(12) **PATENT**

(19) NO (11) **321185** (13) **B1**

NORGE (51) Int Cl.
G01N 33/576 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19950006	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1993.07.02 PCT/US93/06309
(22)	Inng.dag	1995.01.02	(85)	Videreføringsdag	1995.01.02
(24)	Løpedag	1993.07.02	(30)	Prioritet	1992.07.07, US, 910759
(41)	Alm.tilgj	1995.02.24			
(45)	Meddelt	2006.04.03			

(73) Innehaver Chiron Corp, 4560 Horton Street, CA94608-2916 EMERYVILLE, US
(72) Oppfinner David Y Chien, 1121 Douglas Court, CA94507 ALAMO, US
(74) Fullmektig Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, NO

(54) Benevnelse **In vitro fremgangsmåte for deteksjon av antistoffer som oppstår relativt tidlig i løpet av infeksjonsforløpet i en kroppsdel hos en mammalsk vert mot hepatitt C virus (HCV), samt et sett for anvendelse i nevnte fremgangsmåte.**

(56) Anførte publikasjoner EP 468657 A2, GB 2239245 A, US 4855224, WO 91 15516 A2, WO 91 15574 A1

(57) Sammendrag

Immunoanalysemetoder som anvender HCV kappe antigener som inneholder konformasjonelle epitoper som er reaktive med antistoffer i serum fra infiserte individer er nyttige for screening og diagnostikk. Disse antigenene detekterer antistoffer som ikke blir detektert av denaturerte HCV kappe antigener. Disse HCV kappe antigenen som omfatter konformasjonelle epitoper er mere immunologisk reaktive enn mange andre HCV antigener. Dette er det første beviset på at konformasjonelle epitoper kan være involvert i den immunologiske responsen til HCV antigener.

Foreliggende oppfinnelse vedrører materialer og metoder for å behjelpe spredning av hepatitt C virus (HCV) infeksjon. Den vedrører spesielt polypeptider som er nyttige immunologiske reagenser for deteksjon av HCV-infeksjoner, samt immunoanalysesett.

HCV ble først identifisert og karakterisert som den primære årsaken til post transfusjon non-A, non-B hepatitt (NANBH) av Houghton et al. I tillegg til å tilveiebringe vesentlig informasjon vedrørende HCV har Hoyghton et al. beskrives et antall generelle og spesifikke immunologiske reagenser og metoder. Se for eksempel Houghton et al., EPO Pub. No. 318,216; Houghton et al., EPO Pub. No. 388,232; Choo et al., Science (1989) 244:359-362; Kuo et al., Science (1989) 244:362-364; Takeuchi et al., J. Gen. Virol. (1990) 71:3027-3033; Takeuchi et al., Gene (1990) 91:287-291; Takeuchi et al., Nucl. Acids. Res. (1990) 18:4626; Miymura et al. Proc. natl. Acad. Sci. USA (1990) 87: 983-987; Saito et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1990) 87: 6547-6549 Choo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991) 88: 2451-2455; Han et al., Proc. NAtl. Acad. Sci. USA 88 1711-1715; Houhton et al., Hepatology (1991) 14:381-388; Weiner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89: 3468-3472. Disse publikasjonene tilveiebringer en omfattende bakgrunn på HCV generelt, samt fremstilling og anvendelse av HCV polypeptid immunologiske reagenser. Beskrivelsene av disse publikasjonene er spesielt innkorporert heri som referanse.

Andre har anvendt arbeidet til Houghton et al. se for eksempel Highfield et al., UK Pat App. 2,239,245 (The Welcome Foundation Ltd.): Wang, EPO Pub. No. 442,394 (United Biomedical Inc.); Leung et al., EPO Pub. No. 445,423 (Abbott Laboratories=; Habits et al., EPO Pub. No. 451.891 (Akzo N.V.); Reyes et al., PCT Pub No. WO 91/15516 (Genelabs Inc.): Maki et al., EPO Pub. No. 468,657 (Tonen Corp.); og kamada et al., EPO Pub. No. 469,348 (Shionogi Seiyaku K.K.). Se også matsuura et al., (1992) J. Virology 66: 1425; Kato et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1990) 87: 9524-9528: Takamizawa et al., J. Virol. (1991) 65: 1105-1113); Chiba et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991) 88 4641-4645; Harada et al., J. Virol. (1990) 65: 3051-3021; Hijikata et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991) 88: 5547-5551: Okamoto et al., Jpn. J. Exp. Med. (1990) 60: 167-177; Yuasa et al., J. Gen. Virol. (1991) 72: 2021-2024; Watanabe et al., Int. J. Cancer (1991) 48: 340-343.

Sensitive, spesifikke metoder for screening og identifisering av bærer av HCV og HCV-kontaminert blod eller blodprodukter er et viktig fremskritt innen medisin. Post-transfusjonshepatitt (PTH) oppstår i omtrent 10% av transfuserte pasienter, og HCV har stått for opptil 90% av disse tilfellene. Hovedproblemet i denne sykdommen er at den

ofte blir til kronisk leverskade (25-55%) relativt til andre hepatitter, så som type B.

Pasientbehandling samt forhindring av overføring av HCV fra blod og blodprodukter eller ved nære personlig kontakt krever pålitelige diagnostiske og prognostiske medikamenter, så som HCV polypeptider, for å detektere antistoffer relatert til HCV. Slike polypeptider er også nyttige som vaksiner og immunterapeutiske terapeutiske midler for forhindring og/eller behandling av sykdommen. På grunn av at HCV er et relativt nytt agens eksisterer det et behov for å definere ytterligere immunologiske reagenser som vil muliggjøre ytterligere studier av det kliniske forløpet til sykdommen og epidemiologien til HCV i populasjonen.

Søkerne har utført ytterligere serologiske studier på HCV antigener og har oppdaget at immunanalyser ved anvendelse av HCV kappe antigener som opprettholder konformasjonelle epitoper er mer effektive for detektering av anti-HCV antistoffer enn de som anvender samme antigener med lineære epitoper.

Et aspekt ifølge oppfinnelsen er følgelig en fremgangsmåte for detektering av antistoffer mot hepatitt C virus (HCV) i en kroppskomponent fra pattedyr antatt å inneholde nevnte antistoffer omfattende kontakting av nevnte kroppskomponent med et HCV antigen omfattende en konformasjonell epitope fra EI eller E2 domenen til HCV under betingelser som muliggjør en immunologisk reaksjon mellom antistoffene (om noen) og antigenet, og detektering av tilstedeværelse av immunkomplekser (om noen) av nevnte antistoffer og nevnte antigener.

I andre utførelsesformer blir antigenene kodet i E1 og/eller E2 domenene eller er E1 og/eller E2 antigener. I noen utførelsesformer kan antigenene bli uttrykt fra Vaccinia vektorer, eller bli uttrykt i CHO celler. I visse utførelsesformer av oppfinnelsen er et annet antigen bestående av en annen konformasjonell epitope innbefattet.

Oppfinnelsen muliggjør en fremgangsmåte for screening av blodkomponenter eller blod for HCV før anvendelse av et slikt blod eller blodkomponent for å danne blodprodukter omfattende:

a. reagering av en kroppskomponent fra en potensiell donor med et HCV antigen omfattende en konformasjonell epitope fra E1 eller E2 domenene til HCV under betingelser som muliggjør en immunologisk reaksjon mellom antistoffene i kroppskomponenten (om noen) og antigenet;

b. detektering av komplekser dannet mellom antigenet og antistoffene, om

noen; og

c. fjerning av eventuelle blod eller blodkomponenter fra nevnte donor, dersom nevnte komplekser blir detektert i trinn b.

Et ytterligere aspekt av oppfinnelsen er et sett for detektering av HCV antistoffer omfattende et HCV antigen bestående av en konformasjonell epitope fra E1 eller E2 domenene til HCV, og kontrollstandarder, pakket i egnede beholdere og instruksjoner for anvendelse av sett komponentene.

Figur 1 viser de antatte domenene til HCV polyproteinet.
Figur 2 viser noen trekk ved vektoren, pSC59.
Figurene 3A, 3B og 3C viser prosentandel av gruppe I, II og III pasienter som er reaktive i ELISA analyser mot individuelle HCV antigener.

"HCV antigen" refererer til en polypeptid eller polypeptidanalog (for eksempel mimitoper) omfattende en aminosyresekvens (og/eller aminosyreanaloger) som definerer minst en HCV epitope. Sekvenser som definerer epitopen tilsvarer aminosyresekvensen til et HCV protein (enten identisk eller via substitusjon av analoger av det native aminosyreresidiet som ikke ødelegger epitopen). Generelt vil den epitope-definerende sekvensen ha lengder på 5 eller flere aminosyrer, mer vanlig er 8 eller flere aminosyrer i lengde, og ytterligere mer vanlig er 10 eller flere aminosyrer i lengde. Med hensyn til konformajonelle epitoper kan lengden på den epitopedefinerende sekvensen bli utsatt for store variasjoner på grunn av at det antas at disse epitopene blir dannet fra den tredimensjonale formen til antigenet (for eksempel folding). Aminosyrer som definerer epitopen kan være relativt få i antall, men meget dispergert langs lengden av molekylet (og til og med på forskjellige molekyler når det gjelder dimerer osv.), som blir brakt i viktig epitope konformasjon via folding. Delene av antigenet mellom residiene som definerer epitopen behøver ikke å være kritisk for den konformasjonelle strukturen til epitopen. Delesjon eller substitusjon av disse mellomliggende sekvensene behøver for eksempel ikke å påvirke den konformasjonelle epitopen dersom sekvensene som er kritiske for epitopekonformasjonen blir opprettholdt (for eksempel cysteiner involvert i disulfidbinding, glykosyleringsseter osv.).

HCV antigener omfatter konformasjonelle epitoper fra E1 og/eller E2 (kappe) domenene til HCV. E1 domenen som antas å tilsvare det virale kappeproteinet, antas nå å dekke aminosyrene 192-383 av HCV polyproteinet (PCT Pub. No. WO91/15771,

figur 1). Ved ekspresjon i et CHO system (glykosylert) antas det å ha en omtrentlig molekylvekt på 35 Kd bestemt via SDS-PAGE. E2 proteinet, tidligere betegnet NS1, antas å dekke aminosyrene 384-800 av polyproteinet og også være et kappeprotein. Ved ekspresjon i et CHO system (glykosylert) antas det å ha en tilsynelatende gelmolekylvekt på omtrent 72 Kd. Det er kjent at disse protein endepunktene er omtrentlige (for eksempel karboksyterminalen til E2 bør ligge et sted i 750-820 aminosyreregionen). Det er også å bemerke at prototypeisolat HCV1 sekvensen i ovennevnte PCT søknad er sitert bare for å illustrere, og et hvilket som helst HCV isolat (se for eksempel referansene sitert i bakgrunnsseksjonen) er en egnet kilde for E1 og/eller E2 sekvensen for utførelse av foreliggende oppfinnelse.

E1 og E2 antigenene anvendt i foreliggende oppfinnelse kan være fullengde virale proteiner, vesentlig full-lengde versjoner derav, eller funksjonelle fragmenter derav (for eksempel fragmenter som ikke mangler sekvenser som er vesentlige for dannelsen eller retensjonen av en konformasjonell epitope). HCV antigenene kan videre også innbefatte andre sekvenser som ikke blokkerer eller forhindrer dannelsen av den konformasjonelle epitopen av interesse. Tilstedeværelse eller fravær av en konformasjonell epitope kan lett bli bestemt ved screening av antigenet av interesse med et antistoff (polyklonalt serum eller monoklonalt for den konformasjonelle epitopen) og sammenligning av reaktiviteten med den til en denaturert versjon av antigenet som bare har beholdt lineære epitoper (om noen). Ved slike screeninger ved anvendelse av polyklonale antistoffer kan det være fordelaktig å adsorbere det polyklonale serumet først med det denaturerte antigenet og se om det beholder antistoffer mot antigenet av interesse.

HCV antigener kan bli dannet ifølge en hvilken som helst hensiktsmessig fremgangsmåte som tilveiebringer den konformasjonelle epitopen av interesse. For eksempel er rekombinant ekspresjon i pattedyr eller insektceller en foretrukket metode for å tilveiebringe utskilte glykosylerte E1 og/eller E2 antigener i "nativ konformasjon". Det kan derimot også være mulig, som kjent for proteiner, å uttrykke antigenene i andre rekombinante verter og renaturere proteinet etter isolering derav. Det er også kjent at kjemisk syntese kan tilveiebringe konformasjonelle antigen mimitoper som kryss-ragerer med det native antigenets konformasjonelle epitope.

Komplekser av E1 og/eller E2 (også betegnet aggregater) inneholdende mere enn en E1 eller E2 monomer er også foretrukne antigener. E1:E1 dimerer, E2:E2 dimerer og E1:E2 heterodimerer er alle antigener innenfor rammen av denne oppfinnelsen. Aggregater kan også innbefatte store former og kan ha molekylvekter i overskudd av 800 kD.

"Fusjonspolypeptidet" angir et polypeptid hvor HCV antigen(ene) er del av en enkelt kontinuerlig kjede av aminosyrer, i det kjeden ikke oppstår i naturen. HCV antigener kan bli koblet direkte til hverandre ved peptidbindinger eller bli separert med mellomliggende aminosyresekvenser. Fusjonspolypeptidene kan også inneholde aminosyresekvenser som er eksogene for HCV.

"Vanlig fast matrise" angir et fast legeme hvortil individuelle HCV antigener eller fusjonspolypeptidet bestående av HCV antigener blir bundet kovalent eller ved hjelp av ikke-kovalente midler så som hydrofobisk adsorpsjon.

"Kroppskomponent" angir et fluid eller vev fra et pattedyr (for eksempel en antropoid, et menneske) som vanligvis inneholder antistoffer produsert av individet. Slike komponenter er kjent innenfor fagområdet og innbefatter, uten begrensning, blod, plasma, serum, spinalfluid, lymfefluid, sekresjoner fra respiratorisk, tarm eller genital-urinkanaler, tårer, spytt, melk, hvite blodceller og myelomer. Kroppskomponenter innbefatter biologiske væsker. Betegnelsen "biologisk væske refererer til et fluid oppnådd fra en organisme. Noen biologiske væsker blir anvendt som en kilde for andre produkter, så som koaguleringsfaktorer (for eksempel faktor VIII:C), serumalbumin, veksthormon og lignende. I slike tilfeller er det viktig at kilden fra biologisk fluid er fri for kontaminering med virus så som HCV.

"Immunologisk reaktive" betyr at antigenet vil reagere spesifikt med anti-HCV antistoffer til stede i en kroppskomponent fra et HCV infisert individ.

"Immunkompleks" angir kombinasjonen dannet når et antistoff blir bundet til en epitope på et antigen.

"E1" som anvendt heri refererer til et protein eller polypeptid uttrykt innenfor de første 400 aminosyrene til et HCV polyprotein, noen ganger referert til som E eller S protein. I dets naturlige form er det et 35 kD glykoprotein som blir funnet sterkt assosiert med membraner. I de fleste naturlige HCV stammene blir E1 proteinet kodet i det virale polyproteinet etter C (kjerne) proteinet. E1 proteinet utgår fra omtrent aminosyre (aa) 192 til omtrent aa 383 av full-lengde polyproteinet. Betegnelsen "E1" som anvendt heri innbefatter også analoger og forkortede former som er immunologisk kryssreaktive med naturlig E1.

"E2" som anvendt heri refererer til et protein eller polypeptid uttrykt innenfor de første 900 aminosyrene av et HCV polyprotein, noen ganger referert til som NS1 protein. I dets naturlige form er det et 72 kD glykoprotein som finnes i sterk assosiasjon med membranen. I mest naturlige HCV stammer blir E2 proteinet kodet i det virale polyproteinet etter E1 proteinet. E2 proteinet utgår fra omtrent aa 384 til omtrent aa 820. Betegnelsen "E2" som anvendt heri innbefatter også analoger og forkortede former som er immunologisk kryssreaktive med naturlig E2.

Betegnelsen "aggregat" som anvendt heri refererer til et kompleks av E1 og/eller E2 inneholdende mer enn en E1 eller E2 monomer. E1:E1 dimerer, E2:E2 dimerer og E1:E2 heterodimerer eller alle "aggregater" innenfor rammen av denne definisjonen. Aggregater kan også innbefatte store former, og kan ha molekylvekter i overskudd av 800 kD.

Betegnelsen "renset" som anvendt for proteiner heri refererer til en sammensetning hvor det ønskede proteinet omfatter minst 35% av den totale proteinkomponenten i sammensetningen..Det ønskede proteinet omfatter fortrinnsvis minst 40%, mer foretrukket er minst omtrent 50%, mer foretrukket er minst omtrent 60% og ytterligere mer foretrukket er minst omtrent 70%, enda mer foretrukket er minst omtrent 80%, enda mer foretrukket er minst omtrent 90%, og mest foretrukket er minst omtrent 95% av den totale proteinkomponenten. Sammensetningen kan inneholde andre forbindelser så som karbohydrater, salter, lipider, oppløsningsmidler og lignende, uten å påvirke bestemmelsen av prosentandel renhet som anvendt heri. Et "isolert " HCV protein angir en HCV proteinsammensetning som har en renhet på minst 35%.

Betegnelsen "isolert polypeptid" refererer til et polypeptid som er blitt vesentlig fri fra andre HCV virale komponenter, spesielt genomiske HCV polynukleotid. En polypeptidsammensetning er "vesentlig fri" for en annen komponent dersom vekten av polypeptidet i sammensetningen er minst 70% av vekten til polypeptidet og annen komponent kombinert, fortrinnsvis minst omtrent 89%, ytterligere mer foretrukket er omtrent 90% og mest foretrukket er 95% eller høyere.

Immunoanalysemetodene ifølge oppfinnelsen anvender HCV antigener fra E1 og E2 domenene og som opprettholder konformasjonelle epitoper som blir gjenkjent av antistoffene i sera til individer infisert HCV. Hvert antigen har minst en konformasjonell epitope som eksisterer i den naturlig forekommende HCV partikkelen eller infisert produkt derav, som vist ved immunreaktiviteten til antigenet med anti-

stoffene i en kroppskomponent fra et HCV infisert individ, og et tap av epitopens immunreaktivitet ved denaturering av antigenet. Lengden på antigenet er tilstrekkelig for å opprettholde en immunreaktiv konformasjonell epitope assosiert med den epitopen. Det hører inn under rammen av oppfinnelsen å ha mer enn en konformasjonell epitope på et antigen. De native kappeantigenene anvendt i immunoanalysene kan ofte være i nesten full lengde, men kan være forkortet for eksempel å øke oppløseligheten eller for å forbedre utskillelsen (for eksempel delesjon av membran bindende domener). Det hører også inn under rammen av oppfinnelsen å anvende enten enkelte antigener, eller kombinasjoner eller aggregater av antigener. Immunoanalysene kan dermed anvende E1 epitoper, E2 epitoper, aggregater eller kombinasjoner av native E1 og E2. Det blir også betraktet innenfor rammen av denne oppfinnelsen å anvende antigener med lineære epitoper i kombinasjon med HCV kappe konformasjonelle epitoper.

Fremgangsmåter for detektering av tilstedeværelse av konformasjonelle epitoper er kjent innenfor fagområdet og er illustrert i eksemplene nedenfor.

Basert på antatte aminosyrer som blir kodet i nukleotidsekvensen til HCV1 og andre bevis utgjør mulige proteindomener av det kodede HCV polyproteinet, samt omtrentlige grenser følgende:

Antatt domene	Omtrentlig grense aminosyre nr.
C (nukleokapsid protein)	1-191
E1 (virus kappe protein)	192-383
E2/NS1 (kappe?)	384-800
NS2	800-1050
NS3 (protease?)	1050-1650
NS4	1651-2100
NS5 (polymerase)	2100-3011 (end.)

Disse domenene er derimot tentative. For eksempel er E1-NS2 grensen sannsynligvis i 750-810 regionen, og NS3-NS4 grensen er ved omtrent 1640-1650. Det er også mye som tyder på at 191 aa versjonen av C er en forløper som blir ytterligere bearbeidet (for eksempel til omtrent 170 aa i lengde), og at NS2, NS4 og NS5 proteinene blir hver ytterligere bearbeidet til to modne proteiner. Forholdet mellom domenene er illustrert i figur 1.

Fremgangsmåter for preparering av E1 og E2 antigenene inkludert de med native konformasjoner er beskrevet i Spaete R., et al., Virology (1992) 188:819-830, og i WO92/08734, som er inkorporert heri som referanse. Vertscellene blir valgt slik at de vil muliggjøre dannelsen av native konformasjonelle epitoper innenfor de uttrykte kappeproteinene; disse vertscellene kan for eksempel innbefatte dyreceller, insektsceller, gjærceller og lignende.

Eukaryote verter innbefatter gjær og pattedyrceller i kultursystemer. Saccharomyces cerevisia og Saccharomyces carlsbergensis er de mest vanlige anvendte gjærverter, og er hensiktsmessige soppverter. Gjærkompatible vektorer inneholdende markører som muliggjør seleksjon av vellykkede transformanter ved å gi prototrofi til auxotrofe mutanter eller resistens overfor tungmetaller på villtype stammer. Gjærkompatible vektorer kan anvende to mikronreplikasjonsorigo (Broach et al. (1983) Meth. Enz. 101:307.), kombinasjonen av CEN3 og ARS1 eller andre metoder for å forsikre replikasjon, så som sekvenser som vil resultere i inkorporering av et hensiktsmessig fragment inn i vertscellegenomet. Kontrollsekvenser for gjærvektorer er kjent innenfor fagområdet og innbefatter promotere for syntese av glykolytiske enzymer (Hess et al. (1968) J. Adv. Enzyme Reg 7:149; Holland et al. (1978) Biochemistry 17:4900), inkludert promoteren for 3 fosfoglyceratkinase (Hitzeman (1980) J. Biol. Chem. 255:2073). Terminatorer kan også bli innbefattet, så som de som er avledet fra enolase genet (Holland (1981) J. Biol. Chem. 256: 1385). Spesielt nyttige kontrollsystemer er de som omfatter glyceraldehyd-3 fosfatdehydrogenase (GAPDH) promoteren eller alkoholdehydrogenase (ADH) regulerbar promoter, terminatorer også avledet fra GAPDH, og om sekresjon er ønskelig, ledersekvensen fra gjær alfa faktoren. I tillegg kan den transkripsjonelle regulatoriske regionen og den transkripsjonelle initieringsregionen som er operabelt koblet være slik at de ikke er naturlig assosiert i villtype organismen. Disse systemene er beskrevet i detalj i EPO 120,551, publisert oktober 3, 1984; EPO 116,201, publisert august 22, 1984; og EPO 164,556, publisert desember 18, 1985, alle er til oppfinneren heri og er herved inkorporert som referanse.

Pattedyrcellelinjer tilgjengelige som verter for ekspresjon er kjent innenfor fagområdet og innbefatter mange udødeliggjorte cellelinjer tilgjengelig fra American Type Culture Collection (ATCC), inkludert HeLa celler, kinesisk hamster ovarie (CHO) celler, baby hamster nyre (BHK) celler og et antall andre cellelinjer. Egnede promotere for pattedyrceller er også kjent innenfor fagområdet og innbefatter virale promotere så som fra Simian Virus 40 (SV40) (Fiers (1978) Nature 273:113), Rous sarcoma virus (RSV), adenovirus (ADV) og bovint papillomavirus (BPV). Pattedyreceller kan også kreve

terminatorsekvenser og poly A addisjonssekvenserM enhancer sekvenser som øker ekspresjonen kan også bli innbefattet, og sekvenser som forårsaker amplifikasjon av genet kan også være ønskelig. Disse sekvensene er kjent innenfor fagområdet. Vektorer egnede for replikasjon i pattedyrceller er kjent innenfor fagområdet og kan innbefatte virale replikoner, eller sekvenser som forsikrer integrasjon av hensiktsmessige sekvenser som koder for NANBV epitoper i vertsgenomet.

En vektor som blir anvendt for å uttrykke fremmed DNA, og som kan bli anvendt i dannelsen av vaksine er Vaccinia virus. I dette tilfellet er det heterologe DNA skutt inn i Vaccinia genomet. Teknikker for innskudd av fremmed DNA inn i Vaccinia virusgenomet er kjent innenfor fagområdet og anvender for eksempel homolog rekombinasjon. Innskudd av heterologt DNA er generelt inn i et gen som er ikke-essensielt av natur, for eksempel, thymidin genet (tk), som også tilveiebringer en selekterbar markør. Plasmidvektorer som letter konstruksjonen av rekombinante viruser er blitt beskrevet (se for eksempel, Mackett et al. (19849 J. Virol. 49:857., Chakrabarti et al. (1985) Mol. Cell. BIol. 6:3403; Moss (1987) i GENE TRANSFER VECTORS FOR MAMMALIAN CELLS (Miller and Calos, eds., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.), s 10). Ekspresjon av HCV polypeptidet oppstår deretter i celler eller individer som blir immunisert med levende rekombinant Vaccinia virus.

Segmentet av HCV cDNA som koder for den ønskede sekvensen, blir skutt inn i en Vaccinia vektor. Den polypeptidkodende sekvensen kan bli koblet til en ledersekvens. Ledersekvensen kan være den for vevsplasminogen aktivator (TPA), eller fra en annen kilde, for eksempel fra beta-globin. Heterologt polynukleotid kan bli skutt inn i en Vaccinia virus som er en modifisert versjon av pSC11 på grunn av tilsetning av en polylinkersekvens som inneholder et kloningssete.

For å detektere om HCV polypeptidet blir uttrykt fra Vaccinia vektoren kan BSC 1 celler bli infisert med rekombinant vektor og dyrket på mikroskopobjekt glass under betingelser som muliggjør ekspresjon. Cellene kan deretter bli aceton-fikserte og immunofluorescensanalyser utført ved anvendelse av serum som er kjent for å inneholde anti-HCV antistoffer mot et polypeptid (er) som blir kodet i regionen til HCV genomet hvorfra HCV segmentet i den rekombinante ekspresjonsvektoren var avledet fra.

Andre systemer for ekspresjon av eukaryote eller virale genomer innbefatter insektsceller og vektorer egnede for anvendelse i disse cellene. Disse systemene er kjent

innenfor fagområdet og omfatter for eksempel insektsekspresjonstransfer vektorer avledet fra baculovirus Autographa californica nuclear polyhedrosis virus (AcNPV), som er en hjelper-uavhengig, viral uttrykkende vektor. Ekspresjonsvektorer avledet fra dette systemet anvender vanligvis den sterke virale polyhedrin genpromoteren for å drive ekspresjonen av heterologe gener. Den mest vanlige anvendte transfer vektor for innføring av fremmede gener inn i AcNPV i er pAc373. Mange andre vektorer, kjent for fagfolk innenfor dette området, er også blitt konstruert for forbedret ekspresjon. Disse innbefatter for eksempel pVL985 (som endrer polyhedrin startkodonet fra ATG til ATT, og som innfører et BamHI kloningssete 32 basepar nedstrøms fra ATT; se Luckow og Summers (1989) Virology 17:31). God ekspresjon av ikke-koblede fremmede proteiner krever vanligvis fremmede gener som ideelt sett har en kort ledersekvens inneholdende egnede translasjonsinitieringssignaler foran et ATG startsignal. Plasmidet inneholder også polyhedrinpolyadenyleringssignalet og ampicillin-resistens (amp) genet og replikasjonsorigo for seleksjon og propagering i E. coli.

Fremgangsmåter for innføring av heterologt DNA inn i det ønskede setet i baculovius er kjent innenfor fagområdet. (Se Summer og Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555; Ju et al. (1987); Smith et al. (1983) Mol & Cell Biol. 3:2156-2165; og Luckow og Summers (1989) Virology 17:31). Innskuddet kan for eksempel utføres i et gen så som polyhedringenet, ved homolog kombinasjon; innskudd kan også bli utført inn i et restriksjonsenzymsete plassert inn i det ønskede baculovirusgenet. De innskutte sekvensene kan være de som koder for alle eller varierende segmenter av polyproteinet, eller andre orfs som koder for virale polypeptider.

Signaler for post-translasjonelle modifikasjoner, så som signalpeptidspaltning, proteolytisk spaltning og fosforylering, ser ut til å bli gjenkjent av insektsceller. Signaler nødvendig for sekresjon og nukleær akkumulering ser også ut til å være konservert mellom celler fra virveldyr og virvelløse dyr. Eksempler på signalsekvenser fra celler fra virveldyr, som er effektive i celler fra virvelløse dyr er kjent innenfor fagområdet, for eksempel humant interleukin-2 signal ($IL\text{-}2_S$) som er et signal for transport ut av cellen, er gjenkjent og blir viktig fjernet i insektsceller.

Immunoanalyseformater

Foreliggende oppfinnelse omfatter en in-vitro fremgangsmåte for deteksjon av antistoffer som oppstår relativt tidlig i løpet av infeksjonsløpet i en kroppsdel hos en mammalsk vert mot hepatitt C virus (HCV), kjennetegnet ved at

(a) nevnte kroppsdel mistenkt å inneholde antistoffer mot HCV bringes i kontakt med (1) et HCV-antigen valgt fra et antigen kodet i E1-domenet av et HCV-genom, E2 domene av et HCV genom eller aggregater derav, hvor nevnte HCV-antigen renses under ikke-denaturerende betingelser eller (2) en standard kontroll under betingelser som muliggjør en immunologisk reaksjon; og

(b) tilstedeværelsen av immunkomplekser av nevnte antistoffer og nevnte antigen detekteres, hvor fraværet av nevnte immunkomplekser inneholdende standardkontrollen og tilstedeværelsen av nevnte immunkomplekser inneholdende nevnte HCV-antigen indikerer serokonversjon til HCV.

HCV E1 og E2 antigenene kan bli anvendt i omtrent et hvilket som helst analyseformat som anvender et kjent antigen for å detektere antistoffet. Formater som denaturerer HCV konformasjonell epitope av interesse bør bli unngått eller modifisert. Et vanlig trekk ved alle disse analysene er at antigenet blir kontaktet med kroppskomponenten som antas å inneholde HCV antistoffer under betingelser som muliggjør at antigener blir bundet til slike antistoffer til stede i komponenten. Slike tilstander vil vanligvis være fysiologisk temperatur, pH og ionestyrke ved anvendelse av et overskudd antigen. Inkubasjon av antigenet med prøven bli etterfulgt av deteksjon av immunkomplekser bestående av antigenet.

Konstruksjon av immunoanalyser blir utsatt for en stor del variasjon og mange formater er kjent innenfor fagområdet. Protokoller kan for eksempel anvende faste bærere, eller immunopresipitering. De fleste analysene involverer anvendelse av merket antistoff eller polypeptid. Markørene kan for eksempel være enzymatiske, fluorescens, kjemiluminescens, radioaktive eller fargestoffmolekyler. Analyser som amplifiserer signalene fra immunkomplekset er også kjent. Eksempler på dette er analyser som anvender biotin og avidin, og enzymmerkede og formidlede immunoanalyser, så som ELISA analyser.

Immunoanalysen kan uten begrensning være i et heterogent eller i et homogent format, og være en standard eller konkurrerende type. I et heterogent format blir polypeptidet vanligvis bundet til en fast matrise eller bærer for å lette separeringen av prøven fra polypeptidet etter inkubasjon. Eksempler på faste bærere som kan bli anvendt er nitro-cellulose (for eksempel i membran eller mikrotiterbrønnform), polyklorid (for eksempel i lag eller mikrotiterbrønner), polystyrenlateks (for eksempel i kuler eller mikrotiterplater, polyvinylfluorid (kjent som Immunlon), diazotisert papir,

nylonmembraner, aktiverte kuler og protein A kuler. For eksempel kab Dynatech Immunlon 1 eller Immunlon 2 mikrotiterskåler eller 0.63 cm polystyren kuler (Precision Plastic Balls) kan bli anvendt i heterogent format. Den faste bæreren inneholdende de antigeniske polypeptidene blir vanligvis vasket etter separering derav fra testprøven og før deteksjon av bundne antistoffer. Både standard og konkurrerende formater er kjent innenfor fagområdet.

I et homogent format blir testprøven inkubert med kombinasjon av antigener i oppløsning. Det kan for eksempel være under betingelser som vil presipitere antigen-antistoffkomplekser som er dannet. Både standard og konkurrerende formater for disse analysene er kjent innenfor fagområdet.

I et standardformat blir mengden av HCV antistoffer i antistoff-antigenkompleksene direkte registrert. Dette kan bli oppnådd ved å bestemme om merkede anti-xenogene (for eksempel anti-humane) antistoffer som gjenkjenner en epitope på anti-HCV antistoffer vil bli bundet forårsaket av kompleksdannelsen. I et konkurrerende format blir mengden av HCV antistoffer i prøven avledet ved registrering av den konkurrerende effekten på bindingen av en kjent mengde merket antistoff (eller annen konkurrerende ligand) i komplekset.

Komplekser som blir dannet omfattende anti-HCV antistoff (eller når det gjelder konkurrerende analyser, mengden av konkurrerende antistoff) blir detektert ved hvilke som helst av de mange kjente teknikkene, avhengig av formatet. For eksempel kan umerkede HCV antistoffer i komplekset bli detektert ved anvendelse av et konjugat av antixenogenisk Ig kompleksbundet med en markør (for eksempel en enzymmarkør).

I et immunopresipiterings- eller agglutineringsanalyseformat danner reaksjonen mellom HCV antigener og antistoffet et nettverk som presipiterer fra oppløsningen eller suspensjonen og danner et synlig lag eller en film av presipitatet. Dersom anti-HCV antistoff ikke er til stede i testprøven blir det ikke dannet synlig presipitat.

Det eksisterer for tiden tre spesifikke typer av partikkel agglutinerings (PA) analyser. Disse analysene blir anvendt for detektering av antistoffer mot forskjellige antigener når belagt på en bærer. En type av denne analysen er hemaglutineringsanalysen ved anvendelse av røde blodceller (RBC_s) som blir sensibilisert ved passiv adsorbering av antigen (eller antistoff) til RBC. Tilsetning av spesifikke antigenantistoffer til stede i kroppskomponenten forårsaker at RBC belagt med renset antigen agglutinerer.

For å eliminere potensielle uspesifikke reaksjoner i hemaglutineringsanalysen kan to kunstige bærere bli anvendt i stedet for RBC i PA. Den mest vanlige av disse er lateks-partikler. Gelatinpartikler kan dermed også bli anvendt. Analysene som anvender hvilke som helst av disse bærerne er basert på passiv agglutinering av partikler belagt med rensede antigener.

HCV E1 og E2 antigenene bestående av konformasjonelle epitoper vil vanligvis bli pakket i form av et sett for anvendelse i disse immunoanalysene. Settet vil normalt inneholde i separate beholdere det native HCV antigenet, kontrollantistoff formuleringer (positive og/eller negative), merket antistoff når analyseformatet krever samme eller signaldannende reagenser (for eksempel enzymsubstratet) dersom markøren ikke danner et signal direkte. Nativt HCV antigen kan allerede være bundet til en fast matrise eller separere med reagenset for binding av det til matrisen. Instruksjoner (for eksempel skrevne, bånd, CD-ROM osv.) for å utføre analysen vil vanligvis bli innbefattet i settet.

Immunoanalyser som anvender det native HCV antigenet er nyttig ved screening av blod for preparering av en mengde hvorfra potensielle infektive HCV mangler. Fremgangsmåte for preparering av blodtilførselen omfatter følgende trinn. Reagering av en kroppskomponent, fortrinnsvis blod eller en blodkomponent, fra det individuelle donerende blodet med nativ HCV E1 eller nativ HCC E2 antigen for å muliggjøre en immunologisk reaksjon mellom HCV antistoffer, om noen, og HCV antigenet. Detektering om anti-HCV antistoff-HCV antigenkomplekser blir dannet som et resultat av reageringen. Blod bidrar til blodtilførselen er fra donorer som ikke utviser antistoffer mot native HCV antigener, E1 eller E2.

Når det gjelder en positiv reaktivitet mot HCV antigenet, er det foretrukket å gjenta immunoanalysen for å minske muligheten av falske positiver. I stor skala screening av blod for produksjon av blodprodukter (for eksempel blodtransfusjon, plasma, faktor VIII, immunoglobulin osv.) blir screeningstester vanligvis oppstilt for å øke sensitiviteten (for å forsikre at kontaminert blod ikke anvendes) på bekostning av spesifisiteten, dvs. den falske-positive raten blir øket. Det er derfor vanlig bare å overdra for ytterligere testing de donorene som er "repiterende reaktive", dvs. positive i to eller flere kjøringer av immunoanalysen på den donerte prøven.

Oppfinnelsen omfatter også et sett for anvendelse i fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, kjennetegnet ved at nevnte sett omfatter nevnte HCV-

antigen og kontrollstandard pakket i egnede beholdere og instruksjon for anvendelse av settdelene.

Følgende eksempler illustrerer oppfinnelsen og skal ikke begrense denne.

Eksempel 1
Konstruksjon av PSC59 poly

HCV sekvensen anvendt for konstruksjon ble isolert fra plasmid pC5P-1 og et StuI del/BglII fragment. Dette fragmentet rager fra første methionin av HCV-1 polyproteinet til asparaginsyre i posisjon 966. Domenene som er innbefattet er nukleokapsidet, C, begge antatte kappeglukoproteiner, E1 og E2, og en forkortet form av NS2. I tillegg inneholder fragmentet også omtrent 60 bp som tilsvarer den delen av den 5' utranslaterte regionen av HCV genomet.

Fragmentet ble behandlet med Klenow polymerase for å danne butte ender, og deretter klonet i StuI setet av en vaccinia vektor, PSC59 (oppnådd fra Dr. B. Moss ved National Institues of Health, Bethesda, Md). Vektoren er vist i figur 2. Som et resultat av ligering inn i polylinkersekvensen til vektoren inneholder C'-terminusen til NS2 regionen en ytterligere Pro-Tyr-sekvens.

Eksempel 2
Preparering av lagre av Vacciniavirus kodende for HCV polyproteinfragment inkludert E1 og E2

Screening for rekombinant Vaccinia virus ble utført vesentlig som beskrevet av Mackett et al. i DNA Coming, Vol. II (Ed. D. M. Glover, IRL Press, Oxford, England, 1985, s. 191-211. Et konfluent monolag (6 cm skål) av afrikanske grønne apenyreceller, BC40, ble infisert med villtype vaccinia virus (WR stamme) ved en multiplisitet ved infeksjon (MOI) på 0.05. Etter 2 timer inkubasjon ved 37°C ble cellene transfektert med 25 μg PSC59 poly DNA ved anvendelse av kalsiumfosfat metoden. Etter 4 timers inkubasjon ble mediet skiftet til normalt medium og cellene ble inkubert i ytterligere 48 timer ved 37°C. Cellene ble isolert ved skraping av disse fra skålen, og virus ble frigjort med tre sykluser fryse-tørking, og frigjort virus i cellelysatet ble lagret ved -80°C.

For å screene for rekombinant virus ble et konfluent monolag av humane 143 TK^- celler infisert i 2 timer med cellelysatet i 10-ganger seriefortynninger. Etter fjerning av

inokulumet ble 1% agarose i serummedium inneholdende 25 µg/ml 5-bromdeoksyuridin tilsatt, og cellene ble inkubert i 72 timer ved 37°C. Plaque ble visualisert ved belegging av cellelaget med 1% agarose pluss 0.01% nøytral rød og inkubering av cellene over natt ved 37°C. Agaroselaget ble deretter forsiktig fjernet, og cellelaget ble blottet med et master nitrocellulosefilter (Schleir og Schuell, BA85, 0.45 µm). En replikaplate av masterfilteret ble dannet og probet med en ^{32}P-merket hybridiseringsprobe til HCV sekvensen. Positive plaque ble isolert fra masterfilteret, plassert i 0,5 ml serumfritt medium og sonikert to ganger i 30 sekunder. Screeningsprosessen ble gjentatt to ganger for å plaquerense viruset.

For å propagere rekombinant vacciniavirus ble 10 skåler (150 cm^2) BSC40 celler infisert med det virale lageret ved en MOI på 0.5. Infeksjonen ble utført i 2 timer ved 37°C og det virale lageret ble erstattet med friskt medium. Etter 72 timer ble cellene høstet, suspendert i 10 mM Tris HCl, pH 9.0 og homogenisert i en "Wheaton dounce tissue" maler. Celledebris ble fjernet ved sentrifugering, supernatantene ble trypsinert og sonikert, og alikvoter av de virale suspensjonene ble lagret ved -80°C.

Eksempel 3
Produksjon av E1/E2 antigener

En liter Hela S3 spinnerceller ble dyrket i en spinner flaske til en tetthet på 10^6 celler pr. ml. Cellene ble infisert med rekombinant vaccinia virus kodende for HCV polyprotein-fragmentet ved anvendelse av en MOI på 1.0, inkubering over natt, høstet og lagret som en cellepellet ved -80°C.

E1/E2 ekspresjonsproduktet ble renset ved lysering av cellene i hypotonisk buffer etterfulgt av ekstrahering i en buffer inneholdende ikke-ionisk detergent. Det cellulære ekstraktet ble kromatografert gjennom en lectin (GNA) agarosekolonne. Ønskede proteiner ble eluert fra kolonnen med metyl-α-D-mannopyranosid (Sigma Corp.). Eluerte fraksjoner ble registrert for E1 og E2 ved Western blot ved anvendelse av et spesifikt antiserum dannet mot E1 eller E2. Fraksjoner inneholdende antigenene ble slått sammen og konsentrert på en S-sepharosekolonne (Pharmacia). Renheten til sluttproduktet var omtrent 70%.

Eksempel 5
Anvendelse av E1/E2 for immunoanalyser

Pasienter

Serumprøver ble oppnådd fra tilfeldig valgte betalte plasmadonorer fra østre, vestre, midtvestre og sydligere stater i U.S.A. oppnådd fra Uniglobe Research Corporation (Reseda, ICA). Serumprøver gitt av H. Tong (Huntington Memorial Hospital at Pasadena, California), ble oppnådd fra en gruppe på 38 pasienter med transfusjonsassosiert kronisk NANBH og en annen gruppe på 39 pasienter med IV medikamentbrukere med kronisk NANBH. Disse 77 pasientene hadde ingen andre leversykdommer, var anti-HAV og anti-Hbsag ikke-reaktive og anti-nukleære antistoffer (ANA) var normale. Tre transfusjonsassosierte HCV serokonversjonspaneler ble oppnådd fra H. Alter (the National Institutes of Health, Bethesda, Maryland) og Serologicals Incorporation at Clarkston, Georgia. Akutte oppnådde HCV prøver ble gitt fra Max von Petlenkofer-Institute, University of Munich, Munich, Germany. 19 tilfeller av akutt oppløst NANBH ble diagnostisert basert på leverpiopsi og normale alaninaminotransferase (ALT) nivåer i løpet av langtidsoppfølgingsstudier (2-11 år).

Ekspresjon og rensing av rekombinante HCV antigener

C22 (119aa), E1 (130aa), E2 (251aa), NS5 (942aa) og chimerisk C25 (også betegnet c200/c22)(858aa) antigener ble uttrykt som indre antigener innenfor gjær, S. cerevisiae, som C-terminale fusjoner med human superoksid dismutase (SOD) ved anvendelse av metoder tidligere beskrevet av Kuo, G. et al., Science (1989) 244:362-364 og Cousens L., et al., Gene (1987) 61:265-272. C33C antigen (266aa) ble uttrykt som et indre sådd fusjonspolypeptid i E. coli ved anvendelse av metoder beskrevet tidligere for syntese av 5-1-1 antigen (se PCT WO89/046699; EPO pub. nr. 318,216; Houghton et al., Science 244:359 (1989), som er innkorporert heri som referanse. Etter celleoppbrudd og sentrifugering ble uoppløselig sådd fusjonspolypeptider ekstrahert fra cellepelletene ved anvendelse av enten 5 M urea eller 1% SDS og renset ved anvendelse av enten gelfiltrering eller en kombinasjon av ione-bytte kromatografi (Q- og S-sepharose) og gelfiltreringskromatografi (Sephacryl S-300 HR).

HCV nativ E1 og E2 antigen (også betegnet rVV (e1 & e2)) ble renset fra endoplasmatisk retikulum til rekombinant vaccinia virus (rvv)-infiserte celler som inneholder full-lengde HCV E1 og E2 gener. Rensing ble oppnådd ved affinitetskromatografi, etterfulgt av ionebyttekromatografi under ikke-denaturerende betingelser. Disse metodene var som beskrevet i WO92/08734, som er innkorporert heri

som referanse.

Nativt HCV E2 antigen CHO-e2 ble dannet vesentlig ifølge Spaete et al., Virology (1992) 188:819-830. Pattedyr CHO cellelinjeproduserende CHO-e2 antigen ble konstruert fra et plasmid inneholdende en HCV-1 sekvens kodende for Ala383 til Glu661. Plasmidet ble deretter transfektert inn i CHO celler for å danne en stabil linje som uttrykker fullengde E2 (også betegnet e2/ns1) antigen. Kloner som utviser høy ekspresjon ble selektert og formert i rulleflasker ved vekst i DME/H21 med 10% dialysert føtalt kalveserum og vanlige tilsetningsstoffer pluss 1.6 µM methotreksat. Kulturmedium supernatanten ble høstet og anvendt for rensing av CHO-e2 antigen. Rensningsmetoden innbefattet affinitets- og ionebyttekromatografi under ikke-denaturerende betingelser.

For å pertubere native e2 antatte konformasjonelle epitoper ble denaturert CHO-e2 dannet ved tilsetning av DL-dithiothreitol (DTT) til en endelig konsentrasjon på 10 mM, 0.2% natrium dodecylsulfat (SDS) og kokt ved 100°C i 5 minutter. Alle rensede rekombinante HCV antigener ble vurdert å ha en renhet på minst 90% ifølge SDS polyakrylamidgelanalyse og farving med Coomassie blå.

ELISA analyse

RVV(e1 & e2), CHO-e2 og denaturert CHO-e2 antigener ble fortynnet til optimal konsentrasjon i fosfatbufret saltvann (PBS) (pH7.4) og belagt på Immunlon 1 plater (Dynatech, Chantilly, FA). ELISA analysene ble utført som følger. Testprøvene på platen ble fortynnet 40-ganger i prøvefortynningsmiddel og inkubert i 1 time ved 37°C og deretter vasket med vaskebuffer. Polyklonalt geiteanti-humant IgG (H+L) antistoff konjugert til pepperrotperoksidase (HRPO) ble tilsatt i hver brønn. Platene ble inkubert i 1 time ved 37°C og deretter vasket. o-fenylendiamin 2 HCl (OPD) og hydrogenperoksid ble tilsatt for HRP fargeutvikling. Resultatene ble avlest ved anvendelse av en plateavleser ved 492/620nm. ELISA avspaltnings O.D. verdiene for antigen RVV (e1 & e2), SOD, C25, C22, C33C og ns-5 var 0.4 pluss O.D. fra gjennomsnittet av negativ kontroll. Avspaltningsverdiene til CHO-e2 og denaturert CHO-e2 var 0.3 O.D. pluss O.D. fra tilsvarende antigen negativ kontroll. Avspaltningsverdien til anti-C100-3 var 0.45 O.D. pluss gjennomsnittlig negativ kontroll O.D.

Immunoanalyse resultater Resultater av ELISA analyser ved anvendelse av antigenene beskrevet ovenfor for å detektere anti-HCV antistoffer i blodkomponentene fra USA pasientgruppene er vist i tabell 1.

TABELL 1

Utbredelse av HCV antistoffer i US pasientgruppene

gruppe	nr. pasienter	Anti-HCV Positive									
		C22	Y-e1	Y-e2	CHO-e2	rVV (e1 & e2)	C33C	C100-3	Ns5	C25	ANY
A. betalt dononer	158	29 18%	19 12%	15 9%	20 19%	30 19%	30 19%	26 17%	27 17%	32 20%	32 20%
B. Transfusjon assosierte kroniske NANBH pasienter	38	35 92%	22 58%	21 55%	36 95%	36 95%	36 95%	27 71%	28 74%	36 95%	36 95%
C. IV medikamentbruker NANBH pasienter	39	39 100%	17 44%	13 33%	39 100%	39 100%	39 100%	27 69%	32 82%	39 100%	39 100%

A. Tilfeldig selekterte betalte plasmadononer ble oppnådd fra øst, vest, midtvest og sydstatene i USA

B & C. Serumprøver var fra 70 kroniske NANB hepatitt pasienter fra Hunington Memorial Hospital at PAsadena, CA som hadde en bakgrunn med blodtransfusjoner eller IV medikamentforbruker.

Resultatene i tabell 1 illustrerer at gjærproduserte HCV kappeantigenene e1 og e2 er mye mindre immunreaktive enn rekombinante antigener produsert i Vaccinia virus, RVV (e1 & e2) og i CHO celler, CHO-e2. i hver undersøkte gruppe var reaktiviteten til gjærproduserte antigener, e1 og e2, bare 2/3 eller mindre enn det til antigener produsert i dyreceller. Det er å bemerke at gjær e1 og e2 antigenene ble produsert i gjærceller og renset under denaturerende betingelser. Det ser derfor ut som om bare lineære epitoper eksisterer i disse antigenene. I kontrast til dette ble native HCV antigener, RVV(e1 & e2) og CHO-e2 isolert fra dyrevertsceller under ikke-denaturerende betingelser som muliggjør eksistens av native konformasjonelle epitoper.

Rekombinante native HCV antigener uttrykt fra E1 og E2 gener i celler så ut til å være så immunreaktive som C33C og sannsynligvis C25, og mere immunreaktive enn noen av andre undersøkte HCV antigener. C25 er et chimerisk polyprotein bestående av deler av NS_3, NS_4 og C polypeptidene, koblet som vist i figur 1.

Rollen til konformasjonelle epitoper for stimulering av vertsimmunsystem tidligrespons ble vurdert ifølge immunoanalyse av HCV seroomdanningspaneler. Resultatene i tabell 2 viser immunreaktiviteten til native HCV kappeantigenene RVV(e1 & e2) og CHO-e2, med prøvene i tre seroomdanningspaneler. Prøvene i panelene representerer hver sekvensielle blødninger fra et individ med post-transfusjons NANBH. Som det fremgår av resultatene i tabell 2 detekterer native HCV kappeantigener, dvs. de med naturlige konformasjonelle epitoper, antistoffer som oppstår relativt tidlig i løpet av infeksjonsforløpet, sammenlignet med de som blir detektert av andre testede HCV-antigener. Disse antigenene kan derfor være spesielt anvendbare i immunoanalyser for diagnostikk av HCV-infeksjon.

TABELL 2

Sammenligning av CHO-e2, rVV (e1 & e2) og multi-antigen ELISA på HCV seromdanningspaneler

Prøve	tappedato	dager* fra transfusjon	CHO-e2 ELISA S/CO	rVV(e1 & e2) ELISA S/CO	C22 ELISA S/CO	C33C ELISA S/CO	C100-3 ELISA S/CO	ns5 ELISA S/CO	C25 ELISA S/CO	ALT nivå 1U/L
(1) Seroomd.panel A										
A1	07/18/88	0	0.61	0.6	0.01	0.01	0.09	0.03	0.02	23
A6	08/15/88	28	0.19	0.2	0.02	0.02	0.01	0.03	0.21	39
A7	08/25/88	38	1.23	1.75	0.38	1.21	0.12	0.28	1.63	274
A8	08/29/88	42	1.97	2.28	0.42	3.52	0.07	0.32	2.83	346
A9	09/14/88	58	2.88	2.8	2.66	4.48	2.45	0.61	6.03	1175
(2) Seroomd.panel C										
C1	07/28/88	0	0.07	0.12	0.08	0.08	0.21	0.23	0.01	22
C6	08/25/88	28	0.54	0.31	0.13	0.11	0.21	0.15	0.02	53
C7	08/29/88	32	1.29	0.43	0.08	0.08	0.10	0.09	0.02	63
C8	09/01/88	35	2.25	1.29	0.26	0.28	0.18	0.13	0.32	81
C9	09/08/88	42	6.14	2.62	1.38	0.86	0.15	0.13	2.11	183
C10	09/28/88	62	7.66	3.42	5.32	4.79	1.68	0.12	6.65	563
(3) Seroomd.panel J										
J1	07/04/76	0	0.13	0.09	0.07	0.03	0.02	0.02	0.08	13
J2	07/16/76	12	0.05	0.06	0.03	0.04	0.01	0.01	0.10	56
J3	07/20/76	16	0.06	0.09	0.02	0.03	0.06	0.03	0.07	34
J4	08/02/76	29	0.07	0.14	0.06	0.10	0.08	0.07	0.06	19
J5	08/09/76	36	0.12	0.16	0.08	0.08	0.07	0.08	0.09	19
J6	08/17/76	44	0.05	0.14	0.07	0.11	0.08	0.07	0.11	23
J7	09/13/76	67	0.10	0.10	0.11	0.09	0.10	0.09	0.12	163
J8	09/13/76	71	1.03	0.64	0.62	0.21	0.07	0.07	0.68	168
J9	09/20/76	78	1.78	1.10	1.14	0.42	0.08	0.08	1.88	320
J10	09/27/76	85	2.22	2.35	2.10	0.87	0.04	0.07	3.25	660

TABELL 2 (FORTS.)

Sammenligning av CHO-e2, rVV (e1 & e2) og multi-antigen ELISA på HCV seromdanningspaneler

Prøve	tappedato	dager* fra transfusjon	CHO-e2 ELISA S/CO	rVV(e1 & e2) ELISA S/CO	C22 ELISA S/CO	C33C ELISA S/CO	C100-3 ELISA S/CO	ns5 ELISA S/CO	C25 ELISA S/CO	ALT nivå 1U/L
(4) Seroomd.panel B										
B1	07/19/88	0	0.08	0.09	0.08	0.09	0.08	0.21	0.09	11
B10	08/26/88	39	0.11	0.35	0.12	0.17	0.10	0.28	0.18	68
B11	08/30/88	43	0.06	0.48	0.63	0.15	0.08	0.27	0.48	180
B12	09/28/88	72	0.26	1.63	6.38	5.19	0.18	0.54	5.88	401
B13	11/09/88	114	0.16	2.18	4.95	5.99	4.15	8.16	6.78	72

* Verdier på oppsamlingsdato av prøvene.
S/CO: Analysesignal OD/avspaltning OD verdier

Resultatene i tabell 3 viser en sammenligning av native HCV antigener uttrykt fra E1 og E2 gener, med sammenlignbare denaturerte antigener. I tabellen ble immunreaktiviteten med serum fra pasienter med akutt oppløsende NANBH fulgt med tiden, og sammenlignet med det fra pasienter med kronisk NANBH. Som det fremgår fra tabell 3 er native HCV kappeantigener som inneholder både konformasjonelle og lineære epitoper RVV (e1 & e2) og CHO-e2 mere immunreaktive enn antigener bare inneholdende lineære epitoper, e1 og e2 (produsert i gjær), og denaturert CHO-e2. Den totale observasjonen er at immunreaktiviteten til native HCV kappeantigener blir økt mellom 8 til 9 ganger med akutt oppløsende pasienter, og omtrent to ganger med kroniske NANBH pasienter. Det ser derfor ut som om de fleste immunologiske responsene i pasienter med den oppløsende formen av NANBH er for konformasjonelle epitoper, mens det i den akutte formen blir otmrent jevnt fordelt mellom konformasjonelle og lineære epitoper.

Disse studiene tilveiebringer det første beviset på at konformasjonelle epitoper kan være involvert i vertens immunologiske respons overfor HCV.

TABELL 3

Utbredelse av anti-HCV antigener inneholdende konformasjonelle epitoper vs. antigener som bare inneholder lineære epitoper i oppløsende og kronisk NANBH

	Nr. (%) anti-HCV positive etter transfusjon			
Diagnostikk	Akutt oppløsende NANBH			Kronisk NANBH
tid etter transfusjon	0-6 måneder	6-12 måneder	>12 måneder	
HCV antigener				
C25	19/19* (100%)	19/19* (100%)	18/19* (95%)	9/9* (100%)
rVV (e1 & e2)	16/19* (84%)	17/19* (89%)	16/19* (84%)	9/9* (100%)
CHO-e2	11/19* (58%)	12/19* (63%)	13/19* (68%)	9/9* (100%)
CHO-e2 (denaturert)	1/19* (5%)	3/19* (16%)	4/19* (21%)	5/9* (56%)
e1	1/19* (5%)	1/19* (5%)	4/19* (21%)	4/9* (44%)
e2	2/19* (11%)	4/19* (21%)	4/19* (21%)	4/9* (44%)

* Nummer positive/nummer testet

** Akutt oppløsende NANBH diagnostikk basert på biopsi (stor overvekt med biopsi) og oppløsning av vedvarelse av transaminaser.

Eksempel 5

E1/E2 immunoanalyse: sammenligning av immunkompetente og immunundertrykte pasienter

Pasienter

Grupper av pasienter ble studert. Alle pasientene var negative for antistoff mot humant immunsviktvirus (HIV). Gruppe 1 besto av 20 immunkompetente pasienter med transfusjonsrelatert kroniske HCV infeksjon som ellers var friske. Alle pasientene var positive for anti-HCV og HCV RNA. Gruppe II innbefatter 15 pasienter på opprettholdt hemodialyse. 11 pasienter var anti-HCV positive ved presentasjonen, en mottok nyretransplantasjon i løpet av oppfølgingen. 4 pasienter ble anti-HCV positive i løpet av oppfølgingen. Gruppe III besto av 17 nyretransplanterte mottagere. 7 pasienter var anti-HCV og HCV RNA positive ved presentasjonen. 7 ble anti-HCV positive i løpet av oppfølgingen, 2 var opprinnelige HCV RNA alene postive. 2 pasienter var HCV RNA alene positive ved presentasjonen, begge forble HCV RNA positive, men anti-HCV negative i løpet av oppfølgingen. En pasient ble positiv for HCV RNA bare i løpet av oppfølgingen.

Sera

Serum ble samlet mellom juli 1989 og april 1992, og lagret i alikvoter ved -70°C før testingen. To til fire prøver samlet i intervaller på 6-12 måneder ble testet for pasienter i gruppe I. To prøver samlet ved et intervall på 1.6 til 2 år ble testet for alle pasienter i gruppene II og III; ytterligere prøver i den mellomliggende perioden og oppfølgingsprøvene ble også testet for pasienter som hadde forandringer i anti-HCV og/eller HCV RNA status i den andre prøven.

ELISA analyse

HCV antigener ble dannet som i eksempel 4 og anvendt i ELISA analyse som beskrevet i eksempel 4. I N e1 & e2 analysen ble falske positiver forårsaket av binding til vaccinia proteinet redusert ved (i) tilsetning av vaccinia cellelysat til prøvefortynningsmiddelet for å virke som konkurrerende antigen og (ii) anvendelse av vaccinia reaktive prøver som negative kontroller.

Resultatene er vist i figurene 3A-3C. Bare 55% av gruppe I immunkompetente pasienter reagerte overfor e1 eller e2 antigener uttrykt i gjær; men alle pasienter reagerte overfor native, glykosylerte e1 og e2 antigener uttrykt i vaccinia virus. Som i immunkompetente

pasienter var de fleste gruppe II hemodialysepasienter reaktive overfor C25, C22 og N e1 og e2 antigener. En signifikant lavere andel pasienter reagerte med C100-3, C33C, NS-5, e1 og e2. Når sammenlignet med immunkompetente pasienter reagerte betraktelig mindre gruppe III nyretransplanterte mottagere overfor alle testede HCV antigener.

Alle immunkompetente pasienter reagerte overfor C25, C22 og C33C; 90% reagerte overfor NS-5 og 80% overfor C100-3. Bare 55% reagerte overfor gjær avledede e1 og e2 antigener, men alle reagerte overfor vaccinia uttrykte N e1 og e2 antigener som indikerer at kappe-epitopene er konformasjonelle og glykosylerte. 65% - 90% av dialyse og nyretransplanterte pasienter reagerte overfor C25, C22 og N e1 og e2, men bare 12% - 60% reagerte overfor C100-3, C33C og NS-5. Reduksjon eller tap av reaktivitet overfor hepatitt C virus antigener ble observert etter nyre- og benamargstransplantasjon, i det C25 og N e1 og e2 har mindre påvirkede.

Dette tyder på at e1 og e2 epitoper er konformasjoelle, og reaktiviteten til disse epitopene blir minimalt påvirket av immunsuppresjon i forhold til andre HCV antigener.

P a t e n t k r a v

1.

In-vitro fremgangsmåte for deteksjon av antistoffer som oppstår relativt tidlig i løpet av infeksjonsløpet i en kroppsdel hos en mammalsk vert mot hepatitt C virus (HCV), k a r a k t e r i s e r t v e d at

(a) nevnte kroppsdel mistenkt å inneholde antistoffer mot HCV bringes i kontakt med (1) et HCV-antigen valgt fra et antigen kodet i E1-domenet av et HCV-genom, E2 domene av et HCV genom eller aggregater derav, hvor nevnte HCV-antigen renses under ikke-denaturerende betingelser eller (2) en standard kontroll under betingelser som muliggjør en immunologisk reaksjon; og

(b) tilstedeværelsen av immunkomplekser av nevnte antistoffer og nevnte antigen detekteres, hvor fraværet av nevnte immunkomplekser inneholdende standardkontrollen og tilstedeværelsen av nevnte immunkomplekser inneholdende nevnte HCV-antigen indikerer serokonversjon til HCV.

2.

Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at HCV-antigenet kodes innenfor E1 domenet til HCV-genomet.

3.

Fremgangsmåte ifølge krav 1 eller 2, k a r a k t e r i s e r t v e d at HCV-antigenet er E1.

4.

Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at HCV-antigenet kodes innenfor E2 domenet til HCV-genomet.

5.

Fremgangsmåte ifølge krav 1 eller 4, k a r a k t e r i s e r t v e d at HCV-antigenet er E2.

6.

Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte HCV-antigen er et E1/E2-aggregat.

7.
Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte HCV-antigen er et E1/E1-aggregat.

8.
Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte HCV-antigen er et E2/E2-aggregat.

9.
Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 8, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte HCV-antigen eller aggregat uttrykkes fra rekombinant Vaccinia-virus.

10.
Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 8, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte HCV-antigen eller aggregat uttrykkes i CHO-celler.

11.
Sett for anvendelse i fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte sett omfatter nevnte HCV-antigen og kontrollstandard pakket i egnede beholdere og instruksjon for anvendelse av settdelene.

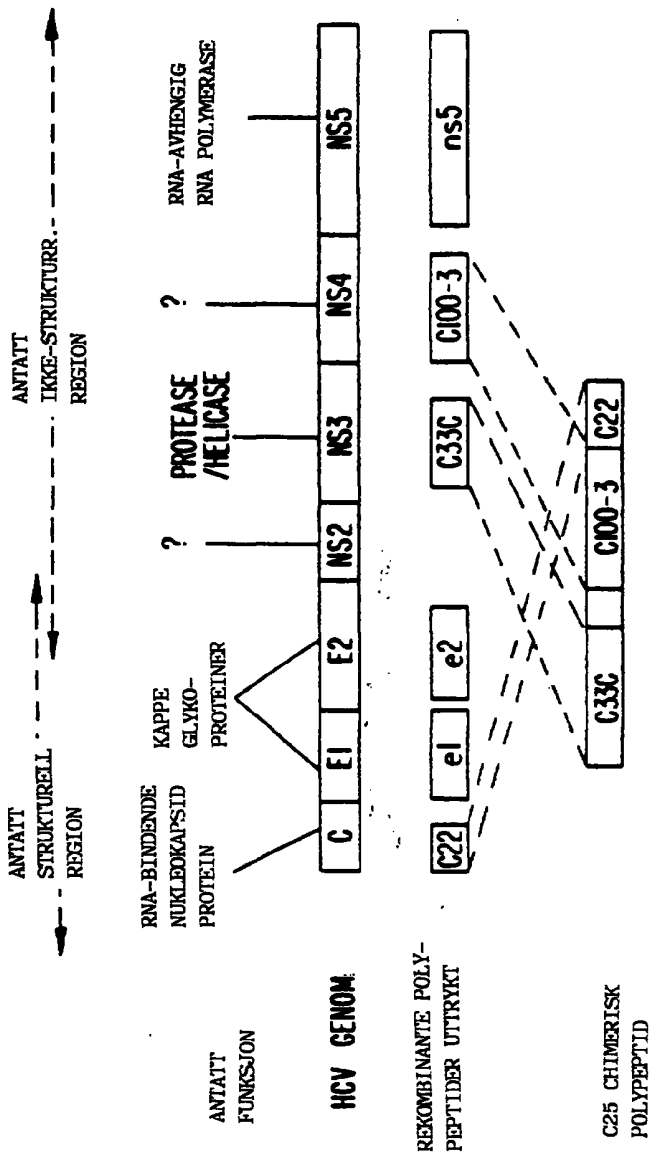
ANTATT STRUKTURELL REGION
ANTATT IKKE-STRUKTURR. REGION
RNA-BINDENDE NUKLEOKAPSID PROTEIN
KAPPE GLYKO-PROTEINER
?
PROTEASE /HELICASE
?
RNA-AVHENGIG RNA POLYMERASE
ANTATT FUNKSJON
HCV GENOM
C
E1
E2
NS2
NS3
NS4
NS5
REKOMBINANTE POLY-PEPTIDER UTTRYKT
C22
e1
e2
C33C
C100-3
ns5
C25 CHIMERISK POLYPEPTID
C33C
C100-3
C22

FIG. 1

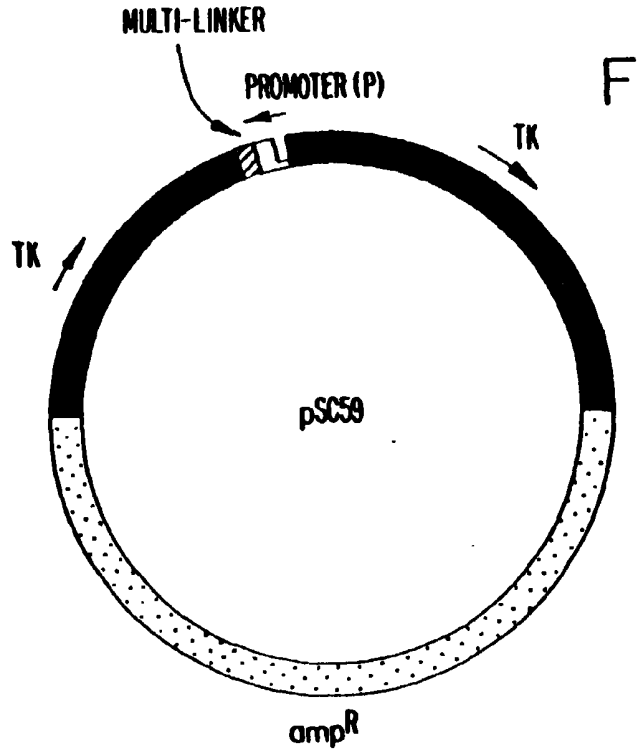

FIG. 2

Translasjon

5' vacT stop SpeI StuI EcoRI XhoI HindIII SalI BamHI 3'

TK--AGAAAAACTAGTTACTTAACTAGTAGGCCTGAATTCCTCGAG-P-AAGCTTGTCGACGGATCC--TK

VacT: Transkripsjonsterminingssignal for early vacciniavirus mRNA.

P: En syntetisk promoter på omtrent 60bp

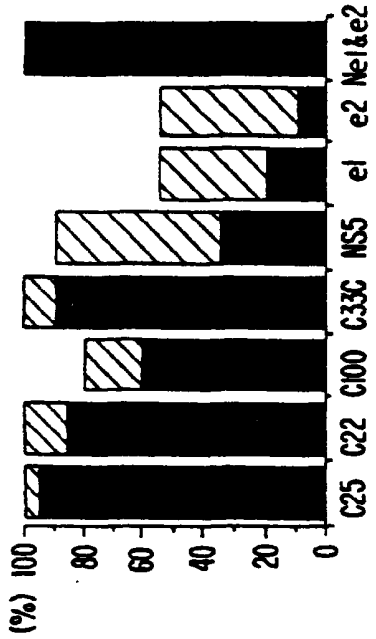

FIG. 3A

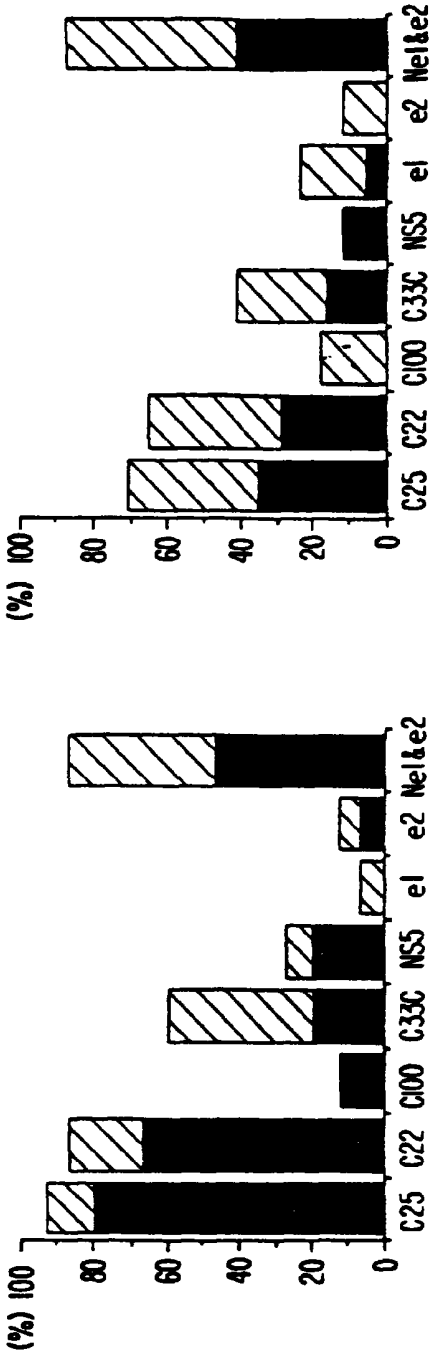

FIG. 3B

FIG. 3C