



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 37 88 902 T3** 2004.11.25

(12) **Übersetzung der geänderten europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 251 575 B2**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **P 37 88 902.8**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **87 305 391.2**

(96) Europäischer Anmeldetag: **17.06.1987**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **07.01.1988**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **26.01.1994**

(97) Veröffentlichungstag

des geänderten Patents beim EPA: **13.11.2002**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **25.11.2004**

(51) Int Cl.7: **C12N 15/00**

**A61K 39/29, G01N 33/576**

(30) Unionspriorität:

**875337            17.06.1986    US**

**53991            22.05.1987    US**

(73) Patentinhaber:

**Chiron Corp. (n.d.Ges.d. Staates Delaware),  
Emeryville, Calif., US**

(74) Vertreter:

**Vossius & Partner, 81675 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, ES, FR, GB, GR, IT, LI, LU, NL, SE**

(72) Erfinder:

**Houghton, Michael, Danville, CA 94526, US; Wang,  
Kang-Sheng, Oakland, CA 94608, US; Choo,  
Qui-Lim, El Cerrito, CA 94530, US; Weiner, Amy  
Joan, Berkeley, CA 94702, US; Overby, Lacy  
Rasco, Alamo, CA 94507, US**

(54) Bezeichnung: **Hepatitis-Delta-Diagnostika und Impfstoffe, ihre Herstellung und Verwendung.**

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

**Beschreibung**

**[0001]** Die Erfindung betrifft Materialien und Verfahren zur Beherrschung der Ausbreitung von Infektionen durch Hepatitis- $\delta$ . Insbesondere betrifft sie DNA-Fragmente zur Diagnose, Proteine zur Diagnose und Schutzantigene und -antikörper bezüglich des Hepatitis- $\delta$ -Virus.

**[0002]** Eine ungewöhnliche Form des Hepatitisvirus, Hepatitis-D (HDV), auch  $\delta$ -Agens genannt, wurde 1977 von Rizzetto, M. et al., Gut 18 (1977), 997–1003, entdeckt. Das Virus wurde in Leberzellen von Patienten, die mit Hepatitis B infiziert waren, als ein neues Antigen/Antikörper-System durch Immunfluoreszenz nachgewiesen. Tatsächlich zeigten nachfolgende Untersuchungen, daß das Hepatitis D-Virus in seiner Replikation von einer begleitenden Infektion durch Hepatitis B abhängig ist. Die Natur der Helfer-Funktion ist noch unbekannt. Das HDV enthält anscheinend ein aus einer einzelsträngigen RNA bestehendes Genom, das von einem " $\delta$ -Antigen"-Protein umgeben ist. Dieses ist seinerseits vom Hepatitis B-Oberflächenantigen (HBsAg) in einer 35 bis 37 nm partikulären Konfiguration umgeben (Rizzetto, M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 77 (1980), 6124–6128; Bonino, F. et al., Hepatology 1 (1981), 127–131). Die während der Infektion produzierte DNA enthält demgemäß einen "genomischen" und einen komplementären Strang.

**[0003]** Die Epidemiologie und die Art der Übertragung von HDV ähneln denen von Hepatitis B (HBV) darin, daß HDV durch Bluttransfusion und durch direkten engen Kontakt von Körperflüssigkeiten übertragen wird. Es wurden 3 Muster der HDV- (oder  $\delta$ -) Infektion identifiziert: die akute, einer chronischen B-Infektion überlagerte  $\delta$ -Infektion, die chronische, einer chronischen B-Infektion überlagerte  $\delta$ -Infektion und die akute, einer gleichzeitigen akuten Hepatitis B-Infektion überlagerte  $\delta$ -Infektion (Schiff, E. R. et al., Diagnostic Medicine (März 1985), 17–22). Während die Erkrankung ursprünglich im Mittelmeerbecken nachgewiesen wurde, scheint sie sich weltweit auszubreiten (Jacobson, I. M. et al., Hepatology 5 (1985), 188–191). Eine Übersicht der demographischen und epidemiologischen Aspekte dieser Erkrankung findet sich ebenfalls in Rizzetto, M. et al., J. Hepatol. 1 (1985), 187–193.

**[0004]** Obwohl der Krankheitsverlauf gut charakterisiert und die allgemeine Struktur des Virions verstanden ist, waren bisher weder Informationen zur genetischen Struktur des Virus verfügbar, noch wurde die Natur des  $\delta$ -Antigens beschrieben. Der einzig verfügbare Test zum Nachweis der Erkrankung durch Verwendung von Blutproben ist ein in Europa auf dem Markt befindlicher Immunassay, der in den Vereinigten Staaten von der FDA noch nicht genehmigt wurde. Frühere Nachweismethoden beschränkten sich auf direkte Immunfluoreszenz in den Kernen von Hepatocyten in Biopsieproben. Eine Form des Tests beruht auf der Fähigkeit des im Testserum enthaltenen Antikörpers, die Bindung von markiertem anti- $\delta$ -IgG an das  $\delta$ -Antigen per se zu blockieren. Eine andere Anordnung stützt sich auf die Fähigkeit von anti- $\delta$ -IgM aus dem Testserum, anti-Human-IgM (spezifisch für die  $\mu$ -Kette) zu binden, das an einer festen Phase fixiert ist, worauf die Zugabe von Standard- $\delta$ -Antigen und markiertem anti- $\delta$ -IgM folgt, so daß die Anwesenheit von anti- $\delta$ -IgM im Testserum (zusammen mit dem zugegebenen  $\delta$ -Antigen) die Bindung von markiertem anti- $\delta$ -IgM erlaubt. Keiner dieser Tests benötigt eine Analyse der oder Kenntnisse über die  $\delta$ -Antigen-Protein-Struktur oder die genomische Struktur von HDV.

**[0005]** Nun ist es möglich, wirksame DNA-Hybridisierungssonden zur Diagnose der Erkrankung zu entwerfen. Genauso ist es möglich, als Impfstoffe und diagnostische Testsubstanzen verwendbare rekombinante Proteine zu erzeugen. Außerdem können die rekombinant hergestellten Proteine zur Erzeugung von Antikörpern verwendet werden, die für die Diagnose oder die passive Therapie nützlich sind.

**[0006]** Die Erfindung stellt eine Familie von cDNA-Kopien der vollständigen genomischen Sequenz von HDV bereit. Teile dieser DNA-Sequenzen sind als Sonden zur Diagnose der Anwesenheit des Virus in klinischen Proben und zum Isolieren natürlich vorkommender Virusvarianten nützlich. Ein Verständnis der grundsätzlichen genomischen Sequenz (und ihres Komplements) macht ebenfalls die Polypeptidsequenz der innerhalb eines der offenen Leserahmen codierten  $\delta$ -Antigene zugänglich und erlaubt die Herstellung dieser Peptide oder Teile davon, die als Standards oder als Reagenzien in diagnostischen Tests und als Bestandteile von Impfstoffen nützlich sind. In ähnlicher Weise erlaubt die Analyse anderer offener Leserahmen jedes Stranges eine Schlußfolgerung auf zusätzliche virale Peptidsequenzen, die für HDV charakteristisch sind, und die ähnlich nützlich sein können. Schutz-Antikörper lassen sich ebenfalls gegen die rekombinant hergestellten Proteine erzeugen und können in polyclonaler oder monoclonaler Form erhalten werden.

**[0007]** Die Verfügbarkeit einer vollständigen HDV-Sequenz erlaubt es somit, Polypeptide zu entwerfen und zu konstruieren, die entweder als Impfstoffe oder Diagnosereagenzien oder als Intermediate bei der Herstellung monoclonaler Antikörper- (Mab-) Präparationen, die in der passiven Immuntherapie gegen die Erkrankung

nützlich sind oder als Intermediate bei der Produktion von Antikörpern, die als Diagnosereagenzien nützlich sind, dienen. können. Ohne die Bereitstellung der Sequenz des vollständigen Genoms ist die Konstruktion therapeutischer oder präventiver Zusammensetzungen und eine erfolgreiche Herstellung optimal wirksamer Produkte unmöglich.

**[0008]** Dementsprechend betrifft die Erfindung Nucleotidsequenzen, die aus dem in **Fig. 2** dargestellten HDV-Genom oder seinem Komplement abgeleitet sind, und die zur Herstellung von HDV-Diagnostika und -Impfstoffen nützlich sind. Die Erfindung betrifft damit die Verwendung dieser Sequenz oder von deren Teilen als oligomere Sonden, zur Herstellung von Peptiden, die als Diagnosemittel oder als Impfstoffe dienen können, und sie betrifft diese Peptide selbst und polyclonale und monoclonale Antikörper, die bei der Diagnose und der Behandlung der Erkrankung nützlich sind.

**[0009]** Die Erfindung betrifft ferner Expressionssysteme, die fähig sind, ein gewünschtes Protein zu produzieren, das durch Sequenzen, die vom vollständigen Genom abgeleitet sind, codiert ist. Die Erfindung betrifft ferner rekombinante Vektoren, die solche Systeme oder Teile davon enthalten, rekombinante Wirtszellen, die mit derartigen Vektoren transformiert sind, Proteine, die von den transformierten Zellen produziert werden und Impfstoffe, die aus solchen Proteinen hergestellt werden. Außerdem betrifft die Erfindung spezifische Peptidsequenzen, die durch das Genom codierte Epitope repräsentieren und Sequenzen, die kovalent mit einem Marker oder mit Trägerproteinen verknüpft sind. Außer den herkömmlicheren Trägern schließen Trägerproteine das mit der Hepatitis B-Infektion assoziierte 22nm-Partikel ein, das Polyalbumin-Rezeptorstellen enthält und 1000-fach immunogener ist als die nicht-zusammengefügte Untereinheits-Komponente. Durch Einfügen antigener HDV-Determinanten in das 22nm-HBsAG-Partikel erhält man für diese Epitope eine erhöhte Immunogenität.

**[0010]** Ferner betrifft die Erfindung Verfahren zur Herstellung dieser gewünschten Polypeptid-Impfstoffe und Immunglobuline, und sie betrifft Test-Kits, die die Sonden, Polypeptide und/oder Immunglobuline enthalten.

**[0011]** Ferner betrifft die Erfindung außerdem die Verwendung einer Nucleotidsequenz, die von dem in **Fig. 2** dargestellten HDV-Genom oder dessen Komplement abgeleitet ist, bei der Herstellung eines Impfstoffes gegen HDV oder bei der Herstellung eines Kits zum Nachweis von Material, das charakteristisch für HDV ist, wobei die Sequenz, wie sie weiter definiert wird, fakultativ einen Bereich enthält, der von den offenen Leserahmen (ORF) 1 bis 12 und bevorzugt von ORF1, ORF2, ORF5, ORF6 oder ORF7 und bevorzugter von ORF5 abgeleitet ist

#### Erklärung der beigefügten Zeichnungen

**[0012]** **Fig. 1** zeigt ein Diagramm des einzelsträngigen RNA-Genoms von HDV und die Position überlappender cDNA-Clone, die zur Aufklärung der Struktur des Genoms verwendet wurden.

**[0013]** **Fig. 2** zeigt die vollständige Nucleotidsequenz der mit dem vollständigen HDV-RNA-Genom korrespondierenden doppelsträngigen cDNA.

**[0014]** **Fig. 3** zeigt die Sequenz der zur RNA von ORF5 äquivalenten cDNA. Außerdem sind die abgeleitete Aminosäuresequenz und die Heterogenitäten in den Nucleotiden, wie sie sich aus der Bestimmung aus anderen Clonen ergeben haben, angegeben.

**[0015]** **Fig. 4** zeigt die Sequenz des Clons  $\delta 1$ , der zum Erlangen der Nucleotidsequenz des Virus nützlich war.

**[0016]** **Fig. 5** zeigt die Hybridisierung der Sonde mit der viralen RNA.

**[0017]** **Fig. 6** zeigt Gele, die die Produktion immunologisch reaktiver HDV-Peptide durch *E. coli* beweisen.

**[0018]** **Fig. 7** zeigt die Positionen der ORFs des HDV-Genoms und seines Komplements.

**[0019]** **Fig. 8** zeigt einen unter Verwendung von HDV-Antiserum ausgeführten Immunblot der exprimierten mit SOD fusionierten Produkte der ORFs 1, 2, 6 und 7 und des nichtfusionierten Expressionsproduktes von ORF5.

**[0020]** **Fig. 9** ist eine Restriktionskarte von pAB24, die einige genetische Merkmale einschließt.

**[0021] Fig. 10A** zeigt einen unter Verwendung von HDV-Antiserum ausgeführten Immunblot des in *E. coli* exprimierten nicht-fusionierten ORF5-Produkte im Vergleich mit Antigenen, die in HDV-Partikeln und in infizierten Leberlysaten vorhanden sind.

**[0022] Fig. 10B** zeigt einen Immunblot, der die Konkurrenz zwischen dem in Hefe exprimierten ORF5-Produkt und den in HDV-Partikeln anwesenden p24<sup>δ</sup> und p27<sup>δ</sup> um HDV-Antikörper beweist.

**[0023]** Figur 10C zeigt einen Immunblot, der die Konkurrenz zwischen dem in Hefe und in Bakterien exprimierten ORF5-Produkt und den in HDV-infizierter Leber vorhandenen p24<sup>δ</sup> und p27<sup>δ</sup> um HDV-Antikörper beweist.

**[0024] Fig. 11** zeigt durch ein indirektes Immunperoxidase-Anfärbeverfahren angefärbte Leberschnitte, die beweisen, daß das in Hefe exprimierte ORF5-Produkt mit Leber-HDV- $\delta$ -Antigen um HDV-Antikörper konkurriert.

#### A. Definitionen

**[0025]** Der Ausdruck eine Nucleotidsequenz "abgeleitet von" dem HDV-Genom oder der cDNR betrifft, wie er hier verwendet wird, eine die wesentlichen Eigenschaften des erläuterten Polynucleotids bewahrende Sequenz, die einen Teil der Gesamtsequenz, von der sie für den beabsichtigten Zweck abgeleitet ist, darstellt. Ein spezifisches, jedoch nicht einschränkendes Beispiel solch einer Ableitung würde eine Sequenz darstellen, die eine identische oder eine im wesentlichen identische Aminosäuresequenz codiert, die aber wegen Codon-Degeneration unterschiedliche spezifische Codons verwendet. Ein anderes Beispiel, ist der komplementäre Strang. Es ist notwendig, daß eine in diagnostischen Tests nützliche Sonde oder ein nützliches Oligonucleotid die Komplementarität zur gezeigten Sequenz beibehält. Sie/es kann aber kürzer sein, als die Gesamtsequenz oder kann Teile davon auslassen. Für Manipulationen oder zur Expression sind jedoch Nucleotidänderungen häufig erwünscht, um Restriktionsstellen zu erzeugen oder zu zerstören, Stellen zur Prozessierung bereitzustellen oder die codierte Aminosäuresequenz in einer Weise zu verändern, die ihre Funktionsfähigkeit nicht nachteilig beeinflusst. Der Begriff "Nucleotidsequenz" bezieht sich sowohl auf eine Ribonucleotid- als auch eine Desoxyribonucleotid-Sequenz und schließt sowohl den genomischen als auch dessen komplementären Strang ein.

**[0026]** Die Wendung eine DNA "abgeleitet von" der Nucleotidsequenz, die das HDV-Genom umfaßt, betrifft deshalb eine DNA-Sequenz, die eine mit der eines Bereichs der genomischen Nucleotidsequenz (oder ihres Komplementes) oder mit einer Kombination von Bereichen dieser Sequenz korrespondierende Sequenz enthält, die in bekannter Weise übereinstimmend mit ihrer beabsichtigten Verwendung modifiziert ist. Solche DNAs sind natürlich nicht notwendigerweise physikalisch von der Nucleotidsequenz des Gens abgeleitet, sondern betreffen auf beliebige Weise erzeugte Polynucleotide, denen die Information zugrunde liegt, die durch die Basensequenz in dem Bereich (den Bereichen) aus dem (denen) das Polynucleotid abgeleitet ist, bereitgestellt wird. Bereiche z.B., von denen typische DNA-Sequenzen "abgeleitet" werden können, schließen solche Bereiche ein, die spezifische Epitope codieren und solche, die Teile des  $\delta$ -Antigens codieren. Ähnlich bezieht sich der Ausdruck ein Peptid "abgeleitet von" den  $\delta$ -Antigenen auf eine im wesentlichen mit der dieser Polypeptide oder eines Teils davon identischen Aminosäuresequenz, die dieselben biologischen Eigenschaften wie dieser Anteil hat. Die Art der Synthese solch eines "abgeleiteten" Peptids ist belanglos – sie kann beispielsweise durch chemische Synthese oder auf rekombinantem Wege erfolgen.

**[0027]** "Rekombinante Wirtszellen", "Wirtszellen", "Zellen", "Zelllinien", "Zellkulturen" und andere ähnliche Ausdrücke, die Mikroorganismen oder höhere in einzelliger Form kultivierte eukaryontische Zelllinien kennzeichnen, werden austauschbar verwendet und beziehen sich auf Zellen, die als Rezipienten für rekombinante Vektoren oder andere Transfer-DNA verwendet werden können oder verwendet worden sind, und sie schließen die Nachkommenschaft der ursprünglich transfizierten Zelle ein. Es ist klar, daß die Nachkommenschaft einer einzelnen Elternzelle wegen zufälliger oder gewollter Mutationen nicht unbedingt vollständig in der Morphologie oder in der genomischen DNA oder dem gesamten DNA-Komplement mit der ursprünglichen Elternzelle identisch sein muß. Die Nachkommen der Elternzelle, die eine ausreichende Ähnlichkeit mit der Elternzelle haben, um durch die relevante Eigenschaft wie z.B. dem Vorhandensein einer ein gewünschtes Peptid codierenden Nucleotidsequenz gekennzeichnet zu sein, sind in den definitionsgemäßen Nachkommen enthalten, und sie werden durch die vorstehenden Ausdrücke umfaßt.

**[0028]** "Kontrollsequenz" bezieht sich auf DNA-Sequenzen, die zur Expression codierender Sequenzen, mit denen sie verknüpft sind, notwendig sind. Die Art solcher Kontrollsequenzen unterscheidet sich und hängt vom

Wirtsorganismus ab. In Prokaryonten schließen solche Kontrollsequenzen im allgemeinen einen Promotor und eine Ribosomenbindungsstelle ein. In Eukaryonten schließen solche Kontrollsequenzen im allgemeinen Promotoren, Terminatoren und in einigen Fällen "Enhancer" ein. Es ist beabsichtigt, daß der Ausdruck "Kontrollsequenzen" mindestens alle Bestandteile einschließt, deren Anwesenheit für die Expression notwendig ist, und er kann außerdem zusätzliche Bestandteile einschließen, deren Vorhandensein vorteilhaft ist.

**[0029]** Der Ausdruck "funktionell verknüpft" oder "funktionell verbunden" bezieht sich auf eine Juxtaposition, in der die so beschriebenen Bestandteile in einer Beziehung stehen, die es ihnen erlaubt, in der gewünschten Weise zu funktionieren. Eine mit einer codierenden Sequenz "funktionell verknüpfte" Kontrollsequenz ist in solch einer Weise ligiert, daß die Expression der codierenden Sequenz unter Bedingungen erreicht wird, die mit den Kontrollsequenzen kompatibel sind.

**[0030]** Ein "offener Leserahmen" ist ein Bereich einer Polynucleotidsequenz, der ein Polypeptid codiert.

**[0031]** Der Ausdruck "immunologisch identifizierbar mit/als" bezieht sich auf das Vorhandensein von Epitopen im nicht-nativen, d.h. künstlich synthetisierten oder rekombinanten Protein, die ebenfalls in den viralen HDV-Proteinen vorhanden sind. Diese Epitope können durch ihre immunologische Reaktivität mit Antikörpern, die gegen die HDV-Proteine gerichtet sind, identifiziert werden. Ihre Anwesenheit im nicht-nativen Protein kann durch direkte Reaktivität mit den HDV-Antikörpern ebenso nachgewiesen werden, wie durch Konkurrenz-Tests zwischen nicht-nativen und HDV-Proteinen um die gegen die HDV-Proteine gerichteten Antikörper. Verfahren zum Nachweis der Bindung eines Antikörpers und zur Bestimmung der Konkurrenz bei der Bindung sind dem Fachmann bekannt und werden außerdem nachstehend erläutert.

## B. Allgemeine Beschreibung

**[0032]** Die erfindungsgemäßen nützlichen Materialien und Verfahren werden durch die Bereitstellung einer Familie von Nucleotidsequenzen ermöglicht, die jeweils ein vollständiges Genom des Hepatitis-D-Virus enthalten. Die Verfügbarkeit dieser Familie von Polynucleotiden erlaubt erstens das Isolieren anderer Mitglieder der Genom-Familie, die sich in kleinen Heterogenitäten unterscheiden. Zweitens erlaubt es die Konstruktion von diagnostisch nützlicher DNA und von diagnostisch nützlichen Proteinen. Hinsichtlich der DNA sind Oligomere mit ungefähr 8 bis 10 bp oder mehr als Hybridisierungs sondens bei der Diagnose der Erkrankung nützlich. Solche Sonden lassen sich zum Nachweis des viralen Genoms z.B. in Seren von Probanden, bei denen der Verdacht besteht, daß sie das Virus in sich tragen, verwenden. Die HDV-Sequenzen erlauben ebenfalls den Entwurf und die Herstellung von HDVspezifischen Polypeptiden, die als diagnostische Reagenzien zum Testen des Vorhandenseins von HDV induzierten Antikörpern im Serum oder Blut nützlich sind. Gegen diese Polypeptide hervorgerufene Antikörper sind als Diagnostika ebenfalls nützlich. (Da zusätzlich zum offenen Leserahmen des  $\delta$ -Antigens weitere offene Leserahmen im Hinblick auf das vollständige Genom oder seines Komplements entschlüsselt werden können, kann man die Primärstrukturen von HDVverwandten Proteinen, die sich vom  $\delta$ -Antigen selbst unterscheiden, ableiten. Bei diesen kann es sich ebenfalls um für das Virus kennzeichnende Marker-Polypeptide handeln, und sie können für die Diagnose und möglicherweise für die Immunisierung nützlich sein.) Die Kenntnis der Gensequenz ermöglicht schließlich außerdem den Entwurf und die Herstellung von Impfstoffen, die gegen HDV wirksam sind, und außerdem die Herstellung von Schutz-Antikörpern.

**[0033]** Die aus dem Genom verfügbare Sequenzinformation erlaubt es, die Aminosäuresequenz des  $\delta$ -Antigens oder anderer Polypeptide abzuleiten und geeignete Epitope zu identifizieren. Das gesamte  $\delta$ -Antigen oder geeignete Teile davon kann man über die Fragmente der relevanten DNA, die man unabhängig voneinander erhält und exprimiert, herstellen. Somit stellt man die gewünschten Polypeptide durch Rekombinationstechniken bereit. Sowohl prokaryontische als auch eukaryontische Wirte sind für solch eine Expression nützlich. Kurze Polypeptidfragmente kann man ebenfalls chemisch synthetisieren und zur Verwendung als Impfstoffe mit Trägerproteinen verknüpfen. Ferner können die Epitope hergestellt werden, die mit einem Immunogenität vermittelnden Protein verknüpft sind. Die so produzierten Proteine können ihrerseits als Impfstoffe oder zur Induktion immunkompetenter B-Zellen in Wirtstieren verwendet werden, wobei die B-Zellen dann zur Produktion von Hybridomen verwendet werden können, die für die passive Immuntherapie nützliche Antikörper sekretieren.

### B.1. Präparation der HDV-Gen-Sequenz

**[0034]** Das Serum von mit HDV infizierten Schimpansen, das einen hohen Titer des Virus enthielt (ungefähr  $10^{11}$  schimpansen-infektiöse Erkrankungsdosis ("chimpanzee infectious disease dose")/ml) wurde als Quelle für das Virus verwendet. Die aus dem geernteten Virus extrahierte Nucleinsäure ergab, wenn man eine Analyse mit

denaturierender Gelelektrophorese vornahm, übereinstimmend eine Dublett-RNA, die ungefähr 1700 Nucleotide enthielt. Unter Verwendung dieser RNA als Matrize wurde ein cDNA-Clou, pKD3, mit einer ungefähr 174 bp großen cDNA, die spezifisch mit dem RNA-Dublett hybridisierte, erhalten, und seine DNA-Sequenz wurde bestimmt (Denniston, K. J. et al., Science 232 (1986), 873–975). Auf der Grundlage dieser aufgeklärten DNA-Sequenz, die der Publikation vorausgehend bereitgestellt worden war, wurden zwei komplementäre synthetische Oligomere hergestellt, von denen nur das eine mit der Dublett-RNA hybridisiert.

**[0035]** Das hybridisierende Oligomer wurde dann als Sonde zum Absuchen einer cDNA-Bank verwendet, die nach dem Okayama/Berg-Verfahren aus der Dublett-RNA hergestellt worden war. Es ergab sich der Clon  $\delta 1$ , der eine mit dem RNA-Dublett hybridisierende 570 bp-Insertion enthielt, die als Sonde zur Gewinnung des überlappenden Clons  $\delta 2$  aus derselben Bank verwendet wurde.

**[0036]** Die zusätzlichen Clone  $\delta 4$  und  $\delta 115$  wurden durch Absuchen einer in pBR322 durch Zufallspriming der isolierten RNA hergestellten cDNA-Bank mit dem  $\delta 1$ -Clon als Sonde erhalten.  $\delta 115$  wurde dann als Sonde verwendet, um die überlappenden Clone  $\delta 7a$ ,  $\delta 3b$ ,  $\delta 7b$  zu erhalten. Die unabhängigen Clone  $\delta 3b$ ,  $\delta 4$ ,  $\delta 7a$ ,  $\delta 7b$  und  $\delta 115$  stellten zusammen mit  $\delta 1$  und  $\delta 2$  die vollständige Sequenz der zirkulären einzelsträngigen in **Fig. 1** schematisch dargestellten 1679 Nucleotide langen RNA bereit.

**[0037]** Die Beschreibung des Verfahrens zur Gewinnung des vollständigen HDV-Genoms ist natürlich vor allem historisch interessant. Die resultierende Sequenz (und damit ebenfalls ihr Komplement) wird hier bereitgestellt und die vollständige Sequenz oder irgendwelche Teile davon ließen sich ebenfalls unter Anwendung synthetischer Verfahren oder durch eine Kombination synthetischer Verfahren mit einer Gewinnung partieller Sequenzen nach Verfahren, die den hier beschriebenen ähnlich sind, präparieren.

## B.2. Herstellung viraler Polypeptide und ihrer Fragmente

**[0038]** Die Verfügbarkeit der vollständigen genomischen Sequenzen erlaubt die Konstruktion von Expressionsvektoren, die antigene aktive Bereiche des  $\delta$ -Antigens oder andere beliebige virale vom Genom oder seinem Komplement codierte Polypeptide codieren. Die die gewünschten Proteine codierenden Fragmente werden aus den cDNA-Clonen durch herkömmliche Restriktionsspaltung oder durch synthetische Verfahren erhalten und in Vektoren ligiert, die z.B. Anteile von Fusionssequenzen von  $\beta$ -Galactosidase oder Superoxiddismutase (SOD), bevorzugt SOD, enthalten. Jeder gewünschte Teil des HDV-Genoms, der in einem der Stränge einen offenen Leserahmen enthält, kann als rekombinantes Protein, z.B. als ein reifes oder ein Fusionsprotein erhalten werden, oder er kann durch chemische Synthese oder allgemeine Rekombinationsverfahren bereitgestellt werden.

**[0039]** Die DNA, die das gewünschte Polypeptid sowohl in fusionierter als auch in reifer Form und auch mit oder ohne eine die Sekretion erlaubende Signalsequenz codiert, kann in Expressionsvektoren ligiert werden, die für jeden beliebigen vorteilhaften Wirt geeignet sind. Gegenwärtig werden sowohl eukaryontische als auch prokaryontische Wirtssysteme zur Erzeugung rekombinanter Polypeptide verwendet, und eine Zusammenfassung einiger der bekannteren Kontrollsysteme in Wirtszelllinien wird im nachstehenden Abschnitt C1 gegeben. Das Polypeptid wird dann aus den lysierten Zellen oder aus dem Kulturmedium gereinigt. Es wird soweit gereinigt, wie es für seine beabsichtigte Verwendung notwendig ist. Solche Peptide können als Diagnostika verwendet werden, oder zu Impfstoffen formuliert werden. Gegen diese Polypeptide gerichtete Antikörper können ebenfalls als Diagnostika verwendet werden.

**[0040]** Die Analyse des Genoms zeigt das Vorhandensein einer Reihe offener Leserahmen (ORFs). Mindestens einer von ihnen, ORF5, codiert das  $\delta$ -Antigen. Andere codieren möglicherweise vorher unbekannte virale Polypeptide. Eine Reihe solcher Leserahmen, die mindestens ungefähr 150 Nucleotide enthalten und denen ein ATG-Startcodon vorangeht, wurden identifiziert. Es gibt zusätzliche Leserahmen mit längeren offenen Sequenzen, denen aber ein ATG-Startcodon fehlt. Die Leserahmen wurden sowohl im cDNA-Strang, der sinnlich mit dem Genom ist, als auch im anti-Genomstrang gefunden.

**[0041]** Fünf der große Polypeptide codierenden ORFs, die ein Methionin proximal zum Aminoterminus enthalten, wurden in Bakterien exprimiert. Nur die vom anti-genomischen ORF5 codierten Polypeptide kreuzreagierten mit Antiseren, die von Patienten mit Hepatitis- $\delta$ -Infektionen erhalten worden waren. Aufgrund immunologischer Analysen, bei denen virale Extrakte und rekombinante, in Bakterien und in Hefe synthetisierte ORF-Polypeptide verwendet wurden, ergab sich, daß ORF5 die immunogenen Epitope codiert, die von den beiden viralen Hepatitis  $\delta$ -Polypeptiden p27<sup>s</sup> und p24<sup>s</sup> geteilt werden, und daß ORF5 wahrscheinlich das vollständige strukturelle Gen für p27<sup>s</sup> und p24<sup>s</sup> darstellt. Aufgrund der hier beschriebenen Immunkonkurrenz-Un-

tersuchungen ergibt sich, daß das nucleare Hepatitis  $\delta$ -Antigen sowohl p27 <sup>$\delta$</sup>  und p24 <sup>$\delta$</sup>  umfaßt. Ein Vergleich der cDNA-Nucleotidsequenzen in den Clonen 115, 7a, 1, 4, 2, 7b und 3b zeigt, daß in einem geringen Ausmaß eine Heterogenität in den überlappenden Sequenzen vorliegt (vgl. Tabelle 2). Eine Heterogenität in der Nucleotidsequenz ist für RNA enthaltende Viren nicht ungewöhnlich (Holland, J. et al., Science 215 (1982), 1577). Es ist insbesondere möglich, daß die Sequenzheterogenitäten in der Position 608 von ORF5 der Grund für den Unterschied zwischen p27 <sup>$\delta$</sup>  und p24 <sup>$\delta$</sup>  ist, d.h. die Größe der beiden Polypeptide kann sich aus den zusätzlichen Aminosäuren im C-terminalen Anteil von p27 <sup>$\delta$</sup>  ergeben. Wenn die Position durch ein G besetzt ist, codiert das dieses G enthaltende Triplet Tryptophan, und die Translation schreitet bis zum in der Position 664 (vgl. Fig. 3) beginnenden Opal-Stoppocodon fort. Wenn alternativ die Position 608 ein A enthält, codiert das dieses A umfassende Triplet ein Amber-Stoppocodon, und die Translation bricht an diesem Punkt ab, falls die Zelle nicht die Fähigkeit zur Suppression des Ambercodons besitzt, wodurch die Translation bis zum Opalcodon fort-schreiten könnte.

### B.3. Herstellung antigener Polypeptide und Konjugation mit einem Träger

**[0042]** Der antigene Bereich von Peptiden ist im allgemeinen relativ klein – er hat typischerweise eine Länge von 10 Aminosäuren oder weniger. Fragmente mit nur 5 Aminosäuren können typischerweise einen antigenen Bereich kennzeichnen. Diese Abschnitte können mit Bereichen des  $\delta$ -Antigens oder mit Bereichen zusätzlich codierter Marker-Polypeptide korrespondieren. Dementsprechend können bei Verwendung des HDV-Genoms als Grundlage DNAs, die kurze Peptidabschnitte codieren, rekombinant entweder als Fusionsproteine oder als isolierte Peptide exprimiert werden. Außerdem lassen sich kurze Aminosäuresequenzen vorteilhafterweise chemisch synthetisieren. In Fällen, in denen das synthetisierte Peptid die richtige Konfiguration und somit das richtige Epitop aufweist, aber zu klein ist, um immunogen zu sein, kann das Peptid mit einem geeigneten Träger verknüpft werden.

**[0043]** Eine Reihe von Verfahren zur Herstellung solcher Verknüpfung sind Stand der Technik, einschließlich der Bildung von Disulfidverknüpfungen unter Verwendung von N-Succinimidyl-3-(2-pyridyl-thio)propionat (SPDP) und Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)-cyclohexan-1-carboxylat (SMCC), die bei der Pierce Company, Rockford, Illinois, erhältlich sind. (Wenn dem Peptid eine Sulfhydryl-Gruppe fehlt, kann man diese durch Zufügen eines Cystein-Restes bereitstellen.) Diese Reagenzien erzeugen eine Disulfidverknüpfung zwischen sich und Peptid-Cysteinresten des einen Proteins und eine Amidverknüpfung über die  $\epsilon$ -Aminogruppe eines Lysins oder über eine andere freie Aminogruppe des anderen Peptids. Eine Reihe solcher Disulfid-Amid-erzeugenden Agenzien sind bekannt. Siehe z.B. Immun Rev 62 (1982), 185. Andere bifunktionelle Kupplungsagenzien bilden anstelle einer Disulfidverknüpfung einen Thioether. Viele dieser Thioether bildenden Agenzien sind käuflich erhältlich und schließen reaktive Ester von 6-Maleimidocaprinsäure, 2-Bromessigsäure, 2-Jodes-sigsäure, 4-(N-Maleimido-methyl)cyclohexan-1-carbonsäure und ähnliche Verbindungen ein. Die Carboxylgruppen lassen sich durch Kombination mit Succinimid oder mit dem Natriumsalz von 1-Hydroxy-2-nitro-4-sulfonsäure aktivieren. Die vorstehende Liste ist nicht als erschöpfend aufzufassen und Modifikationen der genannten Verbindungen lassen sich natürlich verwenden.

**[0044]** Es läßt sich jeder beliebige Träger verwenden, der nicht selbst die für den Wirt nachteilige Produktion von Antikörpern hervorruft, z.B. die verschiedenen Serumalbumine, Tetanustoxoide oder "Keyhol-limpet"-Hemocyanin (KLH).

**[0045]** Die Konjugate führen, wenn sie in geeignete Versuchsobjekte injiziert werden, zur Produktion von Antisera, die Immunglobuline enthalten, die nicht nur spezifisch gegen die Konjugate, sondern außerdem gegen die Fusionsproteine, die die analogen Teile der Sequenz tragen, und gegen geeignete Determinanten innerhalb des gesamten HDV reaktiv sind.

### B.4. Herstellung von hybriden Partikel-Immunogenen, die HDV-Epitope enthalten

**[0046]** Die Immunogenität der HDV-Epitope läßt sich ebenfalls verstärken, indem man sie in Säuger- oder He-fesystemen fusioniert mit partikelbildenden Proteinen, wie dem mit dem Hepatitis B-Oberflächenantigen assoziierten Protein herstellt. Konstruktionen, in denen das HDV-Epitop direkt mit dem das Partikel bildende Protein codierenden Sequenzen verknüpft sind, produzieren Hybride, die bezüglich des HDV-Epitops immunogen sind. Außerdem enthalten alle hergestellten Vektoren Hepatitis B-Virus (HBV) spezifische Epitope, die unterschiedliche Ausmaße der Immunogenität für z.B. das pre-S-Peptid aufweisen. Somit sind Partikel, die aus dem partikelbildenden Protein unter Einbeziehung von HDV-Sequenzen konstruiert sind, immunogen sowohl hinsichtlich HDV als auch HBV.

**[0047]** Es wurde gezeigt, daß sich Hepatitis-Oberflächenantigen (HBsAg) genauso in *S. cerevisiae* bildet und zusammenlagert (Valenzuela et al., Nature 298 (1982), 344–350), wie in z.B. Säugerzellen (Valenzuela P., et al. Hepatitis B (1984), Millman, I. et al. Herausgeber, Plenum Press, Seiten 225–236). Es wurde gezeigt, daß die Bildung solcher Partikel die Immunogenität der monomeren Untereinheit verstärkt. Die Konstruktionen können ebenfalls das immundominante Epitop von HBsAg einschließen, das die 55 Aminosäuren des pre-Oberflächen-(pre-S)Bereichs enthält (Neurath et al., Science 224 (1984), 392–394). In Hefe exprimierbare Konstruktionen des pre-S-HBsAg-Partikels sind in der am 18. Juni 1984 eingereichten US-Anmeldung mit der Serien-Nr. 621,756 offenbart. Hybride, die heterologe virale Sequenzen für die Hefeexpression einschließen sind in der am 13. September 1984 eingereichten US-Anmeldung mit der Serien-Nr. 650,323 offenbart. Auf beide dem Inhaber der vorliegenden Anmeldung gehörende Anmeldungen wird hier Bezug genommen. Diese Konstruktionen kann man ebenfalls in Säugerzellen, z.B. in den Ovarzellen des Chinesischen Hamsters, unter Verwendung eines SV40-Dihydrofolat-Reduktase-Vektors (Michelle et al., Int. Symp on Viral Hepatitis (1984)) exprimieren.

**[0048]** Ferner kann man Teile der Sequenz selbst, die das Partikel bildende Protein codiert, durch Codons für ein HDV-Epitop ersetzen. In dieser Substitution können Bereiche, die zur Aggregation der Einheiten bei der Bildung immunogener Partikel in Hefe oder Säugern nicht benötigt werden, entfernt werden, wodurch zusätzliche antigene Stellen von Hepatitis B aus der Konkurrenz mit dem HDV-Epitop eliminiert werden.

### B.5. Herstellung von Impfstoffen

**[0049]** Die Herstellung von Impfstoffen, die Peptidsequenzen als aktive Bestandteile enthalten, sind Stand der Technik. Typischerweise werden solche Impfstoffe in einer injizierbaren Form entweder als flüssige Lösungen oder Suspensionen hergestellt. Feste Formen, die zum Lösen oder Suspendieren in einer Flüssigkeit vor der Injektion geeignet sind, können ebenfalls hergestellt werden. Die Präparation kann ferner emulgiert oder das Protein in Liposomen verpackt werden. Der aktive immunogene Bestandteil wird oft mit Excipienten vermischt, die pharmazeutisch verträglich und mit dem aktiven Bestandteil kompatibel sind. Geeignete Excipienten sind beispielsweise Wasser, Kochsalzlösung, Glucose, Glycerin, Ethanol oder ähnliches und Kombinationen daraus. Ferner kann der Impfstoff, falls gewünscht, kleinere Mengen von Hilfsstoffen, wie befeuchtende, oder emulgierende Mittel, pH-Puffersubstanzen oder Adjuvantien enthalten, die die Wirksamkeit des Impfstoffes steigern. Die Impfstoffe werden herkömmlicherweise parenteral durch Injektion, z.B. entweder subkutan oder intramuskulär verabreicht. Zusätzliche, für andere Formen der Verabreichung geeignete Formulierungen schließen Suppositorien und in einigen Fällen Formulierungen für die orale Verabreichung ein. Bei Suppositorien können traditionelle Binder und Träger z.B. Polyalkylglykole oder Triglyceride einschließen. Solche Suppositorien können aus Gemischen gebildet werden, die den aktiven Bestandteil im Bereich von 0,5 % bis 10 %, bevorzugt von 1 % bis 2 % enthalten. Orale Formulierungen enthalten solche normalerweise verwendeten Excipienten mit pharmazeutischem Grad wie Mannit, Lactose, Stärke, Magnesiumstearat, Natriumsaccharin, Cellulose, Magnesiumcarbonat. Diese Zusammensetzungen liegen in der Form von Lösungen, Suspensionen, Tabletten, Pillen und Kapseln, von Formulierungen mit stetiger Freisetzung oder von Pulvern vor und enthalten 10 % bis 95 %, bevorzugt 25 bis 70 % des aktiven Bestandteils.

**[0050]** Bei der Formulierung der Impfstoffe können Proteine in der neutralen Form oder als Salz vorliegen. Pharmazeutisch verträgliche Salze schließen (mit den freien Aminogruppen der Peptide gebildete) Säure-Additions-Salze und solche Salze ein, die mit anorganischen Säuren, wie z.B. Salzsäure, Phosphorsäuren oder solchen organischen Säuren, wie Essigsäure, Oxalsäure, Traubensäure, Mandelsäure usw. gebildet werden. Mit den freien Carboxylgruppen gebildete Salze lassen sich ebenfalls von anorganischen Basen, wie Natrium-, Kalium-, Ammonium-, Calcium- oder Eisenhydroxid und solchen organischen Basen wie Isopropylamin, Trimethylamin, 2-Ethylaminoethanol, Histidin, Procain usw. ableiten.

**[0051]** Die Impfstoffe werden in einer mit der Formulierung der Dosis kompatiblen Weise und in solch einer Menge verabreicht, die therapeutisch wirksam und immunogen ist. Die zu verabreichende Menge hängt von dem zu behandelnden Individuum, von der Kapazität seines Immunsystems zur Synthese von Antikörpern und vom gewünschten Ausmaß des Schutzes ab. Die genauen Mengen an aktivem Bestandteil, die zur Verabreichung benötigt werden, hängen von der Beurteilung des praktisch arbeitenden Fachmanns ab und sind charakteristisch für jeden Einzelfall. Es wird darauf hingewiesen, daß wegen der Tatsache, daß eine  $\delta$ -Infektion von einer Infektion mit Hepatitis B abhängig ist, eine Subpopulation, für die ein anti- $\delta$ -Impfstoff besonders nützlich ist, die Gesamtheit der Hepatitis B-Träger darstellt. Es kann außerdem vorteilhaft sein, "duale" Impfstoffe zu konstruieren, die sowohl das B- als auch das D-Antigen enthalten.

**[0052]** Die im ORF5 codierten Polypeptide (und davon abgeleiteten Peptide) sind besonders geeignete Impf-

stoff-Bestandteile zum Schutz gegen eine HDV-Infektion, trotz der Tatsache, daß ORF5-Kern- (core-) Antigene des HDV-Partikels codiert. Impfstoffe, die rekombinant hergestellte Kern-Antigene von HBV enthalten, schützen wirksam gegen Hepatitis B-Infektion oder mindern eine solche; Murray, K. et al., EMBO J. 3 (1984), 645.

#### B.6. Herstellung von Antikörpern gegen HDV-Epitope

**[0053]** Die wie vorstehend beschrieben hergestellten immunogenen Proteine werden zur Immunisierung von Säugetieren verwendet. Die resultierenden Antiseren sind als Diagnostika nützlich. Man kann außerdem Lymphozyten oder Milzzellen aus diesen Tieren verwenden, um Hybridome herzustellen, die zur Sekretion monoklonaler Antikörper fähig sind, die gegen diese Epitope gerichtet und kreuzreaktiv gegen das infektiöse Virus sind. Die resultierenden monoklonalen Antikörper sind zur Diagnose besonders nützlich, und solche, die neutralisierende Wirkung haben, sind in der passiven Immuntherapie nützlich. Die innerhalb von ORF5 codierten Polypeptide und Antikörper gegen diese Polypeptide sind für die immunologische Diagnose von HDV besonders nützlich.

**[0054]** Wie nachstehend diskutiert, codiert ORF5 das  $\delta$ -Antigen, das anscheinend zwei virale Polypeptide, p24 <sup>$\delta$</sup>  und p27 <sup>$\delta$</sup>  umfaßt.

#### B.7. Diagnostische Oligonucleotid-Sonden und Kits

**[0055]** Unter Verwendung der offenbaren Familie von HDV-Genomen als Grundlage lassen sich Oligomere mit einer Länge von ungefähr 8 bp oder mehr entweder durch Herausschneiden oder synthetisch herstellen. Diese Oligonucleotide hybridisieren mit dem HDV-Genom und sind für den Nachweis des Virus in erkrankten Individuen nützlich. Eine Länge von 8 bp ist verwendbar, Sequenzen von 10 bis 12 bp werden aber bevorzugt und ungefähr 20 bp scheinen optimal zu sein. Bevorzugt leiten sich diese Sequenzen aus Bereichen ab, die keine Heterogenität aufweisen. Diese Sonden lassen sich nach Routineverfahren, die automatisierte Oligonucleotid-Syntheseverfahren einschließen, herstellen. Zu den nützlichen Sonden gehören z.B. der Clon  $\delta$ 1, die verschiedenen zum Absuchen von cDNA-Banken nachstehend aufgeführten Oligomere und die hier zusätzlich offenbaren Clone. Besonders nützlich sind diejenigen Clone, die Fragmente von ORF5 enthalten. Jeder Teil des Genoms oder seines Komplements ist befriedigend. Zur Verwendung als Sonde ist eine vollständige Komplementarität wünschenswert, obwohl eine solche nicht notwendig ist, wenn die Fragmentlänge vergrößert ist.

**[0056]** Bei der Verwendung solcher Sonden zur Diagnose wird, falls gewünscht, die zu analysierende biologische Probe, z.B. Blut oder Serum, so behandelt, daß die darin enthaltene Nucleinsäure extrahiert wird. Die resultierende Nucleinsäure wird einer Gelelektrophorese oder einem anderen nach Größe trennenden Verfahren unterworfen, oder sie wird einfach ohne Trennung nach Größe auf einen Träger getüpfelt. Die Sonden werden dann z.B. durch "Nick-Translation" oder durch Phosphorylierung markiert, und die extrahierten Nucleinsäuren werden mit der markierten Sonde unter geeigneter Hybridisierungsstringens behandelt.

**[0057]** Da die Sonden vollständig komplementär zur viralen RNR hergestellt werden können, werden Bedingungen mit einer hohen Stringens bevorzugt, um so falsche Positive zu vermeiden. Bedingungen mit hoher Stringens sollten jedoch nur dann angewandt werden, wenn die Sonden komplementär zu Bereichen des viralen Genoms sind, die keine Heterogenität aufweisen. Die Hybridisierungsstringens wird durch eine Reihe von Faktoren bestimmt. Dazu gehören Temperatur, Ionenstärke, Dauer der zugelassenen Hybridisierung und des Waschens und die Konzentration von Formamid. Diese Faktoren sind z.B. in Maniatis, T. et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982), Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, beschrieben. Eine erhöhte Stringens läßt sich z.B. durch Erhöhen der Temperatur, Verkürzen der Expositionsdauer und Einstellen der Ionenstärke erreichen.

**[0058]** Die Sonden können in Diagnose-Kits verpackt sein, die die markierte DNA, in geeigneter Weise gepackte zusätzliche Reagenzien, Materialien, die für diese spezielle Vorgehensweise benötigt werden und Anleitungen zur Durchführung des Tests enthalten.

#### D.8. Diagnose-Kits für den Immunassay

**[0059]** Sowohl die Polypeptide, die mit HDV-Antikörper enthaltendem Serum immunologisch reagieren, z.B. die ORF5-codierten Polypeptide als auch die gegen diese Polypeptide erzeugten Antikörper sind nützliche Bestandteile von Diagnose-Kits, die zum Nachweis von HDV-Antikörpern im Blut oder in Serumproben oder auch zum Nachweis des Virus entworfen wurden. Die Ausführung der Immunassays unterliegt einer großen Variationsbreite, und es sind eine Reihe von Versuchsdurchführungen verfügbar, die z.B. auf einer Konkurrenz- oder

einer direkten Reaktion auf einem festen Träger oder auf einer Immunpräzipitation basieren. Bei den meisten Assays ist ein markierter Antikörper oder ein Polypeptid, das ein fluoreszierendes, radioaktives oder ein Farbstoff-Molekül als Markierung trägt, involviert. Häufig werden ebenfalls enzymmarkierte und -vermittelte Immunoassays angewandt. Deshalb werden Kits, die für solche Versuchsdurchführungen geeignet sind, und die die geeigneten markierten Reagenzien enthalten, so zusammengestellt, daß die geeigneten, die erfindungsgemäßen Antikörper oder Polypeptide enthaltenden Materialien zusammen mit den restlichen zur Durchführung des Assays notwendigen Mitteln in geeigneten Behältern verpackt sind, und ein geeigneter Satz von Anweisungen für seine Durchführung enthalten ist.

### C. Allgemeine Verfahren

**[0060]** Die allgemeinen Verfahren zur Extraktion von RNA aus dem Virus, zur Herstellung und zum Absuchen einer cDNA-Bank, zur Sequenzierung von Clonen, zum Konstruieren von Expressionsvektoren und zum Transformieren von Zellen und verwandte Techniken sind Stand der Technik, und es sind Labor-Handbücher verfügbar, die diese Techniken beschreiben. Als genereller Leitfaden werden im nachfolgenden jedoch einige übliche verfügbare Quellen für solche Prozeduren und für Materialien, die zu ihrer Ausführung nützlich sind, aufgeführt.

#### C.1. Wirte und Expressions-Kontrollsequenzen

**[0061]** Sowohl prokaryontische als auch eukaryontische Wirtszellen können zur Expression gewünschter codierender Sequenzen verwendet werden, wenn geeignete, mit dem vorgesehenen Wirt kompatible Kontrollsequenzen verwendet werden. Unter den prokaryontischen Wirten wird *E. coli* vor allem aus Bequemlichkeitsgründen am häufigsten verwendet. Prokaryontische Expressions-Kontrollsequenzen schließen Promotoren, die fakultativ Operatoranteile enthalten, und Ribosomen-Bindungsstellen ein. Mit prokaryontischen Wirten kompatible Transfervektoren sind üblicherweise z.B. von pBR322 – einem Plasmid, das Ampicillin- und Tetracyclin-Resistenz vermittelnde Operons enthält – und den verschiedenen pUC-Vektoren abgeleitet, die ebenfalls Sequenzen enthalten, die eine Antibiotikum-Resistenz vermitteln. Die vorstehenden Operons kann man als Marker zur Auswahl erfolgreicher Transformanten verwenden. Allgemein verwendete prokaryontische Kontrollsequenzen schließen die  $\beta$ -Lactamase- (Penicillinase-) und Lactose-Promotorsysteme (Chang et al., *Nature* 198 (1977), 1056), das Tryptophan (*trp*)-Promotorsystem (Goeddel et al., *Nucleic Acids Res.* 8 (1980), 4057) und den von  $\lambda$  abgeleiteten  $P_L$ -Promotor und die N-Gen-Ribosomenbindungsstelle (Shimatake et al., *Nature* 292 (1981), 128) und den hybriden *tac*-Promotor (De Boer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 80 (1983), 21–25), der aus Sequenzen der *trp*- und der *lac*-UV5-Promotoren abgeleitet ist, ein. Die vorstehenden Systeme sind mit *E. coli* besonders kompatibel. Falls gewünscht, können andere prokaryontische Wirte, wie Stämme von *Bacillus* oder *Pseudomonas* mit den korrespondierenden Kontrollsequenzen verwendet werden.

**[0062]** Eukaryontische Wirte schließen Hefe und Säuger-Zellkulturen ein. Die meist verwendeten Hefewirte sind, wieder aus Bequemlichkeitsgründen, *Saccharomyces cerevisiae* oder Bäcker-Hefe und *Saccharomyces carlsbergensis*. Mit Hefe kompatible Vektoren tragen Marker, die es erlauben, erfolgreiche Transformanten dadurch zu selektionieren, daß sie auxotrophen Mutanten eine Prototrophie verleihen oder dadurch, daß sie Wildtypstämmen eine Antibiotikumresistenz oder eine Resistenz gegen Schwermetalle verleihen. Mit Hefe kompatible Vektoren können den 2-Mikron-Replikationsursprung (Broach, J. et al., *Meth. Enz.* 101 (1983), 307), eine Kombination von CEN3 und ARS1 oder andere, die Replikation sicherstellende Mittel verwenden, wie z.B. Sequenzen, die zu einer Inkorporation eines geeigneten Fragments in das Genom der Wirtszelle führen. Kontrollsequenzen für Hefevektoren schließen die Promotoren für die Synthese von glycolytischen Enzymen (Hess et al., *J. Adv. Enzyme Reg.* 7 (1968), 149; Holland et al., *Biochemistry* 17 (1978), 4900) und den Promotor für 3-Phosphoglycerat-Kinase (Hitzeman et al., *J. Biol. Chem.* 255 (1980), 2073) ein. Für die Expression in Hefe können ebenfalls Terminatoren, wie die vom Enolasegen (Holland, M., J., *J. Biol. Chem.* 256 (1981), 1385) abgeleiteten, verwendet werden. Besonders nützliche Kontrollsysteme schließen die hier spezifisch beschriebenen Kontrollsysteme, die den Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase-(GAPDH)-Promotor oder den regulierbaren Alkoholdehydrogenase-(ADH)-Promotor, die ebenfalls von GAPDH abgeleiteten Terminatoren und, falls eine Sekretion erwünscht ist, die Signalsequenz des Hefe- $\alpha$ -Faktors umfassen, mit ein. Diese Systeme sind in den am 22. Februar 1983 bzw. am 12. August 1983 eingereichten US-Anmeldungen mit den Nummern 468,589 und 522,909 beschrieben. Beide gehören dem Inhaber der vorliegenden Anmeldung, und auf sie wird hier Bezug genommen.

**[0063]** Säugerezelllinien, die als Wirte für die Expression verfügbar sind, schließen viele immortalisierte Zelllinien ein, die von der American Type Culture Collection erhältlich sind. Dazu gehören HeLa-Zellen, Ovarzellen des Chinesischen Hamsters (CHO-Zellen) Babyhamster-Nierenzellen (baby hamster kidney = BHK) und eine

Reihe anderer Zelllinien. Geeignete Promotoren für Säugerzellen schließen vor allem virale Promotoren, wie die von Simian Virus 40 (SV40) (Fiers et al., *Nature* 273 (1978), 113) oder andere virale Promotoren ein, wie die von Rous-Sarkomvirus (RSV), Adenovirus und Rinder-Papillomavirus (bovine papilloma virus = BPV).

**[0064]** Säugerzellen können ebenfalls Terminatorsequenzen benötigen. Zur Replikation in Säugerzellen geeignete Vektoren können virale Replikons oder Sequenzen enthalten, die eine Integration der geeigneten Sequenzen in das Wirtsgenom sicherstellen.

### C.2. Transformationen

**[0065]** Das angewandte Verfahren zur Transformation hängt von dem zu transformierenden Wirt ab. Bei der Transformation von Bakterien wird im allgemeinen eine Behandlung mit Calcium oder Rubidiumchlorid angewandt (Cohen, S. N., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 69 (1972), 2110, Maniatis et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1982), Cold Spring Harbor Press, S. 254). Transformationen von Hefe können nach dem Verfahren von Hinnen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 75 (1978), 1929–1933 ausgeführt werden. Transformationen von Säugerzellen werden nach dem Calciumphosphat-Präzipitationsverfahren von Graham und van der Eb, *Virology* 52 (1978), 546 oder einer seiner zahlreichen Modifikationen ausgeführt.

### C.3. Konstruktion des Vektors

**[0066]** Zur Vektorkonstruktion werden heutzutage gut bekannte Verfahren angewandt. Eine positionspezifische DNA-Spaltung wird durch Behandlung mit geeigneten Restriktionsenzymen unter Bedingungen durchgeführt, die im allgemeinen vom Hersteller dieser käuflich erhältlichen Enzyme (siehe z.B. Produktkatalog von "New England Biolabs") spezifiziert werden. Im allgemeinen wird ungefähr 1 µg der Plasmid- oder DNA-Sequenz in ungefähr 20 µl Pufferlösung bei 37°C bei einer Inkubationszeit von ungefähr 1 bis 2 Stunden durch eine Enzymeinheit gespalten. Nach der Inkubation mit dem Restriktionsenzym wird das Protein durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion entfernt und die DNA durch Fällung mit Ethanol wiedergewonnen. Die gespaltenen Fragmente können mit Polyacrylamid- oder Agarosegel-Elektrophorese-Verfahren gemäß dem allgemeinen in *Methods in Enzymology* 65 (1980), 499–560 beschriebenen Prozeduren aufgetrennt werden.

**[0067]** Spaltfragmente mit kohäsiven Enden können unter Verwendung von E. coli-DNA-Polymerase I (Klenow) in Gegenwart der geeigneten Desoxynucleosidtriphosphate (dNTPs) stumpfend gemacht werden, indem man die für die Polymerase geeigneten Inkubationsbedingungen anwendet. Die Polymerase baut hervorstehende 3'-Einzelstränge ab, füllt aber entsprechend den im Gemisch vorhandenen dNTPs 5'-vorstehende Enden auf. Eine Behandlung mit S1-Nuclease kann ebenfalls angewandt werden, da diese in einer Hydrolyse jedes beliebigen einzelsträngigen DNA-Bereiches resultiert.

**[0068]** Ligationen werden unter Standard-Puffer- und -Temperaturbedingungen mit T4-DNA-Ligase und ATP durchgeführt; Ligationen von kohäsiven Enden benötigen weniger ATP und weniger Ligase als Ligationen stumpfer Enden. Wenn man Vektorfragmente als Teil des Ligationsgemisches verwendet, wird das Vektorfragment häufig mit bakterieller alkalischer Phosphatase (BAP) behandelt, um die 5'-Phosphate zu entfernen und so eine Re-Ligation des Vektors zu verhindern. Alternativ kann eine Spaltung ungewünschter Fragmente mit einem Restriktionsenzym zur Verhinderung einer Re-Ligation vorgenommen werden.

**[0069]** Ligationsgemische werden zur Transformation geeigneter Wirte für die Clonierung, z.B. E. coli, verwendet, und erfolgreiche Transformanten werden z.B. durch ihre Antibiotikumresistenz selektioniert und auf die richtige Konstruktion hin abgesehen.

### C.4. Konstruktion gewünschter DNA-Sequenzen

**[0070]** Synthetische Oligonucleotide können mit einem automatischen Oligonucleotid-Synthesizer wie von Warner, B.D. et al., *DNA* 3 (1984), 401–411 beschrieben, hergestellt werden. Falls gewünscht, können diese synthetischen Stränge zur Markierung mit einem Überschuss von Polynucleotid-Kinase in Gegenwart von markiertem ATP unter Standard-Phosphorylierungsbedingungen mit <sup>32</sup>p phosphoryliert werden.

**[0071]** DNA-Sequenzen, die solche einschließen, die aus genomischen oder cDNA-Banken isoliert wurden, können durch ortsgerichtete Mutagenese nach Zoller, M. et al., *Nucleic Acids Res.* 10 (1982), 6487–6499, modifiziert werden. Kurz gesagt, wird die so zu modifizierende DNA als einzelsträngige Sequenz in einen Phagen verpackt und mit DNA-Polymerase in eine doppelsträngige DNA überführt. Dabei verwendet man als Primer ein synthetisches zum Anteil der zu modifizierenden DNA komplementäres Oligonucleotid, das die gewünsch-

te Modifikation als Teil seiner eigenen Sequenz enthält. Die resultierende doppelsträngige DNA wird zur Transformation eines den Phagen vermehrendes Wirtsbakterium verwendet, und Kulturen der transformierten Bakterien, die die Kopien jedes Phagenstranges enthalten, werden auf Agar plattiert, um Plaques zu erhalten. Theoretisch enthalten 50 % der neuen Plaques Phagen, die im Einzelstrang die mutierte Form aufweisen, während 50 % die ursprüngliche Sequenz haben. Kopien dieses Plaques werden gegen die phosphorylierte synthetische Sonde bei Temperaturen und unter Bedingungen hybridisiert, die eine Hybridisierung mit dem richtigen Strang, nicht aber eine Hybridisierung mit der nicht-modifizierten Sequenz erlauben. Die so identifizierten gewünschten modifizierten Sequenzen werden dann gewonnen und cloniert und dienen als Quelle für die gewünschte DNA.

#### C.5. Hybridisierung mit der Sonde

**[0072]** DNA-Banken werden nach dem Verfahren von Grundstein und Hogness (Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 73 (1975), 3961) abgesucht. Kurz gesagt, wird bei diesem Verfahren die zu testende DNA auf Nitrocellulosefiltern immobilisiert, denaturiert und mit einem Puffer vor-hybridisiert, der 0 bis 50 % Formamid, 0,6 M NaCl, 60 mM Natriumcitrat, je 0,02 (Gew./Vol.) Rinderserumalbumin, Polyvinylpyrrolidon und Ficoll, 50 mM Natriumphosphat (pH 6,5), 1 % Glycin und 100 µg/ml denaturierte Träger-DNR enthält. Der Prozentsatz Formamid im Puffer hängt genauso wie die Zeit und die Temperaturbedingungen der Vor-Hybridisierung und der nachfolgenden Hybridisierungsschritte von der gewünschten Stringens ab. Oligomere Sonden, die Bedingungen mit einer niedrigeren Stringens erfordern, werden im allgemeinen bei niedrigen Prozentsätzen Formamid, niedrigeren Temperaturen und längeren Hybridisierungszeiten verwendet. Sonden, die mehr als 30 oder 40 Nucleotide enthalten, so wie die, die aus cDNA oder aus genomischen Sequenzen abgeleitet sind, werden im allgemeinen bei höheren Temperaturen, d.h. ungefähr 40 bis 42° und bei einem höheren Prozentsatz, z.B. 50 %, Formamid verwendet. Nach der Vor-Hybridisierung wird derselbe Puffer, der nun die mit <sup>32</sup>P-phosphorylierte Oligonucleotidsonde enthält, zugegeben, um eine Hybridisierung zu bewirken. Eine Radioautographie der behandelten Filter zeigt die Position der hybridisierten Sonde. Die entsprechenden Positionen auf den Replica-Filtern, die nicht dem Test durch die Sonde unterworfen worden waren, können dann als Quelle für die gewünschte DNA verwendet werden.

#### C.6. Verifikation von Konstruktion und Sequenzierung

**[0073]** Bei Routine-Vektorkonstruktionen wird der E. coli-Stamm HB101 oder ein anderer geeigneter Wirt mit dem Ligationsgemisch transformiert, und erfolgreiche Transformanten werden durch die Antibiotikum-Resistenz oder andere Marker selektioniert. Plasmide aus den Transformanten werden dann nach dem Verfahren von Clewell, D. B., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 62 (1969), 1159 normalerweise nach einer vorangehenden Chloramphenicol-Amplifikation (Clewell, D. B., J. Bacteriol. 110 (1972), 667) präpariert. Die isolierte DNA wird durch Restriktionsanalyse analysiert oder nach dem Didesoxyverfahren von F. Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 74 (1977), 5463 in der von Messing et al., (Nucleic Acids Res 9 (1981), 309) weiter beschriebenen Weise oder nach dem Verfahren von Maxam et al., (Methods in Enzymology 65 (1980), 499) sequenziert. Zur Überwindung von Problemen bezüglich einer Banden-Kompression, die verschiedentlich in GC-reichen Abschnitten beobachtet werden, wurde T-Deazaoguanosin verwendet; vgl. Barr, P. et al., Biotechniques 4 (1986), 428.

### D. Beispiele

**[0074]** Die nachfolgenden Beispiele dienen der Erläuterung der Erfindung, stellen aber keine Einschränkung der Erfindung dar. Die in D.1 aufgeführten Prozeduren können z.B., falls gewünscht, wiederholt werden, dies muß aber nicht sein, da Verfahren zur Konstruktion der gewünschten Nucleotidsequenzen aufgrund der erfindungsgemäß bereitgestellten Informationen verfügbar sind. Die Expression wird beispielhaft in E. coli und Hefe gezeigt. Wie in Abschnitt C.1. aber ausführlicher dargelegt wurde, sind andere Systeme verfügbar. Es können ferner zusätzliche, aus der genomischen Struktur abgeleitete Epitope hergestellt und zur Erzeugung von Antikörpern verwendet werden, wie nachstehend ausgeführt wird.

#### D.1. Präparation von HDV-cDNA

**[0075]** Schimpansen Serum, das vom δ-Agens ungefähr 10<sup>11</sup> Schimpansen-infektiöse Dosen ("chimpanzee infectious doses") pro ml enthielt, wurde ultrazentrifugiert, und die Nucleinsäure wurde vom resultierenden Sediment nach Inkubation mit Proteinase K extrahiert. Kurz gesagt, wurde die RNR aus den Virions durch herkömmliche Verfahren extrahiert, z.B. nach dem von Ticehurst, J. E., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 80 (1983), 5885-5889, das eine Proteasebehandlung und eine Phenol-/Chloroform-Extraktion, der eine Ethanol-

fällung folgt, einschließt. HDV wurde durch 20%-ige Saccharose in 20 mM Hepes, pH 7,5, mit 0,1 % BSA zentrifugiert. Nach dem proteolytischen Verdau über Nacht bei 37° mit 1 mg/ml Proteinase K in 20 mM Hepes, pH 7, 5, mit 50 µg/ml Transfer-RNA aus Hefe, 50 mM EDTA, 200 mM NaCl und 1 % Natriumdodecylsulfat (SDS = sodium dodecyl sulfat) wurde die RNA durch Phenol-/CHCl<sub>3</sub>-Extraktion und Fällung mit Ethanol gereinigt.

**[0076]** Die Nucleinsäure wurde durch denaturierende Gelelektrophorese analysiert. Es wurde ein RNA-Duplett mit 1700 Nucleotiden erhalten, wie durch Hybridisierungsanalyse festgestellt wurde. Das Duplett wurde von Denniston, K. J. et al., *Science* (1986) (siehe oben) verwendet, um damit den ungefähr 164 by cDNA-Clon pkD3 zu erhalten, der mit dem Duplett ebenso spezifisch hybridisiert, wie mit Proben, die mit dem δ-Agens infiziert waren.

**[0077]** Unter Verwendung der Sequenzinformation, die man aus dem pkD3-cDNA-Clon von Denniston et al. als Basis erhält, wurden zwei komplementäre Oligonucleotide synthetisiert. Die Sonden 1 (5'-GATGCCCTTC-CCGATGCTCGATTCCGACTC) und 2 (5'-GAGTCGGAATCGAGCATCGGGAAGGGCATC) wurden durch Phosphorylierung mit Kinase unter Verwendung von 200 µCi <sup>32</sup>P-ATP, >5 Ci/µMol, markiert. Sie wurden am 5'-Terminus nach dem Verfahren von Lillehaug et al., *Biochemistry* 15 (1976), 1858 mit T4-Kinase phosphoryliert. Darauf folgte eine Reinigung auf einer Sep-pak-C18-Kartusche (Millipore), wobei mit 50 (Vol./Vol.) CH<sub>3</sub>OH, 50 mM Ammoniumacetat (pH 7,5) eluiert wurde.

**[0078]** Zur Hybridisierung gegen DNA-Sonden wurde die HDV-RNA durch ein 1%iges Agarose-Formaldehyd-Gel zusammen mit Schimpansen-Kontroll-RNA und DNA-Größenmarkern elektrophoretisiert (Lehrach, H. et al., *Biochemistry* 16 (1977), 4743). Jedes Gel wurde auf Nitrocellulose-Membran abgeklatscht und gegen eine markierte spezifische Sonde hybridisiert (vgl. Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 77 (1980), 5201). Die Behandlung der die Matrizen RNA und die geeigneten Kontrollen enthaltenden Gele mit jeder dieser Sonden zeigte, daß nur die Sonde 2 mit der Matrize hybridisierte, wodurch die einzelsträngige Natur des Genoms bestätigt wurde.

**[0079]** Eine cDNA-Bank wurde aus dem ursprünglichen RNA-Extrakt des Sediments vom Schimpansenserum nach dem Verfahren von Okayama und Berg (*Mol. Cell. Biol.* 2 (1982), 161–170) präpariert, nachdem poly(rA)-Schwänze an den 3'-Hydroxy-Terminus der RNA angeheftet worden waren. Die RNA zeigte einen erheblichen Abbau während der Inkubation mit der poly(rA)-Polymerase. Das Absuchen der resultierenden cDNA-Bank mit der Sonde 2 resultierte jedoch in der Gewinnung eines Clons, δ1, der die in **Fig. 4** gezeigte Sequenz aufweist. Ein kleinerer (250 bp) überlappender Clon, δ2, wurde ebenfalls in dieser Bank unter Verwendung eines 435 by NcoI-Fragments, das aus der clonierten cDNA von δ1 herausgeschnitten worden war, gefunden.

**[0080]** Zum Identifizieren der genomischen und der komplementären Stränge der cDNA wurden aus δ1 strangspezifische Sonden unter Verwendung eines PvuII-/HindIII-Restriktionsfragmentes mit ca. 950 bp, das flankierende Bereiche enthält, oder eines PvuII-/PstI-Fragments mit ca. 450 bp hergestellt. Diese Fragmente wurden in M13-Vektoren ligiert, um komplementierende einzelsträngige δ-Matrizen zu erzeugen. Zur Herstellung von Hybridisierungsonden wurden 0,8 µg jeder Matrizen-DNA mit 0,1 µg Hybridisierungssonden-Primer (New England Biolabs) in 200 µM NaCl vermischt. Anschließend wurde nach einem 1minütigen Denaturieren in einem siedenden Wasserbad 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Die aneinandergelagerten Primer-Matrizen-DNA-Gemische wurden 2 Stunden bei 15°C in 200 µl inkubiert, die 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM β-Mercaptoethanol, 50 µg/ml BSA, je 0,1 mM dATP, dGTP und dTTP, 14 µM dCTP (1000 Ci/mMol) gemeinsam mit 250 Einheiten/ml Klenow-Enzym enthielten, um so die einzelsträngigen Insertionen zu markieren. Die Reaktion wurde gestoppt, und die DNA wurde auf Sephadex G50 gereinigt. Die resultierende Sonde, die im Ausschlußvolumen eluierte, wurde zur Hybridisierung eines Northern-Blots, der die RNA-Matrize enthielt, verwendet.

**[0081]** Die Ergebnisse bei der Verwendung einer erfolgreichen Sonde (einer der Stränge des PvuII-/PstI-Fragments mit 450 bp) sind in **Fig. 5** gezeigt. Spur 1 enthält markierte Marker, Spur 2 enthält 10 ng RNA des δ-Virions aus Plasma, die Spuren 3 und 4 enthalten 1,4 µg Leber-RNA aus Kontrollschimpansen bzw. aus infizierten Schimpansen. Die Spuren 2 und 4 zeigen klar das Vorhandensein viraler Nucleinsäure an.

**[0082]** Eine weitere HDV-cDNA-Bank wurde unter Verwendung von Kalbsthymus-Zufallsprimern (Taylor, J. M. et al., *Biochem Biophys Acta* 442 (1976), 324–3300) zum Primen der reversen Transkription von HDV-RNA hergestellt. Die resultierende einzelsträngige cDNA wurde dann gereinigt und durch Inkubation mit E. coli-DNA-Polymerase I in den Doppelstrang überführt. Nach der Behandlung mit S1-Nuclease wurde die cDNA mit terminaler Transferase mit oligo-dC-Schwänzen versehen und an zuvor mit dem Restriktionsenzym PstI

gespaltenes und mit dG-Schwänzen versehenes pBR322 angelagert. Das Wirtsbakterium *E. coli* MC1061 wurde dann mit den Plasmiden transformiert. Dann wurde, wie vorstehend beschrieben, eine Koloniehybridisierung durchgeführt, um die tetracyclinresistenten Rekombinanten auf  $\delta$ -Clone hin abzusuchen. (Diese allgemeinen Verfahren sind in Maniatis, T. et al., in *Molecular Cloning* (Cold Spring Harbor Laboratory), S. 229–242 (1982) beschrieben).

**[0083]** Das NcoI-Fragment mit 435 bp aus der cDNA-Insertion von  $\delta 1$  wurde "nick-translatiert" und zum Absuchen der vorstehenden mit Zufallsprimern hergestellten cDNA-Bank verwendet, wobei  $\delta 4$  und  $\delta 115$  erhalten wurden. Ein HindIII/SmaI-Fragment mit 481 bp der cDNA-Insertion in  $\delta 115$  wurde zum Absuchen dieser Bank verwendet, wodurch  $\delta 7a$  erhalten wurde. Die Clone  $\delta 3b$  und  $\delta 7b$  wurden durch Verwendung einer Oligonucleotidsonde erhalten, die auf einer Sequenz von  $\delta 115$  (5'-TGGAACGTCGGAGAAAC-3') basierte. Somit wurden in dieser Bank die zusätzlichen nachfolgend aufgeführten Clone gefunden:  $\delta 3b$  (829 bp),  $\delta 4$  (1123 bp),  $\delta 7a$  (474 bp),  $\delta 7b$  (1378 bp) und  $\delta 115$  (1362 bp). Wenn man diese Clone und  $\delta 1$  und  $\delta 2$  sequenziert, erhält man, wie in **Fig. 1** erläutert wird, überlappende Anteile des Genoms. Die Ergebnisse der Sequenzierung machten es sehr wahrscheinlich, daß die ursprüngliche HDV-RNA ein ringförmiges Molekül war, da es nicht möglich war, die 7 unterschiedlichen cDNA-Clone in ein lineares Molekül mit einer Länge von nur ungefähr 1700 Nucleotiden einzupassen. Diese Hypothese wurde dadurch bestätigt, daß unter denaturierenden Bedingungen im Elektronenmikroskop ringförmige HDV-RNA-Moleküle zu erkennen waren. Die vollständige Sequenz der das Genom und dessen Komplement repräsentierenden DNA ist in **Fig. 2** gezeigt, wobei die überlappenden Teile der unterschiedlichen Clone berücksichtigt wurden. Der obere Strang stellt die genomische HDV-RNA, der untere Strang deren Komplement dar. Wie aus **Fig. 2** hervorgeht, gab es zwischen den verschiedenen Clonen eine gewisse Sequenz-Heterogenität.

**[0084]** Die Heterogenitäten in der Nucleotidsequenz sind oberhalb des genomischen Stranges angegeben. Die Auswirkung auf die codierte Aminosäure ist unterhalb des komplementären Stranges angegeben; AM bezeichnet ein amber-Stoppocodon und OP kennzeichnet ein Opal-Stoppocodon. Tabelle 1 zeigt einen Vergleich der Heterogenitäten einer Reihe von Clonen.

**[0085]** Tabelle 2 zeigt mutmaßliche durch die offenen Leserahmen (ORF) mit mindestens 300 Nucleotiden codierte Polypeptide.

**[0086]** Die Position des ersten Nucleotids in jedem offenen Leserahmen ist in Übereinstimmung mit der Nummerierung des oberen in **Fig. 2** gezeigten Stranges gekennzeichnet. Der die genomische Sequenz darstellende obere Strang ist von 1 bis 1679 durchnummeriert. Die Positionen im Komplement haben dieselben Zahlen, ihnen ist aber ein x vorangestellt. Die durch Bereiche des Komplements codierten Polypeptide werden somit durch Nummern in der "umgekehrten" Ordnung – z.B. x1619-x1014 für ORF5 – beschrieben. Die erste Nummer eines Nucleotids in der Tabelle ist die des ersten Nucleotids im Leserahmen – nicht des ATGs. Der Translations-Leserahmen von ORF5 ist in **Fig. 2** gezeigt (mutmaßliches Polypeptid p1 der Tabelle 2) und eine potentielle N-Glykosylierungsstelle ist durch \* gekennzeichnet.

**[0087]** Eine Analyse der Nucleotidsequenz der Clone, die den ORF5-Bereich enthalten, machte einige Sequenzheterogenitäten in diesem Bereich deutlich. Diese Heterogenitäten sind in **Fig. 3** gezeichnet, die die Nucleotidsequenz von ORF5 wiedergibt. Die bei der Analyse anderer Clone entdeckten Heterogenitäten in der Nucleotidsequenz sind oberhalb der Nucleotidsequenz aufgelistet. Die aus der Sequenzheterogenität resultierenden Aminosäuresubstitutionen sind oberhalb der abgeleiteten Aminosäuresequenz aufgelistet. Als Ergebnis dieser Sequenzheterogenität codiert ORF5 eine Familie eng verwandter Polypeptide.

**[0088]** Die Heterogenität in der Nucleotidposition 608 von ORF5 (siehe **Fig. 3**) ist von besonderem Interesse, da, wie nachstehend diskutiert wird, beide viralen Polypeptide p24<sup>δ</sup> und p27<sup>δ</sup> in ORF5 codiert zu sein scheinen. Wenn die Position

Tabelle 1

Heterogenität von Hepatitis δ-cDNA

Heterogenität (Nr. des Nucleotids)	Nr. des Clons							3b
	115	7a	1	7	2	7b	7b	
118	C	T	-	-	-	-	-	- T A C T A - - - - -
264	C	C	-	-	-	-	-	- - - - - T - - - - - T T - A C C C G
390	A	G	-	-	-	-	-	- - - - - T - - - - - T T - A C C C G
414	C	T	-	-	-	-	-	- - - - - T - - - - - T T - A C C C G
488	C	T	-	-	-	-	-	- - - - - T - - - - - T T - A C C C G
553	-	-	A	A	-	-	-	- - - - - T - - - - - T T - A C C C G
589	-	-	C	C	-	-	-	- - - - - T - - - - - T T - A C C C G
603	-	-	T	T	-	-	-	- - - - - T - - - - - T T - A C C C G
653	-	-	G	A	-	-	-	- - - - - T - - - - - T T - A C C C G
987	-	-	T	C	-	-	-	- - - - - T - - - - - T T - A C C C G
1012	C	-	T	C	-	-	-	- - - - - T - - - - - T T - A C C C G
1024	T	-	C	C	-	-	-	- - - - - T - - - - - T T - A C C C G
1084	C	-	T	C	-	-	-	- - - - - T - - - - - T T - A C C C G
1141	T	-	A	T	-	-	-	- - - - - T - - - - - T T - A C C C G
1309	A	-	T	C	-	-	-	- - - - - T - - - - - T T - A C C C G
1413	T	-	A	T	-	-	-	- - - - - T - - - - - T T - A C C C G
1473	T	-	T	C	-	-	-	- - - - - T - - - - - T T - A C C C G
1567	T	-	T	C	-	-	-	- - - - - T - - - - - T T - A C C C G
1677	A	-	A	T	-	-	-	- - - - - T - - - - - T T - A C C C G

- = nicht bestimmt oder nicht innerhalb des Clons

Tabelle 2

Strang	Nr. des ORFs	Nucleotidposition (Nr.)	Gesamtzahl der Aminosäuren	Nr. der mit dem ersten Methionin beginnenden Aminosäuren	Mutmaßliches Polypeptid
HDV-RNA	1	539	165	152	p6
HDV-RNA	2	786	156	121	p7
HDV-RNA	3	1608	121	0	p8
HDV-RNA	4	1297	115	68	p9
HDV-RNA	10	435	116	33	p10
HDV-RNA	11	937	119	86	p11
Anti-HDV-RNA	5	1619	221/202	214/195 Δ	p1
Anti-HDV-RNA	6	1341	288	195/34 *	p2
Anti-HDV-RNA	7	506	148/80	148/80 †	p3
Anti-HDV-RNA	8	821	104	74	p4
Anti-HDV-RNA	9	91	101	0	p5

\* Zweideutigkeit, die von einer Heterogenität in der Position 1012 der Clone herrührt (Fig. 2)

† Zweideutigkeit, die von einer Heterogenität in der Position 264 der Clone herrührt (Fig. 2)

Δ Zweideutigkeit, die von einer Heterogenität in der Position 1012 der Clone herrührt (Fig. 2)

608 ein A enthält, ist das resultierende Codon ein amber-Stoppocodon, durch das sich bei der Translation (wenn der Wirt kein amber-Suppressorsystem enthält) ein Polypeptid mit der Größe von p24<sup>6</sup> ergibt. Wenn die Position 608 dagegen ein G enthält (oder wenn der Wirt die Fähigkeit zur Suppression der amber-Mutation besitzt) ergibt ein Durchlesen des Codons bis zum Opal-Stoppesignal in der Position 664 ein Polypeptid mit der Größe von p27<sup>6</sup>. Diese Vorstellung wird durch den Befund gestützt, daß die Expression von ORF5 in E. coli D1210, das mit porf5 transformiert worden war, zwei Produkte ergab, die bezüglich der Größe und der Immunreaktivität

(siehe Abschnitt D.3) als p24<sup>5</sup> und p27<sup>5</sup> identifizierbar waren. *E. coli* D1210 enthält ein nicht voll wirksames amber-Suppressorsystem. Dadurch terminiert ein Teil der Translation am amber-Codon. Eine Verifikation dieser Vorstellung läßt sich durch eine Substitution des As in der Position 608 des in porf5 vorhandenen ORFs gegen ein G erhalten. Diese Substitution kann man durch ortsgerichtete in vitro Mutagenese erreichen. Die entsprechenden Verfahren sind dem Durchschnittsfachmann bekannt.

**[0089]** Das vollständige Genom von HDV stellt eine ringförmige Nucleotidsequenz von 1679 by dar. Es wird angenommen, daß die genomische RNA einzelsträngig ist, da nur einer der komplementären synthetischen Oligomere und einzelsträngige  $\delta$ 1-M13-Sonden mit der Matrize hybridisieren. Ferner läßt sich die Matrizen-RNA in einem Kaninchen-Reticulocytenlysate (für die in vitro-Translation) nicht translatieren. Dies legt die Möglichkeit nahe, daß das Genom wirklich einen anti-Sinn-Strang repräsentiert.

## D.2. Bestätigung der Polypeptid codierenden Clone

**[0090]** Die aus infektiösem Plasma abgeleitete virale RNA wurde mit Zufallsprimern revers translatiert und die resultierende cDNA wurde unter Verwendung von GC-Schwänzen wie vorstehend beschrieben in die PstI-Stelle von pBR322 cloniert. *E. coli* MC1061 wurde mit den Ligationsgemischen transformiert, und die Plasmid-DNA wurde aus einer Kollektion von ungefähr 20 000 Rekombinanten präpariert. Die Plasmid-DNA wurde mit PstI gespalten, und die cDNA-Insertionen wurden aus einem Agarosegel eluiert, mit Klenow-Enzym stumpfendig gemacht, mit EcoRI-Linkern ligiert und dann in den Phagenvektor  $\lambda$ gt11 (Young et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 80 (1983), 1194–1198) in die einzige EcoRI-Stelle ligiert. Als Wirt wurde Y1090(r<sup>-</sup>) verwendet. Diese Phagen-Zufalls-cDNA-Bank wurde dann durch Hybridisieren gegen zwei Sonden abgesucht, die von den oben erwähnten  $\delta$ 4- und  $\delta$ 115-Clonen abgeleitet waren. Außerdem wurden Kolonien durch Immunreaktion unter Verwendung von Antiseren abgesucht, die sich von chronisch mit Hepatitis B- und  $\delta$ -Viren coinfizierten Menschen herleiteten.

**[0091]** Es wurden eine Reihe von Plaques erhalten, die sowohl die Sonden als auch die Antiseren banden. DNA aus einem der erhaltenen Plaques wurde sequenziert. Sie enthielt eine cDNA mit ungefähr 200 bp, deren Translations-Leserahmen mit einem Teil des Polypeptids p1 korrespondierte, das vom in Tabelle 2 gezeigten anti-genomischen Strang translatiert wird. Das von diesem  $\lambda$ gt11 produzierte  $\beta$ -Galactosidase-Fusionsprotein enthielt somit an seinem Carboxy-Terminus einen Bereich des p1-Polypeptids, der für die spezifische Bindung des  $\delta$ -Antiserums verantwortlich war. Kontrollantiseren von früheren Infektionen mit Hepatitis A, B und nicht-A/nicht-B gingen keine Bindung mit diesem Fusionsprotein ein. p1 enthält dementsprechend offensichtlich einen antigenen Bereich, der fähig ist, spezifisch aus  $\delta$ -Infektionen hervorgehende Antiseren zu binden und ist somit diagnostisch nützlich.

## D.3. Konstruktion von Expressionsvektoren und Expression von HDV-Sequenzen

**[0092]** Das HDV-Genom und das Komplement enthalten eine Reihe von ORFs (siehe Abschnitt D.1). Einige dieser ORFs wurden exprimiert, und die Antigenität der codierten Polypeptide wurde hinsichtlich ihrer Fähigkeit untersucht, HDV-Antiserum zu binden. **Fig. 7** ist eine schematische Darstellung der HDV-ORFs. Alle HDV-ORFs mit mehr als 300 Nucleotiden, die mit einem ATG beginnen, wurden nach den zirkulären Koordinaten des HDV-Genoms ausgerichtet. Die dicken Linien stellen den Teil jedes ORFs dar, der in Bakterien exprimiert wurde. Die Dreiecke (  $\Delta$  ) bezeichnen das erste in Phase befindliche ATG von jedem ORF. Die Pfeile kennzeichnen die Translation des Genoms bzw. des anti-genomischen Stranges, in Uhrzeigerrichtung bzw. gegen den Uhrzeiger. Die Koordinaten jedes vollständigen ORFs, der in Bakterien exprimiert wurde und das relative Translationsraster sind in Tabellenform zusammengestellt.

D.3.a. Expression in *E. coli* von Fusionsproteinen, die in ORF5- und ORF6-codierte HDV-Polypeptide enthalten.

**[0093]** Es wurden Plasmide für die bakterielle Expression konstruiert, die die Synthese von Fusionsproteinen steuerten, die menschliche Superoxiddismutase (SOD) (Hallewell, et al., Nucleic Acids Res. 13 (1985), 2017) und außerdem Teile von dem in ORF5 und ORF6 codierten HDV-Protein, d.h. p1 bzw. p2, enthielten. Die Plasmide synthetisierten den größten Teil des ORF5-codierten p1 oder des ORF6-codierten p2 in einer mit dem Carboxy-Terminus von SOD fusionierten Form.

**[0094]** Die Expressionsplasmide basierten auf dem Expressionsplasmid pSOD16 von Hallewell et al. (siehe oben), das den tac-Promotor verwendet. Das Plasmid pSOD16cf2 wurde aus pSOD16 durch Ersatz eines Teils des carboxyterminal codierenden Bereichs des SOD-Gens und der stromabwärts liegenden Polylinker-Se-

quenzen bis zur MboI-Stelle durch die nachfolgende Polylinker-Sequenz  
 5' GATCGCCATGGGTACCCGGGTCGACTAAATGACTAG 3'  
 3' CGGTACCCATGGGCCAGCTGATTTACTGATCTTAA 5'  
 erzeugt.

**[0095]** Die Substitution dieser Polylinker-Sequenz führt zur Beseitigung des natürlichen carboxyterminalen Gln von SOD.

**[0096]** Um die vom HDV-Genom abgeleitete Sequenz zu inserieren, wurde nach dem Verfahren von Steimer et al., J. Virol. 58 (1986), 9–16 vorgegangen. pSOD16cf2 wurde in geeigneter Weise gespalten, um die speziell gewünschte codierende Sequenz, wie nachstehend beschrieben, unterzubringen.

**[0097]** Für p1 wurde der gewonnene DNA-Clon  $\delta$ 115 mit SstII gespalten, mit Klenow stumpfendig gemacht und dann mit Sall gespalten, um so ein aus einem Agarosegel isoliertes 600 bp-Fragment zu gewinnen. Das isolierte Fragment wurde in pSOD16cf2 ligiert, das mit NcoI gespalten, stumpfendig und dann mit Sall gespalten worden war, wodurch sich pSOD- $\delta$ p1 ergab. Das codierte Fusionsprotein enthielt 205 Reste der durch die Nucleotide x1567 bis x963 codierten p1-Aminosäuresequenz.

**[0098]** Für das p2-Protein wurde das rekombinante Plasmid  $\delta$ 4 mit EcoRI und SmaI gespalten, wodurch ein 622 bp-Fragment gewonnen wurde, das in das mit EcoRI/SmaI-gespaltene pSOD16cf2 ligiert wurde, wodurch sich pSOD- $\delta$ p2 ergab.

**[0099]** (Beide resultierende Plasmide wurden sequenziert, um die Lage und die Orientierung der p1- und p2-codierenden Sequenzen am C-Terminus des SOD-Proteins zu bestätigen.

**[0100]** E. coli D1210 (Sadler et al., Gene 8 (1980), 279–300) wurde mit den Ligationsprodukten transformiert. Einzelne Transformantenkolonien wurden bei 37°C in 2 ml L-Nährmedium mit 100 µg/ml Ampicillin über Nacht gezüchtet. Von diesen Kulturen wurden Glycerin (50 %)-Lagerformen zubereitet und bei –20°C gelagert.

**[0101]** Zur Analyse der Proteinexpression wurden in dem gleichen Medium wie vorstehend Übernachtskulturen aus den Glycerin-Kulturen angelegt. Diese Kulturen wurden 1/100 mit demselben Medium verdünnt und bei 37°C bis zu einer OD<sub>650</sub> von 0,6 gezüchtet. Dann wurden Aliquots entweder lysiert, oder es wurde für die maximale Expression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert und vor der Lyse weitere 4 Stunden inkubiert.

**[0102]** Die Zellen wurden zur Analyse auf denaturierenden Polyacrylamid-Gelen (Laemmli, Nature 277 (1970), 680) in Gegenwart von SDS und DTT lysiert. Es wurde dann nach Towbin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 76 (1979), 4350 ein Immunblot gefertigt. Die Ergebnisse sind in **Fig. 6** gezeigt.

**[0103]** Die Immunblots wurden einer Reaktion mit  $\delta$ -Antiserum von chronisch infizierten Patienten (Spur A) oder mit Kontroll-Antiseren (Spur B), die Antiseren aus Infektionen mit nicht- $\delta$ -Hepatitis-Viren enthielten, unterworfen. Ferner wurden die Immunblots nach einem Vor-Binden von 5%igem Ziegenserum einer Reaktion mit einer 1:300fachen Verdünnung eines Antiserums unterworfen, das mit 1 × PBS, enthaltend 0,3 Tween-20 und 5 % Ziegenserum, verdünnt war. Anschließend wurde mit einer 1:200fachen Verdünnung Ziegen-anti-Human-IgG, das mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert war, inkubiert, und der Blot wurde in Gegenwart des Chromogens 4-Chlor-1-naphthol (Biorad) entwickelt.

**[0104]** Spuren 1 bis 4 in **Fig. 6** enthielten Extrakte von Zellen, die den rekombinanten Vektor pSOD- $\delta$ p1 enthielten; die Spuren 5 und 6 enthielten Extrakte von Zellen, die mit dem Wirtsvektor transformiert worden waren; die Spuren 7 bis 10 enthielten die korrespondierenden rekombinanten Vektoren pSOD- $\delta$ p2. Die Proben der Spuren 3, 4, 6, 9 und 10 stammten – von Kulturen, die mit IPTG nicht induziert worden waren; die der übrigen Spuren 1, 2, 5, 7 und 8 stammten von Kulturen, die zusätzlich mit IPTG induziert worden waren. Das Vorhandensein zusätzlicher Proteinbanden in den Spuren 1 bis 4 zeigt im Vergleich mit den Spuren 5 bis 10, daß von pSOD- $\delta$ p1 ein mit SOD-p1 bezeichnetes antigen-reaktives Protein, von pSOD- $\delta$ p2 aber kein solches Protein produziert wurde. Somit codiert ORF5, nicht aber ORF6 ein Protein, das spezifisch menschliches HDV-Antiserum bindet. Der Fehlschlag, ein spezifische immunreaktives ORF6-Fusionspolypeptid nachzuweisen lag nicht an seiner mangelnden Expression im Bakterienwirt, da die von pSOD- $\delta$ p1 und pSOD- $\delta$ p2 exprimierten Produkte, wenn man deren Bindung an Kaninchen-Antiserum, das gegen menschliche Superoxid-Dismutase gerichtet war, verfolgt, in ähnlichem Ausmaß vorhanden waren:

**[0105]** Wie aus **Fig. 6a** ersichtlich ist, gibt es hauptsächlich zwei Translationsprodukte von pSOD- $\delta$ p1, die mit

HDV-Antiserum immunreaktiv sind. Die abgeschätzte Größe des größten hauptimmunreaktiven ORF5-Polypeptids beträgt 49 000 Dalton, was sich in Übereinstimmung mit einem Fusionspolypeptid befindet, das 154 Aminosäuren von Superoxid-Dismutase und 205 durch ORF5 spezifizierte Aminosäuren enthält. Dieses Polypeptid kann sich durch Suppression des Amber-Codons in ORF5 (siehe **Fig. 2**) ergeben. Das Amber-Codon ist in pSOD- $\delta$ p1 vorhanden und der Wirtstamm, E. coli D1210, ist ein Amber-Suppressor-Stamm. Das zweite kleinere Haupt-Polypeptidprodukt kann das Ergebnis einer mangelhaften Suppression sein, die eine Termination am Amber-Codon erlaubt. Andere mögliche alternative Erklärungen sind, daß das kleinere Protein bzw. die kleineren Proteine sich durch posttranslationales Prozessing eines einzigen Produktes ergibt bzw. ergeben, oder daß es alternative Initiationsstellen innerhalb des ORF5 codierenden Bereiches gibt.

**[0106]** Eine Probe des E. coli Stammes D1210 (pSOD- $\delta$ p1) wurde unter der Hinterlegungsnummer 67131 bei der American Type Culture Collection (ATCC), 12310 Parklawn Drive, Rockville, Maryland, 20852, hinterlegt. Diese hinterlegte Probe wird nach den im Budapester Vertrag spezifizierten Bedingungen aufbewahrt.

D.3.b. Expression in E. coli von Fusionsproteinen, die HDV-Polypeptide enthalten, die in den ORFs 1, 2 und 7 codiert sind

**[0107]** Es wurden bakterielle Expressionsvektoren, die die Synthese von Fusionsproteinen steuerten, die Teile von SOD und von HDV-Proteinen enthielten, die in den ORFs 1, 2 und 7 codiert sind, d.h. die Vektoren pSOD-orf1, pSOD-orf2 und pSOD-orf7 konstruiert. Die Konstruktionsbedingungen und das Sequenzieren waren analog zu Abschnitt D.3.a. für pSOD- $\delta$ p1 und pSOD- $\delta$ p2, abgesehen vom Folgenden.

**[0108]** Für pSOD-orf1 wurde das 436 bp-Insertionsfragment aus dem Clon  $\delta$ 1 durch Spaltung des Plasmids mit NcoI und nachfolgende Gel-Reinigung isoliert. Dieses Fragment wurde mit pSOD16cf2, das mit NcoI und Phosphatase behandelt worden war, ligiert. Das ORF1-Fragment im Clon besitzt die genomische Orientierung.

**[0109]** Für pSOD-orf2 wurde das über ein Gel gereinigte Insertionsfragment mit 593 by isoliert, nachdem der Clon  $\delta$ 115 mit BstXI gespalten, anschließend mit Klenow behandelt und dann mit EcoRI gespalten worden war. Dieses Fragment wurde mit pSOD16cf2 ligiert, das mit NcoI gespalten, mit Klenow stumpfend gemacht und mit EcoRI gespalten worden war.

**[0110]** Für pSOD-orf7 wurde ein über ein Gel gereinigtes 439 bp-Insertionsfragment isoliert, nachdem der Clon  $\delta$ 115 mit AluI und SmaI gespalten worden war. Dieses Fragment wurde mit pSOD 16cf2 ligiert, das mit SmaI gespalten und mit Phosphatase behandelt worden war.

**[0111]** Die von pSOD-orf1, pSOD-orf2 und pSOD-orf7 exprimierten Proteine wurden wie für pSOD- $\delta$ p1 und pSOD- $\delta$ p2 (siehe Abschnitt D.3.a.) beschrieben durch Immun-Blotting analysiert.

**[0112]** Die Expressionsbedingungen waren ebenfalls denen in Abschnitt D.3.a. beschriebenen analog. Das Vorhandensein von ORF1-, ORF2- und ORF7-hSOD-Fusionsprodukten in den Bakterienlysaten wurde durch eine partielle Reaktivität mit polyclonalen gegen hSOD gerichteten Kaninchen-anti-hSOD-Antikörpern gezeigt. Lysate von Bakterienkulturen, die jeden der ORFs exprimierten wurden auf Nitrocellulose transferiert ("immun-blotted") und mit individuellen Antiseren von 12 verschiedenen Patienten mit chronischen HDV-Infektionen inkubiert. Die von pSOD-orf1, pSOD-orf2 und pSOD-orf7 exprimierten Produkte banden nicht an HDV-Antiseren, obwohl ein von pORF5 exprimiertes Produkt, dessen Konstruktion in Abschnitt D.3.c. beschrieben ist, die HDV-Antiseren band.

D.3.c. Expression in E. coli von nicht-fusionierten HDV-Polypeptiden, die in ORF5 codiert sind

**[0113]** Es wurde ein bakterielles Expressionsplasmid konstruiert, daß die Synthese von nicht-fusionierten ORF5-codierten Polypeptiden steuert. Dieser Vektor, porf5, war dem zur Expression der fusionierten sod-orf-Polypeptide (pSOD- $\delta$ p1, vergleiche Abschnitt D.3.a.) ähnlich, außer daß er einen zweiten synthetischen Linker enthielt, der so entworfen war, daß er die Translation nach der hSOD-codierenden Sequenz beendet, und die Translation beim ersten ATG der HDV-Sequenz erneut initiierte. Dieser Linker codiert 10 ursprünglich in ORF5 vorhandene Aminosäuren einschließlich des aminoterminalen ATGs. Genauer gesagt, wurde der Vektor durch Zusammenlagern der nachfolgenden Bestandteile konstruiert: a) ein 605 bp SstII-/Sall-Fragment, das aus  $\delta$ 115 gespalten und über ein Gel gereinigt wurde; b) der zweite Linker; und c) das große durch Spaltung von pSOD16cf2 mit NcoI und Sall erhaltene Fragment. Die Linkersequenz war folgendermaßen: 5' CATG GCT ACA GAG GAA TTA TAAT ATG AGC CGG TCC GAG TCG AGG AAG AAC CGC 3' 3' CGA TGT CTC CTT AAT ATTA TAC TCG GCC AGG CTC AGC TCC TTC TTG G 5' Die Transformation von E. coli

D1210 mit dem Plasmid porf5 wurde so vorgenommen, wie im Abschnitt D.3.a. für die Transformation mit anderen Plasmiden beschrieben worden war. Die Konstruktion der Insertion in porf5 wurde durch DNA-Sequenzanalyse bestätigt. Diese Analyse bestätigte ebenfalls das Vorhandensein des Amber-Codons im  $\delta$ 115-Derivat von ORF5 (siehe Fig. 3) hinsichtlich der ORF5-Sequenzheterogenitäten.

**[0114]** Die Expression der in porf5 codierten ORF5-Polypeptide und die Analyse der Immunreaktivität der exprimierten Produkte mit HDV-Antiseren wurde analog zu Abschnitt D.3.a. gleichzeitig mit den Analysen der exprimierten Produkte von pSOD-orf1, pSOD-orf2, pSOD-orf6 und pSOD-orf7 ausgeführt. Wie aus Fig. 8, die einen Immunblot zeigt, hervorgeht, erfolgte eine Bindung an die HDV-Antiseren nur von den durch ORF5 codierten Polypeptiden, und diese Polypeptide gingen keine Bindung an die Antiseren aus uninfizierten Individuen ein.

**[0115]** Für die Immunblot-Analyse in Fig. 8, wurden die Bakterienkulturen, die das Kontrollplasmid (pSOD16cf2) oder die hSOD-orf1-, 2-, 6-, 7- und ORF5-Expressionsplasmide enthielten, ungefähr 4 Stunden mit IPTG induziert. Die Zellen wurden sedimentiert, Lipid und Protein aus einer Zellmenge, die 0,024 OD äquivalent war, wurden auf 12 % Laemmli-Gelen elektrophoretisiert, wie in Abschnitt D.3. beschrieben worden war. Das Protein wurde in Carbonatpuffer auf Nitrocellulosefilter transferiert. Die Immunblots wurden mit einer 1:200fachen Verdünnung von menschlichem HDV-Antiserum inkubiert. Danach wurden sie mit <sup>125</sup>J-markiertem Schafs-anti-Human-IgG-Antikörper inkubiert und, wie in Abschnitt D.3.a. beschrieben, gewaschen. Die Lysate erscheinen in der nachfolgenden Reihenfolge: Spur 1, pSOD16cf2; Spur 2, pSODorf1; Spur 3, pSOD-orf2; Spur 4, porf5; Spur 5, pSOD-orf6 und Spur 6, pSOD-orf7.

**[0116]** Fig. 8 zeigt ferner, daß sich die von porf5 exprimierten Produkte, die mit HDV-spezifischen Antikörpern reagieren, aus zwei Molekulargewichts-Arten mit ungefähr 27k und 24k zusammensetzen. Wie nachstehend beschrieben, enthalten diese Polypeptide immunogene Epitope, die von den beiden viralen Hepatitis-Polypeptiden p27<sup>s</sup> und p24<sup>s</sup> geteilt werden. Das Vorhandensein von 27kd- und 24kd-Polypeptiden in HDV ist kürzlich beschrieben worden, Bergmann, K. F., und Gerin, J. L., J. of Inf. Diseases 154 (1986), 702; und Bonino F. et al. J. Virol. 58 (1986), 945. Außerdem enthalten, wie nachstehend gezeigt wird, diese Polypeptide wahrscheinlich ebenfalls das Hepatitis-delta-Antigen (HDAg). HDAg wurde ursprünglich in Kernen von Hepatocysten infizierter Individuen gefunden, Rizzetto, M. et al., Gut 18 (1977), 997.

D.3.d. Expression in Hefe von HDV-Polypeptiden, die in ORF5 codiert werden, und partielle Reinigung des Produktes

**[0117]** Es wurde ein Hefe-Expressionsvektor konstruiert, der die Synthese der gewünschten ORF5-codierten HDV-Polypeptide steuert. Die Expression dieses Plasmids, pYAG- $\delta$ p1, im Hefestamm AB 110 ergab ein Polypeptid mit 195 Aminosäuren, das mit HDV-Antiserum immunologisch reaktiv ist, und bei dem es sich mutmaßlich um das virale Protein p24<sub>s</sub> handelt.

**[0118]** Der Hefe-Expressionsvektor, pYAG- $\delta$ p1 wurde wie folgt konstruiert: Zuerst wurde pAG- $\delta$ p1 konstruiert, indem der mit einem neuen Linker ligierte ORF5 vom Clon  $\delta$ 115 in eine Expressions-Kassette in PBS100 inseriert wurde. Die Kassette, die sich mit BamHI herauspalten läßt, enthält stromaufwärts der einzigen NcoI-Stelle einen regulierbaren ADH2-GAP-Promotor und stromabwärts der einzigen Sall-Stelle einen GAP-Terminator. Nach dem Clonieren von pAG- $\delta$ p1 in E. coli HB101, wurde die ORF5 enthaltende Expressionskassette mit BamHI aus pAG- $\delta$ p1 herausgespalten und in den Hefe-"Shuttle-Vektor" pAB24, der mit BamHI gespalten worden war, ligiert. Die resultierenden Plasmide wurden in E. coli HB101 cloniert und ein "Shuttle-Plasmid", pYAG- $\delta$ p1, wurde ausgewählt. Zur Expression von ORF5 wurde der Hefestamm AB110 mit diesem Plasmid transformiert, wodurch sich AB110 (pYAG- $\delta$ p1) ergab.

**[0119]** Eine Probe des Hefestammes AB110 (pYAG- $\delta$ p1) wurde bei der ATCC, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852 unter der Hinterlegungsnummer \_\_\_\_\_ hinterlegt. Die hinterlegte Probe wird nach den im Budapester Vertrag spezifizierten Bedingungen aufbewahrt.

**[0120]** Genauer gesagt wurde die ORF5 enthaltende Expressionskassette durch Ligieren der folgenden Bestandteile konstruiert: Ein über ein Gel gereinigtes Fragment mit 605 bp, das durch Spaltung des Clons  $\delta$ 115 mit SstII und Sall erhalten worden war; ein neuer Linker (Linker 3) und ein durch Spaltung von PBS100 mit NcoI und Sall erhaltenes über ein Gel gereinigtes 5841 bp-Fragment. Die Sequenz von Linker 3 war:

```
5' CATG AGC CGG TCC GAG TCG AGG AAG AAC CGC 3'
    TGC GCC AGG CTC AGC TCC TTC TTG G
```

**[0121]** Das Plasmid pBS100 wird in der US-Anmeldung mit der Nummer 760,197 beschrieben. Diese Anmeldung gehört dem Inhaber der vorliegenden Anmeldung und auf sie wird hier Bezug genommen. Dieses Plasmid enthält eine Hefe-Expressionskassette, die in pAB12, einem pBR322-Derivat cloniert ist. Die Expressionskassette enthält einen hybriden ADH2-GAP-Promotor, einen GAP-Terminator, und nicht-essentielle Sequenzen zwischen den NcoI- und Sall-Stellen; die letzteren Sequenzen wurden durch den ORF5-Bereich aus dem Clon  $\delta$ 115 ersetzt. Der ADH2-GAP-Promotor ist ein aus dem Plasmid pJS103 isoliertes BamHI-NcoI-Fragment mit 1200 bp.

**[0122]** Das Plasmid pJS103 wurde wie folgt konstruiert: Der ADH2-Teil des Promotors wurde konstruiert durch Spalten eines Plasmids, das das Wildtyp-ADH2-Gen aus dem Plasmid pADR2 (Beier et al., Nature 300 (1982), 724–728) enthält, mit dem Restriktionsenzym EcoRV, das in der Position +66 relativ zum ATG-Startcodon ebenso spaltet wie an zwei anderen Stellen in pADR2 außerhalb des ADH2-Bereichs. Das resultierende Gemisch eines Vektorfragmentes und zweier kleinerer Fragmente wurde mit Bal31-Exonuclease verdaut, um ungefähr 300 bp zu entfernen. Mit der Bal31-behandelten DNA wurden synthetische XhoI-Linker ligiert. Das resultierende Vektor-DNA-Linker-Fragment (ungefähr 5 kb) wurde von den Linkern durch Säulenchromatographie abgetrennt, mit dem Restriktionsenzym XhoI gespalten, re-ligiert und zur Transformation von *E. coli*, das dadurch resistent gegen Ampicillin wird, verwendet. Die Positionen der XhoI-Linker wurden durch DNA-Sequenzierung bestimmt. Ein Plasmid, das einen XhoI-Linker innerhalb des 5'-nicht-transkribierten Bereichs des ADH2-Gens enthielt (Position -232 vom ATG), wurde mit dem Restriktionsenzym XhoI gespalten, mit S1-Nuclease und anschließend mit dem Restriktionsenzym EcoRI behandelt, um so ein lineares Vektormolekül zu erzeugen, das ein stumpfes Ende an der Stelle des XhoI-Linkers und ein EcoRI-Ende aufweist. Der GAP-Teil des Promotors wurde durch Spaltung des Plasmids pPGAP1 mit den Enzymen BamHI und EcoRI und einem nachfolgenden Isolieren des 0,4 kbp-DNA-Fragments konstruiert. Dieses gereinigte Fragment wurde dann vollständig mit dem Enzym AluI gespalten, und es wurde ein Fragment mit ungefähr 200 bp isoliert. Dieses GAP-Promotor-Fragment wurde mit dem auf dem vorstehend beschriebenen linearen Vektor vorhandenen ADH2-Fragment ligiert, wodurch sich das Plasmid pJS103 ergab.

**[0123]** Das Plasmid pPGAP1 ist ein mit einer Expressionskassette versehener Hefevektor, der zwischen dem GAPDH-Terminator und einem verstümmelten GAPDH-Promotorbereich einen Poly-Restriktionsstellen-Linker hat. Die Poly-Restriktionsstelle enthält die Erkennungsstellen für NcoI, EcoRI und Sall, und die Kassette ist als BamHI-Fragment herausschneidbar. Die Herstellung von pPGAP1 ist in EP- 0 164 556 und bei Travis, L. et al., J. Biol. Chem. 260(7) (1985), 4384-4389 beschrieben. In beiden Referenzen wird pPGAP1 als pPGAP bezeichnet.

**[0124]** Das Plasmid pAB12 ist ein pBR322-Derivat, dem der Bereich zwischen der einzigen HindIII- und der einzigen Sall-Stelle fehlt, und das in der einzigen EcoRI-Stelle einen BamHI-Linker enthält. Der Vektor wurde durch vollständige Spaltung von pBR322 mit HindIII und Sall, der ein begrenzter Verdau mit Bal31-Nuclease folgte, konstruiert. Die resultierenden Enden wurden mit Klenow behandelt, und die stumpfen Enden wurden mit T4-DNA-Ligase ligiert, wodurch kovalent geschlossene Ringe zurückgebildet wurden. Diese Ringe wurden dann vollständig mit EcoRI gespalten, die überhängenden Enden mit Klenow aufgefüllt und die stumpfen Enden mit BamHI-Linkern ligiert. Überschüssiger Linker wurde durch Spaltung mit BamHI entfernt, und kovalent geschlossene Ringe wurden durch Ligation erzeugt.

**[0125]** Das Plasmid pAB24 ist ein Hefe-"Shuttle-Vektor", der die vollständige 2 $\mu$ -Sequenz (Broach in Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces* 1 (1981), 445, Cold Spring Harbor Press) und pBR322-Sequenzen enthält. Es enthält außerdem das – aus dem Plasmid YEp24 (Botstein et al., Gene 8 (1979), 17) abgeleitete Hefegen URA3 und das Hefegen LEU<sup>2</sup>d, das aus dem (in der Europäischen Patentanmeldung EP 0 116 201 beschriebenen) Plasmid pC1/1 abgeleitet ist. Zur Beseitigung der partiellen 2 $\mu$ -Sequenzen durch Spalten von YEp24 mit EcoRI und durch Re-ligieren des Vektors wurde das Plasmid pAB24 konstruiert. Das resultierende Plasmid, YEp24 $\Delta$ R1 wurde durch Spalten mit ClaI linearisiert und mit dem vollständigen 2 $\mu$ -Plasmid, das mit ClaI linearisiert worden war, ligiert. Das resultierende Plasmid pCBou wurde dann mit XbaI gespalten, und das 8605 bp-Vektorfragment wurde über ein Gel isoliert. Dieses isolierte XbaI-Fragment wurde mit einem 4460 bp-XbaI-Fragment ligiert, das aus pC1/1 isolierte LEU<sup>2</sup>d-Gen enthielt. Das LEU<sup>2</sup>d-Gen hat die gleiche Orientierung wie das URA3-Gen. Das Inserieren der Expressionskassette erfolgte in die einzige BamHI-Stelle der pBR322-Sequenzen, wodurch das Gen für die bakterielle Resistenz gegen Tetracyclin unterbrochen wurde. **Fig. 9** stellt eine Karte von PAB24 dar, die die Stellen für die Restriktionsenzyme und einige charakteristische Merkmale zeigt.

**[0126]** Die Expression von ORF5 in Hefe wurde mit dem Hefestamm AB110 erreicht, der mit pYAG- $\delta$ p1 transformiert worden war. Der Hefestamm AB110 ist in der US-Patentanmeldung mit der Nr. 620,662 beschrieben,

die dem Inhaber der vorliegenden Anmeldung gehört, und auf die hiermit Bezug genommen wird. Der Genotyp von AB110 ist Mat $\alpha$ , ura 3-52, leu 2-04 oder sowohl leu 2-3 als auch leu 2-112, pep 4-3, his 4-500 [cir $^{\circ}$ ].

**[0127]** Zur Expression wurden Zellen aus einer gefrorenen Aufbewahrungsform auf Leu $^{-}$ -Platten ausgestrichen und bei 30°C inkubiert. Leucin-Selektivmedium wurde mit einer Einzelkolonie inokuliert [synthetisches Minimalmedium, Aminosäureergänzung (w/o Leu), 8 % Glucose; Sherman et al., Laboratory Manual for Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory 1986, Seiten 163-169]. Die Kultur wurde unter Schütteln bei 30°C inkubiert. Dann wurden 100 ml Leu – Medium (mit 3 % Glucose) mit 2 ml der Kultur inokuliert und unter Schütteln bei 30°C inkubiert. Wenn die Kultur stationär geworden war, wurde 1 Liter Leu-Medium (mit 1 % Glucose) mit 50 ml inokuliert. Die Kultur wurde unter Schütteln bei 30°C inkubiert, bis eine Dichte von OD<sub>650</sub>=1,75 OD/ml gemessen wurde. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Zellen sedimentiert und entweder bei –80°C gelagert oder der Protein-Reinigungsprozedur unterzogen.

**[0128]** In Hefe exprimierte orf5-codierte Proteine wurden wie folgt partiell gereinigt. Die Expressions-Hefekultur AB110(pYAG- $\delta$ p1) wurde sedimentiert, und das Volumen der gepackten Zellen wurde abgeschätzt. Das  $\delta$ p1-Protein wurde unter Anwendung des Glaskugel-Lyseverfahrens gereinigt. Das Zellpellet wurde in zwei Volumina (Vol.) Puffer I (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), 1  $\mu$ g/ml Pepstatin A) und 1 Vol. Glasperlen (0,25 mm, säure- und hitzebehandelt) resuspendiert. Die Zellen wurden durch heftiges Rühren auf dem Vortex lysiert und bei 4°C gehalten. Die Suspension wurde zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet wurde in 2 Vol. Puffer I (mit 1 % Triton X-100) gewaschen und dann zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und das Pellet wurde dreimal mit 2 Vol. Puffer I gewaschen. Während des letzten Waschschruttes wurden die Glasperlen aus der Proteinsuspension entfernt. Das gewaschene Pellet wurde zweimal mit gleichen Volumina Puffer I (mit 6 M Harnstoff) zur Solubilisierung des Proteins extrahiert. Die Überstände wurden vereinigt und mit Puffer I 1:10 verdünnt und mit 20 mM Natriumazid als Konservierungsmittel bei 4°C gelagert. Der letzte Schritt vor der Verwendung des Proteins war eine zweimalige Dialyse gegen 100 bis 300 Volumina Puffer I ohne PMSF und Pepstatin.

#### D.4. Identifizierung von Polypeptiden, die innerhalb von ORF5 codiert werden

**[0129]** Die innerhalb ORF5 codierten Polypeptide wurden als p27 $^{\delta}$  und p24 $^{\delta}$  durch direkten Vergleich der Größen der im Bakterium exprimierten rekombinanten nicht-fusionierten Polypeptide mit denen der in HDV-Partikeln und in HDAG-positiven Leber-Extrakten vorhandenen Polypeptide p27 $^{\delta}$  und p24 $^{\delta}$  identifiziert. Die ORF5-codierten Polypeptide wurden ferner auf der Basis immunologischer Konkurrenz zwischen den in Hefe exprimierten rekombinanten Polypeptiden und p27 $_{\delta}$  und p24 $^{\delta}$  um HDV-Antikörper als p27 $^{\delta}$  und p24 $^{\delta}$  identifiziert. Durch die konkurrierende Bindung der rekombinanten Polypeptide mit dem Kern-HDAG, die durch eine indirekte Immunperoxidase-Anfärbung von HDV-infizierten Leberschnitten nachweisbar war, wurden die ORF5-codierten Polypeptide schließlich als Bestandteile des Kern-HDAGs identifiziert.

##### D.4.a. Vergleich von anti-HDV-Antikörper bindenden Polypeptiden, die von porf5 in Bakterien exprimiert werden, mit p24 $^{\delta}$ und p27 $^{\delta}$ in HDV-Partikeln und in HDV-infizierter Leber

**[0130]** Die (von porf5 gesteuerte) Expression der ORF5-codierten Polypeptide in Bakterien und die Präparation der Lysate wurden wie vorstehend in Abschnitt D.3 beschrieben durchgeführt. Die Lysate von HDV-Partikeln und von HDV-infizierter Leber wurden freundlicherweise von K. F. Bergmann nach der Prozedur präpariert, die von K. F. Bergmann und J.L. Geria in J. of Inf. Diseases 154 (1986), 702 beschrieben wurde. Bei der Präparation von Leberlysaten wurden Leberproben mit der Schere zerstückelt und mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte ein Homogenisieren mit einem Potter-Elvehjem-Apparat in 6 M Guanidinium-HCl (pH 6). Nach 1 bis 3 Stunden Inkubation bei 4°C wurden die Extrakte 10 Minuten bei 1500 g zentrifugiert, gegen PBS dialysiert und erneut zentrifugiert. Virale Lysate wurden nach veröffentlichten Verfahren mit der Modifikation, daß das BSA- weggelassen wurde, präpariert. Die Serumproben wurden über 20%-ige Saccharose in 0,02 M HEPES (pH 7,4), 0,01 M CaCl<sub>2</sub>, 0,01 M MgCl<sub>2</sub> geschichtet und in einem SW 41-Rotor 5 Stunden mit 150 000 g zentrifugiert, um das Virus zu pelletieren. Die Pellets wurden in 0,05 M Tris (pH 6,8) und 2 % SDS gehalten.

**[0131]** Lysate von ORF5-exprimierenden Bakterien wurden auf 12%igen Laemmli-Gelen in Spuren elektro-phoretisiert, die benachbart zu Extrakten von pelletiertem HDV oder zu Extrakten von HDAG-positiver Leber waren, für die Immunanalyse auf Nitrocellulose übertragen und mit HDV-Antiserum (1:400fache Verdünnung) inkubiert. **Fig. 10A** zeigt den Immunblot von Extrakten des HDV-Virus (Spur 1), der Lysate von infizierter Leber (Spur 2) und eines Bakterienlysates nach der Expression von porf5 (Spur 3). Wie aus **Fig. 10A** hervorgeht, comigrierten anscheinend zwei hauptimmunreaktive Polypeptide in den Bakterienlysaten mit den p27 $^{\delta}$ - und p24 $^{\delta}$ -Polypeptiden, die aus pelletiertem Virus und aus HDAG-positiver Leber extrahiert sind. Ferner waren in

den Bakterienlysaten eine Reihe immunreaktiver Polypeptide mit niedrigem Molekulargewicht vorhanden. Bei diesen kann es sich um proteolytische Produkte von p27 und/oder p24 handeln.

D.4.b. Immunologische Konkurrenz zwischen dem in Hefe oder Bakterien exprimierten ORF5-Polypeptid und p24<sup>δ</sup> und p27<sup>δ</sup> aus HDV-Partikeln oder aus HDV-infizierter Leber

**[0132]** Die immunologische Konkurrenz zwischen rekombinanten ORF5-Produkten und den viralen Peptiden p24<sup>δ</sup> und p27<sup>δ</sup> wurde durch Konkurrenz-Bindungsassays bestimmt. Generell wurde dem HDV-Antiserum erlaubt, an die entweder in Hefe oder in Bakterien produzierten rekombinanten ORF5-Produkte zu adsorbieren. Das prä-adsorbierte Serum wurde auf seine Fähigkeit hin, in einer Immunblot-Prozedur virales p24<sup>δ</sup> und p27<sup>δ</sup> zu binden, mit einem Kontrollserum verglichen. Das Kontrollserum war HDV-Antiserum, an das die Expressionsprodukte von Hefe- oder Bakterienkulturen, die mit den Kontroll-(Eltern)-Vektoren transformiert worden waren prä-adsorbiert wurde. Die Expressionsbedingungen entsprachen denen, die eine Expression der ORF5 enthaltenden rekombinanten Vektoren erlaubten.

**[0133]** Eine immunologische Konkurrenz zwischen den ORF5-Produkten, die in dem mit pYAG-δp1 transformierten Hefestamm AB110 exprimiert worden waren und p24<sup>δ</sup> und p27<sup>δ</sup> aus HDV-Partikeln wurde wie folgt gemessen. Die rekombinanten ORF5-Produkte wurden in Hefe exprimiert und partiell unter denen in Abschnitt D.3. beschriebenen Bedingungen gereinigt. Extrakte von HDV-Partikeln wurden präpariert, auf Laemmli Gelen gelesen, und es wurde ein Blot so angefertigt, wie in Abschnitt D.4.a. beschrieben, außer daß in der Immunblot-Prozedur vor der Inkubation der Nitrocellulosefilter mit HDV-Antiserum 5 entfettete Milch in 1 × PBS (0,14 M NaCl, 2,5 mM KCl, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12 H<sub>2</sub>O, pH = 7,4) als Blockierungsmittel verwendet wurde. Die auf die Nitrocellulose übertragenen HDV-Polypeptide wurden inkubiert mit HDV-Antiserum, das mit Extrakten prä-adsorbiert worden war, die aus 0,44 ml Hefekulturen (OD<sub>650</sub>, 16 OD/ml) stammten, die entweder (1) das Eltern-Kontrollplasmid pAB 24 oder (2), das den ORF5 enthaltende Plasmid pYAG-δp1 exprimierten.

**[0134]** Fig. 10B zeigt die Immunblots bei Verwendung von HDV-Antiserum, das mit Lysaten von Hefe, die entweder das Kontrollplasmid (Spur 1) oder das ORF5 enthaltende Plasmid (Spur 2) exprimierte, prä-adsorbiert worden war. Wie aus der Figur hervorgeht, verhindert eine Prä-Adsorption des HDV-Antiserums mit rekombinanten ORF5-Polypeptiden vollständig die Antikörperbindung an die HDV-Polypeptide p24<sup>δ</sup> und p27<sup>δ</sup>. Eine Prä-Adsorption mit HDV-Antiserum, das mit dem Kontrollserum prä-adsorbiert war, verhinderte eine Bindung nicht. Die schwache diffuse Bande in Fig. 10B, Spur 2, kann eine nicht-spezifische Bindung darstellen, da die Bande ebenfalls vorhanden war, wenn Kontrollseren, denen HDV-Antikörper fehlten, das HDV-Antiserum ersetzten. Aus dem Binden der polyclonalen Antikörper im HDV-Antiserum insgesamt läßt sich ableiten, daß die ORF-Polypeptide immunologisch als p24<sup>δ</sup> und p27<sup>δ</sup> identifizierbar waren.

**[0135]** Die immunologische Konkurrenz zwischen den in Bakterien oder Hefe exprimierten ORF-Polypeptiden und p24<sup>δ</sup> und p27<sup>δ</sup> aus infizierter Leber wurde ebenfalls gemessen. Die Expression von ORF5-Polypeptiden im Hefestamm HB110 (pYAG-δp1) wurde, wie unmittelbar vorstehend beschrieben, vorgenommen. Die Expression von ORF5-Polypeptiden in E. coli D1210, das mit porf5 transformiert worden war, wurde unter den in Abschnitt D.3. beschriebenen Bedingungen ausgeführt. Leberlysate wurden wie in Abschnitt D.4.a. beschrieben präpariert und auf Nitrocellulose transferiert (blotted), außer daß die vorstehend beschriebene Modifikation in der Blotting-Prozedur ebenfalls angewandt wurde. Die Blots der Polypeptide aus HDAg-positiven Leberextrakten wurden mit HDV-Antiserum inkubiert, das mit den nachfolgend aufgeführten Proben prä-inkubiert worden war: Extrakte von Hefekulturen AB110, die pAB24 exprimierten (Kontrolle); Extrakte von Hefekulturen AB110, die den ORF5 von pYAG-δp1 exprimierten; Extrakte von E. coli D1210, das pSOD16cf2 exprimierte (Kontrolle); und Extrakte von E. coli, das porf5 exprimierte. Eine Prä-Adsorption des HDV-Antiserums mit (1) den Hefekulturen wurde mit 0,44 ml (OD<sub>650</sub>, 16 OD/ml) und (2) E. coli mit ungefähr 100 ml (OD<sub>650</sub>, 0,6 OD/ml) vorgenommen. Die Blots wurden mit 1:1000-fachen Verdünnungen des prä-adsorbierten HDV-Antiserums inkubiert. Ferner wurde als eine Kontrolle ein Blot mit HDV-Antiserum inkubiert, das mit einem gleichen Volumen von dialysiertem Harnstoff-Extraktionspuffer prä-inkubiert worden war.

**[0136]** Figur 10C zeigt die Immunblots von HDV-Polypeptiden, die sich ergeben, wenn Serum verwendet wurden, das präadsorbiert ist mit: Hefe, die das Kontrollplasmid exprimiert (Spur 1); Hefe, die ORF5 exprimiert (Spur 2); E. coli, das das Kontrollplasmid exprimiert (Spur 3); E. coli, das ORF5 exprimiert (Spur 4), Puffer-Kontrolle (Spur 5). Wie aus der Figur hervorgeht, beseitigt die Prä-Adsorption von HDV-Antiserum mit ORF5-Polypeptiden, die in Hefe exprimiert worden waren, vollständig die Bindung von HDV-spezifischen Antikörpern an p27<sup>δ</sup> und p24<sup>δ</sup> aus HDAg-positiven Leberextrakten. Orf5-Polypeptide aus Bakterienkulturen beseitigen anscheinend ebenfalls die Bindung von HDVspezifischen Antikörpern an p27<sup>δ</sup> und vermindern die Bindung dieser Antikörper an p24<sup>δ</sup> mindestens 10-fach wie aus dem densitometrischen Abtasten der ursprünglichen Autora-

diogramme hervorgeht. Die restliche Bindung des HDV-Antiserums an p24<sup>δ</sup> rührt wahrscheinlich von der begrenzten Menge des ORF5-Polypeptids in Bakterienextrakten her. In keiner der Kontrollen trat eine signifikante Verminderung der Bindung von HDV-Antigen an p24<sup>δ</sup> und p27<sup>δ</sup> von HDAg aus infizierter Leber auf.

#### D.4.c. Immunologische Konkurrenz zwischen ORF5-codierten Polypeptiden und dem Kern-HDAg aus HDV-infizierter Leber

**[0137]** Schnitte von HDAg-positiver Leber wurden mit HDV-Antiserum inkubiert, das mit in Hefe exprimierten ORF5-codierten Polypeptiden oder einem Kontrolllysat präadsorbiert worden war. Die Präparation des präadsorbierten HDV-Antiserums wurde, einschließlich der Kontrollen, so wie in Abschnitt D.3.b beschrieben, vorgenommen. Die Schnitte wurden anschließend mit einem mit Peroxidase markierten anti-Human-IgG inkubiert, und es wurde eine indirekte Anfärbung mit Immun-Peroxidase vorgenommen. Die Prozeduren wurden gemäß Govindarajan, S. et al, *Histopathology* 8 (1984), 63, durchgeführt. Bei diesem Verfahren wurde ein Vorabblockieren endogener Peroxidase vorgenommen. Entplastifizierte Schnitte wurden in einer feuchten Kammer 30 Minuten bei Raumtemperatur mit präadsorbiertem HDV-Antiserum inkubiert. Anschließend wurden zwei Waschschriffe mit PBS und eine Behandlung mit Kaninchen-anti-Human-IgG, das mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert war, in einer feuchten Kammer ausgeführt. Danach wurden die Sektionen 10 Minuten in PBS gespült und 5 bis 8 Minuten mit 3-3'-Diaminobenzidin-hydrochlorid und Wasserstoffperoxid behandelt. Nach dem Dehydratisieren wurden die Schnitte mit Deckgläschen versehen und durch Lichtmikroskopie untersucht.

**[0138]** Fig. 11 zeigt Photographien der angefärbten Leberschnitte. Die Photographien wurden mit einer 150fachen Vergrößerung aufgenommen. Fig. 11A zeigt die indirekte Immunperoxidase-Anfärbung, die man mit HDV-Antiserum erhielt, das mit dem Hefe-Kontrolllysate inkubiert worden war. Fig. 11B zeigt die Anfärbung, die man erhielt, wenn das HDV-Antiserum mit den in Hefe exprimierten ORF5-codierten Polypeptiden präadsorbiert wurde. Im Gegensatz zu der klaren Bindung von Antikörpern gegen HDAg an Kerne, die zu beobachten war, wenn das mit HDV-Antiserum ein Kontrolleextrakt präadsorbiert wurde, gab es keine Bindung, wenn das Antiserum mit den rekombinanten ORF5-Polypeptiden präadsorbiert wurde.

**[0139]** Bisher fehlte ein direkter Beweis, daß p24<sup>δ</sup> und p27<sup>δ</sup> Bestandteile des nuclearen delta-Antigens sind. Die vorstehend gelieferten Ergebnisse zeigen, daß die ORF5 codierten Produkte mit dem nuclearen δ-Antigen um HDV-spezifische Antikörper konkurrieren. Die Ergebnisse zeigen ferner, daß ORF5 zwei Polypeptide codiert, die dieselbe Größe wie p24<sup>δ</sup> und p27<sup>δ</sup> haben, und die dieselben immunreaktiven Epitope aufweisen wie jene viralen Polypeptide. Somit zeigen die kombinierten Ergebnisse, daß ORF5 die viralen Polypeptide p24<sup>δ</sup> und p27<sup>δ</sup> codiert und daß diese Polypeptide Bestandteile des nuclearen delta-Antigens in HDV-infizierter Leber sind.

#### D.5. Hybride Partikel-HDV-Immunogene

**[0140]** Auf die am 12. April 1984 eingereichte US-Anmeldung 650,323, die dem Inhaber der vorliegenden Anmeldung gehört, wird hiermit Bezug genommen. Diese Anmeldung beschreibt die Konstruktion hybrider Partikel des Hepatitis B-Oberflächenantigens, (HBsAg), das im Leseraster mit den Codons für HBsAg Insertionen fremder Immunogene in einen den Pre-Oberflächen (pre-S) codierenden Teil enthält. Das dort beschriebene Plasmid pDC101 enthält einen Teil des pre-S/HBsAg-Gens einschließlich von 55 Codons des pre-S-Bereichs in einer GAPDH-kontrollierten Expressionskassette, die in die BamHI-Stelle eines pBR322-Derivats cloniert ist. Die Anmeldung, auf die hier Bezug genommen wird, beschreibt die Insertion von gewünschten Immunogenen, wie der gD-(Glykoprotein D-) antigenen Stelle in eine einzig vorkommende EcoRI-Stelle, die im pre-S-Bereich von pDC101 vorhanden ist, wodurch sich das hybride Plasmid pDC103 ergibt. Ähnlich können gemäß der vorliegenden Erfindung gewünschte vom HDV-Genom abgeleitete Epitope, insbesondere solche, die in ORF5 codiert sind, mit geeigneten EcoRI-Linkern bereitgestellt und im richtigen Leseraster in die EcoRI-Stelle von pDC101 inseriert werden oder dazu verwendet werden, die gD-Codons im pDC103-Hybrid zu ersetzen. pDC103 ist unter der Hinterlegungsnummer 20726 bei der ATCC hinterlegt.

**[0141]** Hybride Partikel-Immunogene werden somit so hergestellt, daß man fusionierte HBsAg- und HDV-codierende Sequenzen verwendet und eine gesteigerte Immunogenität für die HDV-Epitope bereitstellt.

#### D.6. Herstellung von Antikörpern gegen ORF5-codierte Polypeptide

**[0142]** Antikörper gegen ORF5-codierte Polypeptide werden durch die Immunisierung eines Tieres mit partiell gereinigten ORF5-codierten im Hefestamm AB110(pYAG-δp1) exprimierten Polypeptiden hergestellt. Die Expressionsbedingungen und die Prozeduren zur partiellen Reinigung für die ORF5-Produkte aus Hefe entspre-

chen den vorstehend beschriebenen. Die gegen ORF5-codierte Polypeptide gerichteten Antikörper lassen sich aus den so abgeleiteten polyclonalen Antikörpern durch Affinitäts-Chromatographie reinigen, d.h. durch Passieren des Antiserums über Affinitätssäulen, die die Expressionsprodukte des Elternplasmids, pAB24, enthalten. Die Antikörper gegen die ORF5-Produkte sollten im Durchlauf zu finden sein. Die Verfahren zur Herstellung von Affinitätssäulen sind dem Fachmann bekannt.

#### Nützlichkeit

**[0143]** Die hier offenbarte Erfindung hat die nachfolgend aufgeführten industriellen Verwendungen. Die Information über die Nucleotidsequenz des HDV-Genoms läßt sich zur Entwicklung von Nucleotidsonden verwenden, die zur Diagnose von HDV-Infektionen nützlich sind. Diese Sonden können ferner in Diagnostika-Kits verwendet werden. Die Information über die Nucleotidsequenz läßt sich ferner zur Synthese von Peptiden und Polypeptiden verwenden, für die ihrerseits die nachfolgenden Verwendungsmöglichkeiten bestehen. Da ORF5 die Polypeptide codiert, die das HDV-Antigen umfassen, sind die von ORF5-Sequenzen synthetisierten Peptide und Polypeptide insbesondere nützlich zum Diagnostizieren von HDV-Infektionen, die sich im Auftreten von HDV-Antikörpern widerspiegeln. Ferner sind die Produkte der Expression von ORF5-Sequenzen bei der Herstellung von Impfstoffen gegen HDV und bei der Herstellung von – polyclonalen und monoclonalen – HDV-Antikörpern nützlich. Gegen die ORF5-Produkte gerichtete HDV-Antikörper können zur Diagnose von HDV-Antigenen aufgrund des Vorhandenseins der Antigene selbst verwendet werden. Solche Antikörper können die Grundlage eines Diagnose-Kits für HDV bilden. Ferner können die Antikörper außerdem in Impfstoffen gegen HDV verwendet werden.

**[0144]** Die von anderen ORF-Sequenzen synthetisierten Peptide oder Polypeptide können ebenfalls zur Erzeugung von Antikörpern gegen HDV-codierte Bestandteile verwendet werden. Diese Antikörper können genau so wie die Produkte der ORF-Sequenz nützlich bei der Bestimmung des viralen Replikationszyklus und der zellulären Interaktionen mit den viralen Bestandteilen sein. Dieses Wissen seinerseits ist für die gewerbliche Entwicklung von Impfstoffen gegen HDV wertvoll.

#### Patentansprüche

1. Isolierte DNA-Nucleotidsequenz, umfassend das HDV-Genom oder die komplementäre Sequenz gemäß **Fig. 2**.
2. Isolierte Nucleotidsequenz, die für die Produktion von HDV-Diagnostika oder -Impfstoffen wertvoll ist, wobei die Sequenz eine Nucleotidsequenz umfaßt, die eines der viralen Polypeptide p1, p2, p4, p5, p6, p7, p8, p9, p10, oder p11 codiert, wobei die isolierte Nucleotidsequenz nicht das HDV-Genom ist.
3. Sequenz nach Anspruch 2, wobei das codierte virale Polypeptid p27δ oder p24δ ist.
4. Rekombinantes Expressionssystem, umfassend einen codierenden Anteil an DNA, der von der Sequenz nach Anspruch 2 oder 3 stammt, funktionell verbunden mit einer Kontrollsequenz, die mit einem gewünschten Wirt kompatibel ist.
5. Wirtszellen, die mit einer Nucleotidsequenz nach Anspruch 2 oder 3 transformiert sind, die mit einer Kontrollsequenz funktionell verbunden ist, die mit den Wirtszellen kompatibel ist.
6. Mittel, umfassend ein gereinigtes, antigenes HDV-Protein, erhältlich aus den Zellen nach Anspruch 5, das eine Aminosäuresequenz gemäß **Fig. 3** aufweist.
7. Immunogenes Teilchen, das Antikörper gegen HDV-Antigene erzeugt, wobei das Teilchen einen teilchenbildenden Anteil des Hepatitis B-Oberflächenantigens umfaßt, der mit einem rekombinanten, ein HDV-Epitop umfassenden Protein fusioniert ist.
8. Kit zur Analyse biologischer Proben auf die Gegenwart von HDV, umfassend eine Oligonucleotidsonde, die eine DNA-Sequenz von 8 oder mehr Nucleotiden des HDV-Genoms oder seines Komplements umfaßt, wobei die DNA-Sequenz von ORF 2, 4, 5 oder 11 stammt, und Instruktionen für die Analyse.
9. Verfahren zur Herstellung eines Kits zur Analyse der Gegenwart von HDV-Antikörpern in biologischen Proben, umfassend den Schritt der rekombinanten oder chemischen Synthese eines Polypeptides, welches ein Epitop enthält, das in der Nucleotidsequenz nach Anspruch 2 oder 3 codiert ist.

10. Impfstoff zur Behandlung oder Vorbeugung einer HDV-Infektion, umfassend ein rekombinant oder chemisch synthetisiertes Polypeptid, das in der Nucleotidsequenz nach Anspruch 2 oder 3 codiert ist.

11. Verfahren zur Herstellung eines Proteins, das ein Epitop enthält, das immunologisch als ein innerhalb eines HDV-Antigens enthaltenes Epitop identifizierbar ist, umfassend die Inkubation von Wirtszellen, die mit einem rekombinanten Vektor transformiert sind, unter Bedingungen, die die Expression des Vektors erlauben, wobei der Vektor eine Nucleotidsequenz gemäß der Definition in einem der Ansprüche 1 bis 3 umfasst.

12. Verfahren zum Nachweis von HDV, umfassend das Hybridisieren einer Nucleotidsequenz gemäß der Definition in einem der Ansprüche 1 bis 3 mit einer biologischen Probe.

13. Verfahren zur Herstellung von Antikörpern gegen HDV, umfassend das Immunisieren eines Tieres mit einem ein Epitop enthaltenden Protein, das immunologisch als ein innerhalb eines HDV-Antigens enthaltenes Epitop identifizierbar ist, wobei das Protein in Wirtszellen synthetisiert wird, die mit einem rekombinanten Vektor transformiert sind, welcher eine Nucleotidsequenz gemäß der Definition in einem der Ansprüche 1 bis 3 umfasst, und Gewinnung der Antikörper aus diesem Tier.

14. Verwendung einer Nucleotidsequenz gemäß der Definition in einem der Ansprüche 1 bis 3, für die Herstellung eines Impfstoffs gegen HDV oder für die Herstellung eines Kits zum Nachweis von für HDV charakteristischem Material.

Es folgen 10 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

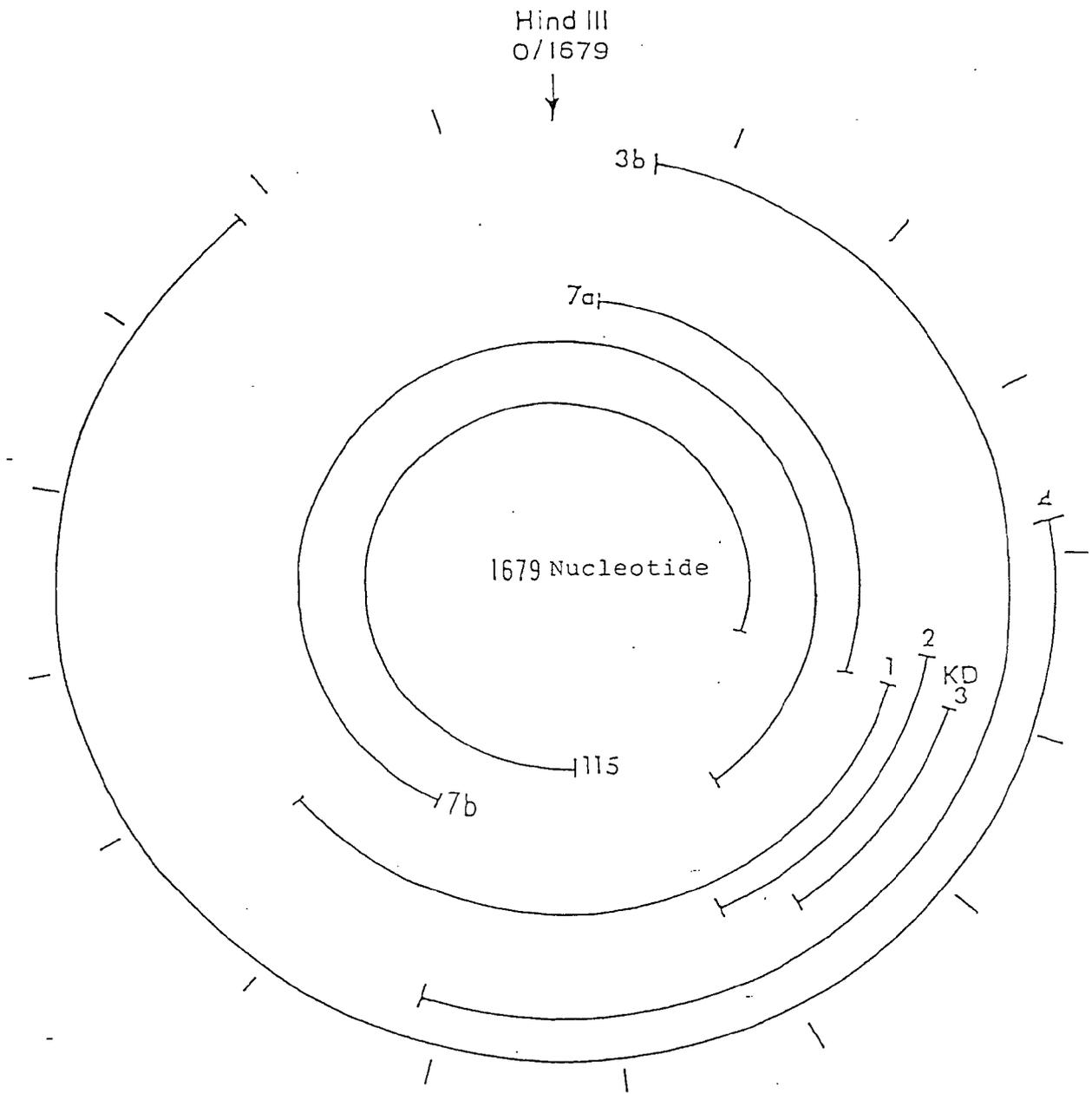


FIG. 1





1 GlyLeuProProLeuAlaGluMetSerArgSerGluSerArgLysAsnArgGlyGlyArg  
 GGACTGCCGCTCTAGCCGAGATGAGCCGGTCCGAGTCGAGGAAGAACCGCGGAGGGAGA  
 --- G

61 GluGluIleLeuGluGlnTrpValAlaGlyArgLysLysLeuGluGluLeuGluArgAsp  
 GAAGAGATCCTCGAGCAGTGGGTGGCCGGAAGAAAGAAGTTAGAGGAACTCGAGAGAGAC

121 LeuArgLysThrLysLysLysLeuLysLysIleGluAspGluAsnProTrpLeuGlyAsn  
 CTCCGGAAGACAAAGAAGAACTCAAAAAGATTGAGGACGAAAATCCCTGGCTGGGGAAC  
 G

181 IleLysGlyIleLeuGlyLysLysAspLysAspGlyGluGlyAlaProProAlaLysArg  
 ATCAAAGGAATTCTCGGAAAGAAGGATAAGGATGGAGAGGGGGCTCCCCCGCGAAGAGG  
 C

241 AlaArgThrAspGlnMetGluValAspSerGlyProArgLysArgProLeuArgGlyGly  
 GCCCGAACGGACCAGATGGAGGTAGACTCCGGACCTAGGAAGAGGCCTCTCAGGGGAGGA

301 Arg  
 PheThrAspLysGluArgGlnAspHisArgArgArgLysAlaLeuGluAsnLysLysLys  
 TTCACCGACAAGGAGAGGCAGGATCACCGACGAAGGAAGCCCTCGAGAACAAGAAGAAG  
 G

361 GlnLeuSerAlaGlyGlyLysAsnLeuSerLysGluGluGluGluLeuArgArgLeu  
 CAGCTATCGGCGGGAGGCAAGAACCTCAGCAAGGAGGAAGAAGAGGAACTCAGGAGGTTG

421 ThrGluGluAspGluArgArgGluArgArgValAlaGlyProProValGlyGlyValIle  
 ACCGAGGAAGACGAGAGAAGGGAAGAAGAGTAGCCGGCCCCCGGTTGGGGGTGTGATC  
 Asn  
 A

481 ProLeuGluGlyGlySerArgGlyAlaProGlyGlyGlyPheValProSerLeuGlnGly  
 CCCCTCGAAGGTGGATCGAGGGGAGCGCCCGGGGGCGGCTTCGTCCCCAGTCTGCAGGGA  
 Leu  
 T

541 ValProGluSerProPheSerArgThrGlyGluGlyLeuAspIleArgGlyAsnArgGly  
 GTCCCGGAGTCCCCCTTCTCTCGGACCGGGGAGGGGCTGGACATCAGGGGAAACCGGGGA  
 Gln  
 A

601 END  
 PheProTrpAspIleLeuPheProAlaAspProProPheSerProGlnSerCysArgPro  
 TTTCCATGGGATATACTCTTCCCAGCCGATCCGCCCTTTTCTCCCCAGAGTTGTCGACCC  
 A A  
 \*

661 GlnEND  
 CAGTGA

FIG. 3

1 GTCCCCCTTCTCTCGGACCGGGGAGGGGCTGGACATCAGGGGAAACCGGGGATTTCCATG  
 CAGGGGGAAAGAGAGCCTGGCCCCCTCCCCGACCTGTAAGTCCCCTTTGGCCCCCTAAAGGTAC  
 15 AVA2 SAU96, 18 HPA11 NCI1 SCRF1, 23 MNL1, 46 HPA11 NCI1 S  
 CRF1, 56 NCO1, 57 NLA111,  
 61 GGATATACTCTTCCCAGCCGATCCACCCTTTTCTCCCAGAGTTGTGCGACCCAGTGAAT  
 CCTATATGAGAAGGGTCTGGCTAGGTGGGAAAAGAGGGGTCTCAACAGCTGGGGTCACTTA  
 69 MB011, 80 BIN1 MB01, 105 ACC1 HINC11 SAL1, 106 TAQ1,  
 121 AAAGCGGGTTTTCCA CTACAGGTTTGCCTCTCGCGTCCTTCTTTCTTTCGGGTCCGCA  
 TTTCCGCCAAAGGTGAGTGTCCAAACGCAGAGCGCAGGAAGAAAGGAGAAGCCAGCCGT  
 146 HGA1, 152 THA1, 153 HGA1, 165 MNL1, 167 MB011, 179 NLA11  
 1,   
 181 TGGCATCTCCACCTCCTCGCGGTCCGACCTGGGCATCCGAAGGAGGACGCACGTCCACTC  
 ACCGTAGAGGTGGAGGAGCGCCAGGCTGGACCCGTAGGCTTCTCCTGCGTGCAGGTGAG  
 183 SFAN1, 192 MNL1, 195 MNL1, 198 THA1, 201 AVA2 SAU96, 208  
 ECOR11 SCRF1, 213 SFAN1, 214 FOK1, 223 MNL1, 226 HGA1, 231  
 MAE2, 235 BSTX1,  
 241 GGATGGCTAAGGGAGAGCCACTTTTTCTCTCGATTCTCTATCGGAATCTAGAGAGATTTGT  
 CCTACCGATTCCCTCTCGGTGAAAAGAGAGCTAAGAGATAGCCTTAGATCTCTCTAAACA  
 241 FOK1, 247 DDE1, 269 TAQ1, 271 HINF1, 283 HINF1, 286 XBA1  
 , 287 MAE1,  
 301 GGGTCCCATTCCGCCATTACCGAGGGGACGGTCCCCTCGGAATGTTGCCAGCCGGCGCCA  
 CCCAGGGTAAGCGGTAATGGCTCCCCTGCCAGGGGAGCCTTACAACGGGTCCGCCGCGGT  
 301 NLA1V, 302 AVA2 NLA1V SAU96, 321 MNL1, 329 AVA2 NLA1V SA  
 U96, 334 MNL1, 346 BGL1, 351 NAE1, 352 HPA11, 354 AHA11 BAN1  
 HAE11 NAR1 NLA1V, 355 HHA1,  
 361 GCGAGGAGGCTGGGACCATGCCGGCCATCAGGTAAGAAAGGATGGAACGCGGACCCTGCA  
 CGCTCCTCCGACCCTGGTACGGCCGGTAGTCCATTCTTTCTACCTTGCGCCTGGGACGT  
 363 MNL1, 366 MNL1, 372 NLA1V, 373 AVA2 SAU96, 377 NLA111, 3  
 80 NAE1, 381 HPA11, 382 CFR1, 383 HAE111, 400 FOK1, 408 THA1  
 , 411 AVA2 NLA1V SAU96, 416 PST1,  
 421 GAGTGGGGTCCCGCCATTCTGGGGGACCCCTGGGGGGGGGAGTCCGAATCGAGCATCGG  
 CTCACCCAGGGCGGTAAGGACCCGCTGGGAACCCCCCTCAGCCTTAGCTCGTAGCC  
 426 NLA1V, 427 AVA2 NLA1V SAU96, 439 ECOR11 SCRF1, 461 HINF1  
 , 467 HINF1, 470 TAQ1, 474 SFAN1,  
 481 GAGGGGCATCCCATGGCTCCACTGGTCCCCGGTGTTCCTAGCACCCCTCCGGTCACTTT  
 CTCCCCGTAGGGTACCGAGGTGACCAGGGGCCACAAGGATCGTGGGGGAGGCCAGTGAAA  
 481 MNL1, 486 SFAN1, 487 FOK1, 491 NCO1, 492 NLA111, 493 NLA  
 1V, 504 AVA2 NLA1V SAU96, 508 NCI1 SCRF1, 509 HPA11, 518 MAE  
 1, 523 HGIE11, 527 MNL1, 530 HPA11, 533 MAE3, 539 ASU11, 540  
 †AQ1,  
 541 CGAAGGGGGTCCGGGGTCCCGCTAGAT  
 GCTTCCCCCAGGGCCCCAGGGCGATCTA  
 547 NLA1V, 548 AVA2 SAU96, 551 HPA11 NCI1 SCRF1, 554 NLA1V,  
 555 AVA2 NLA1V SAU96, 562 MAE1,  
 601

FIG. 4

FIG. 5

1 2 3 4



FIG. 6

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

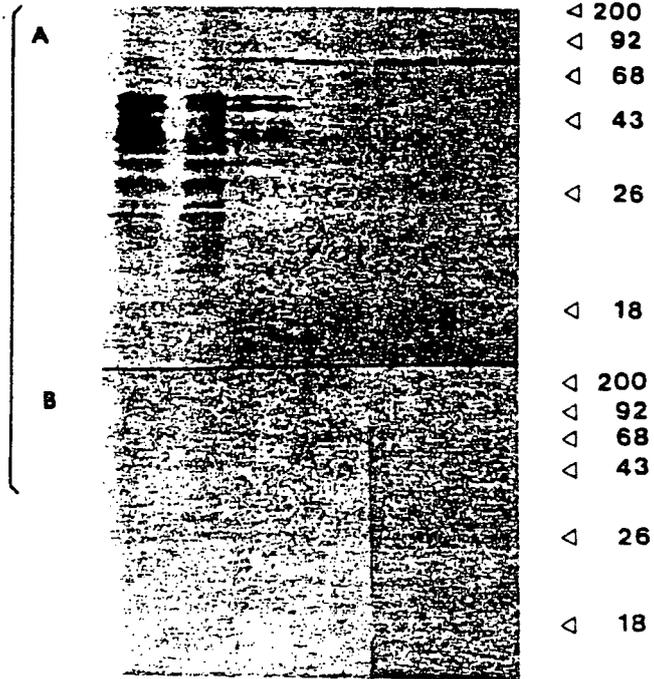


FIG. 8

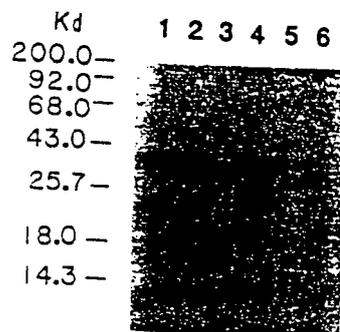
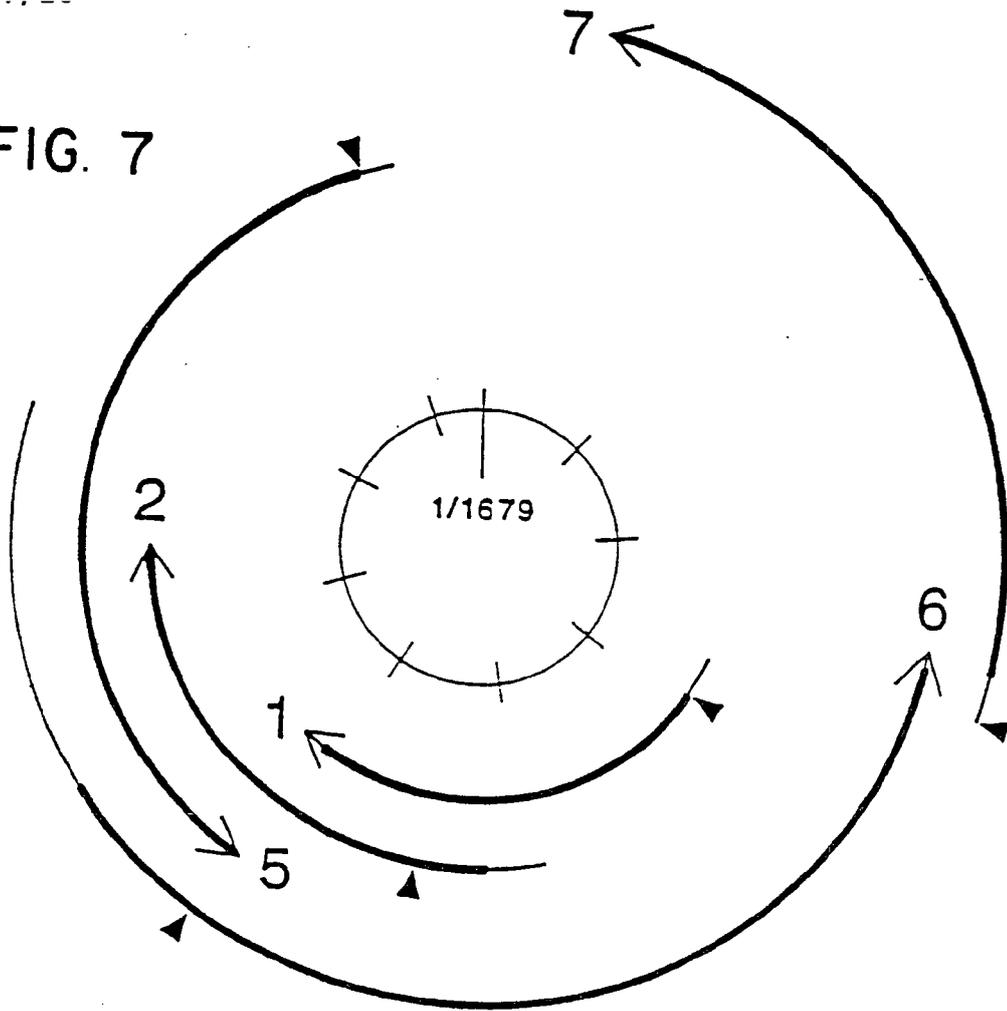


FIG. 7



orf (Leseraster)	Koordinaten von orf	Koordinaten des exprimierten Bereichs
1 (2)	539 - 1033	578 - 1014
2 (1)	786 - 1253	834 - 1253
5 (1)	1619 - 1014	1598 - 1014
6 (3)	1341 - 478	1110 - 485
7 (1)	506 - 63	481 - 63

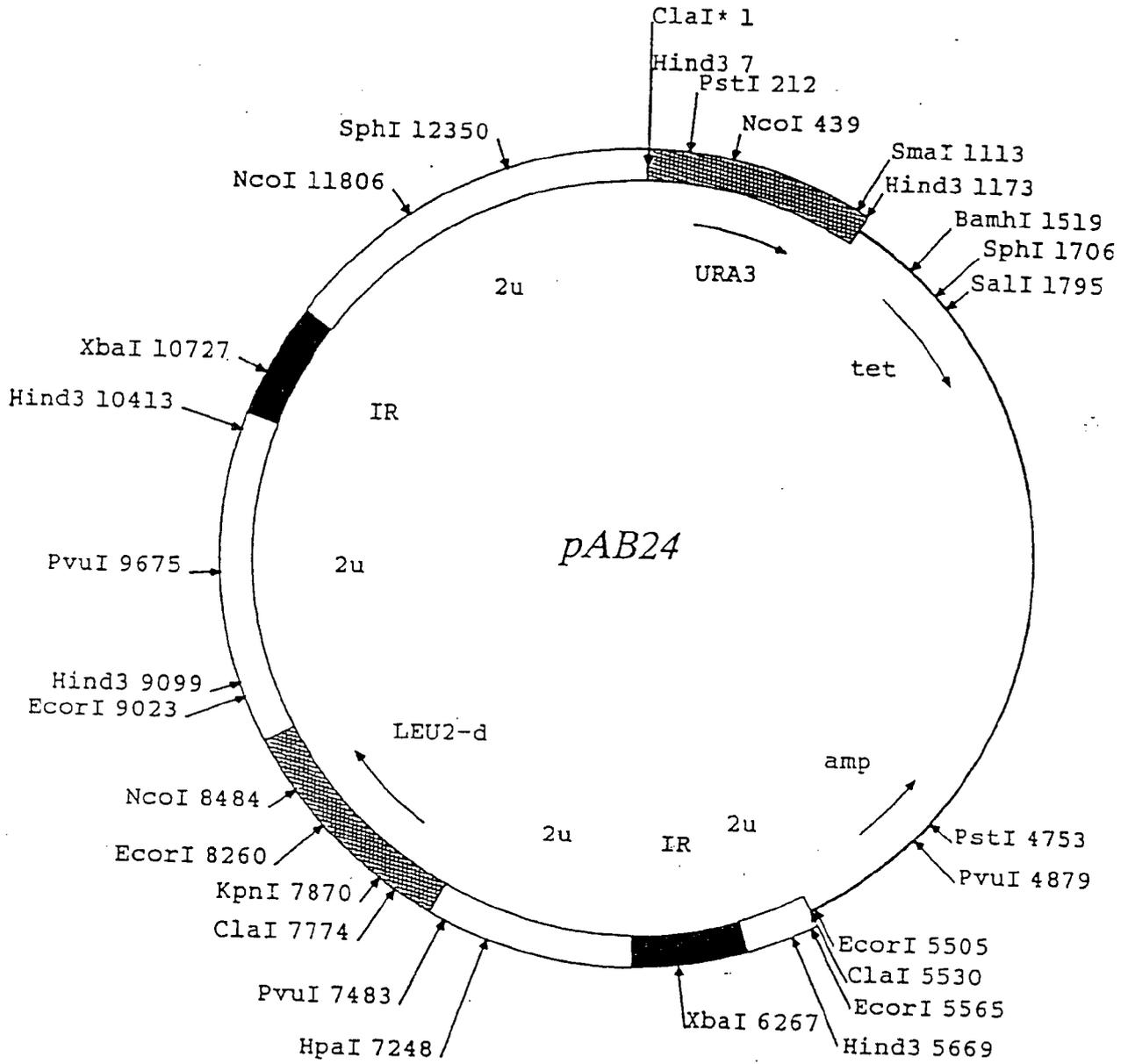


FIG. 9

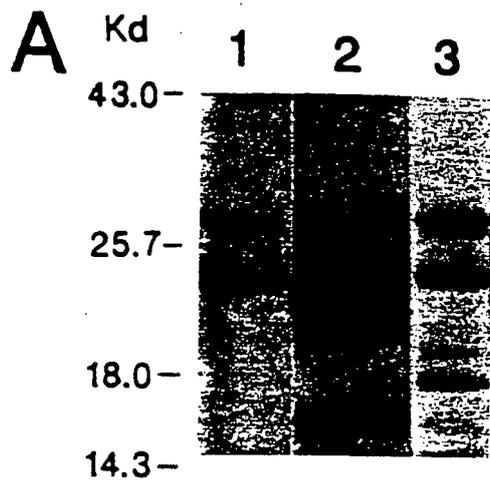


FIG. 10

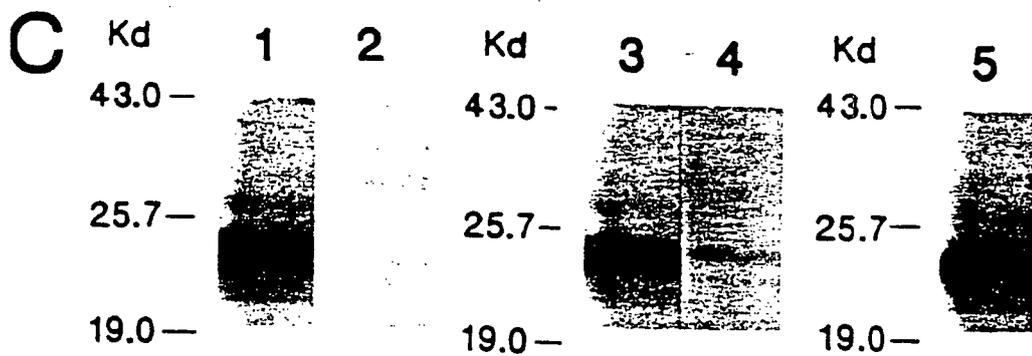
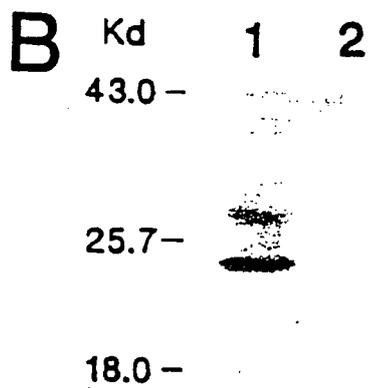


FIG. II



**B**



**A**