPheTrpAlaLysHisMetTrpAsnPheIleSer
CAGACCAACTGGCAAACTCGAGACCTTCTGGGCGAAGCATATGTGGAACCTTCATCAGT
GTCTGGTTGACCGTTTTTGTAGCTCTGGAAGACCGCTTCGTATACACCTGAAGTAGTCA

901 GlyIleGlnTyrLeuAlaGlyLeuSerThrLeuProGlyAsnProAlaIleAlaSerLeu
GGGATACAATACTTGGCGGGCTTGTCAACGCTGCCTGGTAACCCCGCCATTGCTTCATTG
CCCTATGTTATGAACCGCCCGAACAGTTGCGACGGACCATTGGGGCGGTAACGAAGTAAC

961 MetAlaPheThrAlaAlaValThrSerProLeuThrThrSerGlnThrLeuLeuPheAsn
ATGGCTTTTACAGCTGCTGTCAACGACCCACTAACCCTAGCCAAACCCTCCTCTTCAAC
TACCGAAAATGTCGACGACAGTGGTCCGGTGATTGGTGATCGGTTTGGGAGGAGAAGTTG

1021 IleLeuGlyGlyTrpValAlaAlaGlnLeuAlaAlaProGlyAlaAlaThrAlaPheVal
ATATTGGGGGGGTGGGTGGCTGCCAGCTCGCCGCCCCCGGTGCCGCTACTGCCTTTGTG
TATAACCCCCCACCACCGACGGGTCGAGCGGGGGGCCACGGCGATGACGGAACAC

1081 GlyAlaGlyLeuAlaGlyAlaAlaIleGlySerValGlyLeuGlyLysValLeuIleAsp
GGCGCTGGCTTAGCTGGCGCCGCCATCGGCAGTGTGGACTGGGGAAGGTCCCTCATAGAC
CCGCGACCGAATCGACCGCGGGCGGTAGCCGTCACAACCTGACCCCTTCCAGGAGTATCTG

1141 IleLeuAlaGlyTyrGlyAlaGlyValAlaGlyAlaLeuValAlaPheLysIleMetSer
ATCCTTGCAGGGTATGGCGGGGCGTGGCGGGAGCTCTTGTGGCATTCAAGATCATGAGC
TAGGAACGTCCCATACCGCGCCCGCACCGCCCTCGAGAACACCGTAAGTTCTAGTACTCG

1201 GlyGluValProSerThrGluAspLeuValAsnLeuLeuProAlaIleLeuSerProGly
GGTGAGGTCCCCCTCCACGGAGGACCTGGTCAATCTACTGCCCCCATCCTCTCGCCCCGA
CCACTCCAGGGGAGGTGCCTCCTGGACCAGTTAGATGACGGGCGGTAGGAGAGCGGGCCT

1261 AlaLeuValValGlyValValCysAlaAlaIleLeuArgArgHisValGlyProGlyGlu
GCCCTCGTAGTCGGCGTGGTCTGTGTCAGCAATACTGCGCCGGCACGTTGGCCCCGGCGAG
CGGGAGCATCAGCCGCACCAGACACGTCGTTATGACGCGGCGGTGCAACCGGGCCCCGCTC

1321 GlyAlaValGlnTrpMetAsnArgLeuIleAlaPheAlaSerArgGlyAsnHisValSer
GGGGCAGTGCACTGGATGAACCGGCTGATAGCCTTCGCCTCCCGGGGGAACCATGTTCCCC
CCCCGTCACGTCACCTACTTGGCCGACTATCGGAAGCGGAGGGCCCCCTTGGTACAAAGGGG

FIG. 9-2

FIG. 10

1 LeuAlaAlaLysLeuValAlaLeuGlyIleAsnAlaValAlaTyrTyrArgGlyLeuAsp
 CTCGCCGCAAAGCTGGTCGCATTGGGCATCAATGCCGTGGCCTACTACCGCGGTCTTGAC
 GAGCGGCGTTTCGACCAGCGTAACCCGTAGTTACGGCACCGGATGATGGCGCCAGAACTG

 61 ValSerValIleProThrSerGlyAspValValValAlaThrAspAlaLeuMetThr
 GTGTCCGTCATCCCGACCAGCGGCGATGTTGTCGTCGTGGCAACCGATGCCCTCATGACC
 CACAGGCAGTAGGGCTGGTCGCCGCTACAACAGCAGCACCGTTGGCTACGGGAGTACTGG

 121 GlyTyrThrGlyAspPheAspSerValIleAspTyrAsnThrCysValThrGlnThrVal
 GGCTATACCGGCGACTTCGACTCGGTGATAGACTACAATACGTGTGTCACCCAGACAGTC
 CCGATATGGCCGCTGAAGCTGAGCCACTATCTGATGTTATGCACACAGTGGGTCTGTCAG

 181 AspPheSerLeuAspProThrPheThrIleGluThrIleThrLeuProGlnAspAlaVal
 GATTTTCAGCCTTGACCCCTACCTTCACCATTGAGACAATCACGCTCCCCAGGATGCTGTC
 CTAAAGTCGGAACCTGGGATGGAAGTGGAACCTCTGTTAGTCCGAGGGGGTCTCTACGACAG

 241 SerArgThrGlnArgArgGlyArgThr
 TCCCGCACTCAACGTCGGGGCAGGACTG
 AGGGCGTGAGTTGCAGCCCCGTCTGAC

FIG. 11

1 MetAsnArgLeuIleAlaPheAlaSerArgGlyAsnHisValSerProThrHisTyrVal
 GATGAACCGGCTGATAGCCTTCGCCTCCCGGGGAACCATGTTTCCCCACGCACTACGT
 CTACTTGGCCGACTATCGGAAGCGGAGGGCCCCCTTGGTACAAAGGGGTGCGTGATGCA

 61 ProGluSerAspAlaAlaAlaArgValThrAlaIleLeuSerSerLeuThrValThrGln
 GCCGGAGAGCGATGCAGCTGCCCGCTCACTGCCATACTCAGCAGCCTCACTGTAACCCA
 CGGCCTCTCGCTACGTCGACGGGCGCAGTGACGGTATGAGTCGTTCGGAGTGACATTGGGT

 121 LeuLeuArgArgLeuHisGlnTrpIleSerSerGluCysThrThrProCysSerGlySer
 GCTCCTGAGGCGACTGCACCAGTGGATAAGCTCGGAGTGTAACCTCCATGCTCCGGTTC
 CGAGGACTCCGCTGACGTGGTCACCTATTCGAGCCTCACATGGTGAGGTACGAGGCCAAG

 181 TrpLeuArgAspIleTrpAspTrpIleCysGluValLeuSerAspPheLysThrTrpLeu
 CTGGCTAAGGGACATCTGGGACTGGATATGCGAGGTGTTGAGCGACTTTAAGACCTGGCT
 GACCGATTCCCTGTAGACCCTGACCTATACGCTCCACAACCTCGCTGAAATTCTGGACCGA

 241 LysAlaLysLeuMetProGlnLeuProGlyIleProPheValSerCysGlnArgGlyTyr
 AAAAGCTAAGCTCATGCCACAGCTGCCGTTGGGATCCCTTTGTGTCCTGCCAGCGCGGGTA
 TTTTCGATTTCGAGTACGGTGTGACGAGCCCTAGGGGAAACACAGGACGGTTCGCGCCCAT

 301 LysGlyValTrpArgVal
 TAAGGGGGTCTGGCGAGTG
 ATTCCCCCAGACCGCTCAC

FIG. 12

AlaTyrMetSerLysAlaHisGlyIleAspProAsnIleArgThrGlyValArgThrIle
1 GGCTTACATGTCCAAGGCTCATGGGATCGATCCTAACATCAGGACCGGGGTGAGAACAAT
CCGAATGTACAGGTCCGAGTACCCTAGCTAGGATTGTAGTCCTGGCCCCACTCTTGTTA

ThrThrGlySerProIleThrTyrSerThrTyrGlyLysPheLeuAlaAspGlyGlyCys
61 TACCACTGGCAGCCCCATCAGTACTCCACCTACGGCAAGTTCCTTGCCGACGGCGGGTG
ATGGTGACCGTCGGGGTAGTGCAATGAGGTGGATGCCGTTCAAGGAACGGCTGCCGCCAC

SerGlyGlyAlaTyrAspIleIleIleCysAspGluCysHisSerThrAspAlaThrSer
121 CTCGGGGGGCGCTTATGACATAATAATTTGTGACGAGTGCCACTCCACGGATGCCACATC
GAGCCCCCGCGAATACTGTATATTATAAACACTGCTCACGGTGAGGTGCCTACGGTGTA

IleLeuGlyIleGlyThrValLeuAspGlnAlaGluThrAlaGlyAlaArgLeuValVal
181 CATCTTGGGCATCGGCACTGTCTTGACCAAGCAGAGACTGCGGGGGCGAGACTGGTTGT
GTAGAACCCGTAGCCGTGACAGGAAGTGGTTCGTCTCTGACGCCCCGCTCTGACCAACA

LeuAlaThrAlaThrProProGlySerValThrValProHisProAsnIleGluGluVal
241 GCTCGCCACCGCCACCCCTCCGGGCTCCGTCAGTGTGCCCCATCCCAACATCGAGGAGCT
CGAGCGGTGGCGGTGGGGAGGC'CCGAGGCAGTGACACGGGGTAGGGTTGTAGCTCCTCCA

AlaLeuSerThrThrGlyGluIleProPheTyrGlyLysAlaIleProLeuGluValIle
301 TGCTCTGTCCACCACCGGAGAGATCCCTTTTTACGGCAAGGCTATCCCCCTCGAAGTAAT
ACGAGACAGGTGGTGGCCTCTCTAGGGAAAAATGCCGTTCCGATAGGGGGAGCTTCATTA

LysGlyGlyArgHisLeuIlePheCysHisSerLysLysLysCysAspGluLeuAlaAla
361 CAAGGGGGGGAGACATCTCATCTTCTGTCAATCAAAGAAGAAGTGCGACGAACCTCGCCGC
GTTCCCCCCTCTGTAGAGTAGAAGACAGTAAGTTCTTCTTCACGCTGCTTGAGCGGCG

LysLeuValAlaLeuGlyIleAsnAlaValAlaTyrTyrArgGlyLeuAspValSerVal
421 AAAGCTGGTCCGATTGGGCATCAATGCCGTGGCCTACTACCGCGGTCTTGACGTGTCCGT
TTTCGACCAGCGTAACCCGTAGTTACGGCACCGGATGATGGCGCCAGAACTGCACAGGCA

IleProThr
481 CATCCCGACCAG
GTAGGGCTGGTC

FIG. 13

CysSerLeuThrValThrGlnLeuLeuArgArgLeuHisGlnTrpIleSerSerGluCys
 1 ACTGCAGCCTCACTGTAACCCAGCTCCTGAGGCGACTGCACCAGTGGATAAGCTCGGAGT
 TGACGTCGGAGTGACATTGGGTCGAGGACTCCGCTGACGTGGTCACCTATTTCGAGCCTCA

ThrThrProCysSerGlySerTrpLeuArgAspIleTrpAspTrpIleCysGluValLeu
 61 GTACCACTCCATGCTCCGGTTCTGGCTAAGGGACATCTGGGACTGGATATGCGAGGTGT
 CATGGTGAGGTACGAGGCCAAGGACCGATTCCCTGTAGACCCTGACCTATACGCTCCACA

SerAspPheLysThrTrpLeuLysAlaLysLeuMetProGlnLeuProGlyIleProPhe
 121 TGAGCGACTTTAAGACCTGGCTAAAAGCTAAGCTCATGCCACAGCTGCCTGGGATCCCCT
 ACTCGCTGAAATTCCTGGACCGATTTTCGATTTCGAGTACGGTGTGACGGACCCTAGGGGA

ValSerCysGlnArgGlyTyrLysGlyValTrpArgGlyAspGlyIleMetHisThrArg
 181 TTGTGTCCTGCCAGCGCGGGTATAAGGGGGTCTGGCGAGGGGACGGCATCATGCACACTC
 AACACAGGACGGTCGCGCCCATATCCCCCAGACCGCTCCCCTGCCGTAGTACGTGTGAG

CysHisCysGlyAlaGluIleThrGlyHisValLysAsnGlyThrMetArgIleValGly
 241 GCTGCCACTGTGGAGCTGAGATCACTGGACATGTCAAAAACGGGACGATGAGGATCGTCG
 CGACGGTGACACCTCGACTCTAGTGACCTGTACAGTTTTTGCCTGCTACTCCTAGCAGC

ProArgThrCysArgAsnMetTrpSerGlyThrPheProIleAsnAlaTyrThrThrGly
 301 GTCCTAGGACCTGCAGGAACATGTGGAGTGGGACCTTCCCCATTAATGCCTACACCACGG
 CAGGATCCTGGACGTCCTTGTACACCTCACCTGGAAGGGTAATTACGGATGTGGTGCC

ProCysThrProLeuProAlaProAsnTyrThrPheAlaLeuTrpArgValSerAlaGlu
 361 GCCCCTGTACCCCCCTTCCGTGCGCCGAACACACGTTCGCGCTATGGAGGGTGTCTGCAG
 CGGGGACATGGGGGAAGGACGCGGCTTGATGTGCAAGCGGATACCTCCACAGACGTC

GluTyrValGluIleArgGlnValGlyAspPheHisTyrValThrGlyMetThrThrAsp
 421 AGGAATATGTGGAGATAAGGCAGGTGGGGGACTTCCACTACGTGACGGGTATGACTACTG
 TCCTTATACACCTCTATTCCGTCCACCCCCGAAGGTGATGCACTGCCCATACTGATGAC

AsnLeuLysCysProCysGlnValProSerProGluPhePheThrGlu
 481 ACAATCTCAAATGCCCGTGCCAGGTCCCATCGCCCGAATTTTTCACAGAAT
 TGTTAGAGTTTACGGGCACGGTCCAGGGTAGCGGGCTTAAAAAGTGCTTA

FIG. 14-1

AlaTyrMetSerLysAlaHisGlyIleAspProAsnIleArgThrGlyValArgThrIle
 1 TGCTTACATGTCCAAGGCTCATGGGATCGATCCTAACATCAGGACCGGGGTGAGAACAAT
 ACGAATGTACAGGTTCCGAGTACCTAGCTAGGATTGTAGTCTGGCCCCACTCTTGTTA

ThrThrGlySerProIleThrTyrSerThrTyrGlyLysPheLeuAlaAspGlyGlyCys
 61 TACCACTGGCAGCCCCATCACGTACTCCACCTACGGCAAGTTCCTTGCCGACGGCGGGTG
 ATGGTGACCGTCCGGGTAGTGCATGAGGTGGATGCCGTCAAGGAACGGCTGCCGCCAC

SerGlyGlyAlaTyrAspIleIleIleCysAspGluCysHisSerThrAspAlaThrSer
 121 CTCGGGGGGCGCTTATGACATAATAATTTGTGACGAGTGCCACTCCACGGATGCCACATC
 GAGCCCCCGGAATACTGTATTATTAAACACTGCTCACGGTGAGGTGCCTACGGTGTAG

IleLeuGlyIleGlyThrValLeuAspGlnAlaGlnThrAlaGlyAlaArgLeuValVal
 181 CATCTTGGGCATCGGCACTGTCTTGACCAAGCAGAGACTGCGGGGGGAGACTGGTGTGT
 GTAGAACCCGTAGCCGTGACAGGAAGTGGTTCGTCTCTGACGCCCCCGCTCTGACCAACA

LeuAlaThrAlaThrProProGlySerValThrValProHisProAsnIleGluGluVal
 241 GCTCGCCACCGCCACCCCTCCGGGCTCCGTCACTGTGCCCCATCCCAACATCGAGGAGGT
 CGAGCGGTGGCGGTGGGGAGGCCGAGGCAGTGACACGGGGTAGGGTGTAGCTCCTCCA

AlaLeuSerThrThrGlyGluIleProPheTyrGlyLysAlaIleProLeuGluValIle
 301 TGCTCTGTCCACCACCGGAGAGATCCCTTTTACGGCAAGGCTATCCCCCTCGAAGTAAT
 ACGAGACAGGTGGTGGCCTCTCTAGGGAATAATGCCGTTCGATAGGGGGAGCTTCATTA

LysGlyGlyArgHisLeuIlePheCysHisSerLysLysLysCysAspGluLeuAlaAla
 361 CAAGGGGGGAGACATCTCATCTTCTGTCAATCAAAGAAGAAGTGGCAGCAACTCGCCGC
 GTTCCCCCTCTGTAGAGTAGAAGACAGTAAGTTTCTTCTTACGCTGCTTGAGCGGGC

LysLeuValAlaLeuGlyIleAsnAlaValAlaTyrTyrArgGlyLeuAspValSerVal
 421 AAAGCTGGTTCGCATTTGGGCATCAATGCCGTGGCCTACTACCGCGGTCTTGACGTGTCCT
 TTTTCGACCAGCGTAACCCGTAGTTACGGCACCGGATGATGGCGCCAGAAGTGCACAGGCA

IleProThrSerGlyAspValValValAlaThrAspAlaLeuMetThrGlyTyrThr
 431 CATCCCGACCGCGGCGATGTTGTCTGTCGTGGCAACCGATGCCCTCATGACCGGCTATAC
 GTAGGGCTGGTTCGCCGTACAACAGCAGCACCGTTGGCTACGGGAGTACTGGCCGATATG

GlyAspPheAspSerValIleAspTyrAsnThrCysValThrGlnThrValAspPheSer
 541 CGGCGACTTCGACTCGGTGATAGACTACAATACGTGTGTCACCCAGACAGTCGATTTTCAG
 CCCGTGAAGCTGAGCCACTATCTGATGTTATGCACACAGTGGGTCTGTAGCTAAAGTC

LeuAspProThrPheThrIleGluThrIleThrLeuProGlnAspAlaValSerArgThr
 601 CCTTGACCTACCTTCACCATTTAGACAATCACGCTCCCCAGGATGCTGTCTCCCGCAC
 GGAATGGGATGGAAGTGGTAACTCTGTTAGTGCGAGGGGGTCTACGACAGAGGGCGTG

GlnArgArgGlyArgThrGlyArgGlyLysProGlyIleTyrArgPheValAlaProGly
 661 TCAACGTGCGGGCAGGACTGGCAGGGGGAAGCCAGGCATCTACAGATTTGTGGCACC
 AGTTGCAGCCCCGTCTGACCGTCCCCCTTCGGTCCGTAGATGTCTAAACACCGTGGCCC

GluArgProSerGlyMetPheAspSerSerValLeuCysGluCysTyrAspAlaGlyCys
 721 GGAGCGCCCCCTCCGGCATGTTGACTCGTCCGTCTCTGTGAGTGCTATGACGAGGCTG
 CCTCGCGGGGAGGCCGTACAAGCTGAGCAGGCAGGAGACACTCACGATACTGCGTCCGAC

AlaTrpTyrGluLeuThrProAlaGluThrThrValArgLeuArgAlaTyrMetAsnThr
 781 TGCTTGGTATGAGCTCACGCCCCGCGAGACTACAGTTAGGCTACGAGCGTACATGAACAC
 ACGAACCATACTCGAGTGCGGGCGGGCTCTGATGTCAATCCGATGCTCGCATGTACTTGTG

ProGlyLeuProValCysGlnAspHisLeuGluPheTrpGluGlyValPheThrGlyLeu
 841 CCCGGGGCTTCCCGTGTGCCAGGACCATCTTGAATTTTGGGAGGGCGCTTTACAGGCCCT
 GGGCCCCGAAGGGCACACGGTCTCTGGTAGAACTTAAACCCCTCCCGCAGAAATGTCCGGA

ThrHisIleAspAlaHisPheLeuSerGlnThrLysGlnSerGlyGluAsnLeuProTyr
 901 CACTCATATAGATGCCCACTTTCTATCCCAGACAAAGCAGAGTGGGGAGAACCTTCTTA
 GTGAGTATATCTACGGGTGAAAGATAGGGTCTGTTTCGTCTCACCCCTCTTGAAGGAAT

961 LeuValAlaTyrGlnAlaThrValCysAlaArgAlaGlnAlaProProProSerTrpAsp
 CCTGGTAGCGTACCAAGCCACCGTGTGCGCTAGGGCTCAAGCCCCCTCCCCATCGTGGGA
 GGACCATCGCATGGTTCGGTGGCACACGCGATCCCGAGTTCGGGGAGGGGTAGCACCCCT

 1021 GlnMetTrpLysCysLeuIleArgLeuLysProThrLeuHisGlyProThrProLeuLeu
 CCAGATGTGGAAGTGTGTTGATTGCGCTCAAGCCCACCCCTCCATGGGCCAACACCCCTGCT
 GGTCTACACCTTCACAACTAAGCGGAGTTCGGGTGGGAGGTACCCGGTTGTGGGACGA

 1081 TyrArgLeuGlyAlaValGlnAsnGluIleThrLeuThrHisProValThrLysTyrIle
 ATACAGACTGGGCGCTGTTTCAAGTAAATCACCCTGACGCACCCAGTCACCAATACAT
 TATGTCTGACCCGCGACAAGTCTTACTTTAGTGGGACTGCGTGGGTTCAGTGGTTTATGTA

 1141 MetThrCysMetSerAlaAspLeuGluValValThrSerThrTrpValLeuValGlyGly
 CATGACATGCATGTGCGCCGACCTGGAGGTGCTCACGAGCACCTGGGTGCTCGTTGGCCG
 GTACTGTACGTACAGCCGGCTGGACCTCCAGCAGTGTCTGTGACCCACGAGCAACCGCC

 1201 ValLeuAlaAlaLeuAlaAlaTyrCysLeuSerThrGlyCysValValIleValGlyArg
 CGTCTGGCTGCTTTGGCCGCGTATTGCGCTGTCAACAGGCTGCGTGGTTCATAGTGGGCAG
 GCAGGACCGACGAAACCGGCGCATAACGGACAGTTGTCCGACGCACAGTATCACCCGTC

 1261 ValValLeuSerGlyLysProAlaIleIleProAspArgGluValLeuTyrArgGluPhe
 GGTCTGCTTGTCCGGGAAGCCGGCAATCATACCTGACAGGGAAGTCTCTACCGAGAGTT
 CCAGCAGAACAGGCCCTTCGGCCGTTAGTATGGACTGTCCCTTCAGGAGATGGCTCTCAA

 1321 AspGluMetGluGluCysSerGlnHisLeuProTyrIleGluGlnGlyMetMetLeuAla
 CGATGAGATGGAAGAGTGTCTCTCAGCACTTACCGTACATCGAGCAAGGGATGATGCTCGC
 GCTACTCTACCTTCTCACGAGAGTGTGAATGGCATGTAGCTCGTTCCCTACTACGAGCG

 1381 GluGlnPheLysGlnLysAlaLeuGlyLeuLeuGlnThrAlaSerArgGlnAlaGluVal
 CGAGCAGTTCAAGCAGAAGGCCCTCGGCCCTCTGCAGACCGCGTCCCGTCAGGCAGAGGT
 GCTCGTCAAGTTCGTCTTCCGGGAGCCGGAGGACGTCTGGCGCAGGGCAGTCCGTCTCCA

 1441 IleAlaProAlaValGlnThrAsnTrpGlnLysLeuGluThrPheTrpAlaLysHisMet
 TATCGCCCTGCTGTCCAGACCAACTGGCAAACTCGAGACCTTCTGGGCGAAGCATAT
 ATAGCGGGGACGACAGGTCTGGTTGACCGTTTTTGTAGCTCTGGAAGACCCGCTTCGTATA

 1501 TrpAsnPheIleSerGlyIleGlnTyrLeuAlaGlyLeuSerThrLeuProGlyAsnPro
 GTGGAACCTTCATCAGTGGGATACAATATTGGCGGGCTGTCAACGCTGCCTGGTAACCC
 CACCTTGAAGTAGTCACCTATGTTATGAACCGCCGAACAGTTGCGACGGACCATTGGG

 1561 AlaIleAlaSerLeuMetAlaPheThrAlaAlaValThrSerProLeuThrThrSerGln
 CGCCATTGCTTCATTGATGGCTTTTACAGCTGCTGTACAGGCCCACTAACCCTAGCCA
 GCGGTAACGAAGTAACCTACCGAAAATGTCGACGACAGTGGTTCGGGTGATTGGTGATCGGT

 1621 ThrLeuLeuPheAsnIleLeuGlyGlyTrpValAlaAlaGlnLeuAlaAlaProGlyAla
 AACCTCCTCTTCAACATATTGGGGGGTGGGTGGCTGCCCAGCTCGCCGCCCGGGTGC
 TTGGGAGGAGAAGTTGTATAACCCCCCACCACCGACGGGTGAGCGGGGGGGGCCACG

 1681 AlaThrAlaPheValGlyAlaGlyLeuAlaGlyAlaAlaIleGlySerValGlyLeuGly
 CGTACTGCCTTTGTGGGCGCTGGCTTAGCTGGCGCCGCCATCGGCAGTGTGGACTGGG
 GCGATGACGGAACACCCGCGACCGAATCGACCGCGCGGTAGCCGTCAACCTGACCC

 1741 LysValLeuIleAspIleLeuAlaGlyTyrGlyAlaGlyValAlaGlyAlaLeuValAla
 GAAGGTCTCATAGACATCCTTGCAGGGTATGGCGCGGGCGTGGCGGGAGCTCTTGTGGC
 CTTCCAGGAGTATCTGTAGGAACGTCCCATACCGCGCCGACCGCCCTCGAGAACACCG

 1801 PheLysIleMetSerGlyGluValProSerThrGluAspLeuValAsnLeuLeuProAla
 ATTCAAGATCATGAGCGGTGAGGTCCCTCCACGGAGGACCTGGTCAATCTACTGCCCGC
 TAAGTTCTAGTACTCGCCACTCCAGGGGAGGTGCCTCCTGGACAGTTAGATGACGGCGG

 1861 IleLeuSerProGlyAlaLeuValValGlyValValCysAlaAlaIleLeuArgArgHis
 CATCCTCTCGCCCGAGCCCTCGTAGTCGGCGTGGTCTGTGCAGCAATCTGCGCCGGCA
 GTAGGAGAGCGGGCTCGGGAGCATCAGCCGACCCAGACACGTGCTTATGACGCGGCCGT

FIG. 14-2 valGlyProGlyGluGlyAlaValGlnTrpMetAsnArgLeuIleAlaPheAlaSerArg

1921 CGTTGGCCCGGGCGAGGGGCGAGTGCAGTGGATGAACCGGCTGATAGCCTTCGCCTCCCG
 GCAACCGGGCCCGCTCCCCGTCACGTCACCTACTTGGCCGACTATCGGAAGCGGAGGGC
 GlyAsnHisValSerProThrHisTyrValProGluSerAspAlaAlaAlaArgValThr
 1981 GGGGAACCATGTTTCCCCACGCACTACGTGCCGGAGAGCGATGCAGCTGCCCCGCTCAC
 CCCCTTGGTACAAAGGGGGTGCGTGATGCACGGCCTCTCGCTACGTGACGGGCGCAGTG
 AlaIleLeuSerSerLeuThrValThrGlnLeuLeuArgArgLeuHisGlnTrpIleSer
 2041 TGCCATACTCAGCAGCCTCACTGTAACCCAGCTCCTGAGGCGACTGCACCACTGGATAAG
 ACGGTATGAGTCGTCGGAGTGACATTGGGTCGAGGACTCCGCTGACGTGGTCACCTATTCT
 SerGluCysThrThrProCysSerGlySerTrpLeuArgAspIleTrpAspTrpIleCys
 2101 CTCGGAGTGTACCCTCCATGCTCCGGTTCCTGGCTAAGGGACATCTGGGACTGGATATG
 GAGCCTCACATGGTGAGGTACGAGGCCAAGGACCGATTCCCTGTAGACCCTGACCTATAC
 GluValLeuSerAspPheLysThrTrpLeuLysAlaLysLeuMetProGlnLeuProGly
 2161 CGAGGTGTTGAGCGACTTTAAGACCTGGCTAAAAGCTAAGCTCATGCCACAGCTGCCTGG
 GCTCCACAACCTCGCTGAAATTCTGGACCGATTTTCGATTTCGAGTACGGTGTGACGGACC
 IleProPheValSerCysGlnArgGlyTyrLysGlyValTrpArgValAspGlyIleMet
 2221 GATCCCCTTTGTGTCTCGCCAGCGCGGGTATAAGGGGGTCTGGCGAGTGGACGGCATCAT
 CTAGGGGAAACACAGGACGGTCGCGCCCATATTCCCCAGACCGCTCACCTGCCGTAGTA
 HisThrArgCysHisCysGlyAlaGluIleThrGlyHisValLysAsnGlyThrMetArg
 2281 GCACACTCGCTGCCACTGTGGAGCTGAGATCACTGGACATGTCAAAAACGGGACGATGAG
 CGTGTGAGCGACGGTCACACCTCGACTCTAGTGACCTGTACAGTTTTTGCCCTGCTACTC
 IleValGlyProArgThrCysArgAsnMetTrpSerGlyThrPheProIleAsnAlaTyr
 2341 GATCGTCGGTCCTAGGACCTGCAGGAACATGTGGAGTGGGACCTTCCCCATTAATGCCTA
 CTAGCAGCCAGGATCCTGGACGTCCTTGACACCTCACCTGGAAGGGTAATTA.CGGAT
 ThrThrGlyProCysThrProLeuProAlaProAsnTyrThrPheAlaLeuTrpArgVal
 2401 CACCACGGGCCCCCTGTACCCCCCTTCTGCGCCGAACACAGTTTCGCGCTATGGAGGGT
 GTGGTGGCCGGGACATGGGGGGAAGGACGCGGCTTGATGTGCAAGCGCGATACCTCCCA
 SerAlaGluGluTyrValGluIleArgGlnValGlyAspPheHisTyrValThrGlyMet
 2461 GTCTGCAGAGGAATATGTGGAGATAAGGCAGGTGGGGGACTTCCACTACGTGACGGGTAT
 CAGACGTCCTTATACACCTCTATTCCGTCCACCCCCCTGAAGGTGATGCAC'TGCCATA
 ThrThrAspAsnLeuLysCysProCysGlnValProSerProGluPhePheThrGlu
 2521 GACTACTGACAATCTCAAATGCCCCGTGCCAGGTCCCA.TCGCCCGAATTTTTCACAGAAT
 CTGATGACTGTTAGAGTTTACGGGCACGGTCCAGGGTAGCGGGCTTAAAAAGTGCTTA

FIG. 14-3

FIG. 15

AlaValAspPheIleProValGluAsnLeuGluThrThrMetArgSerProValPheThr
 1 GGCGGTGGACTTTATCCCTGTGGAGAACCTAGAGACAACCATGAGGTCCCCGGTGTTCAC
 CCGCCACCTGAAATAGGGACACCTCTTGGATCTCTGTTGGTACTCCAGGGGTCACAAGTG

AspAsnSerSerProProValValProGlnSerPheGlnValAlaHisLeuHisAlaPro
 61 GGATAACTCTCTCCACCAGTAGTCCCCAGAGCTTCCAGGTGGCTCACCTCCATGCTCC
 CCTATTGAGGAGAGGTGGTCATCAGGGGTCTCCAGGTCCACCAGTGGAGGTACGAGG

ThrGlySerGlyLysSerThrLysValProAlaAlaTyrAlaAlaGlnGlyTyrLysVal
 121 CACAGGCAGCGGCAAAAGCACCAAGGTCCCGGCTGCATATGCAGCTCAGGGCTATAAGGT
 GTGTCCGTGCGCGTTTTCGTGGTTCAGGGCCGACGTATACGTCGAGTCCCGATATTCGA

LeuValLeuAsnProSerValAlaAlaThrLeuGlyPheGlyAlaTyrMetSerLysAla
 181 GCTAGTACTCAACCCCTCTGTTGCTGCAACACTGGGCTTGGTGCTTACATGTCCAAGGC
 CGATCATGAGTTGGGGAGACAACGACGTTGTGACCCGAAACCACGAATGTACAGGTTCGG

HisGlyIleAspProAsnIleArgThrGlyValArgThrIleThrThrGlySerProIle
 241 TCATGGGATCGATCCTAACATCAGGACCGGGGTGAGAACAAATTACCACTGGCAGCCCCAT
 AGTACCCTAGCTAGGATTGTAGTCCTGGCCCCACTCTTGTTAATGGTGACCGTCGGGGTA

ThrTyrSerThrTyrGlyLysPheLeuAlaAspGlyGlyCysSerGlyGlyAlaTyrAsp
 301 CACGTACTCCACCTACGGCAAGTTCCTTGCCGACGGCGGGTGCTCGGGGGGCGCTTATGA
 GTGCATGAGGTGGATGCEGTTCAAGGAACGGCTGCCGCCACGAGCCCCCGGAATACT

IleIleIleCysAspGluCysHisSerThrAspAlaThrSerIleLeuGlyIleGlyThr
 361 CATAATAATTTGTGACGAGTGCCACTCCACGGATGCCACATCCATCTTGGGCATTTGGCAC
 GTATTATTAAACACTGCTCACGGTGAGGTGCCTACGGTGTAGGTAGAACCCGTAACCGTG

ValLeuAspGlnAlaGluThrAlaGlyAlaArgLeuValValLeuAlaThrAlaThrPro
 421 TGTCTTGACCAAGCAGAGACTGCGGGGGCGAGACTGGTGTGCTCGCCACCGCCACCCC
 ACAGGAACCTGGTTCGTCTCTGACGCCCCGCTCTGACCAACACGAGCGGTGGCGGTGGGG

ProGlySerValThrValProHisProAsnIleGluGluValAlaLeuSerThrThrGly
 481 TCCGGGCTCCGTCACTGTGCCCCATCCCAACATCGAGGAGGTGCTCTGTCCACCACCGG
 AGGCCCCGAGGCAGTGACACGGGGTAGGGTTGTAGCTCCTCCAACGAGACAGGTGGTGGCC

GluIleProPheTyrGlyLysAlaIleProLeuGluValIleLysGlyGlyArgHisLeu
 541 AGAGATCCCTTTTTACGGCAAGGCTATCCCCCTCGAAGTAATCAAGGGGGGAGACATCT
 TCTCTAGGGAAAAATGCCGTTCCGATAGGGGGAGCTTCATTAGTTCCCCCCTCTGTAGA

IlePheCysHisSerLysLysLysCysAspGluLeuAlaAlaLysLeuValAlaLeuGly
 601 CATCTTCTGTCAATCAAAGAAGAAGTGCGACGAACCTCGCCGAAAGCTGGTTCGCATTGGG
 GTAGAAGACAGTAAGTTTCTTCTCACGCTGCTTGAGCGGCGTTTCGACCAGCGTAACCC

IleAsnAlaValAlaTyrTyrArgGlyLeuAspValSerValIleProThrSerGlyAsp
 661 CATCAATGCCGTGGCCTACTACCGCGGTCTTGACGTGTCCGTCACTCCCGACCGCGCGA
 GTAGTTACGGCACCGGATGATGGCGCCAGAACTGCACAGGCAGTAGGGCTGGTCGCGGCT

ValValValValAlaThrAspAlaLeuMetThrGlyTyrThrGlyAspPheAspSerVal
 721 TGTGTCGTCGTGGCAACCGATGCCCTCATGACCGGCTATACGGGCGACTTCGACTCGGT
 ACAACAGCAGCACCGTTGGCTACGGGAGTACTGGCCGATATGGCCGCTGAAGCTGAGCCA

IleAspCysAsnThrCys
 781 GATAGACTGCAATACGTGTG
 CTATCTGACGTTATGCACAC

FIG. 16

ProCysThrCysGlySerSerAspLeuTyrLeuValThrArgHisAlaAspValIlePro
 1 CTCCCTGCACTTGCGGCTCCTCGGACCTTTACCTGGTCAAGAGGCACGCCGATGTCATTG
 GAGGGACGTGAACGCCGAGGAGCCTGGAAATGGACCAGTGCTCCGTGCGGCTACAGTAAG

 ValArgArgArgGlyAspSerArgGlySerLeuLeuSerProArgProIleSerTyrLeu
 61 CCGTGCGCCGCGCGGGGTGATAGCAGGGGCAGCCTGCTGTGCGCCCCGGCCCATTTCTACT
 GGCACGCGGCCGCCCACTATCGTCCCCGTGCGACGACAGCGGGGCCGGGTAAAGGATGA

 LysGlySerSerGlyGlyProLeuLeuCysProAlaGlyHisAlaValGlyIlePheArg
 121 TCAAAGGCTCCTCGGGGGGTCCGCTGTTGTGCCCCGCGGGGCACGCCGTGGGCATATTTA
 ACTTTCCGAGGAGCCCCCAGGCGACAACACGGGGCGCCCCGTGCGGCACCCGTATAAAT

 AlaAlaValCysThrArgGlyValAlaLysAlaValAspPheIleProValGluAsnLeu
 181 GGGCCGCGGTGTGCACCCGTGGAGTGGCTAAGGCGGTGGACTTTATCCCTGTGGAGAACC
 CCGGGCGCCACACGTGGGCACCTCACCATTCCGCCACCTGAAATAGGGACACCTCTTG

 33c-----
 GluThrThrMetArgSerProValPheThrAspAsnSer
 241 TAGAGACAACCATGAGGTCCCCGGTGTTCACGGATAACTCCTC
 ATCTCTGTTGGTACTCCAGGGGCCACAAGTGCCTATTGAGGAG

FIG. 17

GlyTrpArgLeuLeuAlaProIleThrAlaTyrAlaGlnGlnThrArgGlyLeuLeuGly
 1 GGGGTGGAGGTGCTGGCGCCCATCACGGCGTACGCCCAGCAGACAAGGGGCTCCTAGG
 CCCACCTCCAACGACCGCGGTAGTGCCGCATGCGGGTCGTCTGTTCCCCGGAGGATCC

 CysIleIleThrSerLeuThrGlyArgAspLysAsnGlnValGluGlyGluValGlnIle
 61 GTGCATAATCACCAGCCTAAGTGGCCGGGACAAAACCAAGTGGAGGGTGAGGTCCAGAT
 CACGTATTAGTGGTTCGATTGACCGGCCCTGTTTTGGTTACCTCCCACTCCAGGTCTA

 ValSerThrAlaAlaGlnThrPheLeuAlaThrCysIleAsnGlyValCysTrpThrVal
 121 TGTGTCAACTGCTGCCCAAACCTTCTGGCAACGTGCATCAATGGGGTGTGCTGGACTGT
 ACACAGTTGACGACGGGTTTGAAGGACCGTTGCACGTAGTTACCCACACGACCTGACA

 TyrHisGlyAlaGlyThrArgThrIleAlaSerProLysGlyProValIleGlnMetTyr
 181 CTACCACGGGGCCGGAACGAGGACCATCGCGTCACCCAAGGGTCTGTATCCAGATGTA
 GATGGTGCCCCGGCCTTGCTCCTGGTAGCGCAGTGGGTCCAGGACAGTAGGTCTACAT

 ThrAsnValAspGlnAspLeuValGlyTrpProAlaProGlnGlySerArgSerLeuThr
 241 TACCAATGTAGACCAAGACCTTGTGGGCTGGCCCCGCTCCGCAAGGTAGCCGCTCATGAC
 ATGGTTACATCTGGTTCTGGAACACCCGACCGGGCGAGGCGTTCCATCGGCGAGTAAGT

 ProCysThrCysGlySerSerAspLeuTyrLeuValThrArgHis
 301 ACCCTGCACTTGCGGCTCCTCGGACCTTTACCTGGTCAAGAGGCACG
 TGGGACGTGAACGCCGAGGAGCCTGGAAATGGACAGTGCTCCGTGC

FIG. 18

AsnMetTrpSerGlyThrPheProIleAsnAlaTyrThrThrGlyProCysThrProLeu
1 GPACATGTGGAGTGGGACCTTCCCCATTAATGCCTACACCACGGGCCCCGTACCCCCCT
CTTGTAACCTCACCTGGAAGGGTAATTACGGATGTGGTGCCCGGGACATGGGGGA

ProAlaProAsnTyrThrPheAlaLeuTrpArgValSerAlaGluGluTyrValGluIle
61 TCCTGCGCCGAACACGTTTCGCGCTATGGAGGGTGTCTGCAGAGGAATACGTGGAGAT
AGGACGCGGCTTGATGTGCAAGCGCGATACCTCCACAGACGTCTCCTTATGCACCTCTA

ArgGlnValGlyAspPheHisTyrValThrGlyMetThrThrAspAsnLeuLysCysPro
121 AAGGCAGGTGGGGGACTTCCACTACGTGACGGGTATGACTACTGACAATCTTAAATGCCC
TTCCATCCACCCCCCTGAAGGTGATGCACTGCCCATACTGATGACTGTTAGAATTACGGG

CysGlnValProSerProGluPhePheThrGluLeuAspGlyValArgLeuHisArgPhe
181 GTGCCAGGTCCCATCGCCGAATTTTTCACAGAATTGGACGGGGTGCGCCTACATAGGTT
CACGGTCCAGGGTAGCGGGCTTAAAAAGTGCTTAACTGCCCCACGCGGATGTATCCAA

AlaProProCysLysProLeuLeuArgGluGluValSerPheArgValGlyLeuHisGlu
241 TGCGCCCCCTGCAAGCCCTTGCTGCGGGAGGAGGTATCATTCAGAGTAGGACTCCACGA
ACGCGGGGGGACGTTTCGGGAACGACGCCCTCCTCCATAGTAAGTCTCATCTGAGGTGCT

TyrProValGlySerGlnLeuProCysGluProGluProAspValAlaValLeuThrSer
301 ATACCCGGTAGGGTCGCAATTACCTTGCGAGCCCCGAACCGGACGTGGCCGTGTGACGTC
TATGGGCCATCCAGCGTTAATGGAACGCTCGGGCTTGCCCTGCACCGGCACAACCTGCAG

MetLeuThrAspProSerHisIleThrAlaGluAlaAlaGlyArgArgLeuAlaArgGly
361 CATGCTCACTGATCCCTCCCATATAACAGCAGAGGCGGCGGGCGAAGGTTGGCGAGGGG
GTACGAGTGACTAGGGAGGGTATATTGTCGTCTCCGCGGGCCCGCTTCCAACCGCTCCCC

SerProProSerValAlaSerSerSerAlaSerGlnLeuSerAlaProSerLeuLysAla
421 ATCACCCCCCTCTGTGGCCAGCTCCTCGGCTAGCCAGCTATCCGCTCCATCTCTCAAGGC
TAGTGGGGGGAGACACCGGTCGAGGAGCCGATCGCTCGATAGGCGAGGTAGAGAGTTCCG

ThrCysThrAlaAsnHisAspSerProAsp
481 AACTTGCACCGCTAACCATGACTCCCCCTGAT
TTGAACGTGGCGATTGGTACTGAGGGGACTA

FIG. 19

1 SerSerSerAlaSerGlnLeuSerAlaProSerLeuLysAlaThrCysThrAlaAsnHis
 AGCTCCTCGGCTAGCCAGCTATCCGCTCCATCTCTCAAGGCAACTGCAACCGCTAACCAT
 TCGAGGAGCCGATCGGTCGATAGGCGAGGTAGAGAGTTCCGTTGAACGAGGCGATTGGTA

 61 AspSerProAspAlaGluLeuIleGluAlaAsnLeuLeuTrpArgGlnGluMetGlyGly
 GACTCCCCTGATGCTGAGCTCATAGAGGCCAACCTCCTATGGAGGCAGGAGATGGGCGGC
 CTGAGGGGACTACGACTCGAGTATCTCCGGTTGGAGGATACCTCCGTCTCTACCCGCCG
 121 AsnIleThrArgValGluSerGluAsnLysValValIleLeuAspSerPheAspProLeu
 AACATCACCAGGGTTGAGTCAGAAAACAAAGTGGTGATTCTGGACTCCTTCGATCCGCTT
 TTGTAGTGGTCCCAACTCAGTCTTTTGTTCACCACTAAGACCTGAGGAAGCTAGGCGAA
 181 ValAlaGluGluAspGluArgGluIleSerValProAlaGluIleLeuArgLysSerArg
 GTGGCGGAGGAGGACGAGCGGGAGATCTCCGTACCCGCAGAAATCCTGCGGAAGTCTCGG
 CACCGCCTCCTCTGCTCGCCCTCTAGAGGCATGGGCGTCTTTAGGACGCCTTCAGAGCC
 241 ArgPheAlaGlnAlaLeuProValTrpAlaArgProAspTyrAsnProProLeuValGlu
 AGATTGCCCCAGGCCCTGCCCCGTTTGGGCGCGGCCGACTATAACCCCCGCTAGTGGAG
 TCTAAGCGGGTCCGGGACGGGCAAACCCGCGCGGCCTGATATTGGGGGGCGATCACCTC
 301 ThrTrpLysLysProAspTyrGluProProValValHisGlyCysProLeuProProPro
 ACGTGGAAAAAGCCCGACTACGAACCACCTGTGGTCCATGGCTGTCCGCTTCCACCTCCA
 TGCACCTTTTTTCGGGCTGATGCTTGGTGGACACCAGGTACCGACAGGCGAAGGTGGAGGT
 361 LysSerProProValPro
 AAGTCCCCTCCTGTGCCG
 TTCAGGGGAGGACACGGC

FIG. 20

1 ValTrpAlaArgProAspTyrAsnProProLeuValGluThrTrpLysLysProAspTyr
 CGTTTGGGCGCGGCCGACTATAACCCCCCGCTAGTGGAGACGTGGAAGAACCCGACTA
 GCAAACCCGCGCGGCCTGATATTGGGGGGCGATCACCTCTGCACCTTTTTTGGGCTGAT
 61 GluProProValValHisGlyCysProLeuProProProLysSerProProValProPro
 CGAACACCTGTGGTCCATGGCTGCCCGCTTCCACCTCCAAAGTCCCCTCCTGTGCCTCC
 GCTTGGTGGACACCAGGTACCGACGGGCGAAGGTGGAGGTTTCAGGGGAGGACACGGAGG
 121 ProArgLysLysArgThrValValLeuThrGluSerThrLeuSerThrAlaLeuAlaGlu
 GCCTCGGAAGAAGCGGACGGTGGTCCCTCACTGAATCAACCCTATCTACTGCCTTGGCCGA
 CGGAGCCTTCTTCGCCTGCCACCAGGAGTGACTTAGTTGGGATAGATGACGGAACGGCT
 181 LeuAlaThrArgSerPheGlySerSerSerThrSerGlyIleThrGlyAspAsnThrThr
 GCTCGCCACCAGAAGCTTTGGCAGCTCCTCAACTTCCGGCATTACGGGCGACAATACGAC
 CGAGCGGTGGTCTTCGAAACCGTCGAGGAGTTGAAGGCCGTAAAGCCCGCTGTTATGCTG
 241 ThrSerSerGluProAlaProSerGlyCysProProAspSerAspAlaGluSerPhe
 AACATCCTCTGAGCCCGCCCTTCTGGCTGCCCCCGACTCCGACGCTGAGTCCTTTCG
 TTGTAGGAGACTCGGGCGGGGAAGACCGACGGGGGGCTGAGGCTGCGACTCAGGAAACG

FIG. 21

1 AlaSerArgSerPheGlySerSerSerThrSerGlyIleThrGlyAspAsnThrThrThr
 GCCTCCAGAAGCTTTGGCAGCTCCTCAACTTCCGGCATTACGGGCGACAATACGACAACA
 CGGAGGTCTTCGAAACCGTCGAGGAGTTGAAGGCCGTAATGCCCCTGTTATGCTGTGT

 61 SerSerGluProAlaProSerGlyCysProProAspSerAspAlaGluSerTyrSerSer
 TCCTCTGAGCCCGCCCTTCTGGCTGCCCGCCGACTCCGACGCTGAGTCCTATTCCTCC
 AGGAGACTCGGGCGGGGAAGACCGACGGGGGGGCTGAGGCTGCGACTCAGGATAAGGAGG

 121 MetProProLeuGluGlyGluProGlyAspProAspLeuSerAspGlySerTrpSerThr
 ATGCCCCCCTGGAGGGGGAGCCTGGGGATCCGGATCTTAGCGACGGGTCAATGTCACG
 TACGGGGGGGACCTCCCCCTCGGACCCCTAGGCCTAGAATCGCTGCCAGTACCAGTTGC

 181 ValSerSerGluAlaAsnAlaGluAspValValCysCysSerMetSerTyrSerTrpThr
 GTCAGTAGTGAGGCCAACCGGAGGATGTCGTGTGCTGCTCAATGTCTTACTCTTGGACA
 CAGTCATCACTCCGGTTGCGCCTCTACAGCACACGACGAGTTACAGAATGAGAACCTGT

 241 GlyAlaLeuValThrProCysAlaAlaGluGluGlnLysLeuProIleAsnAlaLeuSer
 GGGCGACTCGTCACCCCGTGCGCGCGGAAGAACAGAACTGCCCATCAATGCACTAAGC
 CCGCGTGAGCAGTGGGGCACGCGCGCCTTCTTGTCTTTGACGGGTAGTTACGTGATTGC

 301 AsnSerLeuLeuArgHisHisAsnLeuValTyrSerThrThrSerArgSer
 AACTCGTTGCTACGTCACCACAATTTGGTGTATTCCACCACCTCACGCAGTG
 TTGAGCAACGATGCAGTGTTAAACCACATAAGGTGGTGGAGTGCGTCAC

FIG. 22

1 GlyThrTyrValTyrAsnHisLeuThrProLeuArgAspTrpAlaHisAsnGlyLeuArg
 GGCACCTATGTTTATAACCATCTCACTCCTCTTCGGGACTGGGCGCACAACGGCTTGCGA
 CCGTGGATACAAATATTGGTAGAGTGAGGAGAAGCCCTGACCCGCGTGTGCGCAACGCT

 61 AspLeuAlaValAlaValGluProValValPheSerGlnMetGluThrLysLeuIleThr
 GATCTGGCCGTGGCTGTAGAGCCAGTCGTCTTCTCCCAATGGAGACCAAGCTCATCAG
 CTAGACCGGCACCGACATCTCGGTACAGAGAAGAGGGTTTACCTCTGGTTCGAGTAGTGC

 121 TrpGlyAlaAspThrAlaAlaCysGlyAspIleIleAsnGlyLeuProValSerAlaArg
 TGGGGGGCAGATACCGCCGCGTGCGGTGACATCATCAACGGCTTGCCCTGTTTCCGCCCCG
 ACCCCCCGTCTATGGCGGCGCACGCCACTGTAGTAGTTGCCGAACGGACAAAGGCGGGCG

 181 ArgGlyArgGluIleLeuLeuGlyProAlaAspGlyMetValSerLysGlyTrpArgLeu
 AGGGGCGGGAGATACTGCTCGGGCCAGCCGATGGAATGGTCTCCAAGGGTTGGAGGTTG
 TCCCCGCCCTCTATGACGAGCCCGGTGCGCTACCTTACCAGAGGTTCCTAACCTCCAAC

 241 LeuAlaProIleThrAlaTyrAlaGlnGlnThrArgGlyLeuLeuGlyCysIleIleThr
 CTGGCGCCCATCACGGCGTACGCCAGCAGACAAGGGGCTCTAGGGTGCAATACACC
 GACCGCGGGTAGTGCCGCATGCGGGTCGTCTGTTCCCGGAGGATCCCACGTATTAGTGG

 301 SerLeuThrGlyArgAspLysAsnGlnValGluGlyGluValGlnIleValSerThrAla
 AGCCTAATGGCCGGGACAAAAACCAAGTGGAGGGTGAGGTCCAGATTGTGTCAACTGCT
 TCGGATIGACCGGCCCTGTTTTTGGTTACCTCCCACTCCAGGTCTAACACAGTTGACGA

 361 AlaGlnThrPheLeuAlaThrCysIleAsnGlyValCysTrp
 GCCCCAACCTTCCTGGCAACGTGCATCAATGGGGTGTGCTGG
 CGGGTTTGAAGGACCGTTGCACGTAGTTACCCACACGACC

FIG. 23

1 GlyGlyValValLeuValGlyLeuMetAlaLeuThrLeuSerProTyrTyrLysArgTyr
GGCGGTGTTGTTCTCGTCGGGTTGATGGCGCTGACTCTGTCACCATATTACAAGCGCTAT
CCGCCACAACAAGAGCAGCCCACTACCGCGACTGAGACAGTGGTATAATGTTTCGCGATA

61 IleSerTrpCysLeuTrpTrpLeuGlnTyrPheLeuThrArgValGluAlaGlnLeuHis
ATCAGCTGGTGCTTGTGGTGGCTTCAGTATTTTCTGACCAGAGTGGAAGCGCAACTGCAC
TAGTCGACCACGAACACCACCGAAGTCATAAAAGACTGGTCTCACCTTCGCGTTGACGTG

121 ValTrpIleProProLeuAsnValArgGlyGlyArgAspAlaValIleLeuLeuMetCys
GTGTGGATTCCCCCCTCAACGTCCGAGGGGGGCGGACGCCGTACCTTACTCATGTGT
CACACCTAAGGGGGGAGTTGCAGGCTCCCCCGCGCTGCGGCAGTAGAATGAGTACACA

181 AlaValHisProThrLeuValPheAspIleThrLysLeuLeuLeuAlaValPheGlyPro
GCTGTACACCCGACTCTGGTATTTGACATCACCAAATTGCTGCTGGCCGTCTTCGGACCC
CGACATGTGGGCTGAGACCATAAACTGTAGTGGTTTAACGACGACCGGCAGAAGCCTGGG

241 LeuTrpIleLeuGlnAlaSerLeuLeuLysValProTyrPheValArgValGlnGlyLeu
CTTTGGATTCTTCAAGCCAGTTTGCTTAAAGTACCCTACTTTGTGCGCGTCCAAGGCCTT
GAAACCTAAGAAGTTCGGTCAAACGAATTCATGGGATGAAACACGCGCAGGTTCGGAA

301 LeuArgPheCysAlaLeuAlaArgLysMetIleGlyGlyHisTyrValGlnMetValIle
CTCCGGTTCTGCGCGTTAGCGCGGAAGATGATCGGAGGCCATTACGTGCAAATGGTCATC
GAGGCCAAGACGCGCAATCGCGCCTTCTACTAGCCTCCGTAATGCACGTTTACCAGTAG

361 IleLysLeuGlyAlaLeuThrGlyThrTyrValTyrAsnHisLeuThrProLeuArgAsp
ATTAAGTTAGGGGCGCTTACTGGCACCTATGTTTATAACCATCTCACTCCTCTTCGGGAC
TAATTCAATCCCCGCGAATGACCGTGGATACAAATATTGGTAGAGTGAGGAGAAGCCCTG

421 TrpAlaHisAsnGlyLeuArgAspLeuAlaValAlaValGluProValValPheSerGln
TGGGCGCACACGGCTTGCAGATCTGGCCGTGGCTGTAGAGCCAGTCGTCTTCTCCCAA
ACCCGCGTGTTGCCGAACGCTCTAGACCGGCACCGACATCTCGGTCAGCAGAAGAGGGTT

481 MetGluThrLysLeuIleThrTrpGly
ATGGAGACCAAGCTCATCACGTGGGGGGC
TACCTCTGGTTTCGAGTAGTGCACCCCCG

FIG. 24

GluTyrValValLeuLeuPheLeuLeuLeuAlaAspAlaArgValCysSerCysLeuTrp
 1 GGGAGTACGTCGTTCTCCTGTTCTTCTGCTTGCAGACGCGCGCTCTGCTCCTGCTTGT
 CCTCATGCAGCAAGAGGACAAGGAAGACGAACGCTGCGCGCGCAGACGAGGACGAACA

 MetMetLeuLeuIleSerGlnAlaGluAlaAlaLeuGluAsnLeuValIleLeuAsnAla
 61 GGATGATGCTACTCATATCCCAAGCGGAGGCGGCTTTGGAGAACCTCGTAATACCTAATG
 CCTACTACGATGAGTATAGGGTTCGCCTCCGCGAAACCTCTTGGAGCATTATGAATTAC

 AlaSerLeuAlaGlyThrHisGlyLeuValSerPheLeuValPhePheCysPheAlaTrp
 121 CAGCATCCCTGGCCGGGACGCACGGTCTTGTATCCTTCCTCGTGTCTTCTGCTTTGCAT
 GTCGTAGGGACCGGCCCTGCGTGCCAGAACATAGGAAGGAGCACAAGAAGACGAAACGTA

 TyrLeuLysGlyLysTrpValProGlyAlaValTyrThrPheTyrGlyMetTrpProLeu
 181 GGTATTTGAAGGGTAAGTGGGTGCGCGAGCGGTCTACACCTTCTACGGGATGTGGCCTC
 CCATAAACTTCCCATTACCCACGGGCCTCGCCAGATGTGGAAGATGCCCTACACCGGAG

 LeuLeuLeuLeuLeuAlaLeuProGlnArgAlaTyrAlaLeuAspThrGluValAlaAla
 241 TCCTCCTGCTCCTGTTGGCGTTGCCCCAGCGGGCGTACGCGCTGGACACGGAGGTGGCCG
 AGGAGGACGAGGACAACCGCAACGGGGTCGCCGCGATGCGCGACCTGTGCCTCCACCGGC

 SerCysGlyGlyValValLeuValGlyLeuMetAlaLeuThrLeuSerProTyrTyrLys
 301 CGTCGTGTGGCGGTGTTGTTCTCGTCGGGTGATGGCGCTGACTCTGTCAACCATATTACA
 GCAGCACACCGCCACAACAAGAGCAGCCCAACTACCGCGACTGAGACAGTGGTATAATGT

 ArgTyrIleSerTrpCysLeuTrpTrpLeuGln
 361 AGCGCTATATCAGCTGGTGCTTGTGGTGGCTTCAGAA
 TCGCGATATAGTCGACCACGAACACCACCGAAGTCTT

FIG. 25

ProAlaProSerGlyCysProProAspSerAspAlaGluSerTyrSerSerMetProPro
 1 CCAGCCCCCTCTGGCTGCCCCCGGACTCCGACGCTGAGTCCTATTCTCTCCATGCCCCCC
 GGTGCGGGAAGACCGACGGGGGGGCTGAGGCTGCGACTCAGGATAAGGAGGTACGGGGGG

 LeuGluGlyGluProGlyAspProAspLeuSerAspGlySerTrpSerThrValSerSer
 61 CTGGAGGGGGAGCCTGGGGATCCGGATCTTAGCGACGGGTGATGGTCAACAGTCAGTAGT
 GACCTCCCCCTCGGACCCCCTAGGCCTAGAATCGCTGCCCAGTACCAGTTGTCTAGTCATCA

 GluAlaAsnAlaGluAspValValCysCysSerMetSerTyrSerTrpThrGlyAlaLeu
 121 GAGGCCACGCGGAGGATGTCGTGTGCTGCTCAATGTCCTACTCTTGGACAGGCGCACTC
 CTCCGGTTGCGCCTCTACAGCACACGACGAGTTACAGGATGAGAACCCTGTCCGCGTGAG

 ValThrProCysAlaAlaGluGluGlnLysLeuProIleAsnAlaLeuSerAsnSerLeu
 181 GTCACCCCGTGCGCCGCGGAAGAAGCAAACTGCCCATCAATGCACTGAGCAACTCGTTG
 CAGTGGGGCAGCGGCGCCTTCTTGTCTTTGACGGGTAGTTACGTGACTCGTTGAGCAAC

 LeuArgHisHisAsnLeuValTyrSerThrThrSerArgSerAlaCysGlnArgGlnLys
 241 CTACGTCACCACAATTTGGTGTATTCCACACCTCACGCAGTGCTTGCCAAAGGCAGAAG
 GATGCAGTGGTGTTAAACCACATAAGGTGGTGGAGTGCGTCACGAACGGTTTCCGTCTTC

 LysValThrPheAspArgLeuGlnValLeuAspSerHisTyrGlnAspValLeuLysGlu
 301 AAAGTCACATTTGACAGACTGCAAGTTCTGGACAGCCATTACCAGGACGTACTCAAGGAG
 TTTCAGTGTAACCTGTCTGACGTTCAAGACCTGTCGTAATGGTCCTGCATGAGTTCTC

 ValLysAlaAlaAlaSerLysValLysAlaAsnPhe
 361 GTTAAAGCAGCGGCGTCAAAGTGAAGGCTAACTTC
 CAATTCGTGCGCCGAGTTTTCACTTCCGATTGAAG

FIG. 26-1

1 GluTyrValValLeuLeuPheLeuLeuLeuAlaAspAlaArgValCysSerCysLeuTrp
 GGGAGTACGTCGTTCTCTGTTCTTCTGCTTGCAGACGCGCGCTCTGCTCCTGCTTGT
 CCTCATGCAGCAAGAGGACAAGGAAGACGAACGTCTGCGCGCGCAGACGAGGACGAACA

 61 MetMetLeuLeuIleSerGlnAlaGluAlaAlaLeuGluAsnLeuValIleLeuAsnAla
 GGATGATGCTACTCATATCCCAAGCGGAGGCGGCTTTGGAGAACCTCGTAATACTTAATG
 CCTACTACGATGAGTATAGGGTTGCGCTCCGCCGAAACCTCTTGGAGCATTATGAATTAC

 121 AlaSerLeuAlaGlyThrHisGlyLeuValSerPheLeuValPhePheCysPheAlaTrp
 CAGCATCCCTGGCCGGGACGCACGGTCTTGTATCCTTCCTCGTGTTCTTCTGCTTTGCAT
 GTCGTAGGGACCGCCCTGCGTGCCAGAACATAGGAAGGAGCACAAGAAGACGAAACGTA

 181 TyrLeuLysGlyLysTrpValProGlyAlaValTyrThrPheTyrGlyMetTrpProLeu
 GGTATTTGAAGGGTAAGTGGGTGCCCCGAGCGGTCTACACCTTCTACGGGATGTGGCCTC
 CCATAAACTTCCCATTCACCCACGGGCCTCGCCAGATGTGGAAGATGCCCTACACCGGAG

 241 LeuLeuLeuLeuLeuAlaLeuProGlnArgAlaTyrAlaLeuAspThrGluValAlaAla
 TCCTCCTGCTCCTGTTGGCGTTGCCCCAGCGGGCGTACGCGCTGGACACGGAGGTGGCCG
 AGGAGGACGAGGACAACCGCAACGGGGTCGCCCCGATGCGCGACCTGTGCCTCCACCGGC

 301 SerCysGlyGlyValValLeuValGlyLeuMetAlaLeuThrLeuSerProTyrTyrLys
 CGTCGTGTGGCGGTGTGTTCTCGTCGGGTGATGGCGCTGACTCTGTACCATATTACA
 GCAGCACACCGCCACAACAAGAGCAGCCCACTACCGCGACTGAGACAGTGGTATAATGT

 361 ArgTyrIleSerTrpCysLeuTrpTrpLeuGlnTyrPheLeuThrArgValGluAlaGln
 AGCGCTATATCAGCTGGTGTCTTGGTGGCTTCAGTATTTCTGACCAGAGTGGAAAGCGC
 TCGGATATAGTCGACCACGAACACCACCGAAGTCATAAAAGACTGGTCTACCTTCGCG

 421 LeuHisValTrpIleProProLeuAsnValArgGlyGlyArgAspAlaValIleLeuLeu
 AACTGCACGTGTGGATTCCCCCTCAACGTCCGAGGGGGCGCGACGCCGTACCTTAC
 TTGACGTGCACACCTAAGGGGGGAGTTGCAGGCTCCCCCGCCTGCGGCAGTAGAATG

 481 MetCysAlaValHisProThrLeuValPheAspIleThrLysLeuLeuLeuAlaValPhe
 TCATGTGTGCTGTACACCGACTCTGGTATTTGACATCACCAATTGCTGCTGGCCGTCT
 AGTACACACGACATGTGGGCTGAGACCATAAACTGTAGTGGTTTAACGACGACCGGCAGA

 541 GlyProLeuTrpIleLeuGlnAlaSerLeuLeuLysValProTyrPheValArgValGln
 TCGGACCCCTTTGGATTCTTCAAGCCAGTTTGCTTAAAGTACCCTACTTTGTGCGCGTCC
 AGCCTGGGGAAACCTAAGAAGTTCGGTCAAACGAATTTTCATGGGATGAAACACGCGCAGG

 601 GlyLeuLeuArgPheCysAlaLeuAlaArgLysMetIleGlyGlyHisTyrValGlnMet
 AAGGCCTTCTCCGTTCTGCGCTTAGCGCGAAGATGATCGGAGGCCATTACGTGCAAA
 TTCCGGAAGAGGCCAAGACGCGCAATCGCGCTTCTACTAGCCTCCGGTAATGCACGTTT

 661 ValIleIleLysLeuGlyAlaLeuThrGlyThrTyrValTyrAsnHisLeuThrProLeu
 TGGTCATCATTAAGTTAGGGGCGCTTACTGGCACCTATGTTTATAACCATCTCACTCCTC
 ACCAGTAGTAATTCAATCCCCGGAATGACCGTGGATACAAATATTGGTAGAGTGAGGAG

 721 ArgAspTrpAlaHisAsnGlyLeuArgAspLeuAlaValAlaValGluProValValPhe
 TTCGGGACTGGGCGCACACGGCTTGCAGATCTGGCCGTGGCTGTAGAGCCAGTCGTCT
 AAGCCCTGACCCGCGTGTGCGCAACGCTCTAGACCGGCACCGACATCTCGGTCAGCAGA

 781 SerGlnMetGluThrLysLeuIleThrTrpGlyAlaAspThrAlaAlaCysGlyAspIle
 TCTCCCAAATGGAGACCAAGCTCATCAGTGGGGGCGAGATACCGCCGCGTGCGTGACA
 AGAGGGTTTACCTCTGGTTCGAGTAGTGCACCCCCGTCTATGGCGGCGCACGCCACTGT

 841 IleAsnGlyLeuProValSerAlaArgArgGlyArgGluIleLeuLeuGlyProAlaAsp
 TCATCAACGGCTTGCTGTTTCCGCCCCGAGGGGCGGGAGATACTGCTCGGGCCAGCCG
 AGTAGTTGCCGAACGACAAAGGCGGGCGTCCCCGCCCTCTATGACGAGCCCGTCCGCG

 GlyMetValSerLysGlyTrpArgLeuLeuAlaProIleThrAlaTyrAlaGlnGlnThr

901 ATGGAATGGTCTCCAAGGGGTGGAGGTTGCTGGCGCCCATCACGGCGTACGCCCAGCAGA
 TACCTTACCAGAGGTTCCCCACCTCCAACGACCGCGGGTAGTGCCGCATGCGGGTCGTCT
 ArgGlyLeuLeuGlyCysIleIleThrSerLeuThrGlyArgAspLysAsnGlnValGlu
 961 CAAGGGGCTCCTAGGGTGCATAATCACCAGCCTAACTGGCCGGGACAAAACCAAGTGG
 GTTCCCCGAGGATCCCACGTATTAGTGGTCGGATTGACCGGCCCTGTTTTGGTTTACC
 GlyGluValGlnIleValSerThrAlaAlaGlnThrPheLeuAlaThrCysIleAsnGly
 1021 AGGGTGAGGTCCAGATTGTGTCAACTGCTGCCCAAACCTTCTGGCAACGTGCATCAATG
 TCCCACTCCAGGTCTAACACAGTTGACGACGGGTTTGAAGGACCGTTGCACGTAGTTAC
 ValCysTrpThrValTyrHisGlyAlaGlyThrArgThrIleAlaSerProLysGlyPro
 1081 GGGTGTGCTGGACTGTCTACCACGGGGCCGAACGAGGACCATCGCGTCACCCAAGGGTC
 CCCACACGACCTGACAGATGGTGCCCCGGCCTTGCTCCTGGTAGCGCAGTGGGTTCACG
 ValIleGlnMetTyrThrAsnValAspGlnAspLeuValGlyTrpProAlaProGlnGly
 1141 CTGTCATCCAGATGTATACCAATGTAGACCAAGACCTTGTTGGGCTGGCCCCGTCCGCAAG
 GACAGTAGGTCTACATATGGTTACATCTGGTTCTGGAACACCCGACCGGGCGAGGCGTTC
 SerArgSerLeuThrProCysThrCysGlySerSerAspLeuTyrLeuValThrArgHis
 1201 GTAGCCGCTCATGACACCTGCACCTTGCGGCTCCTCGGACCTTTACCTGGTCACGAGGC
 CATCGGCGAGTAACGTGGGACGTGAACGCCGAGGAGCCTGGAAATGGACCAGTGCTCCG
 AlaAspValIleProValArgArgArgGlyAspSerArgGlySerLeuLeuSerProArg
 1261 ACGCCGATGTTCATTCCTGCGCCGGCGGGGTGATAGCAGGGGCAGCCTGCTGTCGCCCC
 TCGCGCTACAGTAAGGGCACGCGGCCGCCCACTATCGTCCCCGTCGGACGACAGCGGGG
 ProIleSerTyrLeuLysGlySerSerGlyGlyProLeuLeuCysProAlaGlyHisAla
 1321 GGCCCATTTCTACTTGAAAGGCTCCTCGGGGGGTCCGCTGTGTGCCCCGCGGGGCACG
 CCGGGTAAAGGATGAACCTTCCGAGGAACCCCCAGGCGACAACACGGGGCGCCCCGTGC
 ValGlyIlePheArgAlaAlaValCysThrArgGlyValAlaLysAlaValAspPheIle
 1381 CCGTGGGCATATTTAGGGCCGCGGTGTGCACCCGTGGAGTGGCTAAGGCGGTGGACTTTA
 GGCACCCGTATAAATCCCGGCGCCACACGTGGGCACCTACCGATTCCGCCACCTGAAAT
 ProValGluAsnLeuGluThrThrMetArgSerProValPheThrAspAsnSerSerPro
 1441 TCCCTGTGGAGAACCTAGAGACAACCATGAGGTCCCCGGTGTTCACGGATAACTCCTCTC
 AGGGACACCTCTTGGATCTCTGTTGGTACTCCAGGGGCCACAAGTGCTATTGAGGAGAG
 ProValValProGlnSerPheGlnValAlaHisLeuHisAlaProThrGlySerGlyLys
 1501 CACCAGTAGTGCCCAAGAGCTTCCAGGTGGCTCACCTCCATGCTCCACAGGCAGCGGCA
 GTGGTCATCACGGGGTCTCGAAGGTCCACCGAGTGGAGGTACGAGGGTGTCCTGCGCGT
 SerThrLysValProAlaAlaTyrAlaAlaGlnGlyTyrLysValLeuValLeuAsnPro
 1561 AAAGCACCAAGGTCCCGGCTGCATATGCAGCTCAGGGCTATAAGGTGCTAGTACTCAACC
 TTTCTGTTCCAGGGCCGACGTATACGTGAGTCCCGATATTCCACGATCATGAGTTGG
 SerValAlaAlaThrLeuGlyPheGlyAlaTyrMetSerLysAlaHisGlyIleAspPro
 1621 CCTCTGTGCTGCAACACTGGGCTTTGGTGCTTACATGTCCAAGGCTCATGGGATCGATC
 GGAGACAACGACGTTGTGACCCGAAACCACGAATGTACAGGTTCGAGTACCCTAGCTAG
 AsnIleArgThrGlyValArgThrIleThrThrGlySerProIleThrTyrSerThrTyr
 1681 CTAACATCAGGACCGGGTGAGAACAATTACCACTGGCAGCCCCATCACGTACTCCACCT
 GATTGTAGTCTTGGCCCCACTCTTGTTAATGGTGACCGTGGGGTAGTGATGAGGTGGA
 GlyLysPheLeuAlaAspGlyGlyCysSerGlyGlyAlaTyrAspIleIleIleCysAsp
 1741 ACGGCAAGTTCTTGCCGACGGCGGGTGCTCGGGGGCGCTTATGACATAATAATTTGTG
 TGCCGTTCAAGGAACGGCTGCCGCCACGAGCCCCCGGAATACTGTATTATTAAACAC
 GluCysHisSerThrAspAlaThrSerIleLeuGlyIleGlyThrValLeuAspGlnAla
 1801 ACGAGTGCCACTCCACGGATGCCACATCCATCTTGGGCATCGCACTGTCTTGACCAAG
 TGCTCACGGTGAGGTGCCTACGGTGTAGGTAGAACCCGTAGCCGTGACAGGAACGTGTTT
 GluThrAlaGlyAlaArgLeuValValLeuAlaThrAlaThrProProGlySerValThr
 1861 CAGAGACTGCGGGGGCGAGACTGGTGTGCTCGCCACCGCCACCCCTCCGGGCTCCGTCA
 GTCTTGACGCCCCGCTCTGACCAACACGAGCGGTGGCGGTGGGGAGGCCCCGAGGCAGT

FIG. 26-2

1921 ValProHisProAsnIleGluGluValAlaLeuSerThrThrGlyGluIleProPheTyr
 CTGTGCCCCATCCCAACATCGAGGAGGTTGCTCTGTCCACCACCGGAGAGATCCCTTTTT
 GACACGGGGTAGGGTTGTAGCTCCTCCAACGAGACAGGTGGTGGCCTCTCTAGGGAAA AA

1981 GlyLysAlaIleProLeuGluValIleLysGlyGlyArgHisLeuIlePheCysHisSer
 ACGGCAAGGCTATCCCCCTCGAAGTAATCAAGGGGGGAGACATCTCATCTTCTGTCAATT
 TGCCGTTCCGATAGGGGAGCTTCATTAGTTCCCCCCTCTGTAGAGTAGAAGACAGTAA

2041 LysLysLysCysAspGluLeuAlaAlaLysLeuValAlaLeuGlyIleAsnAlaValAla
 CAAAGAAGAAGTGCAGCAACTCGCCGCAAAAGCTGGTGCATTGGGCATCAATGCCGTGG
 GTTTCCTTCTCACGCTGCTTGAGCGGGCTTTCGACCAGCGTAACCCGTAGTTACGGCACC

2101 TyrTyrArgGlyLeuAspValSerValIleProThrSerGlyAspValValValValAla
 CCTACTACCGCGTCTTGACGTGTCCGTCAATCCCGACCAGCGCGATGTTGTCGTCTGTGG
 GGATGATGGCGCCAGAACTGCACAGGCAGTAGGGCTGGTTCGCCGTACAACAGCAGCACC

2161 ThrAspAlaLeuMetThrGlyTyrThrGlyAspPheAspSerValIleAspCysAsnThr
 CAACCGATGCCCTCATGACCGGCTATACCGGCGACTTCGACTCGGTGATAGACTGCAATA
 GTTGGCTACGGGAGTACTGGCCGATATGGCCGCTGAAGCTGAGCCACTATCTGACGTTAT

2221 CysValThrGlnThrValAspPheSerLeuAspProThrPheThrIleGluThrIleThr
 CGTGTGTACCCAGACAGTCGATTTTCAGCCTTGACCCCTACCTTCACCATGAGACAATCA
 GCACACAGTGGGTCTGTGAGCTAAAGTCGGAAGTGGGATGGAAGTGGTAACCTCTGTAGT

2281 LeuProGlnAspAlaValSerArgThrGlnArgArgGlyArgThrGlyArgGlyLysPro
 CGTCCCCCAGGATGCTGTCTCCCGCACTCAACGTCCGGGGCAGGACTGGCAGGGGGAAGC
 GCGAGGGGGTCTTACGACAGAGGGCGTGAGTTGCAGCCCCGTCTGACCGTCCCCCTTCG

2341 GlyIleTyrArgPheValAlaProGlyGluArgProSerGlyMetPheAspSerSerVal
 CAGGCATCTACAGATTTGTGGCACCAGGGGAGCGCCCCCTCCGGCATGTTTCGACTCGTCCG
 GTCCGTAGATGTCTAAACACCGTGGCCCCCTCGCGGGAGGCGGTACAAGCTGAGCAGGC

2401 LeuCysGluCysTyrAspAlaGlyCysAlaTrpTyrGluLeuThrProAlaGluThrThr
 TCCTCTGTGAGTGCTATGACGCAGGCTGTGCTTGGTATGAGCTCACGCCCGCCGAGACTA
 AGGAGACACTCACGATACTGCGTCCGACACGAACCATACTCGAGTGCAGGGCGGCTCTGAT

2461 ValArgLeuArgAlaTyrMetAsnThrProGlyLeuProValCysGlnAspHisLeuGlu
 CAGTTAGGCTACGAGCGTACATGAACACCCCGGGGCTTCCCGTGTGCCAGGACCATCTTG
 GTCAATCCGATGCTCGCATGTACTTGTGGGGCCCCGAAGGGCACACGGTCTGTGTAGAAC

2521 PheTrpGluGlyValPheThrGlyLeuThrHisIleAspAlaHisPheLeuSerGlnThr
 AATTTTGGGAGGGCGTCTTTACAGGCCCTCACTCATATAGATGCCCACTTTCTATCCAGA
 TTAACCCCTCCCGCAGAAATGTCCGGAGTGAGTATATCTACGGGTGAAAGATAGGGTCT

2581 LysGlnSerGlyGluAsnLeuProTyrLeuValAlaTyrGlnAlaThrValCysAlaArg
 CAAAGCAGAGTGGGGAGAACCCTTCCTTACCTGGTAGCGTACCAAGCCACCGTGTGCGCTA
 GTTTCGTCTACCCCTCTTGAAGGAATGGACCATCGCATGGTTCCGGTGGCACACGCGAT

2641 AlaGlnAlaProProProSerTrpAspGlnMetTrpLysCysLeuIleArgLeuLysPro
 GGGCTCAAGCCCTCCCCCATCGTGGGACCAGATGTGGAAGTGTGTTGATTCGCCTCAAGC
 CCCGAGTTCGGGAGGGGGTAGCACCTGGTCTACACCTTCACAACTAAGCGGAGTTCCG

2701 ThrLeuHisGlyProThrProLeuLeuTyrArgLeuGlyAlaValGlnAsnGluIleThr
 CCACCCTCCATGGGCCAACACCCCTGCTATACAGACTGGGCGCTGTTTCAAGTGAATCA
 GGTGGGAGGTACCCGGTGTGGGGACGATATGTCTGACCCGCGACAAGTCTTACTTTAGT

2761 LeuThrHisProValThrLysTyrIleMetThrCysMetSerAlaAspLeuGluValVal
 CCCTGACGCACCCAGTCACCAAATACATCATGACATGCATGTCGGCCGACCTGGAGGTG
 GGGACTGCGTGGGTCACTGGTTTATGTAGTACTGTACGTACAGCCGGCTGGACCTCCAGC

2821 ThrSerThrTrpValLeuValGlyGlyValLeuAlaAlaLeuAlaAlaTyrCysLeuSer
 TCACGAGCACCTGGGTGCTCGTTGGCGGCGTCTGGCTGCTTTGGCCGCGTATTGCTGT
 AGTGCTCGTGGACCCACGAGCAACCGCCGAGGACCGACGAAACCGGCGCATAACGGACA

ThrGlyCysValValIleValGlyArgValValLeuSerGlyLysProAlaIleIlePro

FIG. 26-3

- 2881 CAACAGGCTGCGTGGTCATAGTGGGCAGGGTCGTCTTGTCCGGGAAGCCGGCAATCATAC
GTTGTCCGACGCACCAGTATCACCCGTCCAGCAGAACAGGCCCTTCGGCCGTTAGTATG
- 2941 AspArgGluValLeuTyrArgGluPheAspGluMetGluGluCysSerGlnHisLeuPro
CTGACAGGGAAGTCCTCTACCGAGAGTTCGATGAGATGGAAGAGTGCTCTCAGCACTTAC
GACTGTCCCTCAGGAGATGGCTCTCAAGCTACTCTACCTTCTCAGGAGAGTCGTGAATG
- 3001 TyrIleGluGlnGlyMetMetLeuAlaGluGlnPheLysGlnLysAlaLeuGlyLeuLeu
CGTACATCGAGCAAGGGATGATGCTCGCCGAGCAGTTCAAGCAGAAGGCCCTCGGCCTCC
GCATGTAGCTCGTTCCTACTACGAGCGGCTCGTCAASTTCGTCTTCCGGGAGCCGGAGG
- 3061 GlnThrAlaSerArgGlnAlaGluValIleAlaProAlaValGlnThrAsnTrpGlnLys
TGCAGACCGCGTCCCGTCAGGCAGAGGTTATCGCCCCGTGCTGTCCAGACCAACTGGCAAA
ACGTCTGGCGCAGGGCAGTCCGTCTCCAATAGCGGGGACGACAGGTCTGGTTGACCGTTT
- 3121 LeuGluThrPheTrpAlaLysHisMetTrpAsnPheIleSerGlyIleGlnTyrLeuAla
AACTCGAGACCTTCTGGGCGAAGCATATGTGGAAGTTCATCAGTGGGATACAATACTTGG
TTGAGCTCTGGAAGACCCGCTTCGTATACACCTGAAGTAGTCACCTATGTTATGAACC
- 3181 GlyLeuSerThrLeuProGlyAsnProAlaIleAlaSerLeuMetAlaPheThrAlaAla
CGGGCTTGTCACGCTGCCTGGTAACCCCGCCATTGCTTCATTGATGGCTTTTACAGCTG
GCCCCAACAGTTGCGACGGACCATTTGGGGCGGTAAACGAAGTAACTACCGAAAATGTCGAC
- 3241 ValThrSerProLeuThrThrSerGlnThrLeuLeuPheAsnIleLeuGlyGlyTrpVal
CTGTCACCGACCCACTAACCACTAGCCAAACCCCTCCTTCAACATATTGGGGGGGTGGG
GACAGTGGTTCGGGTGATTGGTGATCGGTTTGGGAGGAGAAGTTGTATAACCCCCCACCC
- 3301 AlaAlaGlnLeuAlaAlaProGlyAlaAlaThrAlaPheValGlyAlaGlyLeuAlaGly
TGGCTGCCCAGCTCGCCGCCCCCGGTGCCGCTACTGCCCTTGTGGGCGCTGGCTTAGCTG
ACCGACGGGTGAGCGGGCGGGGCCACGGCGATGACGGAACACCCGCGACCGAATCGAC
- 3361 AlaAlaIleGlySerValGlyLeuGlyLysValLeuIleAspIleLeuAlaGlyTyrGly
GCGCCGCCATCGGCAGTGTGGACTGGGGAAGGTCCTCATAGACATCCTTGCAGGGTATG
CGCGCGGTAGCCGTACAACCTGACCCCTTCCAGGAGTATCTGTAGGAACGTCCCATAC
- 3421 AlaGlyValAlaGlyAlaLeuValAlaPheLysIleMetSerGlyGluValProSerThr
GCGCGGGCGTGGCGGGAGCTCTGTGGCATTCAAGATCATGAGCGGTGAGGTCCCCCTCA
CGCGCCCGCACCGCCCTCGAGAACACCGTAAGTTC'TAGTACTCGCCACTCCAGGGGAGGT
- 3481 GluAspLeuValAsnLeuLeuProAlaIleLeuSerProGlyAlaLeuValValGlyVal
CGGAGGACCTGGTCAATCTACTGCCCCCATCCTCTCGCCCGGAGCCCTCGTAGTCGGCG
GCCTCTGGACAGTTAGATGACGGGCGGTAGGAGAGCGGGCCTCGGGAGCATCAGCCGC
- 3541 ValCysAlaAlaIleLeuArgArgHisValGlyProGlyGluGlyAlaValGlnTrpMet
TGGTCTGTGCAGCAATACTGCGCCGGCACGTTGGCCCGGGCAGGGGGCAGTGCAGTGA
ACCAGACACGTCGTATGACGCGGCCGTGCAACCGGGCCCGCTCCCCCGTCACGTACCT
- 3601 AsnArgLeuIleAlaPheAlaSerArgGlyAsnHisValSerProThrHisTyrValPro
TGAACCGGCTGATAGCCTTCGCCCTCCCGGGGAACCATGTTTCCCCCACGCACTACGTGC
ACTTGGCCGACTATCGGAAGCGGAGGGCCCCCTTGGTACAAAGGGGGTGCGTGATGCACG
- 3661 GluSerAspAlaAlaAlaArgValThrAlaIleLeuSerSerLeuThrValThrGlnLeu
CGGAGAGCGATGCAGCTGCCCGCGTCACTGCCATACTCAGCAGCCTCACTGTAACCCAGC
GCCTCTCGCTACGTGACGGGCGCAGTGACGGTATGAGTCGTGAGTGACATTGGGTGC
- 3721 LeuArgArgLeuHisGlnTrpIleSerSerGluCysThrThrProCysSerGlySerTrp
TCCTGAGGCGACTGCACCAAGTGGATAAGCTCGGAGTGTACCACTCCATGCTCCGGTTCT
AGGACTCCGCTGACGTGGTCACCTATTCGAGCCTCACATGGTGAGGTACGAGGCCAAGGA
- 3781 LeuArgAspIleTrpAspTrpIleCysGluValLeuSerAspPheLysThrTrpLeuLys
GGCTAAGGGACATCTGGGACTGGATATGCGAGGTGTTGAGCGACTTAAAGACCTGGCTAA
CCGATTCCCTGTAGACCCTGACCTATACGCTCCACAAC'TCGCTGAAAT'TCTGGACCGATT
- 3841 AlaLysLeuMetProGlnLeuProGlyIleProPheValSerCysGlnArgGlyTyrLys
AAGCTAAGCTCATGCCACAGCTGCCTGGGATCCCTTTGTGTCTGCCAGCGGGGTATA
TTCGATTGAGTACGGTGTGACGGACCCTAGGGGAAACACAGGACGGTCGCGCCCATAT

FIG. 26-4

3901 GlyValTrpArgValAspGlyIleMetHisThrArgCysHisCysGlyAlaGluIleThr
 AGGGGGTCTGGCGAGTGGACGGCATCATGCACACTCGCTGCCACTGTGGAGCTGAGATCA
 TCCCCAGACCGCTCACCTGCCGTAGTACGTGTGAGCGACGGTGACACCTCGACTCTAGT

3961 GlyHisValLysAsnGlyThrMetArgIleValGlyProArgThrCysArgAsnMetTrp
 CTGGACATGTCAAAAACGGGACGATGAGGATCGTCGGTCTAGGACCTGCAGGAACATGT
 GACCTGTACAGTTTTTGGCCCTGCTACTCCTAGCAGCCAGGATCCTGGACGTCCTTGTAACA

4021 SerGlyThrPheProIleAsnAlaTyrThrThrGlyProCysThrProLeuProAlaPro
 GGAGTGGGACCTTCCCCATTAATGCCTACACCACGGGGCCCTGTACCCCCCTTCTGCGC
 CCTCACCCGTGAAGGGTAATTACGGATGTGGTGCCCGGGACATGGGGGAAGGACGCG

4081 AsnTyrThrPheAlaLeuTrpArgValSerAlaGluGluTyrValGluIleArgGlnVal
 CGAACTACACGTTTCGCGCTATGGAGGGTGTCTGCAGAGGAATATGTGGAGATAAGGCAGG
 GCTTGATGTGCAAGCGCGATACCTCCCACAGACGTCTCCTTATACACCTCTATTCCGTCC

4141 GlyAspPheHisTyrValThrGlyMetThrThrAspAsnLeuLysCysProCysGlnVal
 TGGGGGACTTCCACTACGTGACGGGTATGACTACTGACAATCTCAAATGCCCGTGCCAGG
 ACCCCCTGAAGGTGATGCACTGCCATACTGATGACTGTTAGAGTTTACGGGCACGGTCC

4201 ProSerProGluPhePheThrGluLeuAspGlyValArgLeuHisArgPheAlaProPro
 TCCCATCGCCCGAATTTTTCACAGAATTGGACGGGTGCGCCTACATAGGTTTGCGCCCC
 AGGGTAGCGGGCTTAAAAAGTGTCTTAACCTGCCCCACGCGGATGTATCCAACGCGGGG

4261 CysLysProLeuLeuArgGluGluValSerPheArgValGlyLeuHisGluTyrProVal
 CCTGCAAGCCCTTGCTGCGGGAGGAGGTATCATTCAGAGTAGGACTCCACGAATACCCGG
 GGACGTTTCGGGAACGACGCCCTCCTCCATAGTAAGTCTCATCCTGAGGTGCTTATGGGCC

4321 GlySerGlnLeuProCysGluProGluProAspValAlaValLeuThrSerMetLeuThr
 TAGGGTCGCAATTACCTTGCGAGCCCGAACCGGACGTGGCCGTGTTGACGTCCATGCTCA
 ATCCCAGCGTTAATGGAACGCTCGGGCTTGGCCTGCACCGGCACAACCTGCAGGTACGAGT

4381 AspProSerHisIleThrAlaGluAlaAlaGlyArgArgLeuAlaArgGlySerProPro
 CTGATCCCTCCCATATAACAGCAGAGGCGGCGCGGCGAAGGTTGGCGAGGGGATCACCCC
 GACTAGGGAGGGTATATTGTCTCTCCGCCGCGCCGCTTCCAACCGCTCCCTAGTGGGG

4441 SerValAlaSerSerSerAlaSerGlnLeuSerAlaProSerLeuLysAlaThrCysThr
 CCTCTGTGGCCAGCTCCTCGGCTAGCCAGCTATCCGCTCCATCTCTCAAGGCAACTTGCA
 GGAGACACCGGTCGAGGAGCCGATCGGTCGATAGGCGAGGTAGAGAGTTCCGTTGAACGT

4501 AlaAsnHisAspSerProAspAlaGluLeuIleGluAlaAsnLeuLeuTrpArgGlnGlu
 CCGCTAACCATGACTCCCTGATGCTGAGCTCATAGAGGCCAACCTCCTATGGAGGCAGG
 GGCGATTGGTACTGAGGGGACTACGACTCGAGTATCTCCGTTGAGGATACCTCCGTCC

4561 MetGlyGlyAsnIleThrArgValGluSerGluAsnLysValValIleLeuAspSerPhe
 AGATGGGCGGCAACATCACCGAGGTTGAGTCAGAAAACAAAGTGGTGATTCTGGACTCCT
 TCTACCCGCCGTTGTAGTGGTCCCAACTAGTCTTTTGTTCACCACTAAGACCTGAGGA

4621 AspProLeuValAlaGluGluAspGluArgGluIleSerValProAlaGluIleLeuArg
 TCGATCCGCTTGTTGGCGGAGGAGGACGAGCGGGAGATCTCCGTACCCGCAGAAATCCTGC
 AGCTAGGCGAACACCGCCTCCTCCTGCTCGCCCTCTAGAGGCATGGGCGTCTTTAGGACG

4681 LysSerArgArgPheAlaGlnAlaLeuProValTrpAlaArgProAspTyrAsnProPro
 GGAAGTCTCGGAGATTCGCCCAGGCCCTGCCCGTTTGGGCGCGGCGGACTATAACCCCC
 CCTTCAGAGCCTTAAGCGGGTCCGGGACGGGCAACCCGCGCGGCGCTGATATTGGGGG

4741 LeuValGluThrTrpLysLysProAspTyrGluProProValValHisGlyCysProLeu
 CGCTAGTGGAGACGTGAAAAAGCCCGACTACGAACACCTGTGGTCCATGGCTGTCCGC
 GCGATCACCTCTGCACCTTTTTCGGGCTGATGCTTGGTGGACACCAGGTACCGACAGGCG

4801 ProProProLysSerProProValProProProArgLysLysArgThrValValLeuThr
 TTCCACCTCCAAAGTCCCTCCTGTGCCTCCGCCTCGGAAGAAGCGGACGGTGGTCTCA
 AAGGTGGAGGTTTCAGGGGAGGACACGGAGGCGGAGCCTTCTTCGCTGCCACCAGGAGT

GluSerThrLeuSerThrAlaLeuAlaGluLeuAlaThrArgSerPheGlySerSerSer

FIG. 26-5

4861 CTGAATCAACCCCTA1CTACTGCCTTGGCCGAGCTCGCCACCAGAAGCTTTGGCAGCTCCT
 GACTTAGTTGGCATAGATGACGGAACCGGCTCGAGCGGTGGTCTTCGAAACCGTCGAGGA

 ThrSerGlyIleThrGlyAspAsnThrThrThrSerSerGluProAlaProSerGlyCys
 4921 CAACTTCCGGCATTACGGGCGACAATACGACAACATCCTCTGAGCCCGCCCTTCTGGCT
 GTTGAAGCCGTAATGCCCGCTGTTATGCTGTTGTAGGAGACTCGGGCGGGGAAGACCGA

 ProProAspSerAspAlaGluSerTyrSerSerMetProProLeuGluGlyGluProGly
 4981 GGGGGGGGACTCCGACGCTGAGTCCTATTCTCCATGGCCCCCTGGAGGGGGAGCCTG
 CGGGGGGGCTGAGGCTGCGACTCAGGATAAGGAGGTACGGGGGGGACCTCCCCCTCGGAC

 AspProAspLeuSerAspGlySerTrpSerThrValSerSerGluAlaAsnAlaGluAsp
 5041 GGGATCCGGATCTTAGCGACGGGTCATGGTCAACGGTCAGTAGTGAGGCCAACCGGGAGG
 CCTAGGCCTAGAATCGCTGCCCAGTACCAGTTGCCAGTCATCACTCCGGTTGCGCCTCC

 ValValCysCysSerMetSerTyrSerTrpThrGlyAlaLeuValThrProCysAlaAla
 5101 ATGTCGTGTGCTGCTCAATGTCTTACTCTTGGACAGGCGCACTCGTCACCCCGTGGCGCG
 TACAGCACACGACGAGTTACAGAATGAGAACCTGTCCGCGTGAGCAGTGGGGCACGGGGC

 GluGluGlnLysLeuProIleAsnAlaLeuSerAsnSerLeuLeuArgHisHisAsnLeu
 5161 CGGAAGAACAGAACTGCCCATCAATGCACCTAAGCAACTCGTTGCTACGTCACCACAATT
 GCCTTCTTGTCTTTGACGGGTAGTTACGTGATTTCGTTGAGCAACGATGCAGTGGTGTTAA

 ValTyrSerThrThrSerArgSerAlaCysGlnArgGlnLysLysValThrPheAspArg
 5221 TGGTGTATTCCACCACCTCACGCAGTGCTTGCCAAAGGCAGAAGAAAGTCACATTGACA
 ACCACATAAGGTGGTGGAGTGCGTCACGAACGGTTTCGCTCTTCTTTCAGTGTAACCTGT

 LeuGlnValLeuAspSerHisTyrGlnAspValLeuLysGluValLysAlaAlaAlaSer
 5281 GACTGCAAGTTCTGGACAGCCATTACCAGGACGTACTCAAGGAGGTTAAAGCAGCGCGT
 CTGACGTTCAAGACCTGTCGGTAATGGTCCTGCATGAGTCTCTCAATTTTCGTCGCCGCA

 LysValLysAlaAsnLeu
 5341 CAAAAGTGAAGGCTAACTTG
 GTTTTCACTTCCGATTGAAC

FIG. 26-6

FIG. 27

IlePheLysIleArgMetTyrValGlyGlyValGluHisArgLeuGluAlaAlaCysAsn
1 CCATATTTTAAATCAGGATGTACGTGGGAGGGGTCGAACACAGGCTGGAAGCTGCCTGCA
GGTATAAATTTTAGTCCTACATGCACCTCCCCAGCTTGTGTCCGACCTTCGACGGACGT

TrpThrArgGlyGluArgCysAspLeuGluAspArgAspArgSerGluLeuSerProLeu
61 ACTGGACGCGGGGCGAACGTTGCGATCTGGAAGACAGGGACAGGTCCGAGCTCAGCCCGT
TGACCTGCGCCCCGCTTGCAACGCTAGACCTTCTGTCCCTGTCCAGGCTCGAGTCGGGCA

LeuLeuThrThrThrGlnTrpGlnValLeuProCysSerPheThrThrLeuProAlaLeu
121 TACTGCTGACCACTACACAGTGGCAGGTCTCCCGTGTTCCTTCACAACCTACCAGCCT
ATGACGACTGTGTGATGTGTCACCGTCCAGGAGGGCACAAGGAAGTGTGGGATGGTCGGA

SerThrGlyLeuIleHisLeuHisGlnAsnIleValAspValGlnTyrLeuTyrGlyVal
181 TGTCCACCGGCCTCATCCACCTCCACCAGAACATTGTGGACGTGCAGTACTTGTACGGGG
ACAGGTGGCCGGAGTAGGTGGAGGTGGTCTTGTAAACACCTGCACGTCATGAACATGCCCC

GlySerSerIleAlaSerTrpAlaIleLysTrpGluTyrValValLeuLeuPheLeuLeu
241 TGGGGTCAAGCATCGCGTCTGGGCCATTAAGTGGGAGTACGTGCTTCTCCTGTTTCCTTC
ACCCACAGTTCGTAGCGCAGGACCCGGTAATTCACCCTCATGCAGCAAGAGGACAAGGAAG

LeuAlaAspAlaArgValCysSerCysLeuTrpMetMetLeuLeuIleSerGlnAlaGlu
301 TGCTTGACAGACGCGCGCTCTGCTCCTGCTTGTGGATGATGCTACTCATATCCCAAGCGG
ACGAACGTC'TGCCGCGCAGACAGGACGAACACCTACTACGATGAGTATAGGGTTCGCC

AlaAlaLeuGluAsnLeuValIleLeuAsnAlaAlaSerLeuAlaGlyThrHisGlyLeu
361 AGGCGGCTTTGGAGAACCTCGTAATACTTAATGCAGCATCCCTGGCCGGGACGCACGGTC
TCCGCCGAAACCTCTTGGAGCATTATGAATTACGTGCTAGGGACCGGCCCTGCGTGCCAG

Val
421 TTGTATC
AACATAG

FIG. 28

LeuLysGluValLysAlaAlaAlaSerLysValLysAlaAsnLeuLeuSerValGluGlu
1 TGCTCAAGGAGGTAAAGCAGCGCGTCAAAAGTGAAGGCTAACTTGCTATCCGTAGAGG
ACGAGTTCCCTCCAAATTCGTCGCCGCAGTTTTCACTTCCGATTGAACGATAGGCATCTCC

AlaCysSerLeuThrProProHisSerAlaLysSerLysPheGlyTyrGlyAlaLysAsp
61 AAGCTTGACAGCCTGACGCCCCACACTCAGCCAAATCCAAGTTTGGTTATGGGGCAAAAG
TTCGAACGTCGGACTGCGGGGGTGTGAGTCGGTTTAGGTTCAAACCAATACCCCGTTTTTC

ValArgCysHisAlaArgLysAlaValThrHisIleAsnSerValTrpLysAspLeuLeu
121 ACGTCCGTTGCCATGCCAGAAAGGCCGTAACCCACATCAACTCCGTGTGGAAAGACCTTC
TGCAGGCAACGGTACGGTCTTTCCGGCATTTGGGTGTAGTTGAGGCACACCTTTCTGGAAG

GluAspAsnValThrProIleAspThrThrIleMetAlaLysAsnGluValPheCysVal
181 TGGAAGACAATGTAAACCAATAGACACTACCATCATGGCTAAGAACGAGGTTTTCTGCG
ACCTTCTGTTACATTTGTGGTTATCTGTGATGGTAGTACCGATTCTTGCTCCAAAAGACGC

GlnProGluLysGlyGlyArgLysProAlaArgLeuIleValPheProAspLeuGlyVal
241 TTCAGCCTGAGAAGGGGGGTCGTAAGCCAGCTCGTCTCATCGTGTTCCTCCGATCTGGGCG
AAGTCGGACTCTTCCCCCAGCATTCGGTCGAGCAGAGTAGCACAAGGGGGCTAGACCCGC

ArgValCysGluLysMetAlaLeuTyrAspValValThrLysLeuProLeuAlaValMet
301 TGCGCGTGTGCGAAAAGATGGCTTTGTACGACGTGGTTACAAAGCTCCCCCTTGGCCGTGA
ACGCGCACACGCTTTTCTACCGAAACATGCTGCACCAATGTTTCGAGGGGAACCGGCACT

GlySerSerTyrGlyPheGlnTyrSerProGlyGlnArgValGluPheLeuValGlnAla
361 TGGGAAGCTCCTACGGATTCCAATACTCACCAGGACAGCGGGTTGAATTCCTCGTGCAAG
ACCCTTCGAGGATGCCTAAGGTTATGAGTGGTCCTGTGCCCCAACTTAAGGAGCACGTTTC

TrpLysSerLysLysThrProMetGlyPheSerTyrAspThrArgCysPheAspSerThr
421 CGTGGAAGTCCAAGAAAACCCCAATGGGGTTCTCGTATGATACCCGCTGCTTTGACTCCA
GCACCTTCAGGTTCTTTTGGGGTTACCCCAAGAGCATACTATGGGCGACGAACTGAGGT

ValThrGluSerAspIleArgThrGluGluAla
481 CAGTCACTGAGAGCGACATCCGTACGGAGGAGGCA
GTCAGTGACTCTCGCTGTAGGCATGCCTCCTCCGT

FIG. 29

1 GluPheLeuValGlnAlaTrpLysSerLysLysThrProMetGlyPheSerTyrAspThr
GAATTCCCTCGTGCAAGCGTGGAAGTCCAAGAAAACCCCAATGGGGTTCTCGTATGATACC
CTTAAGGAGCACGTTCGCACCTTCAGGTTCTTTTGGGGTTACCCCAAGAGCATACTATGG

61 ArgCysPheAspSerThrValThrGluSerAspIleArgThrGluGluAlaIleTyrGln
CGCTGCTTTGACTCCACAGTCACTGAGAGCGACATCCGTACGGAGGAGGCAATCTACCAA
GCGACGAAACTGAGGTGTCAGTGACTCTCGCTGTAGGCATGCCTCCTCCGTTAGATGGTT

121 CysLysAspLeuAspProGlnAlaArgValAlaIleLysSerLeuThrGluArgLeuTyr
TGTTGTGACCTCGACCCCCAAGCCCGCGTGGCCATCAAGTCCCTCACCAGAGAGGCTTTAT
ACAACACTGGAGCTGGGGGTTCCGGGCGACCCGGTAGTTCAGGGAGTGGCTCTCCGAAATA

181 ValGlyGlyProLeuThrAsnSerArgGlyGluAsnCysGlyTyrArgArgCysArgAla
GTTGGGGGCCCTCTTACCAATTCAAGGGGGGAGAACTGCGGCTATCGCAGGTGCCGCGCG
CAACCCCGGGAGAACTTTAAGTTCCCCCTCTTGACGCCGATAGCGTCCACGGCGCGC

241 SerGlyValLeuThrThrSerCysGlyAsnThrLeuThrCysTyrIleLysAlaArgAla
AGCGGCGTACTGACAACTAGCTGTGGTAACACCCTCACTTGCTACATCAAGGCCCGGGCA
TCGCCGCATGACTGTTGATCGACACCATTGTGGGAGTGAACGATGTAGTTCCGGGCCCCGT

301 AlaCysArgAlaAlaGlyLeuGlnAspCysThrMetLeuValCysGlyAspAspLeuVal
GCCTGTGAGCCGCAGGGCTCCAGGACTGCACCATGCTCGTGTGTGGCGACGACTTAGTC
CGGACAGCTCGGCGTCCCGAGGTCTTGACGTGGTACGAGCACACACCGCTGCTGAATCAG

361 ValIleCysGluSerAlaGlyValGlnGluAspAlaAla
GTTATCTGTGAAAGCGCGGGGTCCAGGAGGACGCGGCGAG
CAATAGACACTTTCGCGCCCCCAGGTCTCTCTGCGCCGCTC

FIG. 30

1 GlyGlyGluAsnCysGlyTyrArgArgCysArgAlaSerGlyValLeuThrThrSerCys
 GGGGGGAGAACTGCGGCTATCGCAGGTGCCGCGCAAGCGGCGTACTGACAAGTAGCTGT
 CCCCCCTCTTGACGCCGATAGCGTCCACGGCGCGTTGCCCGCATGACTGTTGATCGACA

61 GlyAsnThrLeuThrCysTyrIleLysAlaArgAlaAlaCysArgAlaAlaGlyLeuGln
 GGTAACACCCTCACTTGTTACATCAAGGCCGAGCAGCCTGTCGAGCCGAGGGCTCCAG
 CCATTGTGGGAGTGAACAATGTAGTTCCGGGCTCGTCGGACAGCTCGGCGTCCCGAGGTC

121 AspCysThrMetLeuValCysGlyAspAspLeuValValIleCysGluSerAlaGlyVal
 GACTGCACCATGCTCGTGTGTGGCGACGACTTAGTCGTTATCTGTGAAAGCGCGGGGTC
 CTGACGTGGTACGAGCACACACCGCTGCTGAATCAGCAATAGACACTTTCGCGCCCCCAG

181 GlnGluAspAlaAlaSerLeuArgAlaPheThrGluAlaMetThrArgTyrSerAlaPro
 CAGGAGGACGCGCGAGCCTGAGAGCCTTCACGGAGGCTATGACCAGGTACTCCGCCCCC
 GTCTCTCGCGCCGCTCGGACTCTCGGAAGTGCC'TCCGATACTGGTCCATGAGGCGGGG

241 ProGlyAspProProGlnProGluTyrAspLeuGluLeuIleThrSerCysSerSerAsn
 CCTGGGGACCCCCACAACCAGAATACGACTTGGAGCTCATAACATCATGCTCCTCCAAC
 GGACCCCTGGGGGGTGTGGTCTTATGCTGAACCTCGAGTATTGTAGTACGAGGAGGTG

301 ValSerValAlaHisAspGlyAlaGlyLysArgValTyrTyrLeuThrArgAspProThr
 GTGTCACTCGCCACGACGGCGCTGGAAAGAGGGTCTACTACCTCACCCGTGACCTTACA
 CACAGTCAGCGGGTGCTGCCGCGACCTTCTCCAGATGATGGAGTGGGCACCTGGGATGT

361 ThrProLeuAlaArgAlaAlaTrpGluThrAlaArgHisThrProValAsnSerTrpLeu
 ACCCCCCCTCGCGAGAGCTGCGTGGGAGACAGCAAGACACACTCCAGTCAATTCTGGCTA
 TGGGGGGAGCGCTCTCGACGCACCTCTGTGCTTCTGTGTGAGGTGAGTTAAGGACCGAT

421 GlyAsnIleIleMetPheAlaProThrLeuTrpAla
 GGCAACATAATCATGTTTGCCCCCACACTGTGGGCG
 CCGTTGTATTAGTACAAACGGGGGTGTGACACCCGC

FIG. 31

1 GlyAlaGlyLysArgValTyrTyrLeuThrArgAspProThrThrProLeuAlaArgAla
 CGCGCTGGAAAGAGGGTCTACTACCTCACCCGTGACCTACAACCCCCCTCGCGAGAGC
 GCCGCGACCTTCTCCAGATGATGGAGTGGGCACCTGGGATGTTGGGGGAGCGCTCTCG

61 AlaTrpGluThrAlaArgHisThrProValAsnSerTrpLeuGlyAsnIleIleMetPhe
 TCGGTGGGAGACAGCAAGACACACTCCAGTCAATTCCTGGCTAGGCAACATAATCATGTT
 ACGCACCTCTGTGCTTCTGTGTGAGGTGAGTTAAGGACCGATCCGTTGTATTAGTACAA

121 AlaProThrLeuTrpAlaArgMetIleLeuMetThrHisPhePheSerValLeuIleAla
 TGCCCCCACACTGTGGGCGAGGATGATACTGATGACCCATTTCTTTAGCGTCCTTATAGC
 ACGGGGGTGTGACACCCGCTCTACTATGACTACTGGGTAAAGAAATCGCAGGAATATCG

181 ArgAspGlnLeuGluGlnAlaLeuAspCysGluIleTyrGlyAlaCysTyrSerIleGlu
 CAGGGACAGCTTGAACAGGCCCTCGATTGCGAGATCTACGGGGCTGCTACTCCATAGA
 GTCCCTGGTCAACTGTCCGGGAGCTAACGCTCTAGATGCCCGGACGATGAGTATCT

241 ProLeuAspLeuProProIleIleGlnArgLeu
 ACCACTTGATCTACCTCCAATCATTCAAAGACTC
 TGGTGAAC TAGATGGAGGTAGTAAGTTCTGAG

FIG. 32-1

IlePheLysIleArgMetTyrValGlyGlyValGluHisArgLeuGluAlaAlaCysAsn
 1 CCATATTTAAATCAGGATGTACGTGGGAGGGGTGCAACACAGGCTGGAGCTGCCTGCA
 GGTATAAATTTTAGTCCTACATGCACCTCCCCAGCTTGTGTCCGACCTTCGACGGACGT
 TrpThrArgGlyGluArgCysAspLeuGluAspArgAspArgSerGluLeuSerProLeu
 61 ACTGGACGCGGGGCGAACGTTGCGATCTGGAAGACAGGGACAGGTCCGAGCTCAGCCCGT
 TGACCTGCGCCCCGCTTGCAACGCTAGACCTTCTGTCCCTGTCCAGGCTCGAGTCGGGCA
 LeuLeuThrThrThrGlnTrpGlnValLeuProCysSerPheThrThrLeuProAlaLeu
 121 TACTGCTGACCACTACACAGTGGCAGGTCCCTCCCGTGTTCCTTACAAACCTACCAGCCT
 ATGACGACTGGTGATGTGTACCGTCCAGGAGGGCACAAGGAAGTGTGGGATGGTCGGA
 SerThrGlyLeuIleHisLeuHisGlnAsnIleValAspValGlnTyrLeuTyrGlyVal
 181 TGTCCACCGGCTCATCCACCTCCACAGAACATTGTGGACGTGCAGTACTTGTACGGGG
 ACAGGTGGCCGGAGTAGGTGGAGGTGGTCTTGTAAACACCTGCACGTATGAACATGCCCC
 GlySerSerIleAlaSerTrpAlaIleLysTrpGluTyrValValLeuLeuPheLeuLeu
 241 TGGGGTCAAGCATCGCGTCCCTGGGCCATTAAAGTGGGAGTACGTCGTTCTCCTGTTCCCTTC
 ACCCCAGTTCGTAGCGCAGGACCCGGTAATTCACCTCATGCAGCAAGAGGACAAGGAAG
 LeuAlaAspAlaArgValCysSerCysLeuTrpMetMetLeuLeuIleSerGlnAlaGlu
 301 TGCTTGCAGACGCGCGCTCTGCTCCTGCTTGTGGATGATGCTACTCATATCCCAAGCGG
 ACGAACGTCTGCGCGCGCAGACGAGGACGAACACCTACTACGATGAGTATAGGGTTCCGC
 AlaAlaLeuGluAsnIleValIleLeuAsnAlaAlaSerLeuAlaGlyThrHisGlyLeu
 361 AGGCGGCTTTGGAGAACCTCGTAATACTTAATGCAGCATCCCTGGCCGGGACGCACGGTC
 TCCGCCGAAACCTCTTGGAGCATTATGAATTACGTTCGTAGGGACCGGCCCTGCGTGCCAG
 ValSerPheLeuValPhePheCysPheAlaTrpTyrLeuLysGlyLysTrpValProGly
 421 TTGTATCCTTCCTCGTGTCTTCTGCTTTCGATGGTATTTGAAGGGTAAGTGGGTGCCCG
 AACATAGGAAGGAGCACAAGAAGACGAAACGTACCATAAACTTCCCATTCACCCACGGGC
 AlaValTyrThrPheTyrGlyMetTrpProLeuLeuLeuLeuLeuAlaLeuProGln
 481 GAGCGGTCTACACCTTCTACGGGATGTGGCCTCTCCTCCTGCTCCTGTTGGCGTTGCCCC
 CTCGCCAGATGTGGAAGATGCCCTACACCGGAGAGGAGGACGAGGACAACCGCAACGGGG
 ArgAlaTyrAlaLeuAspThrGluValAlaAlaSerCysGlyGlyValValLeuValGly
 541 AGCGGGCGTACGCGCTGGACACGGAGGTGGCCGCGTCTGTGGCGGTGTTGTTCTCGTCG
 TCGCCTCGCATGCGCGACCTGTGCCTCCACCGGCGCAGCACACCGCCACAACAAGAGCAGC
 LeuMetAlaLeuThrLeuSerProTyrTyrLysArgTyrIleSerTrpCysLeuTrpTrp
 601 GGTTGATGGCGCTGACTCTGTACCATATTACAAGCGCTATATCAGCTGGTGTGTTGGT
 CCAACTACCGGACTGAGACAGTGGTATAATGTTCCGATATAGTCGACCACGAACACCA
 LeuGlnTyrPheLeuThrArgValGluAlaGlnLeuHisValTrpIleProProLeuAsn
 661 GGCTTCAGTATTTCTGACCAGAGTGAAGCGCAACTGCACGTGTGGATTCCCCCCTCA
 CCGAAGTCATAAAAGACTGGTCTCACCTTCGCGTTGACGTGCACACCTAAGGGGGGAGT
 ValArgGlyGlyArgAspAlaValIleLeuLeuMetCysAlaValHisProThrLeuVal
 721 ACGTCCGAGGGGGGCGCGACCCGTCATCTTACTCATGTGTGCTGTACACCGACTCTGG
 TCGAGGCTCCCCCGCGCTGCGGCAGTAGAATGAGTACACACGACATGTGGGCTGAGACC
 PheAspIleThrLysLeuLeuLeuAlaValPheGlyProLeuTrpIleLeuGlnAlaSer
 781 TATTTGACATCACCAAATTGCTGCTGGCCGTCTTCGGACCCCTTGGATTCTTCAAGCCA
 ATAAACTGTAGTGGTTTAAACGACGACCGGCAGAAGCCTGGGGAAACCTAAGAAGTTCGGT
 LeuLeuLysValProTyrPheValArgValGlnGlyLeuLeuArgPheCysAlaLeuAla
 841 GTTGTCTTAAAGTACCCTACTTGTGCGCGTCCAAGGCCTTCTCCGGTTCTGCGCGTTAG
 CAAACGAATTTTCATGGGATGAAACACGCGCAGGTTCCGGAAGAGGCCAAGACGCGCAATC
 ArgLysMetIleGlyGlyHisTyrValGlnMetValIleIleLysLeuGlyAlaLeuThr
 901 CGCGGAAGATGATCGGAGGCCATTACGTGCAAAATGGTCATCATTAAGTTAGGGGCGCTTA
 GCGCCTTCTACTAGCCTCCGGTAATGCACGTTTACCAGTAGTAATTCATCCCCGCGAAT

- 961 GlyThrTyrValTyrAsnHisLeuThrProLeuArgAspTrpAlaHisAsnGlyLeuArg
CTGGCACCTATGTTTATAACCATCTCACTCCTCTTCGGGACTGGGCGCACAAACGGCTTGC
GACCGTGGATACAAATATTGGTAGAGTGAGGAGAAGCCCTGACCCGCGTGTGCCGAACG
- 1021 AspLeuAlaValAlaValGluProValValPheSerGlnMetGluThrLysLeuIleThr
GAGATCTGGCCGTGGCTGTAGAGCCAGTCGTCTTCTCCCAATGGAGACCAAGCTCATCA
CTCTAGACCGGCACCGACATCTCGCTCAGCAGAAGAGGGTTTACCTCTGGTTTCGAGTAGT
- 1081 TrpGlyAlaAspThrAlaAlaCysGlyAspIleIleAsnGlyLeuProValSerAlaArg
CGTGGGGGGCAGATACCGCCGCGTGCCTGACATCATCAACGGCTTGCTGTTCGCCCC
GCACCCCCGCTATGGCGGCGCACGCCACTGTAGTAGTTGCCGAACGGACAAAGGCGGG
- 1141 ArgGlyArgGluIleLeuLeuGlyProAlaAspGlyMetValSerLysGlyTrpArgLeu
GCAGGGGCGGGAGATACTGCTCGGGCCAGCCGATGGAATGGTCTCCAAGGGGTGGAGGT
CGTCCCCGGCCCTCTATGACGAGCCCGTGGCTACCTTACCAGAGGTTCACCACTCCA
- 1201 LeuAlaProIleThrAlaTyrAlaGlnGlnThrArgGlyLeuLeuGlyCysIleIleThr
TGCTGGCGCCCATCACGGCGTACGCCAGCAGACAAGGGGCCCTCCTAGGGTGCATAATCA
ACGACCGCGGGTAGTGCCGCATGCGGTCGTCTGTTCCCGGAGGATCCACGTTATTAGT
- 1261 SerLeuThrGlyArgAspLysAsnGlnValGluGlyGluValGlnIleValSerThrAla
CCAGCCTAACTGGCCGGGACAAAAACCAAGTGGAGGGTGAGGTCCAGATTGTGTCAACTG
GGTCCGATTGACCGGCCCTGTTTTTGGTTTCACTCCCACTCCAGGTCTAACACAGTTGAC
- 1321 AlaGlnThrPheLeuAlaThrCysIleAsnGlyValCysTrpThrValTyrHisGlyAla
CTGCCCCAAACCTTCTGGCAACGTGCATCAATGGGGTGTGCTGGACTGTCTACCACGGGG
GACGGGTTTGAAGGACCGTTGCACGTAGTTACCCACACGACCTGACAGATGGTGCCCC
- 1381 GlyThrArgThrIleAlaSerProLysGlyProValIleGlnMetTyrThrAsnValAsp
CCGGAACGAGGACCATCGCGTCACCCAAGGGTCCCTGTCATCCAGATGTATACCAATGTAG
GGCCTTGCTCCTGGTAGCGCAGTGGGTTCACGAGACAGTAGGTCTACATATGGTTACATC
- 1441 GlnAspLeuValGlyTrpProAlaProGlnGlySerArgSerLeuThrProCysThrCys
ACCAAGACCTTGTTGGCTGGCCCGCTCCGCAAGGTAGCCGCTCATTGACACCCCTGCACTT
TGTTCTTGGAACACCCGACCGGGCGAGGCGTTCATCGGCGAGTAACGTGGGACGTGAA
- 1501 GlySerSerAspLeuTyrLeuValThrArgHisAlaAspValIleProValArgArgArg
GCGGCTCCTCGGACCTTACCTGGTCACGAGGCACGCGATGTCATTCCCGTGCAGCGGC
CGCCGAGGAGCCTGGAAATGGACCAAGTGTCCGTGCGGCTACAGTAAGGGCACGCGGCCG
- 1561 GlyAspSerArgGlySerLeuLeuSerProArgProIleSerTyrLeuLysGlySerSer
GGGGTGATAGCAGGGGACGCTGCTGTGCCCCGCGCCCATTTCTTACCTGAAAGGCTCCT
CCCCACTATCGTCCCGTCCGACGACAGCGGGGCCGGGTAAAGGATGAACCTTCCGAGGA
- 1621 GlyGlyProLeuLeuCysProAlaGlyHisAlaValGlyIlePheArgAlaAlaValCys
CGGGGGGTCGCTGTTGTGCCCCGCGGGGCACGCCGTGGGCATATTTAGGGCCGCGGTGT
GCCCCCAGGCGACAACACGGGGCGCCCCGTGCGGCACCCGTATAAATCCCGCGCCACA
- 1681 ThrArgGlyValAlaLysAlaValAspPheIleProValGluAsnLeuGluThrThrMet
GCACCCGTGGAGTGGCTAAGGCGGTGGACTTTATCCCTGTGGAGAACCTAGAGACAACCA
CGTGGGCACCTACCGATTCCGCCACCTGAAATAGGGACACCTCTTGGATCTCTGTGGT
- 1741 ArgSerProValPheThrAspAsnSerSerProProValValProGlnSerPheGlnVal
TGAGGTCCCCGTGTTTACGGATAACTCCTCTCCACCAGTAGTGCCCAAGAGCTTCCAGG
ACTCCAGGGGCCACAAGTGCTATTGAGGAGAGGTGGTCATCACGGGGTCTCGAAGGTCC
- 1801 AlaHisLeuHisAlaProThrGlySerGlyLysSerThrLysValProAlaAlaTyrAla
TGGCTCACCTCCATGCTCCACAGGCAGCGGCAAAAGCACCAAGGTCCCGGCTGCATATG
ACCGAGTGGAGGTACGAGGGTGTCCGTGCGCGTTTTCTGTGGTTCCAGGGCCGACGTATAC
- 1861 AlaGlnGlyTyrLysValLeuValLeuAsnProSerValAlaAlaThrLeuGlyPheGly
CAGCTCAGGGCTATAAGGTGCTAGTACTCAACCCCTCTGTGTGCTGCAACACTGGGCTTTG
GTCGAGTCCCGATATTCCACGATCATGAGTTGGGGAGACAACGACGTTGTGACCCGAAAC
- AlaTyrMetSerLysAlaHisGlyIleAspProAsnIleArgThrGlyValArgThrIle

FIG. 32-2

- 1921 GTGCTTACATGTCCAAGGCTCATGGGATCGATCCTAACATCAGGACCGGGGTGAGAACA
CACGAATGTACAGGTCCGAGTACCCTAGCTAGGATTGTAGTCCTGGCCCCACTCTTGTT
- 1981 ThrThrGlySerProIleThrTyrSerThrTyrGlyLysPheLeuAlaAspGlyGlyCys
TTACCACTGGCAGCCCCATCAGTACTCCACCTACGGCAAGTTCCTTGCCGACGGCGGGT
AATGGTGACCGTCGGGGTAGTGCATGAGGTGGATGCCGTTCAGAAGAACGGCTGCCGCCCA
- 2041 SerGlyGlyAlaTyrAspIleIleIleCysAspGluCysHisSerThrAspAlaThrSer
GCTCGGGGGGCGCTTATGACATAATAATTTGTGACGAGTGCCACTCCACGGATGCCACAT
CGAGCCCCCGCGAATACTGTATTATTAACACTGCTCACGGTGAGGTGCCTACGGTGTA
- 2101 IleLeuGlyIleGlyThrValLeuAspGlnAlaGluThrAlaGlyAlaArgLeuValVal
CCATCTTGGGCATCGGCACTGTCTTGACCAAGCAGAGACTGCCGGGGCGAGACTGGTTG
GGTAGAACCCGTAGCCGTGACAGGAAGTGGTTCGTCTCTGACGCCCCGCTCTGACCAAC
- 2161 LeuAlaThrAlaThrProProGlySerValThrValProHisProAsnIleGluGluVal
TGCTCGCCACCGCCACCCCTCCGGGCTCCGTCACTGTGCCCCATCCCAACATCGAGGAGG
ACGAGCGGTGGCGGTGGGGAGGCCGAGGCAGTGACACGGGGTAGGGTGTAGCTCCTCC
- 2221 AlaLeuSerThrThrGlyGluIleProPheTyrGlyLysAlaIleProLeuGluValIle
TTGCTCTGTCCACCACCGGAGAGATCCCTTTTACGGCAAGGCTATCCCCCTCGAAGTAA
AACGAGACAGGTGGTGGCCTCTCTAGGGAAAATGCCGTTCCGATAGGGGGAGCTTCATT
- 2281 LysGlyGlyArgHisLeuIlePheCysHisSerLysLysLysCysAspGluLeuAlaAla
TCAAGGGGGGAGACATCTCATCTTCTGTCAATCAAAGAAGAAGTGGCAGCAACTCGCCG
AGTTCCCCCCTCTGTAGAGTAGAAGACAGTAAGTTTCTTCTTCACGCTGCTTGAGCGGC
- 2341 LysLeuValAlaLeuGlyIleAsnAlaValAlaTyrTyrArgGlyLeuAspValSerVal
CAAAGCTGGTCGCATTGGGCATCAATGCCGTGGCCTACTACCGCGTCTTGACGTGTCCG
GTTTCGACCAGCGTAACCCGTAGTTACGGCACCGGATGATGGCGCCAGAAGTGCACAGGC
- 2401 IleProThrSerGlyAspValValValAlaThrAspAlaLeuMetThrGlyTyrThr
TCATCCCGACCGCGGATGTTGTCTGTGCGTGGCAACCGATGCCCTCATGACCGGCTATA
AGTAGGGCTGGTCGCGCTACAACAGCAGCACCGTTGGCTACGGGAGTACTGGCCGATAT
- 2461 GlyAspPheAspSerValIleAspCysAsnThrCysValThrGlnThrValAspPheSer
CCGGCGACTTCGACTCGGTGATAGACTGCAATACGTGTGTACCCAGACAGTGCATTTC
GGCCGCTGAAGCTGAGCCACTATCTGACGTTATGCACACAGTGGGTCTGTACGCTAAAGT
- 2521 LeuAspProThrPheThrIleGluThrIleThrLeuProGlnAspAlaValSerArgThr
GCCTTGACCTACCTTACCATTGAGACAATCAGCTCCCCAGGATGCTGTCTCCCGCA
CGGAAC TGCGATGGAAGTGGAACCTCTGTAGTCCGAGGGGGTCTACGACAGAGGGCGT
- 2581 GlnArgArgGlyArgThrGlyArgGlyLysProGlyIleTyrArgPheValAlaProGly
CTCAACGTCGGGGCAGGACTGGCAGGGGAAGCCAGGCATCTACAGATTGTGGCACC GG
GAGTTGCAGCCCCGTCTGACCGTCCCCCTTCGGTCCGTAGATGTCTAAACACCGTGCC
- 2641 GluArgProSerGlyMetPheAspSerSerValLeuCysGluCysTyrAspAlaGlyCys
GGGAGCGCCCCCTCCGGCATGTTGACTCGTCCGTCTCTGTGAGTGCTATGACGAGGCT
CCCTCGCGGGGAGGCCGTACAAGCTGAGCAGGCAGGAGACACTCACGATACTGCGTCCGA
- 2701 AlaTrpTyrGluLeuThrProAlaGluThrThrValArgLeuArgAlaTyrMetAsnThr
GTGCTTGGTATGAGCTCACGCCCCCGAGACTACAGTTAGGCTACGAGCGTACATGAACA
CACGAACCATACTCGAGTGCGGGCGGCTCTGATGTCAATCCGATGCTCGCATGTACTTGT
- 2761 ProGlyLeuProValCysGlnAspHisLeuGluPheTrpGluGlyValPheThrGlyLeu
CCCCGGGGCTTCCCGTGTGCCAGGACCATCTTGAATTTTGGGAGGGCGTCTTTACAGGCC
GGGGCCCCGAAGGGCACACGGTCTGGTAGAACTTAAAACCTCCCGCAGAAATGTCCGG
- 2821 ThrHisIleAspAlaHisPheLeuSerGlnThrLysGlnSerGlyGluAsnLeuProTyr
TCACTCATATAGATGCCCACTTTCTATCCAGACAAAGCAGAGTGGGGAGAACCTTCCTT
AGTGAGTATATCTACGGGTGAAAGATAGGGTCTGTTTCGTCTACCCCTCTTGGAAGGAA
- 2881 LeuValAlaTyrGlnAlaThrValCysAlaArgAlaGlnAlaProProProSerTrpAsp
ACCTGGTAGCGTACCAAGCCACCGTGTGCGCTAGGGCTCAAGCCCCTCCCCATCGTGGG
TGGACCATCGCATGGTTCGGTGGCACACGCGATCCCGAGTTCGGGGAGGGGTAGCACC

FIG. 32-3

GlnMetTrpLysCysLeuIleArgLeuLysProThrLeuHisGlyProThrProLeuLeu
 2941 ACCAGATGTGGAAGTGTTCGATTCGCCTCAAGCCCACCCATGGGCCAACACCCCTGC
 TGGTCTACACCTTCACAACTAAGCGGAGTTCGGGTGGGAGGTACCCGGTTGTGGGGACG

TyrArgLeuGlyAlaValGlnAsnGluIleThrLeuThrHisProValThrLysTyrIle
 3001 TATACAGACTGGGCGCTGTTTCAGAATGAAATCACCTGACGCACCCAGTCAACAAATACA
 ATATGTCTGACCCGCGACAAGTCTTACTTTAGTGGGACTGCGTGGGTCAAGTGGTTTATGT

MetThrCysMetSerAlaAspLeuGluValValThrSerThrTrpValLeuValGlyGly
 3061 TCATGACATGCATGTCGGCCGACCTGGAGGTGCTCACGAGCACCTGGGTGCTCGTTGGCG
 AGTACTGTACGTACAGCCGGCTGGACCTCCAGCAGTGCCTGCGACCCACGAGCAACCGC

ValLeuAlaAlaLeuAlaAlaTyrCysLeuSerThrGlyCysValValIleValGlyArg
 3121 GCGTCCTGGCTGCTTTGGCCGCGTATTCGCTGTCAACAGGCTGCGTGGTCATAGTGGGCA
 CGCAGGACCGACGAAACCGGCGCATACCGACAGTTGTCCGACGCACCAAGTATCACCCGT

ValValLeuSerGlyLysProAlaIleIleProAspArgGluValLeuTyrArgGluPhe
 3181 GGGTCGTCTTGTCCGGGAAGCCGGCAATCATACCTGACAGGGAAGTCTCTACCGAGAGT
 CCCAGCAGAACAGGCCCTTCGGCCGTTAGTATGGACTGTCCCTTCAGGAGATGGCTCTCA

AspGluMetGluGluCysSerGlnHisLeuProTyrIleGluGlnGlyMetMetLeuAla
 3241 TCGATGAGATGGAAGAGTGTCTTCAGCACTTACCGTACATCGAGCAAGGGATGATGCTCG
 AGCTACTCTACCTTCTCACGAGAGTCGTGAATGGCATGTAGCTCGTTCCTACTACGAGC

GluGlnPheLysGlnLysAlaLeuGlyLeuLeuGlnThrAlaSerArgGlnAlaGluVal
 3301 CCGAGCAGTTCAAGCAGAAGGCCCTCGGCCCTCCTGCAGACCGCGTCCCGTCAGGCAGAGG
 GGCTCGTCAAGTTCGTCTTCCGGGAGCCGAGGACGTCTGGCGCAGGCGAGTCCGTCTCC

IleAlaProAlaValGlnThrAsnTrpGlnLysLeuGluThrPheTrpAlaLysHisMet
 3361 TTATCGCCCTGCTGTCCAGACCAACTGGCAAAAACCTCGAGACCTTCTGGGCGAAGCATA
 AATAGCGGGGACGACAGGTCTGGTTGACCGTTTTTGAGCTCTGGAAGACCCGCTTCGTAT

TrpAsnPheIleSerGlyIleGlnTyrLeuAlaGlyLeuSerThrLeuProGlyAsnPro
 3421 TGTGGAACTTCATCAGTGGGATACAATACTTGGCGGGCTTGTCAACGCTGCCTGGTAACC
 ACACCTTGAAGTAGTCACCCATATGTTATGAACCGCCGAACAGTTGCGACGGACCATTTG

AlaIleAlaSerLeuMetAlaPheThrAlaAlaValThrSerProLeuThrThrSerGln
 3481 CCGCCATTGCTTCATTGATGGCTTTTACAGCTGCTGTCAACAGCCCACTAACCACTAGCC
 GGCGGTAACGAAGTAACCTACCGAAAAATGTCGACGACAGTGGTCCGGTGATTGGTGATCGG

ThrLeuLeuPheAsnIleLeuGlyGlyTrpValAlaAlaGlnLeuAlaAlaProGlyAla
 3541 AAACCCCTCTCTCAACATATTGGGGGGGTGGGTGGCTGCCAGCTCGCCGCCCCGGTG
 TTTGGGAGGAGAAGTTGTATAACCCCCCACCACCGACGGGTGAGCGGGGGGGGCCAC

AlaThrAlaPheValGlyAlaGlyLeuAlaGlyAlaAlaIleGlySerValGlyLeuGly
 3601 CCGCTACTGCCTTTGTGGGCGCTGGCTTAGCTGGCGCCGCCATCGGCAGTGTGGACTGG
 GGCGATGACGGAACACCCGCGACCGAATCGACCGCGGCGGTAGCCGTCACAACTGACC

LysValLeuIleAspIleLeuAlaGlyTyrGlyAlaGlyValAlaGlyAlaLeuValAla
 3661 GGAAGGTCTCATAGACATCCTTGCAGGGTATGGCGCGGGCGTGGCGGGAGCTCTTGTGG
 CCTTCCAGGAGTATCTGTAGGAACGTCCCATACCGCGCCCGCACCGCCCTCGAGAACACC

PheLysIleMetSerGlyGluValProSerThrGluAspLeuValAsnLeuLeuProAla
 3721 CATTCAAGATCATGAGCGGTGAGGTCCCTCCACGGAGGACCTGGTCAATCTACTGCCCCG
 GTAAGTTCTAGTACTCGCCACTCCAGGGGAGGTGCCTCCTGGACCACTTAGATGACGGGC

IleLeuSerProGlyAlaLeuValValGlyValValCysAlaAlaIleLeuArgArgHis
 3781 CCATCCTCTCGCCCGGAGCCCTCGTAGTGGGCGTGGTCTGTGCAGCAATACTGCGCCGGC
 GGTAGGAGAGCGGGCTCGGGAGCATCAGCCGCACCAGACAGTTCGTTATGACGCGCCG

ValGlyProGlyGluGlyAlaValGlnTrpMetAsnArgLeuIleAlaPheAlaSerArg
 3841 ACGTTGGCCCGGGCGAGGGGGCAGTGCAGTGGATGAACCGGCTGATAGCCTTCGCTCCC
 TGCAACCGGGCCGCTCCCCCGTCACGTCACCTACTGGCCGACTATCGGAAGCGGAGGG

GlyAsnHisValSerProThrHisTyrValProGluSerAspAlaAlaAlaArgValThr

FIG. 32-4

3901 GGGGGAAACATGTTTCCCCACGCACTACGTGCCGGAGAGCGATGCAGCTGCCCCGCTCA
 CCCCCTTGGTACAAAGGGGTGCGTGATGCACGGCCTCTCGCTACGTGACGGGCGCAGT

 AlaIleLeuSerSerLeuThrValThrGlnLeuLeuArgArgLeuHisGlnTrpIleSer
 3961 CTGCCATACTCAGCAGCCTCACTGTAACCCAGCTCCTGAGGCGACTGCACCACTGGATAA
 GACGGTATGAGTCTCGGAGTGACATTGGGTGAGGACTCCGCTGACGTGGTACCTATT

 SerGluCysThrThrProCysSerGlySerTrpLeuArgAspIleTrpAspTrpIleCys
 4021 GCTCGGAGTGTACCCTCCATGCTCCGGTTCCTGGCTAAGGGACATCTGGGACTGGATAT
 CGAGCCTCACATGGTGAGGTACGAGGCCAAGGACCGATTCCCTGTAGACCTGACCTATA

 GluValLeuSerAspPheLysThrTrpLeuLysAlaLysLeuMetProGlnLeuProGly
 4081 GCGAGGTGTTGAGCGACTTTAAGACCTGGCTAAAAGCTAAGCTCATGCCACAGCTGCCTG
 CCTCCACAACCTCGCTGAAATCTGGACCGATTTTCGATTCGAGTACGGTGTGACGGAC

 IleProPheValSerCysGlnArgGlyTyrLysGlyValTrpArgValAspGlyIleMet
 4141 GGATCCCCTTTGTGTCTGCGCAGCGGGGTATAAGGGGGTCTGGCGAGTGGACGGCATCA
 CTTAGGGGAAACACAGGACGGTCGCGCCCATATTCCCCAGACCGCTCACCTGCCGTAGT

 HisThrArgCysHisCysGlyAlaGluIleThrGlyHisValLysAsnGlyThrMetArg
 4201 TGCACACTCGCTGCCACTGTGGAGCTGAGATCACTGGACATGTCAAAAACGGGACGATGA
 ACGTGTGAGCGACGGTGACACCTCGACTCTAGTGACCTGTACAGTTTTTGCCCTGCTACT

 IleValGlyProArgThrCysArgAsnMetTrpSerGlyThrPheProIleAsnAlaTyr
 4261 GGATCGTCGGTCTTAGGACCTGCAGGAACATGTGGAGTGGGACCTTCCCCATTAATGCCCT
 CCTAGCAGCCAGGATCCTGGACGTCTTGACACCTCACCTGGAAGGGTAATTACGGA

 ThrThrGlyProCysThrProLeuProAlaProAsnTyrThrPheAlaLeuTrpArgVal
 4321 ACACCACGGGGCCCTGTACCCCCCTTCCTGCGCCGAACACACGTTTCGCGCTATGGAGGG
 TGTGGTGGCCGGGACATGGGGGAAGGACGCGGCTTGATGTGCAAGCGGATACCTCCC

 SerAlaGluGluTyrValGluIleArgGlnValGlyAspPheHisTyrValThrGlyMet
 4381 TGTCTGCAGAGGAATATGTGGAGATAAGGCAGCTGGGGGACTTCCACTACGTGACGGGTA
 ACAGACGTCCTTATACACCTCTATTCCTCCACCCCCCTGAAGGTGATGCACTGCCCAT

 ThrThrAspAsnLeuLysCysProCysGlnValProSerProGluPhePheThrGluLeu
 4441 TGACTACTGACAATCTCAAATGCCCGTGCCAGGTCCCATCGCCCGAATTTTTCACAGAAT
 ACTGATGACTGTTAGAGTTTACGGGCACGGTCCAGGGTAGCGGGCTTAAAAGTGTCTTA

 AspGlyValArgLeuHisArgPheAlaProProCysLysProLeuLeuArgGluGluVal
 4501 TGGACGGGGTGCGCCTACATAGGTTTGCGCCCCCTGCAAGCCCTTGCTGCGGGAGGAGG
 ACCTGCCCCACGCGGATGTATCCAAACGCGGGGGACGTTGCGGAACGACGCCCTCCTCC

 SerPheArgValGlyLeuHisGluTyrProValGlySerGlnLeuProCysGluProGlu
 4561 TATCATTCAGAGTAGGACTCCACGAATACCCGGTAGGGTCGCAATTACCTTGCAGCCCCG
 ATAGTAAGTCTCATCTGAGGTGCTTATGGGCCATCCACGGTTAATGGAACGCTCGGGC

 ProAspValAlaValLeuThrSerMetLeuThrAspProSerHisIleThrAlaGluAla
 4621 AACCGGACGTGGCCGTGTTGACGTCCATGCTCACTGATCCCTCCCATATAACAGCAGAGG
 TTGGCCTGCACCGGCACAACCTGCAGGTACGAGTGACTAGGGAGGGTATATTGTCTCTCC

 AlaGlyArgArgLeuAlaArgGlySerProProSerValAlaSerSerSerAlaSerGln
 4681 CGGCCGGGCGAAGGTTGGCGAGGGGATCACCCCCCTCTGTGGCCAGCTCCTCGGCTAGCC
 CGCGCCCGCTTCCAACCGCTCCCTAGTGGGGGAGACACCGGTCGAGGAGCCGATCGG

 LeuSerAlaProSerLeuLysAlaThrCysThrAlaAsnHisAspSerProAspAlaGlu
 4741 AGCTATCCGCTCCATCTCTCAAGGCAACTTGACCCGCTAACCATGACTCCCTGTATGCTG
 TCGATAGCGAGGTAGAGAGTTCCGTTGAACGTGGCGATTGGTACTGAGGGGACTACGAC

 LeuIleGluAlaAsnLeuLeuTrpArgGlnGluMetGlyGlyAsnIleThrArgValGlu
 4801 AGCTCATAGAGGCAACCTCCTATGGAGGCAGGAGATGGGCGGCAACATACACAGGGTTG
 TCGAGTATCTCCGGTTGGAGGATACCTCCGTCTTACCCGCGTGTAGTGGTCCCAAC

 SerGluAsnLysValValIleLeuAspSerPheAspProLeuValAlaGluGluAspGlu
 4861 AGTCAGAAAACAAAGTGGTGATTCTGGACTCCTTCGATCCGCTTGTGGCGGAGGAGACG
 TCAGTCTTTGTTTCACCACTAAGACCTGAGGAAGCTAGGCGAACACCGCCTCCTCTGC

FIG. 32-5

4921 ArgGluIleSerValProAlaGluIleLeuArgLysSerArgArgPheAlaGlnAlaLeu
AGCGGGAGATCTCCGTACCCGAGAAATCCTGCGGAAGTCTCGGAGATTCGCCCAGGCCC
TCGCCCTCTAGAGGCATGGGCGTCTTTAGGACGCCTTCAGAGCCTCTAAGCGGGTCCGGG

4981 ProValTrpAlaArgProAspTyrAsnProProLeuValGluThrTrpLysLysProAsp
TGCCCGTTTGGGCGCGGCCGACTATAACCCCGCTAGTGGAGACGTGGAAGGACCCG
ACGGGCAAACCCGCGCCGGCTGATATTGGGGGGCGATCACCTCTGCACCTTTTTCGGGG

5041 TyrGluProProValValHisGlyCysProLeuProProProLysSerProProValPro
ACTACGAACCACCTGTGGTCCATGGCTGTCCGCTTCCACCTCCAAAGTCCCCCTCTGTGC
TGATGCTTGGTGGACACCAGGTACCGACAGGCGAAGGTGGAGGTTTCAGGGGAGGACACG

5101 ProProArgLysLysArgThrValValLeuThrGluSerThrLeuSerThrAlaLeuAla
CTCCGCCCTCGAAGAAGCGGACGGTGGTCCCTCACTGAATCAACCTATCTACTGCCTTGG
GAGGCGGAGCCTTCTTTCGCTGCCACCAGGAGTGACTTAGTTGGGATAGATGACGGAACC

5161 GluLeuAlaThrArgSerPheGlySerSerSerThrSerGlyIleThrGlyAspAsnThr
CCGAGCTCGCCACCAGAAGCTTTGGCAGCTCCTCAACTTCCGGCATTACGGGCGACAATA
GGCTCGAGCGGTGGTCTTCGAAACCGTCGAGGAGTTGAAGGCCGTAATGCCCGCTGTTA

5221 ThrThrSerSerGluProAlaProSerGlyCysProProAspSerAspAlaGluSerTyr
CGACAACATCCTCTGAGCCCGCCCCCTTCTGGCTGCCCCCGGACTCCGACGCTGAGTCTT
GCTGTTGTAGGAGACTCGGGCGGGGAAGACCGACGGGGGGCTGAGGCTGCGACTCAGGA

5281 SerSerMetProProLeuGluGlyGluProGlyAspProAspLeuSerAspGlySerTrp
ATTCTCTCATGCCCCCCTGGAGGGGGAGCCTGGGGATCCGGATCTTAGCGACGGGTCAT
TAAGGAGGTACGGGGGGGACCTCCCCCTCGGACCCCTAGGCCTAGAATCGCTGCCCAGTA

5341 SerThrValSerSerGluAlaAsnAlaGluAspValValCysCysSerMetSerTyrSer
GGTCAACGGTCAGTAGTGAGGCCAACGCGGAGGATGTCGTGTGCTGCTCAATGTCTTACT
CCAGTTGCCAGTCATCACTCCGGTTGCGCTCCTACAGCACACGACGAGTTACAGAATGA

5401 TrpThrGlyAlaLeuValThrProCysAlaAlaGluGluGlnLysLeuProIleAsnAla
CTTGGACAGGCGCACTCGTCAACCCGTGCGCCGCGGAAGAACAGAACTGCCCATCAATG
GAACCTGTCCGCTGAGCAGTGGGGCACGCGCGCCTTCTTGCTTTGACGGGTAGTTAC

5461 LeuSerAsnSerLeuLeuArgHisHisAsnLeuValTyrSerThrThrSerArgSerAla
CACTAAGCAACTCGTTGCTACGTCACCACAATTTGGTGTATTCACCACCTCACGCAGTG
GTGATTCTGTTAGCAACGATGCAGTGGTGTAAACCACATAAGGTGGTGGAGTGCGTCAC

5521 CysGlnArgGlnLysLysValThrPheAspArgLeuGlnValLeuAspSerHisTyrGln
CTTGCCAAAGGCAGAAGAAAGTCACATTTGACAGACTGCAAGTTCTGGACAGCCATTACC
GAACGGTTTCCGTCTTCTTTCAGTGTAAACTGTCTGACGTTCAAGACCTGTCCGTAATGG

5581 AspValLeuLysGluValLysAlaAlaAlaSerLysValLysAlaAsnLeuLeuSerVal
AGGACGTACTCAAGGAGGTTAAAGCAGCGCGCTCAAAAGTGAAGGCTAACTTGCTATCCG
TCCTGCATGAGTTCTTCCAATTTCTGTCGCCGAGTTTTCACCTCCGATTGAACGATAGGC

5641 GluGluAlaCysSerLeuThrProProHisSerAlaLysSerLysPheGlyTyrGlyAla
TAGAGGAAGCTTGACGCTGACGCCCCACACTCAGCCAAATCCAAGTTTGGTTATGGGG
ATCTCCTTCGAACGTCGGACTGCGGGGGTGTGAGTGGTTTAGGTTCAAACCAATACCCC

5701 LysAspValArgCysHisAlaArgLysAlaValThrHisIleAsnSerValTrpLysAsp
CAAAAGACGTCCGTGCGCATGCCAGAAAGGCCGTAACCCACATCAACTCCGTGTGGAAAG
GTTTTCTGCAGGCAACGGTACGGTCTTTCGGCATTTGGGTGTAGTTGAGGCACACCTTTC

5761 LeuLeuGluAspAsnValThrProIleAspThrThrIleMetAlaLysAsnGluValPhe
ACCTTCTGGAAGACAATGTAACACCAATAGACACTACCATCATGGCTAAGAACGAGGTTT
TGAAGACCTTCTGTACATTGTGGTTATCTGTGATGGTAGTACCGATTCTTGCTCCAAA

5821 CysValGlnProGluLysGlyGlyArgLysProAlaArgLeuIleValPheProAspLeu
TCTGCGTTCAGCTGAGAAGGGGGGTCTAAGCCAGCTCGTCTCATCGTGTCCCCGATC
AGACGCAAGTCGGACTCTTCCCCCAGCATTCGGTCGAGCAGAGTAGCACAAGGGGCTAG

GlyValArgValCysGluLysMetAlaLeuTyrAspValValThrLysLeuProLeuAla

FIG. 32-6

5881 TGGGCGTGCGCGTGTGCGAAAAAGATGGCTTTGTACGACGTGGTTACAAAGCTCCCCCTGG
 ACCCGCACGCGCACACGCTTTTCTACCGAAACATGCTGCACCAATGTTTCGAGGGGAACC

 ValMetGlySerSerTyrGlyPheGlnTyrSerProGlyGlnArgValGluPheLeuVal
 5941 CCGTGATGGGAAGCTCCTACGGATTCCAATACTACCAGGACAGCGGGTTGAATTCTCG
 GGCCTACCCCTTCGAGGATGCCTAAGGTTATGAGTGGTCTGTGCGCCCACTTAAGGAGC

 GlnAlaTrpLysSerLysLysThrProMetGlyPheSerTyrAspThrArgCysPheAsp
 6001 TGCAAGCGTGGAAGTCCAAGAAAACCCCAATGGGGTTCTCGTATGATACCCGCTGCTTTG
 ACGTTCGCACCTTCAGGTTCTTTTGGGGTTACCCCAAGAGCATACTATGGGCGACGAAAC

 SerThrValThrGluSerAspIleArgThrGluGluAlaIleTyrGlnCysCysAspLeu
 6061 ACTCCACAGTCAC TGAGAGCGACATCCGTACGGAGGAGGCAATCTACCAATGTTGTGACC
 TGAGGTGTCACTGACTCTCGCTGTAGGCATGCCTCCTCCGTTAGATGGTTACAACACTGG

 AspProGlnAlaArgValAlaIleLysSerLeuThrGluArgLeuTyrValGlyGlyPro
 6121 TCGACCCCCAAGCCCGGTGGCCATCAAGTCCCTCACCAGAGAGGCTTTATGTTGGGGGCC
 AGCTGGGGGTTGGGGCGACCGGTAGTTTCAAGGAGTGGCTCTCCGAAATACAACCCCCG

 LeuThrAsnSerArgGlyGluAsnCysGlyTyrArgArgCysArgAlaSerGlyValLeu
 6181 CTCTTACCAATTCAAGGGGGGAGAACTGCGGCTATCGCAGGTGCCGCGGAGCGGCGTAC
 GAGAATGGTTAAGTTCCCCCTCTTGACGCCGATAGCGTCCACGGCGCGCTCGCCGCATG

 ThrThrSerCysGlyAsnThrLeuThrCysTyrIleLysAlaArgAlaAlaCysArgAla
 6241 TGACAAC TAGCTGTGGTAACACCTCACTTGCTACATCAAGGCCCGGGCAGCCTGTTCGAG
 ACTGTTGATCGACACCATGTGAGGAGTGAACGATGTAGTTCCGGGCCCCGTCGGACAGCTC

 AlaGlyLeuGlnAspCysThrMetLeuValCysGlyAspAspLeuValValIleCysGlu
 6301 CCGCAGGGCTCCAGGACTGCACCATGCTCGTGTGTGGCGACGACTTAGTCTGTTATCTGTG
 GCGTCCCGAGGTCTGACGTGGTACGATCAGACACACCGCTGCTGAATCAGCAATAGACAC

 SerAlaGlyValGlnGluAspAlaAlaSerLeuArgAlaPheThrGluAlaMetThrArg
 6361 AAAGCGCGGGGGTCCAGGAGGACGCGGCGAGCCTGAGAGCCTTCACGGAGGCTATGACCA
 TTTTCGCGCCCCAGGTCTCTGCGCCGCTCGGACTCTCGGAAGTGCCTCCGATACTGGT

 TyrSerAlaProProGlyAspProProGlnProGluTyrAspLeuGluLeuIleThrSer
 6421 GGTACTCCGCCCCCTGGGGACCCCCACAACCAGAATACGACTTGGAGCTCATAACAT
 CCATGAGGCGGGGGGACCCCTGGGGGTGTTGGTCTTATGCTGAACCTCGAGTATTGTA

 CysSerSerAsnValSerValAlaHisAspGlyAlaGlyLysArgValTyrTyrLeuThr
 6481 CATGCTCCTCCAACGTGTCAGTCGCCCACGACGGCGCTGGAAAGAGGGTCTACTACCTCA
 GTACGAGGAGGTTGCACAGTCAGCGGGTGTGCGCGACCTTTCTCCAGATGATGGAGT

 ArgAspProThrThrProLeuAlaArgAlaAlaTrpGluThrAlaArgHisThrProVal
 6541 CCCGTGACCCTACAACCCCTCGCGAGAGCTGCGTGGGAGACAGCAAGACACACTCCAG
 GGGCACTGGGATGTTGGGGGAGCGCTCTCGACGCACCTCTGTCTGTTCTGTGTGAGGTC

 AsnSerTrpLeuGlyAsnIleIleMetPheAlaProThrLeuTrpAlaArgMetIleLeu
 6601 TCAATTCTGGCTAGGCAACATAATCATGTTTGGCCCCACACTGTGGGCGAGGATGATAC
 AGTTAAGGACCGATCCGTGTATTAGTACAAACGGGGTGTGACACCCGCTCCTACTATG

 MetThrHisPhePheSerValLeuIleAlaArgAspGlnLeuGluGlnAlaLeuAspCys
 6661 TGATGACCCATTTCTTTAGCGTCTTATAGCCAGGAGCAGCTTGAACAGGCCCTCGATT
 ACTACTGGGTAAAGAAATCGCAGGAATATCGGTCCCTGGTCAACTTGTCCGGGAGCTAA

 GluIleTyrGlyAlaCysTyrSerIleGluProLeuAspLeuProProIleIleGlnArg
 6721 GCGAGATCTACGGGCTGTACTACTCCATAGAACCCTTGATCTACCTCCAATCATTCAAA
 CGCTCTAGATGCCCCGACGATGAGGTATCTTGGTGAAC TAGATGGAGGTTAGTAAGTTT

 Leu
 6781 GACTC
 CTGAG

FIG. 32-7

- 90 -

FIG. 33

1	1	NANB	0	9
2	1	NANB	76	71
3	1	NANB	110	19
4	1	NANB	154	N/A
5	2	NANB	0	5
6	2	NANB	21	52
7	2	NANB	73	13
8	2	NANB	130	N/A
9	3	NANB	0	8
10	3	NANB	43	205
11	3	NANB	53	14
12	3	NANB	159	6
13	4	NANB	-3	11
14	4	NANB	55	132
15	4	NANB	83	N/A
16	4	NANB	140	N/A
17	5	HAV	0	4
18	5	HAV	25	147
19	5	HAV	40	18
20	5	HAV	268	5
21	6	HAV	-8	N/A
22	6	HAV	15	106
23	6	HAV	41	10
24	6	HAV	129	N/A
26	7	HAV	0	7
27	7	HAV	22	83
28	7	HAV	115	5
29	7	HAV	139	N/A
30	8	HAV	0	15
31	8	HAV	26	130
32	8	HAV	74	8
33	8	HAV	205	5
34	9	HBV	-290	N/A
35	9	HBV	379	9
36	9	HBV	435	6
37	10	HBV	0	8
38	10	HBV	111-118	96-156
39	10	HBV	205	9
40	10	HBV	240	13
41	11	HBV	0	11
42	11	HBV	28-56	8-100
43	11	HBV	169	9
44	11	HBV	223	10

[illegible]

HBV		HBV		HBV		HAV		HAV	
223		240		379		74		22	
169		205		435		26		115	
42		115		-290		0		139	
0		0		205		0		5	
54		126		9		130		15	
9		8		6		8		7	
10		13		5		8		83	
		9		1					
		11							
		13							
		169							
		223							

- 92 -

FIG. 34

1	1 ¹	NANB	1354
2	1 ¹	NANB	31
3	2 ¹	NANB	14
4	2 ¹	NANB	79
5	2 ¹	NANB	26
6	3 ¹	NANB	78
7	3 ¹	NANB	87
8	3 ¹	NANB	25
9	4 ¹	NANB	60
10	4 ¹	NANB	13
11	5 ¹	NANB	298
12	5 ¹	NANB	101
13	6 ¹	NANB	474
14	6 ¹	NANB	318
15	7 ¹	NANB	20
16	7 ¹	NANB	163
17	8 ¹	NANB	44
18	8 ¹	NANB	50
19	9	NANB	N/A
20	10	NANB	N/A
21	11	NANB	N/A
22	12		N/A
23	13		N/A
24	14		N/A
26	30174		N/A
27	30105		N/A
28	30072		N/A
29	30026		N/A
30	30146		N/A
31	30250		N/A
32	30071		N/A
33	15	HAV	N/A
34	16	HAV	N/A
35	17	HAV	N/A
36	18	HAV	N/A
37	48088	HAV	N/A
38	47288	HAV	N/A
39	47050	HAV	N/A
40	46997	HAV	N/A
41	19	HBV	N/A
42	20	(-HBSag+ve;	N/A
43	21	(-HBCag+ve)	N/A
44	22	(-HBSag+ve;	N/A
45	23	(-HBCag+ve)	N/A
46	24	(-HBSag+ve;	N/A
47	25	(-HBCag+ve)	N/A
48	26	(-HBSag+ve;	N/A
49	27	(-HBSag+ve)	N/A

FIG. 34-1

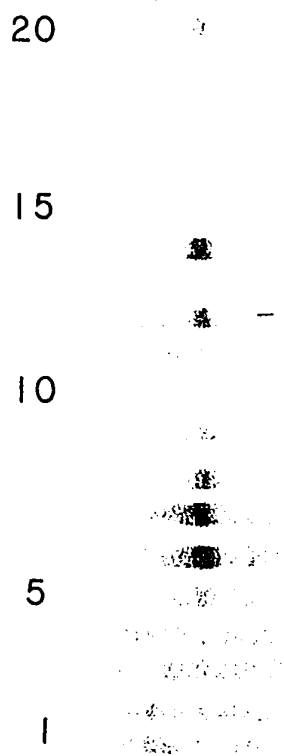
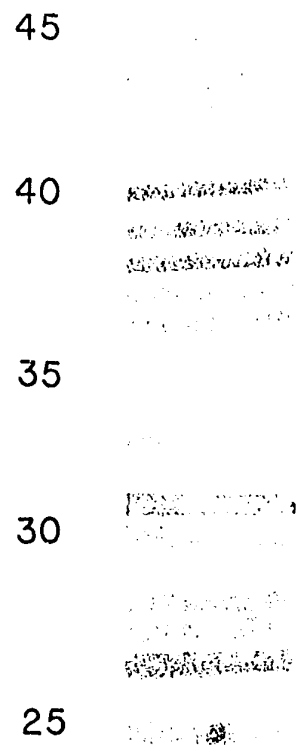
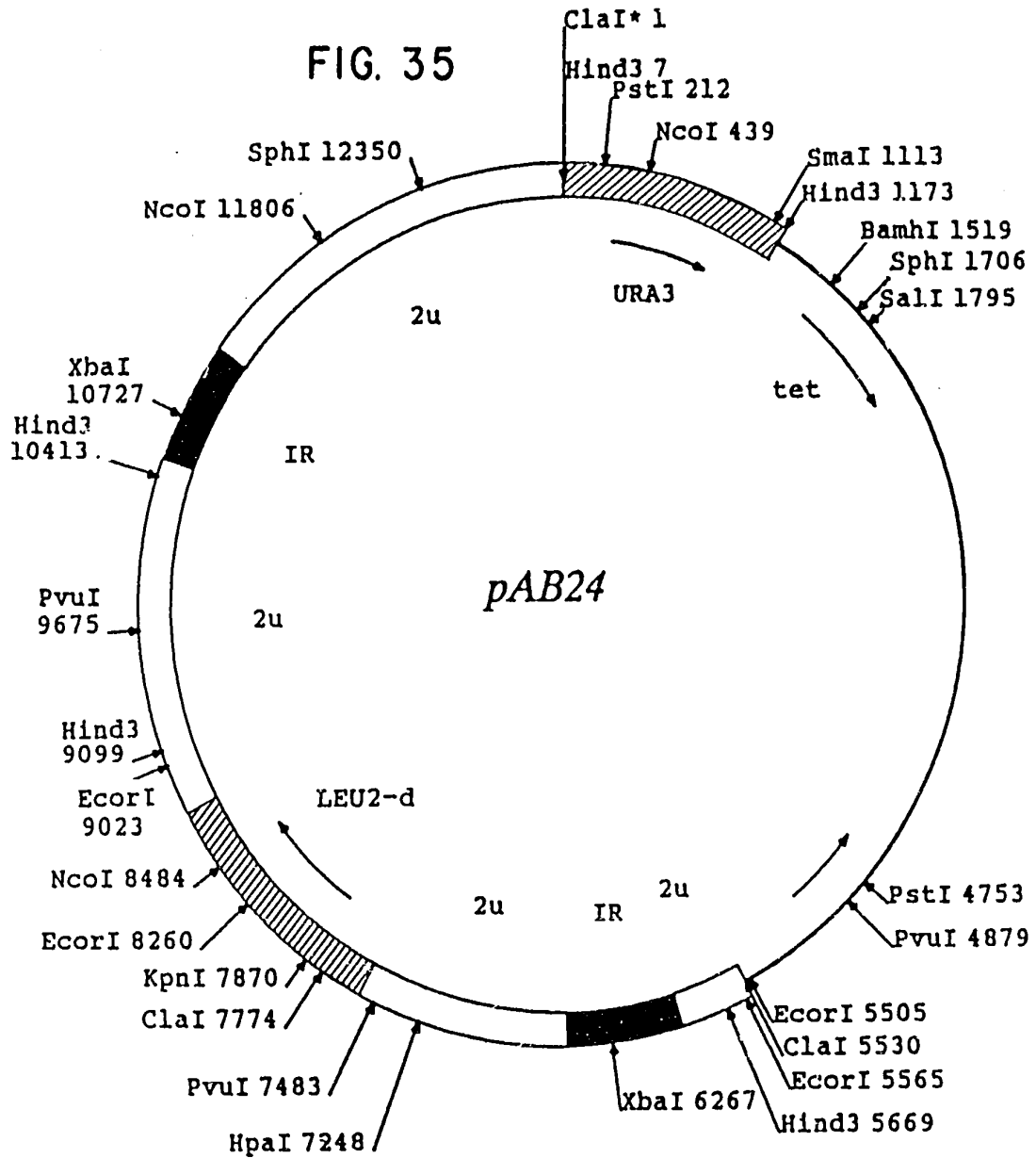


FIG. 34-2





AlaCysGlyValIleGlyIleAlaGlnAsnLeuGlyIleArgAspAlaHisPheLeuSer
1 GCTTGTGGTGTAATTGGGATCGCCAGAAATTGGGAATTCGGGATGCCACTTTCTATCC
CGAACACCATTAACCCTAGCGGTCTTAAACCCTAAGCCCTACGGGTGAAAGATAGG

>>

GlnThrLysGlnSerGlyGluAsnLeuProTyrLeuValAlaTyrGlnAlaThrValCys
61 CAGACAAAGCAGAGTGGGGAGAACCCTTCTTACCTGGTAGCGTACCAAGCCACCGTGTGC
GTCTGTTTTCTCTCACCCCTCTTGAAGGAATGGACCATCGCATGGTTCGGTGGCACACG

AlaArgAla AlaProProProSerTrpAspGlnMetTrpLysCysLeuIleArgLeu
121 GCTAGGGCTCAAGCCCCTCCCCATCGTGGGACCAGATGTGGAAGTGTTCGATTCGCCCTC
CGATCCCCGAGTTTCGGGGAGGGGTAGCACCTGGTCTACACCTTCACAACTAAGCGGAG

LysProThrLeuHisGlyProThrProLeuLeuTyrArgLeuGlyAlaValGlnAsnGlu
181 AAGCCCCACCTCCATGGGCCAACACCCTGCTATACAGACTGGGCGCTGTTTTCAGAATGAA
TTCGGGTGGGAGGTACCCGGTTGTGGGGACGATATGTCTGACCCGCGACAAGTCTTACTTT

IleThrLeuThrHisProValThrLysTyrIleMetThrCysMetSerAlaAspLeuGlu
241 ATCACCTGACGCACCCAGTCACCAAATACATCATGACATGCATGTTCGGCCGACCTGGAG
TAGTGGGACTGCGTGGGTGAGTGGTTTATGTAGTACTGTACGTACAGCCGGCTGGACCTC

ValValThrSerThrTrpValLeuValGlyGlyValLeuAlaAlaLeuAlaAlaTyrCys
301 GTCGTACGAGCACCTGGGTGCTCGTTGGCGGCGTCTGGCTGCTTTGGCCGCGTATTGC
CAGCAGTGCTCGTGGACCCACGAGCAACCGCCGACGACCGACGAAACCGGCGCATAACG

LeuSerThrGlyCysValValIleValGlyArgValValLeuSerGlyLysProAlaIle
361 CTGTCAACAGGCTGCGTGGTCATAGTGGGCAGGGTCTGCTTGTCCGGGAAGCCGGCAATC
GACAGTTGTCCGACGCACCAAGTATCACCCGTCCAGCAGAACAGGCCCTTCGGCCGTTAG

IleProAspArgGluValLeuTyrArgGluPheAspGluMetGluGluCysSerGlnHis
421 ATACCTGACAGGGAAGTCTCTACCGAGAGTTCGATGAGATGGAAGAGTGTCTCTCAGCAC
TATGGACTGTCCCTTCAGGAGATGGCTCTCAAGTACTCTACCTTCTCAGGAGATCGTG

LeuProTyrIleGluGlnGlyMetMetLeuAlaGluGlnPheLysGlnLysAlaLeuGly
481 TTACCGTACATCGAGCAAGGGATGATGCTCGCCGAGCAGTTCAAGCAGAAGGCCCTCGGC
AATGGCATGTAGCTCGTTCCCTACTACGAGCGGCTCGTCAAGTTCGTCTTCCGGGAGCCG

LeuLeuGlnThrAlaSerArgGlnAlaGluValIleAlaProAlaValGlnThrAsnTrp
541 CTCCTGCAGACCGCGTCCCGTCAGGCAGAGTTATCGC'CCCTGCTGTCCAGACCAACTGG
GAGGACGTCTGGCGCAGGGCAGTCCGTCTCCAATAGCGGGGACGACAGGTCTGGTTGACC

GlnLysLeuGluThrPheTrpAlaLysHisMetTrpAsnPheIleSerGlyIleGlnTyr
601 CAAAACTCGAGACCTTCTGGGCGAAGCATATGTGGAACCTTCATCAGTGGGATACAATAC
GTTTTTGAGCTCTGGAAGACCCGCTTCGTATACACCTTGAAGTAGTACCCTATGTTATG

LeuAlaGlyLeuSerThrLeuProGlyAsnProAlaIleAlaSerLeuMetAlaPheThr
661 TTGGCGGGCTTGTC AACGCTGCCTGGTAACCCCGCCATTGCTTCATTGATGGCTTTTACA
AACCGCCGAACAGTTGCGACGGACCATTGGGGCGGTAACGAAGTAACACCGAAAATGT

AlaAlaValThrSerProLeuThrThrSerGlnThrLeuLeuPheAsnIleLeuGlyGly
721 GCTGTGTACACAGCCACTAACCCTAGCCAAACCCTCCTCTTCAACATATTGGGGGGG
CGACGACAGTGGTTCGGGTGATTGGTGATCGGTTTGGGAGGAGAAGTTGTATAACCCCCC

TrpValAlaAlaGlnLeuAlaAlaProGlyAlaAlaThrAlaPheValGlyAlaGlyLeu
781 TGGGTGGCTGCCCAGCTCGCCGCCCCCGGTGCCGCTACTGCCTTTGTGGGCGCTGGCTTA
ACCCACCGACGGGTGAGCGGGCGGGGGCCACGGCGATGACGGAACACCCGCGACCGAAT

AlaGlyAlaAlaIleGlySerValGlyLeuGlyLysValLeuIleAspIleLeuAlaGly
841 GCTGGCGCCGCCATCGGCAGTGTGGACTGGGGAAGGTCTCATAGACATCCTTGCAGGG

FIG. 36-2

FIG. 36-2



FIG. 37 a

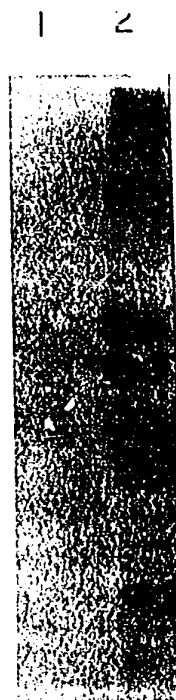


FIG. 37 b

1 2 3

A

FIG. 39

1 2 3 4

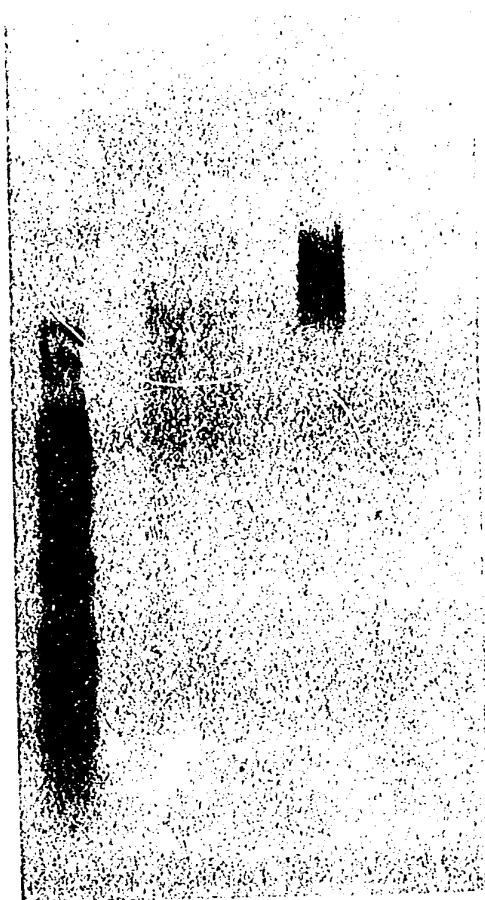


FIG. 38

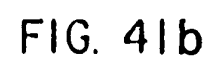
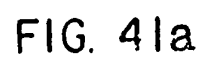
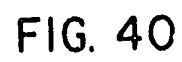


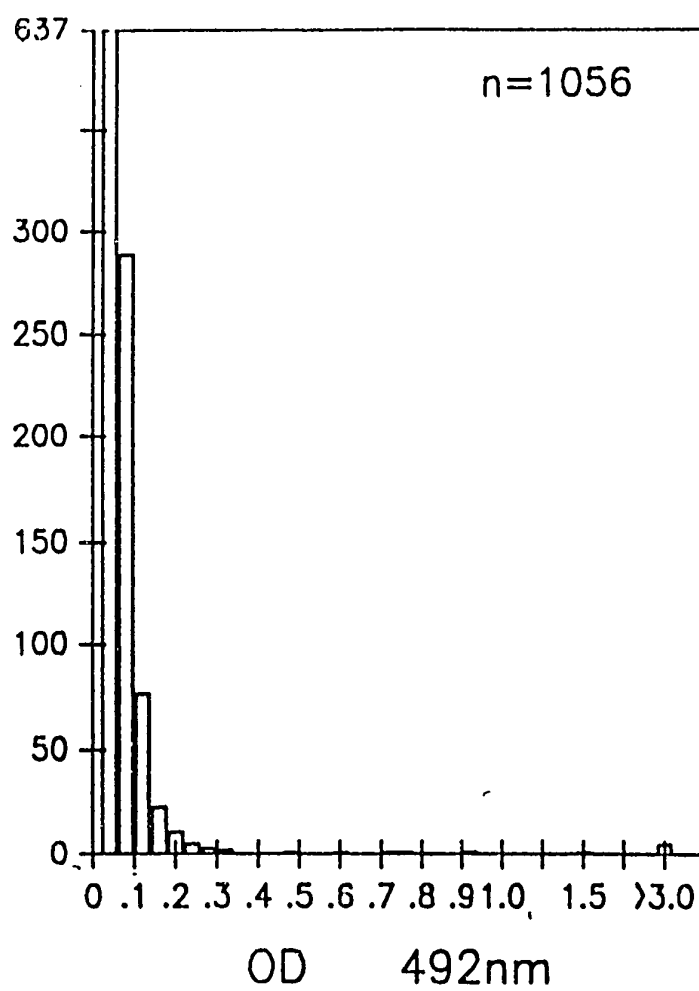
FIG. 42-1

HCV	10	20	30	40	50
	EVVLLFLLLADARVC	SCLWMMLLISQAE	AALNLVILNAAS	LAGTHGLVSFLV	FFCF
MNWVD1	AVSFVTLITGNMS	FRDLGRVMVMVG	ATMTDDIGMGV	TYLALLAAFKVR	PFTAAGLLLRKL
	130	140	150	160	170 180
HCV	60	70	80	90	100 110
	WYLKGKWP	GAVYTFYGMW	PLLLLLLALP	QRAYALDTEVA	ASCGGVVLVGLMAL
MNWVD1	TSKELMMTTIGIV	LLSQSTIPETILE	LTDALALGMMVL	KMVRKMEKYQLA	VTIMAILCVP
	190	200	210	220	230 240
HCV	120	130	140	150	160 170
	KRYISWCLWLQY	FLTRVEAQLH	WIPPLNVRGGR	DAVILLMCAVH	PTLVFDITKLLAV
MNWVD1	NAVILQNAWKV	SCTILAVVSPL	FLTSSQKADWI	PLALTIKGLNP	TAIF-LTTLSRTN
	250	260	270	280	290
HCV	180	190	200	210	220 230
	FGPLWILQASLL	KVPYF-VRVQGL	LRFCALARKMIG	GHHYVQMVI	IKLGALTGTYYNHL
MNWVD1	KKRSWPLNEA	IMAVGMVSIL	ASSLLKNDIP	MTGPLVAGGL	LTVCYV-LTGRSADLELERA
	300	310	320	330	340 350
HCV	240	250	260	270	280 290
	TPLRDWAHNG	LRDLAVAVEP	VVFSQMETKL	ITWGADTAAC	GDIINGLPVSARRGREILLG
MNWVD1	ADV-KWEDQAE	ISGSSPILSIT	ISE-DGSM	SIKNEEQTLT	ILIRTGLLVISG---LFP
	360	370	380	390	400 410
HCV	300	310	320	330	340 350
	PADGMVSKGW	KLLAPITAYA	QQTGRLLGCI	ITSLTGRDKN	QVEGEVQIVSTAAQTFLATC
MNWVD1	VSIPJTAAAW	YLWEVKQR	AGVLWDVSP	PPVPGKAELE	DGAYRIKQKGI
	420	430	440	450	460 470
HCV	360	370	380	390	400 410
	INGVCWTVYH	GAGTRTIA	SPKGPVIQMY	TNVDQDLV----	GWPAPQGSRLTPCTCGSSD
MNWVD1	KECTFI	TMWHIVTR	GAVLMHKG	KRIEPSWADV	KKDLVSCGGGWKLEGEWKEGEEVQVLALE
	480	490	500	510	520 530
HCV	420	430	440	450	460 470
	LYLVTRIADV	IPVRRRGDS	RGSLLSPRP	ISYLGSSGG	PLLPAGHAVGIFRAAVCTRGV
MNWVD1	PGKNPRAVQ	TKPGLF	KTN--AGTIG	AVSLDFSPG	TSGSPIIDKKGKVVG
	540	550	560	570	580 590
HCV	480	490	500	510	520 530
	AKAVDFIP	VENLET	TMRS	SPVFTDNSS	PPVVPQSFQVAHLHAPTGS
MNWVD1	AYVSAIAQ	TEK--SIED	NPEIEDDIF	RK--RKL	TIMDLHPGAGKTKRYLPAIVRGAIKR
	600	610	620	630	640
	540	550	560	570	580

FIG. 42-2

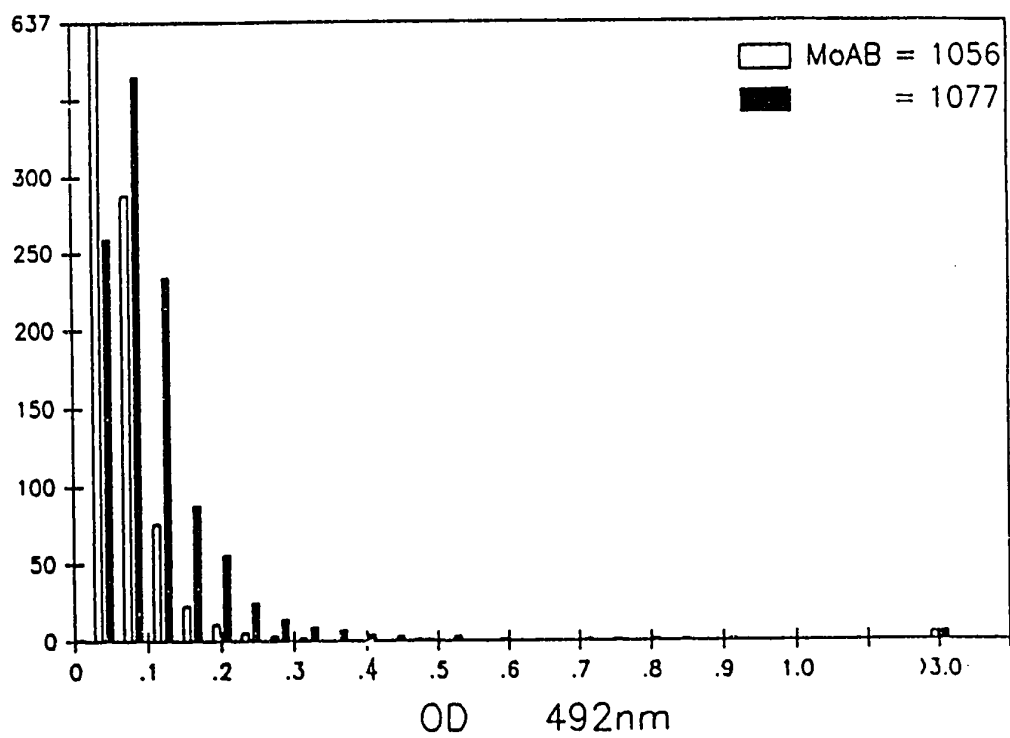
- 101 -

FIG. 43



- 103 -

FIG. 44



-104-

FIG. 45

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

FIG. 46-1

GlyCysProGluArgLeuAlaSerCysArgProLeuThrAspPheAspGlnGlyTrpGly
 1 CAGGCTGTCTGAGAGGCTAGCCAGCTGCCGACCCCTTACCGATTTTGACCAGGGCTGGG
 GTCCGACAGGACTCTCCGATCGGTCGACGGCTGGGGAATGGCTAAAC'TGGTCCCGACCC

ProIleSerTyrAlaAsnGlySerGlyProAspGlnArgProTyrCysTrpHisTyrPro
 61 GCCCTATCAGTTATCCCAACGGAAGCGGCCCGACAGCGCCCTACTGCTGGCACTACC
 CGGGATAGTCAATACGGTTGCC'TTCGCCGGGGCTGGTCGCGGGGATGACGACCGTGATGG

ProLysProCysGlyIleValProAlaLysSerValCysGlyProValTyrCysPheThr
 121 CCCCCAACCTTGCGGTATTGTGCCCGCGAAGAGTGTGTGTGGTCCGGTATATTGCTTCA
 GGGGTTT'TGGAACGCCATAACACGGGCGCTTCTCACACACACCAGGCCATATAACGAAGT

ProSerProValValValGlyThrThrAspArgSerGlyAlaProThrTyrSerTrpGly
 181 CTCCAGCCCCGTGGTGGTGGGAACGACCGACAGGTCCGGGCGCGCCACCTACAGCTGGG
 GAGGTCCGGGCACCAACCACCTTGCTGGCTGTCCAGCCCGCGGGTGGATGTCGAGCC

GluAsnAspThrAspValPheValLeuAsnAsnThrArgProProLeuGlyAsnTrpPhe
 241 GTGAAATGATACGACGTCTTCGTCCTTAACAATACCAGGCCACCGCTGGGCAATTGGT
 CACTTTTACTATGCCTGCAGAAGCAGGAATTGTTATGGTCCGGTGGCGACCCGTTAACCA

GlyCysThrTrpMetAsnSerThrGlyPheThrLysValCysGlyAlaProProCysVal
 301 TCGGTTGTACCTGGATGAACTCAACTGGATTACCAAAGTGTGCGGAGCGCCTCCTTGTTG
 AGCCAACATGGACCTACTTGAGTTGACCTAAGTGGTTTCACACGCCTCGCGGAGGAACAC

IleGlyGlyAlaGlyAsnAsnThrLeuHisCysProThrAspCysPheArgLysHisPro
 361 TCATCGGAGGGGCGGGCAACAACACCCTGCACTGCCCCACTGATTGCTTCCGCAAGCATC
 AGTAGCCTCCCCGCGCGTGTGTGGGACGTGACGGGGTGACTAACGAAGGCGTTCGTAG

AspAlaThrTyrSerArgCysGlySerGlyProTrpIleThrProArgCysLeuValAsp
 421 CGGACGCCACATACTCTCGGTGCGGCTCCGGTCCCTGGATCACACCCAGGTGCCTGGTGC
 GCCTGCGGTGTATGAGAGCCACGCCGAGGCCAGGGACCTAGTGTGGGTCCACGGACCAGC

 TyrProTyrArgLeuTrpHisTyrProCysThrIleAsnTyrThrIlePheLysIleArg
 481 ACTACCCGTATAGGCTTTGGCATTATCCTTGTACCATCAACTACACTATATTTAAATCA
 TGATGGGCATATCCGAAACCGTAATAGGAACATGGTAGTTGATGTGATATAAATTTTAGT

 MetTyrValGlyGlyValGluHisArgLeuGluAlaAlaCysAsnTrpThrArgGlyGlu
 541 GGATGTACGTGGGAGGGGTCGAGCACAGGCTGGAAGCTGCCTGCAACTGGACGCGGGCG
 CCTACATGCACCTCCCCAGCTCGTGTCCGACCTTCGACGGACGTTGACCTGCGCCCCGC

 ArgCysAspLeuGluAspArgAspArgSerGluLeuSerProLeuLeuLeuThrThrThr
 601 AACGTTGCGATCTGGAAGATAGGGACAGGTCCGAGCTCAGCCGTTACTGCTGACCACTA
 TTGCAACGCTAGACCTTCTATCCCTGTCCAGGCTCGAGTCGGGCAATGACGACTGGTGAT

 GlnTrpGlnValLeuProCysSerPheThrThrLeuProAlaLeuSerThrGlyLeuIle
 661 CACAGTGGCAGGTCTCTCCGTGTTCTTCACAACCCTGCCAGCCTTGTCACCGGCCTCA
 GTGTACCGTCCAGGAGGGCACAAGGAAGTGTGGGACGGTCGGAACAGGTGGCCGGAGT

 HisLeuHisGlnAsnIleValAspValGlnTyrLeuTyrGlyValGlySerSerIleAla
 721 TCCACCTCCACCAGAACATTGTGGACGTGCAGTACTTGTACGGGGTGGGGTCAAGCATCG
 AGGTGGAGGTGGTCTTGTAAACACCTGCACGTCATGAACATGCCCCACCCAGTTCGTAGC

 SerTrpAlaIleLysTrpGluTyrValValLeuLeuPheLeuLeuAlaAspAlaArg
 781 CGTCCTGGGCCATTAAAGTGGGAGTACGTGCTCCTCCTGTTCTTCTGCTTGACAGCGCG
 GCAGGACCCGGTAATTCACCTCATGCAGCAGGAGGACAAGGAAGACGAACGTCTGCGCG

- 106 -

ValCysSerCysLeuTrpMetMetLeuLeuIleSerGlnAlaGluAlaAlaLeuGluAsn
 841 GCGTCTGCTCCTGCTTGTGGATGATGCTACTCATATCCCAAGCGGAAGCGGCTTTGGAGA
 CGCAGACGAGGACGAACACCTACTACGATGAGTATAGGGTTCGCCCTCGCCGAAACCTCT

LeuValIleLeuAsnAlaAlaSerLeuAlaGlyThrHisGlyLeuValSerPheLeuVal
 901 ACCTCGTAATACTTAATGCAGCATCCCTGGCCGGGACGCACGGTCTTGTATCCTTCCTCG
 TGGAGCATTATGAATTACGTCGTAGGGACCGGCCCTGCCGTGCCAGAACATAGGAAGGAGC

PhePheCysPheAlaTrpTyrLeuLysGlyLysTrpValProGlyAlaValTyrThrPhe
 961 TGTTCTTCTGCTTTGCATGGTATCTGAAGGGTAAAGGGTGCCCGAGCGGTCTACACCT
 ACAAGAAGACGAAACGTACCATAGACTTCCCATTCACCCACGGGCCCTCGCCAGATGTGGA

TyrGlyMetTrpProLeuLeuLeuLeuLeuLeuAlaLeuProGlnArgAlaTyrAlaLeu
 1021 TCTACGGGATGTGGCCTCTCCTCCTGCTCCTGTTGGCGTTGCCCCAGCGGGCGTACGCGC
 AGATGCCCTACACGGAGAGGAGGACGAGGACAACCGCAACGGGGTCGCCCCGATGCGCG

AspThrGluValAlaAlaSerCysGlyGlyValValLeuValGlyLeuMetAlaLeuThr
 1081 TGGACACGGAGGTGGCCGCGTCGTGTGGCGGTGTGTCTCGTCGGGTGATGGCGCTAA
 ACCTGTGCCTCCACGGCGCAGCAACCGCCACAACAAGAGCAGCCCACTACCGCGATT

LeuSerProTyrTyrLysArgTyrIleSerTrpCysLeuTrpTrpLeuGlnTyrPheLeu
 1141 CTCTGTCAACCATATTACAAGCGCTATATCAGCTGGTGCTTGTGGTGGCTTCAGTATTTTC
 GAGACAGTGGTATAATGTTCGCGATATAGTCGACCACGAACACCACCGAAGTCATAAAAG

ThrArgValGluAlaGlnLeuHisValTrpIleProProLeuAsnValArgGlyGlyArg
 1201 TGACCAGAGTGGAAGCGCAACTGCACGTGTGGATTCCCCCCTCAACGTCCGAGGGGGGC
 ACTGGTCTACCTTCGCGTTGACGTGCACACCTAAGGGGGGGAGTTGCAGGCTCCCCCG

AspAlaValIleLeuLeuMetCysAlaValHisProThrLeuValPheAspIleThrLys
 1261 GCGACGCTGTCATCTTACTCATGTGTGCTGTACACCGACTCTGGTATTTGACATACCA
 CGCTGCGACAGTAGAATGAGTACACACGACATGTGGGCTGAGACCATAAACTGTAGTGGT

LeuLeuLeuAlaValPheGlyProLeuTrpIleLeuGlnAla
 1321 AATTGCTGCTGGCCGTCTTCGGACCCCTTTGGATTCTTCAAGCCAG
 TTAACGACGACCGGCAGAAGCCTGGGGAACCTAAGAAGTTCGGTC

FIG. 46-2

-107-

FIG. 47-1

GlyCysProGluArgLeuAlaSerCysArgProLeuThrAspPheAspGlnGlyTrpGly
 1 CAGGCTGTCCTGAGAGGCTAGCCAGCTGCCGACCCCTTACCGATTTTGACCAGGGCTGGG
 GTCCGACAGGACTCTCCGATCGGTTCGACGGCTGGGGAATGGCTAAACTGGTCCCGACCC

ProIleSerTyrAlaAsnGlySerGlyProAspGlnArgProTyrCysTrpHisTyrPro
 61 GCCCTATCAGTTATGCCAACGGAAGCGGCCCGACCGAGCGCCCTACTGCTGGCACTACC
 CGGGATAGTCAATACGGTTGCCTTCGCCGGGGCTGGTCGCGGGGATGACGACCGTGATGG

ProLysProCysGlyIleValProAlaLysSerValCysGlyProValTyrCysPheThr
 121 CCCCCAAACCTTGCGGTATTGTGCCCCGGAAGAGTGTGTGGTCCGGTATATTGCTTCA
 GGGGTTTTGGAACGCCATAACACGGGCGCTTCTCACACACACCAGGCCATATAACGAAGT

ProSerProValValValGlyThrThrAspArgSerGlyAlaProThrTyrSerTrpGly
 181 CTCCCAGCCCCGTGGTGGTGGGAACGACCGACAGGTCCGGCGCGCCACCTACAGCTGGG
 GAGGGTCGGGGCACCACCACCCTTGCTGGCTGTCCAGCCCGCGCGGGTGGATGTCGACCC

GluAsnAspThrAspValPheValLeuAsnAsnThrArgProProLeuGlyAsnTrpPhe
 241 GTGAAAATGATACGGACGTCTTCGTCTTAACAATACCAGGCCACCGCTGGGCAATTGGT
 CACTTTTACTATGCCTGCAGAAGCAGGAATTGTTATGGTCCGGTGGCGACCCGTTAACCA

GlyCysThrTrpMetAsnSerThrGlyPheThrLysValCysGlyAlaProProCysVal
 301 TCGGTTGTACCTGGATGAACCTCAACTGGATTACACAAAGTGTGCGGAGCGCCTCCTTGTG
 AGCCAACATGGACCTACTTGAGTTGACCTAAGTGGTTTCACACGCCCTCGCGGAGGAACAC

IleGlyGlyAlaGlyAsnAsnThrLeuHisCysProThrAspCysPheArgLysHisPro
 361 TCATCGGAGGGGCGGGCAACAACACCCTGCACTGCCCCACTGATTGCTTCCGCAAGCATC
 AGTAGCCTCCCCGCCCGTTGTTGTGGGACGTGACGGGGTGACTAACGAAGGCGTTCTGTAG

AspAlaThrTyrSerArgCysGlySerGlyProTrpIleThrProArgCysLeuValAsp
 421 CGGACGCCACATACTCTCGGTGCGGCTCCGGTCCCTGGATCACACCCAGGTGCTTGGTTCG
 GCCTGCGGTGTATGAGAGCCACGCCGAGGCCAGGGACCTAGTGTGGGTCCACGGACCAGC

TyrProTyrArgLeuTrpHisTyrProCysThrIleAsnTyrThrIlePheLysIleArg
 481 ACTACCCGTATAGGCTTTGGCATTATCCTTGTACCATCAACTACACCATATTTAAATCA
 TGATGGGCATATCCGAAACCGTAATAGGAACATGGTAGTTGATGTGGTATAAATTTAGT

MetTyrValGlyGlyValGluHisArgLeuGluAlaAlaCysAsnTrpThrArgGlyGlu
 541 GGATGTACGTGGGAGGGGTGCAACACAGGCTGGAAGCTGCCTGCAACTGGACGCGGGGCG
 CCTACATGCACCCFCCCCAGCTTGTGTCCGACCTTCGACGGACGTTGACCTGCGCCCCCGC

ArgCysAspLeuGluAspArgAspArgSerGluLeuSerProLeuLeuLeuThrThrThr
 601 AACGTTGCGATCTGGAAGACAGGGACAGGTCCGAGCTCAGCCCGTTACTGCTGACCACTA
 TTGCAACGCTAGACCTTCTGTCCCTGTCCAGGCTCGAGTCGGGCAATGACGACTGGTGAT

GlnTrpGlnValLeuProCysSerPheThrThrLeuProAlaLeuSerThrGlyLeuIle
 661 CACAGTGGCAGGTCCTCCCGTGTTCCTTCAACAACCCTACCAGCCTTGTCACCGGCCCTCA
 GTGTCACCGTCCAGGAGGGCACAAGGAAGTGTGGGATGGTTCGGAACAGGTGGCCGGAGT

HisLeuHisGlnAsnIleValAspValGlnTyrLeuTyrGlyValGlySerSerIleAla
 721 TCCACCTCCACCAGAACATTGTGGACGTTCAGTACTTGTACGGGGTGGGGTCAAGCATCG
 AGGTGGAGGTGGTCTTGTAACACCTGCACGTCATGAACATGCCCCACCCAGTTCGTAGC

SerTrpAlaIleLysTrpGluTyrValValLeuLeuPheLeuLeuLeuAlaAspAlaArg
 781 CGTCTTGCGCCATTAAGTGGGAGTACGTCGTTCTCCTGTTCTTCTGCTTGACAGCGCGC
 GCAGGACCCGGTAATTCACCTCATGCAGCAAGAGGACAAGGAAGACGAACGTCGCGCC

ValCysSerCysLeuTrpMetMetLeuLeuIleSerGlnAlaGluAlaAlaLeuGluAsn
 841 GCGTCTGCTCCTGCTTGTGGATGATGCTACTCATATCCCAAGCGGAGGCGGCTTTGGAGA
 CGCAGACGAGGACGAACACCTACTACGATGAGTATAGGGTTCGCCTCCGCCGAAACCTCT

LeuValIleLeuAsnAlaAlaSerLeuAlaGlyThrHisGlyLeuValSerPheLeuVal
 901 ACCTCGTAATACTTAATGCAGCATCCCTGGCCGGGACGCACGGTCTTGATCCTTCCTCG
 TGGAGCATTATGAATTACGTCGTAGGGACCGGCCCTGCGTGCCAGAACATAGGAAGGAGC

PhePheCysPheAlaTrpTyrLeuLysGlyLysTrpValProGlyAlaValTyrThrPhe
 961 TGTTCCTCTGCTTTGCATGGTATTTGAAGGGTAAGTGGGTGCCCCGAGCGGTCTACACCT
 ACAAGAAGACGAAACGTACCATAAACTTCCCATTACCCACGGGCCTCGCCAGATGTGGA

 TyrGlyMetTrpProLeuLeuLeuLeuLeuAlaLeuProGlnArgAlaTyrAlaLeu
 1021 TCTACGGGATGTGGCCTCTCCTCCTGCTCCTGTTGGCGTTGCCCCAGCGGGCGTACGCGC
 AGATGCCCTACACCGGAGAGGAGGACGAGGACAACCGCAACGGGGTCGCCCCGATGCGCG

 AspThrGluValAlaAlaSerCysGlyGlyValValLeuValGlyLeuMetAlaLeuThr
 1081 TGGACACGGAGGTGGCCGCGTCGTGTGGCGGTGTTGTTCTCGTCGGGTGATGGCGCTGA
 ACCTGTGCCTCCACCGGCGCAGCACACCGCCACAACAAGAGCAGCCCACTACCGCGACT

 LeuSerProTyrTyrLysArgTyrIleSerTrpCysLeuTrpTrpLeuGlnTyrPheLeu
 1141 CTCTGTCAACCATATTACAAGCGCTATATCAGCTGGTGCTTGTGGTGGCTTCAGTATTTTC
 GAGACAGTGGTATAATGTTTCGCGATATAGTCGACCACGAACACCACCGAAGTCATAAAAG

 ThrArgValGluAlaGlnLeuHisValTrpIleProProLeuAsnValArgGlyGlyArg
 1201 TGACCAGAGTGAAGCGCAACTGCACGTGTGGATTCCCCCCTCAACGTCCGAGGGGGGC
 ACTGGTCTCACCTTCGCGTTGACGTGCACACCTAAGGGGGSGAGTTGCAGGCTCCCCCG

 AspAlaValIleLeuLeuMetCysAlaValHisProThrLeuValPheAspIleThrLys
 1261 GCGACGCCGTATCTTACTCATGTGTGCTGTACACCGACTCTGGTATTTGACATACCA
 CGCTGCGGCAGTAGAATGAGTACACACGACATGTGGGCTGAGACCATAAACGTAGTGGT

 LeuLeuLeuAlaValPheGlyProLeuTrpIleLeuGlnAlaSerLeuLeuLysValPro
 1321 AATTGCTGCTGGCCGTCTTCGGACCCCTTTGGATTCTTCAAGCCAGTTTGCTTAAAGTAC
 TTAACGACGACCGGCAGAAGCCTGGGGAAACCTAAGAAGTTCGGTCAAACGAATTTTCATG

 TyrPheValArgValGlnGlyLeuLeuArgPheCysAlaLeuAlaArgLysMetIleGly
 1381 CCTACTTTGTGCGCGTCCAAGGCCTTCTCCGGTCTGCGCGTTAGCGCGGAAGATGATCG
 GGATGAAACACGCGCAGGTTCCGGAAGAGGCCAAGACGCGCAATCGCGCCTTCTACTAGC

 GlyHisTyrValGlnMetValIleIleLysLeuGlyAlaLeuThrGlyThrTyrValTyr
 1441 GAGGCCATTACGTGCAAATGGTCATCATTAAGTTAGGGGCGCTTACTGGCACCTATGTTT
 CTCCGGTAATGCACGTTTACCAGTAGTAATTCATCCCCGCGAATGACCGTGGATACAAA

 AsnHisLeuThrProLeuArgAspTrpAlaHisAsnGlyLeuArgAspLeuAlaValAla
 1501 ATAACCATCTCACTCCTCTTCGGGACTGGGCGCACAACGGCTTGCAGATCTGGCCGTGG
 TATTGGTAGAGTGAGGAGAAGCCCTGACCCGCGTGTGCGGAACGCTCTAGACCGGCACC

 ValGluProValValPheSerGlnMetGluThrLysLeuIleThrTrpGlyAlaAspThr
 1561 CTGTAGAGCCAGTCGTCTTCTCCCAAATGGAGACCAAGCTCATCACGTGGGGGGCAGATA
 GACATCTCGGTCAGCAGAAGAGGGTTTACCTCTGGTTCGAGTAGTGCACCCCCCGTCTAT

 AlaAlaCysGlyAspIleIleAsnGlyLeuProValSerAlaArgArgGlyArgGluIle
 1621 CCGCCGCGTGCGGTGACATCATCAACGGCTTGCCGTGTTTCCGCCCCGAGGGGGCCGGAGA
 GCGGCGCACGCCACTGTAGTAGTTGCCGAACGGACAAAGCGGGCGTCCCCGGCCCTCT

 LeuLeuGlyProAlaAspGlyMetValSerLysGlyTrpArgLeuLeuAlaProIleThr
 1681 TACTGCTCGGGCCAGCCGATGGAATGGTCTCCAAGGGGTGGAGGTGCTGGCGCCCATCA
 ATGACGAGCCCGGTGCGCTACCTTACCAGAGGTCCCCACCTCCAACGACCGCGGGTAGT

 AlaTyrAlaGlnGlnThrArgGlyLeuLeuGlyCysIleIleThrSerLeuThrGlyArg
 1741 CGGCTACGCCCAGCAGACAAGGGGCTCCTAGGGTGCATAATCACCAGCCTAACTGGCC
 GCCGCATGCGGGTCGTCTGTTCCCGGAGGATCCCACGTATTAGTGGTTCGGATTGACCGG

 AspLysAsnGlnValGluGlyGluValGlnIleValSerThrAlaAlaGlnThrPheLeu
 1801 GGGACAAAACCAAGTGGAGGGTGAGGTCCAGATTGTGTCAACTGCTGCCCAAACCTTCC
 CCCTGTTTTTGGTTACCTCCCACTCCAGGTCTAACACAGTTGACGACGGGTTTGGGAAGG

 AlaThrCysIleAsnGlyValCysTrpThrValTyrHisGlyAlaGlyThrArgThrIle
 1861 TGGCAACGTGCATCAATGGGGTGTGCTGGACTGTCTACCACGGGCGCGGAACGAGGACCA
 ACCGTGACAGTAGTTACCCACACGACCTGACAGATGGTGGCCCGGCTTGCTCCTGGT

 AlaSerProLysGlyProValIleGlnMetTyrThrAsnValAspGlnAspLeuValGly

- 1921 TCGCGTCACCCAAGGGTCCTGTCATCCAGATGTATACCAATGTAGACCAAGACCTTGTGG
AGCGCAGTGGGTTCACAGGACAGTAGGTCTACATATGGTTACATCTGGTTCTGGAACACC
- 1981 TrpProAlaProGlnGlySerArgSerLeuThrProCysThrCysGlySerSerAspLeu
GCTGGCCCCGCTCCGCAAGGTAGCCGCTCATTGACACCCTGCACTTGCGGCTCCTCGGACC
CGACCGGGCGAGGCGTTCCATCGGCGAGTAACTGTGGGACGTGAACGCCGAGGAGCCTGG
- 2041 TyrLeuValThrArgHisAlaAspValIleProValArgArgArgGlyAspSerArgGly
TTTACCTGGTCACGAGGCACGCCGATGTCATTCCCGTGCGCCGGCGGGGTGATAGCAGGG
AAATGGACCAGTGCTCCGTGCGGCTACAGTAAGGCCACGCGGCCGCCACTATCGTCCC
- 2101 SerLeuLeuSerProArgProIleSerTyrLeuLysGlySerSerGlyGlyProLeuLeu
GCAGCCTGCTGTCGCCCCGGCCATTTCCCTACTTGAAAGGCTCCTCGGGGGGTCCGCTGT
CGTCGGACGACAGCGGGGCGGGTAAAGGATGAACTTCCGAGGAGCCCCCAGGCGACA
- 2161 CysProAlaGlyHisAlaValGlyIlePheArgAlaAlaValCysThrArgGlyValAla
TGTGCCCCGCGGGGACGCGCTGGGCATATTTAGGGCCGCGGTGTGCACCCGTGGAGTGG
ACACGGGGCGCCCCGTGCGGCACCCGTATAAATCCCGGCGCCACACGTGGGCACCTCACC
- 2221 LysAlaValAspPheIleProValGluAsnLeuGluThrThrMetArgSerProValPhe
CTAAGGCGGTGGACTTTATCCCTGTGGAGAACCTAGAGACAACCATGAGGTCCCCGGTGT
GATTCCGCCACCTGAAATAGGGACACCTCTTGATCTCTGTTGGTACTCCAGGGGCCACA
- 2281 ThrAspAsnSerSerProProValValProGlnSerPheGlnValAlaHisLeuHisAla
TCACGGATAACTCCTCTCCACAGTAGTGCCCCAGAGCTTCCAGGTGGCTCACCTCCATG
AGTGCCATTGAGGAGAGGTGGTCATCAGGGGTCTCGAAAGTCCACCGAGTGAGGTAC
- 2341 ProThrGlySerGlyLysSerThrLysValProAlaAlaTyrAlaAlaGlnGlyTyrLys
CTCCACAGGCAGCGGCAAAAGCACCAAGGTCCCGGCTGCAATATGCAGCTCAGGGCTATA
GAGGGTGTCCGTGCGCGTTTTCTGTTGTTCCAGGGCCGACGTATACGTTCGAGTCCCGATAT
- 2401 ValLeuValLeuAsnProSerValAlaAlaThrLeuGlyPheGlyAlaTyrMetSerLys
AGGTGCTAGTACTCAACCCCTCTGTTGCTGCAACACTGGGCTTTGGTGCTTACATGTCCA
TCCACGATCATGAGTTGGGGAGACAACGACGTGTGACCCGAAACCACGAATGTACAGGT
- 2461 AlaHisGlyIleAspProAsnIleArgThrGlyValArgThrIleThrThrGlySerPro
AGGCTCATGGGATCGATCCTAACATCAGGACCGGGGTGAGAACAATTACCACTGGCAGCC
TCCGAGTACCCTAGCTAGGATTGTAGTCTGGCCCCACTCTTGTTAATGGTGACCGTCCG
- 2521 IleThrTyrSerThrTyrGlyLysPheLeuAlaAspGlyGlyCysSerGlyGlyAlaTyr
CCATCAGTACTCCACCTACGGCAAGTTCTTTGCCGACGGCGGGTGCTCGGGGGGCGCTT
GGTAGTGCATGAGGTGGATGCCGTTCAAGGAACGGGTGCCGCCCACGAGCCCCCGCGAA
- 2581 AspIleIleIleCysAspGluCysHisSerThrAspAlaThrSerIleLeuGlyIleGly
ATGACATAATAATTTGTGACGAGTGCCACTCCACGGATGCCACATCCATCTTGGGCATCG
TACTGTATTATTAAACACTGCTCAGGTGAGGTGCCTACGGTGTAGGTAGAACCCGTAGC
- 2641 ThrValLeuAspGlnAlaGluThrAlaGlyAlaArgLeuValValLeuAlaThrAlaThr
GCACTGTCCTTGACCAAGCAGAGACTGCGGGGGCGAGACTGGTTGTGCTCGCCACCGCCA
CGTGACAGGAAGTGGTTTCGTCTCTGACGCCCCGCTCTGACCAACACGAGCGGTGGCGGT
- 2701 ProProGlySerValThrValProHisProAsnIleGluGluValAlaLeuSerThrThr
CCCCTCGGGCTCCGTCCTGCTGCCCCATCCCAACATCGAGGAGGTGCTCTGTCCACCA
GGGAGGCCCGAGGCAGTGACGCGGGTAGGGTTGTAGCTCCTCCAACGAGACAGGTGGT
- 2761 GlyGluIleProPheTyrGlyLysAlaIleProLeuGluValIleLysGlyGlyArgHis
CCGGAGAGATCCCTTTTACGGCAAGGCTATCCCCCTCGAAGTAATCAAGGGGGGAGAC
GGCCTCTCTAGGGAAAAATGCCGTTCCGATAGGGGGAGCTTCATTAGTTCCCCCTCTG
- 2821 LeuIlePheCysHisSerLysLysLysCysAspGluLeuAlaAlaLysLeuValAlaLeu
ATCTCATCTTCTGTCAATCAAAGAAGAAGTGCGACGAACCTGCCGCAAGCTGGTTCGCAT
TAGAGTAGAAGACAGTAAGTTTCTTCTTACGCTGCTTGAGCGGCGTTTCGACCAAGCGTA
- 2881 GlyIleAsnAlaValAlaTyrTyrArgGlyLeuAspValSerValIleProThrSerGly
TGGGCATCAATGCCGTGGCTACTACCGGGTCTTGACGTGTCCGTCAATCCCGACAGCG
ACCCGTAGTTACGGCACCGGATGATGGCGCCAGAACTGCACAGGCAGTAGGGCTGGTTCG

- 2941 AspValValValValAlaThrAspAlaLeuMetThrGlyTyrThrGlyAspPheAspSer
GCGATCTGTGTCGTGGCAACCGATGCCCTCATGACCGGCTATACCGGCGACTTCGACT
CGCTACAACAGCAGCACCCTTGGCTACGGGAGTACTGGCCGATATGGCCGCTGAAGCTGA
- 3001 ValIleAspCysAsnThrCysValThrGlnThrValAspPheSerLeuAspProThrPhe
CGGTGATAGACTGCAATACGTGTGTACCCAGACAGTCGATTTCAGCCTTGACCCTACCT
GCCACTATCTGACGTTATGCACACAGTGGGTCTGTCTAGCTAAAGTCGGAACCTGGGATGGA
- 3061 ThrIleGluThrIleThrLeuProGlnAspAlaValSerArgThrGlnArgArgGlyArg
TCACCATTGAGACAATCAGCTCCCCAGGATGCTGTCTCCCGCACTCAACGTCGGGGCA
AGTGGTAACTCTGTTAGTGGCAGGGGGTCTACGACAGAGGGCGTGAGTTGCAGCCCCGT
- 3121 ThrGlyArgGlyLysProGlyIleTyrArgPheValAlaProGlyGluArgProSerGly
GGACTGGCAGGGGAAGCCAGGCATCTACAGATTTGTGGCACCAGGGGAGCGCCCTCCG
CCTGACCGTCCCCCTTCGGTCCGTAGATGTCTAAACACCGTGGCCCCCTCGCGGGAGGC
- 3181 MetPheAspSerSerValLeuCysGluCysTyrAspAlaGlyCysAlaTrpTyrGluLeu
GCATGTTCCGACTCGTCCGTCCTCTGTAGTGCTATGACGAGGCTGTGCTTGGTAAGAGC
CGTACAAGCTGAGCAGGCAGGAGACACTCACGATACTGCGTCCGACACGAACCATACTCG
- 3241 ThrProAlaGluThrThrValArgLeuArgAlaTyrMetAsnThrProGlyLeuProVal
TCACGCCCCGCGAGACTACAGTTAGGCTACGAGCGTACATGAACACCCCGGGCTTCCCG
AGTGGCGGGCGGCTCTGATGTCAATCCGATGCTCGCATGTACTTGTGGGGCCCCGAAGGGC
- 3301 CysGlnAspHisLeuGluPheTrpGluGlyValPheThrGlyLeuThrHisIleAspAla
TGTGCCAGGACCATCTTGAATTTTGGGAGGGCGTCTTACAGGCCTCACTCATATAGATG
ACACGGTCTGGTAGAACTTAAACCCCTCCCGCAGAAATGTCCGGAAGTGTAGTATATCTAC
- 3361 HisPheLeuSerGlnThrLysGlnSerGlyGluAsnLeuProTyrLeuValAlaTyrGln
CCCACCTTCTATCCCAGACAAAGCAGAGTGGGGAGAACCCTCCTTACCTGGTAGCGTACC
GGGTGAAAGATAGGGTCTGTTTCGTCTCACCCCTCTTGGGAAGGAATGGACCATCGCATGG
- 3421 AlaThrValCysAlaArgAlaGlnAlaProProProSerTrpAspGlnMetTrpLysCys
AAGCCACCGTGTGCGCTAGGGCTCAAGCCCCCTCCCCATCGTGGGACAGATGTGGAAGT
TTCGGTGGCACACGCGATCCCGAGTTCGGGGAGGGGGTAGCACCTGGTCTACACCTTCA
- 3481 LeuIleArgLeuLysProThrLeuHisGlyProThrProLeuLeuTyrArgLeuGlyAla
GTTTGATTGCGCTCAAGCCACCCCTCCATGGGCCAACACCCCTGCTATACAGACTGGGCG
CAAACCTAAGCGGAGTTCGGGTGGGAGGTACCCGGTGTGGGGACGATATGTCTGACCCGC
- 3541 ValGlnAsnGluIleThrLeuThrHisProValThrLysTyrIleMetThrCysMetSer
CTGTTTCAGAATGAAATCACCTGACGCACCCAGTCACCAAATACATCATGACATGCATGT
GACAAGTCTTACTTTAGTGGGACTGCGTGGGTCAAGTGGTTTATGTAGTACTGTACGTACA
- 3601 AlaAspLeuGluValValThrSerThrTrpValLeuValGlyGlyValLeuAlaAlaLeu
CGGCGGACCTGGAGGTGCTCAGGACACCTGGGTGCTCGTTGGCGGGCGTCTGGCTGCTT
GCCGGCTGGACCTCCAGCAGTGCTCGTGGACCCAGAGCAACCGCCGAGGACCGACGAA
- 3661 AlaAlaTyrCysLeuSerThrGlyCysValValIleValGlyArgValValLeuSerGly
TGGCCGCGTATTGCCTGTCAACAGGCTGCGTGGTCATAGTGGGCAGGGTCTGTGTCCG
ACCGGCGCATACCGACAGTTGTCCGACGCACCAAGTATCACCCGTCCAGCAGAACAGGC
- 3721 LysProAlaIleIleProAspArgGluValLeuTyrArgGluPheAspGluMetGluGlu
GGAAGCCGGCAATCATACCTGACAGGGAAGTCTCTACCGAGAGTTCGATGAGATGGAAG
CCTTCGGCCGTTAGTATGGACTGTCCCTTCAGGAGATGGCTCTCAAGCTACTCTACCTTC
- 3781 CysSerGlnHisLeuProTyrIleGluGlnGlyMetMetLeuAlaGluGlnPheLysGln
AGTGTCTCTCAGCACTTACCGTACATCGAGCAAGGGATGATGCTCGCCGAGCAGTTCAAGC
TCACGAGACTCGTGAATGGCATGTAGCTCGTTCCCTACTACGAGCGGCTCGTCAAGTTCCG
- 3841 LysAlaLeuGlyLeuLeuGlnThrAlaSerArgGlnAlaGluValIleAlaProAlaVal
AGAAGGCCCTCGGCCTCTGACAGCCGCTCCCGTCAGGCAGAGTTATCGCCCTGCTG
TCTTCCGGGAGCCGGAGGACGTCTGGCGCAGGGCAGTCCGTCTCCAATAGCGGGGACGAC
- GlnThrAsnTrpGlnLysLeuGluThrPheTrpAlaLysHisMetTrpAsnPheIleSer

FIG. 47-5

41

ValGluIleArgGlnValGlyAspPheHisTyrValThrGlyMetThrThrAspAsnLeu
 4921 ATGTGGAGATAAGGCAGGTGGGGGACTTCCACTACGTGACGGGTATGACTACTGACAATC
 TACACCTCTATTCCGTCCACCCCTGAAGGTGATGCACTGCCCATACTGATGACTGTTAG

 LysCysProCysGlnValProSerProGluPhePheThrGluLeuAspGlyValArgLeu
 4981 TCAAATGCCCCGTGCCAGGTCCCATCGCCCGAATTTTTCACAGAATTGGACGGGGTGCGCC
 AGTTTACGGGCACGGTCCAGGGTAGCGGGCTTAAAAAGTGTCTTAACCTGCCCCACGCGG

 HisArgPheAlaProProCysLysProLeuLeuArgGluGluValSerPheArgValGly
 5041 TACATAGGTTTGGCGCCCCCTGCAAGCCCTTGCTGCGGGAGGAGGTATCATTCAGAGTAG
 ATGTATCCAAACGCGGGGGACGTTCCGGGAACGACGCCCTCCTCCATAGTAAGTCTCATC

 LeuHisGluTrpProValGlySerGlnLeuProCysGluProGluProAspValAlaVal
 5101 GACTCCACGAATACCCGGTAGGGTCGCAATTACCTTGCGAGCCCCGAACGGACGTGGCCG
 CTGAGGTGCTTATGGGCCATCCCAGCGTTAATGGAACGCTCGGGCTTGCCCTGCACCGGC

 LeuThrSerMetLeuThrAspProSerHisIleThrAlaGluAlaAlaGlyArgArgLeu
 5161 TGTTGACGTCCATGCTCACTGATCCCTCCCATATAACAGCAGAGGCGGCCGGCGAAGGT
 ACAACTGCAGGTACGAGTGACTAGGGAGGGTATATTGTGCTCTCCGCCGGCCCGCTTCCA

 AlaArgGlySerProProSerValAlaSerSerSerAlaSerGlnLeuSerAlaProSer
 5221 TGGCGAGGGGATCACCCCTCTGTGGCCAGCTCCTCGGCTAGCCAGCTATCCGCTCCAT
 ACCGCTCCCTAGTGGGGGAGACACCGGTCGAGGAGCCGATCGGTGATAGGCGAGGTA

 LeuLysAlaThrCysThrAlaAsnHisAspSerProAspAlaGluLeuIleGluAlaAsn
 5281 CTCTCAAGGCAACTTGCACCGCTAACCATGACTCCCCTGATGCTGAGCTCATAGAGGCCA
 GAGAGTTCGGTTGAACGTGGCGATTGGTACTGAGGGGACTACGACTCGAGTATCTCCGGT

 LeuLeuTrpArgGlnGluMetGlyGlyAsnIleThrArgValGluSerGluAsnLysVal
 5341 ACCTCCTATGGAGGCAGGAGATGGGCGGCAACATCACCAGGGTTGAGTCAGAAAACAAAG
 TGGAGGATACCTCCGTCTCTACCCGCCGTGTAGTGGTCCCAACTCAGTCTTTTGTTC

 ValIleLeuAspSerPheAspProLeuValAlaGluGluAspGluArgGluIleSerVal
 5401 TGGTGATTCTGGACTCCTTCGATCCGCTTGTGGCGGAGGAGGACGAGCGGGAGATCFCG
 ACCACTAAGACCTGAGGAAGCTAGGCGAACACCGCCTCCTCTGCTCGCCCTTAGAGGC

 ProAlaGluIleLeuArgLysSerArgArgPheAlaGlnAlaLeuProValTrpAlaArg
 5461 TACCCGCAGAAATCCTGCGGAAGTCTCGGAGATTCGCCCAGGCCCTGCCCGTTTGGGGCG
 ATGGGCGTCTTTAGGACGCCTTCAGAGCCTTAAGCGGGTCCGGGACGGGCAAACCCGCG

 ProAspTyrAsnProProLeuValGluThrTrpLysLysProAspTyrGluProProVal
 5521 GGCCGCTCTATAACCCCCCGCTAGTGGAGACGTGGAAGAAAGCCCGACTACGAACCACCTG
 CCGGCCTGATATTGGGGGGCGATCACCTCTGCACCTTTTTCGGGCTGATGCTTGGTGGAC

 ValHisGlyCysProLeuProProProLysSerProProValProProProArgLysLys
 5581 TGGTCCATGGCTGTCCGCTTCCACCTCAAAGTCCCTCCTGTGCCTCCGCTCGGAAGA
 ACCAGGTACCGACAGGCGAAGGTGGAGGTTTCAGGGGAGGACACGGAGGCGGAGCCTTCT

 ArgThrValValLeuThrGluSerThrLeuSerThrAlaLeuAlaGluLeuAlaThrArg
 5641 AGCGGACGGTGGTCTCTACTGAATCAACCCTATCTACTGCCTTGGCCGAGCTCGCCACCA
 TCGCCTGCCACAGGAGTGACTTAGTTGGGATAGATGACGGAACCGGCTCGAGCGGTGGT

 SerPheGlySerSerSerThrSerGlyIleThrGlyAspAsnThrThrThrSerSerGlu
 5701 GAAGCTTTGGCAGCTCCTCAACTTCCGGCATTACGGGCGACAATACGACAACATCTCTG
 CTTGAAACCGTCGAGGAGTTGAAGGCCGTAATGCCCGCTGTATGCTGTTGTAGCAGAC

 ProAlaProSerGlyCysProProAspSerAspAlaGluSerTyrSerSerMetProPro
 5761 AGCCCGCCCCCTTCTGGCTGCCCCCGGACTCCGACGCTGAGTCTATTCTCTCATGCCCC
 TCGGGCGGGGAAGACCGACGGGGGGCTGAGGCTCCGACTCAGGATAAGGAGTACGGGG

 LeuGluGlyGluProGlyAspProAspLeuSerAspGlySerTrpSerThrValSerSer
 5821 CCTTGGAGGGGGAGCCTGGGGATCCGGATCTTAGCGACGGGTCATGGTCAACGGTCAGTA
 GGGACCTCCCCCTCGGACCCCTAGGCCTAGAATCGTGCACAGTACCAGTTGCCAGTCAT

 GluAlaAsnAlaGluAspValValCysCysSerMetSerTyrSerTrpThrGlyAlaLeu

5881 GTGAGGCCAACGCGGAGGATGTCGTGTGCTGCTCAATGTCTTACTCTTGGACAGGCGCAC
CACTCCGGTTGCGCCTCCTACAGCACACGACGAGTTACAGAATGAGAACCTGTCCGCGTG

ValThrProCysAlaAlaGluGluGlnLysLeuProIleAsnAlaLeuSerAsnSerLeu
5941 TCGTCACCCCGTGCGCCGCGGAAGAACAGAACTGCCCATCAATGCACTAAGCAACTCGT
AGCAGTGGGGCACGCGGCGCCTTCTTGCTTTGACGGGTAGTTACGTGATTCTGTTGAGCA

LeuArgHisHisAsnLeuValTyrSerThrThrSerArgSerAlaCysGlnArgGlnLys
6001 TGCTACGTCAACCACAATTTGGTGTATTCCACCACCTCACGCAGTGCTTGCCAAAGGCAGA
ACGATGCAGTGGTGTTAAACCACATAAGGTGGTGGAGTGCGTCACGAACGGTTTCCGTCT

LysValThrPheAspArgLeuGlnValLeuAspSerHisTyrGlnAspValLeuLysGlu
6061 AGAAAGTCACATTTGACAGACTGCAAGTTCTGGACAGCCATTACCAGGACCTCAAGG
TCTTTCAGTGTAAGTGTCTGACGTTCAAGACCTGTCGGTAATGGTCCTGCATGAGTTCC

ValLysAlaAlaAlaSerLysValLysAlaAsnLeuLeuSerValGluGluAlaCysSer
6121 AGGTTAAAGCAGCGGCGTCAAAAGTGAAGGCTAACTTGCTATCCGTAGAGGAAGCTTGCA
TCCAATTTTCGTGCGCGCAGTTTTCTACCTCCGATTGAACGATAGGCATCTCCTTCGAACGT

LeuThrProProHisSerAlaLysSerLysPheGlyTyrGlyAlaLysAspValArgCys
6181 GCCTGACGCCCCACACTCAGCCAAATCCAAGTTTGGTTATGGGGCAAAGACGTCCGTT
CGGACTGCGGGGTGTGAGTCGGTTTAGGTTCAAACCAATACCCGTTTTCTGCAGGCAA

HisAlaArgLysAlaValThrHisIleAsnSerValTrpLysAspLeuLeuGluAspAsn
6241 GCCATGCCAGAAAGGCCGTAAACCCACATCAACTCCGTGTGGAAAGACCTTCTGGAAGACA
CGGTACGGTCTTTCCGGCATTGGGTGTAGTTGAGGCACACCTTCTGGAAGACCTTCTGT

ValThrProIleAspThrThrIleMetAlaLysAsnGluValPheCysValGlnProGlu
6301 ATGTAACACCAATAGACACTACCATCATGGCTAAGAACGAGGTTTTCTGCGTTTCAGCCTG
TACATTGTGGTTATCTGTGATGGTAGTACCGATTCTTGCTCCAAAGACGCAAGTCGGAC

LysGlyGlyArgLysProAlaArgLeuIleValPheProAspLeuGlyValArgValCys
6361 AGAAGGGGGGTTCGTAAGCCAGCTCGTCTCATCGTGTTCCTCCGATCTGGGCGTGCGCGTGT
TCTTCCCCCAGCATTCGGTCGAGCAGAGTAGCACAAGGGCTAGACCCGCACGCGCAC

GluLysMetAlaLeuTyrAspValValThrLysLeuProLeuAlaValMetGlySerSer
6421 GCGAAAAGATGGCTTTGTACGACGTGGTTACAAAGCTCCCTTGCCCGTGATGGGAAGCT
CGCTTTTCTACCGAAACATGCTGCACCAATGTTTCGAGGGGAACCGGCACTACCCTTCGA

TyrGlyPheGlnTyrSerProGlyGlnArgValGluPheLeuValGlnAlaTrpLysSer
6481 CCTACGGATTCCAATACTCACCAGGACAGCGGGTTGAATTCTCTCGTGCAAGCGTGGAAGT
GGATGCCTAAGGTTATGAGTGGTCTGTGCGCCCACTTAAGGAGCACGTTCCGACCTTCA

LysLysThrProMetGlyPheSerTyrAspThrArgCysPheAspSerThrValThrGlu
6541 CCAAGAAAACCCCAATGGGGTTCTCGTATGATACCCGCTGCTTTGACTCCACAGTCACTG
GGTTCTTTTGGGGTTACCCCAAGAGCATACTATGGGCGACGAACTGAGGTGTCAGTGAC

SerAspIleArgThrGluGluAlaIleTyrGlnCysCysAspLeuAspProGlnAlaArg
6601 AGAGCGACATCCGTACGGAGGAGGCAATCTACCAATGTTGTGACCTCGACCCCCAAGCCC
TCTCGCTGTAGGCATGCCTCCTCCGTTAGATGGTTACAACACTGGAGCTGGGGGTTCGGG

ValAlaIleLysSerLeuThrGluArgLysValGlyGlyProLeuThrAsnSerArg
6661 GCGTGGCCATCAAGTCCCTCACCAGAGGCTTTATGTTGGGSGCCCTTACCAATTCAA
CGCACCGGTAGTTCAGGAGTGGCTCTCCGAAATACAACCCCGGAGAAATGGTTAAGTT

GlyGluAsnCysGlyTyrArgArgCysArgAlaSerGlyValLeuThrThrSerCysGly
6721 GGGGGGAGAACTGCGGCTATCGCAGGTGCCGCGGAGCGGCGTACTGACAACTAGCTGTG
CCCCCTCTTGACGCCGATAGCGTCCACGGCGCGCTCGCCGATGACTGTTGATCGACAC

AsnThrLeuThrCysTyrIleLysAlaArgAlaAlaCysArgAlaAlaGlyLeuGlnAsp
6781 GTAACACCCCTCACTTGCTACATCAAGGCCGGGCGAGCCTGTGAGCCGCAGGGCTCCAGG
CATTTGTGGGAGTGAACGATGTAGTTCCGGGCGCGTCCGACAGCTCGGCGTCCCGAGGTCC

CysThrMetLeuValCysGlyAspAspLeuValValIleCysGluSerAlaGlyValGln
6841 ACTGCACCATGCTCGTGTGTGGCGACGACTTAGTCGTTATCTGTGAAAGCGGGGGGTCC
TGACGTGGTACGAGCACACCCGCTGCTGAATCAGCAATAGACACTTTCGCGCCCCCAGG

-114-

6901 GluAspAlaAlaSerLeuArgAlaPheThrGluAlaMetThrArgTyrSerAlaProPro
 AGGAGGACGCGGCGAGCCTGAGAGCCTTCACGGAGGCTATGACCAGGTACTCCGCCCCC
 TCCTCCTGCGCCGCTCGGACTCTCGGAAGTGCTCCGATACTGGTCCATGAGGCGGGGG

6961 GlyAspProProGlnProGluTyrAspLeuGluLeuIleThrSerCysSerSerAsnVal
 CTGGGGACCCCCACAACCAGAATACGACTTGGAGCTCATAACAATCATGCTCCTCCAACG
 GACCCCTGGGGGGTGTGGTCTTATGCTGAACCTCGAGTATTGTAGTACGAGGAGGTTC

7021 SerValAlaHisAspGlyAlaGlyLysArgValTyrTyrLeuThrArgAspProThrThr
 TGTCAGTCGCCCACGACGGCGCTGGAAAGAGGGTCTACTACCTCACCCGTGACCCACAA
 ACAGTCAGCGGGTGCTGCCGCGACCTTCTCCAGATGATGGAGTGGGCACCTGGGATGTT

7081 ProLeuAlaArgAlaAlaTrpGluThrAlaArgHisThrProValAsnSerTrpLeuGly
 CCCCCCTCGCGAGAGCTGCGTGGGAGACAGCAAGACACACTCCAGTCAATTCCTGGCTAG
 GGGGGGAGCGCTCTCGACGCACCTCTGTCTGTTCTGTGTGAGGTCAGTTAAGGACCGATC

7141 AsnIleIleMetPheAlaProThrLeuTrpAlaArgMetIleLeuMetThrHisPhePhe
 GCAACATAATCATGTTTGCCCCACACTGTGGGCGAGGATGATACTGATGACCCATTTCT
 CGTTGTATTAGTACAAACGGGGGTGTGACACCCGCTCCTACTATGACTACTGGGTAAAGA

7201 SerValLeuIleAlaArgAspGlnLeuGluGlnAlaLeuAspCysGluIleTyrGlyAla
 TTAGCGTCCTTATAGCCAGGGACCAGCTTGAACAGGCCCTCGATTGCGAGATCTACGGGG
 AATCGCAGGAATATCGGTCCCTGGTCCGAACCTGTCCGGGAGCTAACGCTCTAGATGCCCC

7261 CysTyrSerIleGluProLeuAspLeuProProIleIleGlnArgLeu
 CCTGCTACTCCATAGAACCCTTGATCTACCTCCAATCATTCAAAGACTC
 GGACGATGAGGTATCTTGGTGAACCTAGATGGAGGTTAGTAAGTTTCTGAG

FIG. 47- 8