FI000106211B



(12) **PATENTTIJULKAISU**
PATENTSKRIFT

(10) **FI 106211 B**

(45) Patentti myönnetty - Patent beviljats **15.12.2000**

(51) Kv.lk.7 - Int.kl.7

C12N 15/51, C07K 14/18, A61K 39/12, C12Q 1/68
G01N 30/68, C12P 21/02

(21) Patenttihakemus - Patentansökning **905591**

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag **12.11.1990**

(24) Alkupäiva - Löpdag **15.03.1990**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig **12.11.1990**

(86) Kv. hakemus - Int. ansökan **PCT/US90/01348**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet

17.03.1989 US 325338 P 20.04.1989 US 341334 P
18.05.1989 US 355002 P

SUOMI – FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

(73) Haltija - Innehavare

1 •**Chiron Corporation,** 4560 Horton Street, Emeryville, CA 94608, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1 •**Houghton,Michael,** 53 Rosemead Court, Danville, CA 94526, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
2 •**Choo,Qui-Lim,** 5700 Fern Street, El Cerrito, CA 94530, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
3 •**Kuo,George,** 1370 Sixth Avenue, San Francisco, CA 94122, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud: Oy Jalo Ant-Wuorinen Ab
Iso Roobertinkatu 4 - 6 A, 00120 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

HCV-polypeptidi ja HCV:n määritysmenetelmä sekä vasta-ainekoostumukset
HCV-polypeptid och bestämningsmetod av HCV och antikropp kompositioner

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

FI A 893447 (A61K 39/29)

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Hakija on keksinyt uuden viruksen, hepatitis-C-viruksen (HCV), jonka on osoitettu olevan pääasiallinen verivälitteisen NANBH:n aiheuttaja-aine. Alkuperäinen työ tämän viruksen suhteen, mikä sisältää osittaisen prototyyppi-HCV-eristeen genomisekvenssin, on kuvattu EP-julkaisussa No. 318,216 ja PCT-julkaisussa No. WO/89/04669. Tämä keksintö, joka osittain perustuu uusiin HCV-sekvensseihin ja polypeptideihin, joita ei esitetä yllämainituissa julkaisuissa, sisältää näiden uusien sekvenssien ja polypeptidien käytön immunologisissa analyyseissä, koetindiagnostiikassa, HCV:n vastaisten vasta-aineiden tuotannossa. PCR-teknologiassa ja yhdistelmä-DNA-teknologiassa. Keksintöön sisältyvät myös uudet immunogeeniset polypeptidit, jotka on koditettu klooneissa, jotka sisältävät HCV:n cDNA:ta, uudet menetelmät immunogeenisen HCV-polypeptidin puhdistamiseksi ja HCV:n cDNA:sta peräisin olevat antisense-polynukleotidit.

Patentansökaren har uppfunnit ett nytt virus, hepatitis-C-viruset, som har visat sig vara det huvudsakliga ämnet, som förorsakar NANBH, som sprids via blodet. Det ursprungliga arbetet angående detta virus, som innehåller en genomsekvens för en delvis prototyps-HCV-isolering, finns beskrivet i EP-publikationen no. 318216 och i PCT-publikationen no. WO/89/04669. Denna uppfinning, som delvis baserar sig på nya HCV-sekvensser och polypeptider, som inte förevisas i ovannämnda publikationer, baserar sig på en användning av dessa nya sekvenser och polypeptider i immunologiska analyser, utvärderingsdiagnoser, i produktionen av anti-HVC motmedel. I PCR-teknologin och kombinations-DNA-teknologin. Uppfinningen består dessutom av nya immunogeniska polypeptider, som är kodade i klonerna, som innehåller HCV:s cDNA, nya metoder för att rengöra en immunogenisk HCV-polypeptid och antisense-polynukleotider, som härstammar från HCV:s cDNA.

HCV-POLYPEPTIDI JA HCV:N MÄÄRITYSMENETELMÄ SEKÄ VASTA-AINEKOOSTUMUKSET

Keksintö koskee materiaaleja hepatitisvirustartunnan, joka ei ole tyyppiä A tai B (NANBV), levinneisyyden selvittämiseksi. Tarkemmin se koskee polypeptidEJÄ, jotka ovat peräisin NANBV:n etiologisen aineen, hepatitis-C-viruksen (HCV) genomista. Nämä ja niitä käsittävät reagenssit ovat hyödyllisiä HCV:n ja sen infektion seulomisaineina.

Selityksessä viitataan seuraaviin julkaisuihin

Barr et al. (1986), Biotechniques 4:428.

Botstein (1979), Gene 8:17.

Brinton, M.A. (1986), julkaisussa THE VIRUSES: THE TOGAVIRIDAE AND FLAVIRIDAE (Sarjan toimittaja Fraenkel-Conrat and Wagner, painosten toimittaja Schlesinger and Schlesinger, Plenum Press), ss. 327-374.

Broach (1981) julkaisussa Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces, Vol.1, s.445, Cold Spring Harbor Press.

Broach et al. (1983), Meth. Enz. 101:307.

Chang et al. (1977), Nature 198:1056.

Chirgwin et al. (1979), Biochemistry 18:5294.

Chomczynski and Sacchi (1987), Analytical Biochemistry 162:156.

Clewell et al. (1969), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 62:1159.

Clewell (1972), J. Bacteriol. 110:667.

Cohen (1972), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69:2110.

Cousens et al. (1987), Gene 61:265.

De Boer et al. (1983), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 292:128.

Dreesman et al. (1985), J. Infect. Disease 151:761.

Feinstone, S.M. and Hoofnagle, J.H. (1984), New Engl. J. Med. 311:185.

Fields & Knipe (1986), FUNDAMENTAL VIROLOGY (Raven Press, N.Y.)

Fiers et al. (1978), Nature 273:113.

Gerety, R.J. et al. julkaisussa VIRAL HEPATITIS AND LIVER DISEASE (Vyas, B.N., Dienstag, J.L., and Hoofnagle, J.H., toim., Grune and Stratton, Inc., 1984) ss. 23-47.
Goeddel et al. (1980), Nucleic Acids Res. 8:4057.
Graham and Van der Eb (1978), Virology 52:546.
Grunstein and Hogness (1975), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73:3961.
Grych et al. (1985), Nature 316:74.
Gubler and Hoffman (1983), Gene 25:263.
Hammerling et al. (1981), MONOCLONAL ANTIBODIES AND T-CELL HYBRIDOMAS.
Han (1987), Biochemistry 26:1617.
Helfman (1983), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:31.
Hess et al. (1968), J. Adv. Enzyme Reg. 7:149.
Hinnen et al. (1978), Proc. Natl. Acad. Sci. 75:1929.
Hitzeman et al. (1980), J. Biol. Chem. 255:2073.
Holland et al. (1978), Biochemistry 17:4900.
Holland (1981), J. Biol. Chem. 256:1385.
Houghton et al. (1981), Nucleic Acids Res. 9:247.
Hunyh, T.V. et al. (1985), julkaisussa DNA CLONING TECHNIQUES; A PRACTICAL APPROACH (D. Glover, toim., IRL Press, Oxford, U.K.), ss. 49-78.
Immun. Rev. (1982) 62:185.
Iwarson (1987), British Medical J. 295:946.
Kenneth et al. (1980), MONOCLONAL ANTIBODIES.
Kyte and Doolittle (1982), J. Mol. Biol. 157:105-132.
Laemmli (1970), Nature 227, 680.
Lee et al. (1988), Science 239:1288.
Maniatis, T. et al. (1982), MOLECULAR CLONING; A LABORATORY MANUAL (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y.).
Mayer and Walker, toim. (1987), IMMUNOCHEMICAL METHODS IN CELL AND MOLECULAR BIOLOGY (Academic Press, London).
Maxam et al. (1980), Methods in Enzymology 65:499.
MacNamara et al. (1984), Science 226:1325.
Messing et al. (1981), Nucleic Acids Res. 9:309.
Messing (1983), Methods in Enzymology 101:20-37.

METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press).
Michelle et al., Int. Symposium on Viral Hepatitis.
Monath (1986) julkaisussa THE VIRUSES: THE TOGAVIRIDAE AND FLAVIRIDAE (Sarjan toimittaja Fraenkel-Conrat and Wagner, painosten toimittaja Schlesinger and Schlesinger, Plenum Press), ss. 375-440.
Nagahuma et al. (1984), Anal. Biochem. 141:74.
Neurath et al. (1984), Science 224:392.
Nisonoff et al. (1981), Clin. Immunol. Immunopathol. 21:397-406.
Overby, L.R. (1985), Curr. Hepatol. 5:49.
Overby, L.R. (1986), Curr. Hepatol. 6:65.
Overby, L.R. (1987), Curr. Hepatol. 7:35.
Peleg (1969), Nature 221:193.
Pferrerkorn and Shapiro (1974), julkaisussa COMPREHENSIVE VIROLOGY, Vol.2 (Fraenkel-Conrat & Wagner, toim., Plenum, N.Y.) ss. 171-230.
Prince, A.M. (1983), Annu. Rev. Microbiol. 37:217.
Rice et al. (1985), Science 229:726.
Rice et al. (1986) julkaisussa THE VIRUSES: THE TOGAVIRIDAE AND FLAVIRIDAE (Sarjan toimittaja Fraenkel-Conrat and Wagner, painosten toimittaja Schlesinger and Schlesinger, Plenum Press), ss. 279-328.
Roehrig (1986) julkaisussa THE VIRUSES: THE TOGAVIRIDAE AND FLAVIRIDAE (Sarjan toimittaja Fraenkel-Conrat and Wagner, painosten toimittaja Schlesinger and Schlesinger, Plenum Press).
Sadler et al. (1980), Gene 8, 279.
Saiki et al. (1986), Nature 324:163.
Saiki et al. (1988), Science 239:487.
Sanger et al. (1977), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463.
Schlesinger et al. (1986), J. Virol. 60:1153.
Schreier, M., et al. (1980), HYBRIDOMA TECHNIQUES.
Scopes (1984), PROTEIN PURIFICATION, PRINCIPLES AND PRACTICE, SECOND EDITION (Springer-Verlag, N.Y.).
Shimatake et al. (1981), Nature 292:128.

Steimer et al. (1986), J.Virol. 58:9.
Stollar (1980), julkaisussa THE TOGAVIRUSES (R.W. Schlesinger, toim., Academic Press, N.Y.), ss. 584-622.
Sumiyoshi et al. (1987), Virology 161:497.
Taylor et al. (1976), Biochem. Biophys. Acta 442:324.
Towbin et al. (1979), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:4350.
Tsu and Herzenberg (1980), julkaisussa SELECTED METHODS IN CELLULAR IMMUNOLOGY (W.H. Freeman and Co.) ss. 373-391.
Vytdehaag et al. (1985), J. Immunol. 134:1225.
Valenzuela, P., et al. (1982), Nature 298:344.
Valenzuela, P., et al. (1984), julkaisussa HEPATITIS B (Millman, I., et al., toim., Plenum Press) ss. 225-236.
Warner (1984), DNA 3:401.
Wu and Grossman (1987), Methods in Enzymology, Vol. 154, RECOMBINANT DNA, Part E.
Wu (1987), Methods in Enzymology, Vol. 155, RECOMBINANT DNA, osa F.
Zoller (1982), Nucleic Acids Res. 10:6487.

Viitataan myös seuraaviin patentteihin:
EP-julkaisu No. 318,216; PCT-julkaisu No. WO 89/04669; US-patentit Not 4,341,761; 4,399,121; 4,427,783; 4,444,887; 4,466,917; 4,472,500; 4,491,632 ja 4,493,890.

Hepatitis, joka ei ole tyyppiä A eikä B (NANBH) on tarttuva tauti tai tautiperhe, jonka uskotaan olevan viruksen aiheuttama ja joka on erotettavissa muista viruksen aiheuttamista maksasairauksien muodoista, mukaanlukien sen, jonka aiheuttavat tunnetut hepatitisvirukset, s.o. hepatitis-A-virus (HAV), hepatitis-B-virus (HBV) ja deltahepatitisvirus (HDV), samoin kuin cytomegaloviruksen (CMV) ja Epstein-Barr-viruksen (EBV) aiheuttamat hepatitikset. NANBH tunnistettiin ensin verensiirtopotilaissa. Tarttuminen ihmisestä simpanssiin ja massatartunta simpanssien joukossa antoivat todisteita, että NANBH:n syy on tarttuva infektioaiheuttaja tai -aiheuttajat.

Epidemiologisista todisteista voidaan tehdä ehdotelmia, että voi olla kolmentyyppistä NANBH:a: vedessä syntynyt epideeminen tyyppi; vereen tai neulaan liittyvä tyyppi; ja satunnaisesti esiintyvä (yhteisön hankkima = community acquired) tyyppi. Kuitenkin niiden aineiden lukumäärä, jotka voivat aiheuttaa NANBH:n on tuntematon.

Kliininen NANBH:n diagnoosi ja tunnistus on tehty etupäässä sulkemalla pois muut virusmerkkiaineet. Niiden menetelmien joukossa, joita käytetään havaitsemaan oletettuja NANBV-antigeenejä ja vasta-aineita ovat agargeelidiffuusio, vastaimmunoeletroforeesi, immunofluoresenssimikroskopia, immunoelektronimikroskopia, radioimmunologinen analyysi ja entsyymiin kytketty immunosorbenttianalyysi. Kuitenkaan mikään näistä analyyseistä ei ole osoittautunut olevan riittävän herkkä, spesifinen ja toistettava käytettäväksi NANBH:n diagnostisena kokeena.

Aikaisemmin ei ole ollut selvyyttä eikä sopimusta NANBH:n aiheuttajiin liittyvien antigeeni-vasta-ainejärjestelmien identtisyyden tai spesifisyyden suhteen. Tämä johtuu ainakin osittain siitä, että henkilöillä on ennalta tai samanaikaisesti NANBV:n kanssa saatu HBV-tartunta ja liukoisten ja partikkelimuotoisten HBV:een liittyvien antigeenien tunnetusta monimutkaisuudesta ja myös HBV:n DNA:n integraatiosta maksasolujen genomiin. Lisäksi on mahdollisuus, että NANBH:n aiheuttaa useampi kuin yksi infektoiva aine, minkä lisäksi on mahdollista, että NANBH on diagnosoitu väärin. Edelleen on epäselvää, mitä serologiset analyysit havaitsevat NANBH-potilaiden seerumista. On väitetty, että agargeelidiffuusio- ja vastaimmunoelektroforeesianalyysit havaitsevat autoimmuunivasteita tai epäspesifisiä proteiinien keskinäisiä reaktioita, joita esiintyy seeruminäytteiden välillä ja että ne eivät edusta spesifisiä NANBV-antigeeni-vasta-ainereaktioita. Immunofluoresenssi ja entsyymiin kytketty immunosorbentti ja radioimmunologiset analyysit näyttävät havaitsevan

alhaisia reumatekijän kaltaisen materiaalin tasoja, jota on tavantakaa läsnä sellaisten potilaiden seerumissa, joilla on NANBH, samoin kuin myös potilaissa, joilla on muita maksasairauksia tai maksaan liittymättömiä sairauksia. Jonkin verran havaittua reaktiivisuutta voi edustaa vasta-ainetta isännän määrittämille sytoplasmisille antigeeneille.

On olemassa lukumäärä NANBV-ehdokkaita. Katso esimerkiksi selontekoja Prince (1983), Feinstone ja Hoofnagle (1984) ja Overby (1985, 1986, 1987) ja Iwarsonin (1987) artikkelia. Kuitenkaan ei ole mitään todistetta, että mikään näistä ehdokkaista edustaisi NANBV:n etiologista aiheuttajaa.

Vaatimus herkistä, spesifisistä menetelmistä NANBV:n kantajien ja NANBV:n saastuttaman veren tai verituotteiden seulomiseksi tai tunnistamiseksi on huomattava. Verensiirron jälkeinen hepatitis (Post Transfusion Hepatitits PTH) esiintyy noin 10 %:lla verensiirron saaneista potilaista ja NANBH:n aiheuttamia näistä tapauksista on jopa 90 %. Pääongelma tässä taudissa on sen tavanomainen eteneminen kroonisiksi maksavaurioiksi (25-55 %).

Potilashuolto sekä NANBH:n tarttumisen estäminen veren tai verituotteiden tai läheisen henkilökohtaisen kontaktin välityksellä vaatii luotettavia diagnostisia ja ennustavia välineitä NANBV:hen liittyvien nukleiinihappojen, antigeenien ja vasta-aineiden havaitsemiseksi. Lisäksi on tarpeita tehokkaiden rokotteiden ja immunoterapeuttisten terapeuttisten aineiden aikaansaamiseksi taudin estämiseksi ja/tai hoitamiseksi.

Hakija on keksinyt uuden viruksen, hepatitis-C-virusken (HCV), jonka on osoitettu olevan pääasiallinen veren kautta syntyneen NANBV:n (BB-NANBH) etiologinen aiheuttaja. Hakijan alkuperäinen työ sisältäen prototyyppi-HCV-eristeen, CDC/HCV1 (myös kutsutaan HCV1:ksi), osittaisen genomisekvenssin, on

kuvattu EP-julkaisussa No. 318,216 (julkaistu 31.05.1989) ja PCT-julkaisussa No. WO 89/04669 (julkaistu 01.06.1989). Näiden patenttihakemusten ja myös minkä tahansa vastaavan kansallisen hakemuksen sisältö liitetään tähän viitteeksi. Nämä hakemukset opettavat mm. yhdistelmä-DNA-menetelmiä HCV-sekvenssien kloonaamiseksi ja ekspressoimiseksi, HCV-polypeptidejä, HCV-immunodiagnostisia tekniikoita, HCV-koettimien diagnostisia tekniikoita, HCV:n vastaisia vasta-aineita ja menetelmiä uusien HCV-sekvenssien eristämiseksi, sisältäen uusien HCV-eristeiden sekvenssejä.

Tämä keksintö perustuu osittain uusiin HCV-sekvensseihin ja polypeptideihin, joita ei ole esitetty EP-julkaisussa No. 318,216 tai PCT-julkaisussa No. WO 89/04669. Keksintö mahdollistaa näiden uusien sekvenssien ja polypeptidien käytön mm. immunodiagnostiikassa, koetindiagnostiikassa, HCV:n vastaisessa vasta-aineiden tuotannossa, PCR-teknologiassa ja yhdistelmä-DNA-teknologiassa. Keksintö mahdollistaa myös uudet immunologiset menetelmät, jotka perustuvat tässä esitettyjen HCV-polypeptidien immunogeenisyyteen. Tässä vaaditulla uudella asialla, vaikka onkin kehitetty käyttäen tekniikoita, jotka on kuvattu esimerkiksi EP-julkaisussa No. 318,216, on prioriteettipäivä, mikä on aikaisempi kuin tuon tai minkään sen vastineen julkaiseminen. Täten keksintö aikaansaa uusia koostumuksia ja menetelmiä, jotka ovat hyödyllisiä HCV-antigeenien ja -vasta-aineiden näytteiden seulomisessa ja hyödyllisiä HCV-infektioiden hoidossa.

Keksinnön kohde on polypeptidi, mikä käsittää epitoopin, joka on kooditettu HCV:n cDNA:ssa, jossa HCV:n cDNA on sekvenssi, jota on merkitty nukleotidinumeroilla -319 - 1348 tai 8659 - 8866 kuviossa 17.

Muu keksinnön kohde on peptidi, mikä käsittää HCV-epitoopin, jossa peptidillä on kaava

$$AA_x\text{-}AA_y,$$

missä x ja y merkitsevät aminohapponumeroita, jotka on esitetty kuviossa 17 ja jossa peptidi on valittu ryhmästä, mikä käsittää

AA1-AA50; AA1-AA84; AA9-AA177; AA50-AA100; AA40-AA90; AA65-AA75; AA99-AA120; AA95-AA110; AA100-AA150; AA150-AA200; AA200-AA250; AA220-AA240; AA245-AA265; AA250-AA300; AA290-AA330; AA290-AA305; AA300-AA350; AA310-AA330; AA350-AA400; AA405-AA495; AA400-AA450; AA437-AA582; AA450-AA500; AA475-AA495; AA500-AA550; AA511-AA690; AA515-AA550; AA550-AA600; AA550-AA625; AA575-AA605; AA600-AA650; AA600-AA625; AA635-AA665; AA650-AA700; AA645-AA680; AA700-AA750; AA700-AA725; AA725-AA775; AA770-AA790; AA750-AA800; AA800-AA815; AA850-AA875; AA800-AA850; AA920-AA990; AA850-AA900; AA920-AA945; AA940-AA965; AA950-AA1000; AA1000-AA1060; AA1000-AA1050; AA1025-AA1040; AA1075-AA1175; AA1050-AA1200; AA1070-AA1100; AA1100-AA1140; AA1192-AA1457; AA1195-AA1250; AA1200-AA1225; AA1225-AA1250; AA1250-AA1300; AA1260-AA1310; AA1260-AA1280; AA1266-AA1428; AA1300-AA1350; AA1310-AA1340; AA1345-AA1405; AA1350-AA1400; AA1365-AA1380; AA1380-AA1405; AA1400-AA1450; AA1450-AA1500; AA1475-AA1515; AA1475-AA1500; AA1500-AA1550; AA1515-AA1550; AA1550-AA1600; AA1569-AA1931; AA1570-AA1590; AA1595-AA1610; AA1590-AA1650; AA1610-AA1645; AA1650-AA1690; AA1685-AA1770; AA1689-AA1805; AA1690-AA1720; AA1694-AA1735; AA1720-AA1745; AA1745-AA1770; AA1750-AA1800; AA1775-AA1810; AA1795-AA1850; AA1850-AA1900; AA1900-AA1950; AA1900-AA1920; AA1916-AA2021; AA1920-AA1940; AA1949-AA2124; AA1950-AA2000; AA1950-AA1985; AA2000-AA2050; AA2020-AA2045; AA2045-AA2100; AA2045-AA2070; AA2054-AA2223; AA2070-AA2100; AA2100-AA2150; AA2150-AA2200; AA2200-AA2325; AA2250-AA2330; AA2265-AA2280; AA2280-AA2290; AA2287-AA2385; AA2300-AA2350; AA2350-AA2400; AA2345-AA2415; AA2345-AA2375; AA2348-AA2464; AA2370-AA2410; AA2400-AA2450; AA2400-AA2425; AA2415-AA2450; AA2445-AA2500; AA2371-AA2502; AA2500-AA2550; AA2505-AA2540; AA2550-AA2600; AA2560-AA2580; AA2600-AA2650; AA2620-AA2650; AA2650-AA2700; AA2655-AA2670; AA2670-AA2700; AA2700-AA2750; AA2750-AA2800; AA2755-AA2780; AA2780-AA2830; AA2785-AA2810; AA2796-AA2886; AA2810-AA2825; AA2800-AA2850; AA2850-AA2900; AA2900-AA2950; AA2910-AA2930; AA2925-AA2950; ja AA2945-loppuun (C'-pää).

Kuvio 1 esittää HCV:n cDNA:n sekvenssiä kloonissa 12f ja siihen kooditettuja aminohappoja.

Kuvio 2 esittää HCV:n cDNA:n sekvenssiä kloonissa k9-1 ja siihen kooditettuja aminohappoja.

Kuvio 3 esittää HCV:n cDNA:n sekvenssiä kloonissa 15e ja siihen kooditettuja aminohappoja.

Kuvio 4 esittää HCV:n cDNA:n nukleotidisekvenssiä kloonissa 13i ja siihen kooditettuja aminohappoja ja sekvenssejä, jotka menevät päällekkäin kloonin 12f kanssa.

Kuvio 5 esittää HCV:n cDNA:n nukleotidisekvenssiä kloonissa 26j ja siihen kooditettuja aminohappoja ja sekvenssejä, jotka menevät päällekkäin kloonin 13i kanssa.

Kuvio 6 esittää HCV:n cDNA:n nukleotidisekvenssiä kloonissa CA59a ja siihen kooditettuja aminohappoja ja sekvenssejä, jotka menevät päällekkäin kloonien 26j ja K9-1 kanssa.

Kuvio 7 esittää HCV:n cDNA:n nukleotidisekvenssiä kloonissa CA84a ja siihen kooditettuja aminohappoja ja sekvenssejä, jotka menevät päällekkäin kloonin CA59a kanssa.

Kuvio 8 esittää HCV:n cDNA:n nukleotidisekvenssiä kloonissa CA156e ja siihen kooditettuja aminohappoja ja sekvenssejä, jotka menevät päällekkäin kloonin CA84a kanssa.

Kuvio 9 esittää HCV:n cDNA:n nukleotidisekvenssiä kloonissa CA167b ja siihen kooditettuja aminohappoja ja sekvenssejä, jotka menevät päällekkäin kloonin CA156e kanssa.

Kuvio 10 esittää HCV:n cDNA:n nukleotidisekvenssiä kloonissa CA216a ja siihen kooditettuja aminohappoja ja sekvenssejä, jotka menevät päällekkäin kloonin CA167b kanssa.

Kuvio 11 esittää HCV:n cDNA:n nukleotidisekvenssiä kloonissa CA290a ja siihen kooditettuja aminohappoja ja päällekkäisyyttä kloonin CA216a kanssa.

Kuvio 12 esittää HCV:n cDNA:n nukleotidisekvenssiä kloonissa ag30a ja päällekkäin menemistä kloonin CA290a kanssa.

Kuvio 13 esittää HCV:n cDNA:n nukleotidisekvenssiä kloonissa CA205a ja päällekkäin menemistä HCV:n cDNA:n sekvenssin kanssa kloonissa CA290a.

Kuvio 14 esittää HCV:n cDNA:n nukleotidisekvenssiä kloonissa 18g ja päällekkäin menemistä HCV:n cDNA:n sekvenssin kanssa kloonissa ag30a.

Kuvio 15 esittää HCV:n cDNA:n nukleotidisekvenssiä kloonissa 16jh, siihen kooditettuja aminohappoja ja nukleotidien päällekkäisyyttä HCV:n cDNA:n sekvenssin kanssa kloonissa 15e.

Kuvio 16 esittää HCV:n cDNA:n ORF:n, joka cDNA on peräisin klooneista pi14a, CA167b, CA156e, CA84a, CA59a, K9-1, 12f, 14i, 11b, 7f, 7e, 8h, 33c, 40b, 37b, 35, 36, 81, 32, 33b, 25c, 14c, 8f, 33f, 33g, 39c, 35f, 19g, 26g ja 15e.

Kuvio 17 esittää kootun HCV:n cDNA-sekvenssin, joka on peräisin yllämainituista klooneista, sense-säikeen ja kootun HCV:n cDNA-sekvenssin, joka on julkaistu EP-julkaisussa No. 318,216. Kloonit, joista sekvenssi on peräisin, ovat b114a, 18g, ag30a, CA205a, CA290a, CA216a, pi14a, CA167b, CA156e, CA84a, CA59a, K9-1 (jota kutsutaan myös nimellä k9-1), 26j, 13i, 12f, 14i, 11b, 7f, 7e, 8h, 33c, 40b, 37b, 35, 36, 81, 32, 33b, 25c, 14c, 8f, 33f, 33g, 39c, 35f, 19g, 26g, 15e, b5a ja 16jh. Kuviossa kolme viivaa sekvenssin päällä merkitsee oletetun initiaattorimetioniinikodonin asemaa. Kuviossa on myös esitetty yhdistelmä-HCV:n cDNA:ssa kooditetun oletetun polyproteiinin aminohapposekvenssi.

Kuvio 18 on kaavio immunologisesta pesäkkeenseulontamenetelmästä, jota käytetään antigeenin kartoitustutkimuksissa.

Kuvio 19 esittää HCV:ssä ja Länsi-Niilin viruksessa koodi-tettujen polyproteiinien hydrofobisuusprofiilit.

Kuvio 20 on hydrofiilisyys/hydrofobisuusprofiilin seuranta ja oletetun HCV-polyproteiinin antigeeni-indeksin seuranta.

Kuvio 21 esittää säilyneet yhteislineaariset peptidit HCV:ssä ja Flaviviruksissa.

I. Määritelmät

Termi "hepatitis-C-virus" on varattu alalla tähän asti tuntemattomalle NANBV:n etiologiselle aiheuttajalle. Niinpä tässä käytettynä "hepatitis-C-virus" (HCV) viittaa NANBV:n syynä olevaan aiheuttajaan, johon aikaisemmin viitattiin NANBV:nä ja/tai BB-NANBV:nä. Termejä HCV, NANBV ja BB-NANBV käytetään tässä keskenään vaihdellen. Tämän terminologian jatkona kutsutaan HCV:n aiheuttamaa sairautta, jota aikaisemmin kutsuttiin NANB-hepatitikseksi (NANBH), hepatitis-C:ksi. Termejä NANBH ja hepatitis-C käytetään tässä keskenään vaihdellen.

Termi "HCV" merkitsee tässä käytettynä viruslajeja, joista patogeeniset kannat aiheuttavat NANBH:n ja siitä johdettuja heikennettyjä kantoja tai puutteellisia häiritseviä partikkeleita. Kuten esitetään alla, HCV-genomi muodostuu RNA:sta. Tiedetään, että RNA:ta sisältävillä viruksilla on suhteellisen korkeat spontaanien mutaatioiden nopeudet, s.o. on raportoitu suuruusluokkaa 10^{-3} - 10^{-4} nukleotidia kohti olevista nopeuksista (Fields & Knipe (1986)). Siksi alla kuvatun HCV-lajien joukossa on monia kantoja, jotka voivat olla virulentteja tai avirulentteja. Tässä kuvatut koostumukset ja menetelmät tekevät mahdolliseksi eri HCV-kantojen tai eristeiden lisääntymisen, määrittämisen, osoittamisen ja eristämisen. Edelleen tässä esitetty sallii diagnostisten välineiden ja rokotteiden valmistamisen eri kantoja varten ja se sallii myös koostumukset ja menetelmät, joilla on käyttöä

seulontamenetelmissä antiviraalisia aineita varten farmakologiseen käyttöön siinä, että ne estävät HCV:n replikaation.

Tässä annettu tieto, vaikkakin se on peräisin yhdestä HCV-kannasta tai eristeestä, johon tästä lähtien viitataan nimellä CDC/HCV1 (jota myös kutsutaan HCV1:ksi), on riittävä virustaksonomeille salliakseen muidenkin kantojen identifioinnin, jotka ovat lajin sisällä. Tässä annettu tieto antaa uskon, että HCV on Flavi-tyyppinen virus. Flavivirus-partikkeleiden morfologia ja koostumus ovat tunnettuja ja niistä keskustellaan Brintonin (1986) julkaisussa. Yleisesti morfologian suhteen, Flavivirukset sisältävät keskeisen ydinkapsidin, jota ympäröi kaksikerroksinen lipidi. Virionit ovat pallomaisia ja niiden halkaisija on noin 40-50 nm. Niiden ytimet ovat noin 25-30 nm halkaisijaltaan. Pitkin virionikuoren ulkopintaa on ulokkeita, jotka ovat noin 5-10 nm pitkiä ja niiden päässä olevat nupit ovat noin 2 nm halkaisijaltaan.

HCV:n eri kantojen ja eristeiden odotetaan sisältävän vaihteluita aminohapoissa ja nukleiinihapoissa verrattuna prototyyppieristeeseen, HCV1:een. Monien eristeiden odotetaan osoittavan suurta (s.o. suurempaa kuin 40 %) homologiaa kokonaisaminohapposekvenssissä verrattuna HCV1:een. Kuitenkin voidaan myös havaita muita sitä vähäisemmän homologian HCV-eristeitä. Nämä voitaisiin määrittää HCV-kantoina eri kriteereiden mukaan, kuten ORF:nä, jossa on noin 9000 nukleotidia - noin 12000 nukleotidia, koodittaen polyproteiinia, joka on kooltaan samanlainen kuin HCV1, kooditettuna polyproteiinina, jolla on samanlainen hydrofobinen ja antigeeninen luonne kuin HCV1:llä, ja yhteislineaaristen peptidisekvenssien läsnäolona, jotka säilyvät HCV1:n kanssa. Lisäksi genomi olisi positiivisrihmaista RNA:ta.

HCV koodittaa ainakin yhtä epitooppia, joka on immunologisesti identifioitavissa sen epitoopin kanssa HCV-genomissa,

josta tässä kuvatut cDNA:t ovat peräisin; mielellään epitooppi sisältyy tässä kuvattuun aminohapposekvenssiin. Epitooppi on ainutkertainen HCV:lle, kun sitä verrataan muihin tunnettuihin Flaviviruksiin. Epitoopin ainutkertaisuus voidaan määrittää sen immunologisella reaktiivisuudella HCV:n vastaisten vasta-aineiden kanssa ja immunologisen reaktivisuuden puuttumisena muiden Flaviviruslajien vastaisten vasta-aineiden kanssa. Menetelmät immunologisen reaktiivisuuden määrittämiseksi ovat tunnettuja alalla, esimerkiksi radioimmunologinen analyysi, ELISA-analyysi, hemoagglutinaatio ja tässä annetaan lukuisia esimerkkejä sopivista tekniikoista analyysejä varten.

Edellisen lisäksi voidaan käyttää seuraavia nukleiinihappohomologian ja aminohappohomologian parametrejä, joko yksin tai yhdistelmänä, kannan tai eristeen identifioimiseksi HCV:ksi. Koska HCV-kannat ja eristeet ovat kehityksensä suhteen sukulaisia, odotetaan että genomien kokonaishomologia nukleotiditasolla on todennäköisesti noin 40 % tai enemmän, todennäköisesti noin 60 % tai enemmän ja vielä todennäköisemmin noin 80 % tai enemmän; ja lisäksi että niissä on vastaavia viereisiä ainakin noin 13 nukleotidin sekvenssejä. Oletetun HCV-kannan genomisekvenssin ja CDC/CH1 cDNA-sekvenssin välinen vastaavuus voidaan määrittää alalla tunnetuilla tekniikoilla. Esimerkiksi ne voidaan määrittää vertaamalla suoraan oletetun HCV:n polynukleotidin sekvenssitietoa ja tässä kuvattuja HCV:n cDNA-sekvenssejä. Esimerkiksi myös ne voidaan määrittää hybridisoimalla polynukleotideja olosuhteissa, jotka muodostavat stabiileja duplekseja homologisten alueiden välille (esimerkiksi niiden alueiden, joita käytettäisiin ennen S_1-pätkimistä), mitä seuraa pätkiminen yksisäikeisillä erityisillä nukleaaseilla, mitä seuraa pätkittyjen fragmenttien koon määritys.

HCV-kantojen kehitykseen liittyvän suhteen takia voidaan oletetut HCV-kannat tai eristeet tunnistaa niiden polypep-

tiditasolla vallitsevan homologiansa avulla. Yleisesti HCV-kannat tai eristeet ovat enemmän kuin noin 40 % homologisia, todennäköisesti enemmän kuin noin 70 % homologisia ja vielä todennäköisemmin enemmän kuin noin 80 % homologisia ja jotkut voivat olla enemmän kuin noin 90 % homologisia polypeptiditasolla. Tekniikat aminohapposekvenssien homologian määrittämiseksi ovat tunnettuja alalla. Esimerkiksi aminohapposekvenssi voidaan määrittää suoraan ja sitä voidaan verrata tässä annettuihin sekvensseihin. Vaihtoehtoisesti oletetun HCV:n genomimateriaalin nukleotidisekvenssi voidaan määrittää (tavallisesti cDNA-välituotteen kautta), siinä kooditettu aminohapposekvenssi voidaan määrittää ja vastaavia alueita voidaan verrata.

Tässä käytettynä polynukleotidi, joka "on peräisin" annetusta sekvenssistä viittaa polynukleotidisekvenssiin, joka muodostuu arviolta ainakin noin 6 nukleotidin sekvenssistä, mieluummin ainakin noin 8 nukleotidin, vielä mieluummin ainakin noin 10-12 nukleotidin ja vieläkin mieluummin ainakin noin 15-20 nukleotidin sekvenssistä, mikä vastaa merkityn nukleotidisekvenssin aluetta. "Vastaaminen" merkitsee homologista tai komplementaarista annetulle sekvensssille. Mieluummin alueen sekvenssi, josta polynukleotidi on peräisin, on homologinen tai komplementaarinen sekvenssille, joka on ainutkertainen HCV-genomille. Olipa sekvenssi ainutkertainen HCV-genomille tai ei, se voidaan määrittää tekniikoilla, jotka ovat alan ammattilaiselle tunnettuja. Esimerkiksi sekvenssiä voidaan verrata tietopankkien, esimerkiksi Genebank'in sekvensseihin sen määrittämiseksi, onko se läsnä infektoitumattomassa isännässä tai muussa organismissa. Sekvenssiä voidaan myös verrata muiden virusaineiden tunnettuihin sekvensseihin, sisältäen ne aineet, jotka ovat tunnettuja hepatitiksen aiheuttajia, esimerkiksi HAV, HBV ja HDV ja muihin Flaviviridae-perheen jäseniin. Vastaavuus tai vastaamattomuus johdetun sekvenssin ja muiden sekvenssien välillä voidaan määrittää myös hydridisaation avulla sopivissa

tiukoissa olosuhteissa. Hybridisaatiotekniikat nukleiinihapposekvenssien komplementaarisuuden määrittämiseksi ovat tunnettuja alalla ja niistä keskustellaan alla. Katso myös esimerkiksi julkaisua Maniatis et al. (1982). Lisäksi hybridisaatiolla muodostuneiden dupleksipolynukleotidien sopimattomuus voidaan määrittää tunnetuilla tekniikoilla, sisältäen esimerkiksi pätkimisen nukleaasilla, kuten S1:llä, joka spesifisesti katkoo yksisäikeisiä alueita dupleksipolynukleotideissa. Alueet, joista tyypillisiä DNA-sekvenssejä voidaan "johtaa", sisältävät, mutteivat ne ole niihin rajoitettuja, esimerkiksi alueet, jotka koodittavat erityisiä epitooppeja ja lisäksi ei-transkriptoituja ja/tai ei-transloituja alueita.

Johdettu polynukleotidi ei ole välttämättä fysikaalisesti peräisin esitetystä nukleotidisekvenssistä, mutta se voidaan luoda millä tahansa tavalla, sisältäen esimerkiksi kemiallisen synteesin tai DNA:n replikoimisen tai käänteisen transkription tai transkription. Lisäksi niiden alueiden yhdistelmiä, jotka vastaavat annetun sekvenssin alueita, voidaan muokata tavoilla, joiden tiedetään alalla vastaavan aiottua käyttöä.

Samoin polypeptidi- tai aminohapposekvenssi, joka "on peräisin" annetusta nukleiinihapposekvenssistä, viittaa polypeptidiin, jossa on aminohapposekvenssi, joka on identtinen sen polypeptidin kanssa, joka on kooditettu sekvenssiin tai sen osaan, jossa osa käsittää ainakin 3-5 aminohappoa ja mieluummin ainakin 8-10 aminohappoa ja vielä mieluummin ainakin 11-15 aminohappoa tai joka on immunologisesti tunnistettavissa sekvenssiin kooditetun polypeptidin avulla.

Yhdistelmä- tai johdettu polypeptidi ei ole välttämättä transloitu annetusta nukleiinihapposekvenssistä, esimerkiksi tässä kuvatusta HCV:n cDNA-sekvenssistä; se voi olla luotu millä tahansa tavalla, sisältäen esimerkiksi kemiallisen

synteesin tai yhdistelmäekspressiojärjestelmän ekspression tai eristämisen mutatoituneesta HCV:stä. Yhdistelmä- tai johdettu polypeptidi voi sisältää yhden tai useamman aminohappojen tai ei-luonnon aminohappojen analogin sekvenssissään. Menetelmät aminohappojen analogien panemiseksi sekvenssiin ovat alalla tunnettuja. Se voi myös sisältää yhden tai useampia leimoja, jotka ovat tunnettuja alan ammattilaiselle.

Termi "yhdistelmäpolynukleotidi" käytettynä tässä merkitsee polynukleotidia, joka on peräisin genomista, cDNA:sta, se on semiynteettistä tai synteettistä alkuperää, joka alkuperänsä tai manipulaationsa takia: (1) ei liity kaikkiin niihin polynukleotideihin tai niiden osaan, joihin se liittyy luonnossa; (2) on kytketty polynukleotidiin, joka on muu kuin se, johon se on kytketty luonnossa tai (3) se ei esiinny luonnossa.

Termi "polynukleotidi" tässä käytettynä viittaa minkä tahansa pituisten nukleotidien, joko ribonukleotidien tai deoksiribonukleotidien, polymeeriseen muotoon. Tämä termi viittaa vain molekyylin ensisijaiseen rakenteeseen. Täten tämä termi sisältää kaksi- ja yksisäikeisen DNA:n ja lisäksi kaksi- ja yksisäikeisen RNA:n. Se sisältää myös tunnetut modifioidut tyypit, esimerkiksi leimat, jotka tunnetaan alalla, metylaation, "hännästämisen", yhden tai useamman luonnossa esiintyvän nukleotidin substituution analogilla, nukleotidien väliset muunnokset, kuten esimerkiksi ne, joissa on varauksettomia liittymiä (esim. metyylifosfonaatit, fosfotriesterit, fosfoamidaatit, karbamaatit jne.) ja varauksellisia liittymiä (esim. fosforotioaatit, fosforoditioaatit jne.) ne jotka sisältävät riippuvia puoliskoja, kuten esimerkiksi proteiinit (sisältäen esimerkiksi nukleaasit, toksiinit, vasta-aineet, signaalipeptidit, poly-L-lysiinin jne.), ne joissa on välikerrostajia (esim. akridiini, psoraleeni jne.), ne jotka sisältävät kelaattoreita (esim. metallit, radioaktiiviset metallit, boori, hapettavat metallit jne.), ne jotka

sisältävät alkyloivia aineita, ne joissa on muunnettuja liitoksia (esim. alfa-anomeeriset nukleiinihapot jne.) ja myös polynukleotidien modifioimattomat muodot.

Termi "puhdistettu viruspolynukleotidi" viittaa HCV-genomiin tai sen fragmenttiin, joka on olennaisen vapaa, s.o. se sisältää vähemmän kuin noin 50 %, mieluummin vähemmän kuin noin 70 % ja vielä mieluummin vähemmän kuin noin 90 % polypeptidejä, joihin viruspolynukleotidi luonnollisesti liittyy. Tekniikat viruspolynukleotidien puhdistamiseksi viruspartikkeleista ovat tunnettuja alalla ja sisältävät esimerkiksi partikkelin katkaisun kaotrooppisella aineella, polynukleotidien ja polypeptidien differentiaaliuuttamisen ja erottamisen ioninvaihtokromatografian, affiniteettikromatografian ja sedimentoimisen avulla tiheyden mukaan.

Termi "puhdistettu viruspolypeptidi" viittaa HCV-polypeptidiin tai sen fragmenttiin, joka on olennaisen vapaa, s.o. se sisältää vähemmän kuin noin 50 %, mieluummin vähemmän kuin noin 70 % ja vielä mieluummin vähemmän kuin noin 90 % solukomponentteja, joihin viruspolypeptidi luonnollisesti liittyy. Tekniikat viruspolypeptidien puhdistamiseksi ovat alalla tunnettuja ja näiden tekniikoiden esimerkeistä keskustellaan alla. Termi "puhdistettu viruspolynukleotidi" viittaa HCV-genomiin tai sen fragmenttiin, joka on olennaisen vapaa, s.o. se sisältää vähemmän kuin noin 20 %, mieluummin vähemmän kuin noin 50 % ja vielä mieluummin vähemmän kuin noin 70 % polypeptidejä, joihin viruspolynukleotidi liittyy luonnossa. Viruspolynukleotidien puhdistustekniikat viruspartikkeleista ovat alalla tunnettuja ja sisältävät esimerkiksi partikkelin rikkomisen kaotrooppisella aineella ja polynukleotidien ja polypeptidien erottamisen ioninvaihtokromatografialla, affiniteettikromatografialla ja tiheyden mukaan sedimentoimalla.

"Yhdistelmäisäntäsolut", isäntäsolut", "solut", "solulinjat", "soluviljelmät" ja muut sellaiset termit, jotka merkitsevät mikro-organismeja tai korkeampia eukarioottisolulinjoja, joita viljellään yksisoluisina kokonaisuuksina, viittaavat soluihin, joita voidaan käyttää tai on käytetty yhdistelmävektorin tai muun siirto-DNA:n vastaanottajana ja jotka sisältävät sen alkuperäisen solun perimän, johon siirros on tehty. Ymmärretään, että yksittäisen emäsolun perimä ei välttämättä ole täysin identtinen morfologialtaan tai genomiltaan tai ole täysi DNA-komplementti alkuperäisenä vanhempana luonnon, onnettomuuden seurauksena tapahtuneen tai tarkoitetun mutaation seurauksena.

"Replikoni" (replicon) on mikä tahansa geneettinen elementti, esimerkiksi plasmidi, kromosomi, virus, kosmidi jne, joka käyttäytyy autonomisena polynukleotidin replikaation yksikkönä solun sisällä; s.o. se pystyy replikoitumaan oman kontrollinsa alaisena.

"Vektori" on replikoni, johon on kiinnittynyt toinen polynukleotidisegmentti tuodakseen mukaan kiinnittyneen segmentin replikaation ja/tai ekspression.

"Säätösekvenssi" viittaa polynukleotidisekvensseihin, jotka ovat välttämättömiä niiden koodaussekvenssien, joihin ne ovat sitoutuneet, ekspression aikaansaamiseen. Sellaisten säätösekvenssien luonne eroaa isäntäorganismin mukaan; prokariooteissa sellaiset säätösekvenssit sisältävät yleisesti promoottorin, ribosomin sidoskohdan ja terminaattoreita; eukariooteissa sellaiset säätösekvenssit sisältävät yleisesti promoottoreita, terminaattoreita ja joissakin tapauksissa vahvistajia. Termi "säätösekvenssit" on aiottu sisältämään minimissään kaikki komponentit, joiden läsnäolo on välttämätöntä ekspressiota varten ja ne voivat myös sisältää lisäkomponentteja, joiden läsnäolo on edullista, esimerkiksi johtosekvenssejä.

"Toiminnallisesti kytketty" viittaa rinnakkainasetteluun, jossa niin kuvatut komponentit ovat sellaisessa suhteessa, joka sallii niiden toiminnan aiotulla tavalla. Säätösekvenssi, joka on "toiminnallisesti kytketty" kooditussekvenssiin, on sidottu sellaisella tavalla, että kooditussekvenssin ekspressio saadaan aikaan olosuhteissa, jotka ovat yhteensopivia säätösekvenssien kanssa.

"Avoin lukukehys" (Open reading frame ORF) on polynukleotidisekvenssin alue, joka koodittaa polypeptidiä; tämä alue voi edustaa kooditussekvenssin osaa tai kokonaista kooditussekvenssiä.

"Kooditussekvenssi" on polynukleotidisekvenssi, joka on transkriptoitu mRNA:han ja/tai transloitu polypeptidiin, kun se on pantu sopivien säätävien sekvenssien kontrolliin. Kooditussekvenssin rajat määrittävät translaation aloittava kodoni 5'-päässä ja translaation lopettava kodoni 3'-päässä. Kooditussekvenssi voi sisältää, muttei se ole rajoitettu niihin, mRNA:n, cDNA:n ja yhdistelmäpolynukleotidisekvenssejä.

"Immunologisesti tunnistettavissa jollakin/jonakin" viittaa sellaisten epitooppien ja polypeptidien läsnäoloon, jotka ovat myös läsnä ja ovat ainutkertaisia annetuille polypeptideille, tavallisesti HCV-proteiineille. Immunologisen identiteetin voi määrittää vasta-aineen sitoutuminen ja/tai kilpailu sitoutumisessa; nämä tekniikat ovat tunnettuja alan keskitason ammattilaiselle ja niitä kuvataan myös alla. Tässä käytettynä "epitooppi" viittaa polypeptidin antigeeniseen determinanttiin; epitooppi voisi käsittää kolme aminohappoa epitoopille ainutkertaisessa avaruuskonformaatiossa, yleisesti epitooppi käsittää ainakin viisi sellaista aminohappoa ja tavallisemmin se käsittää ainakin 8-10 sellaista aminohappoa. Aminohappojen avaruuskonformaation määrittämis-

menetelmät ovat alalla tunnettuja ja sisältävät esimerkiksi röntgenkristallografian ja kaksiulotteisen ydinmagneettisen resonanssin.

Polypeptidi on "immunologisesti reaktiivinen" vasta-aineen kanssa, kun se sitoutuu vasta-aineeseen siten, että se tunnistaa tietyn polypeptidin sisältämän epitoopin vasta-aineen. Immunologisen reaktiivisuuden voi määrittää vasta-aineen sitoutuminen, erityisemmin vasta-aineen sitoutumisen kinetiikka ja/tai kilpailu sitoutumisessa käyttäen kilpailijoina tunnettuja polypeptidejä, jotka sisältävät epitoopin, jota vastaan vasta-aine on suunnattu. Tekniikat sen määrittämiseksi onko polypeptidi immunologisesti reaktiivinen vasta-aineen kanssa vai ei, ovat alalla tunnettuja.

Tässä käytettynä termi "immunogeeninen polypeptidi" on polypeptidi, joka antaa solu- ja/tai nestevasteen, joko yksin tai liitettynä kantajaan apuaineen läsnä- tai poissaollessa.

Termi "polypeptidi" viittaa aminohappojen polymeeriin, eikä viittaa tuotteen erityiseen pituuteen; täten peptidit, oligopeptidit ja proteiinit sisältyvät polypeptidin määritelmään. Tämä termi ei myöskään viittaa polypeptidien ekspression jälkeisiin muunnoksiin eikä sulje niitä pois, esimerkiksi glykosylaatioihin, asetylaatioihin, fosforylaatioihin ja sen kaltaisiin. Määritelmään sisältyvät esimerkiksi polypeptidit, jotka sisältävät yhden tai useamman aminohappojen analogin (sisältäen esimerkiksi ei-luonnon aminohapot jne.), polypeptidit, joissa on substituoituja liitoksia ja myös muut alalla tunnetut muunnokset, sekä luonnossa esiintyvät että ei-luonnossa esiintyvät.

"Transformaatio" tässä käytettynä viittaa ulkopuolisen polynukleotidin panemiseen isäntäsoluun, riippumatta panemiseen käytetystä menetelmästä, esimerkiksi suora otto, transduktio, f-liitto tai elektroporaatio. Ulkoinen polynukleotidi voidaan

pitää integroimattomana vektorina, esimerkiksi plasmidina tai vaihtoehtoisesti se voidaan integroida isäntägenomiin.

"Yksilö" tässä käytettynä viittaa selkärankaisiin, erityisesti imettäväislajin jäseniin ja sisältää, muttei ole niihin rajoitettu, kotieläimet, urheilueläimet ja kädelliset sisältäen ihmiset.

Tässä käytettynä nukleiinihapon "sense-säie" sisältää sekvensin, jolla on sekvenssihomologiaa mRNA:n sekvenssin kanssa. "Antisense-säie" sisältää sekvenssin, joka on "sense-säikeelle" komplementaarinen.

Tässä käytettynä viruksen "positiivisen säikeen genomi" on sellainen, jossa genomi, joko RNA tai DNA, on yksisäikeinen ja joka koodittaa viruspolypeptidejä. Esimerkit positiivisen säikeen RNA-viruksista sisältävät Togaviridae, Coronaviridae, Retroviridae, Picornaviridae, ja Caliciviridae. Mukaan sisältyvät myös Flaviviridae, joka aikaisemmin luokiteltiin kuulumaan lajiin Togaviridae. Katso Fields & Knipe (1986).

Tässä käytettynä "vasta-aineen sisältävä ruumiin osa" viittaa yksilön ruumiin osaan,joka on kyseessä olevien vasta-aineiden lähde. Vasta-aineita sisältävät ruumiin osat ovat tunnettuja alalla ja sisältävät esimerkiksi, mutta eivät ole niihin rajoitettuja, plasman, seerumin, selkäydinnesteen, imunesteen, hengitysteiden, ruuansulatuskanavan ja sukupuolivirtsakanavan ulko-osat, kyyneleet, syljen, maidon, veren valkosolut ja myeloomat.

Tässä käytettynä "puhdistettu HCV" viittaa HCV-valmisteeseen, joka on eristetty soluosasista, joihin virus tavallisesti liittyy ja muista virustyypeistä, jotka voivat olla läsnä infektoituneessa kudoksessa. Tekniikat virusten eristämiseksi ovat tunnettuja alan ammattilaisille ja sisältävät esimerkik-

si sentrifugoinnin ja affiniteettikromatografian; menetelmästä puhdistetun HCV:n valmistamiseksi keskustellaan alla.

Termi "HCV-partikkelit" sisältää tässä käytettynä koko virionin ja myös partikkelit, jotka ovat virionin muodostumisessa välituotteita. HCV-partikkeleissa on yleensä yksi tai useampia HCV-proteiineja HCV-nukleiiinihappoon liittyvinä.

Tässä käytettynä "koetin" viittaa polynukleotidiin, joka muodostaa hybridirakenteen kohdealueen sekvenssin kanssa johtuen ainakin yhden sekvenssin komplementaarisuudesta koettimessa kohdealueen sekvenssin kanssa. Koetin ei kuitenkaan sisällä sekvenssiä, joka on komplementaarinen sekvensseille, joita käytetään aloittamaan polymeraasiketjureaktio.

Tässä käytettynä termi "kohdealue" viittaa nukleiinihapon alueeseen, joka on amplifioitava ja/tai osoitettava.

Tässä käytettynä termi "virus-RNA", mikä sisältää HCV:n RNA:n, viittaa RNA:han virusgenomista, sen fragmenteista, sen transkripteista ja siitä peräisin olevista mutanttisekvensseistä.

Tässä käytettynä "biologinen näyte" viittaa kudos- tai nestenäytteeseen, joka on eristetty yksilöstä, sisältäen plasman, seerumin, selkäydinnesteen, imunesteen, ihon, hengitysteiden, ruuansulatuskanavan ja sukupuoli-virtsakanavan ulko-osat, kyyneleet, syljen, maidon, verisolut, kasvaimet, elimet ja myös in vitro soluviljelyosien näytteet (sisältäen, mutta ei niihin rajoittuen, kuntoon laitetun viljelyväliaineen, joka on tulosta solujen kasvusta solujen viljelyväliaineessa, oletut virusinfektoidut solut, yhdistelmäsolut ja solukomponentit).

II. Keksinnön kuvaus

Tämän keksinnön käytännön suorituksessa käytetään, ellei toisin ole mainittu, molekyylibiologian, mikrobiologian, yhdistelmä-DNA-tekniikan ja immunologian tavanomaisia tekniikoita, jotka ovat alalla käytössä. Sellaisia tekniikoita selvitetään täysin kirjallisuudessa. Katso esimerkiksi seuraavia: Maniatis, Fitsch & Sambrook, MOLECULAR CLONING; A LABORATORY MANUAL (1982); DNA CLONING, VOLUMES I AND II (D.N. Glover toim. 1985); OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS (M.J. Gait toim. 1984); NUCLEIC ACID HYBRIDIZATION (B.D. Hames & S.J. Higgins toim. 1984); ANIMAL CELL CULTURE (R.I. Freshney toim. 1986); IMMOBOLIZED CELLS AND ENZYMES (IRL Press, 1986); B.Perbal, A PRACTICAL GUIDE TO MOLECULAR CLONING (1984); sarja, METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.); GENE TRANSFER VECTORS FOR MAMMALIAN CELLS (J.H. Miller ja M.P.Calos toim. 1987, Cold Spring Harbor Laboratory), Methods in Enzymology Vol. 154 and Vol. 155 (Wu ja Grossman, ja vastaavasti Wu, toim.), Mayer ja Walker, toim. (1987), IMMUNOCHEMICAL METHODS IN CELL AND MOLECULAR BIOLOGY (Academis Press, Lontoo), Scopes, (1987), PROTEIN PURIFICATION: PRINCIPLES AND PRACTICE, Toinen painos (Springer-Verlag, N.Y.), ja HANDBOOK OF EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY, VOLUMES I-IV (D.M.Weir ja C.C. Blackwell toim. 1986). Kaikki patentit, patenttihakemukset ja julkaisut, jotka tässä on mainittu, sekä yllä että alla, liitetään tähän mukaan viitteeksi.

Tämän keksinnön hyödylliset materiaalit ja menetelmät tekee mahdolliseksi läheisesti homologisten nukleotidisekvenssien, jotka on eristetty cDNA-kirjastoista, jotka sisältävät HCV:n cDNA-sekvenssejä. Nämä cDNA-kirjastot johdettiin infektoituneen simpanssin plasmassa olevista nukleiinihapposekvensseistä. Yhden näistä kirjastoista, "c"-kirjaston (ATCC No. 40394) rakenne raportoitiin EP-julkaisussa No. 318,216. Lukuisat kloonit, jotka sisälsivät tässä raportoitua HCV:n cDNA:ta, saatiin "c"-kirjastosta. Vaikka muut tässä raportoidut kloonit saatiin muista HCV:n cDNA-kirjastoista,

kloonien läsnäolo, jotka sisälsivät sekvenssejä "c"-kirjastossa, vahvistettiin. Kuten keskusteltiin EP-julkaisussa No. 318,216, "c"-kirjastosta eristettyjen HCV:n cDNA-sekvenssien perhe ei ole peräisin ihmisestä tai simpanssista, eikä se osoita mitään merkittävää homologiaa HBV-genomiin sisältyvien sekvenssien kanssa.

Tässä kuvattujen HCV:n cDNA:oiden saatavuus sallii sellaisten polynukleotidikoettimien rakentamisen, jotka ovat reagensseja, jotka ovat hyödyllisiä viruspolynukleotidien osoittamiseen, sisältäen luovutetun veren. Esimerkiksi sekvensseistä on mahdollista syntetisoida DNA-oligomeereja, joissa on noin 8-10 nukleotidia tai suurempia, jotka ovat hyödyllisiä hybridisaatiokoettimina HCV:n RNA:n osoittamiseksi esimerkiksi luovutetussa veressä, sellaisten kohteiden seerumissa, joiden epäillään kantavan virusta tai soluviljelyjärjestelmissä, joissa virus replikoituu. Lisäksi cDNA-sekvenssit sallivat myös sellaisten HCV-spesifisten polypeptidien suunnittelemisen ja tuottamisen, jotka ovat hyödyllisiä diagnostisina reagensseina HCV-infektion aikana syntyvien vasta-aineiden läsnäolon toteamiseksi. cDNA:sta peräisin olevien puhdistettujen polypeptidien vasta-aineita voidaan myös käyttää virusantigeenien osoittamiseksi biologisissa näytteissä, sisältäen esimerkiksi luovutetun veren näytteet, NANBH:ta sairastavien potilaiden seerumin ja kudosviljelyjärjestelmät, joita käytetään HCV:n replikoimiseen. Lisäksi tässä esitetyt immunogeeniset polypeptidit, jotka ovat kooditettuja kuviossa 17 esitetyn HCV:n cDNA:n ORF:n osissa, ovat myös hyödyllisiä HCV:n seulontaan ja diagnooseihin ja sellaisten vasta-aineiden kasvattamiseen, jotka ovat hyödyllisiä näitä tarkoituksia varten.

Lisäksi tässä kuvatut uudet cDNA-sekvenssit tekevät mahdolliseksi HCV-genomin lisäkuvaamisen. Näistä sekvensseistä peräisin olevia polynukleotidikoettimia ja -alukkeita voidaan käyttää amplifioimaan sekvenssejä, jotka ovat läsnä cDNA-kir-

jastoissa ja/tai seulomaan cDNA-kirjastoja sellaisten lisä-cDNA-sekvenssien varalta, jotka menevät päällekkäin niiden kanssa, joita vuorostaan voidaan käyttää päällekkäin menevien sekvenssien lisän saamiseen. Kuten mainitaan alla ja EP-julkaisussa No- 318,216, näyttää HCV:n genomi olevan RNA:ta, joka käsittää etupäässä suuren avoimen luentakehyksen (ORF), joka koodittaa suurta polyproteiinia.

HCV:n cDNA-sekvenssit, jotka on annettu tässä, polypeptidit, jotka ovat peräisin näistä sekvensseistä ja tässä kuvatut immunogeeniset polypeptidit ja myös vasta-aineet, jotka on suunnattu näitä polypeptidejä vastaan, ovat myös hyödyllisiä verivälitteisten NABV-aineiden (BB-NANBV) eristämisessä ja tunnistamisessa. Esimerkiksi vasta-aineita, jotka ovat suunnattuja HCV-epitooppeja vastaan, jotka sisältyvät polypeptideihin, jotka ovat peräisin cDNA:sta, voidaan käyttää menetelmissä, jotka perustuvat affiniteettikromatografiaan viruksen eristämiseksi. Vaihtoehtoisesti vasta-aineita voidaan käyttää tunnistamaan viruspartikkeleita, jotka on eristetty muilla tekniikoilla. Virusantigeenit ja genomimateriaali eristetyissä viruspartikkeleissa voidaan sitten edelleen karakterisoida.

Edellisen lisäksi tieto, joka annetaan alla, sallii lisä-HCV-kantojen tai -eristeiden identifioinnin. Lisä-HCV-kantojen tai eristeiden eristäminen ja määrittäminen voidaan suorittaa eristämällä nukleiiinihapot ruumiinosista, jotka sisältävät viruspartikkeleita ja/tai virus-RNA:ta, luoden cDNA-kirjastoja käyttäen polynukleotidikoettimia, jotka perustuvat alempana kuvattuihin HCV:n cDNA-koettimiin, seulomalla kirjastoja niiden kloonien varalta, jotka sisältävät alla kuvattavia HCV:n cDNA-sekvenssejä ja vertaamalla HCV:n cDNA:oita uusista eristeistä alla kuvattaviin cDNA:oihin. Niissä tai virusgenomissa kooditettuja polypeptidejä voidaan tarkkailla immunologisen ristireaktiivisuuden suhteen käyttäen yllä kuvattuja polypeptidejä ja

vasta-aineita. Kannat tai eristeet, jotka sopivat HCV:n parametreihin, kuten on kuvattu määritysosassa yllä, ovat helposti identifioitavissa. Muut HCV-kantojen identifioimismenetelmät ovat ilmeisiä alan ammattilaisille perustuen tässä annettuun tietoon.

HCV:n cDNA-sekvenssien eristäminen

Alla kuvattavat uudet HCV:n cDNA-sekvenssit laajentavat cDNA:n sekvenssin HCV-genomia, joka on raportoitu EP-julkaisussa No. 318,216. Sekvenssit, jotka ovat läsnä klooneissa b114a, 18g, ag30a, CA205a, CA290a, CA216a, pi14a, CA167b, CA156e, CA84a ja CA59a, ovat ylävirtaan raportoidusta sekvenssistä ja koottuna antavat yhdistelmä-HCV:n cDNA-sekvenssin nukleotidit -319 - 1348. (Nukleotidin negatiivinen numero merkitsee sen etäisyyttä ylävirtaan nukleotidista, mikä aloittaa oletetun initiaattori-MET-kodonin.) Sekvenssit, jotka ovat läsnä klooneissa b5a ja 16jh, ovat alavirtaan raportoidusta sekvenssistä ja antavat yhdistelmäsekvenssin nukleotidit 8659 - 8866. Yhdistelmä-HCV:n cDNA-sekvenssi, mikä sisältää sekvenssit edellämainituissa klooneissa, on esitetty kuviossa 17.

Tässä kuvatut uudet HCV:n cDNA:t eristettiin lukuisista HCV:n cDNA-kirjastoista, sisältäen "c"-kirjaston, joka oli lambda gt11:ssä (ATCC No. 40394). HCV:n cDNA-kirjastot rakennettiin käyttäen varastoitua seerumia simpanssista, jolla oli krooninen HCV-infektio ja mikä sisälsi korkean virustiitterin, s.o. ainakin 10^6 simpanssin infektioannosta/ml (CID/ml). Varastoitua seerumia käytettiin viruspartikkeleiden eristämiseen; näistä partikkeleista eristettyjä nukleiinihappoja käytettiin mallina rakennettaessa cDNA-kirjastoa virusgenomille. Menetelmiä oletettujen HCV-partikkeleiden eristämiseksi ja HCV:n cDNA-kirjaston "c" rakentamiseksi kuvataan EP-julkaisussa No. 318,216. Muut menetelmät HCV:n cDNA-kirjastojen rakentamiseksi ovat alalla tunnettuja ja joitakin näistä menetelmistä

kuvataan alempana esimerkeissä. Sekvenssien eristäminen suoritettiin seulomalla kirjastoja käyttäen synteettisiä polynukleotidikoettimia, jonka sekvenssit olivat peräisin 5'-alueelta ja 3'-alueelta tunnetusta HCV:n cDNA-sekvenssistä. Kuvaus menetelmästä cDNA-sekvenssien saamiseksi on enimmäkseen historiallisesti kiinnostavaa. Tulokseksi saadut sekvenssit (ja niiden komplementit) annetaan tässä ja sekvenssejä tai mitä tahansa niiden osaa voitaisiin valmistaa käyttäen synteettisiä menetelmiä tai synteettisten menetelmien yhdistelmää saaden osittaisia sekvenssejä käyttäen menetelmiä, jotka ovat samanlaisia kuin ne, joita on tässä kuvattu.

Viruspolypeptidien ja -fragmenttien valmistus

cDNA-sekvenssien tai niistä peräisin olevien nukleotidisekvenssien (sisältäen sekvenssin segmentit ja muunnokset) saatavuus sallii sellaisten ekspressiovektoreiden rakentamisen, jotka koodittavat jompaan kumpaan säikeeseen koditetun polypeptidin antigeenisesti aktiivisia alueita. Nämä antigeenisesti aktiiviset alueet voidaan johtaa päällys- tai kuoriantigeeneistä tai ydinantigeeneistä tai antigeeneistä, jotka ovat nonstrukturaalisia, sisältäen esimerkiksi polynukleotidia sitovat proteiinit, polynukleotidipolymeraasit ja muut viruksproteiinit, joita vaaditaan viruspartikkelin replikaatiota ja/tai kokoonpanoa varten. Fragmentit, jotka koodittavat haluttuja polypeptidejä, johdetaan cDNA-klooneista käyttäen tavanomaista restriktiopilkkomista tai synteettisillä menetelmillä ja ne liitetään vektoreihin, jotka voivat esimerkiksi sisältää osia fuusiosekvensseistä, kuten betagalaktosidaasista tai superoksididismutaasista (SOD), mieluummin SOD:sta. Menetelmiä ja vektoreita, jotka ovat hyödyllisiä sellaisten polypeptidien tuottamiseksi, jotka sisältävät SOD:n fuusiosekvenssejä, kuvataan EP-julkaisussa numero 0196056, joka on julkaistu lokakuun 1 päivänä, 1986. Vektoreita SOD:n fuusiopolypeptidien ekspressoimiseksi ja HCV-polypeptidejä varten, jotka on koodi-

tettu lukuisissa HCV-klooneissa, kuvataan alempana esimerkeissä. Mikä tahansa HCV:n cDNA:n osa, joka sisältää avoimen luentakehyksen, kummassa tahansa sense-säikeessä, voidaan saada yhdistelmäpolypeptidinä, kuten kypsässä tai fuusioproteiinina; vaihtoehtoisesti cDNA:han kooditettu polypeptidi voidaan saada aikaan kemiallisella synteesillä.

Haluttua polypeptidiä koodaava DNA, joko fuusioidussa tai kypsässä muodossa ja sisältäen signaalisekvenssin salliakseen erityksen tai ollen sisältämättä, voidaan liittää ekspressiovektoreihin, jotka ovat sopivia mitä tahansa sopivia isäntiä varten. Sekä eukariootti- että prokariootti-isäntäjärjestelmiä käytetään nykyään muodostettaessa yhdistelmäpolypeptidejä ja tiivistelmä muutamista yleisemmin käytetyistä säätöjärjestelmistä ja isäntäsolulinjoista on annettu alla. Polypeptidi eristetään sitten hajotetuista soluista tai viljelyväliaineesta ja puhdistetaan siinä määrin kuin tarvitaan sen aiottua käyttöä varten. Puhdistus voidaan tehdä tekniikoilla, jotka ovat alalla tunnettuja, esimerkiksi differentiaaliuuttamisella, suolafraktioinnilla, ioninvaihtohartseilla kromatografoimalla, affiniteettikromatografialla, linkoamalla ja sen kaltaisilla. Katso esimerkiksi: Methods in Enzymology lukuisia proteiinien puhdistusmenetelmiä varten. Sellaisia polypeptidejä voidaan käyttää diagnostisina välineinä tai niitä, jotka kehittävät neutraloivia vasta-aineita, voidaan muodostaa rokotteiksi. Näitä polypeptidejä vastaan syntyneitä vasta-aineita voidaan myös käyttää diagnostiikassa ja passiivisessa immunoterapiassa. Lisäksi, kuten keskustellaan alla, näiden polypeptidien vasta-aineet ovat hyödyllisiä HCV-partikkeleiden eristämisessä ja tunnistamisessa.

Antigeenisten polypeptidien valmistaminen ja konjugaatio kantajan kanssa

Polypeptidin antigeeninen alue on yleensä suhteellisen pieni - tyypillisesti pituudeltaan 8-10 aminohappoa tai vähemmän. Niinkin vähästä kuin 5 aminohaposta koostuvat fragmentit

voivat karakterisoida antigeenisen alueen. Nämä segmentit voivat vastata HCV-antigeenin alueita. Niinpä, käyttäen HCV:n cDNA:oita pohjana, DNA:oita, jotka koodittavat HCV-polypeptidien lyhyitä segmenttejä, voidaan ekspressoida yhdistelmänä joko fuusioproteiineina tai eristettyinä polypeptideinä. Lisäksi lyhyitä aminohapposekvenssejä voidaan saada sopivasti kemiallisella synteesillä. Esimerkiksi missä syntetisoitu polypeptidi on muotoiltu oikein saadakseen aikaan oikean epitoopin, mutta on liian pieni ollakseen immunogeeninen, polypeptidi voidaan liittää sopivaan kantajaan.

Lukuisia tekniikoita sellaisen liitoksen saamiseksi on tunnettu alalla, mukaanlukien disulfidiliitoksien muodostamisen käyttäen N-sukkinimidyyli-3-(2-pyridyylitio)propionaattia (SPDP) ja sukkinimidyyli 4-(N-maleiini-imidometyyli)sykloheksaani-1-karboksylaattia (SMCC), joita saadaan Pierce Company'sta, Rockford, Illinois (jos peptidissä ei ole sulfhydryyliryhmää, se voidaan varustaa lisäämällä kysteiinijäännös). Nämä reagenssit luovat disulfidiliitoksen itsensä ja peptidin kysteiinijäännöksen välille yhdessä proteiinissa ja amidiliitoksen lysiinin epsilonaminon kautta tai muun vapaan, toisessa ryhmässä olevan aminoryhmän kautta. Tunnetaan lukuisia sellaisia disulfidi/amidin muodostavia aineita. Katso esimerkiksi Immun. Rev. (1982) 62:185. Muut kaksitoimiset kytkentäaineet muodostavat pikemminkin tioeetteri- kuin disulfidikytkentöjä. Monet näistä tioeettereitä muodostavista aineista ovat kaupallisesti saatavia ja sisältävät 6-maleiini-imidokaproiinihapon, 2-bromietikkahapon, 2-jodietikkahapon, 4-(N-maleiini-imidometyyli)sykloheksaani-1-karboksyylihapon ja sellaisten reaktiokykyiset esterit. Karboksyyliryhmät voidaan aktivoida yhdistämällä ne sukkinimidin tai 1-hydroksyyli-2-nitro-4-sulfonihapon natriumsuolan kanssa. Lisämenetelmät antigeenien kytkemiseksi käyttävät rotavirus/"sidospeptidi"-järjestelmää, joka on kuvattu EP-julkaisussa No. 259,149, jonka sisältö liitetään tähän mukaan

viitteeksi. Edellisen listan ei ole tarkoitettu olevan tyhjentävä ja nimettyjen yhdisteiden muunnoksia voidaan selvästi käyttää.

Voidaan käyttää mitä tahansa kantajaa, joka ei itse aiheuta isännälle haitallisten vasta-aineiden tuotantoa. Sopivat kantajat ovat tyypillisesti suuria, hitaasti metaboloituvia makromolekyylejä, kuten proteiineja; polysakkarideja, kuten lateksilla funktionalisoitua sefaroosia, agaroosia, selluloosaa, selluloosapalloja ja sen kaltaisia; polymeerisiä aminohappoja, kuten polyglutaamihappo, polylysiini ja sen kaltaiset; aminohappokopolymeerejä; ja inaktiivisia viruspartikkeleita. Erityisen hyödyllisiä proteiinikantajia ovat seerumialbumiinit, avainreikäkotilon ("keyhole limpet") hemosyaniini, immunoglobuliinimolekyylit, tyroglobuliini, ovalbumiini, jäykkäkouristustoksoidi, ja muut proteiinit, jotka ovat hyvin tunnettuja alan ammattilaiselle.

Täyspitkien virusproteiinien lisäksi ovat polypeptidit, jotka käsittävät typistettyjä HCV-aminohapposekvenssejä, jotka koodittavat ainakin yhtä virusepitooppia, hyödyllisiä immunologisina reagensseina. Esimerkiksi polypeptidejä, jotka käsittävät sellaisia typistettyjä sekvenssejä, voidaan käyttää reagensseina immunologisessa analyysissä. Nämä polypeptidit ovat myös ehdokasalayksikköantigeenejä koostumuksissa antiseerumin tuottamiseksi tai rokotteisiin. Vaikka näitä typistettyjä sekvenssejä voidaan tuottaa erilaisilla tunnetuilla luonnon virusproteiinin käsittelyillä, pidetään yleisesti parempana tehdä synteettisiä tai yhdistelmäpolypeptidejä, jotka käsittävät HCV-sekvenssin. Polypeptidejä, jotka käsittävät näitä typistettyjä HCV-sekvenssejä, voidaan tehdä kokonaan HCV-sekvensseistä (yksi tai useampia epitooppeja, joko vierekkäisiä tai ei-vierekkäisiä) tai HCV-sekvensseistä ja heteroloogisista sekvensseistä fuusioproteiinissa. Hyödylliset heterologiset sekvenssit sisältävät sekvenssit, jotka antavat erityksen yhdistel-

mäisännästä, vahvistavat HCV-epitooppien immunologista reaktiivisuutta tai helpottavat polypeptidin kytkeytymistä immunologisen analyysin kantajaan tai rokotteen kantajaan. Ks. esimerkiksi EP-julkaisu No. 116,201; US-patentti No. 4,722,840; EP-julkaisu No. 259,149; US-patentti No. 4,629,783, joiden sisältö liitetään tässä mukaan viitteeksi.

Typistettyjä HCV-sekvenssejä käsittävien polypeptidien koko voi vaihdella laajalti, minimikoon ollessa sekvenssi, jonka koko on riittävä antamaan HCV-epitoopin, kun taas maksimikoko ei ole kriittinen. Mukavuussyistä maksimikoko ei tavallisesti ole olennaisesti suurempi kuin se, mikä vaaditaan antamaan halutut HCV-epitoopit ja heterologisen sekvenssin toiminnot, jos sellaisia on. Tyypillisesti typistetty HCV-aminohapposekvenssi on pituudeltaan noin 5 - noin 100 aminohappoa. Tyypillisemmin HCV-sekvenssi on kuitenkin maksimissaan noin 50 aminohappoa pitkä, mieluummin maksimissaan noin 30 aminohappoa pitkä. On tavallisesti toivottavaa valita HCV-sekvenssejä, joissa on ainakin noin 10, 12 tai 15 aminohappoa, maksimissaan noin 20 tai 25 aminohappoa.

Typistettyjä HCV-aminohapposekvenssejä, jotka käsittävät epitooppeja, voidaan identifioida lukuisilla tavoilla. Esimerkiksi koko virusproteiinisekvenssi voidaan seuloa valmistamalla sarja lyhyitä peptidejä, jotka yhdessä kattavat koko proteiinisekvenssin. Esimerkki HCV-polyproteiinin alueiden antigeeniseulonnasta on esitetty alla. Lisäksi aloitettaessa esimerkiksi 100-meerisillä polypeptideillä, olisi rutiinia testata kukin polypeptidi niiden epitooppien läsnäolon varalta, jotka osoittavat haluttua reaktiivisuutta ja sitten testata progressiivisesti pienempiä ja päällekkäisiä fragmentteja identifioidusta 100-meeristä kiinnostavan epitoopin kartoittamiseksi. Sellaisten peptidien seulonta immunologisella analyysillä on alan ammattitaitoa. Tunnetaan myös proteiinisekvenssien tietokoneanalyysin suorittaminen potentiaalisten epitooppien identifioimiseksi

ja sitten oligopeptidien valmistamiseksi, jotka käsittävät identifioidut alueet seulontaa varten. Sellainen HCV-aminohapposekvenssin tietokoneanalyysi on esitetty kuviossa 20, jossa hydrofiilinen/hydrofobinen luonne on näytetty antigeeni-indeksin päällä. Aminohapot on numeroitu aloittavasta MET:stä alkaen (asema 1), kuten esitetään kuviossa 17. Alan ammattilaiset antavat arvoa sille, että sellainen antigeenisyyden tietokoneanalyysi ei aina identifioi epitooppia, joka on todella olemassa ja se voi myös virheellisesti identifioida proteiinin alueen sisältävän epitoopin.

Esimerkkejä HCV-aminohapposekvensseistä, jotka voivat olla hyödyllisiä, jotka ekspressoidaan ekspressiovektoreista, jotka käsittävät kloonit 5-1-1, 81, CA74a, 35f, 279a, C36, C33b, CA290a, C8f, C12f, 14c, 15e, C25c, C33c, C33f, 33g, C39c, C40b, Ca167b, on kuvattu alla. Muita esimerkkejä HCV-aminohapposekvensseistä, jotka voivat olla hyödyllisiä, kuten tässä kuvataan, annetaan alla. On ymmärrettävä, että nämä peptidit eivät välttämättä tarkasti kartoita yhtä epitooppia ja ne voivat sisältää myös HCV-sekvenssin, joka ei ole immunogeeninen. Nämä sekvenssin ei-immunogeeniset osat voidaan määrittää, kuten kuvataan yllä käyttäen tavanomaisia tekniikoita ja ne on poistettu kuvatuista sekvensseistä. Edelleen lisää typistettyjä HCV-aminohapposekvenssejä, jotka käsittävät epitoopin tai ovat immunogeenisiä, voidaan identifioida, kuten kuvattiin yllä. Seuraavat aminohapposekvenssit on annettu aminohapponumeroina (s.o. "AAn"), missä n on aminohapon numero, kuten esitetään kuviossa 17:

AA1-AA50; AA1-AA84; AA9-AA177; AA50-AA100; AA40-AA90; AA65-AA75; AA99-AA120; AA95-AA110; AA100-AA150; AA150-AA200; AA200-AA250; AA220-AA240; AA245-AA265; AA250-AA300; AA290-AA330; AA290-AA305; AA300-AA350; AA310-AA330; AA350-AA400; AA405-AA495; AA400-AA450; AA437-AA582; AA450-AA500; AA475-AA495; AA500-AA550; AA511-AA690; AA515-AA550; AA550-AA600; AA550-AA625; AA575-AA605; AA600-AA650; AA600-AA625; AA635-AA665; AA650-AA700; AA645-AA680; AA700-AA750; AA700-AA725; AA725-AA775; AA770-AA790; AA750-AA800; AA800-AA815; AA850-AA875; AA800-AA850; AA920-AA990; AA850-AA900; AA920-AA945; AA940-AA965; AA950-AA1000; AA1000-AA1060; AA1000-AA1050; AA1025-AA1040; AA1075-AA1175; AA1050-AA1200; AA1070-AA1100;

AA1100-AA1140; AA1192-AA1457; AA1195-AA1250; AA1200-AA1225; AA1225-AA1250; AA1250-AA1300; AA1260-AA1310; AA1260-AA1280; AA1266-AA1428; AA1300-AA1350; AA1310-AA1340; AA1345-AA1405; AA1350-AA1400; AA1365-AA1380; AA1380-AA1405; AA1400-AA1450; AA1450-AA1500; AA1475-AA1515; AA1475-AA1500; AA1500-AA1550; AA1515-AA1550; AA1550-AA1600; AA1569-AA1931; AA1570-AA1590; AA1595-AA1610; AA1590-AA1650; AA1610-AA1645; AA1650-AA1690; AA1685-AA1770; AA1689-AA1805; AA1690-AA1720; AA1694-AA1735; AA1720-AA1745; AA1745-AA1770; AA1750-AA1800; AA1775-AA1810; AA1795-AA1850; AA1850-AA1900; AA1900-AA1950; AA1900-AA1920; AA1916-AA2021; AA1920-AA1940; AA1949-AA2124; AA1950-AA2000; AA1950-AA1985; AA2000-AA2050; AA2020-AA2045; AA2045-AA2100; AA2045-AA2070; AA2054-AA2223; AA2070-AA2100; AA2100-AA2150; AA2150-AA2200; AA2200-AA2325; AA2250-AA2330; AA2265-AA2280; AA2280-AA2290; AA2287-AA2385; AA2300-AA2350; AA2350-AA2400; AA2345-AA2415; AA2345-AA2375; AA2348-AA2464; AA2370-AA2410; AA2400-AA2450; AA2400-AA2425; AA2415-AA2450; AA2445-AA2500; AA2371-AA2502; AA2500-AA2550; AA2505-AA2540; AA2550-AA2600; AA2560-AA2580; AA2600-AA2650; AA2620-AA2650; AA2650-AA2700; AA2655-AA2670; AA2670-AA2700; AA2700-AA2750; AA2750-AA2800; AA2755-AA2780; AA2780-AA2830; AA2785-AA2810; AA2796-AA2886; AA2810-AA2825; AA2800-AA2850; AA2850-AA2900; AA2900-AA2950; AA2910-AA2930; AA2925-AA2950; ja AA2945-loppuun (C'-pää).

Ylläolevia HCV-aminohapposekvenssejä voidaan valmistaa erillisinä peptideinä tai liitettyinä suurempaan polypeptidiin ja niillä voi olla käyttöä, kuten tässä kuvataan. Lisäpolypeptidejä, jotka käsittävät typistettyjä HCV-sekvenssejä, kuvataan esimerkeissä.

Oletettujen HCV:n polyproteiinien havaittu suhde Flaviviruksien kanssa sallii HCV:n "nonstrukturaalisten" (NS) proteiinien oletettujen alueiden ennustamisen. Yksittäisten NS-proteiinien paikat oletetussa Flaviviruksen esivaiheen polyproteiinissa ovat melko hyvin tunnettuja. Lisäksi nämä yhtyvät myös havaittuihin kokonaisvaihteluihin polyproteiinin hydrofobisuusprofiilissa. On osoitettu, että Flavivirusten NS5 koodittaa virionipolymeraasia ja että NS1 vastaa komplementtikiinnitysantigeeniä, minkä on osoitettu olevan tehokas rokote eläimissä. Äskettäin on osoitettu, että flaviviruksproteaasitoiminto on NS3:ssa. Johtuen havaituista samankaltaisuuksista HCV:n ja Flavivirusten välillä, joita kuvataan alla, ovat päätelmät mahdollisia koskien vastaavien proteiinialueiden suunnilleen paikkoja ja HCV-polyproteiinin

toimintoja. Polypeptidien, jotka sisältävät näitä alueita lukuisissa yhdistelmäisäntäsoluissa, sisältäen esimerkiksi bakteerit, hiivan, hyönteis- ja selkärankaissolut, ekspression tulisi kasvattaa tärkeitä immunologisia reagensseja, joita voidaan käyttää diagnooseihin ja osoittamiseen.

Vaikka tässä kuvatun HCV-eristeen ja Flavivirusten oletetuilla polyproteiinien nonstrukturaalisilla alueilla näyttää olevan jotain samankaltaisuutta, on vähemmän samankaltaisuutta niiden oletettujen strukturaalisten alueiden välillä, jotka ovat kohti N-päätä. Tällä alueella on suurempi poikkeavuus sekvenssissä ja lisäksi kahden alueen hydrofobisuusprofiili osoittaa vähemmän samankaltaisuutta. Tämä "poikkeavuus" alkaa HCV:n oletetun NS1-alueen N-pään alueelta ja ulottuu oletettuun N-päähän. Joka tapauksessa voi olla vielä mahdollista ennustaa oletetun ydinkapselin (N-pään emäksinen alue) ja E-alueen (yleensä hydrofobinen) summittaiset paikat HCV-polyproteiinissa. Esimerkeissä ennustukset perustuvat muutoksiin, jotka havaittiin HCV-polyproteiinin hydrofobisessa profiilissa ja Flavivirusproteiinien luonteen ja paikan tietoon. Näistä ennustuksista voi olla mahdollista identifioida HCV-polyproteiinin summittaiset alueet, jotka voisivat vastata hyödyllisiä immunologisia reagensseja. Esimerkiksi Flaviviruksien E- ja NS1-proteiineilla tiedetään olevan tehoa suojarokotteina. Nämä alueet ja myös jotkin sellaiset, joiden on osoitettu olevan antigeenisiä tässä kuvatussa HCV-eristeessä, esimerkiksi ne, jotka ovat oletetuissa NS3-, C- ja NS5-proteiineissa, antaisivat diagnostisia reagensseja. Lisäksi viruskooditettujen entsyymien asema ja ekspressio saattaa myös sallia virustenvastaisten entsyymiinhibiittoreiden arvioimisen, s.o. esimerkiksi inhibiittoreiden, jotka estävät entsyymiaktiivisuutta itse näiden entsyymien kanssa tapahtuvan keskinäisen vaikutuksen johdosta tai aineiden, jotka voivat estää entsyymin ekspression (esimerkiksi antisense-RNA tai muut lääkkeet, jotka sekaantuvat ekspressioon).

HCV-epitooppeja sisältävien hybridipartikkeli-immunogeenien valmistaminen

HCV:n epitooppien immunogeenisyyttä voidaan myös vahvistaa valmistamalla ne imettäväis- tai hiivajärjestelmässä, jotka on fuusioitu tai asennettu siten, että niissä on partikkeleita muodostavia proteiineja, kuten esimerkiksi se, joka liittyy hepatitis-B:n pinta-antigeeniin. Rakenteet, joissa NANBV-epitooppi on liitetty suoraan partikkeleita muodostavaa proteiinia koodittaviin sekvensseihin, tuottavat hybridejä, jotka ovat immunogeenisiä HCV-epitoopin suhteen. Lisäksi kaikki valmistetut vektorit sisältävät HBV:lle spesifisiä epitooppeja, joissa on vaihteleva määrä immunogeenisyyttä, kuten esimerkiksi pre-S-peptidi (pre surface protein). Täten partikkeleita muodostavista proteiineista rakennetut partikkelit, jotka proteiinit sisältävät HCV-sekvenssejä, ovat immunogeenisiä HCV:n ja HBV:n suhteen.

Hepatitiksen pinta-antigeenien (HBSAg) on osoitettu muodostuvan ja liittyvän S. cerevisiae:n partikkeleihin (Valenzuela et al. (1982)) ja myös esimerkiksi imettäväissoluihin (Valenzuela, P., et al. (1984)). Sellaisten partikkeleiden muodostumisen on osoitettu vahvistavan monomeerialayksikön immunogeenisyyttä. Rakenteet voivat myös sisältää hepatitiksen pinta-antigeenin immunodominantin epitoopin, joka käsittää ennen pintaa (pre-S) olevan alueen 55 aminohappoa. Neurath et al. (1984). Pre-S-HBSag-partikkelirakenteita, jotka ovat ekspressoitavissa hiivassa, esitetään EP-julkaisussa 174,444, joka on julkaistu 19.03.1986; hybridejä, jotka sisältävät heterologisia virussekvenssejä hiivaekspressiota varten, on esitetty EP-julkaisussa 175,261, joka on julkaistu 26.03.1986. Nämä rakenteet voivat olla ekspressoituja imettäväissoluissa, kuten kiinalaisen hamsterin munararjasoluissa (CHO) käyttäen SV40-dihydrofolaatti-reduktaasivektoria (Michelle et al. (1984)).

Lisäksi osia partikkeleita muodostavaa proteiinia koodittavasta sekvenssistä voidaan vaihtaa kodoneihin, jotka koodittavat HCV-epitooppia. Tässä vaihdossa alueet, joita ei vaadita välittämään yksiköiden yhdistämistä immunogeenisien partikkeleiden muodostamiseksi hiivoissa tai imettäväisissä, voidaan poistaa välttäen täten ylimääräisten HBV-antigeenipaikkojen kilpailu HCV-epitoopin kanssa.

Vasta-aineiden valmistaminen HCV-epitooppeja vastaan

Immunogeenisiä polypeptidejä, jotka on valmistettu yllä kuvatusti, käytetään tuottamaan vasta-aineita, sekä polyklonaalisia että monoklonaalisia. Jos halutaan polyklonaalisia vasta-aineita, valittu imettäväinen (esimerkiksi hiiri, kani, vuohi, hevonen jne.) immunoidaan immunogeenisellä polypeptidillä, joka kantaa HCV-epitooppeja. Seerumia immunoidusta eläimestä kerätään ja sitä käsitellään tunnetuilla menettelytavoilla. Jos seerumi, joka sisältää polyklonaalisia vasta-aineita HCV-epitoopille, sisältää vasta-aineita muille antigeeneille, polyklonaaliset vasta-aineet voidaan puhdistaa immunoaffiniteettikromatografialla. Tekniikat polyklonaalisen antiseerumin tuottamiseksi ja käsittelemiseksi ovat alalla tunnettuja, katso esimerkiksi Mayer ja Walker (1987). Vaihtoehtoisesti polyklonaaliset vasta-aineet voidaan eristää imettäväisestä, joka on aikaisemmin infektoitu HCV:llä. Esimerkki HCV-epitooppien vasta-aineiden puhdistusmenetelmästä infektoidun yksilön seerumista, perustuen affiniteettikromatografiaan ja käyttäen SOD:n fuusiopolypeptidiä ja polypeptidiä, joka on kooditettu kloonin 5-1-1 cDNA:ssa, on esitetty EP-julkaisussa No. 318,216.

Monoklonaalisia vasta-aineita, jotka on suunnattu HCV-epitooppeja vastaan, voi myös tuottaa helposti alan ammattimies. Yleiset menetelmät monoklonaalisten vasta-aineiden tekemiseksi hybridomien kautta ovat hyvin tunnettuja. Kuolemattomia,

vasta-aineita tuottavia solulinjoja voidaan luoda solufuusiolla ja myös muilla tekniikoilla, kuten suoralla B-lymfosyyttien trasformaatiolla onkogeenisellä DNA:lla tai Epstein-Barr-viruksen avulla tehtävällä transfektiolla. Katso esimerkiksi M. Schreier et al. (1980); Hammerling et al. (1981); Kennett et al. (1980); katso myös US-patentteja numerot 4,341,761; 4,399,121; 4,427,783; 4,444,887; 4,466,917; 4,472,500; 4,491,632 ja 4,493,890. HCV-epitooppeja vastaan tuotettujen monoklonaalisten vasta-aineiden sarjoja voidaan seuloa eri ominaisuuksien suhteen; s.o. isotyypin, epitoopin affiniteetin jne. suhteen.

Vasta-aineet, sekä monoklonaaliset että polyklonaaliset, jotka ovat suunnattuja HCV-epitooppeja vastaan, ovat erityisen hyödyllisiä diagnooseissa ja ne, jotka ovat neutraloivia, ovat hyödyllisiä passiivisessa imunoterapiassa. Monoklonaalisia vasta-aineita voidaan käyttää erityisesti synnyttämään anti-idiotyypin vasta-aineita.

Anti-idiotyypin vasta-aineet ovat immunoglobuliineja, joissa on "sisäinen kuva" infektoivan aineen, jota vastaan suojaa halutaan, antigeenistä. Katso esimerkiksi Nisonoff, A., et al. (1981) ja Dreesman et al. (1985).

Tekniikat anti-idiotyypin vasta-aineiden synnyttämiseksi ovat alalla tunnettuja. Katso esimerkiksi Grzych (1985), MacNamara et al. (1984), ja Uytdehaag et al. (1985). Nämä anti-idiotyypin vasta-aineet voivat olla myös hyödyllisiä NANBH:n hoidossa ja/tai diagnoosissa ja myös HCV-antigeenien immunogeenisten alueiden selventämisessä.

Alan keskiverto ammattimies havaitsisi, että lukuisia vasta-ainetyyppejä, jotka on suunnattu HCV-epitooppeja vastaan voidaan tuottaa. Tässä käytettynä "vasta-aine" viittaa polypeptidiin tai polypeptidien ryhmään, jotka muodostuvat ainakin yhdestä vasta-aineen yhdistymispaikasta. "Vasta-

aineen yhdistymispaikka" tai "sitoutumisalue" muodostuu vasta-ainemolekyylien vaihtelevien alueiden poimuttumisesta muodostaakseen kolmiulotteisia sitoutumistiloja, joiden sisäinen pintamuoto ja varauksen jakaantuminen on komplementaarinen antigeenin epitoopin piirteille. Vasta-aineen yhdistymispaikka voi muodostua raskaan ja/tai kevyen ketjun alueesta (VH ja vastaavasti VL), jotka muodostavat erittäin vaihtelevia silmukoita, jotka antavat tukea antigeenin sitoutumiselle. Termi "vasta-aine" sisältää esimerkiksi selkärankaisvasta-aineet hybridivasta-aineet, kuvitellut vasta-aineet, muutetut vasta-aineet, yksiarvoiset vasta-aineet, Fab-proteiinit ja yksialueiset vasta-aineet.

"Yksialueinen vasta-aine" (dAb) on vasta-aine, joka muodostuu VH-alueesta, joka reagoi immunologisesti tarkoitetun antigeenin kanssa. dAb ei sisällä VL-aluetta, mutta voi sisältää muita antigeenin sitoutumisalueita, joiden tiedetään olevan vasta-aineissa, esimerkiksi kappa- ja lambda-alueet. Menetelmät dAb:eiden valmistamiseksi ovat alalla tunnettuja. Katso esimerkiksi Ward et al. (1989).

Vasta-aineet voivat muodostua myös VH- ja VL-alueista ja myös muista tunnetuista antigeenin sitoutumisalueista. Esimerkit näistä vasta-aineiden tyypeistä ja menetelmistä niiden valmistamiseksi ovat alalla tunnettuja (ks. esim US-patentti No. 4,816,467, joka liitetään tähän viitteeksi) ja sisältävät seuraavat. Esimerkiksi "selkärankaisvasta-aineet" viittaavat vasta-aineisiin, jotka ovat tetrameerejä tai niiden yhteenliittymiä, käsittäen kevyitä ja raskaita ketjuja, jotka ovat tavallisesti liittyneet yhteen "Y"-konfiguraatiossa ja joissa voi olla tai olla olematta kovalenttisia sidoksia ketjujen välillä. Selkärankaisvasta-aineissa kaikkien erityisen vasta-aineen ketjujen aminohapposekvenssit ovat homologisia niiden ketjujen kanssa, jotka on löydetty yhdessä vasta-aineessa, jonka on tuottanut lymfosyytti, joka tuottaa tuota vasta-ainetta in situ tai in vitro (esimerkiksi hydridomissa).

Selkärankaisvasta-aineet sisältävät tyypillisesti luonnon vasta-aineita, esimerkiksi puhdistettuja polyklonaalisia vasta-aineita ja monoklonaalisia vasta-aineita. Esimerkkejä näiden vasta-aineiden valmistusmenetelmistä kuvataan alla.

"Hybridivasta-aineet" ovat vasta-aineita, jossa yksi raskaan ja kevyen ketjun pari on homologinen ketjujen kanssa ensimmäisessä vasta-aineessa, kun taas toinen raskaan ja kevyen ketjun pari on homologinen ketjujen kanssa toisessa eri vasta-aineessa. Tyypillisesti kumpikin näistä kahdesta parista sitoo eri epitooppeja, erityisesti eri antigeeneihin. Tämä on tulosta "divalenssi"-ominaisuudesta, s.o. kyvystä sitoa kahta antigeeniä samanaikaisesti. Sellaisia hybridejä voidaan muodostaa myös käyttäen kuviteltuja ketjuja, kuten esitetään alla.

"Kimeeriset vasta-aineet" ovat vasta-aineita, joissa raskas ja/tai kevyt ketju on fuusioproteiineja. Tyypillisesti ketjujen vakioalue on yhdestä erityisestä lajista ja/tai luokasta ja vaihtelevat alueet ovat eri lajista ja/tai luokasta. Tähän sisältyy myös mikä tahansa vasta-aine, jossa joko raskas tai kevyt ketju tai molemmat on kokoonpantu sellaisten sekvenssien yhdistelmistä, jotka matkivat sekvenssejä eri lähteistä saaduissa vasta-aineissa, olkoon nämä lähteet eri luokkia tai eri lajeja alkuperältään ja olkoon fuusiokohta vaihtelevan/vakion rajalla. Täten on mahdollista tuottaa vasta-aineita, joissa ei vakio- eikä vaihteleva alue matki tunnettuja vasta-ainesekvenssejä. Sitten tulee mahdolliseksi esimerkiksi rakentaa vasta-aineita, joiden vaihtelevalla alueella on korkeampi spesifinen affiniteetti erityiselle antigeenille tai jonka vakioalue voi antaa vahvistuneen komplementin kiinnityksen tai tehdä muita parannuksia erityisen vakioalueen omaavissa ominaisuuksissa.

Toinen esimerkki on "muutettu vasta-aine", mikä viittaa vasta-aineisiin, joissa luonnossa esiintyvä aminohapposek-

venssi selkärankaisvasta-aineessa on vaihdeltu. Käyttäen yhdistelmä-DNA-tekniikoita voidaan vasta-aineita muotoilla uudelleen haluttujen ominaisuuksien saamiseksi. Mahdolliset muuntelut ovat monia ja ulottuvat yhden tai useamman aminohapon muuttamisesta täydelliseen alueen, esimerkiksi vakioalueen, uudelleen muotoilemiseen. Muutokset vakioalueella yleensä saavat aikaan haluttuja solumenetelmäominaisuuksia, esimerkiksi muutoksia komplementin kiinnityksessä, membraanien välisen keskinäisen vaikutuksen ja muita effektoritoimintoja. Vaihtelevan alueen muutokset voidaan panna muuttamaan antigeenin sitoutumisominaisuuksia. Vasta-aine voidaan myös rakentaa auttamaan molekyylin tai aineen spesifistä toimitusta erityiseen solun tai kudoksen paikkaan. Halutut muuttamiset voidaan tehdä tunnetuilla tekniikoilla molekyylibiologiassa, esimerkiksi yhdistelmätekniikoilla, paikkasuunnatuilla mutagenoinneilla jne.

Vielä muu esimerkki ovat "yksiarvoiset vasta-aineet", jotka ovat aggregaatteja, jotka muodostuvat raskaan ketjun/kevyen ketjun dimeeristä, joka on sidottu toisen raskaan ketjun Fc-alueeseen (s.o. vakioalueeseen). Tämän tyyppiselle vasta-aineelle ei voi tehdä antigeenimodulaatiota. Ks. esim. Glennie et al. (1982).

Vasta-aineiden määritelmän alla ovat myös vasta-aineiden "Fab"-fragmentit. "Fab"-alue viittaa niihin raskaiden ja kevyiden ketjujen osiin, jotka ovat karkeasti ekvivalentteja tai analogisia sekvensseille, jotka käsittävät raskaiden ja kevyiden ketjujen haarautumisosan ja joiden on osoitettu osoittavan immunologista sitoutumista erityiseen antigeeniin, mutta joissa ei ole effektorin Fc-osaa. "Fab" sisältää yhden raskaan ja yhden kevyen ketjun aggregaatit (yleisesti tunnetaan Fab':na), ja myös tetrameerit, jotka sisältävät 2H- ja 2L-ketjut (johon viitataan $F(ab)_2$:na), jotka kykenevät reagoimaan selektiivisesti annetun antigeenin tai antigeeniperheen kanssa. "Fab"-vasta-aineet voidaan jakaa alaryh-

miin, jotka ovat analogisia yllä kuvatuille, s.o. "selkärankais-Fab", "hybridi-Fab", "kimeerinen Fab" ja "muutettu Fab". Menetelmät vasta-aineiden "Fab"-fragmenttien tuottamiseksi ovat alalla tunnettuja ja sisältävät esimerkiksi proteolyysin ja synteesin yhdistelmätekniikoilla.

Diagnostiset oliginukleotidikoettimet ja välinesarjat

Käyttäen eristettyjä HCV:n cDNA:ojen esitettyjä osia pohjana, voidaan valmistaa oligomeerejä, joissa on noin 8 nukleootidia tai enemmän, joko pätkimällä tai synteettisesti, jotka oligomeerit hybridisoituvat HCV-genomin kanssa ja ovat hyödyllisiä virusaineiden tunnistamisessa, virusgenomien lisäkarakterisoinnissa ja myös virusten osoittamisessa sairaissa yksilöissä. HCV-polynukleotidejä varten olevien koettimien (joko luonnollisten tai johdettujen) pituudet ovat sellaisia, että ne sallivat ainutkertaisten virussekvenssien osoittamisen hybridisaation avulla. Kun 6-8 nukleotidia voi olla toimiva pituus, pidetään 10-12 nukleotidin sekvenssejä parempana ja noin 20 nukleotidia näyttää olevan optimi. Mieluummin nämä sekvenssit ovat peräisin alueilta, joissa ei ole heterogeenisyyttä. Nämä koettimet voidaan valmistaa käyttäen rutiinimenetelmiä, sisältäen automatisoidut oligonukleotidin synteettiset menetelmät. Hyödyllisten koettimien joukossa ovat esimerkiksi ne, jotka ovat peräisin äskettäin eristetyistä klooneista, jotka on annettu tässä ja myös eri oligomeerit, jotka ovat hyödyllisiä cDNA-kirjastoja tutkittaessa, ja joita on kuvattu alla. Minkä tahansa HCV-genomin ainutkertaisen osan komplementti on myös tyydyttävä. Käytettäväksi koettimina on täydellinen komplementaarisuus toivottavaa, vaikka se voi olla tarpeetonta, kun fragmentin pituus kasvaa.

Sellaisten koettimien käyttämiseksi diagnostiikassa, biologista analysoitavaa näytettä, kuten verta tai seerumia, voidaan käsitellä haluttaessa sen sisältämien nukleiinihappojen uuttamiseksi. Näytteestä tuloksena oleville nukle-

iinihapoille voidaan suorittaa geelielektroforeesi tai jokin muu koon mukaan erotteleva tekniikka; vaihtoehtoisesti nukleiinihapponäyte voidaan pisteblotata ilman kokoerottelua. Koettimet leimataan sitten. Sopivat leimat ja koettimien leimausmenetelmät ovat alalla tunnettuja ja sisältävät esimerkiksi radioaktiiviset leimat, jotka on liitetty nick-translaation tai kinaasion avulla, biotiinin, fluoresoivat koettimet ja kemiluminesoivat koettimet. Näytteestä uutettuja mukleiinihappoja käsitellään sitten leimatulla koettimella sopivan tiukoissa hybridisaatio-olosuhteissa ja polynukleotididupleksit, jotka sisältävät koettimen, osoitetaan.

Koettimet voidaan tehdä täysin komplementaarisiksi HCV-genomille. Siksi hyvin tiukat olosuhteet ovat toivottavia väärien positiivisten estämiseksi. Kuitenkin hyvin tiukkoja olosuhteita tulisi käyttää vain, jos koettimet ovat komplementaarisia sellaiselle virusgenomin alueelle, jossa ei ole heterogeenisyyttä. Hybridisaation tiukkuuden määrittävät lukuisat hybridisaation aikaiset ja pesumenettelyn aikaiset tekijät, mukaanlukien lämpötila, ionivahvuus, ajan pituus ja formamidin pitoisuus. Näitä tekijöitä on hahmotellut esimerkiksi Maniatis, T. (1982).

Yleisesti odotetaan, että HCV-genomia on läsnä infektoituneiden uksilöiden seerumissa suhteellisen alhaisina tasoina, s.o. tasolla noin 10^2-10^3 simpanssin infektoivaa annosta (CID) ml:aa kohti. Tämä taso voi vaatia, että hybridisaatioanalyysissä käytetään amplifikaatiotekniikkaa. Sellaiset tekniikat ovat alalla tunnettuja. Esimerkiksi Enzo Biochemical Corporation'in "Bio-Bridge"-järjestelmä käyttää terminaalista deoksinukleotiditransferaasia modifioimattomien 3'-poly-dT-häntien lisäämiseksi DNA-koettimeen. Poly- dT-häntäinen koetin hybridisoidaan kohdenukleotidisekvenssiin ja sitten biotiinimodifioituun poly-A:han. PCT-hakemus 84/03250 ja EP-julkaisu 124221 kuvaavat DNA-hybridisaatioanalyysiä, jossa: (1) analyytti lämpökäsitellään yksisäikeiseksi DNA-

koettimeksi, joka on komplementaarinen entsyymileimatulle olinukleotidille; ja (2) tuloksena oleva hännällinen dupleksi hybridisoidaan entsyymileimattuun oligonukleotidiin. EP-julkaisu 204510 kuvaa DNA-hybridisaatioanalyysiä, jossa analyytti-DNA saatetaan kosketuksiin koettimen kanssa, jolla on häntä, kuten poly-dT-häntä, amplifikaatiosäie, jossa on sekvenssi, joka hybridisoituu koettimen häntään, kuten poly-A-sekvenssi, ja joka voi sitoa useita leimattuja säikeitä. Erityisen haluttava tekniikka voi ensin käsittää seerumissa kohteena olevien HCV-sekvenssien amplifikaation noin 10000-kertaiseksi, s.o. noin 10^6 sekvenssiin/ml. Tämä voidaan tehdä esimerkiksi polymeraasiketjureaktiotekniikalla (PCR), jonka ovat esittäneet Saiki et al. (1986), Mullis US-patentissa 4,683,195 ja Mullis et al. US-patentissa 4,683,202. Amplifioidut sekvenssit voidaan sitten osoittaa käyttäen hybridisaatioanalyysiä, jota on kuvattu EP-julkaisussa 317,077, joka on julkaistu 24.05.1989. Nämä hybridisaatioanalyysit, joiden tulisi havaita sekvenssit tasolla 10^6/ml, käyttävät nukleiinihappomultimeerejä, jotka sitoutuvat yksisäikeiseen analyyttinukleiinihappoon ja jotka sitoutuvat myös moniin yksisäikeisiin leimattuihin oligonukleotideihin. Sopivaa liuosmuotoista sandwich-analyysiä, jota voidaan käyttää leimattujen polynukleotidikoettimien kanssa ja menetelmiä koettimien valmistamiseksi on kuvattu EP-julkaisussa 225,807, joka on julkaistu 16.6.1987.

Koettimet voidaan pakata diagnostisiksi välinesarjoiksi. Diagnostiset välinesarjat sisältävät koetin-DNA:n, joka voi olla leimattu; vaihtoehtoisesti koetin-DNA voi olla leimaamaton ja leimaamistarvikkeet voivat sisältyä välinesarjaan erillisissä säiliöissä. Välinesarja voi myös sisältää muita sopivasti pakattuja reagensseja ja materiaaleja, joita tarvitaan tiettyä hybridisaatiotoimintatapaa varten, esimerkiksi standardeja ja myös ohjeet kokeen suorittamiseksi.

Immunologinen analyysi ja diagnostiset välinesarjat

Sekä polypeptidit, jotka reagoivat immunologisesti HCV-vasta-aineita sisältävän seerumin kanssa, esimerkiksi ne, jotka on osoitettu alla esimerkeissä kuvatulla antigeenin seulontamenetelmällä ja myös ne, jotka ovat peräisin esimerkeissä kuvatuista eristetyistä klooneista tai jotka ovat niissä koditettuja ja niiden komposiitit ja vasta-aineet, jotka ovat syntyneet näissä polypeptideissä olevia HCV:n spesifisiä epitooppeja vastaan, ovat hyödyllisiä immunologisissa analyyseissä HCV-vasta-aineiden läsnäolon osoittamiseksi tai viruksen ja/tai virusantigeenien osoittamiseksi biologisissa näytteissä. Immunologisten analyysien suunnittelu on suuren vaihtelun kohde ja näitä tunnetaan alalla lukuisia. Esimerkiksi immunologinen analyysi voi käyttää yhtä virusepitooppia; vaihtoehtoisesti immunologinen analyysi voi käyttää virusepitooppien yhdistelmää, jotka epitoopit ovat peräisin näistä lähteistä; nämä epitoopit voivat olla peräisin samasta tai eri viruspolypeptideistä ja ne voivat olla erillisissä yhdistelmä- tai luonnon polypeptideissä tai yhdessä samoissa yhdistelmäpolypeptideissä. Se voi käyttää esimerkiksi monoklonaalista vasta-ainetta, joka on suunnattu virusepitooppeja vastaan, monoklonaalisten vasta-aineiden yhdistelmää, joka on suunnattu yhden virusantigeenin epitooppeja vastaan, monoklonaalisia vasta-aineita, jotka ovat suunnatut erilaisten virusantigeenien epitooppeja vastaan, polyklonaalisia vasta-aineita, jotka on suunnattu samaa virusantigeeniä vastaan tai polyklonaalisia vasta-aineita, jotka ovat suunnattuja eri virusantigeenejä vastaan. Toimintatavat voivat perustua esimerkiksi kilpailuun, tai suoraan reaktioon tai sandwich-tyyppisiin analyyseihin. Toimintatavat voivat myös käyttää esimerkiksi kiinteitä kantajia tai ne voidaan tehdä immunosaostamalla. Useimpiin analyyseihin liittyy leimatun vasta-aineen tai polypeptidin käyttö; leimat voivat olla esimerkiksi fluoresoivia, kemiluminesoivia, radioaktiivisia tai värillisiä molekyylejä. Analyysit, jotka vahvistavat koettimelta tulevat signaalit, ovat myös tunnettuja; joista

esimerkkejä ovat analyysit, jotka käyttävät biotiinia ja avidiinia ja entsyymileimattuja ja entsyymivälitteisiä immunologisia analyysejä, kuten ELISA-analyysiä.

Jotkin oletetun polyproteiinin antigeenialueet on kartoitettu ja identifioitu seulomalla HCV:n cDNA:oiden, jotka koodittavat polyproteiinin osaa, bakteeriekspressiotuotteiden antigeenisyyttä. Katso esimerkkejä. Muita HCV:n antigeenialueita voidaan osoittaa ekspressoimalla HCV:n cDNA:oiden alueet muissa ekspressiojärjestelmissä, sisältäen hiivajärjestelmät ja solujärjestelmät, jotka ovat peräisin hyönteisistä ja selkärankaisista. Lisäksi tutkimukset, jotka antavat antigeenisyysindeksin ja hydrofobisuus/hydrofiilisyysprofiilin, antavat tietoa, joka koskee alueen antigeenisyyden todennäköisyyttä.

Tutkimukset antigeenisyyden kartoituksesta ekspressoimalla HCV:n cDNA:oita, osoittivat, että lukumäärä klooneja, jotka sisältävät näitä cDNA:oita, ekspressoivat polypeptidejä, jotka olivat immunologisesti reaktiokykyisiä seerumin kanssa, joka tuli yksilöistä, joilla oli NANBH. Mikään yksittäinen polypeptidi ei ollut immunologisesti reaktiokykyinen kaikkien seerumien kanssa. Viisi näistä polypeptideistä oli hyvin immonogeenistä siinä, että HCV-epitooppien vasta-aineita näissä polypeptideissä osoitettiin monissa eri potilasseerumeissa, vaikka osoituksen päällekkäisyys ei ollutkaan täydellinen. Täten eri klooneissa kooditettujen polypeptidien immunogeenisyystulokset ehdottavat, että tehokkaat osoitusjärjestelmät voivat sisältää epitooppipaneelien käytön. Paneelin epitoopit voivat olla rakennettuja yhteen tai moniin polypeptideihin.

Välinesarjat, jotka ovat sopivia immunologisia diagnooseja varten ja jotka sisältävät sopivasti leimattuja reagensseja, ovat rakennetut pakkaamalla sopivat materiaalit, mukaanlukien keksinnön polypeptidit, jotka sisältävät HCV-epitooppeja tai

HCV-epitooppeja vastaan suunnattuja vasta-aineita sopivissa astioissa yhdessä niiden muiden reagenssien ja materiaalien kanssa, joita vaaditaan analyysin suorittamiseksi ja myös sopivat analyysiohjeet.

HCV-genomin, virionien ja virusantigeenien lisäkarakterisointi käyttäen koettimia, jotka ovat peräisin virusgenomin cDNA:sta

HCV:n cDNA-sekvenssitietoa äskettäin eristetyissä klooneissa, joita kuvataan esimerkeissä, voidaan käyttää saamaan lisää tietoa HCV-genomin sekvenssistä ja tunnistamaan ja eristämään HCV-aine ja täten se auttaa sen karakterisoinnissa sisältäen genomin luonteen, viruspartikkelin rakenteen ja niiden antigeenien luonteen, joista se koostuu. Tämä tieto vuorostaan voi johtaa lisämäärään polynukleotidikoettimia, polypeptidejä, jotka ovat peräisin HCV-genomista ja vasta-aineita HCV-epitooppeja vastaan, jotka voisivat olla hyödyllisiä HCV:n aiheuttaman NANBH:n diagnoosissa.

Yllämainittujen kloonien cDNA-sekvenssitieto on hyödyllinen suunniteltaessa koettimia lisä-cDNA-sekvenssien erottamiseksi, jotka ovat peräisin HCV-genomien vielä tunnistamattomilta alueilta, joista genomeista cDNA:t tässä ja EP-julkaisussa 318,216 kuvatuissa klooneissa ovat peräisin. Esimerkiksi leimattuja koettimia, jotka sisältävät noin 8 tai enemmän nukleotidin sekvenssin ja mieluummin 20 tai enenmmän nukleotidin sekvenssin, jotka nukleotidit ovat peräisin alueilta, jotka ovat lähellä kuviossa 17 esitettyjen yhdistelmä-HCV:n cDNA-sekvenssin 5'-päätä tai 3'-päätä, voidaan käyttää eristämään päällekkäin meneviä cDNA-sekvenssejä HCV:n cDNA-kirjastoista. Vaihtoehtoisesti genomisegmenttien karakterisointi voitaisiin tehdä virusgenomeista, jotka on eristetty puhdistetuista HCV-partikkeleista. Menetelmiä HCV-partikkeleiden puhdistamiseksi ja niiden osoittamiseksi puhdistusmenettelyn aikana kuvataan tässä alla. Menettelyt

polynukleotidigenomien eristämiseksi viruspartikkelista ovat tunnettuja alalla ja eräs käyttökelpoinen menetelmä on kuvattu EP-julkaisussa 218,316. Eristetyt genomisegmentit voitaisiin sitten kloonata ja sekventoida. Esimerkki tästä tekniikasta, mikä käyttää kloonattavien sekvenssien monistusta, on annettu alla ja se antoi tuloksena kloonin 16jh.

Menetelmät cDNA-kirjastojen luomiseksi ovat alalla tunnettuja ja niistä keskustellaan ylempänä ja alempana; menetelmästä HCV:n cDNA-kirjaston luomiseksi lambda-gt11-vektoriin keskustellaan EP-julkaisussa 318,216. Kuitenkin cDNA-kirjastoja, jotka ovat käyttökelpoisia nukleiinihappokoettimilla seulomiseen, voidaan myös rakentaa muilla alalla tunnetuilla vektoreilla, esimerkiksi lambda-gt10:llä (Huynh et al. (1985)).

HCV:ta vastaan suunnattujen antiviraalisten aineiden seulonta

Soluviljelmä- ja eläinmallijärjelmien saatavuus HCV:tä varten tekee myös mahdolliseksi HCV:n replikaation estävien virukseenvastaisten aineiden seulonnan ja erityisesti sellaisten aineiden seulonnan, jotka etupäässä sallivat solujen kasvun ja monistumisen, mutta estävät virusten replikaation. Nämä seulontamenetelmät ovat tunnettuja alan ammattilaisille. Yleisesti virusten vastaisia aineita testataan lukuisilla pitoisuuksilla niiden tehon suhteen estää viruksen replikaatio solunviljelyjärjestelmissä, jotka tukevat viruksen replikaatiota ja sitten viruspatogeenin infektiivisyyden eston suhteen (ja alhaisen tason myrkyllisyyden suhteen) eläinmallijärjestelmässä.

Nämä menetelmät ja koostumukset, jotka tässä annetaan HCV-antigeenien ja HCV-polynukleotidien havaitsemiseksi, ovat hyödyllisiä virusten vastaisten aineiden seulonnassa siinä, että antavat vaihtoehdon ja ehkä herkemmän välineen aineen tehon havaisemiseen virusreplikaation suhteen, kuin soluplakkianalyysi tai ID_{50}-analyysi. Esimerkiksi tässä kuvattuja

HCV-polynukleotidikoettimia voidaan käyttää soluviljelmässä tuotetun virusnukleiinihapon määrän selvittämisessä. Tämä voitaisiin tehdä esimerkiksi infektoitujen solunukleiinihappojen hybridisaation tai kilpailevan hybridisaation avulla leimatun HCV-polynukleotidikoettimen kanssa. Esimerkiksi myös anti-HCV-vasta-aineita voidaan käyttää soluviljelmässä olevien HCV-antigeenien tunnistamiseen ja niiden määrän selvittämiseen käyttäen tässä kuvattuja immunologisia analyysejä. Lisäksi, koska voi olla toivottavaa selvittää HCV-antigeenien määrä infektoidussa soluviljelmässä kilpailuanalyysillä, tässä kuvattuihin HCV:n cDNA:oihin kooditetut polypeptidit ovat hyödyllisiä näissä kilpailuanalyyseissä. Yleisesti yhdistelmä-HCV-polypeptidi, joka on peräisin HCV:n cDNA:sta, voisi olla leimattu ja tämän leimatun polypeptidin sitoutumisen estoa HCV-polypeptidiin soluviljelmäjärjestelmässä tuotetun antigeenin takia, tarkkailtaisiin. Lisäksi nämä tekniikat ovat erityisen hyödyllisiä tapauksissa, joissa HCV voi kyetä replikoitumaan solulinjassa aiheuttamatta solukuolemaa.

Viruksenvastaiset aineet, jotka voidaan testata tehon suhteen näillä menetelmillä, ovat alalla tunnettuja ja sisältävät esimerkiksi ne, jotka vaikuttavat toisiinsa virionikomponenttien ja/tai solukomponenttien kanssa, jotka ovat välttämättömiä viruksen sitoutumista ja/tai replikointia varten. Tyypilliset viruksenvastaiset aineet voivat sisältää esimerkiksi virionipolymeraasin ja/tai -proteaasin, jotka ovat tarpeen esivaiheen polypeptidien lohkaisemiseksi, inhibiittorit. Muut viruksenvastaiset aineet voivat sisältää ne, jotka vaikuttavat nukleiinihappoihin estääkseen virusreplikoinnin, esimerkiksi antisense-polynukleotidit jne.

Antisense-polynukleotidimolekyylit muodostuvat komplementaarisesta nukleotidisekvenssistä, joka sallii niiden hybridisoitumisen spesifisesti RNA:oiden genomien annettuihin alueisiin. Antisense-polynukleotidit voivat sisältää esimer-

kiksi molekyylit, jotka estävät proteiinitranslaation sitoutumalla mRNA:han tai ne voivat olla molekyylejä, jotka estävät virus-RNA:n replikoinnin transkriptaasilla. Ne voivat myös sisältää molekyylejä, jotka kuljettavat aineita (ei-kovalenttisesti kiinnittyneitä tai kovalenttisesti sidottuja), jotka aiheuttavat virus-RNA:n olemisen ei-aktiivinen aiheuttamalla esimerkiksi leikkauksia virus-RNA:han. Ne voivat myös sitoutua solupolynukleotideihin, jotka vahvistavat ja/tai joita vaaditaan viruksen tartuntakykyä, replikoitumiskykyä tai kroonisuutta varten. Antisense-molekyylit, joiden tulee hybridisoitua HCV:stä peräisin oleviin RNA:oihin, voidaan suunnitella perustuen tässä annettuun HCV:n cDNA:oiden sekvenssitietoon. Viruksenvastaiset aineet, jotka perustuvat HCV:n antisense-polynukleotideihin, voidaan suunnitella sitoutumaan suurella spesifisyydellä, olemaan liukoisuudeltaan lisääntynyt, olemaan stabiili ja olemaan myrkyllisyydeltään alhainen. Niinpä niitä voidaan toimittaa erikoisjärjestelmissä, esimerkiksi liposomeissa tai geeniterapialla. Lisäksi ne voivat sisältää analogeja, kiinnittyneitä proteiineja, substituoidun tai muutetun sidoksen emäksien välillä jne.

Muun tyyppiset lääkkeet voivat perustua polynukleotideihin, jotka "matkivat" tärkeitä HCV-genomin säätelyalueita ja jotka voivat olla hoitavia johtuen niiden keskinäisistä vaikutuksista järjestelmän avainkomponenttien kanssa, jotka ovat vastuussa viruksen tarttuvuudesta tai replikoinnista.

Yleisiä menetelmiä

Yleiset tekniikat, joita käytetään genomin uuttamiseen viruksesta, cDNA-kirjaston valmistamiseen ja testaamiseen, kloonien sekventoimiseen, ekspressiovektoreiden rakentamiseen, solujen transformoimiseen, immunologisten analyysien, kuten radioimmunologiset analyysit ja ELISA-analyysit, suorittamiseen, solujen kasvattamiseen viljelmässä ja sen kaltaisiin,

ovat alalla tunnettuja ja laboratoriokäsikirjoja, jotka kuvaavat näitä tekniikoita, on saatavana. Kuitenkin yleisenä ohjeena seuraava asettaa esiin muutamia lähteitä, jotka ovat nykyään saatavilla sellaisia menettelyjä varten ja materiaaleja varten, jotka ovat hyödyllisiä niiden suorittamiseksi.

Sekä prokariootti- että eukariootti-isäntäsoluja voidaan käyttää haluttujen kooditussekvenssien ekspressiota varten, kun käytetään sopivia säätösekvenssejä, jotka ovat yhteensopivia aiotun isännän kanssa. Prokariootti-isäntien joukosta käytetään useimmiten E. Coli'a. Ekspression säätösekvenssit prokarioottisoluja varten sisältävät promoottoreita, jotka sisältävät mahdollisesti operaattoriosia, ja ribosomin sitoutumispaikkoja. Siirtovektorit, jotka ovat yhteensopivia prokariootti-isäntien kanssa, ovat yleensä peräisin esimerkiksi pBR322:sta, plasmidista, joka sisältää operoneja, jotka antavat ampisilliini- ja tetrasykliiniresistenssin ja erilaisia pUC-vektoreita, jotka myös sisältävät sekvenssejä, jotka antavat antibioottiresistenssimarkkereita. Näitä markkereita voidaan käyttää saamaan onnistuneita transformantteja valinnan kautta. Yleisesti käytetyt prokarioottisäätösekvenssit sisältävät betalaktamaasi- (penisillinaasi) ja laktoosipromoottorijärjestelmiä (Chang et al. (1977)), tryptofaanipromoottorijärjestelmän (trp) (Goeddel et al. (1980)) ja lambdajohdetun P_L-promoottorin ja N-geenin ribosomin sitoutumispaikan (Shimatake et al. (1981)) ja hybridin tac-promoottorin (De Boer et al. (1983)), joka on peräisin trp-ja lac-UV5-promoottoreiden sekvensseistä. Edelläolevat järjestelmät ovat erityisen yhteensopivia E. Coli:n kanssa; haluttaessa voidaan käyttää muita prokariootti-isäntiä, kuten Bacillus- tai Pseudomonas-kantoja voidaan käyttää vastaavien säätösekvenssien kanssa.

Eukariootti-isännät sisältävät hiiva- ja nisäkässolut viljelyjärjestelmissä. Saccharomyces cerevisiae ja Saccharomyces carlsbergensis ovat yleisimmin käytettyjä hiivaisäntiä ja ne

ovat mukavia sieni-isäntiä. Hiivaan sopivissa vektoreissa on markkereita, jotka sallivat onnistuneiden transformanttien valinnan antamalla prototrofian auksotrooppisille mutanteille tai resistenssin raskaille metalleille villityyppisillä kannoilla. Hiivojen kanssa yhteensopivat vektorit voivat käyttää 2 μm:n replikaatioalkua (Broach et al. (1983)), CEN3:n ja ARS1:n yhdistelmää tai muita välineitä replikaation varmistamiseksi, kuten sekvenssejä, jotka aikaansaavat sopivan fragmentin liittymisen isäntäsolun genomiin. Säätösekvenssit hiivavektoreita varten ovat tunnettuja alalla ja sisältävät promoottoreita glykolyyttisten entsyymien synteesiä varten (Hess et al. (1968); Holland et al. (1978)), sisältäen promoottorin 3-fosfoglyseraattikinaasia varten (Hitzeman (1980)). Terminaattoreita voidaan myös sisällyttää, kuten niitä, jotka ovat peräisin enolaasigeenistä (Holland (1981)). Erityisen hyödyllisiä säätöjärjestelmiä ovat ne, jotka käsittävät glyseraldehydi-3-fosfaattidehydrogenaasipromoottorin (GAPDH) tai alkoholidehydrogenaasin (ADH) säädettävän promoottorin, terminaattoreita, jotka ovat peräisin myös GAPDH:sta ja jos halutaan eritystä, johtosekvenssi hiivan alfatekijästä. Lisäksi transkriptiota säätävä alue ja transkription aloittava alue, jotka ovat toiminnallisesti liitettyjä toisiinsa, voivat olla sellaisia, että ne eivät luonnostaan liity villityyppisiin organismeihin. Näitä järjestelmiä kuvataan yksityiskohtaisesti EP-julkaisuissa 120,551, julkaistu 3.10.1984; 116,201, julkaistu 22.8.1984 ja 164,556, julkaistu 18.12.1985, jotka ovat kaikki tämän keksinnön hakijan omistuksessa ja joihin tässä viitataan.

Imettäväissolulinjat, jotka ovat saatavissa isäntinä ekspressiota varten, ovat tunnettuja alalla ja sisältävät monia elossa pidettyjä solulinjoja, jotka ovat saatavilla American Type Culture Collection'ista (ATCC), sisältäen HeLa-solut, kiinalaisen hamsterin munasarjasolut (CHO), hamsterinpoikasen munuaissolut (BHK) ja lukuisia muita solulinjoja. Alalla tunnetaan myös sopivia promoottoreita imettäväissoluja varten

ja ne sisältävät viruspromoottoreita, kuten ne jotka ovat peräisin Ihmisapinaviruksesta 40 (SV40) (Fiers (1978)), Rous'n sarkoomaviruksesta (RSV), adenoviruksesta (ADV) ja härän papilloomaviruksesta (BPV). Imettäväissolut voivat myös vaatia terminaattorisekvenssejä ja poly-A-additiosekvenssejä; vahvistussekvenssejä, jotka lisäävät ekspressiota voidaan myös sisällyttää ja sekvenssit, jotka aiheuttavat geenin amplifikaation, voivat olla myös haluttavia. Nämä sekvenssit ovat alalla tunnettuja. Imettäväissoluissa tapahtuvaa replikaatiota varten sopivat vektorit voivat sisältää virusreplikoneja tai sekvenssejä, jotka varmistavat sopivien NANBV-epitooppeja koodittavien sekvenssien integraation isäntägenomiin.

Transformaatio voidaan suorittaa millä tahansa tunnetulla menetelmällä polynukleotidien viemiseksi isäntäsoluun, sisältäen esimerkiksi polynukleotidin pakkaamisen virukseen ja isäntäsolun muuntamisen viruksella tai polynukleotidin suoralla otolla. Käytetty transformaatiomenettely riippuu trasformoitavasta isännästä. Esimerkiksi E. Coli-isäntäsolujen transformaatiosta BB-NANBV-sekvenssejä sisältävällä lambda-gt11-vektorilla keskustellaan esimerkkiosassa alla. Bakteeritransformaatio suoralla otolla yleensä käyttää käsittelyä kalsium- tai rubidiumkloridilla (Cohen (1972); Maniatis (1982)). Hiivatransformaatio suoralla otolla voidaan suorittaa käyttäen Hinnen et al. (1978) menetelmää. Imettäväistransformaatio suoralla otolla voidaan suorittaa käyttäen kalsiumfosfaattisaostusmenetelmää, jonka ovat esittäneet Graham ja Van der Eb (1978) tai sen erilaisia tunnettuja muunnoksia.

Vektorin rakentaminen käyttää tekniikoita, jotka ovat alalla tunnettuja. Paikkaspesifinen DNA-lohkaisu suoritetaan käsittelemällä sopivilla restriktioentsyymeillä olosuhteissa, jotka on yleensä määritellyt näiden kaupallisesti saatavien entsyymien valmistaja. Yleensä noin 1 μg plasmidia tai DNA-

sekvenssiä lohkaistaan 1 yksiköllä entsyymiä noin 20 µl:n puskuriliuoksessa inkuboimalla 1 - 2 tuntia 37°C lämpötilassa. Restriktioentsyymillä inkuboinnin jälkeen proteiini poistetaan fenoli/kloroformiuutoksella ja DNA palautetaan saostamalla etanolilla. Lohjenneet fragmentit voidaan erottaa käyttäen polyakryyliamidi- tai agaroosigeelielektroforeesitekniikoita niiden yleisten menettelytapojen mukaan, jotka löydetään julkaisusta Methods in Enzymology (1980) 65:499-560.

Tarttuvapäisiä lohkaisufragmentteja voidaan typistää päästään käyttäen E.Coli'n DNA-polymeraasi I:tä (Klenow) sopivien deoksinukleotiditrifosfaattien (dNTP) ollessa läsnä seoksessa. Käsittelyä S1-nukleaasilla voidaan myös käyttää, mistä tulee tulokseksi minkä tahansa yksisäikeisen DNA-osien hydrolyysi.

Liittämiset suoritetaan käyttäen standardeja puskuri- ja lämpötilaolosuhteita käyttäen T4-DNA-ligaasia ja ATP:tä; tarttuvapäiset liittämiset vaativat vähemmän ATP:tä ja vähemmän ligaasia kuin tylppäpäiset liitokset. Kun vektorifragmentteja käytetään osana liitosseosta, vektorifragmenttia käsitellään usein bakteerin alkaalifosfataasilla (BAP) tai vasikan suolen alkaalifosfataasilla 5'-fosfaatin poistamiseksi ja täten vektorin uudelleen liittymisen estämiseksi; vaihtoehtoisesti haluamattomien fragmenttien restriktioentsyymikatkominen voidaan suorittaa liittymisen estämiseksi.

Liittymisseokset transformoidaan sopiviin kloonausisäntiin, kuten E. Coli'in ja onnistuneet transformantit valitaan esimerkiksi antibioottiresistenssin perusteella ja ne seulotaan oikean rakenteen löytämiseksi.

Synteettisiä oligonukleotideja voidaan valmistaa käyttäen automatisoituja oligonukleotidisyntetisoijia, kuten Warner

(1984) kuvaa. Haluttaessa synteettiset säikeet voidaan leimata ^{32}P:llä käsittelemällä polynukleotidikinaasilla ^{32}P-ATP:n läsnäollessa käyttäen standardeja reaktio-olosuhteita.

DNA-sekvenssejä, mukaanlukien ne, jotka on eristetty cDNA-kirjastoista, voidaan muokata tunnetuilla tekniikoilla, sisältäen esimerkiksi paikkasuunnatun mutagenoinnin, jota on kuvannut Zoller (1982). Lyhyesti muokattava DNA pakataan faagiin yksisäikeisenä sekvenssinä ja se muutetaan kaksisäikeiseksi DNA:ksi DNA-polymeraasilla käyttäen alukkeena synteettistä oligonukleotidia, joka on komplementaarinen DNA:n muokattavalle osalle ja jossa on haluttu modifikaatio sisältyvänä omaan sekvenssiinsä. Tuloksena oleva kaksisäikeinen DNA transformoidaan faagiin, joka kantaa isäntäbakteeria. Transformoidun bakteerin viljelmät, jotka sisältävät faagin kunkin säikeen replikaatiotuotteita, pinnoitetaan agariin plakkien saamiseksi. Teoreettisesti 50 % uusista plakeista sisältää faagin, jossa on mutaatiosekvenssi ja jäljellä olevassa 50 %:ssa on alkuperäinen sekvenssi. Plakkien replikaatit hybridisoidaan leimattuihin synteettisiin koettimiin lämpötiloissa ja olosuhteissa, jotka sallivat hybridisaation oikean säikeen kanssa, mutta ei modifioimattoman sekvenssin kanssa. Sekvenssit, jotka on tunnistettu hybridisaation avulla, otetaan talteen ja kloonataan.

DNA-kirjastoja voidaan seuloa koettimilla käyttäen Grunsteinin ja Hognessin (1975) menetelmää. Lyhyesti tässä menettelyssä tutkittava DNA immobilisoidaan nitroselluloosafilttereille, denaturoidaan ja esihybridisoidaan puskurin kanssa, joka sisältää 0 - 50 % formamidia, 0,75 M NaCl:a, 75 mM Na-sitraattia, 0,02 % (w/v) häränseerumialbumiinia, polyvinyylipyrrolidonia ja Fricoll'ia kutakin, 50 mM Na-fosfaattia (pH 6,5), 0,1 % SDS:a ja 100 μg/ml kantajadenaturoitua DNA:ta. Formamidin prosenttimäärä puskurissa ja myös esihybridisaatio- ja sen jälkeisen hybridisaatiovaiheiden aika- ja lämpötilaolosuhteet riippuvat vaadittavasta ankaruu-

desta. Oligomeerikoettimia, jotka vaativat alhaisemman ankarat olosuhteet, käytetään yleisesti alhaisten formamidimäärien, alhaisempien lämpötilojen ja pitempien hybridisaatioaikojen kanssa. Koettimet, jotka sisältävät enemmän kuin 30 tai 40 nukleotidia, kuten ne, jotka ovat peräisin cDNA:sta tai genomisekvensseistä, käyttävät yleensä korkeampia lämpötiloja, esim. noin 40-42°C ja korkeaa formamidipitoisuutta, esim. 50 %. Seuraten esihybridisaatiota 5'-^{32}P-leimattu oligonukleotidikoetin lisätään puskuriin ja filttereitä inkuboidaan tässä seoksessa hybridisaatio-olosuhteissa. Pesun jälkeen käsitellyt filtterit autoradiografoidaan hybridisoidun koettimen paikan osoittamiseksi; DNA:ta vastaavissa paikoissa alkuperäisillä agarlevyillä käytetään halutun DNA:n lähteenä.

Rutiineja vektorirakenteita varten liitosseokset transformoidaan E. Coli-kantaan HB101 tai muuhun sopivaan isäntään ja onnistuneet transformantit valitaan antibioottiresistenssin tai muiden markkereiden avulla. Sitten valmistetaan plasmide- ja transformanteista Clewell et al. (1969) esittämän menetelmän mukaisesti, tavallisesti seuraten klooriamfenikoliamplifikaatiota (Clewell (1972)). DNA eristetään ja analysoidaan tavallisesti restriktioentsyymianalyysin ja/tai sekventoimisen avulla. Sekventoiminen voidaan tehdä dideoksimenetelmällä, jonka on esittänyt Sanger et al. (1977) ja jota on edelleen kuvannut Messing et al. (1981) tai menetelmällä, jonka on kuvannut Maxam et al. (1980). Ongelmat, jotka liittyivät nauhojen kokoonpuristumiseen, mitä huomataan joskus GC-rikkailla alueilla, voitettiin käyttämällä T-deatsoguanosiinia Barr et al. (1986) mukaisesti.

Entsyymiliittävää immunosorbenttianalyysiä (ELISA) voidaan käyttää mittaamaan joko antigeeni- tai vasta-ainepitoisuuksia. Tämä menetelmä riippuu entsyymin liittymisestä joko antigeeniin tai vasta-aineeseen ja se käyttää sidotun entsyymin aktiivisuutta kvantitatiivisena leimana. Vasta-aineen

mittaamiseksi tunnettu antigeeni kiinnitetään kiinteään faasiin (esim. mikrolevyyn tai muovikuppiin), sitä inkuboidaan tutkittavan seerumin laimennoksilla, pestään, inkuboidaan entsyymillä leimatun anti-immunoglobuliinin kanssa ja pestään taas. Leimaukseen sopivat entsyymit ovat alalla tunnettuja ja sisältävät esimerkiksi piparjuuriperoksidaasin. Kiinteään faasin sidottu entsyymiaktiivisuus mitataan lisäämällä spesifistä substraattia ja määrittämällä tuotteen muodostuminen tai substraatin käyttö kolorimetrisesti. Sidottu entsyymiaktiivisuus on suora sidotun vasta-aineen määrän funktio.

Antigeenin mittaamiseksi kiinnitetään tunnettu spesifinen vasta-aine kiinteään faasiin, lisätään tutkittava materiaali, joka sisältää antigeenin, inkuboinnin jälkeen kiinteä faasi pestään ja lisätään toinen entsyymileimattu vasta-aine. Pesun jälkeen lisätään substraatti ja entsyymiaktiivisuus arvioidaan kolorimetrisesti ja se suhteutetaan antigeenipitoisuuteen.

Esimerkit

Alla on kuvattu tämän keksinnön esimerkkejä, jotka on annettu vain kuvaamistarkoituksessa, eikä rajoittamaan tämän keksinnön piiriä. Tämän selvityksen valossa lukuisat suoritusmuodot vaatimusten suojapiirissä ovat ilmeisiä alan keskitason ammattimiehille.

Päällekkäin menevien HCV:n cDNA-kloonien 13i, 26j, CA59a, CA84a, CA156e ja CA167b eristäminen ja sekvenssi

Kloonit 13i, 26j, CA59a, CA84a, CA156e ja CA167b eristettiin lambda-gt11-kirjastosta, joka sisältää HCV:n cDNA:ta (ATCC No. 40394), jonka valmistus on kuvattu EP-julkaisussa 318,216 (julkaistu 31.05.1989) ja julkaisussa WO 89/04669 (julkaistu 01.06.1989). Kirjaston seulonta tapahtui koettimilla, joita

kuvataan alla, käyttäen menetelmää, jonka on kuvannut Huynh (1985). Frekvenssi, jolla positiivisia klooneja ilmestyi vastaavien koettimien kanssa on noin 1:50000.

Kloonin 13i eristäminen suoritettiin käyttäen synteettistä koetinta, joka oli peräisin kloonin 12f sekvenssistä. Koettimen sekvenssi oli:

5' GAA CGT TGC GAT CTG GAA GAC AGG GAC AGG 3'.

Kloonin 26j eristäminen suoritettiin käyttäen koetinta, joka oli peräisin kloonin K9-1 5'-alueelta. Koettimen sekvenssi oli:

5' TAT CAG TTA TGC CAA CGG AAG CGG CCC CGA 3'.

Kloonin 12f ja kloonin k9-1 (jota kutsutaan myös K9-1:ksi) eristysmenettelyt on kuvattu EP-julkaisussa 318,216 ja niiden sekvenssit on esitetty kuvioissa 1 ja vastaavasti 2. Kloonien 13i ja 26j HCV:n cDNA-sekvenssit on esitetty kuvioissa 4 ja vastaavasti 5. Niissä on esitetty myös niihin kooditetut aminohapot ja myös kloonin 13i päällekkäisyys kloonin 12f kanssa ja kloonin 26j päällekkäisyys kloonin 13i kanssa. Näiden kloonien sekvenssit varmistivat kloonin K9-1 sekvenssin. Klooni K9-1 oli eristetty eri HCV:n cDNA-kirjastosta (Ks. EP-218,316).

Klooni CA59a eristettiin käyttäen koetinta, joka perustui kloonin 26j 5'-alueeseen. Tämän koettimen sekvenssi oli:

5' CTG GTT AGC AGG GCT TTT CTA TCA CCA CAA 3'.

Kloonin CA59a sekvenssistä peräisin olevaa koetinta käytettiin eristämään klooni CA84a. Tätä eristystä varten käytetyn koettimen sekvenssi oli:

5' AAG GTC CTG GTA GTG CTG CTG CTA TTT GCC 3'.

Klooni CA156e eristettiin käyttäen koetinta, joka oli peräisin kloonin CA84a sekvenssistä. Koettimen sekvenssi oli:

5' ACT GGA CGA CGC AAG GTT GCA ATT GCT CTA 3'.

Klooni CA167b eristettiin käyttäen koetinta, joka oli peräisin kloonin CA156e sekvenssistä. Koettimen sekvenssi oli:

5' TTC GAC GTC ACA TCG ATC TGC TTG TCG GGA 3'.

HCV:n cDNA:oiden nukleotidisekvenssit klooneissa CA59a, CA84a, CA156e ja CA167b on esitetty vastaavasti kuvioissa 6, 7, 8 ja 9. Niissä kooditetut aminohapot ja myös päällekkäisyys relevanttien kloonien kanssa on myös esitetty kuvioissa.

HCV:n cDNA-kirjaston "pi" luominen

HCV:n cDNA-kirjasto, "pi"-kirjasto, rakennettiin samasta erästä infektoitunutta simpanssin plasmaa, mitä käytettiin HCV:n cDNA:n lambda-gt11-kirjaston rakentamiseen (ATCC No. 40394), mitä kuvattiin EP-julkaisussa No. 318,216 ja käyttäen olennaisesti samoja tekniikoita. Kuitenkin pi-kirjaston rakentaminen käytti alukepidennysmenetelmää, jossa käänteistranskriptaasin aluke perustui kloonin CA59A sekvenssiin. Alukkeen sekvenssi oli:

5' GGT GAC GTG GGT TTC 3'.

Kloonin pi14a eristäminen ja sekvenssi

HCV:n cDNA-kirjaston "pi", jota kuvattiin yllä, seulonta koettimella, jota käytettiin eristämään klooni CA167b (Ks. yllä) antoi tuloksena kloonin pi14a. Klooni sisältää noin 800 cDNA:n emäsparia, jotka menevät päällekkäin kloonien CA167b, CA156e, CA84a ja CA59a kanssa, jotka eristettiin HCV:n lambda-gt11 cDNA-kirjastosta (ATCC No. 40394). Lisäksi pi14a sisältää myös noin 250 emäsparia DNA:ta, jotka ovat ylävirtaan HCV:n cDNA:sta kloonissa CA167b.

Kloonien CA216a, CA290a ja ag30a eristäminen ja sekvenssi

Perustuen kloonin CA167b sekvenssiin tehtiin synteettinen koetin, jolla oli seuraava sekvenssi:

5' GGC TTT ACC ACG TCA CCA ATG ATT GCC CTA 3'.

Ylläolevaa koetinta käytettiin seulomaan kirjastoa, mistä oli tuloksena klooni CA216a, jonka HCV-sekvenssit on esitetty kuviossa 10.

Tehtiin toinen koetin, käyttäen kloonin CA216a sekvenssiä, jolla oli seuraava sekvenssi:

5' TTT GGG TAA GGT CAT CGA TAC CCT TAC GTG 3'.

Lambda-gt11-kirjaston (ATCC No. 40394) seulonta tällä koettimella antoi kloonin CA290a, siinä olevien HCV-sekvenssien ollessa esitettyjä kuviossa 11.

Rinnakkaisessa lähestymisessa tehtiin alukepidennys-cDNA-kirjasto käyttäen nukleiinihappoa, joka oli uutettu samasta infektiokykyisestä plasmasta, mitä käytettiin alkuperäisessä ylläkuvatussa lambda-gt11-cDNA-kirjastossa. Käytetty aluke perustui kloonien CA216a ja CA290a sekvenssiin:

5' GAA GCC GCA CGT AAG 3'.

cDNA-kirjasto tehtiin käyttäen menetelmiä, jotka olivat samanlaisia kuin ne, joita kuvattiin aikaisemmin kirjastoja varten kloonien pi14a ja k9-1 eristämiseen. Tämän kirjaston seulomiseen käytetty koetin perustui kloonin CA290a sekvenssiin:

5' CCG GCG TAG GTC GCG CAA TTT GGG TAA 3'.

Klooni ag30a eristettiin uudesta kirjastosta ylläolevalla koettimella ja se sisälsi noin 670 HCV-sekvenssin emäsparia. Katso kuvio 12. Osa tästä sekvenssistä menee päällekkäin kloonien CA216a ja CA290a HCV-sekvenssin kanssa. Kloonin ag30a sekvenssin noin 300 emäsparia on kuitenkin ylävirtaan

kloonista CA290a saadusta sekvenssistä. Sekvenssissä, joka ei mene päällekkäin, on aloituskodoni (*) ja lopetuskodoneita, jotka voivat merkitä HCV:n ORF:n alkua. Kuviossa 12 ovat myös merkittyinä oletetut pienet kooditetut peptidit (#), joilla voi olla osa translaation säätelyssä ja myös oletettu ensimmäinen oletetun polypeptidin aminohappo (/) ja siihen kooditetut alavirran aminohapot.

Kloonin CA205a eristäminen ja sekvenssi

Klooni CA205a eristettiin alkuperäisestä lambda gt11-kirjastosta (ATCC No. 40394) käyttäen synteettistä koetinta, joka oli peräisin HCV-sekvenssistä kloonissa CA290a (kuvio 11). Koettimen sekvenssi oli:

5' TCA GAT CGT TGG TGG AGT TTA CTT GTT GCC 3'.

HCV:n cDNA:n sekvenssi CA205a:ssa, esitettynä kuviossa 13, menee päällekkäin molempien kloonien ag30a ja CA290a cDNA-sekvenssien kanssa. Sekvenssin päällekkäisyys CA290a:n sekvenssin kanssa on esitetty pisteviivalla sekvenssin päällä (kuvio esittää myös oletetut aminohapot, jotka on kooditettu tässä fragmentissa).

Kuten havaitaan HCV:n cDNA-sekvensseistä klooneissa CA205a ja ag30a, oletettu HCV-polyproteiini näyttää alkavan ATG-aloituskodonista; HCV-sekvenssit molemmissa klooneissa sisältävät kehyksessä olevan vierekkäisen kaksoislopetuskodonin (TGATAG) 42 nukleotidia ylävirtaan tästä ATG:stä. HCV:n ORF näyttää alkavan näiden lopetuskodonien jälkeen ja ulottuvan ainakin 8907 nukleotidin matkan (katso kuviossa 17 esitetty yhdistelmä-HCV:n cDNA).

Kloonin 18g eristäminen ja sekvenssi

Perustuen kloonin ag30a sekvenssiin (ks. kuvio 12) alkuperäisestä lambda gt11-kirjastosta (ATCC No. 40394) saatuun

päällekkäin menevän kloonin sekvenssiin, tehtiin synteettinen koetin, jolla oli seuraava sekvenssi:

5' CCA TAG TGG TCT GCG GAA CCG GTG AGT ACA 3'.

Alkuperäisen lambda gt11-HCV:n cDNA-kirjaston seulominen koettimella antoi kloonin 18g, jonka HCV:n cDNA-sekvenssi on esitetty kuviossa 14. Kuviossa ovat esitettynä päällekkäisyys kloonin ag30a kanssa ja HCV:n cDNA:ssa kooditetut oletetut polypeptidit.

cDNA-sekvenssi kloonissa 18g (C18g tai 18g) menee päällekkäin kloonien ag30a ja CA205a sekvenssien kanssa, joita kuvattiin yllä. C18g:n sekvenssi sisältää lopetuskodonialueen, joka havaittiin kloonissa ag30a. Näistä lopetuskodoneista ylävirtaan olevan polynukleotidin alue oletettavasti edustaa osaa HCV-genomin 5'-alueesta, mikä voi sisältää lyhyitä ORF:iä ja mikä voidaan vahvistaa suoralla puhdistetun HCV-genomin sekventoimisella. Näillä oletetuilla pienillä kooditetuilla peptideillä voi olla säätävä osa translaatiossa. HCV-genomin C18g:n edustamasta alueesta ylävirtaan oleva alue voidaan eristää sekvenssianalyysiä varten käyttäen olennaisesti EP-julkaisussa 318,216 kuvattua tekniikkaa cDNA-sekvenssien eristämiseksi kloonissa 12f olevasta HCV:n cDNA-sekvenssistä ylävirtaan. Olennaisesti syntetisoidaan pieniä käänteistranskriptaasin oligonukleotidialukkeita, jotka perustuvat C18g:n sekvenssiin ja niitä käytetään sitoutumaan vastaavaan sekvenssiin HCV:n genomi-RNA:ssa. Alukesekvenssit ovat läheisiä tunnetulle C18g:n 5'-päälle, mutta riittävästi alavirtaan salliakseen koetinsekvenssien suunnittelun ylävirtaan alukesekvensseistä. Tunnettuja vakiomenetelmiä alukkeilla varustamiseksi ja kloonaamiseksi käytetään. Tulokseksi saatuja cDNA-kirjastoja seulotaan sekvensseillä ylävirtaan alukepaikoista (pääteltynä C18g:n selvitetystä sekvenssistä). HCV:n genomi-RNA saadaan joko plasma- tai maksanäytteistä yksilöistä, joilla on NANBH. Koska HCV näyttää olevan Flavityyppinen virus, genomin 5'-päätä voidaan muuntaa "cap"-

rakenteella. On tunnettua, että Flaviviruksien genomit sisältävät 5'-pään "cap"-rakenteita. (Keltakuumevirus, Rice et al. (1988); Dengue-virus, Hahn et al. (1988); Japanilainen enkefaliittivirus (1987)).

Kloonien eristäminen ja sekvenssi beta-HCV:n cDNA-kirjastoista

Klooneja, jotka sisälsivät cDNA:ta, joka edusti HCV-genomin 3'-pään aluetta, eristettiin cDNA-kirjastosta, joka oli rakennettu alkuperäisestä infektoivasta simpanssin plasmavarastosta, jota oli käytetty HCV:n cDNA:n lambda-gt11-kirjaston luomiseen (ATCC No. 40394), joka on kuvattu EP-julkaisussa No. 318,216. DNA-kirjaston luomiseksi varustettiin plasmasta saatu RNA "hännällä" poly-rA:n kanssa käyttäen poly-(rA)-polymeraasia ja cDNA syntetisoitiin käyttäen oligo$(dT)_{12-18}$:a alukkeena käänteistranskriptaasia varten. Tulokseksi saatu RNA:cDNA-hybridi pilkottiin RNAasi H:lla ja muutettiin kaksisäikeiseksi HCV:n cDNA:ksi. Tulokseksi saatu HCV:n cDNA kloonattiin lambda-gt10:een käyttäen olennaisesti tekniikkaa, jonka on kuvannut Huynh (1985), mistä saatiin beta- (tai b-) HCV:n cDNA-kirjasto. Käytetyt menettelytavat olivat seuraavia.

Plasman näyte (12 ml) käsiteltiin proteinaasi K:lla ja sitä uutettiin samalla tilavuudella fenolia, joka oli kyllästetty 0,05M Tris-HCl:llä, pH 7,5, 0,05 % (v/v) betamerkaptoetanolilla, 0,18 % (w/v) hydroksikinoliinilla, 1 mM EDTA:lla. Tulokseksi saatua vesifaasia uutettiin uudelleen fenoliseoksella, mitä seurasi 3 uutosta 1:1-seoksella, joka sisälsi fenolia ja kloroformi:isoamyylialkoholia (24:1), mitä seurasi 2 uutosta kloroformin ja isoamyylialkoholin (1:1) seoksella. Sen jälkeen kun vesifaasi oli säädetty 200 mM:ksi NaCl:n suhteen, saostettiin vesifaasin nukleiinihapot yli yön -20°C:ssa 2,5 tilavuudella kylmää absoluuttista etanolia. Saostumat kerättiin linkoamalla 10000 kierroksella 40 minuu-

tin ajan, pestiin 70 %:lla etanolilla, joka sisälsi 20 mM NaCl:a ja 100 %:lla kylmällä etanolilla, kuivattiin 5 minuuttia dessikkaattorissa ja liuotettiin veteen.

Infektoivasta simpanssin plasmavarastosta olevat eristetyt nukleiinihapot varustettiin poly-rA-hännällä käyttäen poly-A-polymeraasia ihmisen istukkaribonukleaasi-inhibiittorin (HPRI) läsnäollessa (ostettiin Amersham Corp:lta) käyttäen MS2:n RNA:ta kantajana. Eristettyjä nukleiinihappoja, joita oli yhtä paljon kuin 2 ml:ssa plasmaa, inkuboitiin liuoksessa, joka sisälsi TMN:ää (50 mM Tris-HCl, pH 7,9, 10 mM $MgCL_2$, 250 mM NaCl, 2,5 mM $MnCl_2$, 2 mM ditiotreitolia (DTT)), 40 mikromolaarista alfa-[^{32}P] ATP:tä, 20 yksikköä HPRI:tä (Amersham Corp.) ja noin 9-10 yksikköä RNaasivapaata poly-A-polymeraasia (BRL). Inkuboitiin 10 minuuttia 37°C:ssa ja reaktiot pysäytettiin EDTA:lla (lopullinen pitoisuus noin 250 mM). Liuosta uutettiin yhtäläisellä tilavuudella fenoli-kloroformia ja samalla tilavuudella kloroformia ja nukleiinihappoja saostettiin yli yön -20°C:ssa 2,5 tilavuudella etanolia 200 mM NaCl:a läsnäollessa.

Kloonin b5a eristäminen

Beta-HCV:n cDNA-kirjastoa seulottiin hybridisaatiolla käyttäen synteettistä koetinta, jolla oli sekvenssi, joka perustui HCV:n cDNA-sekvenssiin kloonissa 15e. Kloonin 15e eristäminen on kuvattu EP-julkaisussa 318,216 ja sen sekvenssi on esitetty kuviossa 3. Synteettisen koettimen sekvenssi oli:

5' ATT GCG AGA TCT ACG GGG CCT GCT ACT CCA 3'.

Kirjaston seulominen antoi kloonin beta-5a (b5a), joka sisältää HCV:n cDNA-alueen, joka on suunnilleen 1000 emäsparia. Tämän cDNA:n 5'-alue menee päällekkäin kloonien 35f, 19g, 26g ja 15e kanssa (kloonit on kuvattu edellä). Alue poly-A-sekvenssin 3'-pään ja sen 3'-sekvenssin, joka menee päällekkäin kloonin 15e kanssa, välissä sisältää suunnilleen

200 emäsparia. Tämä klooni sallii HCV-genomin 3'-pään sekvenssin alueen identifioimisen.

b5a:n sekvenssi sisältyy HCV:n cDNA-sekvenssiin kloonissa 16jh (kuvataan alla). Lisäksi sekvenssi on läsnä myös CC34a:ssa, mikä on eristetty alkuperäisestä lambda-gt11-kirjastosta (ATCC No. 40394). (Alkuperäiseen lambda-gt11-kirjastoon viitataan tässä "C"-kirjastona).

Sellaisten kloonien sekvenssin eristäminen, jotka on luotu HCV-genomin 3'-alueen PCR-amplifikaatiolla

On luotu monia cDNA-klooneja, jotka sisältävät nukleotidisekvenssejä, jotka ovat peräisin HCV-genomin 3'-alueelta. Tämä tehtiin amplifioimalla genomin kohdealuetta polymeraasiketjureaktiotekniikalla, jota on kuvannut Saiki et al. (1986) ja Saiki et al. (1988), mitä muunnettiin kuten kuvataan alla. HCV:n RNA, joka amplifioitiin, saatiin alkuperäisestä infektoivasta simpanssin plasmavarastosta, jota käytettiin HCV:n cDNA:n lambda-gt11-kirjaston luomiseen (ATCC No. 40394), mitä kuvataan EP-julkaisussa 318,216. HCV:n RNA:n eristäminen tehtiin kuten kuvataan yllä. Eristetty RNA varustettiin hännällä 3'-päässä ATP:llä E. colin poly-A-polymeraasilla, kuten kuvaa Sippel (1973), paitsi että simpanssin seerumista eristetyt nukleiiinihapot korvasivat nukleiiinihapposubstraatin. Hännällä varustettu RNA käänteiskopioitiin sitten cDNA:ksi käänteistranskriptaasilla käyttäen oligo dT-alukesovitinta olennaisesti kuten kuvaa Han (1987), paitsi että alukesovittimen sekvenssin komponentit olivat:

Stufferi	NotI	SP6 promoottori	Aluke
AATTC	GCGGCCGC	CATACGATTTAGGTGACACTATAGAA	T_{15}

Tulokseksi saadulle cDNA:lle tehtiin amplifikointi PCR:llä käyttäen kahta aluketta:

Aluke	Sekvenssi
JH32 (30-meeri)	ATAGCGGCCGCCCTCGATTGCGAGATCTAC

JH11 (20-meeri) AATTCGGGCGGCCGCCATACGA

JH32-aluke sisälsi 20 nukleotidisekvenssiä, jotka kykenivät hybridisoitumaan cDNA:n kohdealueen 5'-päähän, arvioidun T_m:n ollessa 66°C. JH11 oli peräisin oligo dT-alukesovittimen osasta; täten se oli spesifinen cDNA:n 3'-päälle T_m:n ollessa 64°C. Molemmat alukkeet oli suunniteltu niin, että niillä oli restriktioentsyymin, NotI, tunnistuspaikka 5'-päässä käytettäväksi sitä seuraavassa amplifioidun HCV:n cDNA:n kloonaamisessa.

PCR-reaktio suoritettiin suspendoimalla cDNA ja alukkeet 100 µl:aan reaktioseosta, joka sisälsi neljää deoksinukleosiditrifosfaattia, puskurisuoloja ja metalli-ioneja ja lämpöstabiilia DNA-polymeraasia, joka oli eristetty Thermus aquaticuksesta (Taq-polymeraasi), jotka ovat Perkin Elmer Cetus-yhtiön PCR-välinesarjassa (N801-0043 tai N801-0055). PCR-reaktio suoritettiin 35 syklin ajan Perkin Elmer Cetus-yhtiön DNA:n lämpösyklerissä (DNA thermal cycler). Kukin jakso käsitti 1,5 minuutin denaturoimisvaiheen 94°C:ssa, lämpökäsittelyvaiheen 60°C:ssa 2 minuutin ajan ja alukkeen pidennysvaiheen 72°C:ssa 3 minuutin ajan. PCR-tuotteille tehtiin Southern-blot-analyysi käyttäen 30 nukleotidin koetinta, JH34, jonka sekvenssi perustui kloonin 15e 3'-pään sekvenssiin. JH34:n sekvenssi on:

5' CTT GAT CTA CCT CCA ATC ATT CAA AGA CTC 3'.

HCV:n cDNA-koettimella osoitettujen PCR-tuotteiden kokoalue ulottui noin 50:stä noin 400:aan emäspariin.

Amplifioidun HCV:n cDNA:n kloonaamiseksi lohkaistiin PCR-tuotteet NotI:llä ja valittiin koon mukaan polyakryyliamidigeelielektroforeesilla. Suuremmat kuin 300 emäsparin DNA:t kloonattiin pUC18S:n NotI-paikkaan. Vektori pUC18S on rakennettu sisällyttämällä NotI-polylinkkeri, joka on kloonattu pUC18:n EcoRI- ja SalI-paikkojen väliin. Kloonit seulottiin

HCV:n cDNA:n suhteen käyttäen JH34-koetinta. Saatiin ja sekventoitiin lukumäärä positiivisia klooneja. HCV:n cDNA-insertin nukleotidisekvenssi yhdessä näistä klooneista, 16 jh, ja aminohapot, jotka on kooditettu siinä, on esitetty kuviossa 15. Nukleotidien heterogeenisyys, mikä havaittiin HCV:n cDNA:n sekvenssissä kloonissa 16jh verrattuna toiseen tämän alueen klooniin on merkitty kuvioon.

Kootut HCV:n cDNA-sekvenssit

HCV:n cDNA-sekvenssi on koottu sarjasta päällekkäin meneviä klooneja, jotka ovat peräisin eri HCV:n cDNA-kirjastoista, joita kuvataan yllä. Tässä sekvenssissä koottu HCV:n cDNA-sekvenssi, joka on saatu klooneista b114a, 18g, ag30a, CA205a, CA290a, CA216a, pi14a, CA167b, CA156e, CA84a ja CA59a, on ylävirtaan kootusta HCV:n cDNA-sekvenssistä, joka on julkaistu EP-julkaisussa No. 318,216, ja on esitetty kuviossa 16. Koottu HCV:n cDNA-sekvenssi, joka on saatu klooneista b5a ja 16jh, on alavirtaan kootusta HCV:n cDNA-sekvenssistä, joka on julkaistu EP-julkaisussa No. 318,216.

Kuvio 17 esittää kootun HCV:n cDNA-sekvenssin, joka on peräisin ylläkuvatuista klooneista ja kootun HCV:n cDNA-sekvenssin, joka on julkaistu EP-julkaisussa No. 318,216. Kloonit, joista sekvenssi on peräisin, ovat b114a, 18g, ag30a, CA205a, CA290a, CA216a, pi14a, CA167b, CA156e, CA84a, CA59a, K9-1 (jota kutsutaan myös k9-1:ksi), 26j, 13i, 12f, 14i, 11b, 7f, 7e, 8h, 33c, 40b, 37b, 35, 36, 81, 32, 33b, 25c, 14c, 8f, 33f, 33g, 39c, 35f, 19g, 26g, 15e, b5a ja 16jh. Kuviossa kolme täplää sekvenssin päällä merkitsee oletetun initiaattorimetioniinikodonin asemaa.

Klooni b114a saatiin käyttäen kloonausmenettelyä, jota kuvattiin kloonia b5a varten yllä, paitsi että koetin oli synteettinen koetin, jota käytettiin kloonin 18g osoittamiseen yllä. Klooni b114a menee päällekkäin kloonien 18g, ag30a

ja CA205a kanssa, paitsi että klooni b114a sisältää ylimääräiset kaksi nukleotidia ylävirtaan kloonin 18g sekvenssistä (s.o. 5'-CA). Nämä kaksi ylimääräistä nukleotidia on sisällytetty kuviossa 17 esitettyyn HCV:n genomin sekvenssiin.

Olisi huomattava, että vaikka useat yllä kuvatuista klooneista on saatu kirjastoista, jotka ovat muita kuin alkuperäinen HCV:n cDNA:n lambda-gt11-C-kirjasto (ATCC No. 40394), nämä kloonit sisältävät HCV:n cDNA-sekvenssejä, jotka menevät päällekkäin alkuperäisen kirjaston HCV:n cDNA-sekvenssien kanssa. Täten olennaisesti kaikki HCV-sekvenssit voidaan johtaa alkuperäisestä lambda-gt11-C-kirjastosta (ATCC No. 40394), jota käytettiin ensimmäisen HCV:n cDNA-kloonin (5-1-1) eristämiseen. Kloonin 5-1-1 eristäminen on kuvattu EP-julkaisussa No. 318,216.

Fuusiopolypeptidin C100-3 puhdistaminen
(Vaihtoehtoinen menetelmä)

Fuusiopolypeptidi C100-3 (jota myös kutsutaan HCV:n c100-3:ksi ja vaihtoehtoisesti c100-3:ksi) muodostuu superoksididismutaasista (SOD) N-päässä ja kehyksessä olevasta C100:n HCV-popypeptidistä C-päässä. Menetelmä polypeptidin valmistamiseksi ekspressoimalla hiivassa ja uutettujen isäntähiivasolujen liukenemattoman fraktion differentiaaliuuttamiseksi on kuvattu EP-julkaisussa No. 318,216. Vaihtoehtoinen menetelmä tämän fuusiopolypeptidin valmistamiseksi kuvataan alla. Tässä menetelmässä antigeeni saostetaan raa'asta solulysaatista asetonilla; asetonilla saostetulle antigeenille tehdään sitten ioninvaihtokromatografia ja se puhdistetaan edelleen geelisuodatuksella.

Fuusiopolypeptidi C100-3 (HCV:n c100-3) ekspressoidaan hiivakannassa JSC 308 (ATCC No. 20879), joka on transformoitu pAB24C100-3:lla (ATCC No. 67976); transformoituja hiivasoluja kasvatetaan olosuhteissa, jotka sallivat ekspression (s.o.

kasvattamalla YEP:ssä, joka sisältää 1 % glukoosia). (Ks. EP-julkaisu No. 318,216). Solulysaatti valmistettiin suspendoimalla solut puskuriin A (20 mM Tris-HCl:a, pH 8,0, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF). Solut rikottiin jauhamalla lasihelmien kanssa Dynomill-tyyppisessä homegenoijassa tai vastaavassa. Solujen rikkoutumisen astetta tarkkailtiin laskemalla soluja mikroskoopin alla faasioptiikalla. Rikkoontuneet solut näyttävät tummilta, kun taas elinkykyiset solut ovat vaaleanvärisiä. Määritettiin rikkoontuneiden solujen prosenttimäärä.

Kun rikkoontuneiden solujen prosenttiosuus oli suunnilleen 90 % tai enemmän, rikkoontuneiden solujen jäte erotettiin lasihelmistä linkoamalla ja lasihelmet pestiin puskuri A:lla. Sen jälkeen kun pesut ja homogenaatti oli yhdistetty, saatiin lysaatin liukenematon materiaali linkoamalla. Pelletin materiaali pestiin liukenevien proteiinien poistamiseksi suspendoimalla puskuriin B (50 mM glysiiniä, pH 12,0, 1 mM DTT, 500 mM NaCl). Liukenematon materiaali otettiin talteen linkoamalla ja tehtiin liukenevaksi suspendoimalla puskuriin C, joka sisälsi SDS:ää. Uutosliuosta voidaan kuumentaa betamerkaptoetanolin läsnäollessa ja se voidaan konsentroida ultrasuodatuksen avulla. HCV:n c100-3 uutteessa saostettiin kylmällä asetonilla. Haluttaessa saostuma voidaan säilyttää lämpötiloissa, jotka ovat -15°C tai sen alle.

Ennen ioninvaihtokromatografiaa asetonilla saostettu materiaali otettiin talteen linkoamalla ja se voitiin kuivata typpi-ilmakehässä. Saostuma suspendoitiin puskuriin D (50 mM glysiiniä, pH 10,0, 1 mM DTT, 7 M urea) ja lingottiin liukenemattoman materiaalin pelletiksi. Linkousnesteen materiaalia käytettiin anioninvaihtopylvääseen, joka oli aikaisemmin tasapainotettu puskurilla D. Kerättiin fraktioita ja ne analysoitiin ultraviolettiabsorbanssilla tai geelielektroforeesilla SDS-polyakryyligeeleillä. Ne fraktiot, jotka sisälsivät HCV:n c100-3:a, varastoitiin.

HCV:n c100-3-polypeptidin puhdistamiseksi geelisuodatuksella varastoituja ioninvaihtofraktioita kuumennettiin beta-merkaptoetanolin ja SDS:n läsnäollessa ja eluaatti konsentroitiin ultrasuodatuksella. Konsentraattia käytettiin geelisuodatuspylvääseen, joka oli aikaisemmin tasapainotettu puskurilla E (20 mM Tris-HCl, pH 7,0, 1 mM DTT, 0,1 % SDS). HCV:n c100-3:n läsnäolo eluoiduissa fraktioissa ja myös epäpuhtauksien läsnäolo määritettiin geelielektroforeesilla polyakryyliamidigeeleillä SDS:n läsnäollessa ja tekemällä polypeptidit näkyviksi. Ne fraktiot, jotka sisälsivät puhdistettua HCV:n c100-3:a, varastoitiin. HCV:n c100-3:sta rikkaat fraktiot voidaan edelleen puhdistaa toistamalla geelisuodatusmenetelmä. Jos halutaan osasmuotoisen materiaalin poistamista, voidaan HCV:n c100-3:a sisältävä materiaali suodattaa 0.22 μm:n suodattimen läpi.

HCV:n cDNA:ssa kooditettujen polypeptidien ekspressio ja antigeenisyys

Polypeptidit, jotka ekspressoidaan E. colissa

Polypeptidit, jotka olivat kooditettuina lukuisissa HCV:n cDNA:oissa, jotka ulottuvat läpi HCV:n genomi-ORF:n, ekspressoitiin E. colissa ja testattiin niiden antigeenisyyden suhteen käyttäen seerumia, joka saatiin lukuisista yksilöistä, joilla oli NANBH. Eskpressiovektorit, jotka sisälsivät kloonatut HCV:n cDNA:t rakennettiin pSODcf1:stä (Steimer et al. (1986)). Jotta olisi oltu varmoja, että oikea luentakehys olisi saatu, luotiin kolme erillistä ekspressiovektoria, pcf1AB, pcf1CD ja pcf1EF liittämällä jokin kolmesta linkkeristä AB, CD ja EF BamHI-EcoRI-fragmenttiin, joka oli peräisin täydellisestä vektorin pSODcf1 pätkimisestä EcoRI:llä ja BamHI:llä, mitä seurasi käsittely alkaalisella fosfataasilla. Linkkerit luotiin kuudesta oligomeeristä, A, B, C, D, E ja F. Kukin oligomeeri fosforyloitiin käsittelemällä kinaasilla ATP:n läsnäollessa ennen lämpökäsittelyä

komplementaarioligomeeriksi. Synteettisten linkkereiden sekvenssit olivat seuraavat.

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

Kukin kolmesta linkkeristä tuhoaa alkuperäisen EcoRI-paikan ja luo uuden EcoRI-paikan linkkeriin, mutta eri luentakehykseen. Tästä johtuen HCV:n cDNA:n EcoRI-fragmentit, jotka eristettiin klooneista ekspressiovektoriin insertoitaessa, olivat kolmessa eri luentakehyksessä.

Annetuissa lambda-gt11-klooneissa olevat HCV:n cDNA-fragmentit leikattiin pätkimällä EcoRI:llä; kukin fragmentti insertoitiin pcf1AB:hen, pcf1CD:hen ja pcf1EF:ään. Nämä ekspressiorakenteet transformoitiin sitten D1210 E. coli-soluihin, transformantit kloonattiin ja kunkin kloonin yhdistelmäbakteerit pantiin ekspressoimaan fuusiopolypeptidejä kasvattamalla bakteereita IPTG:n läsnäollessa.

Annettujen HCV:n cDNA:oiden ekspressiotuotteet testattiin antigeenisyyden suhteen pesäkkeiden suoralla immunologisella seulonnalla käyttäen muunnosta menetelmästä, jonka on kuvannut Helfman et al. (1983). Lyhyesti, kuten esitetään kuviossa 18, bakteerit levitettiin nitroselluloosasuodattimille, jotka olivat ampisilliinilevyjen päällä antaakseen suunnilleen 1000 pesäkettä suodatinta kohti. Pesäkkeet levitettiin uudelleen nitroselluloosasuodattimelle ja niitä kasvatettiin uudelleen yli yön 2 mM IPTG:n ja ampisilliinin läsnäollessa. Bakteeri-

pesäkkeet hajotettiin suspendoimalla nitroselluloosasuodattimia noin 15-20 minuutin ajan ilmakehässä, joka oli kyllästetty $CHCl_3$-höyryllä. Kukin suodatin pantiin sitten yksittäiseen 100 mm:n Petri-maljaan, joka sisälsi 10 ml 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 3 % (w/v) BSA, 40 μg/ml lysotsyymiä ja 0,1 μg/ml DNaasia. Levyjä ravistettiin hellästi ainakin 8 tuntia huoneen lämpötilassa. Suodattimet huuhdeltiin TBST:ssä (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,005 % Tween 20). Inkuboinnin jälkeen solujäännökset huuhdeltiin ja niitä inkuboitiin TBS:ssä (TBST ilman Tweeniä), mikä sisälsi 10 % lampaan seerumia; inkubointia tehtiin 1 tunti. Suodattimia inkuboitiin sitten esikäsitellyn seerumin kanssa TBS:ssä yksilöistä, joilla oli NANBH, jotka sisälsivät: 3 simpanssia; 8 potilasta, joilla oli krooninen HANBH, joiden seerumit olivat positiivisia HCV:n C100-3-polypeptidiä vastaan olevien vasta-aineiden suhteen (kuvattu EP-julkaisussa No. 318,216 ja yllä) (myös kutsutaan C100:ksi); 8 potilasta, joilla oli krooninen NANBH, joiden seerumit olivat negatiivisia C100 vastaisten vasta-aineiden suhteen; toipunut potilas, jonka seerumi oli negatiivinen C100 vastaisten vasta-aineiden suhteen; ja 6 potilasta, joilla oli yhteisöhankittu NANBH, sisältäen yhden, jonka seerumi oli voimakkaasti positiivinen C100 vastaisten vasta-aineiden suhteen ja yhden, jonka seerumi oli rajatapauksena positiivinen C100 vastaisten vasta-aineiden suhteen. Seerumia, joka oli laimennettu TBS:llä, esikäsiteltiin absorboimalla se ennalta hSOD:lla. Suodattimien inkubointia seerumin kanssa tehtiin ainakin kaksi tuntia. Inkuboinnin jälkeen suodattimet pestiin kaksi kertaa 30 minuutin ajan TBST:llä. Niiden ekspressoitujen proteiinien, joihin seerumin vasta-aineet olivat kiinnittyneet, leimaus suoritettiin inkuboimalla 2 tuntia ^{125}I-leimatun lampaan anti-ihmisvasta-aineen kanssa. Pesun jälkeen suodattimet pestiin kahdesti 30 minuutin ajan TBST:llä, kuivattiin ja suoritettiin autoradiografia.

Lukumäärä klooneja (ks. alla) ekspressoi polypeptidejä, jotka sisälsivät HCV-epitooppeja, jotka olivat immunologisesti reaktiokykyisiä seerumin kanssa, joka oli yksilöistä, joilla oli NANBH. Viisi näistä polypeptideistä oli hyvin immunogeenistä siinä, että vasta-aineita HCV-epitoopeille näissä polypeptideissä havaittiin monissa eri potilasseerumeissa. Näitä polypeptidejä koodittavat kloonit ja polypeptidien asema oletetussa HCV-polyproteiinissa (jossa aminohapponumerot alkavat oletetusta initiaattorikodonista) ovat seuraavat: klooni 5-1-1, aminohapot 1694-1735; klooni C100, aminohapot 1569-1931; klooni 33c, aminohapot 1192-1457; klooni CA279a, aminohapot 1-84; ja klooni CA290a, aminohapot 9-177. Immunogeenisten polypeptidien paikka oletetussa HCV-polyproteiinissa ovat esitetyt välittömästi alla.

Kloonit, jotka koodittavat polypeptidejä, joilla on todistettu reaktiivisuus NANBH-potilaiden seerumin kanssa

Klooni	Asema HCV-polyproteiinissa (aminohapponumero alkaen oletetusta initiaattorimetioniista)
CA279a	1-84
CA74a	437-582
13i	511-690
CA290a	9-177
33c	1192-1457
40b	1266-1428
5-1-1	1694-1735
81	1689-1805
33b	1916-2021
25c	1949-2124
14c	2054-2223
8f	2200-3325
33f	2287-2385
33g	2348-2464
39c	2371-2502

15e	2796-2886
C100	1569-1931

Tulokset polypeptidien, jotka on kooditettu eri tutkituissa klooneissa, immunogeenisyydestäviittaavat tehokkaaseen osoittamiseen ja immunointijärjestelmät voivat sisältää HCV-polypeptidien/epitooppien paneeleita.

HCV-epitooppien ekspressio hiivassa

Kolme erilaista hiivaekspressiovektoria, jotka sallivat HCV:n cDNA:n insertion kolmeen eri luentakehykseen, rakennettiin. Yhden vektorin, pAB24C100-3, rakenne on kuvattu EP-julkaisussa No. 318,216. Alla olevissa tutkimuksissa HCV:n cDNA yllä luetelluista klooneista antigeenisyyden kartoitustutkimuksessa E. colia käyttäen ekspressoidut tuotteet korvasivat C100-HCV:n cDNA:n. Muiden vektoreiden rakenne korvaa yllä olevissa E. coli-tutkimuksissa käytetyn sovittimen yhdellä seuraavista sovittimista:

Sovitin 1

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

Sovitin 2

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

Insertoitu HCV:n cDNA ekspressoidaan hiivassa, joka on transformoitu vektoreilla, käyttäen yllä kuvattuja ekspressio-olosuhteita fuusiopolypeptidiä C100-3 varten. Tulokseksi saadut polypeptidit seulotaan käyttäen seerumia yksilöistä, joilla on NANBH, joita kuvattiin yllä niiden immunogeenisten polypeptidien seulomiseksi, jotka on kooditettu E. colissa ekspressoiduissa HCV:n cDNA:oissa.

HCV-polyproteiinien hydrofobisen profiilin vertaaminen Länsi-Niilin viruksen polyproteiiniin ja Dengue-viruksen NS1:een

HCV-polyproteiinisegmentin hydrofobisuusprofiilia verrattiin tyypillisen Flaviviruksen, Länsi-Niilin viruksen vastaavaan. Länsi-Niilin viruspolyproteiinin polypeptidisekvenssi johdettiin tunnetusta polynukleotidisekvenssistä, joka koodittaa tuon viruksen nonstrukturaaliproteiineja. HCV:n polyproteiinisekvenssi johdettiin päällekkäin menevien cDNA-kloonien sekvenssistä. Profiilit määriteltiin antigeeniohjelmaa, joka käyttää 7 aminohapon levyistä ikkunaa (ko. aminohappo ja kolme tähdettä kummallakin puolella) antaakseen keskimääräisen hydrofobisuuden annetun aminohappotähteen suhteen. Parametrit, jotka antavat reaktiivisen hydrofobisuuden kullekin aminohappotähteelle ovat julkaisusta Kyte ja Doolittle (1982). Kuvio 19 esittää kahden polyproteiinin hydrofobisuusprofiilit; alueet jotka vastaavat Länsi-Niilin viruksen nonstrukturaaliproteiineja, NS1-NS5, on merkitty kuvioon. Kuten kuviosta nähdään, on HCV-polyproteiinin ja Länsi-Niilin viruksen polyproteiinin profiileissa yleistä samanlaisuutta.

Aminohappojen sekvenssiä, joka on kooditettu kuviossa 16 esitetyn HCV:n cDNA:n 5'-alueella, on verrattu vastaavaan yhden Dengue-viruksen, jota kuvataan yllä, kannan alueeseen hydrofobisuus- ja hydrofiilisyysalueiden profiilin suhteen (tietoa ei esitetty). Tämä vertailu paljasti, että HCV:stä ja Dengue-viruksesta olevilla polypeptideillä, jotka koodittivat tätä aluetta, mikä vastaa aluetta, joka koodittaa NS1:tä (tai sen osaa), oli samanlaiset hydrofobisuus/hydrofiilisyysprofiilit.

Samanlaisuus hydrofobisuusprofiileissa yhdessä aikaisemmin identifioitujen homologioiden kanssa HCV:n ja Dengue Flaviviruksen aminohapposekvensseissä EP-julkaisussa No. 318,216,

ehdottaa, että HCV on sukua näille Flaviviruksien perheen jäsenille.

Oletettujen HCV:n ORF:ssä kooditettujen polypeptidien karakterisointi

Kuviossa 17 esitetty HCV:n cDNA:n sense-säikeen sekvenssi johdettiin päällekkäin menevistä HCV:n cDNA:oista eri klooneissa, joita on kuvattu EP-julkaisussa No. 318,216 ja niissä, joita on kuvattu yllä. Sekvenssistä voidaan päätellä, että HCV-genomi sisältää etupäässä yhden pitkän jatkuvan ORF:n, joka koodittaa polyproteiinia. Sekvenssissä nukleotidi numero 1 vastaa initiaattori-MET-kodonin ensimmäistä nukleotidia; miinusnumerot merkitsevät, että nukleotidit ovat tuon etäisyyden päässä 5'-suunnassa (ylävirtaan), kun taas positiiviset numerot merkitsevät, että nukleotidit ovat tuon etäisyyden päässä 3'-suunnassa (alavirtaan). Yhdistelmäsekvenssi esittää HCV:n cDNA:n "sense"-säiettä.

Oletetun HCV-polyproteiinin, joka on johdettu HCV:n cDNA-sense-säikeen sekvenssistä, aminohapposekvenssi on myös esitetty kuviossa 17, jossa asema 1 alkaa oletetusta initiaattorimetioniinista.

Kooditetun HCV-polyproteiinin mahdolliset proteiinialueet ja myös summittaiset rajat ovat seuraavat (identifioidut polypeptidit suluissa ovat niitä, jotka on kooditettu Flavivirus-alueella):

Oletettu alue	Raja suunnilleen (aminohapponumerot)
"C" (ydinkapseliproteiini)	1-120
"E" (virionikuoriproteiinit ja mahdolliset matriisiproteiinit (M))	120-400
"NS1" (komplementinkiinnitysantigeeni?)	400-660

"NS2" (tuntematon toiminto)	660-1050
"NS3" (proteaasi?)	1050-1640
"NS4" (tuntematon toiminto)	1640-2000
"NS5" (polymeraasi?)	2000-? loppu

Tulisi kuitenkin huomata, että hydrofobisuusprofiilit (kuvataan alla) merkitsevät, että HCV poikkeaa Flavivirusmallista, erityisesti NS2:sta ylävirtaan olevan alueen suhteen. Lisäksi merkittyjä rajoja ei ole tarkoitettu osoittamaan lujia rajalinjoja oletettujen polypeptidien välillä.

Voidaan lisäksi päätellä kuviossa 17 esitetystä sekvenssistä, että siinä on neljä pientä ORF:a, jotka sisältävät ATG:n, joka on ylävirtaan oletetusta suuren polyproteiinin initiaattori-MET:stä. Näiden ORF:ien ATG:t ovat nukleotidinumeroissa -310, -257, -246 ja -127.

Polypeptidin hydrofiilisyys- ja antigeenisyysprofiili

Oletetun polyproteiinin, joka oli kooditettu HCV:n cDNA-sekvenssissä, joka on esitetty kuviossa 16, hydrofiilisyys-/hydrofobisuusprofiilit ja antigeeninen indeksi määritettiin tietokoneanalyysillä. Hydrofiilisyyttä/hydrofobisuutta varten oleva ohjelma kuvattiin yllä. Antigeeninen indeksi on tulosta tietokoneohjelmasta, joka nojaa seuraaviin kriteereihin: 1) pintatodennäköisyys; 2) alfakierteisyyden ennustaminen kahdella eri menetelmällä; 3) betalamellialueiden ennustaminen kahdella eri menetelmällä; 4) U-käännösten ennustaminen kahdella eri menetelmällä; 5) hydrofiilisyys/hydrofobisuus; ja joustavuus. Tietokoneanalyysien profiilijäljet on esitetty kuviossa 20. Hydrofiilisyysprofiilissa merkitsee poikkeaminen abskissan yläpuolelle hydrofiilisyyttä ja abskissan alle merkitsee hydrofobisuutta. Sen todennäköisyyden, että polypeptidialue on antigeeninen, katsotaan yleensä lisääntyvän, kun tapahtuu poikkeama ylöspäin abskissasta hydrofiilisyys- ja/tai

antigeenisyysprofiilissa. Tulisi kuitenkin huomata, että nämä profiilit eivät välttämättä merkitse polypeptidin immunogeenisyyden voimakkuutta.

Yhteislineaaristen peptidien identifiointi HCV:ssä ja Flaviviruksissa

HCV:n cDNA:n sense-säikeeseen kooditetun oletetun polyproteiinin aminohapposekvenssiä verrattiin useiden Flaviviruksien jäsenien tunnettuihin aminohapposekvensseihin. Vertailu osoittaa, että homologia on vähäistä, mutta johtuen alueista, joista sitä löydettiin, se on mahdollisesti merkittävää. Säilyvät yhteislineaariset alueet on esitetty kuviossa 21. Alla luetelluissa aminohapponumeroissa sekvenssit edustavat numeroa oletetussa HCV-polyproteiinissa (Ks. kuvio 17).

Näiden säilyvien aiheiden väli on samanlainen Flaviviruksien ja HCV:n välillä ja merkitsee, että HCV:n ja näiden flavivirusaineiden välillä on jonkin verran samankaltaisuutta.

Seuraavat luetellut materiaalit on talletettu Budapest Treaty:n ehdoilla American Type Culture Collection'iin (ATCC), osoitteessa 12301 Parklawn Dr., Rockville, Maryland 20852, USA ja niille on annettu seuraavat talletusnumerot.

lambda-gt11	ATCC No.	Talletuspäivä
HCV:n cDNA-kirjasto	40394	01.12.1987
klooni 81	40388	17.11.1987
klooni 91	40389	17.11.1987
klooni 1-2	40390	17.11.1987
klooni 5-1-1	40391	18.11.1987
klooni 12f	40514	10.11.1988
klooni 35f	40511	10.11.1988
klooni 15e	40513	10.11.1988
klooni K9-1	40512	10.11.1988

JSC 308	20879	05.05.1988
pS356	67683	29.04.1988

Lisäksi tehtiin seuraavat talletukset 11.05.1989.

Kanta	Linkkerit	ATCC No.
D1210 (Cf1/5-1-1)	EF	67967
D1210 (Cf1/81)	EF	67968
D1210 (Cf1/CA74a)	EF	67969
D1210 (Cf1/35f)	AB	67970
D1210 (Cf1/279a)	EF	67971
D1210 (Cf1/C36)	CD	67972
D1210 (Cf1/13i)	AB	67973
D1210 (Cf1/C33b)	EF	67974
D1210 (Cf1/290a)	AB	67975
HB101 (AB24/C100 #3R)		67976

Seuraavat kannan D1210 johdannaiset talletettiin 03.05.1989.

Kannan johdannainen	ATCC No.
pCF1CS/C8f	67956
pCF1AB/C12f	67952
pCF1EF/14c	67949
pCF1EF/15e	67954
pCF1AB/C25c	67958
pCF1EF/C33c	67953
pCF1EF/C33f	67950
pCF1CD/33g	67951
pCF1CD/C39c	67955
pCF1EF/C40b	67957
pCF1EF/CA167b	67959

Seuraavat kannat talletettiin 12.05.1989.

Kanta	ATCC No.
Lambda gt11 (C35)	40603

Lambda gt10 (beta-5a)	40602
D1210 (C40b)	67980
D1210 (M16)	67981

Kun tätä vastaava hakemus on myönnetty patentiksi USA:ssa, poistetaan kaikki rajoitukset näiden talletusten saatavuudesta peruuttamattomasti; ja merkittyjen talletusten saanti on mahdollista tätä hakemusta vastaavan US-hakemuksen käsittelyn aikana sellaiselle, jolla patenttiviraston Commissioner katsoo olevan oikeuden siihen säännösten 37 CFR 1.14 ja 35 USC 1.22 nojalla. Lisäksi merkittyjä talletuksia ylläpidetään kolmenkymmenen (30) vuoden ajan talletuksen päivästä tai viisi (5) vuotta siitä, kun talletusta on viimeksi kysytty; tai vastaavan US-patentin voimassaoloajan, mikä niistä onkin pitempi. Tässä mainitut talletusmateriaalit ovat tarkoitettuja vain mukavuuden vuoksi, eikä niitä vaadita tämän keksinnön käytäntöön soveltamiseen tässä annetun selityksen valossa ja lisäksi nämä materiaalit liitetään mukaan tähän viitteeksi.

Teollinen käyttökelpoisuus

Keksinnöllä on, lukuisissa tässä esitetyissä ilmenemismuodoissaan, monia teollisia käyttöjä, joista muutamat ovat seuraavia. HCV:n cDNA:oita voidaan käyttää koettimien suunnitteluun HCV:n nukleiinihappojen osoittamiseeen näytteissä. cDNA:oista peräisin olevia koettimia voidaan käyttää HCV:n nukleiinihappojen osoittamiseen esimerkiksi kemiallisissa synteettisissä reaktioissa. Niitä voidaan käyttää myös seulontaohjelmissa antiviraalisia aineita varten, aineiden tehon määrittämiseen estämään virusreplikaatiota soluviljelyjärjestelmissä ja eläinmallijärjestelmissä. HCV-polynukleotidikoettimet ovat myös hyödyllisiä virusnukleiinihappojen osoittamisessa ihmisissä ja täten ne voivat toimia perusteena HCV-infektion diagnosoimiseksi ihmisissä.

Yllä olevan lisäksi tässä esitetyt cDNA:t antavat tietoa ja välineet HCV:n epitooppeja sisältävien polypeptidien syntetisoimiseksi. Nämä polypeptidit ovat hyödyllisiä osoitettaessa vasta-aineita HCV-antigeeneille. Tässä kuvataan sarja immunologisia analyysejä HCV-infektiolle perustuen yhdistelmäpolypeptideihin, jotka sisältävät HCV-epitooppeja ja ne ovat kaupallisesti käytettävissä diagnosoitaessa HCV:n aiheuttamaa NANBH:a, seulottaessa veripankkien luovuttajia HCV:n aiheuttaman tarttuvan maksatulehduksen varalta ja myös osoittamaan saastunut veri, joka tulee tartuttavista verenluovuttajista. Virusantigeeneillä on myös käyttöä tarkkailtaessa antiviraalisien aineiden tehoa eläinmallijärjestelmissä. Lisäksi tässä kuvatuilla HCV:n cDNA:oista peräisin olevilla polypeptideillä on käyttöä rokotteina HCV-infektioiden hoidossa.

HCV:n cDNA:oista peräisin olevat polypeptidit ovat käyttökelpoisia, yllä kuvattujen käyttöjen lisäksi, HCV:n vastaisten vasta-aineiden synnyttämiseksi. Täten niitä voidaan käyttää HCV:n vastaisina rokotteina. Kuitenkin vasta-aineet, jotka ovat syntyneet HCV-polypeptideillä tapahtuneen immunisoinnin seurauksena, ovat myös käyttökelpoisia osoitettaessa virusantigeenien läsnäolo näytteessä. Täten niitä voidaan käyttää HCV-polypeptidien tuotannon analysoimiseen kemiallisissa järjestelmissä. HCV:n vastaisia vasta-aineita voidaan käyttää myös tarkkailemaan virustenvastaisten aineiden tehoa seulontaohjelmissa, joissa näitä aineita testataan kudosviljelyjärjestelmissä. Niitä voidaan käyttää myös passiiviseen immunoterapiaan ja diagnosoimaan HCV:n aiheuttamaa NANBH:a sallimalla virusantigeenien osoittaminen sekä verenluovuttajissa että -vastaanottajissa. Toinen tärkeä käyttö HCV:n vastaisille vasta-aineille on affiniteettikromatografiassa viruksen ja viruspolypeptidien puhdistamiseksi. Puhdistettua virusta ja viruspolypeptidivalmisteita voidaan käyttää rokotteissa. Kuitenkin, puhdistettu virus voi olla myös hyödyllinen solu-

viljelyjärjestelmien kehittämisessä, joissa järjestelmissä HCV replikoituu.

Antisense-polynukleotideja voidaan käyttää virusreplikaation inhibiittoreina.

Mukavuuden vuoksi HCV:n vastaiset vasta-aineet ja HCV-polypeptidit, joko luonnolliset tai yhdistelmät, voidaan pakata välinepakkauksiin.

Patenttivaatimukset

1. Olennaisesti eristetty polypeptidi käytettäväksi *in vitro* HCV-vastaisten vasta-aineiden havaitsemiseksi, **tunnettu** siitä että se käsittää HCV-antigeenisen determinantin ja sisältää HCV-genomin koodaaman, kuvion 17 mukaisen sekvenssiin sisältyvän jatkuvan sekvenssin joka käsittää vähintään 8 aminohappoa, jolloin mainittu jatkuva aminohapposekvenssi on peräisin jonkin HCV-polyproteiinin aminohapoista 1-450 tai aminohapoista 2887-2955.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen polypeptidi, **tunnettu** siitä että jatkuva aminohapposekvenssi on valittu ryhmästä:

(a) HCV-aminohapot 1-84;
(b) HCV-aminohapot 9-177;
(c) HCV-aminohapot 1-120;
(d) HCV-aminohapot 2900-2950; tai
(e) jonkin kohdan a-d immunologisesti reaktiivisesta fragmentista.

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen polypeptidi, **tunnettu** siitä että jatkuva aminohapposekvenssi on immunologisesti reaktiivinen fragmentti joka on valittuna ryhmästä joka koostuu HCV-aminohapoista 1-50, 35-45, 50-100, 40-90, 65-75, 80-90, 99-120, 95-100, 100-150, 2910-2930 tai 2925-2950.

4. Olennaisesti eristetty polypeptidi käytettäväksi *in vitro* immunomäärityksessä, **tunnettu** siitä että polypeptidi käsittää HCV-polyproteiinista peräisin olevan vähintään 8 aminohapon sekvenssin ja käsittää HCV-epitooopin, jolloin mainittu jatkuva sekvenssi on valittu alla esitetystä ryhmästä missä jatkuva sekvenssi on merkitty AA_x-AA_y, ja x ja y merkitsevät aminohappojen numeroita kuvion 17 esittämässä HCV-polyproteiinissa:

AA1-AA50; AA1-AA84; AA9-AA177; AA50-AA100; AA40-AA90; AA65-AA75; AA99-AA120; AA95-AA110; AA100-AA150; AA150-AA200; AA200-AA250; AA220-AA240; AA245-AA265; AA250-AA300; AA290-AA330; AA290-AA305; AA300-AA350; AA310-AA330; AA350-AA400;

AA405-AA495; AA400-AA450; AA437-AA582; AA450-AA500; AA475-AA495; AA500-AA550; AA511-AA690; AA515-AA550; AA550-AA600; AA550-AA625; AA575-AA605; AA600-AA650; AA600-AA625; AA635-AA665; AA650-AA700; AA645-AA680; AA700-AA750; AA700-AA725; AA725-AA775; AA770-AA790; AA750-AA800; AA800-AA815; AA850-AA875; AA800-AA850; AA920-AA990; AA850-AA900; AA920-AA945; AA940-AA965; AA950-AA1000; AA1000-AA1060; AA1000-AA1050; AA1025-AA1040; AA1075-AA1175; AA1050-AA1200; AA1070-AA1100; AA1100-AA1140; AA1192-AA1457; AA1195-AA1250; AA1200-AA1225; AA1225-AA1250; AA1250-AA1300; AA1260-AA1310; AA1260-AA1280; AA1266-AA1428; AA1300-AA1350; AA1310-AA1340; AA1345-AA1405; AA1350-AA1400; AA1365-AA1380; AA1380-AA1405; AA1400-AA1450; AA1450-AA1500; AA1475-AA1515; AA1475-AA1500; AA1500-AA1550; AA1515-AA1550; AA1550-AA1600; AA1569-AA1931; AA1570-AA1590; AA1595-AA1610; AA1590-AA1650; AA1610-AA1645; AA1650-AA1690; AA1685-AA1770; AA1689-AA1805; AA1690-AA1720; AA1694-AA1735; AA1720-AA1745; AA1745-AA1770; AA1750-AA1800; AA1775-AA1810; AA1795-AA1850; AA1850-AA1900; AA1900-AA1950; AA1900-AA1920; AA1916-AA2021; AA1920-AA1940; AA1949-AA2124; AA1950-AA2000; AA1950-AA1985; AA2000-AA2050; AA2020-AA2045; AA2045-AA2100; AA2045-AA2070; AA2054-AA2223; AA2070-AA2100; AA2100-AA2150; AA2150-AA2200; AA2200-AA2325; AA2250-AA2330; AA2265-AA2280; AA2280-AA2290; AA2287-AA2385; AA2300-AA2350; AA2350-AA2400; AA2345-AA2415; AA2345-AA2375; AA2348-AA2464; AA2370-AA2410; AA2400-AA2450; AA2400-AA2425; AA2415-AA2450; AA2445-AA2500; AA2371-AA2502; AA2500-AA2550; AA2505-AA2540; AA2550-AA2600; AA2560-AA2580; AA2600-AA2650; AA2620-AA2650; AA2650-AA2700; AA2655-AA2670; AA2670-AA2700; AA2700-AA2750; AA2750-AA2800; AA2755-AA2780; AA2780-AA2830; AA2785-AA2810; AA2796-AA2886; AA2810-AA2825; AA2800-AA2850; AA2850-AA2900; AA2900-AA2950; AA2910-AA2930; AA2925-AA2950; ja AA2945-loppuun (C'-pää).

5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen, olennaisesti eristetty polypeptidi, **tunnettu** siitä että jatkuva sekvenssi on valittu alla esitetystä ryhmästä missä jatkuva sekvenssi on merkitty AA_x-AA_y, ja x ja y merkitsevät aminohappojen numeroita kuvion 17 esittämässä HCV-polyproteiinissa:

AA1-AA50; AA1-AA84; AA9-AA177; AA50-AA100; AA40-AA90; AA65-AA75; AA99-AA120; AA95-AA110; AA100-AA150; AA150-AA200; AA200-AA250; AA220-AA240; AA245-AA265; AA250-AA300; AA290-AA330; AA290-AA305; AA300-AA350; AA310-AA330; AA350-AA400; AA400-AA450; AA2900-AA2950; AA2910-AA2930; AA2925-AA2950; ja AA2945-loppuun (C'-pää).

6. Patenttivaatimuksen 4 mukainen, olennaisesti eristetty polypeptidi, **tunnettu** siitä että jatkuva sekvenssi on valittu alla esitetystä ryhmästä missä jatkuva sekvenssi on merkitty

AA_x-AA_y, ja x ja y merkitsevät aminohappojen numeroita kuvion 17 esittämässä HCV-polyproteiinissa:

AA405-AA495; AA437-AA582; AA450-AA500; ja AA2850-AA2900.

7. Jonkin patenttivaatimuksista 1-4 mukainen polypeptidi, **tunnettu** siitä että jatkuva sekvenssi on vähintään 10 aminohapon pituinen.

8. Jonkin patenttivaatimuksista 1-4 mukainen polypeptidi, **tunnettu** siitä että jatkuva sekvenssi on vähintään 15 aminohapon pituinen.

9. Immunomäärityksen välinepakkaus, **tunnettu** siitä että se käsittää jonkin patenttivaatimuksen 1-8 mukaista polypeptidiä sopivassa astiassa.

10. Immunomääritysmenetelmä HCV-vastaisten vasta-aineiden (anti-HCV-vasta-aineiden) toteamiseksi, **tunnettu** siitä että se käsittää seuraavat vaiheet:

(a) otetaan käyttöön polypeptidi joka käsittää antigeenisen determinantin jota mainittu anti-HCV-vasta-aine kykenee sitomaan, jossa mainittu antigeeninen determinantti käsittää HCV-genomin koodaaman, kuviosta 17 ilmenevän ainakin 8 aminohapon jatuvan sekvenssin joka on peräisin HCV-polyproteiinin aminohapoista 1-450 tai 2887-2955;

(b) inkuboidaan biologinen näyte *in vitro* mainitun polypeptidin kanssa olosuhteissa jotka mahdollistavat vasta-aine - antigeeni - kompleksin muodostumisen; ja

(c) määritetään, muodostuuko mainittua polypeptidiä sisältävää vasta-aine - antigeeni - kompleksia.

11. Patenttivaatimuksen 10 mukainen immunomääritysmenetelmä, **tunnettu** siitä että mainittu jatkuva aminohapposekvenssi on valittu ryhmästä

(a) HCV-aminohapot 1-84;

(b) HCV-aminohapot 9-177;

(c) HCV-aminohapot 1-120;

(d) HCV-aminohapot 2900-2950; tai

(e) jonkin kohdan a-d immunologisesti reaktiivisesta fragmentista.

12. Patenttivaatimuksen 10 tai 11 mukainen immunomääritysmenetelmä, **tunnettu** siitä että jatkuva aminohapposekvenssi on immunologisesti reaktiivinen fragmentti joka on valittuna ryhmästä joka koostuu HCV-aminohapoista 1-50, 35-45, 50-100, 40-90, 65-75, 80-90, 99-120, 95-100, 100-150, 2910-2930 tai 2925-2950.

13. Immunomääritysmenetelmä HCV-vastaisten vasta-aineiden (anti-HCV-vasta-aineiden) toteamiseksi, **tunnettu** siitä että se käsittää seuraavat vaiheet:

(a) otetaan käyttöön polypeptidi joka käsittää antigeenisen determinantin jota mainittu anti-HCV-vasta-aine kykenee sitomaan, jossa mainittu antigeeninen determinantti käsittää HCV-genomin koodaaman, ainakin 8 aminohapon jatkuvan sekvenssin;

(b) inkuboidaan biologinen näyte *in vitro* mainitun polypeptidin kanssa olosuhteissa jotka mahdollistavat vasta-aine - antigeeni - kompleksin muodostumisen; ja

(c) määritetään, muodostuuko mainittua polypeptidiä sisältävää vasta-aine - antigeeni - kompleksia;

jossa mainittu jatkuva aminohapposekvenssi on valittu alla esitetystä ryhmästä missä jatkuva sekvenssi on merkitty AA_x-AA_y, ja x ja y merkitsevät aminohappojen numeroita kuvion 17 esittämässä HCV-polyproteiinissa:

AA1-AA50; AA1-AA84; AA9-AA177; AA50-AA100; AA40-AA90; AA65-AA75; AA99-AA120; AA95-AA110; AA100-AA150; AA150-

AA200; AA200-AA250; AA220-AA240; AA245-AA265; AA250-AA300; AA290-AA330; AA290-AA305; AA300-AA350; AA310-AA330; AA350-AA400; AA405-AA495; AA400-AA450; AA437-AA582; AA450-AA500; AA475-AA495; AA500-AA550; AA511-AA690; AA515-AA550; AA550-AA600; AA550-AA625; AA575-AA605; AA600-AA650; AA600-AA625; AA635-AA665; AA650-AA700; AA645-AA680; AA700-AA750; AA700-AA725; AA725-AA775; AA770-AA790; AA750-AA800; AA800-AA815; AA850-AA875; AA800-AA850; AA920-AA990; AA850-AA900; AA920-AA945; AA940-AA965; AA950-AA1000; AA1000-AA1060; AA1000-AA1050; AA1025-AA1040; AA1075-AA1175; AA1050-AA1200; AA1070-AA1100; AA1100-AA1140; AA1192-AA1457; AA1195-AA1250; AA1200-AA1225; AA1225-AA1250; AA1250-AA1300; AA1260-AA1310; AA1260-AA1280; AA1266-AA1428; AA1300-AA1350; AA1310-AA1340; AA1345-AA1405; AA1350-AA1400; AA1365-AA1380; AA1380-AA1405; AA1400-AA1450; AA1450-AA1500; AA1475-AA1515; AA1475-AA1500; AA1500-AA1550; AA1515-AA1550; AA1550-AA1600; AA1569-AA1931; AA1570-AA1590; AA1595-AA1610; AA1590-AA1650; AA1610-AA1645; AA1650-AA1690; AA1685-AA1770; AA1689-AA1805; AA1690-AA1720; AA1694-AA1735; AA1720-AA1745; AA1745-AA1770; AA1750-AA1800; AA1775-AA1810; AA1795-AA1850; AA1850-AA1900; AA1900-AA1950; AA1900-AA1920; AA1916-AA2021; AA1920-AA1940; AA1949-AA2124; AA1950-AA2000; AA1950-AA1985; AA2000-AA2050; AA2020-AA2045; AA2045-AA2100; AA2045-AA2070; AA2054-AA2223; AA2070-AA2100; AA2100-AA2150; AA2150-AA2200; AA2200-AA2325; AA2250-AA2330; AA2265-AA2280; AA2280-AA2290; AA2287-AA2385; AA2300-AA2350; AA2350-AA2400; AA2345-AA2415; AA2345-AA2375; AA2348-AA2464; AA2370-AA2410; AA2400-AA2450; AA2400-AA2425; AA2415-AA2450; AA2445-AA2500; AA2371-AA2502; AA2500-AA2550; AA2505-AA2540; AA2550-AA2600; AA2560-AA2580; AA2600-AA2650; AA2620-AA2650; AA2650-AA2700; AA2655-AA2670; AA2670-AA2700; AA2700-AA2750; AA2750-AA2800; AA2755-AA2780; AA2780-AA2830; AA2785-AA2810; AA2796-AA2886; AA2810-AA2825; AA2800-AA2850; AA2850-AA2900; AA2900-AA2950; AA2910-AA2930; AA2925-AA2950; ja AA2945-loppuun (C' -pää).

14. Patenttivaatimuksen 13 mukainen immunomääritysmenetelmä, **tunnettu** siitä että jatkuva sekvenssi on valittu alla esitetystä ryhmästä missä jatkuva sekvenssi on merkitty AA_x-AA_y, ja x ja y merkitsevät aminohappojen numeroita kuvion 17 esittämässä HCV-polyproteiinissa:

AA1-AA50; AA1-AA84; AA9-AA177; AA50-AA100; AA40-AA90; AA65-AA75; AA99-AA120; AA95-AA110; AA100-AA150; AA150-AA200; AA200-AA250; AA220-AA240; AA245-AA265; AA250-AA300; AA290-AA330; AA290-AA305; AA300-AA350; AA310-AA330; AA350-AA400; AA400-AA450; AA2900-AA2950; AA2910-AA2930;AA2925-AA2950; ja AA2945- loppuun (C' -pää).

15. Patenttivaatimuksen 13 mukainen immunomääritysmenetelmä, **tunnettu** siitä että jatkuva sekvenssi on valittu alla esitetystä ryhmästä missä jatkuva sekvenssi on merkitty AA_x-AA_y, ja x ja y merkitsevät aminohappojen numeroita kuvion 17 esittämässä HCV-polyproteiinissa:

AA405-AA495; AA437-AA582; AA450-AA500; ja AA2850-AA2900.

16. Vasta-ainekoostumus, **tunnettu** siitä että se on HCV-vasta-ainekoostumus joka käsittää vasta-aineita jotka sitoutuvat HCV-antigeeniseen determinanttiin jonkin patenttivaatimuksen 1-8 mukaisessa polypeptidissä ja missä HCV-antigeeninen determinantti on (a) puhdistettu polyklonaalisten vasta-aineiden valmiste tai (b) monoklonaalisten vasta-aineiden valmiste.

17. Patenttivaatimuksen 16 mukainen koostumus, **tunnettu** siitä että anti-HCV-vasta-aineet on sidottu kiinteään faasiin.

18. Immunomäärityksen välinepakkaus, **tunnettu** siitä että se käsittää patenttivaatimuksen 16 tai 17 mukaista anti-HCV-vasta-ainetta sopivassa astiassa.

19. Jonkin patenttivaatimuksista 1-8 mukaisten polypeptidien käyttö infektioriskin aiheuttavan HCV:n poistamiseksi verituotteiden lähteestä.

20. Olennaisesti eristetty polypeptidi käytettäväksi valmistettaessa patenttivaatimuksen 16 mukaista anti-HCV-vasta-ainetta, **tunnettu** siitä että se käsittää HCV-antigeenisen determinantin ja sisältää HCV-genomin koodaaman, ainakin 8 aminohapon jatkuvan sekvenssin, jolloin mainittu 8 aminohapon jatkuva sekvenssi on peräisin HCV-polyproteiinin aminohapoista 1-450 tai 2887-2955.

21. Olennaisesti eristetty polypeptidi käytettäväksi valmistettaessa patenttivaatimuksen 20 mukaista anti-HCV-

vasta-ainetta, **tunnettu** siitä että se käsittää ainakin 8 aminohapon jatkuvan sekvenssin HCV-polyproteiinista ja sisältää HCV-epitoopin, jolloin mainittu jatkuva sekvenssi on valittu alla esitetystä ryhmästä missä jatkuva sekvenssi on merkitty AA_x-AA_y, ja x ja y merkitsevät aminohappojen numeroita kuvion 17 esittämässä HCV-polyproteiinissa:

AA1-AA50; AA1-AA84; AA9-AA177; AA50-AA100; AA40-AA90; AA65-AA75; AA99-AA120; AA95-AA110; AA100-AA150; AA150-AA200; AA200-AA250; AA220-AA240; AA245-AA265; AA250-AA300; AA290-AA330; AA290-AA305; AA300-AA350; AA310-AA330; AA350-AA400; AA405-AA495; AA400-AA450; AA437-AA582; AA450-AA500; AA475-AA495; AA500-AA550; AA511-AA690; AA515-AA550; AA550-AA600; AA550-AA625; AA575-AA605; AA600-AA650; AA600-AA625; AA635-AA665; AA650-AA700; AA645-AA680; AA700-AA750; AA700-AA725; AA725-AA775; AA770-AA790; AA750-AA800; AA800-AA815; AA850-AA875; AA800-AA850; AA920-AA990; AA850-AA900; AA920-AA945; AA940-AA965; AA950-AA1000; AA1000-AA1060; AA1000-AA1050; AA1025-AA1040; AA1075-AA1175; AA1050-AA1200; AA1070-AA1100; AA1100-AA1140; AA1192-AA1457; AA1195-AA1250; AA1200-AA1225; AA1225-AA1250; AA1250-AA1300; AA1260-AA1310; AA1260-AA1280; AA1266-AA1428; AA1300-AA1350; AA1310-AA1340; AA1345-AA1405; AA1350-AA1400; AA1365-AA1380; AA1380-AA1405; AA1400-AA1450; AA1450-AA1500; AA1475-AA1515; AA1475-AA1500; AA1500-AA1550; AA1515-AA1550; AA1550-AA1600; AA1569-AA1931; AA1570-AA1590; AA1595-AA1610; AA1590-AA1650; AA1610-AA1645; AA1650-AA1690; AA1685-AA1770; AA1689-AA1805; AA1690-AA1720; AA1694-AA1735; AA1720-AA1745; AA1745-AA1770; AA1750-AA1800; AA1775-AA1810; AA1795-AA1850; AA1850-AA1900; AA1900-AA1950; AA1900-AA1920; AA1916-AA2021; AA1920-AA1940; AA1949-AA2124; AA1950-AA2000; AA1950-AA1985; AA2000-AA2050; AA2020-AA2045; AA2045-AA2100; AA2045-AA2070; AA2054-AA2223; AA2070-AA2100; AA2100-AA2150; AA2150-AA2200; AA2200-AA2325; AA2250-AA2330; AA2265-AA2280; AA2280-AA2290; AA2287-AA2385; AA2300-AA2350; AA2350-AA2400; AA2345-AA2415; AA2345-AA2375; AA2348-AA2464; AA2370-AA2410; AA2400-AA2450; AA2400-AA2425; AA2415-AA2450; AA2445-AA2500; AA2371-AA2502; AA2500-AA2550; AA2505-AA2540; AA2550-AA2600; AA2560-AA2580; AA2600-AA2650; AA2620-AA2650; AA2650-AA2700; AA2655-AA2670; AA2670-AA2700; AA2700-AA2750; AA2750-AA2800; AA2755-AA2780; AA2780-AA2830; AA2785-AA2810; AA2796-AA2886; AA2810-AA2825; AA2800-AA2850; AA2850-AA2900; AA2900-AA2950; AA2910-AA2930; AA2925-AA2950; ja AA2945 - loppuun (C' -pää).

22. Patenttivaatimuksen 21 mukainen, olennaisesti eristetty polypeptidi, **tunnettu** siitä että jatkuva sekvenssi on valittu alla esitetystä ryhmästä missä jatkuva sekvenssi on merkitty

AA_x-AA_y, ja x ja y merkitsevät aminohappojen numeroita kuvion 17 esittämässä HCV-polyproteiinissa:

AA1-AA50; AA1-AA84; AA9-AA177; AA50-AA100; AA40-AA90; AA65-AA75; AA99-AA120; AA95-AA110; AA100-AA150; AA150-AA200; AA200-AA250; AA220-AA240; AA245-AA265; AA250-AA300; AA290-AA330; AA290-AA305; AA300-AA350; AA310-AA330; AA350-AA400; AA400-AA450; AA2900-AA2950; AA2910-AA2930; AA2925-AA2950; ja AA2945-loppuun (C'-pää).

23. Patenttivaatimuksen 20 mukainen, olennaisesti eristetty polypeptidi, **tunnettu** siitä että jatkuva sekvenssi on valittu alla esitetystä ryhmästä missä jatkuva sekvenssi on merkitty AA_x-AA_y, ja x ja y merkitsevät aminohappojen numeroita kuvion 17 esittämässä HCV-polyproteiinissa:

AA405-AA495; AA437-AA582; AA450-AA500; ja AA2850-AA2900.

Patentkrav

1. En väsentligen isolerad polypeptid att användas för *in vitro* konstaterande av antikroppar mot HCV, **kännetecknad** därav att den omfattar en HCV-antigen determinant och innehåller en minst 8 aminosyror omfattande kontinuerlig sekvens kodad av HCV-genomet och ingående i sekvensen enligt fig. 17, varvid nämnda kontinuerliga aminosyrasekvens härstammar från aminosyrorna 1-450 eller 2887-2955 i HCV-polyproteinet.

2. Polypeptid enligt patentkrav 1, **kännetecknad** därav att den kontinuerliga aminosyrasekvensen är vald ur gruppen

(a) HCV-aminosyrorna 1-84;
(b) HCV-aminosyrorna 9-177;
(c) HCV- aminosyrorna 1-120;
(d) HCV- aminosyrorna 2900-2950; eller
(e) ett immunologiskt reaktivt fragment enligt någon av punkterna a-d.

3. Polypeptid enligt något av patentkrav 1 eller 2, **kännetecknad** därav att den kontinuerliga aminosyrasekvensen är ett immunologiskt reaktivt fragment valt ur gruppen bestående av HCV-aminosyrorna 1-50, 35-45, 50-100, 40-90, 65-75, 80-90, 99-120, 95-100, 100-150, 2910-2930 eller 2925-2950.

4. En väsentligen isolerad polypeptid för användning i *in vitro* immunbestämningar, **kännetecknad** därav att polypeptiden omfattar en sekvens om minst 8 aminosyror från ett HCV-polyprotein och omfattar en HCV-epitop, varvid nämnda kontinuerliga sekvens är vald ur gruppen nedan vari den kontinuerliga sekvensen är betecknad AA_x-AA_y, och x och y betecknar aminosyrors ordningstal i HCV-polyproteinet enligt figur 17:

AA1-AA50; AA1-AA84; AA9-AA177; AA50-AA100; AA40-AA90; AA65-AA75; AA99-AA120; AA95-AA110; AA100-AA150; AA150-AA200; AA200-AA250; AA220-AA240; AA245-AA265; AA250-AA300; AA290-AA330; AA290-AA305; AA300-AA350; AA310-AA330; AA350-AA400; AA405-AA495; AA400-AA450; AA437-AA582; AA450-AA500; AA475-AA495; AA500-AA550; AA511-AA690; AA515-AA550; AA550-AA600; AA550-AA625; AA575-AA605; AA600-AA650; AA600-AA625; AA635-AA665; AA650-AA700; AA645-AA680; AA700-AA750; AA700-AA725; AA725-AA775; AA770-AA790; AA750-AA800; AA800-AA815; AA850-AA875; AA800-AA850; AA920-AA990; AA850-AA900; AA920-AA945; AA940-AA965; AA950-AA1000; AA1000-AA1060; AA1000-AA1050; AA1025-AA1040; AA1075-AA1175; AA1050-AA1200; AA1070-AA1100; AA1100-AA1140; AA1192-AA1457; AA1195-AA1250; AA1200-AA1225; AA1225-AA1250; AA1250-AA1300; AA1260-AA1310; AA1260-AA1280; AA1266-AA1428; AA1300-AA1350; AA1310-AA1340; AA1345-AA1405; AA1350-AA1400; AA1365-AA1380; AA1380-AA1405; AA1400-AA1450; AA1450-AA1500; AA1475-AA1515; AA1475-AA1500; AA1500-AA1550; AA1515-AA1550; AA1550-AA1600; AA1569-AA1931; AA1570-AA1590; AA1595-AA1610; AA1590-AA1650; AA1610-AA1645; AA1650-AA1690; AA1685-AA1770; AA1689-AA1805; AA1690-AA1720; AA1694-AA1735; AA1720-AA1745; AA1745-AA1770; AA1750-AA1800; AA1775-AA1810; AA1795-AA1850; AA1850-AA1900; AA1900-AA1950; AA1900-AA1920; AA1916-AA2021; AA1920-AA1940; AA1949-AA2124; AA1950-AA2000; AA1950-AA1985; AA2000-AA2050; AA2020-AA2045; AA2045-AA2100; AA2045-AA2070; AA2054-AA2223; AA2070-AA2100; AA2100-AA2150; AA2150-AA2200; AA2200-AA2325; AA2250-AA2330; AA2265-AA2280; AA2280-AA2290; AA2287-AA2385; AA2300-AA2350; AA2350-AA2400; AA2345-AA2415; AA2345-AA2375; AA2348-AA2464; AA2370-AA2410; AA2400-AA2450; AA2400-AA2425; AA2415-AA2450; AA2445-AA2500; AA2371-AA2502; AA2500-AA2550; AA2505-AA2540; AA2550-AA2600; AA2560-AA2580; AA2600-AA2650; AA2620-AA2650; AA2650-AA2700; AA2655-AA2670; AA2670-AA2700; AA2700-AA2750; AA2750-AA2800; AA2755-AA2780; AA2780-AA2830; AA2785-AA2810; AA2796-AA2886;

AA2810-AA2825; AA2800-AA2850; AA2850-AA2900; AA2900-AA2950; AA2910-AA2930; AA2925-AA2950; och AA2945-slutet (C'-änden).

5. En väsentligen isolerad polypeptid enligt patentkrav 4, **kännetecknad** därav att den kontinuerliga sekvensen är vald ur gruppen nedan, vari den kontinuerliga sekvensen är betecknad AA_x-AA_y, och x och y betecknar aminosyrors ordningstal i HCV-polyproteinet enligt figur 17:
AA1-AA50; AA1-AA84; AA9-AA177; AA50-AA100; AA40-AA90; AA65-AA75; AA99-AA120; AA95-AA110; AA100-AA150; AA150-AA200; AA200-AA250; AA220-AA240; AA245-AA265; AA250-AA300; AA290-AA330; AA290-AA305; AA300-AA350; AA310-AA330; AA350-AA400; AA400-AA450; AA2900-AA2950; AA2910-AA2930; AA2925-AA2950; och AA2945-slutet (C'-änden).

6. En väsentligen isolerad polypeptid enligt patentkrav 4, **kännetecknad** därav att den kontinuerliga sekvensen är vald ur gruppen nedan, vari den kontinuerliga sekvensen är betecknad AA_x-AA_y, och x och y betecknar aminosyrors ordningstal i ett HCV-polyprotein enligt figur 17:
AA405-AA495; AA437-AA582; AA450-AA500; och AA2850-AA2900.

7. En väsentligen isolerad polypeptid enligt något av patentkrav 1-4, **kännetecknad** därav att den kontinuerliga sekvensens längd är minst 10 aminosyror.

8. En väsentligen isolerad polypeptid enligt något av patentkrav 1-4, **kännetecknad** därav att den kontinuerliga sekvensens längd är minst 15 aminosyror.

9. Redskapsförpackning för immunbestämning, **kännetecknad** därav att den omfattar polypeptid enligt något av patentkrav 1-8 i ett lämpligt kärl.

10. Immunbestämningsmetod för konstaterande av antikroppar mot HCV (anti-HCV-antikroppar), **kännetecknad** därav att den omfattar följande steg:

(a) en polypeptid tas i bruk, vilken omfattar en antigen determinant vilket nämnda anti-HCV-antikroppar kan binda, varvid sagda antigena determinant omfattar en kontinuerlig sekvens om minst 8 aminosyror kodad av HCV-genomet, framgående i figur 17 och härstammande från aminosyrorna 1-450 eller 2887-2955 i ett HCV-polyprotein;

(b) ett biologiskt prov inkuberas *in vitro* med nämnda polypeptid i förhållanden som möjliggör uppkomst av ett antikropp-antigen-komplex; och

(c) en bestämning görs huruvida sagda antikropp-antigen-komplex uppstår.

11. Immunbestämningsmetod enligt patentkrav 10, **kännetecknad** därav att nämnda kontinuerliga aminosyrasekvens är vald ur gruppen

(a) HCV-aminosyrorna 1-84;
(b) HCV-aminosyrorna 9-177;
(c) HCV- aminosyrorna 1-120;
(d) HCV- aminosyrorna 2900-2950; eller
(e) ett immunologiskt reaktivt fragment enligt någon av punkterna a-d.

12. Immunbestämningsmetod enligt patentkrav 10 eller 11, **kännetecknad** därav att den kontinuerliga aminosyrasekvensen är ett immunologiskt reaktivt fragment vald ur gruppen bestående av HCV-aminosyrorna 1-50, 35-45, 50-100, 40-90, 65-75, 80-90, 99-120, 95-100, 100-150, 2910-2930 eller 2925-2950.

13. Immunbestämningsmetod för konstaterande av antikroppar mot HCV (anti-HCV-antikroppar), **kännetecknad** därav att den omfattar följande steg:

(a) en polypeptid tas i bruk, vilken omfattar en antigen determinant som nämnda anti-HCV-antikroppar kan binda, varvid sagda antigena determinant omfattar en kontinuerlig sekvens om minst 8 aminosyror kodad av HCV-genomet;

(b) ett biologiskt prov inkuberas *in vitro* med nämnda polypeptid i förhållanden som möjliggör uppkomst av ett antikropp-antigen-komplex; och

(c) en bestämning görs huruvida sagda antikropp-antigen-komplex uppstår;

varvid nämnda kontinuerliga aminosyrasekvens är vald ur gruppen nedan, vari den kontinuerliga sekvensen är betecknad AA_x-AA_y, och x och y betecknar aminosyrors ordningstal i ett HCV-polyprotein enligt figur 17:

AA1-AA50; AA1-AA84; AA9-AA177; AA50-AA100; AA40-AA90; AA65-AA75; AA99-AA120; AA95-AA110; AA100-AA150; AA150-AA200; AA200-AA250; AA220-AA240; AA245-AA265; AA250-AA300; AA290-AA330; AA290-AA305; AA300-AA350; AA310-AA330; AA350-AA400; AA405-AA495; AA400-AA450; AA437-AA582; AA450-AA500; AA475-AA495; AA500-AA550; AA511-AA690; AA515-AA550; AA550-AA600; AA550-AA625; AA575-AA605; AA600-AA650; AA600-AA625; AA635-AA665; AA650-AA700; AA645-AA680; AA700-AA750; AA700-AA725; AA725-AA775; AA770-AA790; AA750-AA800; AA800-AA815; AA850-AA875; AA800-AA850; AA920-AA990; AA850-AA900; AA920-AA945; AA940-AA965; AA950-AA1000; AA1000-AA1060; AA1000-AA1050; AA1025-AA1040; AA1075-AA1175; AA1050-AA1200; AA1070-AA1100; AA1100-AA1140; AA1192-AA1457; AA1195-AA1250; AA1200-AA1225; AA1225-AA1250; AA1250-AA1300; AA1260-AA1310; AA1260-AA1280; AA1266-AA1428; AA1300-AA1350; AA1310-AA1340; AA1345-AA1405; AA1350-AA1400; AA1365-AA1380; AA1380-AA1405; AA1400-AA1450; AA1450-AA1500; AA1475-AA1515; AA1475-AA1500; AA1500-AA1550; AA1515-AA1550; AA1550-AA1600; AA1569-AA1931; AA1570-AA1590; AA1595-AA1610; AA1590-AA1650; AA1610-AA1645; AA1650-AA1690; AA1685-AA1770; AA1689-AA1805; AA1690-

AA1720; AA1694-AA1735; AA1720-AA1745; AA1745-AA1770; AA1750-AA1800; AA1775-AA1810; AA1795-AA1850; AA1850-AA1900; AA1900-AA1950; AA1900-AA1920; AA1916-AA2021; AA1920-AA1940; AA1949-AA2124; AA1950-AA2000; AA1950-AA1985; AA2000-AA2050; AA2020-AA2045; AA2045-AA2100; AA2045-AA2070; AA2054-AA2223; AA2070-AA2100; AA2100-AA2150; AA2150-AA2200; AA2200-AA2325; AA2250-AA2330; AA2265-AA2280; AA2280-AA2290; AA2287-AA2385; AA2300-AA2350; AA2350-AA2400; AA2345-AA2415; AA2345-AA2375; AA2348-AA2464; AA2370-AA2410; AA2400-AA2450; AA2400-AA2425; AA2415-AA2450; AA2445-AA2500; AA2371-AA2502; AA2500-AA2550; AA2505-AA2540; AA2550-AA2600; AA2560-AA2580; AA2600-AA2650; AA2620-AA2650; AA2650-AA2700; AA2655-AA2670; AA2670-AA2700; AA2700-AA2750; AA2750-AA2800; AA2755-AA2780; AA2780-AA2830; AA2785-AA2810; AA2796-AA2886; AA2810-AA2825; AA2800-AA2850; AA2850-AA2900; AA2900-AA2950; AA2910-AA2930; AA2925-AA2950; och AA2945-slutet (C' -änden).

14. Immunbestämningsmetod enligt patentkrav 13, **kännetecknad** därav att den kontinuerliga aminosyrasekvensen är vald ur gruppen nedan, vari den kontinuerliga sekvensen är betecknad AA_x-AA_y, och x och y betecknar aminosyrors ordningstal i ett HCV-polyprotein enligt figur 17:

AA1-AA50; AA1-AA84; AA9-AA177; AA50-AA100; AA40-AA90; AA65-AA75; AA99-AA120; AA95-AA110; AA100-AA150; AA150-AA200; AA200-AA250; AA220-AA240; AA245-AA265; AA250-AA300; AA290-AA330; AA290-AA305; AA300-AA350; AA310-AA330; AA350-AA400; AA400-AA450; AA2900-AA2950; AA2910-AA2930;AA2925-AA2950; och AA2945- slutet (C' -änden).

15. Immunbestämningsmetod enligt patentkrav 13, **kännetecknad** därav att den kontinuerliga aminosyrasekvensen är vald ur gruppen nedan, vari den kontinuerliga sekvensen är betecknad AA_x-AA_y, och x och y betecknar aminosyrors ordningstal i ett HCV-polyprotein enligt figur 17:

AA405-AA495; AA437-AA582; AA450-AA500; och AA2850-AA2900.

16. Antikroppkomposition, **kännetecknad** därav att den är en HCV-antikroppkomposition som omfattar antikroppar vilka binds till en HCV-antigen determinant i en polypeptid enligt något av patentkrav 1-8, och i vilken den HCV-antigena

determinanten är (a) en renad produkt av polyklonala antikroppar, (b) en produkt av monoklonala antikroppar.

17. Komposition enligt patentkrav 16, , **kännetecknad** därav att anti-HCV-antikropparna är bundna till en fast fas.

18. Redskapsförpackning för immunbestämning, **kännetecknad** därav att den omfattar anti-HCV-antikroppar enligt patentkrav 16 eller 17 i ett lämpligt kärl.

19. Användning av polypeptider enligt något av patentkrav 1-8 för att avlägsna HCV utgörande en infektionsrisk från en källa till blodprodukter.

20. En väsentligen isolerad polypeptid för användning vid framställning av anti-HCV-antikroppar enligt patentkrav 16, **kännetecknad** därav att den omfattar en HCV-antigen determinant och innehåller en minst 8 aminosyror omfattande kontinuerlig sekvens varvid nämnda kontinuerliga sekvens om 8 aminosyror härstammar från aminosyrorna 1-450 eller 2887-2955 i ett HCV-polyprotein.

21. En väsentligen isolerad polypeptid för användning vid framställning av anti-HCV-antikroppar enligt patentkrav 20, **kännetecknad** därav att omfattar en sekvens om minst 8 aminosyror från ett HCV-polyprotein och omfattar en HCV-epitop, varvid nämnda kontinuerliga sekvens är vald ur gruppen nedan vari den kontinuerliga sekvensen är betecknad AA_x-AA_y, och x och y betecknar aminosyrors ordningstal i ett HCV-polyprotein enligt figur 17:

AA1-AA50; AA1-AA84; AA9-AA177; AA50-AA100; AA40-AA90; AA65-AA75; AA99-AA120; AA95-AA110; AA100-AA150; AA150-AA200; AA200-AA250; AA220-AA240; AA245-AA265; AA250-AA300; AA290-AA330; AA290-AA305; AA300-AA350; AA310-AA330; AA350-AA400; AA405-AA495; AA400-AA450; AA437-AA582; AA450-AA500; AA475-AA495; AA500-AA550; AA511-AA690; AA515-AA550; AA550-AA600; AA550-AA625; AA575-AA605; AA600-AA650; AA600-AA625; AA635-AA665; AA650-AA700; AA645-AA680; AA700-AA750; AA700-AA725; AA725-AA775; AA770-AA790; AA750-AA800; AA800-AA815; AA850-

AA875; AA800-AA850; AA920-AA990; AA850-AA900; AA920-AA945; AA940-AA965; AA950-AA1000; AA1000-AA1060; AA1000-AA1050; AA1025-AA1040; AA1075-AA1175; AA1050-AA1200; AA1070-AA1100; AA1100-AA1140; AA1192-AA1457; AA1195-AA1250; AA1200-AA1225; AA1225-AA1250; AA1250-AA1300; AA1260-AA1310; AA1260-AA1280; AA1266-AA1428; AA1300-AA1350; AA1310-AA1340; AA1345-AA1405; AA1350-AA1400; AA1365-AA1380; AA1380-AA1405; AA1400-AA1450; AA1450-AA1500; AA1475-AA1515; AA1475-AA1500; AA1500-AA1550; AA1515-AA1550; AA1550-AA1600; AA1569-AA1931; AA1570-AA1590; AA1595-AA1610; AA1590-AA1650; AA1610-AA1645; AA1650-AA1690; AA1685-AA1770; AA1689-AA1805; AA1690-AA1720; AA1694-AA1735; AA1720-AA1745; AA1745-AA1770; AA1750-AA1800; AA1775-AA1810; AA1795-AA1850; AA1850-AA1900; AA1900-AA1950; AA1900-AA1920; AA1916-AA2021; AA1920-AA1940; AA1949-AA2124; AA1950-AA2000; AA1950-AA1985; AA2000-AA2050; AA2020-AA2045; AA2045-AA2100; AA2045-AA2070; AA2054-AA2223; AA2070-AA2100; AA2100-AA2150; AA2150-AA2200; AA2200-AA2325; AA2250-AA2330; AA2265-AA2280; AA2280-AA2290; AA2287-AA2385; AA2300-AA2350; AA2350-AA2400; AA2345-AA2415; AA2345-AA2375; AA2348-AA2464; AA2370-AA2410; AA2400-AA2450; AA2400-AA2425; AA2415-AA2450; AA2445-AA2500; AA2371-AA2502; AA2500-AA2550; AA2505-AA2540; AA2550-AA2600; AA2560-AA2580; AA2600-AA2650; AA2620-AA2650; AA2650-AA2700; AA2655-AA2670; AA2670-AA2700; AA2700-AA2750; AA2750-AA2800; AA2755-AA2780; AA2780-AA2830; AA2785-AA2810; AA2796-AA2886; AA2810-AA2825; AA2800-AA2850; AA2850-AA2900; AA2900-AA2950; AA2910-AA2930; AA2925-AA2950; och AA2945 - slutet (C' -änden).

22. En väsentligen isolerad polypeptid enligt patentkrav 21, **kännetecknad** därav att den kontinuerliga sekvensen är vald ur gruppen nedan vari den kontinuerliga sekvensen är betecknad AA_x-AA_y, och x och y betecknar aminosyrors ordningstal i ett HCV-polyprotein enligt figur 17:

AA1-AA50; AA1-AA84; AA9-AA177; AA50-AA100; AA40-AA90; AA65-AA75; AA99-AA120; AA95-AA110; AA100-AA150; AA150-AA200; AA200-AA250; AA220-AA240; AA245-AA265; AA250-AA300; AA290-AA330; AA290-AA305; AA300-AA350; AA310-AA330; AA350-AA400; AA400-AA450; AA2900-AA2950; AA2910-AA2930; AA2925-AA2950; och AA2945-slutet (C'-änden).

23. En väsentligen isolerad polypeptid enligt patentkrav 20, **kännetecknad** därav att den kontinuerliga sekvensen är vald ur gruppen nedan vari den kontinuerliga sekvensen är betecknad AA_x-AA_y, och x och y betecknar aminosyrors ordningstal i ett HCV-polyprotein enligt figur 17:

AA405-AA495; AA437-AA582; AA450-AA500; och AA2850-AA2900.

FIG. 1 DNA:n translaatio 12f

```
      IlePheLysIleArgMetTyrValGlyGlyValGluHisArgLeuGluAlaAlaCysAsn
  1   CCATATTTAAAATCAGGATGTACGTGGGAGGGGTCGAACACAGGCTGGAAGCTGCCTGCA
      GGTATAAATTTTAGTCCTACATGCACCCTCCCCAGCTTGTGTCCGACCTTCGACGGACGT

      TrpThrArgGlyGluArgCysAspLeuGluAspArgAspArgSerGluLeuSerProLeu
 61   ACTGGACGCGGGGCGAACGTTGCGATCTGGAAGACAGGGACAGGTCCGAGCTCAGCCCGT
      TGACCTGCGCCCCGCTTGCAACGCTAGACCTTCTGTCCCTGTCCAGGCTCGAGTCGGGCA

      LeuLeuThrThrThrGlnTrpGlnValLeuProCysSerPheThrThrLeuProAlaLeu
121   TACTGCTGACCACTACACAGTGGCAGGTCCTCCCGTGTTCCTTCACAACCCTACCAGCCT
      ATGACGACTGGTGATGTGTCACCGTCCAGGAGGGCACAAGGAAGTGTTGGGATGGTCGGA

      SerThrGlyLeuIleHisLeuHisGlnAsnIleValAspValGlnTyrLeuTyrGlyVal
181   TGTCCACCGGCCTCATCCACCTCCACCAGAACATTGTGGACGTGCAGTACTTGTACGGGG
      ACAGGTGGCCGGAGTAGGTGGAGGTGGTCTTGTAACACCTGCACGTCATGAACATGCCCC

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

      GlySerSerIleAlaSerTrpAlaIleLysTrpGluTyrValValLeuLeuPheLeuLeu
241   TGGGGTCAAGCATCGCGTCCTGGGCCATTAAGTGGGAGTACGTCGTTCTCCTGTTCCTTC
      ACCCCAGTTCGTAGCGCAGGACCCGGTAATTCACCCTCATGCAGCAAGAGGACAAGGAAG

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

      AlaAlaLeuGluAsnLeuValIleLeuAsnAlaAlaSerLeuAlaGlyThrHisGlyLeu
361   AGGCGGCTTTGGAGAACCTCGTAATACTTAATGCAGCATCCCTGGCCGGGACGCACGGTC
      TCCGCCGAAACCTCTTGGAGCATTATGAATTACGTCGTAGGGACCGGCCCTGCGTGCCAG

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

FIG. 2-1 DNA:n translaatio k9-1

```
    GlyCysProGluArgLeuAlaSerCysArgProLeuThrAspPheAspGlnGlyTrpGly
1   CAGGCTGTCCTGAGAGGCTAGCCAGCTGCCGACCCCTTACCGATTTTGACCAGGGCTGGG
    GTCCGACAGGACTCTCCGATCGGTCGACGGCTGGGGAATGGCTAAAACTGGTCCCGACCC

    ProIleSerTyrAlaAsnGlySerGlyProAspGlnArgProTyrCysTrpHisTyrPro
61  GCCCTATCAGTTATGCCAACGGAAGCGGCCCCGACCAGCGCCCCTACTGCTGGCACTACC
    CGGGATAGTCAATACGGTTGCCTTCGCCGGGGCTGGTCGCGGGGATGACGACCGTGATGG

    ProLysProCysGlyIleValProAlaLysSerValCysGlyProValTyrCysPheThr
121 CCCCAAAACCTTGCGGTATTGTGCCCGCGAAGAGTGTGTGTGGTCCGGTATATTGCTTCA
    GGGGTTTTGGAACGCCATAACACGGGCGCTTCTCACACACACCAGGCCATATAACGAAGT

    ProSerProValValValGlyThrThrAspArgSerGlyAlaProThrTyrSerTrpGly
181 CTCCCAGCCCCGTGGTGGTGGGAACGACCGACAGGTCGGGCGCGCCCACCTACAGCTGGG
    GAGGGTCGGGGCACCACCACCCTTGCTGGCTGTCCAGCCCGCGCGGGTGGATGTCGACCC

    GluAsnAspThrAspValPheValLeuAsnAsnThrArgProProLeuGlyAsnTrpPhe
241 GTGAAAATGATACGGACGTCTTCGTCCTTAACAATACCAGGCCACCGCTGGGCAATTGGT
    CACTTTTACTATGCCTGCAGAAGCAGGAATTGTTATGGTCCGGTGGCGACCCGTTAACCA

    GlyCysThrTrpMetAsnSerThrGlyPheThrLysValCysGlyAlaProProCysVal
301 TCGGTTGTACCTGGATGAACTCAACTGGATTCACCAAAGTGTGCGGAGCGCCTCCTTGTG
    AGCCAACATGGACCTACTTGAGTTGACCTAAGTGGTTTCACACGCCTCGCGGAGGAACAC

    IleGlyGlyAlaGlyAsnAsnThrLeuHisCysProThrAspCysPheArgLysHisPro
361 TCATCGGAGGGGCGGGCAACAACACCCTGCACTGCCCCACTGATTGCTTCCGCAAGCATC
    AGTAGCCTCCCCGCCCGTTGTTGTGGGACGTGACGGGGTGACTAACGAAGGCGTTCGTAG

    AspAlaThrTyrSerArgCysGlySerGlyProTrpIleThrProArgCysLeuValAsp
421 CGGACGCCACATACTCTCGGTGCGGCTCCGGTCCCTGGATCACACCCAGGTGCCTGGTCG
    GCCTGCGGTGTATGAGAGCCACGCCGAGGCCAGGGACCTAGTGTGGGTCCACGGACCAGC

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

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

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

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

    HisLeuHisGlnAsnIleValAspValGlnTyrLeuTyrGlyValGlySerSerIleAla
721 TCCACCTCCACCAGAACATTGTGGACGTGCAGTACTTGTACGGGGTGGGGTCAAGCATCG
    AGGTGGAGGTGGTCTTGTAACACCTGCACGTCATGAACATGCCCCACCCCAGTTCGTAGC

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

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

```
                ValCysSerCysLeuTrpMetMetLeuLeuIleSerGlnAlaGluAlaAlaLeuGluAsn
841   GCGTCTGCTCCTGCTTGTGGATGATGCTACTCATATCCCAAGCGGAAGCGGCTTTGGAGA
      CGCAGACGAGGACGAACACCTACTACGATGAGTATAGGGTTCGCCTTCGCCGAAACCTCT

      ------------------------------------------------------------
                LeuValIleLeuAsnAlaAlaSerLeuAlaGlyThrHisGlyLeuValSerPheLeuVal
901   ACCTCGTAATACTTAATGCAGCATCCCTGGCCGGGACGCACGGTCTTGTATCCTTCCTCG
      TGGAGCATTATGAATTACGTCGTAGGGACCGGCCCTGCGTGCCAGAACATAGGAAGGAGC

      ------------------------------------------------------------
                PhePheCysPheAlaTrpTyrLeuLysGlyLysTrpValProGlyAlaValTyrThrPhe
961   TGTTCTTCTGCTTTGCATGGTATCTGAAGGGTAAGTGGGTGCCCGGAGCGGTCTACACCT
      ACAAGAAGACGAAACGTACCATAGACTTCCCATTCACCCACGGGCCTCGCCAGATGTGGA

      ------------------------------------------------------------
                TyrGlyMetTrpProLeuLeuLeuLeuLeuAlaLeuProGlnArgAlaTyrAlaLeu
1021  TCTACGGGATGTGGCCTCTCCTCCTGCTCCTGTTGGCGTTGCCCCAGCGGGCGTACGCGC
      AGATGCCCTACACCGGAGAGGAGGACGAGGACAACCGCAACGGGGTCGCCCGCATGCGCG

      ------------------------------------------------------------
                AspThrGluValAlaAlaSerCysGlyGlyValValLeuValGlyLeuMetAlaLeuThr
1081  TGGACACGGAGGTGGCCGCGTCGTGTGGCGGTGTTGTTCTCGTCGGGTTGATGGCGCTAA
      ACCTGTGCCTCCACCGGCGCAGCACACCGCCACAACAAGAGCAGCCCAACTACCGCGATT

      ------------------------------------------------------------
                LeuSerProTyrTyrLysArgTyrIleSerTrpCysLeuTrpTrpLeuGlnTyrPheLeu
1141  CTCTGTCACCATATTACAAGCGCTATATCAGCTGGTGCTTGTGGTGGCTTCAGTATTTTC
      GAGACAGTGGTATAATGTTCGCGATATAGTCGACCACGAACACCACCGAAGTCATAAAAG

      ------------------------------------------------------------
                ThrArgValGluAlaGlnLeuHisValTrpIleProProLeuAsnValArgGlyGlyArg
1201  TGACCAGAGTGGAAGCGCAACTGCACGTGTGGATTCCCCCCCTCAACGTCCGAGGGGGGC
      ACTGGTCTCACCTTCGCGTTGACGTGCACACCTAAGGGGGGGAGTTGCAGGCTCCCCCCG

      ------------------------------------------------------------
                AspAlaValIleLeuLeuMetCysAlaValHisProThrLeuValPheAspIleThrLys
1261  GCGACGCTGTCATCTTACTCATGTGTGCTGTACACCCGACTCTGGTATTTGACATCACCA
      CGCTGCGACAGTAGAATGAGTACACACGACATGTGGGCTGAGACCATAAACTGTAGTGGT

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

FIG. 2-2

FIG. 3

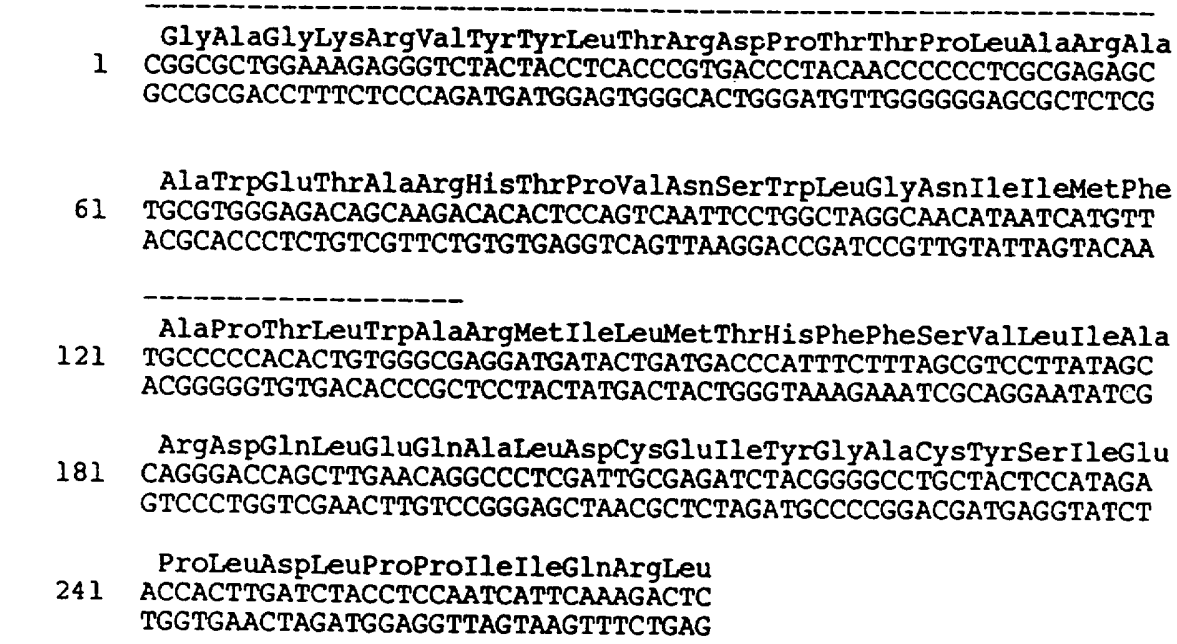

GlyAlaGlyLysArgValTyrTyrLeuThrArgAspProThrThrProLeuAlaArgAla
1 CGGCGCTGGAAAGAGGGTCTACTACCTCACCCGTGACCCTACAACCCCCCTCGCGAGAGC
GCCGCGACCTTTCTCCCAGATGATGGAGTGGGCACTGGGATGTTGGGGGGAGCGCTCTCG
AlaTrpGluThrAlaArgHisThrProValAsnSerTrpLeuGlyAsnIleIleMetPhe
61 TGCGTGGGAGACAGCAAGACACACTCCAGTCAATTCCTGGCTAGGCAACATAATCATGTT
ACGCACCCTCTGTCGTTCTGTGTGAGGTCAGTTAAGGACCGATCCGTTGTATTAGTACAA
AlaProThrLeuTrpAlaArgMetIleLeuMetThrHisPhePheSerValLeuIleAla
121 TGCCCCCACACTGTGGGCGAGGATGATACTGATGACCCATTTCTTTAGCGTCCTTATAGC
ACGGGGGTGTGACACCCGCTCCTACTATGACTACTGGGTAAAGAAATCGCAGGAATATCG
ArgAspGlnLeuGluGlnAlaLeuAspCysGluIleTyrGlyAlaCysTyrSerIleGlu
181 CAGGGACCAGCTTGAACAGGCCCTCGATTGCGAGATCTACGGGGCCTGCTACTCCATAGA
GTCCCTGGTCGAACTTGTCCGGGAGCTAACGCTCTAGATGCCCCGGACGATGAGGTATCT
ProLeuAspLeuProProIleIleGlnArgLeu
241 ACCACTTGATCTACCTCCAATCATTCAAAGACTC
TGGTGAACTAGATGGAGGTTAGTAAGTTTCTGAG

FIG. 5

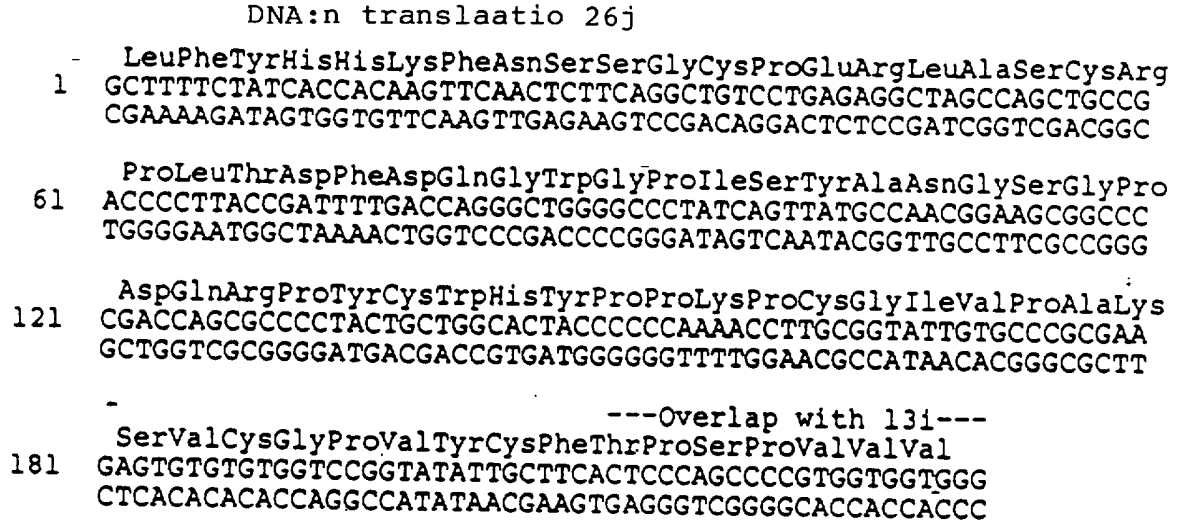

DNA:n translaatio 26j
LeuPheTyrHisHisLysPheAsnSerSerGlyCysProGluArgLeuAlaSerCysArg
1 GCTTTTCTATCACCACAAGTTCAACTCTTCAGGCTGTCCTGAGAGGCTAGCCAGCTGCCG
CGAAAAGATAGTGGTGTTCAAGTTGAGAAGTCCGACAGGACTCTCCGATCGGTCGACGGC
ProLeuThrAspPheAspGlnGlyTrpGlyProIleSerTyrAlaAsnGlySerGlyPro
61 ACCCCTTACCGATTTTGACCAGGGCTGGGGCCCTATCAGTTATGCCAACGGAAGCGGCCC
TGGGGAATGGCTAAAACTGGTCCCGACCCCGGGATAGTCAATACGGTTGCCTTCGCCGGG
AspGlnArgProTyrCysTrpHisTyrProProLysProCysGlyIleValProAlaLys
121 CGACCAGCGCCCCTACTGCTGGCACTACCCCCCAAAACCTTGCGGTATTGTGCCCGCGAA
GCTGGTCGCGGGGATGACGACCGTGATGGGGGGTTTTGGAACGCCATAACACGGGCGCTT
---Overlap with 13i---
SerValCysGlyProValTyrCysPheThrProSerProValValVal
181 GAGTGTGTGTGGTCCGGTATATTGCTTCACTCCCAGCCCCGTGGTGGTGGG
CTCACACACACCAGGCCATATAACGAAGTGAGGGTCGGGGCACCACCACCC

FIG. 4

DNA:n translaatio 13i

```
      ProSerProValValValGlyThrThrAspArgSerGlyAlaProThrTyrSerTrpGly
  1   CTCCCAGCCCCGTGGTGGTGGGAACGACCGACAGGTCGGGCGCGCCTACCTACAGCTGGG
      GAGGGTCGGGGCACCACCACCCTTGCTGGCTGTCCAGCCCGCGCGGATGGATGTCGACCC

      GluAsnAspThrAspValPheValLeuAsnAsnThrArgProProLeuGlyAsnTrpPhe
 61   GTGAAAATGATACGGACGTCTTCGTCCTTAACAATACCAGGCCACCGCTGGGCAATTGGT
      CACTTTTACTATGCCTGCAGAAGCAGGAATTGTTATGGTCCGGTGGCGACCCGTTAACCA

      GlyCysThrTrpMetAsnSerThrGlyPheThrLysValCysGlyAlaProProCysVal
121   TCGGTTGTACCTGGATGAACTCAACTGGATTCACCAAAGTGTGCGGAGCGCCTCCTTGTG
      AGCCAACATGGACCTACTTGAGTTGACCTAAGTGGTTTCACACGCCTCGCGGAGGAACAC

      IleGlyGlyAlaGlyAsnAsnThrLeuHisCysProThrAspCysPheArgLysHisPro
181   TCATCGGAGGGGCGGGCAACAACACCCTGCACTGCCCCACTGATTGCTTCCGCAAGCATC
      AGTAGCCTCCCCGCCCGTTGTTGTGGGACGTGACGGGGTGACTAACGAAGGCGTTCGTAG

      AspAlaThrTyrSerArgCysGlySerGlyProTrpLeuThrProArgCysLeuValAsp
241   CGGACGCCACATACTCTCGGTGCGGCTCCGGTCCCTGGCTCACACCCAGGTGCCTGGTCG
      GCCTGCGGTGTATGAGAGCCACGCCGAGGCCAGGGACCGAGTGTGGGTCCACGGACCAGC

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

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

      ---------  Päällekkäisyys 12f:n kanssa  ----------
      ArgCysAspLeuGluAspArgAspArgSerGluLeuSerProLeuLeuLeuThrThrThr
421   AACGTTGCGATCTGGAAGACAGGGACAGGTCCGAGCTCAGCCCGTTACTGCTGACCACTA
      TTGCAACGCTAGACCTTCTGTCCCTGTCCAGGCTCGAGTCGGGCAATGACGACTGGTGAT

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

FIG. 6


DNA:n translaatio CA59a
LeuValMetAlaGlnLeuLeuArgIleProGlnAlaIleLeuAspMetIleAlaGlyAla
1 TTGGTAATGGCTCAGCTGCTCCGGATCCCACAAGCCATCTTGGACATGATCGCTGGTGCT
AACCATTACCGAGTCGACGAGGCCTAGGGTGTTCGGTAGAACCTGTACTAGCGACCACGA
HisTrpGlyValLeuAlaGlyIleAlaTyrPheSerMetValGlyAsnTrpAlaLysVal
61 CACTGGGGAGTCCTGGCGGGCATAGCGTATTTCTCCATGGTGGGGAACTGGGCGAAGGTC
GTGACCCCTCAGGACCGCCCGTATCGCATAAAGAGGTACCACCCCTTGACCCGCTTCCAG
LeuValValLeuLeuLeuPheAlaGlyValAspAlaGluThrHisValThrGlyGlySer
121 CTGGTAGTGCTGCTGCTATTTGCCGGCGTCGACGCGGAAACCCACGTCACCGGGGGAAGT
GACCATCACGACGACGATAAACGGCCGCAGCTGCGCCTTTGGGTGCAGTGGCCCCCTTCA
AlaGlyHisThrValSerGlyPheValSerLeuLeuAlaProGlyAlaLysGlnAsnVal
181 GCCGGCCACACTGTGTCTGGATTTGTTAGCCTCCTCGCACCAGGCGCCAAGCAGAACGTC
CGGCCGGTGTGACACAGACCTAAACAATCGGAGGAGCGTGGTCCGCGGTTCGTCTTGCAG
GlnLeuIleAsnThrAsnGlySerTrpHisLeuAsnSerThrAlaLeuAsnCysAsnAsp
241 CAGCTGATCAACACCAACGGCAGTTGGCACCTCAATAGCACGGCCCTGAACTGCAATGAT
GTCGACTAGTTGTGGTTGCCGTCAACCGTGGAGTTATCGTGCCGGGACTTGACGTTACTA

SerLeuAsnThrGlyTrpLeuAlaGlyLeuPheTyrHisHisLysPheAsnSerSerGly
301 AGCCTCAACACCGGCTGGTTGGCAGGGCTTTTCTATCACCACAAGTTCAACTCTTCAGGC
TCGGAGTTGTGGCCGACCAACCGTCCCGAAAAGATAGTGGTGTTCAAGTTGAGAAGTCCG
---- Päällekkäisyys 26j:n kanssa
Päällekkäisyys K9-1:n kanssa
CysProGluArgLeuAlaSerCysArgPro
361 TGTCCTGAGAGGCTAGCCAGCTGCCGACCCC
ACAGGACTCTCCGATCGGTCGACGGCTGGGG

DNA:n translaatio CA84a

FIG. 7

```
     GlnGlyCysAsnCysSerIleTyrProGlyHisIleThrGlyHisArgMetAlaTrpAsp
  1  CGCAAGGTTGCAATTGCTCTATCTATCCCGGCCATATAACGGGTCACCGCATGGCATGGG
     GCGTTCCAACGTTAACGAGATAGATAGGGCCGGTATATTGCCCAGTGGCGTACCGTACCC

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

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

     ------ Päällekkäisyys CA59a:n kanssa ------------------
     PheSerMetValGlyAsnTrpAlaLysValLeuValValLeuLeuLeuPheAlaGlyVal
181  ATTTCTCCATGGTGGGGAACTGGGCGAAGGTCCTGGTAGTGCTGCTGCTATTTGCCGGCG
     TAAAGAGGTACCACCCCTTGACCCGCTTCCAGGACCATCACGACGACGATAAACGGCCGC

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

DNA:n translaatio CA156e

FIG. 8

```
     CysTrpValAlaMetThrProThrValAlaThrArgAspGlyLysLeuProAlaThrGln
  1  GTGTTGGGTGGCGATGACCCCTACGGTGGCCACCAGGGATGGCAAACTCCCCGCGACGCA
     CACAACCCACCGCTACTGGGGATGCCACCGGTGGTCCCTACCGTTTGAGGGGCGCTGCGT

     LeuArgArgHisIleAspLeuLeuValGlySerAlaThrLeuCysSerAlaLeuTyrVal
 61  GCTTCGACGTCACATCGATCTGCTTGTCGGGAGCGCCACCCTCTGTTCGGCCCTCTACGT
     CGAAGCTGCAGTGTAGCTAGACGAACAGCCCTCGCGGTGGGAGACAAGCCGGGAGATGCA

     GlyAspLeuCysGlySerValPheLeuValGlyGlnLeuPheThrPheSerProArgArg
121  GGGGGACCTATGCGGGTCTGTCTTTCTTGTCGGCCAACTGTTCACCTTCTCTCCCAGGCG
     CCCCCTGGATACGCCCAGACAGAAAGAACAGCCGGTTGACAAGTGGAAGAGAGGGTCCGC

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

     ------------ Päällekkäisyys CA84a:n kanssa ---------------
     MetAlaTrpAspMetMetMetAsnTrpSerProThrThrAlaLeuValValAlaGlnLeu
241  CATGGCATGGGATATGATGATGAACTGGTCCCCTACGACGGCGTTGGTAGTGGCTCAGCT
     GTACCGTACCCTATACTACTACTTGACCAGGGGATGCTGCCGCAACCATCACCGAGTCGA

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

FIG. 9

DNA:n translaatio CA167b

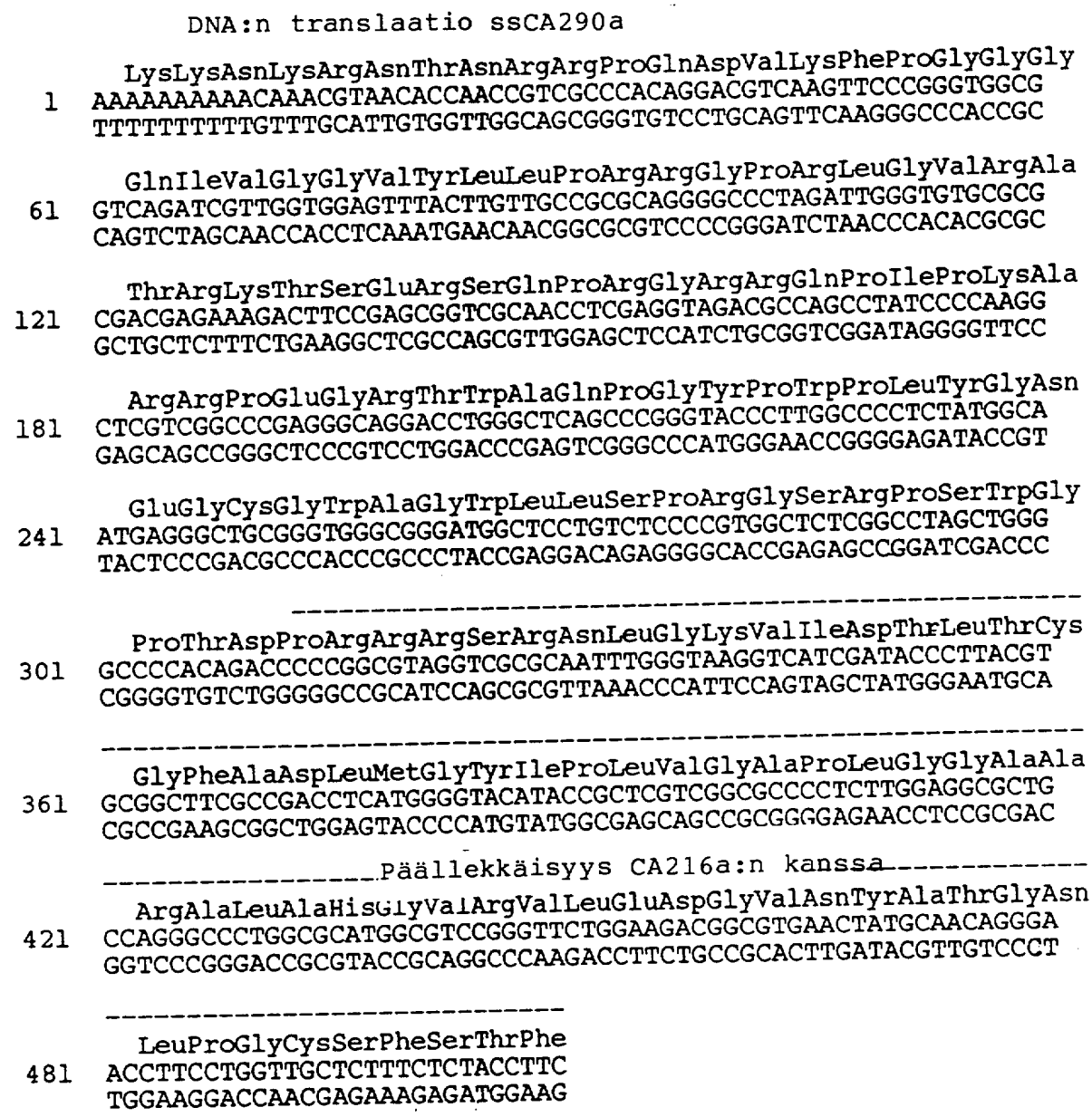
```
      SerThrGlyLeuTyrHisValThrAsnAspCysProAsnSerSerIleValTyrGluAla
  1   CTCCACGGGGCTTTACCACGTCACCAATGATTGCCCTAACTCGAGTATTGTGTACGAGGC
      GAGGTGCCCCGAAATGGTGCAGTGGTTACTAACGGGATTGAGCTCATAACACATGCTCCG

      AlaAspAlaIleLeuHisThrProGlyCysValProCysValArgGluGlyAsnAlaSer
 61   GGCCGATGCCATCCTGCACACTCCGGGGTGCGTCCCTTGCGTTCGTGAGGGCAACGCCTC
      CCGGCTACGGTAGGACGTGTGAGGCCCCACGCAGGGAACGCAAGCACTCCCGTTGCGGAG

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

      ---------- Päällekkäisyys CA156e:n kanssa ----------------
      GlnLeuArgArgHisIleAspLeuLeuValGlySerAlaThrLeuCysSerAlaLeuTyr
181   GCAGCTTCGACGTCACATCGATCTGCTTGTCGGGAGCGCTACCCTCTGTTCGGCCCTCTA
      CGTCGAAGCTGCAGTGTAGCTAGACGAACAGCCCTCGCGATGGGAGACAAGCCGGGAGAT

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

FIG. 10

DNA:n translaatio ssCA216a

```
      ArgArgArgSerArgAsnLeuGlyLysValIleAspThrLeuThrCysGlyPheAlaAsp
  1   CCCGGCGTAGGTCGCGCAATTTGGGTAAGGTCATCGATACCCTTACGTGCGGCTTCGCCG
      GGGCCGCATCCAGCGCGTTAAACCCATTCCAGTAGCTATGGGAATGCACGCCGAAGCGGC

      LeuMetGlyTyrIleProLeuValGlyAlaProLeuGlyGlyAlaAlaArgAlaLeuAla
 61   ACCTCATGGGGTACATACCGCTCGTCGGCGCCCCTCTTGGAGGCGCTGCCAGGGCCCTGG
      TGGAGTACCCCATGTATGGCGAGCAGCCGCGGGGAGAACCTCCGCGACGGTCCCGGGACC

      HisGlyValArgValLeuGluAspGlyValAsnTyrAlaThrGlyAsnLeuProGlyCys
121   CGCATGGCGTCCGGGTTCTGGAAGACGGCGTGAACTATGCAACAGGGAACCTTCCTGGTT
      GCGTACCGCAGGCCCAAGACCTTCTGCCGCACTTGATACGTTGTCCCTTGGAAGGACCAA

      SerPheSerIlePheLeuLeuAlaLeuLeuSerCysLeuThrValProAlaSerAlaTyr
181   GCTCTTTCTCTATCTTCCTTCTGGCCCTGCTCTCTTGCTTGACTGTGCCCGCTTCGGCCT
      CGAGAAAGAGATAGAAGGAAGACCGGGACGAGAGAACGAACTGACACGGGCGAAGCCGGA

            ------------------------------------------------
      GlnValArgAsnSerThrGlyLeuTyrHisValThrAsnAspCysProAsnSerSerIle
241   ACCAAGTGCGCAACTCCACGGGGCTTTACCACGTCACCAATGATTGCCCTAACTCGAGTA
      TGGTTCACGCGTTGAGGTGCCCCGAAATGGTGCAGTGGTTACTAACGGGATTGAGCTCAT

      ------------ Päällekkäisyys CA167d:n kanssa--------------
      ValTyrGluAlaAlaAspAlaIleLeuHisThrProGlyCysValProCysValArgGlu
301   TTGTGTACGAAGCGGCCGATGCCATCCTGCACACTCCGGGGTGCGTCCCTTGCGTTCGTG
      AACACATGCTTCGCCGGCTACGGTAGGACGTGTGAGGCCCCACGCAGGGAACGCAAGCAC

      ------------------------------------------------
      GlyAsnAlaSerArgCysTrpValAlaMetThrProThrValAla
361   AGGGCAACGCCTCGAGGTGTTGGGTGGCGATGACCCCTACGGTGGCC
      TCCCGTTGCGGAGCTCCACAACCCACCGCTACTGGGGATGCCACCGG
```

FIG. 11


DNA:n translaatio ssCA290a
LysLysAsnLysArgAsnThrAsnArgArgProGlnAspValLysPheProGlyGlyGly
1 AAAAAAAAAACAAACGTAACACCAACCGTCGCCCACAGGACGTCAAGTTCCCGGGTGGCG
TTTTTTTTTTGTTTGCATTGTGGTTGGCAGCGGGTGTCCTGCAGTTCAAGGGCCCACCGC
GlnIleValGlyGlyValTyrLeuLeuProArgArgGlyProArgLeuGlyValArgAla
61 GTCAGATCGTTGGTGGAGTTTACTTGTTGCCGCGCAGGGGCCCTAGATTGGGTGTGCGCG
CAGTCTAGCAACCACCTCAAATGAACAACGGCGCGTCCCCGGGATCTAACCCACACGCGC
ThrArgLysThrSerGluArgSerGlnProArgGlyArgArgGlnProIleProLysAla
121 CGACGAGAAAGACTTCCGAGCGGTCGCAACCTCGAGGTAGACGCCAGCCTATCCCCAAGG
GCTGCTCTTTCTGAAGGCTCGCCAGCGTTGGAGCTCCATCTGCGGTCGGATAGGGGTTCC
ArgArgProGluGlyArgThrTrpAlaGlnProGlyTyrProTrpProLeuTyrGlyAsn
181 CTCGTCGGCCCGAGGGCAGGACCTGGGCTCAGCCCGGGTACCCTTGGCCCCTCTATGGCA
GAGCAGCCGGGCTCCCGTCCTGGACCCGAGTCGGGCCCATGGGAACCGGGGAGATACCGT
GluGlyCysGlyTrpAlaGlyTrpLeuLeuSerProArgGlySerArgProSerTrpGly
241 ATGAGGGCTGCGGGTGGGCGGGATGGCTCCTGTCTCCCCGTGGCTCTCGGCCTAGCTGGG
TACTCCCGACGCCCACCCGCCCTACCGAGGACAGAGGGGCACCGAGAGCCGGATCGACCC
ProThrAspProArgArgArgSerArgAsnLeuGlyLysValIleAspThrLeuThrCys
301 GCCCCACAGACCCCCGGCGTAGGTCGCGCAATTTGGGTAAGGTCATCGATACCCTTACGT
CGGGGTGTCTGGGGGCCGCATCCAGCGCGTTAAACCCATTCCAGTAGCTATGGGAATGCA
GlyPheAlaAspLeuMetGlyTyrIleProLeuValGlyAlaProLeuGlyGlyAlaAla
361 GCGGCTTCGCCGACCTCATGGGGTACATACCGCTCGTCGGCGCCCCTCTTGGAGGCGCTG
CGCCGAAGCGGCTGGAGTACCCCATGTATGGCGAGCAGCCGCGGGGAGAACCTCCGCGAC
Päällekkäisyys CA216a:n kanssa
ArgAlaLeuAlaHisGlyValArgValLeuGluAspGlyValAsnTyrAlaThrGlyAsn
421 CCAGGGCCCTGGCGCATGGCGTCCGGGTTCTGGAAGACGGCGTGAACTATGCAACAGGGA
GGTCCCGGGACCGCGTACCGCAGGCCCAAGACCTTCTGCCGCACTTGATACGTTGTCCCT
LeuProGlyCysSerPheSerThrPhe
481 ACCTTCCTGGTTGCTCTTTCTCTACCTTC
TGGAAGGACCAACGAGAAAGAGATGGAAG

DNA:n translaatio ag30a

FIG. 12-1

```
                                    #MetSerValValGlnProProGlyProProLeu
                        #MetAlaLeuValOP
  1  CGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTCGTGCAGCCTCCAGGACCCCCCC
     GCGTCTTTCGCAGATCGGTACCGCAATCATACTCACAGCACGTCGGAGGTCCTGGGGGGG

       ProGlyGluProAM

 61  TCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCCAGGACGAC
     AGGGCCCTCTCGGTATCACCAGACGCCTTGGCCACTCATGTGGCCTTAACGGTCCTGCTG

                                    #MetProGlyAspLeuGlyValProProGlnAsp

121  CGGGTCCTTTCTTGGATCAACCCGCTCAATGCCTGGAGATTTGGGCGTGCCCCCGCAAGA
     GCCCAGGAAAGAACCTAGTTGGGCGAGTTACGGACCTCTAAACCCGCACGGGGGCGTTCT

                                                        OP AM GlyAlaCys
      CysAM                                                   *

181  CTGCTAGCCGAGTAGTGTTGGGTCGCGAAAGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAGGGTGCTT
     GACGATCGGCTCATCACAACCCAGCGCTTTCCGGAACACCATGACGGACTATCCCACGAA

                                          |
       GluCysProGlyArgSerArgArgProCysThrMetSerThrAsnProLysProGlnLys
                                                                 -
241  GCGAGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCACCATGAGCACGAATCCTAAACCTCAAA
     CGCTCACGGGGCCCTCCAGAGCATCTGGCACGTGGTACTCGTGCTTAGGATTTGGAGTTT

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

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

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

       ArgProGluGlyArgThrTrpAlaGlnProGlyTyrProTrpProLeuTyrGlyAsnGlu
     --------------- Päällekkäisyys CA290a:n kanssa -----------
481  GTCGGCCCGAGGGCAGGACCTGGGCTCAGCCCGGGTACCCTTGGCCCCTCTATGGCAATG
     CAGCCGGGCTCCCGTCCTGGACCCGAGTCGGGCCCATGGGAACCGGGGAGATACCGTTAC

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

       ThrAspProArgArgArgSerArgAsnLeuGlyLysValIleAspThrLeuThrCysGly
```

```
601  CCACAGACCCCCGGCGTAGGTCGCGCAATTTGGGTAAGGTCATCGATACCCTTACGTGCG
     GGTGTCTGGGGGCCGCATCCAGCGCGTTAAACCCATTCCAGTAGCTATGGGAATGCACGC

       Phe

     -----
661  GCTTC
     CGAAG
```

* = Pitkän HCV:n ORF:n alku
| = Suuren HCV-polyproteiinin oletettu ensimmäinen aminohappo
= Oletettuja pieniä kooditettuja peptidejä (jotka voi olla osa translaation säätelyssä)

FIG. 12-2

FIG. 13

DNA:n translaatio CA205a

```
     ValLeuGlyArgGluArgProCysGlyThrAlaOP AM GlyAlaCysGluCysProGly
  1  GTCTTGGGTCGCGAAAGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAGGGTGCTTGCGAGTGCCCCGGG
     CAGAACCCAGCGCTTTCCGGAACACCATGACGGACTATCCCACGAACGCTCACGGGGCCC

                                  *                  ----------------
     ArgSerArgArgProCysThrMetSerThrAsnProLysProGlnArgLysThrLysArg
 61  AGGTCTCGTAGACCGTGCACCATGAGCACGAATCCTAAACCTCAAAGAAAAACCAAACGT
     TCCAGAGCATCTGGCACGTGGTACTCGTGCTTAGGATTTGGAGTTTCTTTTTGGTTTGCA

     ------------------------------------------------------------
     AsnThrAsnArgArgProGlnAspValLysPheProGlyGlyGlyGlnIleValGlyGly
121  AACACCAACCGTCGCCCACAGGACGTCAAGTTCCCGGGTGGCGGTCAGATCGTTGGTGGA
     TTGTGGTTGGCAGCGGGTGTCCTGCAGTTCAAGGGCCCACCGCCAGTCTAGCAACCACCT

     ------------------------------------------------------------
     ValTyrLeuLeuProArgArgGlyProArgLeuGlyValArgAlaThrArgLysThrSer
181  GTTTACTTGTTGCCGCGCAGGGGCCCTAGATTGGGTGTGCGCGCGACGAGAAAGACTTCC
     CAAATGAACAACGGCGCGTCCCCGGGATCTAACCCACACGCGCGCTGCTCTTTCTGAAGG

     ---------- Päällekkäisyys CA290a:n kanssa ----------------
     GluArgSerGlnProArgGlyArgArgGlnProIleProLysAlaArgArgProGluGly
241  GAGCGGTCGCAACCTCGAGGTAGACGTCAGCCTATCCCCAAGGCTCGTCGGCCCGAGGGC
     CTCGCCAGCGTTGGAGCTCCATCTGCAGTCGGATAGGGGTTCCGAGCAGCCGGGCTCCCG

     ---------------------------------------------------------
     ArgThrTrpAlaGlnProGlyTyrProTrpProLeuTyrGlyAsnGluGlyCys
301  AGGACCTGGGCTCAGCCCGGGTACCCTTGGCCCCTCTATGGCAATGAGGGCTGCG
     TCCTGGACCCGAGTCGGGCCCATGGGAACCGGGGAGATACCGTTACTCCCGACGC
```

* = oletettu initiaattorimetioniinikodoni

FIG. 14

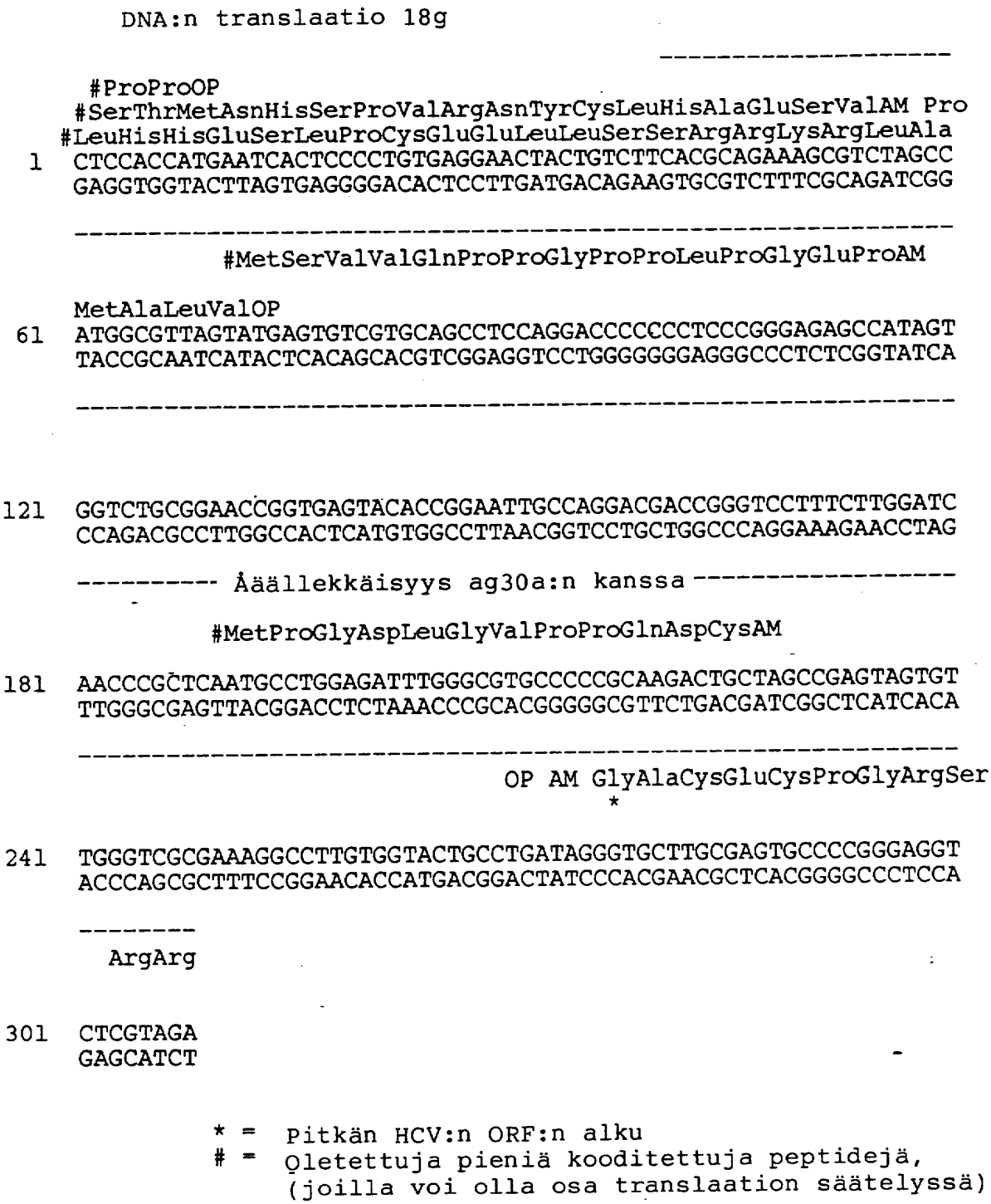
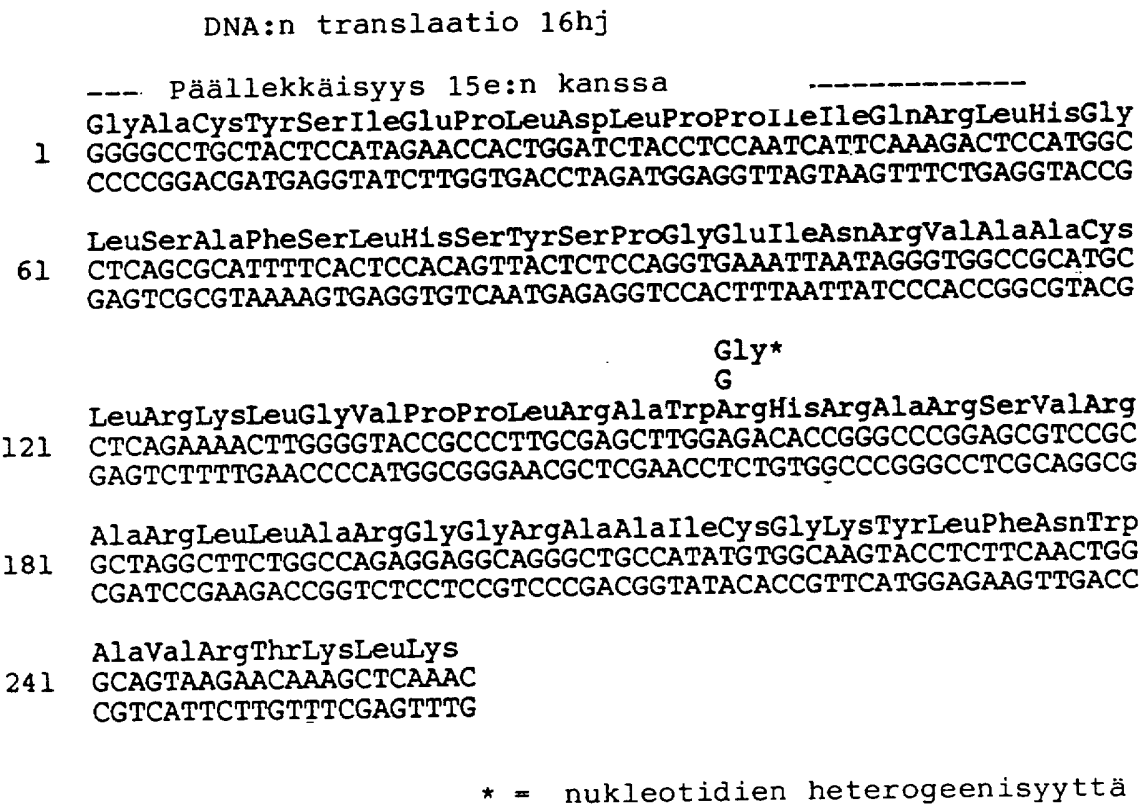

DNA:n translaatio 18g
#ProProOP
#SerThrMetAsnHisSerProValArgAsnTyrCysLeuHisAlaGluSerValAM Pro
#LeuHisHisGluSerLeuProCysGluGluLeuLeuSerSerArgArgLysArgLeuAla
1 CTCCACCATGAATCACTCCCCTGTGAGGAACTACTGTCTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCC
GAGGTGGTACTTAGTGAGGGGACACTCCTTGATGACAGAAGTGCGTCTTTCGCAGATCGG
#MetSerValValGlnProProGlyProProLeuProGlyGluProAM
MetAlaLeuValOP
61 ATGGCGTTAGTATGAGTGTCGTGCAGCCTCCAGGACCCCCCCTCCCGGGAGAGCCATAGT
TACCGCAATCATACTCACAGCACGTCGGAGGTCCTGGGGGGGAGGGCCCTCTCGGTATCA
121 GGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCCTTTCTTGGATC
CCAGACGCCTTGGCCACTCATGTGGCCTTAACGGTCCTGCTGGCCCAGGAAAGAACCTAG
Ääällekkäisyys ag30a:n kanssa
#MetProGlyAspLeuGlyValProProGlnAspCysAM
181 AACCCGCTCAATGCCTGGAGATTTGGGCGTGCCCCCGCAAGACTGCTAGCCGAGTAGTGT
TTGGGCGAGTTACGGACCTCTAAACCCGCACGGGGGCGTTCTGACGATCGGCTCATCACA
OP AM GlyAlaCysGluCysProGlyArgSer
*
241 TGGGTCGCGAAAGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAGGGTGCTTGCGAGTGCCCCGGGAGGT
ACCCAGCGCTTTCCGGAACACCATGACGGACTATCCCACGAACGCTCACGGGGCCCTCCA
ArgArg
301 CTCGTAGA
GAGCATCT
* = Pitkän HCV:n ORF:n alku
# = Oletettuja pieniä kooditettuja peptidejä,
(joilla voi olla osa translaation säätelyssä)

FIG. 15



* = nukleotidien heterogeenisyyttä

DNA:OIDEN YHDISTETTY ORF pil4a-15e

FIG. 16-1

(pil4a/CA167b/CA156e/CA84a/CA59a/K9-1/12f/14i/11b/7f/7e/
8h/33c/40b/37b/35/36/81/32/33b/25c/14c/8f/33f/33g/39c/
35f/19g/26g & 15e)

```
    ArgSerArgAsnLeuGlyLysValIleAspThrLeuThrCysGlyPheAlaAspLeuMet
  1 AGGTCGCGCAATTTGGGTAAGGTCATCGATACCCTTACGTGCGGCTTCGCCGACCTCATG
    TCCAGCGCGTTAAACCCATTCCAGTAGCTATGGGAATGCACGCCGAAGCGGCTGGAGTAC

    GlyTyrIleProLeuValGlyAlaProLeuGlyGlyAlaAlaArgAlaLeuAlaHisGly
 61 GGGTACATACCGCTCGTCGGCGCCCCTCTTGGAGGCGCTGCCAGGGCCCTGGCGCATGGC
    CCCATGTATGGCGAGCAGCCGCGGGGAGAACCTCCGCGACGGTCCCGGGACCGCGTACCG

    ValArgValLeuGluAspGlyValAsnTyrAlaThrGlyAsnLeuProGlyCysSerPhe
121 GTCCGGGTTCTGGAAGACGGCGTGAACTATGCAACAGGGAACCTTCCTGGTTGCTCTTTC
    CAGGCCCAAGACCTTCTGCCGCACTTGATACGTTGTCCCTTGGAAGGACCAACGAGAAAG

    SerIlePheLeuLeuAlaLeuLeuSerCysLeuThrValProAlaSerAlaTyrGlnVal
181 TCTATCTTCCTTCTGGCCCTGCTCTCTTGCTTGACTGTGCCCGCTTCGGCCTACCAAGTG
    AGATAGAAGGAAGACCGGGACGAGAGAACGAACTGACACGGGCGAAGCCGGATGGTTCAC

    ArgAsnSerThrGlyLeuTyrHisValThrAsnAspCysProAsnSerSerIleValTyr
241 CGCAACTCCACGGGGCTTTACCACGTCACCAATGATTGCCCTAACTCGAGTATTGTGTAC
    GCGTTGAGGTGCCCCGAAATGGTGCAGTGGTTACTAACGGGATTGAGCTCATAACACATG

    GluAlaAlaAspAlaIleLeuHisThrProGlyCysValProCysValArgGluGlyAsn
301 GAGGCGGCCGATGCCATCCTGCACACTCCGGGGTGCGTCCCTTGCGTTCGTGAGGGCAAC
    CTCCGCCGGCTACGGTAGGACGTGTGAGGCCCCACGCAGGGAACGCAAGCACTCCCGTTG

    AlaSerArgCysTrpValAlaMetThrProThrValAlaThrArgAspGlyLysLeuPro
361 GCCTCGAGGTGTTGGGTGGCGATGACCCCTACGGTGGCCACCAGGGATGGCAAACTCCCC
    CGGAGCTCCACAACCCACCGCTACTGGGGATGCCACCGGTGGTCCCTACCGTTTGAGGGG

    AlaThrGlnLeuArgArgHisIleAspLeuLeuValGlySerAlaThrLeuCysSerAla
421 GCGACGCAGCTTCGACGTCACATCGATCTGCTTGTCGGGAGCGCCACCCTCTGTTCGGCC
    CGCTGCGTCGAAGCTGCAGTGTAGCTAGACGAACAGCCCTCGCGGTGGGAGACAAGCCGG

    LeuTyrValGlyAspLeuCysGlySerValPheLeuValGlyGlnLeuPheThrPheSer
481 CTCTACGTGGGGGACCTATGCGGGTCTGTCTTTCTTGTCGGCCAACTGTTCACCTTCTCT
    GAGATGCACCCCCTGGATACGCCCAGACAGAAAGAACAGCCGGTTGACAAGTGGAAGAGA

    ProArgArgHisTrpThrThrGlnGlyCysAsnCysSerIleTyrProGlyHisIleThr
541 CCCAGGCGCCACTGGACGACGCAAGGTTGCAATTGCTCTATCTATCCCGGCCATATAACG
    GGGTCCGCGGTGACCTGCTGCGTTCCAACGTTAACGAGATAGATAGGGCCGGTATATTGC

    GlyHisArgMetAlaTrpAspMetMetMetAsnTrpSerProThrThrAlaLeuValMet
601 GGTCACCGCATGGCATGGGATATGATGATGAACTGGTCCCCTACGACGGCGTTGGTAATG
    CCAGTGGCGTACCGTACCCTATACTACTACTTGACCAGGGGATGCTGCCGCAACCATTAC

    AlaGlnLeuLeuArgIleProGlnAlaIleLeuAspMetIleAlaGlyAlaHisTrpGly
661 GCTCAGCTGCTCCGGATCCCACAAGCCATCTTGGACATGATCGCTGGTGCTCACTGGGGA
    CGAGTCGACGAGGCCTAGGGTGTTCGGTAGAACCTGTACTAGCGACCACGAGTGACCCCT

    ValLeuAlaGlyIleAlaTyrPheSerMetValGlyAsnTrpAlaLysValLeuValVal
721 GTCCTGGCGGGCATAGCGTATTTCTCCATGGTGGGGAACTGGGCGAAGGTCCTGGTAGTG
    CAGGACCGCCCGTATCGCATAAAGAGGTACCACCCCTTGACCCGCTTCCAGGACCATCAC

    LeuLeuLeuPheAlaGlyValAspAlaGluThrHisValThrGlyGlySerAlaGlyHis
781 CTGCTGCTATTTGCCGGCGTCGACGCGGAAACCCACGTCACCGGGGGAAGTGCCGGCCAC
    GACGACGATAAACGGCCGCAGCTGCGCCTTTGGGTGCAGTGGCCCCCTTCACGGCCGGTG
```

FIG. 16-2

```
      ThrValSerGlyPheValSerLeuLeuAlaProGlyAlaLysGlnAsnValGlnLeuIle
841   ACTGTGTCTGGATTTGTTAGCCTCCTCGCACCAGGCGCCAAGCAGAACGTCCAGCTGATC
      TGACACAGACCTAAACAATCGGAGGAGCGTGGTCCGCGGTTCGTCTTGCAGGTCGACTAG

      AsnThrAsnGlySerTrpHisLeuAsnSerThrAlaLeuAsnCysAsnAspSerLeuAsn
901   AACACCAACGGCAGTTGGCACCTCAATAGCACGGCCCTGAACTGCAATGATAGCCTCAAC
      TTGTGGTTGCCGTCAACCGTGGAGTTATCGTGCCGGGACTTGACGTTACTATCGGAGTTG

      ThrGlyTrpLeuAlaGlyLeuPheTyrHisHisLysPheAsnSerSerGlyCysProGlu
961   ACCGGCTGGTTGGCAGGGCTTTTCTATCACCACAAGTTCAACTCTTCAGGCTGTCCTGAG
      TGGCCGACCAACCGTCCCGAAAAGATAGTGGTGTTCAAGTTGAGAAGTCCGACAGGACTC

      ArgLeuAlaSerCysArgProLeuThrAspPheAspGlnGlyTrpGlyProIleSerTyr
1021  AGGCTAGCCAGCTGCCGACCCCTTACCGATTTTGACCAGGGCTGGGGCCCTATCAGTTAT
      TCCGATCGGTCGACGGCTGGGGAATGGCTAAAACTGGTCCCGACCCCGGGATAGTCAATA

      AlaAsnGlySerGlyProAspGlnArgProTyrCysTrpHisTyrProProLysProCys
1081  GCCAACGGAAGCGGCCCCGACCAGCGCCCCTACTGCTGGCACTACCCCCCAAAACCTTGC
      CGGTTGCCTTCGCCGGGGCTGGTCGCGGGGATGACGACCGTGATGGGGGGTTTTGGAACG

      GlyIleValProAlaLysSerValCysGlyProValTyrCysPheThrProSerProVal
1141  GGTATTGTGCCCGCGAAGAGTGTGTGTGGTCCGGTATATTGCTTCACTCCCAGCCCCGTG
      CCATAACACGGGCGCTTCTCACACACACCAGGCCATATAACGAAGTGAGGGTCGGGGCAC

      ValValGlyThrThrAspArgSerGlyAlaProThrTyrSerTrpGlyGluAsnAspThr
1201  GTGGTGGGAACGACCGACAGGTCGGGCGCGCCCACCTACAGCTGGGGTGAAAATGATACG
      CACCACCCTTGCTGGCTGTCCAGCCCGCGCGGGTGGATGTCGACCCCACTTTTACTATGC

      AspValPheValLeuAsnAsnThrArgProProLeuGlyAsnTrpPheGlyCysThrTrp
1261  GACGTCTTCGTCCTTAACAATACCAGGCCACCGCTGGGCAATTGGTTCGGTTGTACCTGG
      CTGCAGAAGCAGGAATTGTTATGGTCCGGTGGCGACCCGTTAACCAAGCCAACATGGACC

      MetAsnSerThrGlyPheThrLysValCysGlyAlaProProCysValIleGlyGlyAla
1321  ATGAACTCAACTGGATTCACCAAAGTGTGCGGAGCGCCTCCTTGTGTCATCGGAGGGGCG
      TACTTGAGTTGACCTAAGTGGTTTCACACGCCTCGCGGAGGAACACAGTAGCCTCCCCGC

      GlyAsnAsnThrLeuHisCysProThrAspCysPheArgLysHisProAspAlaThrTyr
1381  GGCAACAACACCCTGCACTGCCCCACTGATTGCTTCCGCAAGCATCCGGACGCCACATAC
      CCGTTGTTGTGGGACGTGACGGGGTGACTAACGAAGGCGTTCGTAGGCCTGCGGTGTATG

      SerArgCysGlySerGlyProTrpIleThrProArgCysLeuValAspTyrProTyrArg
1441  TCTCGGTGCGGCTCCGGTCCCTGGATCACACCCAGGTGCCTGGTCGACTACCCGTATAGG
      AGAGCCACGCCGAGGCCAGGGACCTAGTGTGGGTCCACGGACCAGCTGATGGGCATATCC

      LeuTrpHisTyrProCysThrIleAsnTyrThrIlePheLysIleArgMetTyrValGly
1501  CTTTGGCATTATCCTTGTACCATCAACTACACCATATTTAAAATCAGGATGTACGTGGGA
      GAAACCGTAATAGGAACATGGTAGTTGATGTGGTATAAATTTTAGTCCTACATGCACCCT

      GlyValGluHisArgLeuGluAlaAlaCysAsnTrpThrArgGlyGluArgCysAspLeu
1561  GGGGTCGAACACAGGCTGGAAGCTGCCTGCAACTGGACGCGGGGCGAACGTTGCGATCTG
      CCCCAGCTTGTGTCCGACCTTCGACGGACGTTGACCTGCGCCCCGCTTGCAACGCTAGAC

      GluAspArgAspArgSerGluLeuSerProLeuLeuLeuThrThrThrGlnTrpGlnVal
1621  GAAGACAGGGACAGGTCCGAGCTCAGCCCGTTACTGCTGACCACTACACAGTGGCAGGTC
      CTTCTGTCCCTGTCCAGGCTCGAGTCGGGCAATGACGACTGGTGATGTGTCACCGTCCAG

      LeuProCysSerPheThrThrLeuProAlaLeuSerThrGlyLeuIleHisLeuHisGln
1681  CTCCCGTGTTCCTTCACAACCCTACCAGCCTTGTCCACCGGCCTCATCCACCTCCACCAG
      GAGGGCACAAGGAAGTGTTGGGATGGTCGGAACAGGTGGCCGGAGTAGGTGGAGGTGGTC

      AsnIleValAspValGlnTyrLeuTyrGlyValGlySerSerIleAlaSerTrpAlaIle
1741  AACATTGTGGACGTGCAGTACTTGTACGGGGTGGGGTCAAGCATCGCGTCCTGGGCCATT
      TTGTAACACCTGCACGTCATGAACATGCCCCACCCCAGTTCGTAGCGCAGGACCCGGTAA

      LysTrpGluTyrValValLeuLeuPheLeuLeuLeuAlaAspAlaArgValCysSerCys
1801  AAGTGGGAGTACGTCGTTCTCCTGTTCCTTCTGCTTGCAGACGCGCGCGTCTGCTCCTGC
```

FIG. 16-3

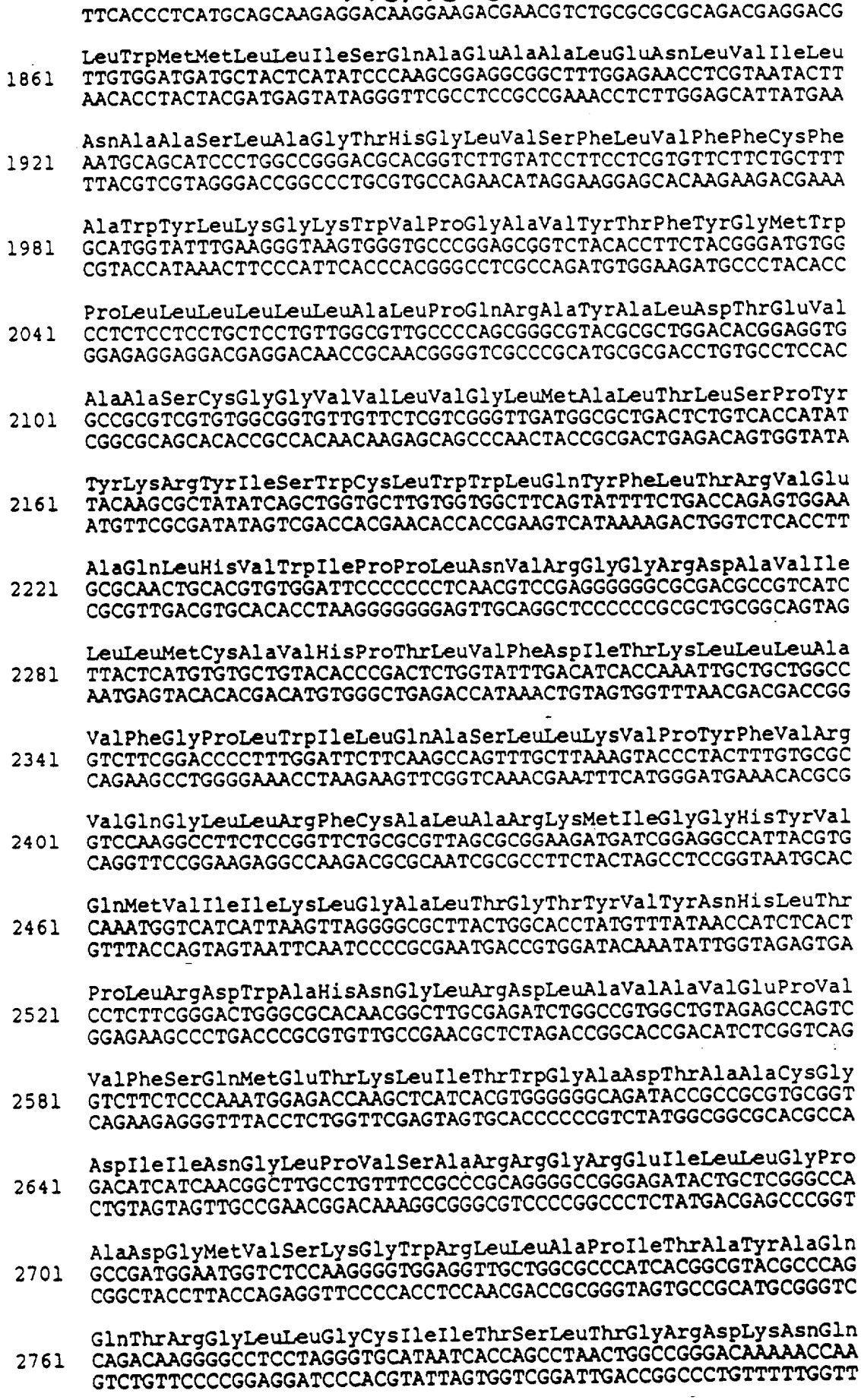

TTCACCCTCATGCAGCAAGAGGACAAGGAAGACGAACGTCTGCGCGCGCAGACGAGGACG
LeuTrpMetMetLeuLeuIleSerGlnAlaGluAlaAlaLeuGluAsnLeuValIleLeu
1861 TTGTGGATGATGCTACTCATATCCCAAGCGGAGGCGGCTTTGGAGAACCTCGTAATACTT
AACACCTACTACGATGAGTATAGGGTTCGCCTCCGCCGAAACCTCTTGGAGCATTATGAA
AsnAlaAlaSerLeuAlaGlyThrHisGlyLeuValSerPheLeuValPhePheCysPhe
1921 AATGCAGCATCCCTGGCCGGGACGCACGGTCTTGTATCCTTCCTCGTGTTCTTCTGCTTT
TTACGTCGTAGGGACCGGCCCTGCGTGCCAGAACATAGGAAGGAGCACAAGAAGACGAAA
AlaTrpTyrLeuLysGlyLysTrpValProGlyAlaValTyrThrPheTyrGlyMetTrp
1981 GCATGGTATTTGAAGGGTAAGTGGGTGCCCGGAGCGGTCTACACCTTCTACGGGATGTGG
CGTACCATAAACTTCCCATTCACCCACGGGCCTCGCCAGATGTGGAAGATGCCCTACACC
ProLeuLeuLeuLeuLeuAlaLeuProGlnArgAlaTyrAlaLeuAspThrGluVal
2041 CCTCTCCTCCTGCTCCTGTTGGCGTTGCCCCAGCGGGCGTACGCGCTGGACACGGAGGTG
GGAGAGGAGGACGAGGACAACCGCAACGGGGTCGCCCGCATGCGCGACCTGTGCCTCCAC
AlaAlaSerCysGlyGlyValValLeuValGlyLeuMetAlaLeuThrLeuSerProTyr
2101 GCCGCGTCGTGTGGCGGTGTTGTTCTCGTCGGGTTGATGGCGCTGACTCTGTCACCATAT
CGGCGCAGCACACCGCCACAACAAGAGCAGCCCAACTACCGCGACTGAGACAGTGGTATA
TyrLysArgTyrIleSerTrpCysLeuTrpTrpLeuGlnTyrPheLeuThrArgValGlu
2161 TACAAGCGCTATATCAGCTGGTGCTTGTGGTGGCTTCAGTATTTTCTGACCAGAGTGGAA
ATGTTCGCGATATAGTCGACCACGAACACCACCGAAGTCATAAAAGACTGGTCTCACCTT
AlaGlnLeuHisValTrpIleProProLeuAsnValArgGlyGlyArgAspAlaValIle
2221 GCGCAACTGCACGTGTGGATTCCCCCCCTCAACGTCCGAGGGGGGCGCGACGCCGTCATC
CGCGTTGACGTGCACACCTAAGGGGGGGAGTTGCAGGCTCCCCCCGCGCTGCGGCAGTAG
LeuLeuMetCysAlaValHisProThrLeuValPheAspIleThrLysLeuLeuLeuAla
2281 TTACTCATGTGTGCTGTACACCCGACTCTGGTATTTGACATCACCAAATTGCTGCTGGCC
AATGAGTACACACGACATGTGGGCTGAGACCATAAACTGTAGTGGTTTAACGACGACCGG
ValPheGlyProLeuTrpIleLeuGlnAlaSerLeuLeuLysValProTyrPheValArg
2341 GTCTTCGGACCCCTTTGGATTCTTCAAGCCAGTTTGCTTAAAGTACCCTACTTTGTGCGC
CAGAAGCCTGGGGAAACCTAAGAAGTTCGGTCAAACGAATTTCATGGGATGAAACACGCG
ValGlnGlyLeuLeuArgPheCysAlaLeuAlaArgLysMetIleGlyGlyHisTyrVal
2401 GTCCAAGGCCTTCTCCGGTTCTGCGCGTTAGCGCGGAAGATGATCGGAGGCCATTACGTG
CAGGTTCCGGAAGAGGCCAAGACGCGCAATCGCGCCTTCTACTAGCCTCCGGTAATGCAC
GlnMetValIleIleLysLeuGlyAlaLeuThrGlyThrTyrValTyrAsnHisLeuThr
2461 CAAATGGTCATCATTAAGTTAGGGGCGCTTACTGGCACCTATGTTTATAACCATCTCACT
GTTTACCAGTAGTAATTCAATCCCCGCGAATGACCGTGGATACAAATATTGGTAGAGTGA
ProLeuArgAspTrpAlaHisAsnGlyLeuArgAspLeuAlaValAlaValGluProVal
2521 CCTCTTCGGGACTGGGCGCACAACGGCTTGCGAGATCTGGCCGTGGCTGTAGAGCCAGTC
GGAGAAGCCCTGACCCGCGTGTTGCCGAACGCTCTAGACCGGCACCGACATCTCGGTCAG
ValPheSerGlnMetGluThrLysLeuIleThrTrpGlyAlaAspThrAlaAlaCysGly
2581 GTCTTCTCCCAAATGGAGACCAAGCTCATCACGTGGGGGGCAGATACCGCCGCGTGCGGT
CAGAAGAGGGTTTACCTCTGGTTCGAGTAGTGCACCCCCCGTCTATGGCGGCGCACGCCA
AspIleIleAsnGlyLeuProValSerAlaArgArgGlyArgGluIleLeuLeuGlyPro
2641 GACATCATCAACGGCTTGCCTGTTTCCGCCCGCAGGGGCCGGGAGATACTGCTCGGGCCA
CTGTAGTAGTTGCCGAACGGACAAAGGCGGGCGTCCCCGGCCCTCTATGACGAGCCCGGT
AlaAspGlyMetValSerLysGlyTrpArgLeuLeuAlaProIleThrAlaTyrAlaGln
2701 GCCGATGGAATGGTCTCCAAGGGGTGGAGGTTGCTGGCGCCCATCACGGCGTACGCCCAG
CGGCTACCTTACCAGAGGTTCCCCACCTCCAACGACCGCGGGTAGTGCCGCATGCGGGTC
GlnThrArgGlyLeuLeuGlyCysIleIleThrSerLeuThrGlyArgAspLysAsnGln
2761 CAGACAAGGGGCCTCCTAGGGTGCATAATCACCAGCCTAACTGGCCGGGACAAAAACCAA
GTCTGTTCCCCGGAGGATCCCACGTATTAGTGGTCGGATTGACCGGCCCTGTTTTTGGTT

FIG. 16-4

```
     ValGluGlyGluValGlnIleValSerThrAlaAlaGlnThrPheLeuAlaThrCysIle
2821 GTGGAGGGTGAGGTCCAGATTGTGTCAACTGCTGCCCAAACCTTCCTGGCAACGTGCATC
     CACCTCCCACTCCAGGTCTAACACAGTTGACGACGGGTTTGGAAGGACCGTTGCACGTAG

     AsnGlyValCysTrpThrValTyrHisGlyAlaGlyThrArgThrIleAlaSerProLys
2881 AATGGGGTGTGCTGGACTGTCTACCACGGGGCCGGAACGAGGACCATCGCGTCACCCAAG
     TTACCCCACACGACCTGACAGATGGTGCCCCGGCCTTGCTCCTGGTAGCGCAGTGGGTTC

     GlyProValIleGlnMetTyrThrAsnValAspGlnAspLeuValGlyTrpProAlaPro
2941 GGTCCTGTCATCCAGATGTATACCAATGTAGACCAAGACCTTGTGGGCTGGCCCGCTCCG
     CCAGGACAGTAGGTCTACATATGGTTACATCTGGTTCTGGAACACCCGACCGGGCGAGGC

     GlnGlySerArgSerLeuThrProCysThrCysGlySerSerAspLeuTyrLeuValThr
3001 CAAGGTAGCCGCTCATTGACACCCTGCACTTGCGGCTCCTCGGACCTTTACCTGGTCACG
     GTTCCATCGGCGAGTAACTGTGGGACGTGAACGCCGAGGAGCCTGGAAATGGACCAGTGC

     ArgHisAlaAspValIleProValArgArgArgGlyAspSerArgGlySerLeuLeuSer
3061 AGGCACGCCGATGTCATTCCCGTGCGCCGGCGGGGTGATAGCAGGGGCAGCCTGCTGTCG
     TCCGTGCGGCTACAGTAAGGGCACGCGGCCGCCCCACTATCGTCCCCGTCGGACGACAGC

     ProArgProIleSerTyrLeuLysGlySerSerGlyGlyProLeuLeuCysProAlaGly
3121 CCCCGGCCCATTTCCTACTTGAAAGGCTCCTCGGGGGGTCCGCTGTTGTGCCCCGCGGGG
     GGGGCCGGGTAAAGGATGAACTTTCCGAGGAGCCCCCCAGGCGACAACACGGGGCGCCCC

     HisAlaValGlyIlePheArgAlaAlaValCysThrArgGlyValAlaLysAlaValAsp
3181 CACGCCGTGGGCATATTTAGGGCCGCGGTGTGCACCCGTGGAGTGGCTAAGGCGGTGGAC
     GTGCGGCACCCGTATAAATCCCGGCGCCACACGTGGGCACCTCACCGATTCCGCCACCTG

     PheIleProValGluAsnLeuGluThrThrMetArgSerProValPheThrAspAsnSer
3241 TTTATCCCTGTGGAGAACCTAGAGACAACCATGAGGTCCCCGGTGTTCACGGATAACTCC
     AAATAGGGACACCTCTTGGATCTCTGTTGGTACTCCAGGGGCCACAAGTGCCTATTGAGG

     SerProProValValProGlnSerPheGlnValAlaHisLeuHisAlaProThrGlySer
3301 TCTCCACCAGTAGTGCCCCAGAGCTTCCAGGTGGCTCACCTCCATGCTCCCACAGGCAGC
     AGAGGTGGTCATCACGGGGTCTCGAAGGTCCACCGAGTGGAGGTACGAGGGTGTCCGTCG

     GlyLysSerThrLysValProAlaAlaTyrAlaAlaGlnGlyTyrLysValLeuValLeu
3361 GGCAAAAGCACCAAGGTCCCGGCTGCATATGCAGCTCAGGGCTATAAGGTGCTAGTACTC
     CCGTTTTCGTGGTTCCAGGGCCGACGTATACGTCGAGTCCCGATATTCCACGATCATGAG

     AsnProSerValAlaAlaThrLeuGlyPheGlyAlaTyrMetSerLysAlaHisGlyIle
3421 AACCCCTCTGTTGCTGCAACACTGGGCTTTGGTGCTTACATGTCCAAGGCTCATGGGATC
     TTGGGGAGACAACGACGTTGTGACCCGAAACCACGAATGTACAGGTTCCGAGTACCCTAG

     AspProAsnIleArgThrGlyValArgThrIleThrThrGlySerProIleThrTyrSer
3481 GATCCTAACATCAGGACCGGGGTGAGAACAATTACCACTGGCAGCCCCATCACGTACTCC
     CTAGGATTGTAGTCCTGGCCCCACTCTTGTTAATGGTGACCGTCGGGGTAGTGCATGAGG

     ThrTyrGlyLysPheLeuAlaAspGlyGlyCysSerGlyGlyAlaTyrAspIleIleIle
3541 ACCTACGGCAAGTTCCTTGCCGACGGCGGGTGCTCGGGGGGCGCTTATGACATAATAATT
     TGGATGCCGTTCAAGGAACGGCTGCCGCCCACGAGCCCCCCGCGAATACTGTATTATTAA

     CysAspGluCysHisSerThrAspAlaThrSerIleLeuGlyIleGlyThrValLeuAsp
3601 TGTGACGAGTGCCACTCCACGGATGCCACATCCATCTTGGGCATCGGCACTGTCCTTGAC
     ACACTGCTCACGGTGAGGTGCCTACGGTGTAGGTAGAACCCGTAGCCGTGACAGGAACTG

     GlnAlaGluThrAlaGlyAlaArgLeuValValLeuAlaThrAlaThrProProGlySer
3661 CAAGCAGAGACTGCGGGGGCGAGACTGGTTGTGCTCGCCACCGCCACCCCTCCGGGCTCC
     GTTCGTCTCTGACGCCCCCGCTCTGACCAACACGAGCGGTGGCGGTGGGGAGGCCCGAGG

     ValThrValProHisProAsnIleGluGluValAlaLeuSerThrThrGlyGluIlePro
3721 GTCACTGTGCCCCATCCCAACATCGAGGAGGTTGCTCTGTCCACCACCGGAGAGATCCCT
     CAGTGACACGGGGTAGGGTTGTAGCTCCTCCAACGAGACAGGTGGTGGCCTCTCTAGGGA

     PheTyrGlyLysAlaIleProLeuGluValIleLysGlyGlyArgHisLeuIlePheCys
3781 TTTTACGGCAAGGCTATCCCCCTCGAAGTAATCAAGGGGGGGAGACATCTCATCTTCTGT
```

FIG. 16-5

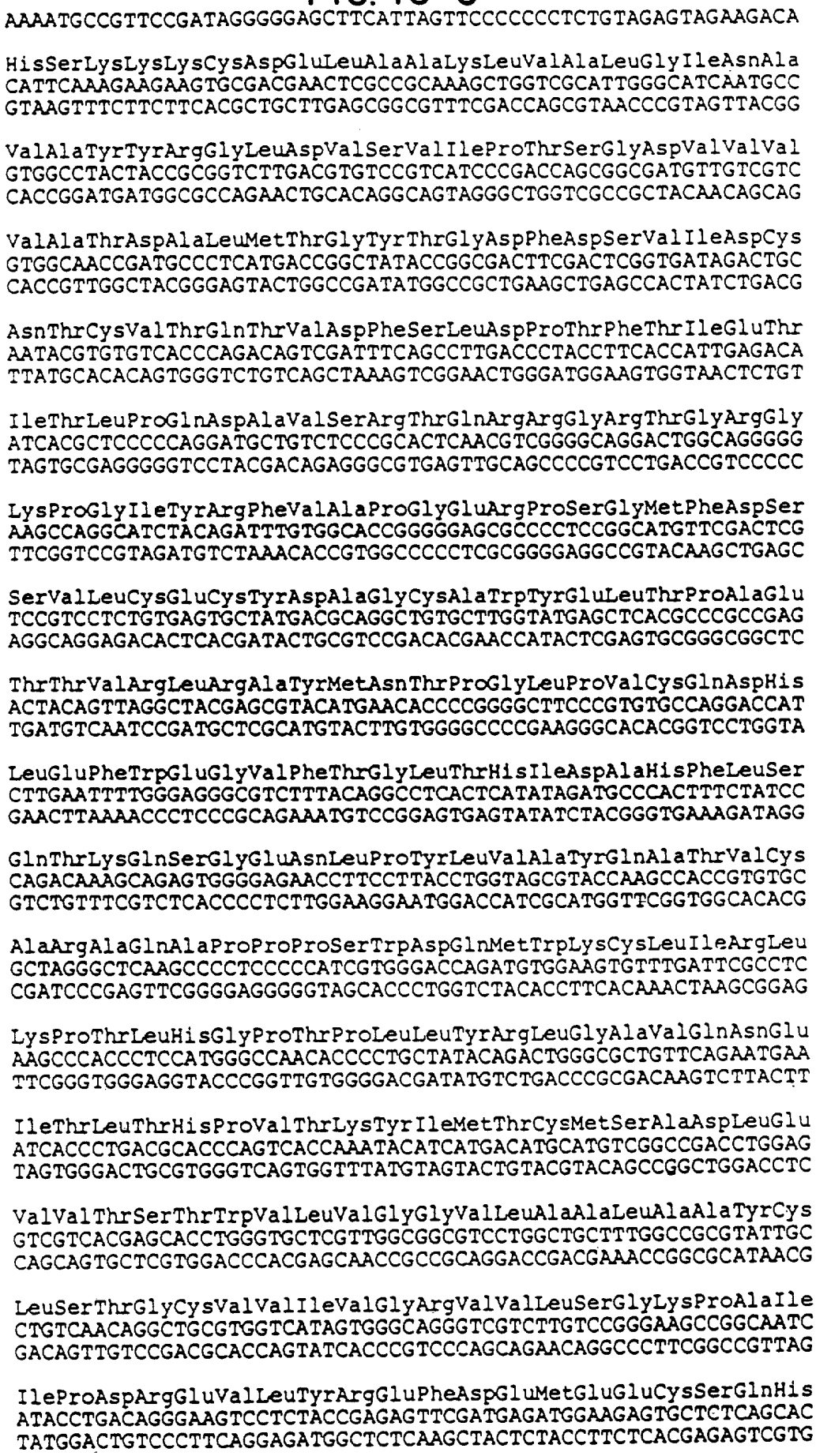

AAAATGCCGTTCCGATAGGGGGAGCTTCATTAGTTCCCCCCCTCTGTAGAGTAGAAGACA
HisSerLysLysLysCysAspGluLeuAlaAlaLysLeuValAlaLeuGlyIleAsnAla
3841 CATTCAAAGAAGAAGTGCGACGAACTCGCCGCAAAGCTGGTCGCATTGGGCATCAATGCC
GTAAGTTTCTTCTTCACGCTGCTTGAGCGGCGTTTCGACCAGCGTAACCCGTAGTTACGG
ValAlaTyrTyrArgGlyLeuAspValSerValIleProThrSerGlyAspValValVal
3901 GTGGCCTACTACCGCGGTCTTGACGTGTCCGTCATCCCGACCAGCGGCGATGTTGTCGTC
CACCGGATGATGGCGCCAGAACTGCACAGGCAGTAGGGCTGGTCGCCGCTACAACAGCAG
ValAlaThrAspAlaLeuMetThrGlyTyrThrGlyAspPheAspSerValIleAspCys
3961 GTGGCAACCGATGCCCTCATGACCGGCTATACCGGCGACTTCGACTCGGTGATAGACTGC
CACCGTTGGCTACGGGAGTACTGGCCGATATGGCCGCTGAAGCTGAGCCACTATCTGACG
AsnThrCysValThrGlnThrValAspPheSerLeuAspProThrPheThrIleGluThr
4021 AATACGTGTGTCACCCAGACAGTCGATTTCAGCCTTGACCCTACCTTCACCATTGAGACA
TTATGCACACAGTGGGTCTGTCAGCTAAAGTCGGAACTGGGATGGAAGTGGTAACTCTGT
IleThrLeuProGlnAspAlaValSerArgThrGlnArgArgGlyArgThrGlyArgGly
4081 ATCACGCTCCCCCAGGATGCTGTCTCCCGCACTCAACGTCGGGGCAGGACTGGCAGGGGG
TAGTGCGAGGGGGTCCTACGACAGAGGGCGTGAGTTGCAGCCCCGTCCTGACCGTCCCCC
LysProGlyIleTyrArgPheValAlaProGlyGluArgProSerGlyMetPheAspSer
4141 AAGCCAGGCATCTACAGATTTGTGGCACCGGGGGAGCGCCCCTCCGGCATGTTCGACTCG
TTCGGTCCGTAGATGTCTAAACACCGTGGCCCCCTCGCGGGGAGGCCGTACAAGCTGAGC
SerValLeuCysGluCysTyrAspAlaGlyCysAlaTrpTyrGluLeuThrProAlaGlu
4201 TCCGTCCTCTGTGAGTGCTATGACGCAGGCTGTGCTTGGTATGAGCTCACGCCCGCCGAG
AGGCAGGAGACACTCACGATACTGCGTCCGACACGAACCATACTCGAGTGCGGGCGGCTC
ThrThrValArgLeuArgAlaTyrMetAsnThrProGlyLeuProValCysGlnAspHis
4261 ACTACAGTTAGGCTACGAGCGTACATGAACACCCCGGGGCTTCCCGTGTGCCAGGACCAT
TGATGTCAATCCGATGCTCGCATGTACTTGTGGGGCCCCGAAGGGCACACGGTCCTGGTA
LeuGluPheTrpGluGlyValPheThrGlyLeuThrHisIleAspAlaHisPheLeuSer
4321 CTTGAATTTTGGGAGGGCGTCTTTACAGGCCTCACTCATATAGATGCCCACTTTCTATCC
GAACTTAAAACCCTCCCGCAGAAATGTCCGGAGTGAGTATATCTACGGGTGAAAGATAGG
GlnThrLysGlnSerGlyGluAsnLeuProTyrLeuValAlaTyrGlnAlaThrValCys
4381 CAGACAAAGCAGAGTGGGGAGAACCTTCCTTACCTGGTAGCGTACCAAGCCACCGTGTGC
GTCTGTTTCGTCTCACCCCTCTTGGAAGGAATGGACCATCGCATGGTTCGGTGGCACACG
AlaArgAlaGlnAlaProProProSerTrpAspGlnMetTrpLysCysLeuIleArgLeu
4441 GCTAGGGCTCAAGCCCCTCCCCCATCGTGGGACCAGATGTGGAAGTGTTTGATTCGCCTC
CGATCCCGAGTTCGGGGAGGGGGTAGCACCCTGGTCTACACCTTCACAAACTAAGCGGAG
LysProThrLeuHisGlyProThrProLeuLeuTyrArgLeuGlyAlaValGlnAsnGlu
4501 AAGCCCACCCTCCATGGGCCAACACCCCTGCTATACAGACTGGGCGCTGTTCAGAATGAA
TTCGGGTGGGAGGTACCCGGTTGTGGGGACGATATGTCTGACCCGCGACAAGTCTTACTT
IleThrLeuThrHisProValThrLysTyrIleMetThrCysMetSerAlaAspLeuGlu
4561 ATCACCCTGACGCACCCAGTCACCAAATACATCATGACATGCATGTCGGCCGACCTGGAG
TAGTGGGACTGCGTGGGTCAGTGGTTTATGTAGTACTGTACGTACAGCCGGCTGGACCTC
ValValThrSerThrTrpValLeuValGlyGlyValLeuAlaAlaLeuAlaAlaTyrCys
4621 GTCGTCACGAGCACCTGGGTGCTCGTTGGCGGCGTCCTGGCTGCTTTGGCCGCGTATTGC
CAGCAGTGCTCGTGGACCCACGAGCAACCGCCGCAGGACCGACGAAACCGGCGCATAACG
LeuSerThrGlyCysValValIleValGlyArgValValLeuSerGlyLysProAlaIle
4681 CTGTCAACAGGCTGCGTGGTCATAGTGGGCAGGGTCGTCTTGTCCGGGAAGCCGGCAATC
GACAGTTGTCCGACGCACCAGTATCACCCGTCCCAGCAGAACAGGCCCTTCGGCCGTTAG
IleProAspArgGluValLeuTyrArgGluPheAspGluMetGluGluCysSerGlnHis
4741 ATACCTGACAGGGAAGTCCTCTACCGAGAGTTCGATGAGATGGAAGAGTGCTCTCAGCAC
TATGGACTGTCCCTTCAGGAGATGGCTCTCAAGCTACTCTACCTTCTCACGAGAGTCGTG

FIG. 16-6

```
     LeuProTyrIleGluGlnGlyMetMetLeuAlaGluGlnPheLysGlnLysAlaLeuGly
4801 TTACCGTACATCGAGCAAGGGATGATGCTCGCCGAGCAGTTCAAGCAGAAGGCCCTCGGC
     AATGGCATGTAGCTCGTTCCCTACTACGAGCGGCTCGTCAAGTTCGTCTTCCGGGAGCCG

     LeuLeuGlnThrAlaSerArgGlnAlaGluValIleAlaProAlaValGlnThrAsnTrp
4861 CTCCTGCAGACCGCGTCCCGTCAGGCAGAGGTTATCGCCCCTGCTGTCCAGACCAACTGG
     GAGGACGTCTGGCGCAGGGCAGTCCGTCTCCAATAGCGGGGACGACAGGTCTGGTTGACC

     GlnLysLeuGluThrPheTrpAlaLysHisMetTrpAsnPheIleSerGlyIleGlnTyr
4921 CAAAAACTCGAGACCTTCTGGGCGAAGCATATGTGGAACTTCATCAGTGGGATACAATAC
     GTTTTTGAGCTCTGGAAGACCCGCTTCGTATACACCTTGAAGTAGTCACCCTATGTTATG

     LeuAlaGlyLeuSerThrLeuProGlyAsnProAlaIleAlaSerLeuMetAlaPheThr
4981 TTGGCGGGCTTGTCAACGCTGCCTGGTAACCCCGCCATTGCTTCATTGATGGCTTTTACA
     AACCGCCCGAACAGTTGCGACGGACCATTGGGGCGGTAACGAAGTAACTACCGAAAATGT

     AlaAlaValThrSerProLeuThrThrSerGlnThrLeuLeuPheAsnIleLeuGlyGly
5041 GCTGCTGTCACCAGCCCACTAACCACTAGCCAAACCCTCCTCTTCAACATATTGGGGGGG
     CGACGACAGTGGTCGGGTGATTGGTGATCGGTTTGGGAGGAGAAGTTGTATAACCCCCCC

     TrpValAlaAlaGlnLeuAlaAlaProGlyAlaAlaThrAlaPheValGlyAlaGlyLeu
5101 TGGGTGGCTGCCCAGCTCGCCGCCCCCGGTGCCGCTACTGCCTTTGTGGGCGCTGGCTTA
     ACCCACCGACGGGTCGAGCGGCGGGGGCCACGGCGATGACGGAAACACCCGCGACCGAAT

     AlaGlyAlaAlaIleGlySerValGlyLeuGlyLysValLeuIleAspIleLeuAlaGly
5161 GCTGGCGCCGCCATCGGCAGTGTTGGACTGGGGAAGGTCCTCATAGACATCCTTGCAGGG
     CGACCGCGGCGGTAGCCGTCACAACCTGACCCCTTCCAGGAGTATCTGTAGGAACGTCCC

     TyrGlyAlaGlyValAlaGlyAlaLeuValAlaPheLysIleMetSerGlyGluValPro
5221 TATGGCGCGGGCGTGGCGGGAGCTCTTGTGGCATTCAAGATCATGAGCGGTGAGGTCCCC
     ATACCGCGCCCGCACCGCCCTCGAGAACACCGTAAGTTCTAGTACTCGCCACTCCAGGGG

     SerThrGluAspLeuValAsnLeuLeuProAlaIleLeuSerProGlyAlaLeuValVal
5281 TCCACGGAGGACCTGGTCAATCTACTGCCCGCCATCCTCTCGCCCGGAGCCCTCGTAGTC
     AGGTGCCTCCTGGACCAGTTAGATGACGGGCGGTAGGAGAGCGGGCCTCGGGAGCATCAG

     GlyValValCysAlaAlaIleLeuArgArgHisValGlyProGlyGluGlyAlaValGln
5341 GGCGTGGTCTGTGCAGCAATACTGCGCCGGCACGTTGGCCCGGGCGAGGGGGCAGTGCAG
     CCGCACCAGACACGTCGTTATGACGCGGCCGTGCAACCGGGCCCGCTCCCCCGTCACGTC

     TrpMetAsnArgLeuIleAlaPheAlaSerArgGlyAsnHisValSerProThrHisTyr
5401 TGGATGAACCGGCTGATAGCCTTCGCCTCCCGGGGGAACCATGTTTCCCCCACGCACTAC
     ACCTACTTGGCCGACTATCGGAAGCGGAGGGCCCCCTTGGTACAAAGGGGGTGCGTGATG

     ValProGluSerAspAlaAlaAlaArgValThrAlaIleLeuSerSerLeuThrValThr
5461 GTGCCGGAGAGCGATGCAGCTGCCCGCGTCACTGCCATACTCAGCAGCCTCACTGTAACC
     CACGGCCTCTCGCTACGTCGACGGGCGCAGTGACGGTATGAGTCGTCGGAGTGACATTGG

     GlnLeuLeuArgArgLeuHisGlnTrpIleSerSerGluCysThrThrProCysSerGly
5521 CAGCTCCTGAGGCGACTGCACCAGTGGATAAGCTCGGAGTGTACCACTCCATGCTCCGGT
     GTCGAGGACTCCGCTGACGTGGTCACCTATTCGAGCCTCACATGGTGAGGTACGAGGCCA

     SerTrpLeuArgAspIleTrpAspTrpIleCysGluValLeuSerAspPheLysThrTrp
5581 TCCTGGCTAAGGGACATCTGGGACTGGATATGCGAGGTGTTGAGCGACTTTAAGACCTGG
     AGGACCGATTCCCTGTAGACCCTGACCTATACGCTCCACAACTCGCTGAAATTCTGGACC

     LeuLysAlaLysLeuMetProGlnLeuProGlyIleProPheValSerCysGlnArgGly
5641 CTAAAAGCTAAGCTCATGCCACAGCTGCCTGGGATCCCCTTTGTGTCCTGCCAGCGCGGG
     GATTTTCGATTCGAGTACGGTGTCGACGGACCCTAGGGGAAACACAGGACGGTCGCGCCC

     TyrLysGlyValTrpArgValAspGlyIleMetHisThrArgCysHisCysGlyAlaGlu
5701 TATAAGGGGGTCTGGCGAGTGGACGGCATCATGCACACTCGCTGCCACTGTGGAGCTGAG
     ATATTCCCCCAGACCGCTCACCTGCCGTAGTACGTGTGAGCGACGGTGACACCTCGACTC

     IleThrGlyHisValLysAsnGlyThrMetArgIleValGlyProArgThrCysArgAsn
5761 ATCACTGGACATGTCAAAAACGGGACGATGAGGATCGTCGGTCCTAGGACCTGCAGGAAC
```

FIG. 16-7

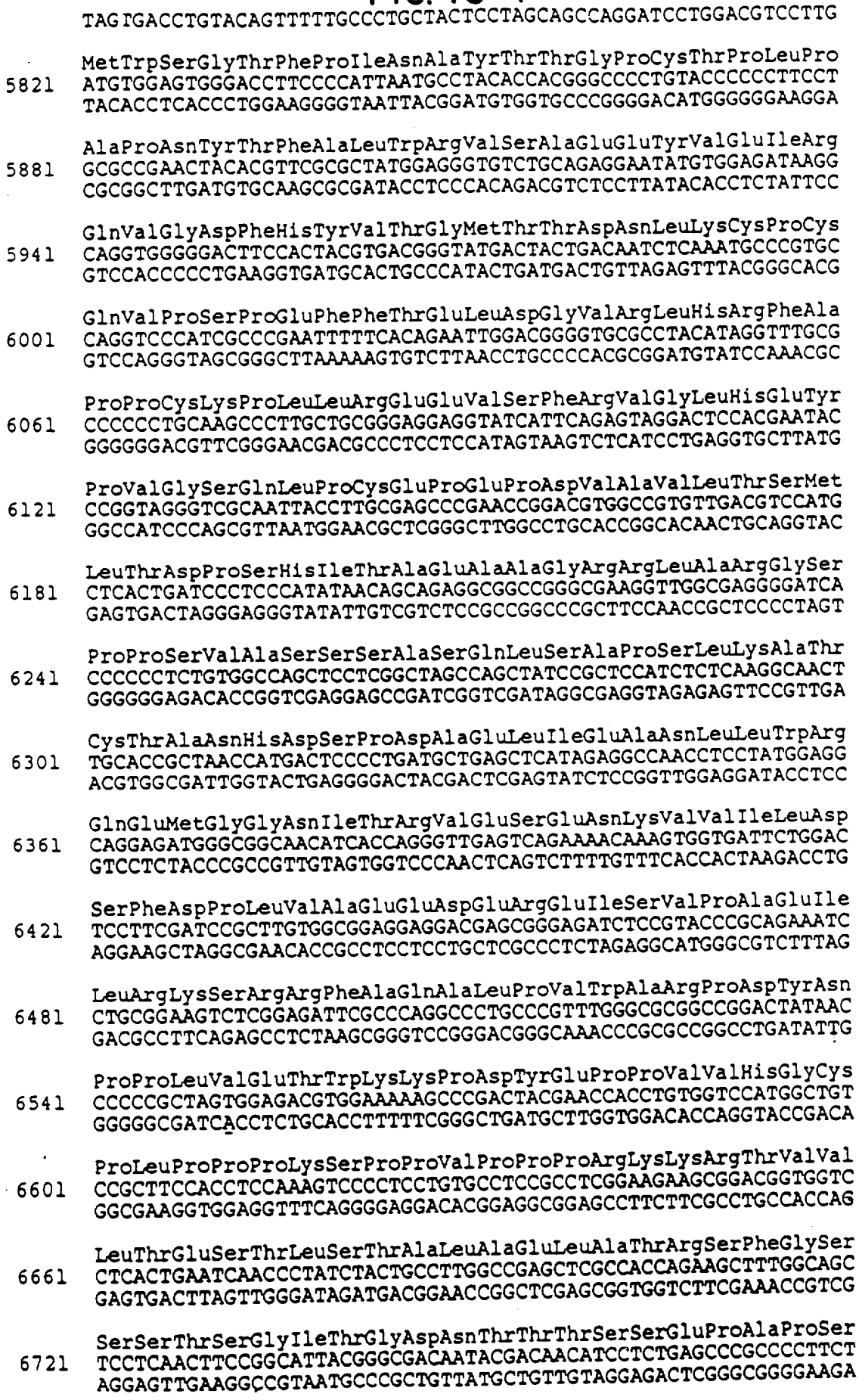

TAGTGACCTGTACAGTTTTTGCCCTGCTACTCCTAGCAGCCAGGATCCTGGACGTCCTTG
MetTrpSerGlyThrPheProIleAsnAlaTyrThrThrGlyProCysThrProLeuPro
5821 ATGTGGAGTGGGACCTTCCCCATTAATGCCTACACCACGGGCCCCTGTACCCCCCTTCCT
TACACCTCACCCTGGAAGGGGTAATTACGGATGTGGTGCCCGGGGACATGGGGGGAAGGA
AlaProAsnTyrThrPheAlaLeuTrpArgValSerAlaGluGluTyrValGluIleArg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

FIG. 16-8

```
                GlyCysProProAspSerAspAlaGluSerTyrSerSerMetProProLeuGluGlyGlu
6781            GGCTGCCCCCCCCGACTCCGACGCTGAGTCCTATTCCTCCATGCCCCCCCCTGGAGGGGGAG
                CCGACGGGGGGGGCTGAGGCTGCGACTCAGGATAAGGAGGTACGGGGGGGACCTCCCCCCTC

                ProGlyAspProAspLeuSerAspGlySerTrpSerThrValSerSerGluAlaAsnAla
6841            CCTGGGGATCCGGATCTTAGCGACGGGTCATGGTCAACGGTCAGTAGTGAGGCCAACGCG
                GGACCCCTAGGCCTAGAATCGCTGCCCAGTACCAGTTGCCAGTCATCACTCCGGTTGCGC

                GluAspValValCysCysSerMetSerTyrSerTrpThrGlyAlaLeuValThrProCys
6901            GAGGATGTCGTGTGCTGCTCAATGTCTTACTCTTGGACAGGCGCACTCGTCACCCCGTGC
                CTCCTACAGCACACGACGAGTTACAGAATGAGAACCTGTCCGCGTGAGCAGTGGGGCACG

                AlaAlaGluGluGlnLysLeuProIleAsnAlaLeuSerAsnSerLeuLeuArgHisHis
6961            GCCGCGGAAGAACAGAAACTGCCCATCAATGCACTAAGCAACTCGTTGCTACGTCACCAC
                CGGCGCCTTCTTGTCTTTGACGGGTAGTTACGTGATTCGTTGAGCAACGATGCAGTGGTG

                AsnLeuValTyrSerThrThrSerArgSerAlaCysGlnArgGlnLysLysValThrPhe
7021            AATTTGGTGTATTCCACCACCTCACGCAGTGCTTGCCAAAGGCAGAAGAAAGTCACATTT
                TTAAACCACATAAGGTGGTGGAGTGCGTCACGAACGGTTTCCGTCTTCTTTCAGTGTAAA

                AspArgLeuGlnValLeuAspSerHisTyrGlnAspValLeuLysGluValLysAlaAla
7081            GACAGACTGCAAGTTCTGGACAGCCATTACCAGGACGTACTCAAGGAGGTTAAAGCAGCG
                CTGTCTGACGTTCAAGACCTGTCGGTAATGGTCCTGCATGAGTTCCTCCAATTTCGTCGC

                AlaSerLysValLysAlaAsnLeuLeuSerValGluGluAlaCysSerLeuThrProPro
7141            GCGTCAAAAGTGAAGGCTAACTTGCTATCCGTAGAGGAAGCTTGCAGCCTGACGCCCCCA
                CGCAGTTTTCACTTCCGATTGAACGATAGGCATCTCCTTCGAACGTCGGACTGCGGGGGT

                HisSerAlaLysSerLysPheGlyTyrGlyAlaLysAspValArgCysHisAlaArgLys
7201            CACTCAGCCAAATCCAAGTTTGGTTATGGGGCAAAAGACGTCCGTTGCCATGCCAGAAAG
                GTGAGTCGGTTTAGGTTCAAACCAATACCCCGTTTTCTGCAGGCAACGGTACGGTCTTTC

                AlaValThrHisIleAsnSerValTrpLysAspLeuLeuGluAspAsnValThrProIle
7261            GCCGTAACCCACATCAACTCCGTGTGGAAAGACCTTCTGGAAGACAATGTAACACCAATA
                CGGCATTGGGTGTAGTTGAGGCACACCTTTCTGGAAGACCTTCTGTTACATTGTGGTTAT

                AspThrThrIleMetAlaLysAsnGluValPheCysValGlnProGluLysGlyGlyArg
7321            GACACTACCATCATGGCTAAGAACGAGGTTTTCTGCGTTCAGCCTGAGAAGGGGGGTCGT
                CTGTGATGGTAGTACCGATTCTTGCTCCAAAAGACGCAAGTCGGACTCTTCCCCCCAGCA

                LysProAlaArgLeuIleValPheProAspLeuGlyValArgValCysGluLysMetAla
7381            AAGCCAGCTCGTCTCATCGTGTTCCCCGATCTGGGCGTGCGCGTGTGCGAAAAGATGGCT
                TTCGGTCGAGCAGAGTAGCACAAGGGGCTAGACCCGCACGCGCACACGCTTTTCTACCGA

                LeuTyrAspValValThrLysLeuProLeuAlaValMetGlySerSerTyrGlyPheGln
7441            TTGTACGACGTGGTTACAAAGCTCCCCTTGGCCGTGATGGGAAGCTCCTACGGATTCCAA
                AACATGCTGCACCAATGTTTCGAGGGGAACCGGCACTACCCTTCGAGGATGCCTAAGGTT

                TyrSerProGlyGlnArgValGluPheLeuValGlnAlaTrpLysSerLysLysThrPro
7501            TACTCACCAGGACAGCGGGTTGAATTCCTCGTGCAAGCGTGGAAGTCCAAGAAAACCCCA
                ATGAGTGGTCCTGTCGCCCAACTTAAGGAGCACGTTCGCACCTTCAGGTTCTTTTGGGGT

                MetGlyPheSerTyrAspThrArgCysPheAspSerThrValThrGluSerAspIleArg
7561            ATGGGGTTCTCGTATGATACCCGCTGCTTTGACTCCACAGTCACTGAGAGCGACATCCGT
                TACCCCAAGAGCATACTATGGGCGACGAAACTGAGGTGTCAGTGACTCTCGCTGTAGGCA

                ThrGluGluAlaIleTyrGlnCysCysAspLeuAspProGlnAlaArgValAlaIleLys
7621            ACGGAGGAGGCAATCTACCAATGTTGTGACCTCGACCCCCAAGCCCGCGTGGCCATCAAG
                TGCCTCCTCCGTTAGATGGTTACAACACTGGAGCTGGGGGGTTCGGGCGCACCGGTAGTTC

                SerLeuThrGluArgLeuTyrValGlyGlyProLeuThrAsnSerArgGlyGluAsnCys
7681            TCCCTCACCGAGAGGCTTTATGTTGGGGGCCCTCTTACCAATTCAAGGGGGGAGAACTGC
                AGGGAGTGGCTCTCCGAAATACAACCCCCGGGAGAATGGTTAAGTTCCCCCCTCTTGACG

                GlyTyrArgArgCysArgAlaSerGlyValLeuThrThrSerCysGlyAsnThrLeuThr
7741            GGCTATCGCAGGTGCCGCGCGAGCGGCGTACTGACAACTAGCTGTGGTAACACCCTCACT
```

FIG. 16-9

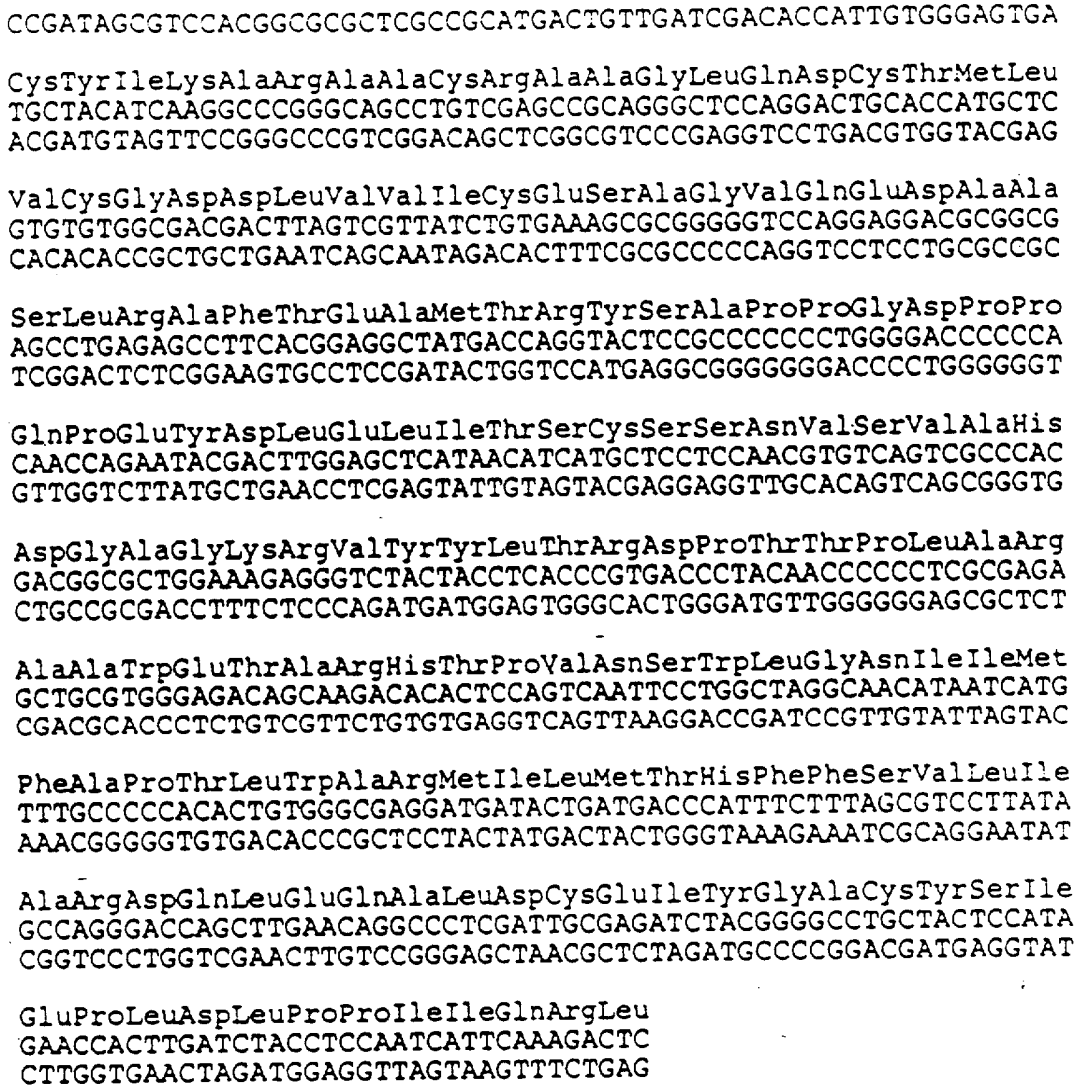

CCGATAGCGTCCACGGCGCGCTCGCCGCATGACTGTTGATCGACACCATTGTGGGAGTGA
CysTyrIleLysAlaArgAlaAlaCysArgAlaAlaGlyLeuGlnAspCysThrMetLeu
7801 TGCTACATCAAGGCCCGGGCAGCCTGTCGAGCCGCAGGGCTCCAGGACTGCACCATGCTC
ACGATGTAGTTCCGGGCCCGTCGGACAGCTCGGCGTCCCGAGGTCCTGACGTGGTACGAG
ValCysGlyAspAspLeuValValIleCysGluSerAlaGlyValGlnGluAspAlaAla
7861 GTGTGTGGCGACGACTTAGTCGTTATCTGTGAAAGCGCGGGGGTCCAGGAGGACGCGGCG
CACACACCGCTGCTGAATCAGCAATAGACACTTTCGCGCCCCCAGGTCCTCCTGCGCCGC
SerLeuArgAlaPheThrGluAlaMetThrArgTyrSerAlaProProGlyAspProPro
7921 AGCCTGAGAGCCTTCACGGAGGCTATGACCAGGTACTCCGCCCCCCCTGGGGACCCCCCA
TCGGACTCTCGGAAGTGCCTCCGATACTGGTCCATGAGGCGGGGGGGACCCCTGGGGGGT
GlnProGluTyrAspLeuGluLeuIleThrSerCysSerSerAsnValSerValAlaHis
7981 CAACCAGAATACGACTTGGAGCTCATAACATCATGCTCCTCCAACGTGTCAGTCGCCCAC
GTTGGTCTTATGCTGAACCTCGAGTATTGTAGTACGAGGAGGTTGCACAGTCAGCGGGTG
AspGlyAlaGlyLysArgValTyrTyrLeuThrArgAspProThrThrProLeuAlaArg
8041 GACGGCGCTGGAAAGAGGGTCTACTACCTCACCCGTGACCCTACAACCCCCCTCGCGAGA
CTGCCGCGACCTTTCTCCCAGATGATGGAGTGGGCACTGGGATGTTGGGGGGAGCGCTCT
AlaAlaTrpGluThrAlaArgHisThrProValAsnSerTrpLeuGlyAsnIleIleMet
8101 GCTGCGTGGGAGACAGCAAGACACACTCCAGTCAATTCCTGGCTAGGCAACATAATCATG
CGACGCACCCTCTGTCGTTCTGTGTGAGGTCAGTTAAGGACCGATCCGTTGTATTAGTAC
PheAlaProThrLeuTrpAlaArgMetIleLeuMetThrHisPhePheSerValLeuIle
8161 TTTGCCCCCACACTGTGGGCGAGGATGATACTGATGACCCATTTCTTTAGCGTCCTTATA
AAACGGGGGTGTGACACCCGCTCCTACTATGACTACTGGGTAAAGAAATCGCAGGAATAT
AlaArgAspGlnLeuGluGlnAlaLeuAspCysGluIleTyrGlyAlaCysTyrSerIle
8221 GCCAGGGACCAGCTTGAACAGGCCCTCGATTGCGAGATCTACGGGGCCTGCTACTCCATA
CGGTCCCTGGTCGAACTTGTCCGGGAGCTAACGCTCTAGATGCCCCGGACGATGAGGTAT
GluProLeuAspLeuProProIleIleGlnArgLeu
8281 GAACCACTTGATCTACCTCCAATCATTCAAAGACTC
CTTGGTGAACTAGATGGAGGTTAGTAAGTTTCTGAG

FIG. 17-1

```
-319  CACTCCACCATGAATCACTCCCCTGTGAGGAACTACTGTCTTCACGCAGAAAGCGTCTAG
      GTGAGGTGGTACTTAGTGAGGGGACACTCCTTGATGACAGAAGTGCGTCTTTCGCAGATC

-259  CCATGGCGTTAGTATGAGTGTCGTGCAGCCTCCAGGACCCCCCCTCCCGGGAGAGCCATA
      GGTACCGCAATCATACTCACAGCACGTCGGAGGTCCTGGGGGGGAGGGCCCTCTCGGTAT

-199  GTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCCTTTCTTGGA
      CACCAGACGCCTTGGCCACTCATGTGGCCTTAACGGTCCTGCTGGCCCAGGAAAGAACCT

-139  TCAACCCGCTCAATGCCTGGAGATTTGGGCGTGCCCCCGCAAGACTGCTAGCCGAGTAGT
      AGTTGGGCGAGTTACGGACCTCTAAACCCGCACGGGGGCGTTCTGACGATCGGCTCATCA

- 79  GTTGGGTCGCGAAAGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAGGGTGCTTGCGAGTGCCCCGGGAG
      CAACCCAGCGCTTTCCGGAACACCATGACGGACTATCCCACGAACGCTCACGGGGCCCTC

- 19  GTCTCGTAGACCGTGCACC
      CAGAGCATCTGGCACGTGG
                                   Arg   Thr
      MetSerThrAsnProLysProGlnLysLysAsnLysArgAsnThrAsnArgArgProGln
   1  ATGAGCACGAATCCTAAACCTCAAAAAAAAAAACAAACGTAACACCAACCGTCGCCCACAG
      TACTCGTGCTTAGGATTTGGAGTTTTTTTTTTGTTTGCATTGTGGTTGGCAGCGGGTGTC

      AspValLysPheProGlyGlyGlyGlnIleValGlyGlyValTyrLeuLeuProArgArg
  61  GACGTCAAGTTCCCGGGTGGCGGTCAGATCGTTGGTGGAGTTTACTTGTTGCCGCGCAGG
      CTGCAGTTCAAGGGCCCACCGCCAGTCTAGCAACCACCTCAAATGAACAACGGCGCGTCC

      GlyProArgLeuGlyValArgAlaThrArgLysThrSerGluArgSerGlnProArgGly
 121  GGCCCTAGATTGGGTGTGCGCGCGACGAGAAAGACTTCCGAGCGGTCGCAACCTCGAGGT
      CCGGGATCTAACCCACACGCGCGCTGCTCTTTCTGAAGGCTCGCCAGCGTTGGAGCTCCA

      ArgArgGlnProIleProLysAlaArgArgProGluGlyArgThrTrpAlaGlnProGly
 181  AGACGTCAGCCTATCCCCAAGGCTCGTCGGCCCGAGGGCAGGACCTGGGCTCAGCCCGGG
      TCTGCAGTCGGATAGGGGTTCCGAGCAGCCGGGCTCCCGTCCTGGACCCGAGTCGGGCCC

      TyrProTrpProLeuTyrGlyAsnGluGlyCysGlyTrpAlaGlyTrpLeuLeuSerPro
 241  TACCCTTGGCCCCTCTATGGCAATGAGGGCTGCGGGTGGGCGGGATGGCTCCTGTCTCCC
      ATGGGAACCGGGGAGATACCGTTACTCCCGACGCCCACCCGCCCTACCGAGGACAGAGGG

      ArgGlySerArgProSerTrpGlyProThrAspProArgArgArgSerArgAsnLeuGly
 301  CGTGGCTCTCGGCCTAGCTGGGGCCCCACAGACCCCCGGCGTAGGTCGCGCAATTTGGGT
      GCACCGAGAGCCGGATCGACCCCGGGGTGTCTGGGGGCCGCATCCAGCGCGTTAAACCCA

      LysValIleAspThrLeuThrCysGlyPheAlaAspLeuMetGlyTyrIleProLeuVal
 361  AAGGTCATCGATACCCTTACGTGCGGCTTCGCCGACCTCATGGGGTACATACCGCTCGTC
      TTCCAGTAGCTATGGGAATGCACGCCGAAGCGGCTGGAGTACCCCATGTATGGCGAGCAG

      GlyAlaProLeuGlyGlyAlaAlaArgAlaLeuAlaHisGlyValArgValLeuGluAsp
 421  GGCGCCCCTCTTGGAGGCGCTGCCAGGGCCCTGGCGCATGGCGTCCGGGTTCTGGAAGAC
      CCGCGGGGAGAACCTCCGCGACGGTCCCGGGACCGCGTACCGCAGGCCCAAGACCTTCTG

                                                      Thr
      GlyValAsnTyrAlaThrGlyAsnLeuProGlyCysSerPheSerIlePheLeuLeuAla
 481  GGCGTGAACTATGCAACAGGGAACCTTCCTGGTTGCTCTTTCTCTATCTTCCTTCTGGCC
      CCGCACTTGATACGTTGTCCCTTGGAAGGACCAACGAGAAAGAGATAGAAGGAAGACCGG

      LeuLeuSerCysLeuThrValProAlaSerAlaTyrGlnValArgAsnSerThrGlyLeu
 541  CTGCTCTCTTGCTTGACTGTGCCCGCTTCGGCCTACCAAGTGCGCAACTCCACGGGGCTT
      GACGAGAGAACGAACTGACACGGGCGAAGCCGGATGGTTCACGCGTTGAGGTGCCCCGAA

      TyrHisValThrAsnAspCysProAsnSerSerIleValTyrGluAlaAlaAspAlaIle
 601  TACCACGTCACCAATGATTGCCCTAACTCGAGTATTGTGTACGAGGCGGCCGATGCCATC
      ATGGTGCAGTGGTTACTAACGGGATTGAGCTCATAACACATGCTCCGCCGGCTACGGTAG

      LeuHisThrProGlyCysValProCysValArgGluGlyAsnAlaSerArgCysTrpVal
 661  CTGCACACTCCGGGGTGCGTCCCTTGCGTTCGTGAGGGCAACGCCTCGAGGTGTTGGGTG
```

FIG. 17-2

```
      AlaMetThrProThrValAlaThrArgAspGlyLysLeuProAlaThrGlnLeuArgArg
721   GCGATGACCCCTACGGTGGCCACCAGGGATGGCAAACTCCCCGCGACGCAGCTTCGACGT
      CGCTACTGGGGATGCCACCGGTGGTCCCTACCGTTTGAGGGGCGCTGCGTCGAAGCTGCA

      HisIleAspLeuLeuValGlySerAlaThrLeuCysSerAlaLeuTyrValGlyAspLeu
781   CACATCGATCTGCTTGTCGGGAGCGCCACCCTCTGTTCGGCCCTCTACGTGGGGGACCTA
      GTGTAGCTAGACGAACAGCCCTCGCGGTGGGAGACAAGCCGGGAGATGCACCCCCTGGAT

      CysGlySerValPheLeuValGlyGlnLeuPheThrPheSerProArgArgHisTrpThr
841   TGCGGGTCTGTCTTTCTTGTCGGCCAACTGTTCACCTTCTCTCCCAGGCGCCACTGGACG
      ACGCCCAGACAGAAAGAACAGCCGGTTGACAAGTGGAAGAGAGGGTCCGCGGTGACCTGC

      ThrGlnGlyCysAsnCysSerIleTyrProGlyHisIleThrGlyHisArgMetAlaTrp
901   ACGCAAGGTTGCAATTGCTCTATCTATCCCGGCCATATAACGGGTCACCGCATGGCATGG
      TGCGTTCCAACGTTAACGAGATAGATAGGGCCGGTATATTGCCCAGTGGCGTACCGTACC

                                                          Val
      AspMetMetMetAsnTrpSerProThrThrAlaLeuValMetAlaGlnLeuLeuArgIle
961   GATATGATGATGAACTGGTCCCCTACGACGGCGTTGGTAATGGCTCAGCTGCTCCGGATC
      CTATACTACTACTTGACCAGGGGATGCTGCCGCAACCATTACCGAGTCGACGAGGCCTAG

      ProGlnAlaIleLeuAspMetIleAlaGlyAlaHisTrpGlyValLeuAlaGlyIleAla
1021  CCACAAGCCATCTTGGACATGATCGCTGGTGCTCACTGGGGAGTCCTGGCGGGCATAGCG
      GGTGTTCGGTAGAACCTGTACTAGCGACCACGAGTGACCCCTCAGGACCGCCCGTATCGC

      TyrPheSerMetValGlyAsnTrpAlaLysValLeuValValLeuLeuLeuPheAlaGly
1081  TATTTCTCCATGGTGGGGAACTGGGCGAAGGTCCTGGTAGTGCTGCTGCTATTTGCCGGC
      ATAAAGAGGTACCACCCCTTGACCCGCTTCCAGGACCATCACGACGACGATAAACGGCCG

      ValAspAlaGluThrHisValThrGlyGlySerAlaGlyHisThrValSerGlyPheVal
1141  GTCGACGCGGAAACCCACGTCACCGGGGGAAGTGCCGGCCACACTGTGTCTGGATTTGTT
      CAGCTGCGCCTTTGGGTGCAGTGGCCCCCTTCACGGCCGGTGTGACACAGACCTAAACAA

      SerLeuLeuAlaProGlyAlaLysGlnAsnValGlnLeuIleAsnThrAsnGlySerTrp
1201  AGCCTCCTCGCACCAGGCGCCAAGCAGAACGTCCAGCTGATCAACACCAACGGCAGTTGG
      TCGGAGGAGCGTGGTCCGCGGTTCGTCTTGCAGGTCGACTAGTTGTGGTTGCCGTCAACC

      HisLeuAsnSerThrAlaLeuAsnCysAsnAspSerLeuAsnThrGlyTrpLeuAlaGly
1261  CACCTCAATAGCACGGCCCTGAACTGCAATGATAGCCTCAACACCGGCTGGTTGGCAGGG
      GTGGAGTTATCGTGCCGGGACTTGACGTTACTATCGGAGTTGTGGCCGACCAACCGTCCC

      LeuPheTyrHisHisLysPheAsnSerSerGlyCysProGluArgLeuAlaSerCysArg
1321  CTTTTCTATCACCACAAGTTCAACTCTTCAGGCTGTCCTGAGAGGCTAGCCAGCTGCCGA
      GAAAAGATAGTGGTGTTCAAGTTGAGAAGTCCGACAGGACTCTCCGATCGGTCGACGGCT

      ProLeuThrAspPheAspGlnGlyTrpGlyProIleSerTyrAlaAsnGlySerGlyPro
1381  CCCCTTACCGATTTTGACCAGGGCTGGGGCCCTATCAGTTATGCCAACGGAAGCGGCCCC
      GGGGAATGGCTAAAACTGGTCCCGACCCCGGGATAGTCAATACGGTTGCCTTCGCCGGGG

      AspGlnArgProTyrCysTrpHisTyrProProLysProCysGlyIleValProAlaLys
1441  GACCAGCGCCCCTACTGCTGGCACTACCCCCCAAAACCTTGCGGTATTGTGCCCGCGAAG
      CTGGTCGCGGGGATGACGACCGTGATGGGGGGTTTTGGAACGCCATAACACGGGCGCTTC

      SerValCysGlyProValTyrCysPheThrProSerProValValValGlyThrThrAsp
1501  AGTGTGTGTGGTCCGGTATATTGCTTCACTCCCAGCCCCGTGGTGGTGGGAACGACCGAC
      TCACACACACCAGGCCATATAACGAAGTGAGGGTCGGGGCACCACCACCCTTGCTGGCTG

      ArgSerGlyAlaProThrTyrSerTrpGlyGluAsnAspThrAspValPheValLeuAsn
1561  AGGTCGGGCGCGCCCACCTACAGCTGGGGTGAAAATGATACGGACGTCTTCGTCCTTAAC
      TCCAGCCCGCGCGGGTGGATGTCGACCCCACTTTTACTATGCCTGCAGAAGCAGGAATTG

      AsnThrArgProProLeuGlyAsnTrpPheGlyCysThrTrpMetAsnSerThrGlyPhe
1621  AATACCAGGCCACCGCTGGGCAATTGGTTCGGTTGTACCTGGATGAACTCAACTGGATTC
      TTATGGTCCGGTGGCGACCCGTTAACCAAGCCAACATGGACCTACTTGAGTTGACCTAAG
```

FIG. 17-3

```
                ThrLysValCysGlyAlaProProCysValIleGlyGlyAlaGlyAsnAsnThrLeuHis
1681            ACCAAAGTGTGCGGAGCGCCTCCTTGTGTCATCGGAGGGGCGGGCAACAACACCCTGCAC
                TGGTTTCACACGCCTCGCGGAGGAACACAGTAGCCTCCCCGCCCGTTGTTGTGGGACGTG

                CysProThrAspCysPheArgLysHisProAspAlaThrTyrSerArgCysGlySerGly
1741            TGCCCCACTGATTGCTTCCGCAAGCATCCGGACGCCACATACTCTCGGTGCGGCTCCGGT
                ACGGGGTGACTAACGAAGGCGTTCGTAGGCCTGCGGTGTATGAGAGCCACGCCGAGGCCA

                      Leu
                ProTrpIleThrProArgCysLeuValAspTyrProTyrArgLeuTrpHisTyrProCys
1801            CCCTGGATCACACCCAGGTGCCTGGTCGACTACCCGTATAGGCTTTGGCATTATCCTTGT
                GGGACCTAGTGTGGGTCCACGGACCAGCTGATGGGCATATCCGAAACCGTAATAGGAACA

                ThrIleAsnTyrThrIlePheLysIleArgMetTyrValGlyGlyValGluHisArgLeu
1861            ACCATCAACTACACCATATTTAAAATCAGGATGTACGTGGGAGGGGTCGAACACAGGCTG
                TGGTAGTTGATGTGGTATAAATTTTAGTCCTACATGCACCCTCCCCAGCTTGTGTCCGAC

                GluAlaAlaCysAsnTrpThrArgGlyGluArgCysAspLeuGluAspArgAspArgSer
1921            GAAGCTGCCTGCAACTGGACGCGGGGCGAACGTTGCGATCTGGAAGACAGGGACAGGTCC
                CTTCGACGGACGTTGACCTGCGCCCCGCTTGCAACGCTAGACCTTCTGTCCCTGTCCAGG

                GluLeuSerProLeuLeuLeuThrThrThrGlnTrpGlnValLeuProCysSerPheThr
1981            GAGCTCAGCCCGTTACTGCTGACCACTACACAGTGGCAGGTCCTCCCGTGTTCCTTCACA
                CTCGAGTCGGGCAATGACGACTGGTGATGTGTCACCGTCCAGGAGGGCACAAGGAAGTGT

                ThrLeuProAlaLeuSerThrGlyLeuIleHisLeuHisGlnAsnIleValAspValGln
2041            ACCCTACCAGCCTTGTCCACCGGCCTCATCCACCTCCACCAGAACATTGTGGACGTGCAG
                TGGGATGGTCGGAACAGGTGGCCGGAGTAGGTGGAGGTGGTCTTGTAACACCTGCACGTC

                TyrLeuTyrGlyValGlySerSerIleAlaSerTrpAlaIleLysTrpGluTyrValVal
2101            TACTTGTACGGGGTGGGGTCAAGCATCGCGTCCTGGGCCATTAAGTGGGAGTACGTCGTT
                ATGAACATGCCCCACCCCAGTTCGTAGCGCAGGACCCGGTAATTCACCCTCATGCAGCAA

                LeuLeuPheLeuLeuLeuAlaAspAlaArgValCysSerCysLeuTrpMetMetLeuLeu
2161            CTCCTGTTCCTTCTGCTTGCAGACGCGCGCGTCTGCTCCTGCTTGTGGATGATGCTACTC
                GAGGACAAGGAAGACGAACGTCTGCGCGCGCAGACGAGGACGAACACCTACTACGATGAG

                IleSerGlnAlaGluAlaAlaLeuGluAsnLeuValIleLeuAsnAlaAlaSerLeuAla
2221            ATATCCCAAGCGGAGGCGGCTTTGGAGAACCTCGTAATACTTAATGCAGCATCCCTGGCC
                TATAGGGTTCGCCTCCGCCGAAACCTCTTGGAGCATTATGAATTACGTCGTAGGGACCGG

                GlyThrHisGlyLeuValSerPheLeuValPhePheCysPheAlaTrpTyrLeuLysGly
2281            GGGACGCACGGTCTTGTATCCTTCCTCGTGTTCTTCTGCTTTGCATGGTATTTGAAGGGT
                CCCTGCGTGCCAGAACATAGGAAGGAGCACAAGAAGACGAAACGTACCATAAACTTCCCA

                LysTrpValProGlyAlaValTyrThrPheTyrGlyMetTrpProLeuLeuLeuLeuLeu
2341            AAGTGGGTGCCCGGAGCGGTCTACACCTTCTACGGGATGTGGCCTCTCCTCCTGCTCCTG
                TTCACCCACGGGCCTCGCCAGATGTGGAAGATGCCCTACACCGGAGAGGAGGACGAGGAC

                LeuAlaLeuProGlnArgAlaTyrAlaLeuAspThrGluValAlaAlaSerCysGlyGly
2401            TTGGCGTTGCCCCAGCGGGCGTACGCGCTGGACACGGAGGTGGCCGCGTCGTGTGGCGGT
                AACCGCAACGGGGTCGCCCGCATGCGCGACCTGTGCCTCCACCGGCGCAGCACACCGCCA

                ValValLeuValGlyLeuMetAlaLeuThrLeuSerProTyrTyrLysArgTyrIleSer
2461            GTTGTTCTCGTCGGGTTGATGGCGCTGACTCTGTCACCATATTACAAGCGCTATATCAGC
                CAACAAGAGCAGCCCAACTACCGCGACTGAGACAGTGGTATAATGTTCGCGATATAGTCG

                                  Asn
                TrpCysLeuTrpTrpLeuGlnTyrPheLeuThrArgValGluAlaGlnLeuHisValTrp
2521            TGGTGCTTGTGGTGGCTTCAGTATTTTCTGACCAGAGTGGAAGCGCAACTGCACGTGTGG
                ACCACGAACACCACCGAAGTCATAAAAGACTGGTCTCACCTTCGCGTTGACGTGCACACC

                IleProProLeuAsnValArgGlyGlyArgAspAlaValIleLeuLeuMetCysAlaVal
2581            ATTCCCCCCCCTCAACGTCCGAGGGGGGCGCGACGCCGTCATCTTACTCATGTGTGCTGTA
                TAAGGGGGGGAGTTGCAGGCTCCCCCCGCGCTGCGGCAGTAGAATGAGTACACACGACAT
```

FIG. 17-4

```
                HisProThrLeuValPheAspIleThrLysLeuLeuLeuAlaValPheGlyProLeuTrp
2641            CACCCGACTCTGGTATTTGACATCACCAAATTGCTGCTGGCCGTCTTCGGACCCCTTTGG
                GTGGGCTGAGACCATAAACTGTAGTGGTTTAACGACGACCGGCAGAAGCCTGGGGAAACC

                IleLeuGlnAlaSerLeuLeuLysValProTyrPheValArgValGlnGlyLeuLeuArg
2701            ATTCTTCAAGCCAGTTTGCTTAAAGTACCCTACTTTGTGCGCGTCCAAGGCCTTCTCCGG
                TAAGAAGTTCGGTCAAACGAATTTCATGGGATGAAACACGCGCAGGTTCCGGAAGAGGCC

                PheCysAlaLeuAlaArgLysMetIleGlyGlyHisTyrValGlnMetValIleIleLys
2761            TTCTGCGCGTTAGCGCGGAAGATGATCGGAGGCCATTACGTGCAAATGGTCATCATTAAG
                AAGACGCGCAATCGCGCCTTCTACTAGCCTCCGGTAATGCACGTTTACCAGTAGTAATTC

                LeuGlyAlaLeuThrGlyThrTyrValTyrAsnHisLeuThrProLeuArgAspTrpAla
2821            TTAGGGGCGCTTACTGGCACCTATGTTTATAACCATCTCACTCCTCTTCGGGACTGGGCG
                AATCCCCGCGAATGACCGTGGATACAAATATTGGTAGAGTGAGGAGAAGCCCTGACCCGC

                HisAsnGlyLeuArgAspLeuAlaValAlaValGluProValValPheSerGlnMetGlu
2881            CACAACGGCTTGCGAGATCTGGCCGTGGCTGTAGAGCCAGTCGTCTTCTCCCAAATGGAG
                GTGTTGCCGAACGCTCTAGACCGGCACCGACATCTCGGTCAGCAGAAGAGGGTTTACCTC

                ThrLysLeuIleThrTrpGlyAlaAspThrAlaAlaCysGlyAspIleIleAsnGlyLeu
2941            ACCAAGCTCATCACGTGGGGGGCAGATACCGCCGCGTGCGGTGACATCATCAACGGCTTG
                TGGTTCGAGTAGTGCACCCCCCGTCTATGGCGGCGCACGCCACTGTAGTAGTTGCCGAAC

                ProValSerAlaArgArgGlyArgGluIleLeuLeuGlyProAlaAspGlyMetValSer
3001            CCTGTTTCCGCCCGCAGGGGCCGGGAGATACTGCTCGGGCCAGCCGATGGAATGGTCTCC
                GGACAAAGGCGGGCGTCCCCGGCCCTCTATGACGAGCCCGGTCGGCTACCTTACCAGAGG

                LysGlyTrpArgLeuLeuAlaProIleThrAlaTyrAlaGlnGlnThrArgGlyLeuLeu
3061            AAGGGGTGGAGGTTGCTGGCGCCCATCACGGCGTACGCCCAGCAGACAAGGGGCCTCCTA
                TTCCCCACCTCCAACGACCGCGGGTAGTGCCGCATGCGGGTCGTCTGTTCCCCGGAGGAT

                GlyCysIleIleThrSerLeuThrGlyArgAspLysAsnGlnValGluGlyGluValGln
3121            GGGTGCATAATCACCAGCCTAACTGGCCGGGACAAAAACCAAGTGGAGGGTGAGGTCCAG
                CCCACGTATTAGTGGTCGGATTGACCGGCCCTGTTTTTGGTTCACCTCCCACTCCAGGTC

                IleValSerThrAlaAlaGlnThrPheLeuAlaThrCysIleAsnGlyValCysTrpThr
3181            ATTGTGTCAACTGCTGCCCAAACCTTCCTGGCAACGTGCATCAATGGGGTGTGCTGGACT
                TAACACAGTTGACGACGGGTTTGGAAGGACCGTTGCACGTAGTTACCCCACACGACCTGA

                ValTyrHisGlyAlaGlyThrArgThrIleAlaSerProLysGlyProValIleGlnMet
3241            GTCTACCACGGGGCCGGAACGAGGACCATCGCGTCACCCAAGGGTCCTGTCATCCAGATG
                CAGATGGTGCCCCGGCCTTGCTCCTGGTAGCGCAGTGGGTTCCCAGGACAGTAGGTCTAC

                                                        Ser     Thr
                TyrThrAsnValAspGlnAspLeuValGlyTrpProAlaProGlnGlySerArgSerLeu
3301            TATACCAATGTAGACCAAGACCTTGTGGGCTGGCCCGCTCCGCAAGGTAGCCGCTCATTG
                ATATGGTTACATCTGGTTCTGGAACACCCGACCGGGCGAGGCGTTCCATCGGCGAGTAAC

                ThrProCysThrCysGlySerSerAspLeuTyrLeuValThrArgHisAlaAspValIle
3361            ACACCCTGCACTTGCGGCTCCTCGGACCTTTACCTGGTCACGAGGCACGCCGATGTCATT
                TGTGGGACGTGAACGCCGAGGAGCCTGGAAATGGACCAGTGCTCCGTGCGGCTACAGTAA

                ProValArgArgArgGlyAspSerArgGlySerLeuLeuSerProArgProIleSerTyr
3421            CCCGTGCGCCGGCGGGGTGATAGCAGGGGCAGCCTGCTGTCGCCCCGGCCCATTTCCTAC
                GGGCACGCGGCCGCCCCACTATCGTCCCCGTCGGACGACAGCGGGGCCGGGTAAAGGATG

                LeuLysGlySerSerGlyGlyProLeuLeuCysProAlaGlyHisAlaValGlyIlePhe
3481            TTGAAAGGCTCCTCGGGGGGTCCGCTGTTGTGCCCCGCGGGGCACGCCGTGGGCATATTT
                AACTTTCCGAGGAGCCCCCCAGGCGACAACACGGGGCGCCCCGTGCGGCACCCGTATAAA

                ArgAlaAlaValCysThrArgGlyValAlaLysAlaValAspPheIleProValGluAsn
3541            AGGGCCGCGGTGTGCACCCGTGGAGTGGCTAAGGCGGTGGACTTTATCCCTGTGGAGAAC
                TCCCGGCGCCACACGTGGGCACCTCACCGATTCCGCCACCTGAAATAGGGACACCTCTTG
```

FIG. 17-5

```
                LeuGluThrThrMetArgSerProValPheThrAspAsnSerSerProProValValPro
3601            CTAGAGACAACCATGAGGTCCCCGGTGTTCACGGATAACTCCTCTCCACCAGTAGTGCCC
                GATCTCTGTTGGTACTCCAGGGGCCACAAGTGCCTATTGAGGAGAGGTGGTCATCACGGG

                GlnSerPheGlnValAlaHisLeuHisAlaProThrGlySerGlyLysSerThrLysVal
3661            CAGAGCTTCCAGGTGGCTCACCTCCATGCTCCCACAGGCAGCGGCAAAAGCACCAAGGTC
                GTCTCGAAGGTCCACCGAGTGGAGGTACGAGGGTGTCCGTCGCCGTTTTCGTGGTTCCAG

                ProAlaAlaTyrAlaAlaGlnGlyTyrLysValLeuValLeuAsnProSerValAlaAla
3721            CCGGCTGCATATGCAGCTCAGGGCTATAAGGTGCTAGTACTCAACCCCTCTGTTGCTGCA
                GGCCGACGTATACGTCGAGTCCCGATATTCCACGATCATGAGTTGGGGAGACAACGACGT

                                                                Leu
                ThrLeuGlyPheGlyAlaTyrMetSerLysAlaHisGlyIleAspProAsnIleArgThr
3781            ACACTGGGCTTTGGTGCTTACATGTCCAAGGCTCATGGGATCGATCCTAACATCAGGACC
                TGTGACCCGAAACCACGAATGTACAGGTTCCGAGTACCCTAGCTAGGATTGTAGTCCTGG

                GlyValArgThrIleThrThrGlySerProIleThrTyrSerThrTyrGlyLysPheLeu
3841            GGGGTGAGAACAATTACCACTGGCAGCCCCATCACGTACTCCACCTACGGCAAGTTCCTT
                CCCCACTCTTGTTAATGGTGACCGTCGGGGTAGTGCATGAGGTGGATGCCGTTCAAGGAA

                AlaAspGlyGlyCysSerGlyGlyAlaTyrAspIleIleIleCysAspGluCysHisSer
3901            GCCGACGGCGGGTGCTCGGGGGGCGCTTATGACATAATAATTTGTGACGAGTGCCACTCC
                CGGCTGCCGCCCACGAGCCCCCCGCGAATACTGTATTATTAAACACTGCTCACGGTGAGG

                ThrAspAlaThrSerIleLeuGlyIleGlyThrValLeuAspGlnAlaGluThrAlaGly
3961            ACGGATGCCACATCCATCTTGGGCATCGGCACTGTCCTTGACCAAGCAGAGACTGCGGGG
                TGCCTACGGTGTAGGTAGAACCCGTAGCCGTGACAGGAACTGGTTCGTCTCTGACGCCCC

                AlaArgLeuValValLeuAlaThrAlaThrProProGlySerValThrValProHisPro
4021            GCGAGACTGGTTGTGCTCGCCACCGCCACCCCTCCGGGCTCCGTCACTGTGCCCCATCCC
                CGCTCTGACCAACACGAGCGGTGGCGGTGGGGAGGCCCGAGGCAGTGACACGGGGTAGGG

                AsnIleGluGluValAlaLeuSerThrThrGlyGluIleProPheTyrGlyLysAlaIle
4081            AACATCGAGGAGGTTGCTCTGTCCACCACCGGAGAGATCCCTTTTTACGGCAAGGCTATC
                TTGTAGCTCCTCCAACGAGACAGGTGGTGGCCTCTCTAGGGAAAAATGCCGTTCCGATAG

                ProLeuGluValIleLysGlyGlyArgHisLeuIlePheCysHisSerLysLysLysCys
4141            CCCCTCGAAGTAATCAAGGGGGGGAGACATCTCATCTTCTGTCATTCAAAGAAGAAGTGC
                GGGGAGCTTCATTAGTTCCCCCCCTCTGTAGAGTAGAAGACAGTAAGTTTCTTCTTCACG

                AspGluLeuAlaAlaLysLeuValAlaLeuGlyIleAsnAlaValAlaTyrTyrArgGly
4201            GACGAACTCGCCGCAAAGCTGGTCGCATTGGGCATCAATGCCGTGGCCTACTACCGCGGT
                CTGCTTGAGCGGCGTTTCGACCAGCGTAACCCGTAGTTACGGCACCGGATGATGGCGCCA

                LeuAspValSerValIleProThrSerGlyAspValValValValAlaThrAspAlaLeu
4261            CTTGACGTGTCCGTCATCCCGACCAGCGGCGATGTTGTCGTCGTGGCAACCGATGCCCTC
                GAACTGCACAGGCAGTAGGGCTGGTCGCCGCTACAACAGCAGCACCGTTGGCTACGGGAG

                                                        Tyr
                MetThrGlyTyrThrGlyAspPheAspSerValIleAspCysAsnThrCysValThrGln
4321            ATGACCGGCTATACCGGCGACTTCGACTCGGTGATAGACTGCAATACGTGTGTCACCCAG
                TACTGGCCGATATGGCCGCTGAAGCTGAGCCACTATCTGACGTTATGCACACAGTGGGTC

                                                    Ser
                ThrValAspPheSerLeuAspProThrPheThrIleGluThrIleThrLeuProGlnAsp
4381            ACAGTCGATTTCAGCCTTGACCCTACCTTCACCATTGAGACAATCACGCTCCCCCAGGAT
                TGTCAGCTAAAGTCGGAACTGGGATGGAAGTGGTAACTCTGTTAGTGCGAGGGGGTCCTA

                AlaValSerArgThrGlnArgArgGlyArgThrGlyArgGlyLysProGlyIleTyrArg
4441            GCTGTCTCCCGCACTCAACGTCGGGGCAGGACTGGCAGGGGGAAGCCAGGCATCTACAGA
                CGACAGAGGGCGTGAGTTGCAGCCCCGTCCTGACCGTCCCCCTTCGGTCCGTAGATGTCT

                PheValAlaProGlyGluArgProSerGlyMetPheAspSerSerValLeuCysGluCys
4501            TTTGTGGCACCGGGGGAGCGCCCCTCCGGCATGTTCGACTCGTCCGTCCTCTGTGAGTGC
                AAACACCGTGGCCCCCTCGCGGGGAGGCCGTACAAGCTGAGCAGGCAGGAGACACTCACG
```

FIG. 17-6

```
      TyrAspAlaGlyCysAlaTrpTyrGluLeuThrProAlaGluThrThrValArgLeuArg
4561  TATGACGCAGGCTGTGCTTGGTATGAGCTCACGCCCGCCGAGACTACAGTTAGGCTACGA
      ATACTGCGTCCGACACGAACCATACTCGAGTGCGGGCGGCTCTGATGTCAATCCGATGCT

      AlaTyrMetAsnThrProGlyLeuProValCysGlnAspHisLeuGluPheTrpGluGly
4621  GCGTACATGAACACCCCGGGGCTTCCCGTGTGCCAGGACCATCTTGAATTTTGGGAGGGC
      CGCATGTACTTGTGGGGCCCCGAAGGGCACACGGTCCTGGTAGAACTTAAAACCCTCCCG

      ValPheThrGlyLeuThrHisIleAspAlaHisPheLeuSerGlnThrLysGlnSerGly
4681  GTCTTTACAGGCCTCACTCATATAGATGCCCACTTTCTATCCCAGACAAAGCAGAGTGGG
      CAGAAATGTCCGGAGTGAGTATATCTACGGGTGAAAGATAGGGTCTGTTTCGTCTCACCC

      GluAsnLeuProTyrLeuValAlaTyrGlnAlaThrValCysAlaArgAlaGlnAlaPro
4741  GAGAACCTTCCTTACCTGGTAGCGTACCAAGCCACCGTGTGCGCTAGGGCTCAAGCCCCT
      CTCTTGGAAGGAATGGACCATCGCATGGTTCGGTGGCACACGCGATCCCGAGTTCGGGGA

      ProProSerTrpAspGlnMetTrpLysCysLeuIleArgLeuLysProThrLeuHisGly
4801  CCCCCATCGTGGGACCAGATGTGGAAGTGTTTGATTCGCCTCAAGCCCACCCTCCATGGG
      GGGGGTAGCACCCTGGTCTACACCTTCACAAACTAAGCGGAGTTCGGGTGGGAGGTACCC

      ProThrProLeuLeuTyrArgLeuGlyAlaValGlnAsnGluIleThrLeuThrHisPro
4861  CCAACACCCCTGCTATACAGACTGGGCGCTGTTCAGAATGAAATCACCCTGACGCACCCA
      GGTTGTGGGGACGATATGTCTGACCCGCGACAAGTCTTACTTTAGTGGGACTGCGTGGGT

      ValThrLysTyrIleMetThrCysMetSerAlaAspLeuGluValValThrSerThrTrp
4921  GTCACCAAATACATCATGACATGCATGTCGGCCGACCTGGAGGTCGTCACGAGCACCTGG
      CAGTGGTTTATGTAGTACTGTACGTACAGCCGGCTGGACCTCCAGCAGTGCTCGTGGACC

      ValLeuValGlyGlyValLeuAlaAlaLeuAlaAlaTyrCysLeuSerThrGlyCysVal
4981  GTGCTCGTTGGCGGCGTCCTGGCTGCTTTGGCCGCGTATTGCCTGTCAACAGGCTGCGTG
      CACGAGCAACCGCCGCAGGACCGACGAAACCGGCGCATAACGGACAGTTGTCCGACGCAC

      ValIleValGlyArgValValLeuSerGlyLysProAlaIleIleProAspArgGluVal
5041  GTCATAGTGGGCAGGGTCGTCTTGTCCGGGAAGCCGGCAATCATACCTGACAGGGAAGTC
      CAGTATCACCCGTCCCAGCAGAACAGGCCCTTCGGCCGTTAGTATGGACTGTCCCTTCAG

      LeuTyrArgGluPheAspGluMetGluGluCysSerGlnHisLeuProTyrIleGluGln
5101  CTCTACCGAGAGTTCGATGAGATGGAAGAGTGCTCTCAGCACTTACCGTACATCGAGCAA
      GAGATGGCTCTCAAGCTACTCTACCTTCTCACGAGAGTCGTGAATGGCATGTAGCTCGTT

      GlyMetMetLeuAlaGluGlnPheLysGlnLysAlaLeuGlyLeuLeuGlnThrAlaSer
5161  GGGATGATGCTCGCCGAGCAGTTCAAGCAGAAGGCCCTCGGCCTCCTGCAGACCGCGTCC
      CCCTACTACGAGCGGCTCGTCAAGTTCGTCTTCCGGGAGCCGGAGGACGTCTGGCGCAGG

      ArgGlnAlaGluValIleAlaProAlaValGlnThrAsnTrpGlnLysLeuGluThrPhe
5221  CGTCAGGCAGAGGTTATCGCCCCTGCTGTCCAGACCAACTGGCAAAAACTCGAGACCTTC
      GCAGTCCGTCTCCAATAGCGGGGACGACAGGTCTGGTTGACCGTTTTTGAGCTCTGGAAG

      TrpAlaLysHisMetTrpAsnPheIleSerGlyIleGlnTyrLeuAlaGlyLeuSerThr
5281  TGGGCGAAGCATATGTGGAACTTCATCAGTGGGATACAATACTTGGCGGGCTTGTCAACG
      ACCCGCTTCGTATACACCTTGAAGTAGTCACCCTATGTTATGAACCGCCCGAACAGTTGC

      LeuProGlyAsnProAlaIleAlaSerLeuMetAlaPheThrAlaAlaValThrSerPro
5341  CTGCCTGGTAACCCCGCCATTGCTTCATTGATGGCTTTTACAGCTGCTGTCACCAGCCCA
      GACGGACCATTGGGGCGGTAACGAAGTAACTACCGAAAATGTCGACGACAGTGGTCGGGT

      LeuThrThrSerGlnThrLeuLeuPheAsnIleLeuGlyGlyTrpValAlaAlaGlnLeu
5401  CTAACCACTAGCCAAACCCTCCTCTTCAACATATTGGGGGGGTGGGTGGCTGCCCAGCTC
      GATTGGTGATCGGTTTGGGAGGAGAAGTTGTATAACCCCCCCACCCACCGACGGGTCGAG

      AlaAlaProGlyAlaAlaThrAlaPheValGlyAlaGlyLeuAlaGlyAlaAlaIleGly
5461  GCCGCCCCCGGTGCCGCTACTGCCTTTGTGGGCGCTGGCTTAGCTGGCGCCGCCATCGGC
      CGGCGGGGGCCACGGCGATGACGGAAACACCCGCGACCGAATCGACCGCGGCGGTAGCCG

      SerValGlyLeuGlyLysValLeuIleAspIleLeuAlaGlyTyrGlyAlaGlyValAla
```

FIG. 17-7

```
5521  AGTGTTGGACTGGGGAAGGTCCTCATAGACATCCTTGCAGGGTATGGCGCGGGCGTGGCG
      TCACAACCTGACCCCTTCCAGGAGTATCTGTAGGAACGTCCCATACCGCGCCCGCACCGC

                                                              Gly
      GlyAlaLeuValAlaPheLysIleMetSerGlyGluValProSerThrGluAspLeuVal
5581  GGAGCTCTTGTGGCATTCAAGATCATGAGCGGTGAGGTCCCCTCCACGGAGGACCTGGTC
      CCTCGAGAACACCGTAAGTTCTAGTACTCGCCACTCCAGGGGAGGTGCCTCCTGGACCAG

      AsnLeuLeuProAlaIleLeuSerProGlyAlaLeuValValGlyValValCysAlaAla
5641  AATCTACTGCCCGCCATCCTCTCGCCCGGAGCCCTCGTAGTCGGCGTGGTCTGTGCAGCA
      TTAGATGACGGGCGGTAGGAGAGCGGGCCTCGGGAGCATCAGCCGCACCAGACACGTCGT

      IleLeuArgArgHisValGlyProGlyGluGlyAlaValGlnTrpMetAsnArgLeuIle
5701  ATACTGCGCCGGCACGTTGGCCCGGGCGAGGGGGCAGTGCAGTGGATGAACCGGCTGATA
      TATGACGCGGCCGTGCAACCGGGCCCGCTCCCCCGTCACGTCACCTACTTGGCCGACTAT

      AlaPheAlaSerArgGlyAsnHisValSerProThrHisTyrValProGluSerAspAla
5761  GCCTTCGCCTCCCGGGGGAACCATGTTTCCCCCACGCACTACGTGCCGGAGAGCGATGCA
      CGGAAGCGGAGGGCCCCCTTGGTACAAAGGGGGTGCGTGATGCACGGCCTCTCGCTACGT

                                HisCys
      AlaAlaArgValThrAlaIleLeuSerSerLeuThrValThrGlnLeuLeuArgArgLeu
5821  GCTGCCCGCGTCACTGCCATACTCAGCAGCCTCACTGTAACCCAGCTCCTGAGGCGACTG
      CGACGGGCGCAGTGACGGTATGAGTCGTCGGAGTGACATTGGGTCGAGGACTCCGCTGAC

      HisGlnTrpIleSerSerGluCysThrThrProCysSerGlySerTrpLeuArgAspIle
5881  CACCAGTGGATAAGCTCGGAGTGTACCACTCCATGCTCCGGTTCCTGGCTAAGGGACATC
      GTGGTCACCTATTCGAGCCTCACATGGTGAGGTACGAGGCCAAGGACCGATTCCCTGTAG

      TrpAspTrpIleCysGluValLeuSerAspPheLysThrTrpLeuLysAlaLysLeuMet
5941  TGGGACTGGATATGCGAGGTGTTGAGCGACTTTAAGACCTGGCTAAAAGCTAAGCTCATG
      ACCCTGACCTATACGCTCCACAACTCGCTGAAATTCTGGACCGATTTTCGATTCGAGTAC

      ProGlnLeuProGlyIleProPheValSerCysGlnArgGlyTyrLysGlyValTrpArg
6001  CCACAGCTGCCTGGGATCCCCTTTGTGTCCTGCCAGCGCGGGTATAAGGGGGTCTGGCGA
      GGTGTCGACGGACCCTAGGGGAAACACAGGACGGTCGCGCCCATATTCCCCCAGACCGCT

      Gly
      ValAspGlyIleMetHisThrArgCysHisCysGlyAlaGluIleThrGlyHisValLys
6061  GTGGACGGCATCATGCACACTCGCTGCCACTGTGGAGCTGAGATCACTGGACATGTCAAA
      CACCTGCCGTAGTACGTGTGAGCGACGGTGACACCTCGACTCTAGTGACCTGTACAGTTT

      AsnGlyThrMetArgIleValGlyProArgThrCysArgAsnMetTrpSerGlyThrPhe
6121  AACGGGACGATGAGGATCGTCGGTCCTAGGACCTGCAGGAACATGTGGAGTGGGACCTTC
      TTGCCCTGCTACTCCTAGCAGCCAGGATCCTGGACGTCCTTGTACACCTCACCCTGGAAG

      ProIleAsnAlaTyrThrThrGlyProCysThrProLeuProAlaProAsnTyrThrPhe
6181  CCCATTAATGCCTACACCACGGGCCCCTGTACCCCCCTTCCTGCGCCGAACTACACGTTC
      GGGTAATTACGGATGTGGTGCCCGGGGACATGGGGGGAAGGACGCGGCTTGATGTGCAAG

      AlaLeuTrpArgValSerAlaGluGluTyrValGluIleArgGlnValGlyAspPheHis
6241  GCGCTATGGAGGGTGTCTGCAGAGGAATATGTGGAGATAAGGCAGGTGGGGGACTTCCAC
      CGCGATACCTCCCACAGACGTCTCCTTATACACCTCTATTCCGTCCACCCCCTGAAGGTG

      TyrValThrGlyMetThrThrAspAsnLeuLysCysProCysGlnValProSerProGlu
6301  TACGTGACGGGTATGACTACTGACAATCTCAAATGCCCGTGCCAGGTCCCATCGCCCGAA
      ATGCACTGCCCATACTGATGACTGTTAGAGTTTACGGGCACGGTCCAGGGTAGCGGGCTT

      PhePheThrGluLeuAspGlyValArgLeuHisArgPheAlaProProCysLysProLeu
6361  TTTTTCACAGAATTGGACGGGGTGCGCCTACATAGGTTTGCGCCCCCCTGCAAGCCCTTG
      AAAAAGTGTCTTAACCTGCCCCACGCGGATGTATCCAAACGCGGGGGGACGTTCGGGAAC

      LeuArgGluGluValSerPheArgValGlyLeuHisGluTyrProValGlySerGlnLeu
6421  CTGCGGGAGGAGGTATCATTCAGAGTAGGACTCCACGAATACCCGGTAGGGTCGCAATTA
      GACGCCCTCCTCCATAGTAAGTCTCATCCTGAGGTGCTTATGGGCCATCCCAGCGTTAAT
```

FIG. 17-8

```
          ProCysGluProGluProAspValAlaValLeuThrSerMetLeuThrAspProSerHis
6481      CCTTGCGAGCCCGAACCGGACGTGGCCGTGTTGACGTCCATGCTCACTGATCCCTCCCAT
          GGAACGCTCGGGCTTGGCCTGCACCGGCACAACTGCAGGTACGAGTGACTAGGGAGGGTA

          IleThrAlaGluAlaAlaGlyArgArgLeuAlaArgGlySerProProSerValAlaSer
6541      ATAACAGCAGAGGCGGCCGGGCGAAGGTTGGCGAGGGGATCACCCCCCTCTGTGGCCAGC
          TATTGTCGTCTCCGCCGGCCCGCTTCCAACCGCTCCCCTAGTGGGGGGAGACACCGGTCG

          SerSerAlaSerGlnLeuSerAlaProSerLeuLysAlaThrCysThrAlaAsnHisAsp
6601      TCCTCGGCTAGCCAGCTATCCGCTCCATCTCTCAAGGCAACTTGCACCGCTAACCATGAC
          AGGAGCCGATCGGTCGATAGGCGAGGTAGAGAGTTCCGTTGAACGTGGCGATTGGTACTG

          SerProAspAlaGluLeuIleGluAlaAsnLeuLeuTrpArgGlnGluMetGlyGlyAsn
6661      TCCCCTGATGCTGAGCTCATAGAGGCCAACCTCCTATGGAGGCAGGAGATGGGCGGCAAC
          AGGGGACTACGACTCGAGTATCTCCGGTTGGAGGATACCTCCGTCCTCTACCCGCCGTTG

          IleThrArgValGluSerGluAsnLysValValIleLeuAspSerPheAspProLeuVal
6721      ATCACCAGGGTTGAGTCAGAAAACAAAGTGGTGATTCTGGACTCCTTCGATCCGCTTGTG
          TAGTGGTCCCAACTCAGTCTTTTGTTTCACCACTAAGACCTGAGGAAGCTAGGCGAACAC

          AlaGluGluAspGluArgGluIleSerValProAlaGluIleLeuArgLysSerArgArg
6781      GCGGAGGAGGACGAGCGGGAGATCTCCGTACCCGCAGAAATCCTGCGGAAGTCTCGGAGA
          CGCCTCCTCCTGCTCGCCCTCTAGAGGCATGGGCGTCTTTAGGACGCCTTCAGAGCCTCT

          PheAlaGlnAlaLeuProValTrpAlaArgProAspTyrAsnProProLeuValGluThr
6841      TTCGCCCAGGCCCTGCCCGTTTGGGCGCGGCCGGACTATAACCCCCCGCTAGTGGAGACG
          AAGCGGGTCCGGGACGGGCAAACCCGCGCCGGCCTGATATTGGGGGGCGATCACCTCTGC

          TrpLysLysProAspTyrGluProProValValHisGlyCysProLeuProProProLys
6901      TGGAAAAAGCCCGACTACGAACCACCTGTGGTCCATGGCTGTCCGCTTCCACCTCCAAAG
          ACCTTTTTCGGGCTGATGCTTGGTGGACACCAGGTACCGACAGGCGAAGGTGGAGGTTTC

          SerProProValProProProArgLysLysArgThrValValLeuThrGluSerThrLeu
6961      TCCCCTCCTGTGCCTCCGCCTCGGAAGAAGCGGACGGTGGTCCTCACTGAATCAACCCTA
          AGGGGAGGACACGGAGGCGGAGCCTTCTTCGCCTGCCACCAGGAGTGACTTAGTTGGGAT

                                    Ser
          SerThrAlaLeuAlaGluLeuAlaThrArgSerPheGlySerSerSerThrSerGlyIle
7021      TCTACTGCCTTGGCCGAGCTCGCCACCAGAAGCTTTGGCAGCTCCTCAACTTCCGGCATT
          AGATGACGGAACCGGCTCGAGCGGTGGTCTTCGAAACCGTCGAGGAGTTGAAGGCCGTAA

          ThrGlyAspAsnThrThrThrSerSerGluProAlaProSerGlyCysProProAspSer
7081      ACGGGCGACAATACGACAACATCCTCTGAGCCCGCCCCTTCTGGCTGCCCCCCCGACTCC
          TGCCCGCTGTTATGCTGTTGTAGGAGACTCGGGCGGGGAAGACCGACGGGGGGGCTGAGG

                         PheAla
          AspAlaGluSerTyrSerSerMetProProLeuGluGlyGluProGlyAspProAspLeu
7141      GACGCTGAGTCCTATTCCTCCATGCCCCCCCCTGGAGGGGGAGCCTGGGGATCCGGATCTT
          CTGCGACTCAGGATAAGGAGGTACGGGGGGGACCTCCCCCTCGGACCCCTAGGCCTAGAA

          SerAspGlySerTrpSerThrValSerSerGluAlaAsnAlaGluAspValValCysCys
7201      AGCGACGGGTCATGGTCAACGGTCAGTAGTGAGGCCAACGCGGAGGATGTCGTGTGCTGC
          TCGCTGCCCAGTACCAGTTGCCAGTCATCACTCCGGTTGCGCCTCCTACAGCACACGACG

          SerMetSerTyrSerTrpThrGlyAlaLeuValThrProCysAlaAlaGluGluGlnLys
7261      TCAATGTCTTACTCTTGGACAGGCGCACTCGTCACCCCGTGCGCCGCGGAAGAACAGAAA
          AGTTACAGAATGAGAACCTGTCCGCGTGAGCAGTGGGGCACGCGGCGCCTTCTTGTCTTT

          LeuProIleAsnAlaLeuSerAsnSerLeuLeuArgHisHisAsnLeuValTyrSerThr
7321      CTGCCCATCAATGCACTAAGCAACTCGTTGCTACGTCACCACAATTTGGTGTATTCCACC
          GACGGGTAGTTACGTGATTCGTTGAGCAACGATGCAGTGGTGTTAAACCACATAAGGTGG

          ThrSerArgSerAlaCysGlnArgGlnLysLysValThrPheAspArgLeuGlnValLeu
7381      ACCTCACGCAGTGCTTGCCAAAGGCAGAAGAAAGTCACATTTGACAGACTGCAAGTTCTG
          TGGAGTGCGTCACGAACGGTTTCCGTCTTCTTTCAGTGTAAACTGTCTGACGTTCAAGAC
```

FIG. 17-9

```
        AspSerHisTyrGlnAspValLeuLysGluValLysAlaAlaAlaSerLysValLysAla
7441    GACAGCCATTACCAGGACGTACTCAAGGAGGTTAAAGCAGCGGCGTCAAAAGTGAAGGCT
        CTGTCGGTAATGGTCCTGCATGAGTTCCTCCAATTTCGTCGCCGCAGTTTTCACTTCCGA

           Phe
        AsnLeuLeuSerValGluGluAlaCysSerLeuThrProProHisSerAlaLysSerLys
7501    AACTTGCTATCCGTAGAGGAAGCTTGCAGCCTGACGCCCCCACACTCAGCCAAATCCAAG
        TTGAACGATAGGCATCTCCTTCGAACGTCGGACTGCGGGGGTGTGAGTCGGTTTAGGTTC

        PheGlyTyrGlyAlaLysAspValArgCysHisAlaArgLysAlaValThrHisIleAsn
7561    TTTGGTTATGGGGCAAAAGACGTCCGTTGCCATGCCAGAAAGGCCGTAACCCACATCAAC
        AAACCAATACCCCGTTTTCTGCAGGCAACGGTACGGTCTTTCCGGCATTGGGTGTAGTTG

        SerValTrpLysAspLeuLeuGluAspAsnValThrProIleAspThrThrIleMetAla
7621    TCCGTGTGGAAAGACCTTCTGGAAGACAATGTAACACCAATAGACACTACCATCATGGCT
        AGGCACACCTTTCTGGAAGACCTTCTGTTACATTGTGGTTATCTGTGATGGTAGTACCGA

        LysAsnGluValPheCysValGlnProGluLysGlyGlyArgLysProAlaArgLeuIle
7681    AAGAACGAGGTTTTCTGCGTTCAGCCTGAGAAGGGGGGTCGTAAGCCAGCTCGTCTCATC
        TTCTTGCTCCAAAAGACGCAAGTCGGACTCTTCCCCCCAGCATTCGGTCGAGCAGAGTAG

        ValPheProAspLeuGlyValArgValCysGluLysMetAlaLeuTyrAspValValThr
7741    GTGTTCCCCGATCTGGGCGTGCGCGTGTGCGAAAAGATGGCTTTGTACGACGTGGTTACA
        CACAAGGGGCTAGACCCGCACGCGCACACGCTTTTCTACCGAAACATGCTGCACCAATGT

        LysLeuProLeuAlaValMetGlySerSerTyrGlyPheGlnTyrSerProGlyGlnArg
7801    AAGCTCCCCTTGGCCGTGATGGGAAGCTCCTACGGATTCCAATACTCACCAGGACAGCGG
        TTCGAGGGGAACCGGCACTACCCTTCGAGGATGCCTAAGGTTATGAGTGGTCCTGTCGCC

        ValGluPheLeuValGlnAlaTrpLysSerLysLysThrProMetGlyPheSerTyrAsp
7861    GTTGAATTCCTCGTGCAAGCGTGGAAGTCCAAGAAAACCCCAATGGGGTTCTCGTATGAT
        CAACTTAAGGAGCACGTTCGCACCTTCAGGTTCTTTTGGGGTTACCCCAAGAGCATACTA

        ThrArgCysPheAspSerThrValThrGluSerAspIleArgThrGluGluAlaIleTyr
7921    ACCCGCTGCTTTGACTCCACAGTCACTGAGAGCGACATCCGTACGGAGGAGGCAATCTAC
        TGGGCGACGAAACTGAGGTGTCAGTGACTCTCGCTGTAGGCATGCCTCCTCCGTTAGATG

        GlnCysCysAspLeuAspProGlnAlaArgValAlaIleLysSerLeuThrGluArgLeu
7981    CAATGTTGTGACCTCGACCCCCAAGCCCGCGTGGCCATCAAGTCCCTCACCGAGAGGCTT
        GTTACAACACTGGAGCTGGGGGTTCGGGCGCACCGGTAGTTCAGGGAGTGGCTCTCCGAA

                                   Gly
        TyrValGlyGlyProLeuThrAsnSerArgGlyGluAsnCysGlyTyrArgArgCysArg
8041    TATGTTGGGGGCCCTCTTACCAATTCAAGGGGGGAGAACTGCGGCTATCGCAGGTGCCGC
        ATACAACCCCCGGGAGAATGGTTAAGTTCCCCCCTCTTGACGCCGATAGCGTCCACGGCG

        AlaSerGlyValLeuThrThrSerCysGlyAsnThrLeuThrCysTyrIleLysAlaArg
8101    GCGAGCGGCGTACTGACAACTAGCTGTGGTAACACCCTCACTTGCTACATCAAGGCCCGG
        CGCTCGCCGCATGACTGTTGATCGACACCATTGTGGGAGTGAACGATGTAGTTCCGGGCC

        AlaAlaCysArgAlaAlaGlyLeuGlnAspCysThrMetLeuValCysGlyAspAspLeu
8161    GCAGCCTGTCGAGCCGCAGGGCTCCAGGACTGCACCATGCTCGTGTGTGGCGACGACTTA
        CGTCGGACAGCTCGGCGTCCCGAGGTCCTGACGTGGTACGAGCACACACCGCTGCTGAAT

        ValValIleCysGluSerAlaGlyValGlnGluAspAlaAlaSerLeuArgAlaPheThr
8221    GTCGTTATCTGTGAAAGCGCGGGGGTCCAGGAGGACGCGGCGAGCCTGAGAGCCTTCACG
        CAGCAATAGACACTTTCGCGCCCCCAGGTCCTCCTGCGCCGCTCGGACTCTCGGAAGTGC

        GluAlaMetThrArgTyrSerAlaProProGlyAspProProGlnProGluTyrAspLeu
8281    GAGGCTATGACCAGGTACTCCGCCCCCCCTGGGGACCCCCCACAACCAGAATACGACTTG
        CTCCGATACTGGTCCATGAGGCGGGGGGGACCCCTGGGGGGTGTTGGTCTTATGCTGAAC

        GluLeuIleThrSerCysSerSerAsnValSerValAlaHisAspGlyAlaGlyLysArg
8341    GAGCTCATAACATCATGCTCCTCCAACGTGTCAGTCGCCCACGACGGCGCTGGAAAGAGG
        CTCGAGTATTGTAGTACGAGGAGGTTGCACAGTCAGCGGGTGCTGCCGCGACCTTTCTCC
```

```
      ValTyrTyrLeuThrArgAspProThrThrProLeuAlaArgAlaAlaTrpGluThrAla
8401  GTCTACTACCTCACCCGTGACCCTACAACCCCCCTCGCGAGAGCTGCGTGGGAGACAGCA
      CAGATGATGGAGTGGGCACTGGGATGTTGGGGGGAGCGCTCTCGACGCACCCTCTGTCGT

      ArgHisThrProValAsnSerTrpLeuGlyAsnIleIleMetPheAlaProThrLeuTrp
8461  AGACACACTCCAGTCAATTCCTGGCTAGGCAACATAATCATGTTTGCCCCCACACTGTGG
      TCTGTGTGAGGTCAGTTAAGGACCGATCCGTTGTATTAGTACAAACGGGGGTGTGACACC

      AlaArgMetIleLeuMetThrHisPhePheSerValLeuIleAlaArgAspGlnLeuGlu
8521  GCGAGGATGATACTGATGACCCATTTCTTTAGCGTCCTTATAGCCAGGGACCAGCTTGAA
      CGCTCCTACTATGACTACTGGGTAAAGAAATCGCAGGAATATCGGTCCCTGGTCGAACTT

      GlnAlaLeuAspCysGluIleTyrGlyAlaCysTyrSerIleGluProLeuAspLeuPro
8581  CAGGCCCTCGATTGCGAGATCTACGGGGCCTGCTACTCCATAGAACCACTTGATCTACCT
      GTCCGGGAGCTAACGCTCTAGATGCCCCGGACGATGAGGTATCTTGGTGAACTAGATGGA

      ProIleIleGlnArgLeuHisGlyLeuSerAlaPheSerLeuHisSerTyrSerProGly
8641  CCAATCATTCAAAGACTCCATGGCCTCAGCGCATTTTCACTCCACAGTTACTCTCCAGGT
      GGTTAGTAAGTTTCTGAGGTACCGGAGTCGCGTAAAAGTGAGGTGTCAATGAGAGGTCCA

      GluIleAsnArgValAlaAlaCysLeuArgLysLeuGlyValProProLeuArgAlaTrp
8701  GAAATTAATAGGGTGGCCGCATGCCTCAGAAAACTTGGGGTACCGCCCTTGCGAGCTTGG
      CTTTAATTATCCCACCGGCGTACGGAGTCTTTTGAACCCCATGGCGGGAACGCTCGAACC

      Gly
      ArgHisArgAlaArgSerValArgAlaArgLeuLeuAlaArgGlyGlyArgAlaAlaIle
8761  AGACACCGGGCCCGGAGCGTCCGCGCTAGGCTTCTGGCCAGAGGAGGCAGGGCTGCCATA
      TCTGTGGCCCGGGCCTCGCAGGCGCGATCCGAAGACCGGTCTCCTCCGTCCCGACGGTAT

      CysGlyLysTyrLeuPheAsnTrpAlaValArgThrLysLeuLys
8821  TGTGGCAAGTACCTCTTCAACTGGGCAGTAAGAACAAAGCTCAAAC
      ACACCGTTCATGGAGAAGTTGACCCGTCATTCTTGTTTCGAGTTTG
```

FIG. 17-10

FIG. 18

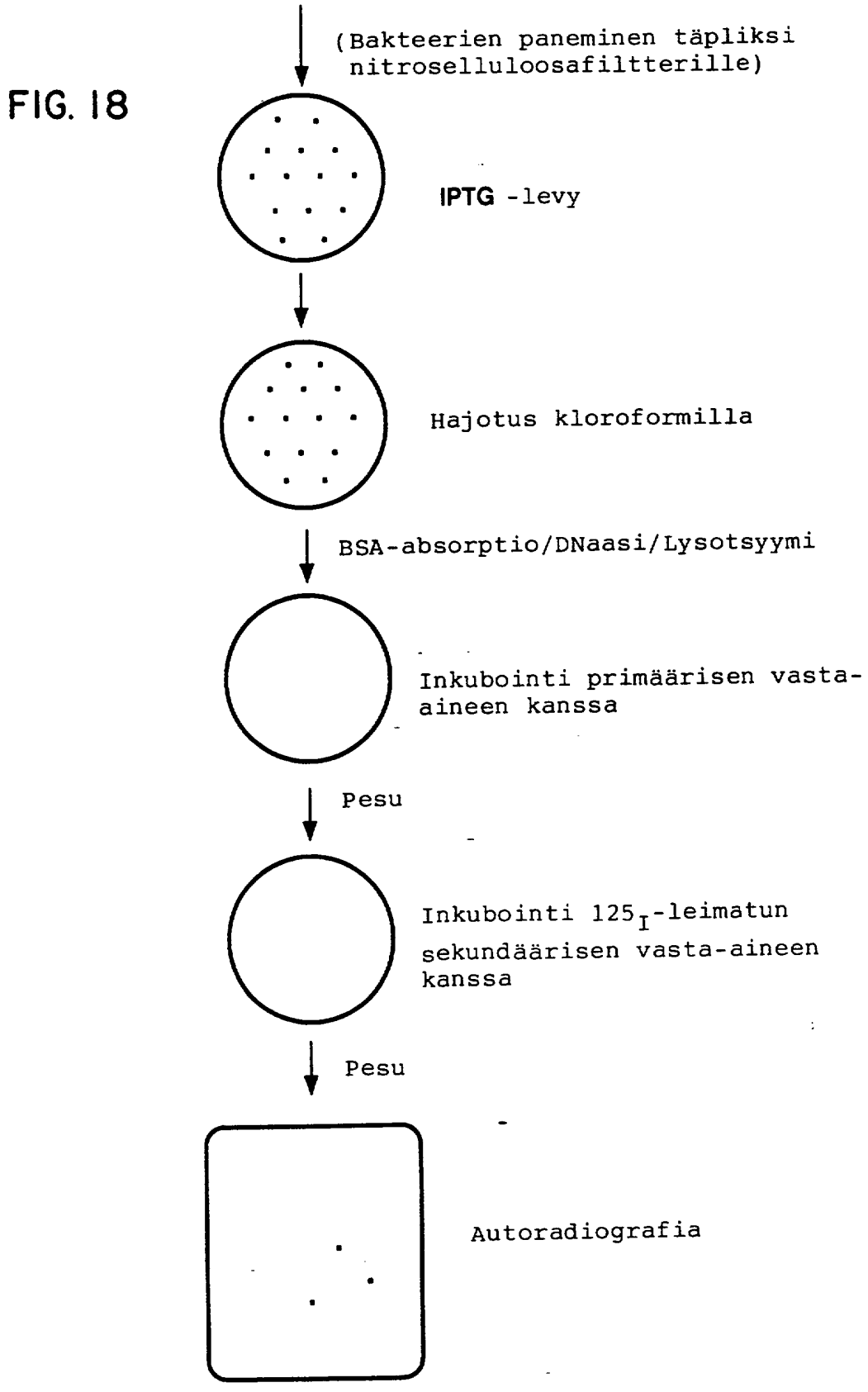

IMMUNOLOGINEN SEULONTA BAKTEEREISSA
E colin transformointi yhdistelmäplasmideilla
(Bakteerien paneminen täpliksi nitroselluloosafiltterille)
IPTG -levy
Hajotus kloroformilla
BSA-absorptio/DNaasi/Lysotsyymi
Inkubointi primäärisen vasta-aineen kanssa
Pesu
Inkubointi 125I-leimatun sekundäärisen vasta-aineen kanssa
Pesu
Autoradiografia

FIG. 19-1

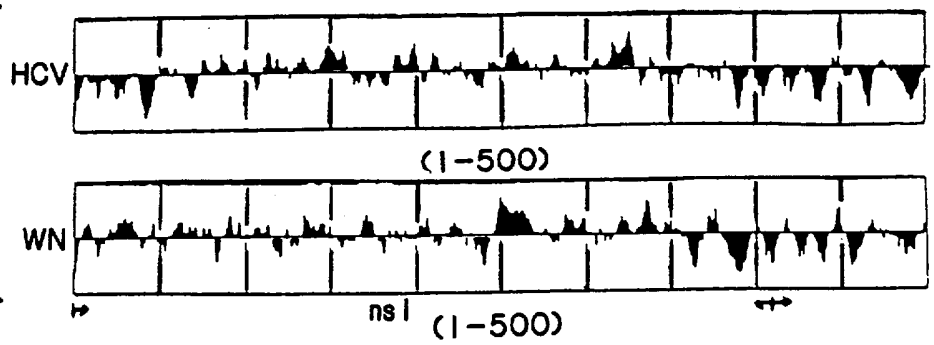


FIG. 19-2

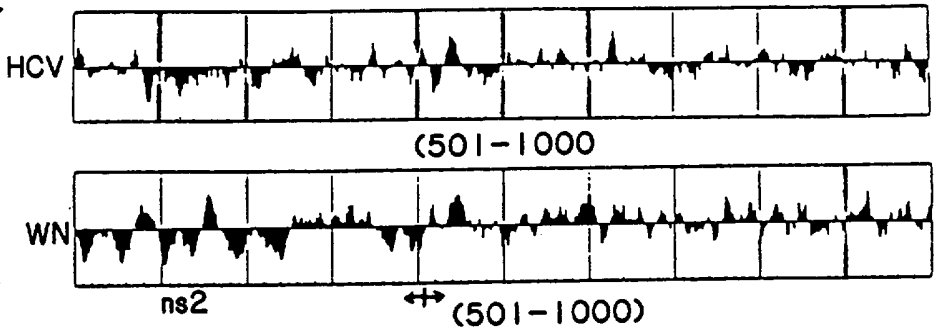


FIG. 19-3

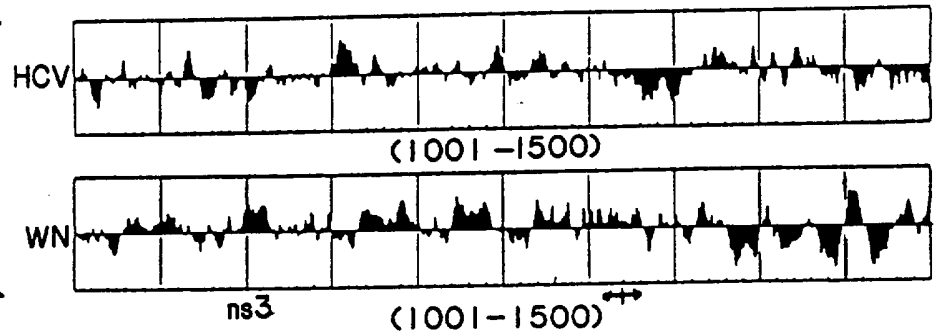


FIG. 19-4

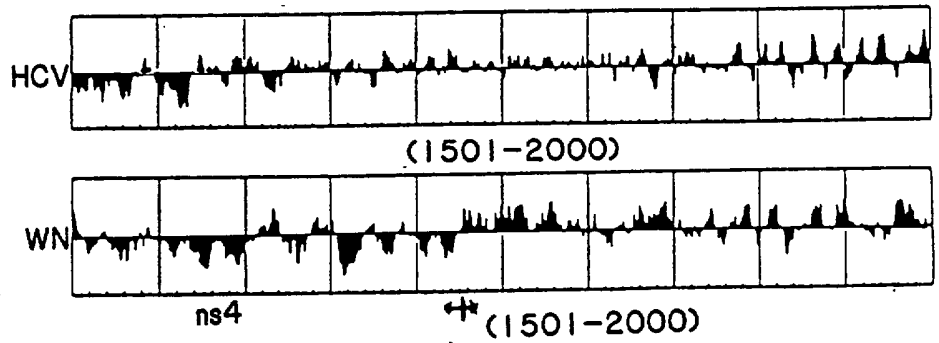
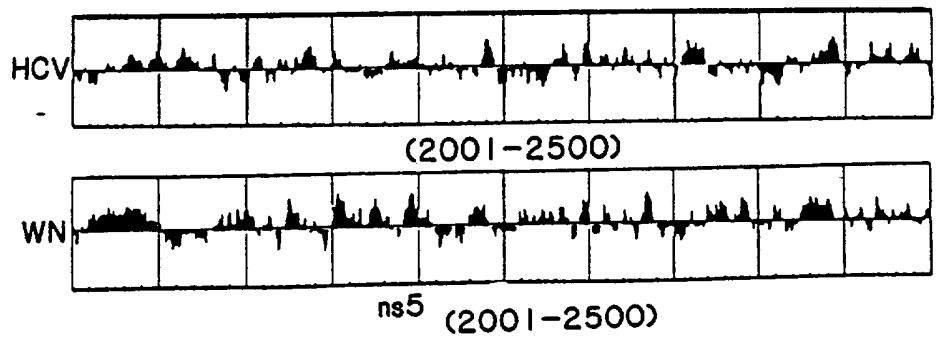
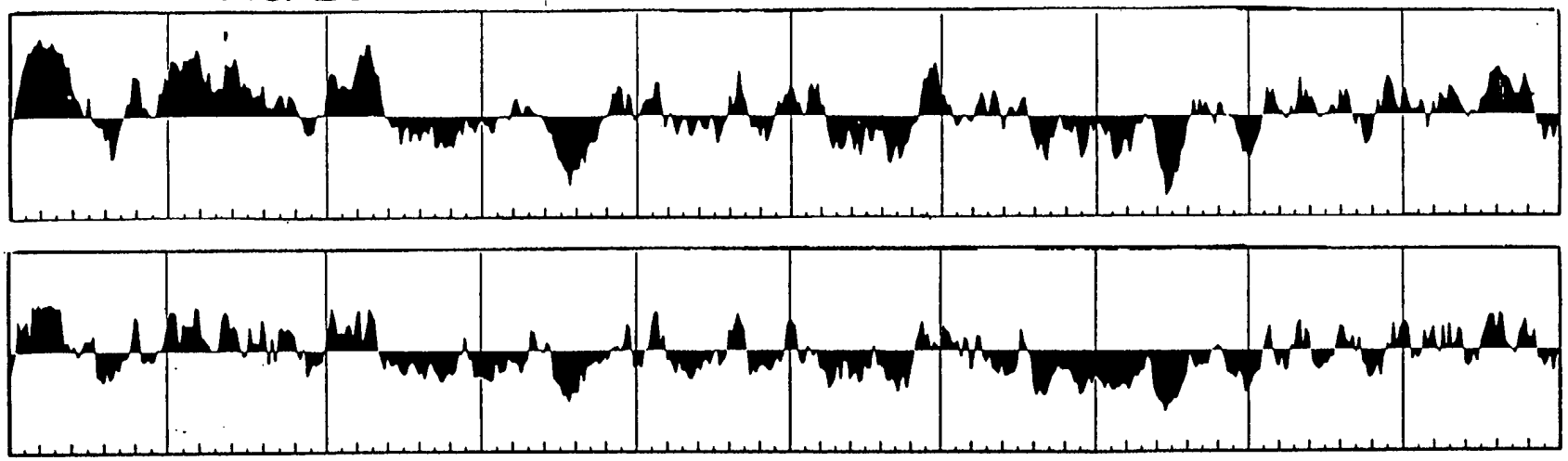


FIG. 19-5



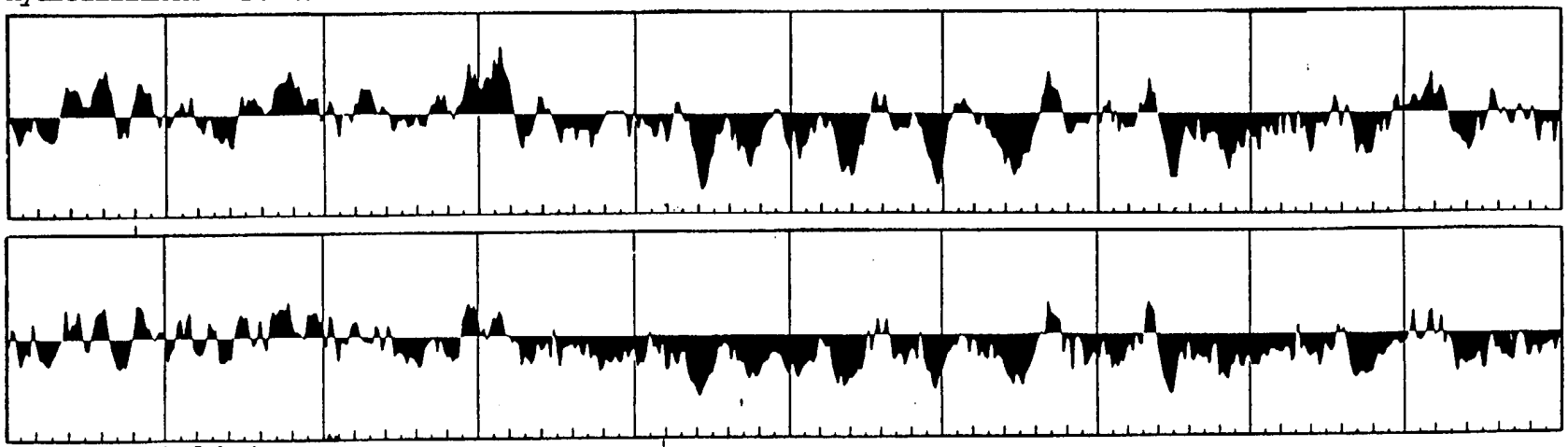
Hydrofiilinen FIG. 20 -1



Antigeeni-indeksi

HCV *(1 - 500)*

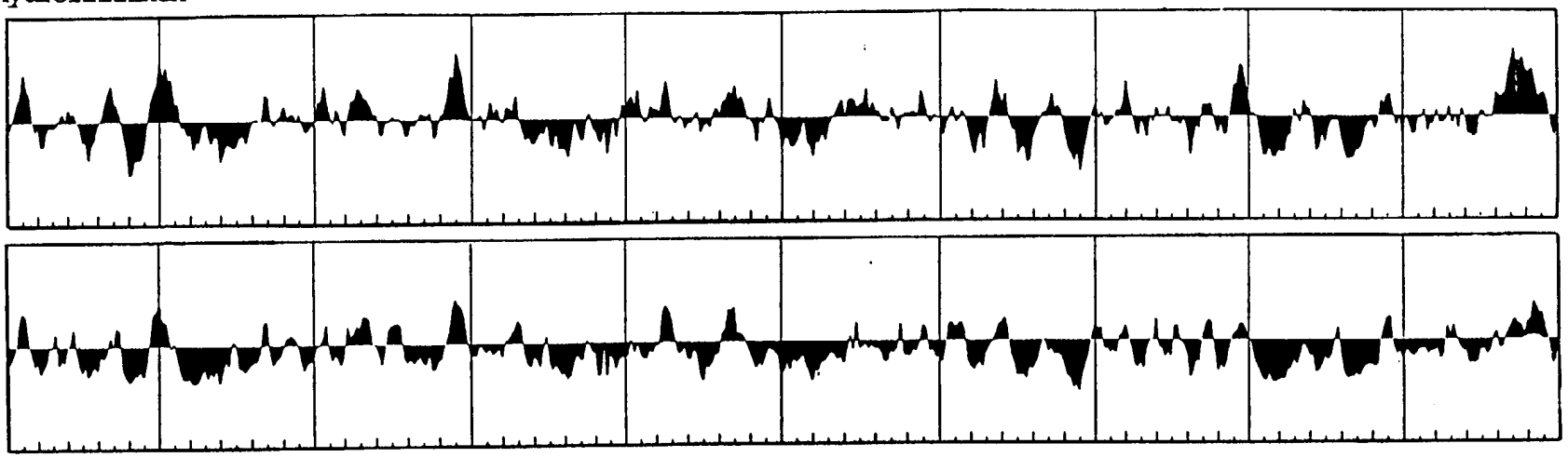
Hydrofiilinen FIG. 20 -2



Antigeeni-indeksi

HCV *(501 - 1000)*

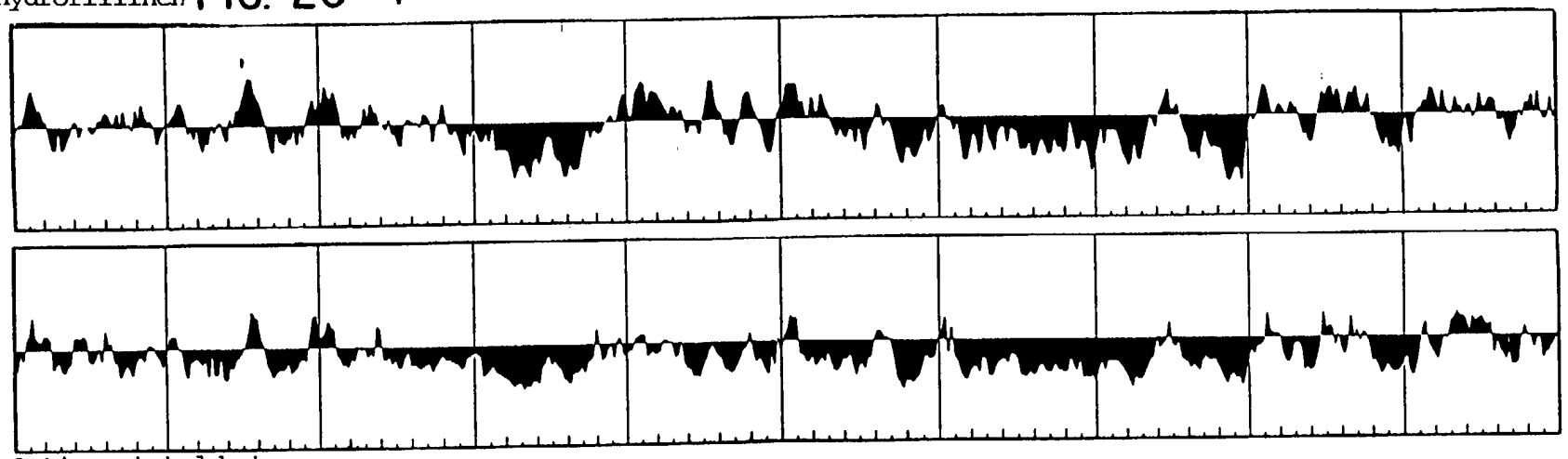
Hydrofiilinen FIG. 20-3



Antigeenni-indeksi

HCV *(1001 – 1500)*

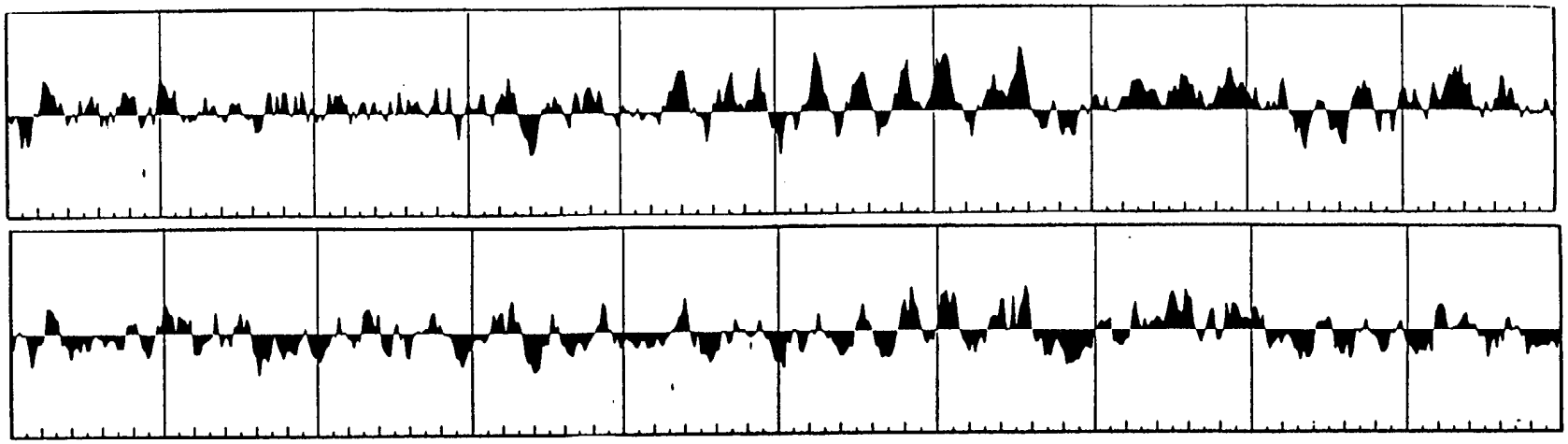
Hydrofiilinen FIG. 20-4



Antigeenni-indeksi

HCV *(1501 – 2000)*

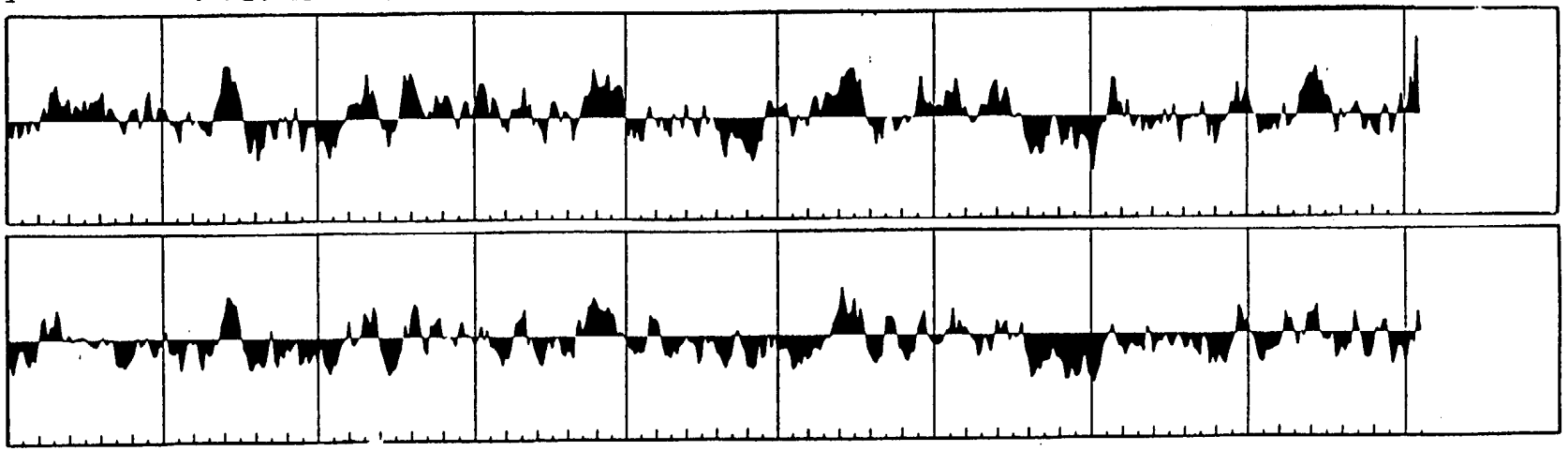
Hydrofiilinen FIG. 20-5



Antigeeni-indeksi

HCV *(2001 – 2500)*

Hydrofiilinen FIG. 20-6



Antigeeni-indeksi

HCV *(2501 – 2955)*

JOITAKIN SÄILYVIÄ YHTEISLINEAARISIA PEPTIDEJÄ HCV:SSÄ & FLAVIVIRUKSESSA

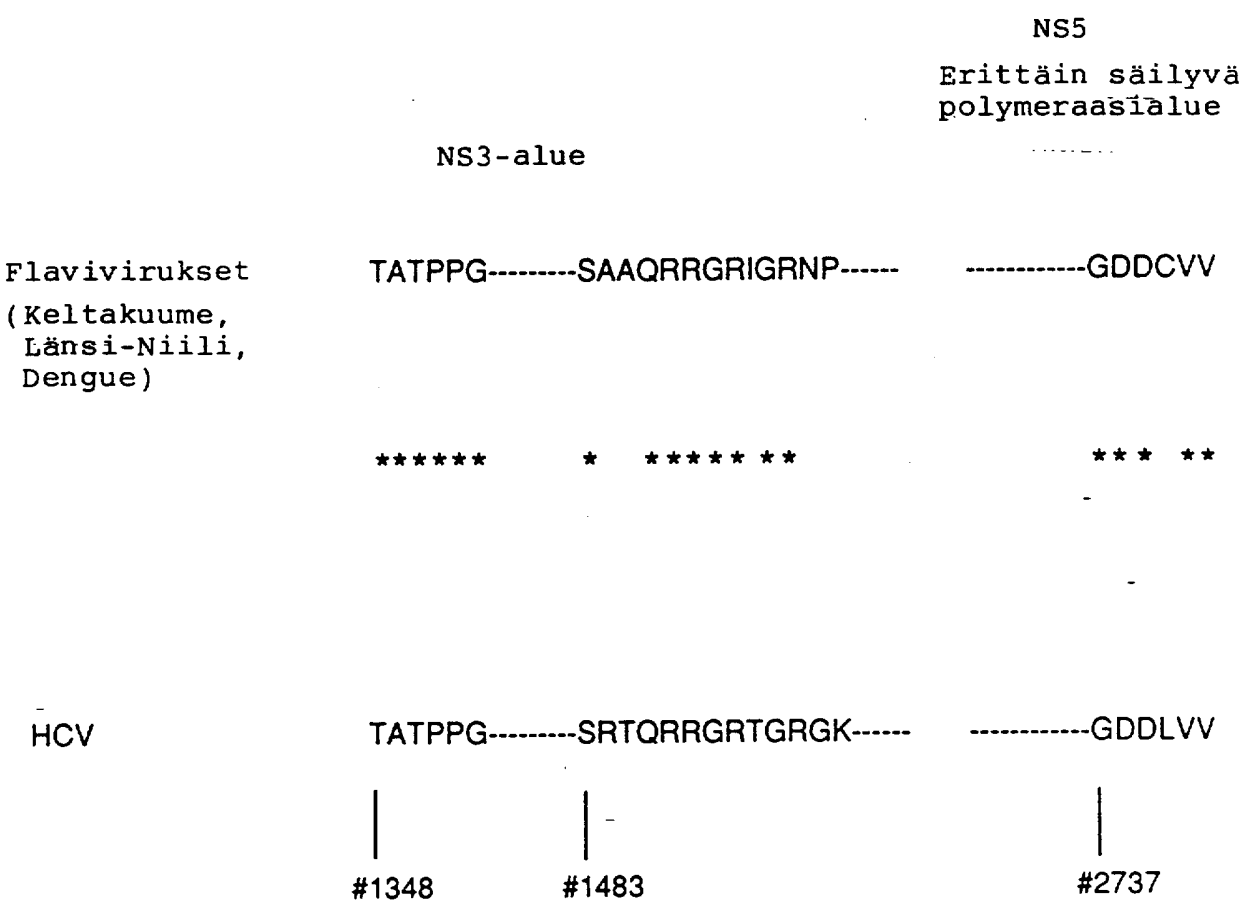


FIG. 21