



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 694 33 160 T2** 2004.07.08

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 697 888 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **694 33 160.0**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US94/04853**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **94 915 985.9**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 94/026306**

(86) PCT-Anmeldetag: **03.05.1994**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **24.11.1994**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **28.02.1996**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **17.09.2003**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **08.07.2004**

(51) Int Cl.⁷: **A61K 39/29**

A61K 38/02, C07K 7/06, C12Q 1/70

(30) Unionspriorität:

61699 12.05.1993 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, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU,
MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**WEINER, J., Amy, Benicia, US; HOUGHTON,
Michael, Danville, US**

(54) Bezeichnung: **Konserviertes Motiv der Hepatitis C Virus E2/NS1 Region**

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

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

Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft im allgemeinen das Gebiet des Hepatitis C-Virus (HCV) und spezifischer die Entdeckung eines immunologisch wichtigen Motivs in der E2/NS1-Region.

[0002] Das Hepatitis C-Virus (HCV) wurde als das wichtigste verursachende Mittel der non-A, non-B-Hepatitis (NANBH) nach der Transfusion identifiziert. Materialien und Verfahren zur Gewinnung der genomischen viralen Sequenzen sind bekannt. Vgl. z. B. PCT-Publ. Nr. WO89/04669, WO90/11089 und WO90/14436. Für eine allgemeine Information bezüglich HCV vgl. Houghton et al. Hepatology (1991) 14: 381–388.

[0003] Die molekulare Charakterisierung des HCV-Genoms zeigt, dass es ein RNA-Molekül von positiver Polarität ist, das etwa 9.500 Nucleotide enthält, die einen langen translationalen offenen Leserahmen (ORF) enthalten, der ein großes Polypeptid von etwa 3000 Aminosäuren (aa) codieren könnte und der mit dem ersten Methionin-Codon im Rahmen beginnt. Eine hypervariable Domäne, die am Aminoende des vermutlichen Hüllglycoproteins E2/NS1 (auch E2 genannt) liegt, wurde lokalisiert, vgl. PCT-Publ. Nr. WO93/06126; Weiner et al., Virology (1991) 180: 842–848; Weiner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89: 3468–3472; Weiner et al., Vaccines 92: 303–308, Cold Spring Harbor Laboratory. In der Referenz in PNAS stellen Weiner et al. fest "Die Ergebnisse in **Fig. 1** zeigen, dass dem N-Terminus des HCV-E2-Polypeptids konservierte strukturelle Motive fehlen und er ein flexibles Ende mit geringem Strukturgehalt sein könnte".

[0004] Wie bei anderen RNA-Viren beobachtet sind HCV-Genome beträchtlich fließend, was von einer zum Irrtum neigenden Replikase und dem Fehlen von Reparaturmechanismen resultiert, die während der DNA-Replikation arbeiten. Selbst in einem einzelnen infizierten Individuum existiert das HCV-Genom nicht als eine homogene Spezies. Es existiert eher als eine quasi-Spezies-Verteilung von nahe verwandten, aber dennoch heterologen Genomen. Martell et al., J. Virol. (1992) 66: 3225–3229. Außerdem hat der Prozess der Wirtsselektion und der Adaption eines schnell mutierenden Genoms zu der Evolution vieler unterschiedlicher (aber noch ineinander fließender) HCV-Genotypen geführt. Es können mindestens vier verschiedene HCV-Genotypen gemäß dem tatsächlichen Ausmaß der Verwandtschaft bei den Nucleotid- und Aminosäure-Sequenzen voller Länge unterschieden werden, und basierend auf partiellen Sequenzen wurden zusätzliche verschiedene Genotypen identifiziert. Mori et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. (1992) 183: 334–342; Chan et al., J. Gen. Virol. (1992) 73: 1131; Cha et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89: 7144–7148.

Offenbarung der Erfindung

[0005] Die vorliegende Erfindung betrifft neue Impfstrategien für die Behandlung der HCV-Infektion und Tests für die Diagnose von HCV.

[0006] Die hypervariable Region von E2/NS1 (E2HV) zwischen etwa Aminosäure 384 und etwa Aminosäure 414 ist eine sich rasch evolvierende Region von HCV und scheint unter positiver Immunselektion zu sein. Die vorliegende Erfindung betrifft eine Consensus-Sequenz, die von der hypervariablen E2HV-Region von HCV abgeleitet ist, die ein konserviertes Motiv einschließt. Insbesondere stellt ein Aspekt der vorliegenden Erfindung ein immunogenes Polypeptid bereit, das ein 31-Mer mit der Consensus-Sequenz .T.VTGG.AARTT.G..SLF..G.SQ.IQLI ist, abgeleitet von der hypervariablen E2HV-Region von HCV, oder eine verkürzte Version davon, die das SLF..G-Motiv beibehält, oder Varianten davon, die das SLF..G-Motiv beibehalten und wobei an einer oder mehreren Aminosäurerestpositionen der Aminosäurerest durch einen anderen Aminosäurerest oder durch ein nicht natürlich vorkommendes Analog davon ersetzt ist, wobei die Immunreaktivität der verkürzten Versionen oder Varianten aufrechterhalten wird.

[0007] In einem weiteren Aspekt der Erfindung wird ein immunogenes Polypeptid der Erfindung, wie vorstehend definiert, für die Verwendung bei einem Verfahren zur Behandlung eines Individuums auf eine HCV-Infektion bereitgestellt. Es wird auch eine Zusammensetzung bereitgestellt, die ein immunogenes Polypeptid der Erfindung, wie vorstehend definiert, zusammen mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger umfaßt.

[0008] In einem anderen Aspekt dieser Erfindung wird ein Immunotest-Verfahren zum Nachweis von anti-Hepatitis C-Virus (HCV)-Antikörpern in biologischen Proben bereitgestellt, wobei das Verfahren die Schritte umfaßt: (a) Inkubation einer Antikörper enthaltenden biologischen Probe, von der angenommen wird, dass sie anti-HCV-Antikörper enthält, mit einem immunogenen Polypeptid der Erfindung, wie vorstehend beschrieben, um die Bildung eines Antikörper-Antigen-Komplexes zu ermöglichen; und (b) Nachweis, ob ein Antikörper-Antigen-Komplex gebildet wird, der das immunogene Polypeptid enthält.

Kurze Beschreibung der Abbildungen

[0009] **Fig. 1** ist ein Schema der genetischen Organisation von HCV.

[0010] **Fig. 2** zeigt die E2HV-Sequenzen für 90 HCV-Isolate.

[0011] **Fig. 3** zeigt die HCV-E2HV-Sequenzdaten von Patienten, die im Anschluß an die HCV-Infektion erhalten wurden.

[0012] **Fig. 4** zeigt den Prozentsatz der Konservierung jeder Aminosäure an den Positionen 384 bis 407 von E2HV

[0013] **Fig. 5** zeigt Balkendiagramme der Epitopkartierung, die die Bindung von Serum vom Schaf, das mit einem Peptid immunisiert worden war, das die HCV 1-E2HV-Region überspannte, mit 8-Meren zeigen, die Mitotope überlappen, die dieselbe Region überspannten.

[0014] **Fig. 6** zeigt Balkendiagramme der Epitopkartierung, die die Bindung von monoclonalen anti-Thyroxin-Antikörpern an überlappende Peptide der E2HV-Region zeigen.

[0015] **Fig. 7** zeigt Balkendiagramme der Epitopkartierung, die die Bindung von menschlichem Serumalbumin (7A), Präalbumin (7B) und TBG (7C) an überlappende Peptide der E2HV-Region zeigen.

Beste Art der Ausführung der Erfindung

A. Definitionen

[0016] Die Ausführung der vorliegenden Erfindung wird, außer anders angegeben, herkömmliche Techniken der Molekularbiologie, Mikrobiologie, rekombinanten DNA-Technik und Immunologie verwenden, die im Stand der Technik bekannt sind. Solche Techniken sind vollständig in der Literatur erklärt. Vgl. z. B. Sambrook et al., MOLECULAR CLONING; A LABORATORY MANUAL, ZWEITE AUSGABE (1989); DNA CLONING, BÄNDE I UND II (D. N. Glover, Hrsg. 1985); OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS (M. J. Gait Hrsg. 1984); NUCLEIC ACID HYBRIDIZATION (B. D. Hames & S. J. Higgins Hrsg. 1984); TRANSCRIPTION AND TRANSLATION (B. D. Hames & S. J. Higgins Hrsg. 1984); ANIMAL CELL CULTURE (R. I. Freshney Hrsg. 1986); IMMOBILIZED CELLS AND ENZYMES (IRL Press, 1986); B. Perbal, A PRACTICAL GUIDE TO MOLECULAR CLONING (1984); die Serie METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc); GENE TRANSFER VECTORS FOR MAMMALIAN CELLS (J. H. Miller und M. P. Calos Hrsg., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Methods in Enzymology Bd. 154 und Bd. 155 (Wu und Grossmann bzw. Wu, Hrsg.); Mayer und Walker, Hrsg. (1987), IMMUNOCHEMICAL METHODS IN CELL AND MOLECULAR BIOLOGY (Academic Press, London); Scopes, (1987), PROTEIN PURIFICATION: PRINCIPLES AND PRACTICE; zweite Ausgabe (Springer-Verlag, N.Y.); und HANDBOOK OF EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY, BÄNDE I-IV (D. M. Weir und C. C. Blackwell Hrsg. 1986).

[0017] Für Nucleotide und Aminosäuren werden in dieser Beschreibung die Standardabkürzungen verwendet.

[0018] Das Hepatitis C-Virus (HCV) ist eine neues Mitglied der Familie der Flaviviridae, welche die Pestiviren (Schweinepest-Virus und Rinderdurchfall-Virus) und die Flaviviren umfaßt, für die das Dengue- und Gelbfieber-Virus Beispiele sind. Ein Schema der genetischen Organisation von HCV ist in **Fig. 1** gezeigt. Ähnlich wie die Flavi- und Pestiviren scheint HCV am N-Terminus des viralen Polyproteins eine basische Polypeptiddomäne ("C") zu codieren, gefolgt von zwei Glycoproteindomänen ("E1," "E2/NS1") stromaufwärts der nicht-strukturellen Gene NS2 bis NS5. Die Aminosäurekoordinaten der vermutlichen Proteindomänen sind in Tabelle 1 gezeigt.

[0019]

Tabelle 1. Die vermutlichen Proteindomänen in HCV

Aminosäurekoordinaten (ungefähr)	Protein
1-191	C
192-383	E1
384-750	E2/NS1
751-1026	NS2
1027-1488	NS3
1489-1959	NS4
1960-3011	NS5

[0020] Weil die E1- und E2/NS1-Regionen des Genoms mutmaßliche Glycoproteine vom Hülltyp codieren, sind diese Regionen von besonderem Interesse bezüglich der Immunogenität und der Behandlung von HCV.

[0021] Die durchschnittliche Rate der Veränderung des HCV-Genoms innerhalb eines einzelnen persistierend infizierten Individuums wurde auf $1 - 2 \times 10^{-3}$ nt-Veränderungen pro Stelle pro Jahr geschätzt. Am äußersten Ende des 5'-Terminus des Gens, das den N-Terminus des E2/NS1-Glycoproteins codiert, ist jedoch eine viel höhere Rate der Veränderung. Weiner et al., FRONTIERS IN VIROLOGY: DIAGNOSIS OF HUMAN VIRUSES BY POLYMERASE CHAIN REACTION TECHNOLOGY (Springer Verlag, Heidelberg, 1992). Diese hypervariable E2-Region (E2HV), die etwa die Aminosäuren 384-414 überspannt (unter Verwendung von HCV 1 als Standard für die Nummerierung der Aminosäuren) (zuvor Region V genannt, vgl. zum Beispiel Ogata et al.,

Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991) 88: 3392–3396; Okamoto et al., Virology (1992) 188: 331–341) scheint die variabelste Region des HCV-Polypeptids zu sein und ist praktisch in jedem bisher untersuchten Isolat verschieden. Weiner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89: 3468–3472. Eine Anzahl von verschiedenen, Antikörper bindenden Epitopen wurden in dieser Region kartiert und in einem chronisch infizierten Patienten wurde das Auftreten einer E2HV-Variante dokumentiert, was nahe legt, daß in dieser E2HV-Region bei der Entwicklung des chronischen Verlaufs Escapemutanten eine große Rolle spielen könnten.

[0022] Wie hier verwendet ist eine "variable Domäne" eines viralen Proteins eine Domäne, die konsistente Muster von Aminosäurevariation zwischen mindestens HCV-Isolaten oder – Subpopulationen zeigt. Vorzugsweise enthält die Domäne mindestens ein Epitop. Variable Domänen können von Isolat zu Isolat um so wenig wie einen Aminosäureaustausch variieren. Diese Isolate können von derselben oder von verschiedenen HCV-Gruppe(n) oder -Subgruppe(n) sein. Variable Domänen können leicht durch den Sequenzvergleich zwischen den Isolaten identifiziert werden, und Beispiele dieser Techniken sind nachstehend beschrieben. Zum Zwecke der Beschreibung der vorliegenden Erfindung werden variable Domänen bezüglich der Aminosäurenummer des Polypeptids definiert, das durch das Genom von HCV 1 codiert wird, wobei dem Initiations-Methionin die Position 1 zugeschrieben wird. Die entsprechende variable Domäne in einem anderen HCV-Isolat wird durch Ausrichtung der zwei Sequenzen der Isolate auf eine Weise bestimmt, die die konservierten Domänen außerhalb jeder variablen Domäne in maximale Ausrichtung bringt. Dies kann mit jeder einer Reihe von Computer-Softwarepaketen durchgeführt werden, wie ALIGN 1.0, verfügbar bei der University of Virginia, Department of Biochemistry (Empfänger: Dr. William R. Pearson). Vgl. Pearson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85: 2444–2448. Es sollte verstanden werden, dass die Aminosäurenummern, die für eine spezielle variable Domäne angegeben werden, etwas subjektiv sind und eine Frage der Wahl. Somit sollte verstanden werden, dass der Anfang und das Ende von variablen Domänen näherungsweise sind und überlappende Domänen oder Subdomänen einschließen, außer wenn anders angegeben ist.

[0023] "Hypervariable Domänen" (HV) sind variable Domänen, die ein relativ hohes Maß an Variabilität zwischen Isolaten zeigen. Insbesondere überspannt die hypervariable Domäne von HCV-E2/NS1, hier als E2HV bezeichnet, die Aminosäuren 384–414.

[0024] Die vorliegende Erfindung verwendet eine Region innerhalb von E2HV von E2/NS1, die ein konserviertes Motiv von Aminosäuren von Aminosäure 401 bis 406 hat, die hier als das "SLF--G"-Motiv bezeichnet wird. Diese Region wurde durch eine Analyse der Sequenzen von 90 Isolaten entdeckt, die mindestens vier Genotypen von HCV umfassen.

[0025] Es ist natürlich so zu verstehen, dass die Aminosäuren durch andere Moleküle ersetzt werden können, zum Beispiel Analoge dieser Aminosäuren, so lange wie die Charakteristika des Motivs bezüglich der Immunreaktivität erhalten bleiben. Die Immunreaktivität einer antigenen Determinante im Vergleich zu der des SLF--G-Motivs ist durch einen Durchschnittsfachmann auf dem Fachgebiet unter Verwendung von Routineverfahren bestimmbar. Zum Beispiel umfassen bekannte Verfahren diejenigen, die für die Epitop-Kartierung verwendet werden, ebenso wie die kompetitive Bindung an Antikörper, die mit antigenen Determinanten, die das Motiv enthalten, immunologisch reaktiv sind (binden).

[0026] Wie hier verwendet betrifft der Ausdruck "Polypeptid" ein Polymer aus Aminosäuren und betrifft nicht eine spezifische Länge des Produkts; somit sind Peptide, Oligopeptide und Proteine von der Definition des Polypeptids umfaßt. Dieser Ausdruck betrifft auch nicht Modifikationen des Polypeptids nach der Expression oder schließt diese aus, zum Beispiel Glycosylierungen, Acetylierungen, Phosphorylierungen und dergleichen. Eingeschlossen in die Definition sind zum Beispiel Polypeptide, die ein oder mehrere Analoge einer Aminosäure enthalten (einschließlich zum Beispiel unnatürlicher Aminosäuren usw.), Polypeptide mit substituierten Verknüpfungen ebenso wie andere Modifikationen, die im Stand der Technik bekannt sind, sowohl natürlicherweise vorkommend als auch nicht natürlicherweise vorkommend.

[0027] Polypeptide, die bei der Herstellung der Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung von Nutzen sind, können rekombinant, synthetisch oder in Gewebekultur hergestellt werden. Rekombinante Polypeptide, die aus den verkürzten HCV-Sequenzen oder HCV-Proteinen voller Länge bestehen, können vollständig aus HCV-Sequenzen (ein oder mehr Epitope, zusammenhängend oder nicht zusammenhängend) oder Sequenzen in einem Fusionsprotein aufgebaut werden. In Fusionsproteinen umfassen nützliche heterologe Sequenzen Sequenzen, die die Sekretion aus einem rekombinanten Wirt bereitstellen, die immunologische Aktivität des HCV-Epitops/der HCV-Epitope erhöhen oder die Kupplung des Polypeptids an ein Stützmaterial oder einen Impfstoffträger erleichtern. Vgl. z. B. EPO-Offenlegungsnummer 116,201; U.S.-Pat. Nr. 4,722,840; EPO-Offenlegungsnummer 259,149; U.S.-Pat. Nr. 4,629,783.

[0028] Ein bedeutender Vorteil der Produktion des Proteins mittels rekombinanter DNA-Techniken statt durch Isolierung und Reinigung eines Proteins aus natürlichen Quellen ist, dass äquivalente Mengen des Proteins unter Verwendung von weniger Ausgangsmaterial produziert werden können, als für die Isolierung des Proteins aus natürlichen Quellen erforderlich wären. Die Produktion des Proteins mittels rekombinanter Techniken erlaubt auch, dass das Protein in der Abwesenheit von einigen Molekülen isoliert wird, die normalerweise in Zellen vorhanden sind. In der Tat können leicht Proteinzusammensetzungen produziert werden, die völlig frei

sind von jeder Spur menschlicher Proteinverunreinigungen, weil das einzige menschliche Protein, das von dem rekombinanten, nicht menschlichen Wirt produziert wird, das fragliche rekombinante Protein ist. Potentielle virale Agentien aus natürlichen Quellen und virale Komponenten, die pathogen für Menschen sind, werden auch vermieden.

[0029] Polypeptide, die von dem SLF--G-Motiv umfaßt werden, können mittels chemischer Synthese hergestellt werden. Verfahren für die Herstellung von Polypeptiden durch chemische Synthese sind im Stand der Technik bekannt. Das Protein kann zur Herstellung von Antikörpern verwendet werden. Ein "Antikörper" ist jedes Immunglobulin, einschließlich Antikörpern und Fragmenten davon (einschließlich F(ab), F(ab')₂ und Fv), das ein spezifisches Epitop bindet. Der Ausdruck umfaßt unter anderem polyclonale, monoclonale, einzelkettige und chimäre Antikörper. Beispiele für chimäre Antikörper werden in den U.S.-Patenten Nr. 4,816,397 und 4,816,567 diskutiert.

[0030] Ein Polypeptid oder eine Aminosäuresequenz, "abgeleitet von" einer vorgegeben Nucleinsäuresequenz betrifft ein Polypeptid, das eine Aminosäuresequenz hat, die identisch ist zu dem Polypeptid, das von der Sequenz codiert wird, oder ein Teil davon, wobei der Teil aus mindestens 3-5 Aminosäuren besteht, und mehr bevorzugt aus mindestens 8-10 Aminosäuren, und noch mehr bevorzugt aus mindestens 11-15 Aminosäuren, oder das mit einem Polypeptid, das von der Sequenz codiert wird, immunologisch identifizierbar ist. Dieser Ausdruck umfaßt auch ein Polypeptid, das von einer vorgegebenen Nucleinsäuresequenz exprimiert wird.

[0031] Der Ausdruck "rekombinantes Polynucleotid", wie hier verwendet, betrifft ein Polynucleotid von genomischem, cDNA-, semisynthetischem oder synthetischem Ursprung, das wegen seines Ursprungs oder Manipulation: (1) nicht mit dem gesamten oder einem Teil des Polynucleotids assoziiert ist, mit dem es in der Natur assoziiert ist, (2) mit einem anderen Polynucleotid verknüpft, als es in der Natur verknüpft ist, oder (3) nicht in der Natur vorkommt.

[0032] Der Ausdruck "Polynucleotid", wie hier verwendet, betrifft eine polymere Form von Nucleotiden jeder Länge, entweder Ribonucleotide oder Desoxyribonucleotide. Dieser Ausdruck betrifft nur die Primärstruktur des Moleküls. Somit umfaßt dieser Ausdruck doppel- und einzelsträngige DNA und RNA. Er umfaßt auch bekannte Arten an Modifikationen, zum Beispiel Markierungen, die im Stand der Technik bekannt sind, Methylierung, "Kappenstrukturen", Substitutionen von einem oder mehreren der natürlicherweise vorkommenden Nucleotide mit einem Analog, Internucleotid-Modifikationen wie zum Beispiel diejenigen mit nicht geladenen Verknüpfungen (z. B. Methylphosphonate, Phosphotriester, Phosphoamidate, Carbamate, usw.) und mit geladenen Verknüpfungen (z. B. Phosphorthioate, Phosphordithioate, usw.), diejenigen, die anhängende Gruppen enthalten, wie zum Beispiel Proteine (einschließlich zum Beispiel Nucleasen, Toxine, Antikörper, Signalpeptide, poly-L-Lysin, usw.), diejenigen mit Interkalatoren (z. B. Acridin, Psoralen, usw.), diejenigen, die Chelatoren enthalten (z. B. Metalle, radioaktive Metalle, Bor, oxidative Metalle, usw.), diejenigen, die Alkylatoren enthalten, diejenigen mit modifizierten Verknüpfungen (z. B. alpha-anomere Nucleinsäuren, usw.) ebenso wie nicht modifizierte Formen des Polynucleotids.

[0033] Ein "Replicon" ist jedes genetische Element, z. B. ein Plasmid, ein Chromosom, ein Virus, ein Cosmid usw., das sich wie eine autonome Einheit der Polynucleotid-Replikation innerhalb einer Zelle verhält; d. h. zur Replikation unter seiner eigenen Kontrolle in der Lage ist. Dies kann selektierbare Marker einschließen.

[0034] Ein "Vektor" ist ein Replicon, bei dem ein anderes Polynucleotidsegment angeheftet ist, um die Replikation und/oder Expression des angehefteten Segments zu bewirken.

[0035] "Kontrollsequenz" betrifft Polynucleotidsequenzen, die notwendig sind, um die Expression von codierenden Sequenzen zu bewirken, mit denen sie ligiert sind. Die Natur solcher Kontrollsequenzen differiert in Abhängigkeit vom Wirtsorganismus; in Prokaryonten umfassen solche Kontrollsequenzen im allgemeinen Promotor, ribosomale Bindungsstelle und Transkriptions-Terminationssequenz; in Eukaryonten umfassen solche Kontrollsequenzen im allgemeinen Promotoren und Transkriptions-Terminationssequenz. Der Ausdruck "Kontrollsequenzen" ist so gemeint, dass er mindestens alle Komponenten umfaßt, deren Gegenwart für die Expression erforderlich ist, und kann auch zusätzliche Komponenten umfassen, deren Gegenwart vorteilhaft ist, zum Beispiel Leadersequenzen und Fusionspartnersequenzen. Ein "Promotor" ist eine Nucleotidsequenz, die aus Consensussequenzen besteht, die die Bindung von RNA-Polymerase an die DNA-Matrize auf eine Weise zulassen, dass die mRNA-Produktion an der normalen Transkriptions-Initiationsstelle für das anschließende Struktugen initiiert wird.

[0036] "Operativ verknüpft" betrifft eine benachbarte Position, worin die so beschriebenen Komponenten in einer Beziehung stehen, die ihnen gestattet, in der beabsichtigten Weise zu funktionieren. Eine mit einer codierenden Sequenz "operativ verknüpfte" Kontrollsequenz ist auf eine Weise ligiert, dass die Expression der codierenden Sequenz unter Bedingungen erreicht wird, die mit den Kontrollsequenzen kompatibel sind.

[0037] Ein "offener Leserahmen" (ORF) ist eine Region einer Polynucleotidsequenz, die ein Polypeptid codiert; diese Region kann einen Teil einer codierenden Sequenz darstellen oder eine gesamte codierende Sequenz.

[0038] Eine "codierende Sequenz" ist eine Polynucleotidsequenz, die in ein Polypeptid übersetzt wird, übli-

cherweise über mRNA, wenn sie unter die Kontrolle geeigneter regulatorischer Sequenzen gestellt wird. Die Grenzen der codierenden Sequenz werden durch ein Translations-Startcodon am 5'-Terminus und ein Translations-Stopcodon am 3'-Terminus bestimmt. Eine codierende Sequenz kann cDNA und rekombinante Polynucleotidsequenzen umfassen, ist aber nicht beschränkt darauf.

[0039] "PCR" betrifft die Technik der Polymerase-Kettenreaktion, wie beschrieben in Saiki et al., Nature (1986) 324: 163; Scharf et al., Science (1986) 233: 1076–1078; U.S. Patent Nr. 4,683,195; und U.S. Patent Nr. 4,683,202.

[0040] Wie hier verwendet, ist x "heterolog" bezüglich y, wenn x nicht natürlicherweise mit y in identischer Art assoziiert ist; d. h. x ist mit y in der Natur nicht assoziiert oder nicht auf dieselbe Weise, wie sie in der Natur gefunden wird.

[0041] "Homologie" betrifft ein Maß an Ähnlichkeit zwischen x und y. Homologie zwischen zwei Polynucleotidsequenzen kann mittels Techniken bestimmt werden, die im Stand der Technik bekannt sind. Zum Beispiel kann sie durch einen direkten Vergleich der Sequenzinformation des Polynucleotids bestimmt werden. In einer anderen Ausführungsform kann die Homologie durch Hybridisierung der Polynucleotide unter Bedingungen bestimmt werden, die stabile Duplexmoleküle zwischen homologen Regionen bilden (zum Beispiel solchen, die vor dem S₁-Verdau verwendet würden), gefolgt vom Verdau mit einer Einzelstrang-spezifischen Nuclease/Einzelstrang-spezifischen Nucleasen, gefolgt von Größenbestimmung der verdauten Fragmente.

[0042] "Rekombinante Wirtszellen", "Wirtszellen", "Zellen", "Zellkulturen" und andere solche Ausdrücke betreffen zum Beispiel Mikroorganismen, Insektenzellen und Säugerzellen, die als Empfänger für rekombinante Vektoren und andere Transfer-DNA verwendet werden können oder verwendet wurden und umfassen die Nachkommen der ursprünglichen Zelle, die transformiert wurde. Es sollte verstanden werden, dass die Nachkommen einer einzelnen Elternzelle wegen natürlicher, zufälliger oder vorsätzlicher Mutation nicht notwendigerweise in der Morphologie oder dem genomischen oder gesamten DNA-Komplement zu dem ursprünglichen Vorläufer vollständig identisch sein müssen. Beispiele für Säugerwirtszellen umfassen Eierstockzellen vom chinesischen Hamster (CHO) und Affennierenzellen (COS).

[0043] Wie hier verwendet, betrifft "Zelllinie" spezifisch eine Population von Zellen, die in vitro zu kontinuierlichem oder verlängertem Wachstum in der Lage ist. Oft sind Zelllinien clonale Populationen, die von einer einzelnen Vorläuferzelle abgeleitet sind. Es ist weiterhin im Stand der Technik bekannt, dass während der Lagerung oder der Übertragung solcher clonalen Populationen spontane oder induzierte Veränderungen in dem Karyotypen auftreten können. Deshalb müssen Zellen, die von der Bezugzelllinie abgeleitet sind, nicht präzise identisch mit den ursprünglichen Zellen oder Kulturen sein, und die Bezugzelllinie umfaßt solche Varianten. Der Ausdruck "Zelllinie" umfaßt auch immortalisierte Zellen. Vorzugsweise umfassen Zelllinien nicht hybride Zellen oder Hybridome von nur zwei Zellarten.

[0044] Wie hier verwendet umfaßt der Ausdruck "Mikroorganismus" prokaryontische und eukaryontische mikrobielle Arten wie Bakterien und Pilze, wobei die letzteren Hefe und filamentöse Pilze umfassen.

[0045] "Transformation" betrifft die Insertion eines exogenen Polynucleotids in eine Wirtszelle, unabhängig von dem Verfahren, das für die Insertion verwendet wird, zum Beispiel direkte Aufnahme, Transduktion, f-Paarung oder Elektroporation. Das exogene Polynucleotid kann als nicht integrierter Vektor erhalten werden, zum Beispiel ein Plasmid, oder kann alternativ in das Wirtsgenom integriert werden.

[0046] Mit "genomisch" ist eine Sammlung oder Bibliothek von DNA-Molekülen gemeint, die von Restriktionsfragmenten abgeleitet sind, die in Vektoren cloniert wurden. Dies kann das gesamte oder einen Teil des genetischen Materials eines Organismus umfassen.

[0047] Mit "cDNA" ist eine komplementäre mRNA-Sequenz gemeint, die mit einem komplementären Strang mRNA hybridisiert.

[0048] Wenn es ein Polypeptid oder eine Nucleotidsequenz betrifft, ist mit "gereinigt" oder "isoliert" gemeint, dass das fragliche Molekül im Wesentlichen in der Abwesenheit von anderen biologischen Makromolekülen desselben Typs vorhanden ist. Der Ausdruck "gereinigt", wie hier verwendet, bedeutet vorzugsweise, dass mindestens 75 Gew.-%, mehr bevorzugt mindestens 85 Gew.-%, noch mehr bevorzugt mindestens 95 Gew.-% und am meisten bevorzugt mindestens 98 Gew.-% an biologischen Makromolekülen desselben Typs vorhanden sind (aber Wasser, Puffer und andere kleine Moleküle, insbesondere Moleküle, die ein Molekulargewicht von unter 1000 haben, können anwesend sein).

[0049] Wie hier verwendet, ist ein "Epitop" eine einzelne antigene Determinante, die eine Struktur hat, die komplementär ist zu der Erkennungsstelle auf einem Lymphocytenrezeptor oder einem Antikörper. Funktionell wird es in einem Standardtest mittels der Fähigkeit eines Antigens getestet, an einen Antikörper zu binden. Im allgemeinen umfaßt ein Epitop mindestens 3 bis 5 Aminosäuren. Manchmal können Epitope größer sein, z. B. 6, 7, 8, 9 oder 10 Aminosäuren.

[0050] Ein Epitop oder eine antigene Determinante ist das Äquivalent eines anderen Epitops oder einer anderen antigenen Determinante in einem vorgegebenen Polypeptid, wenn es mit Antikörpern kreuzreagiert, die immunologisch an das Epitop oder die antigene Determinante in dem vorgegebenen Polypeptid binden. Oft sind es eine oder mehr Aminosäuren innerhalb des Epitops, die für die Antikörperbindung nicht kritisch sind

und die deshalb substituiert oder sogar deletiert werden können. Obwohl lineare Epitope üblicherweise kurze, zusammenhängende Sequenzen sind (mit gewisser Veränderung), können Konformationsepitope aus wenigen Aminosäuren bestehen, die innerhalb der linearen Aminosäuresequenz weit voneinander entfernt sind, aber wegen der Faltung oder anderer sekundärer oder tertiärer Struktureigenschaften des Proteins in enge Nachbarschaft gebracht werden.

[0051] Ein "Antigen" ist ein Polypeptid, das eine oder mehrere antigene Determinanten enthält.

[0052] "Immunogen" bedeutet die Fähigkeit, eine zelluläre und/oder humorale Immunantwort hervorzurufen. Eine Immunantwort kann von immunogenen Polypeptiden allein hervorgerufen werden oder die Anwesenheit eines Trägers in der Anwesenheit oder Abwesenheit eines Adjuvans erfordern.

[0053] "Immunreaktiv" betrifft (1) die Fähigkeit, immunologisch an einen Antikörper und/oder einen Lymphocyten-Antigenrezeptor zu binden oder (2) die Fähigkeit, immunogen zu sein.

[0054] Die Aminosäuresequenz, die das HCV-Epitop umfaßt, kann mit einem andern Polypeptid verknüpft sein (z. B. einem Trägerprotein), entweder mittels kovalenter Verknüpfung oder durch Expression eines fusionierten Polynucleotids, um eine Fusionsprotein zu bilden. Wenn gewünscht, kann man vielfache Kopien des Epitops inserieren oder anheften, und/oder eine Vielzahl von Epitopen einbauen. Das Trägerprotein kann von jeder Quelle abgeleitet sein, wird aber im allgemeinen ein relativ großes, immunogenes Protein sein wie BSA, KLH oder dergleichen. Wenn gewünscht, kann man als Träger ein HCV-Protein von im Wesentlichen voller Länge verwenden, womit man die Anzahl an immunogenen Epitopen vervielfacht. In einer anderen Ausführungsform kann die Aminosäuresequenz von dem HCV-Epitop am Amino-Terminus und/oder am Carboxy-Terminus mit einer nicht-HCV-Aminosäuresequenz verknüpft werden; somit wäre das Polypeptid ein Fusionspolypeptid. Analoge Arten von Polypeptiden können unter Verwendung von Epitopen von anderen ausgewählten viralen Proteinen konstruiert werden.

[0055] Ein "Individuum" betrifft ein Wirbeltier, insbesondere ein Mitglied einer Säugerart, und umfaßt, ist aber nicht beschränkt auf Nager (z. B. Mäuse, Ratten, Hamster, Meerschweinchen), Kaninchen, Ziegen, Schweine, Rind, Schaf und Primaten (z. B. Schimpansen, Afrikanische Grüne Meerkatze, Paviane, Orang-Utans und Menschen).

[0056] Wie hier verwendet, betrifft "Behandlung" jede Art von (i) Verhinderung einer Infektion oder Reinfektion, wie bei einem klassischen Impfstoff, (ii) Reduktion oder Eliminierung von einem oder mehreren Symptomen, die mit dem Zustand der HCV-Infektion assoziiert sind, und (iii) die weitgehende oder vollkommene Eliminierung des Virus. Die Behandlung kann prophylaktisch (vor der Infektion) oder therapeutisch (nach der Infektion) durchgeführt werden.

[0057] Wie hier verwendet betrifft eine "biologische Probe" eine Probe von Gewebe oder Flüssigkeit, die von einem Individuum isoliert wurde, einschließlich, aber nicht beschränkt auf, zum Beispiel Plasma, Serum, Rückenmarksflüssigkeit, Lymphe, die externen Sektionen der Haut, Atmungs-, Verdauungs- und Urogenitaltrakt, Tränen, Speichel, Milch, Blutzellen, Tumore, Organe, Biopsien und auch Proben von Bestandteilen von in vitro-Zellkulturen (einschließlich, aber nicht beschränkt auf konditionierte Medien, die vom Wachstum von Zellen in Zellkulturmedien stammen, z. B. Mab produzierende Myelomzellen, rekombinante Zellen und Zellbestandteile).

[0058] Die "Immunantwort" auf eine Zusammensetzung oder einen Impfstoff ist die Entwicklung einer zellulären und/oder Antikörper-vermittelten Immunantwort in dem Wirt auf das intrazelluläre infektiöse Mittel, das das Zielantigen codiert. Üblicherweise umfaßt eine solche Antwort die individuell produzierenden cytotoxischen T-Zellen und/oder B-Zellen und/oder eine Reihe von Klassen von T-Zellen, die spezifisch gegen Antigen präsentierende Zellen gerichtet sind, die das Zielantigen exprimieren.

B. Expressionssysteme

[0059] Die Verfügbarkeit von DNA-Sequenzen, die die Polypeptide dieser Erfindung codieren, erlaubt die Konstruktion von Expressionsvektoren, die diese Polypeptide codieren. Die DNA, die das gewünschte Polypeptid codiert, in fusionierter oder reifer Form, und eine Signalsequenz, die die Sekretion erlaubt, enthaltend oder nicht, kann in Expressionsvektoren ligiert werden, die für jeden üblichen Wirt geeignet sind. Sowohl eukaryontische als auch prokaryontische Wirtssysteme werden gegenwärtig bei der Bildung von rekombinanten Polypeptiden verwendet und ein Überblick über einige der üblichen Kontrollsysteme und Wirtszelllinien ist nachstehend dargestellt. Das Polypeptid wird dann von den lysierten Zellen oder von dem Zellkulturmedium isoliert und in dem Ausmaß gereinigt, der für die geplante Verwendung notwendig ist. Die Reinigung kann mittels Verfahren erfolgen, die im Stand der Technik bekannt sind, zum Beispiel differentielle Extraktion, Salzfraktionierung, Chromatographie auf Ionenaustauscherharzen, Affinitätschromatographie, Zentrifugation und dergleichen. Vgl. zum Beispiel *Methods in Enzymology* (Academic Press) für eine Reihe von Verfahren zur Reinigung von Proteinen. Solche Polypeptide können als Diagnostika verwendet werden, oder diejenigen, die neutralisierende Antikörper hervorrufen, können zu Impfstoffen formuliert werden. Antikörper, die gegen diese Polypeptide erzeugt wurden, können auch als Diagnostika verwendet werden, oder für die passive Immunthera-

pie.

[0060] Sowohl prokaryontische als auch eukaryontische Wirtszellen können für die Expression der gewünschten codierenden Sequenz verwendet werden, wenn geeignete Kontrollsequenzen verwendet werden, die mit dem ausgewählten Wirt kompatibel sind. Verfahren für eine solche Expression sind im Stand der Technik bekannt. Unter den prokaryontischen Wirten wird *E. coli* am häufigsten verwendet. Expressionskontrollsequenzen für Prokaryonten umfassen Promotoren, ggf. Operateurenteile enthaltend, und Ribosomenbindungsstellen. Transfervektoren, die mit dem prokaryontischen Wirt kompatibel sind, sind üblicherweise von zum Beispiel pBR322 abgeleitet, einem Plasmid, das Operons enthält, die Resistenz gegen Ampicillin und Tetracyclin verleihen, und den verschiedenen pUC-Vektoren, die auch Sequenzen enthalten, die antibiotische Resistenzmarker übertragen. Diese Marker können verwendet werden, um erfolgreiche Transformanten durch Selektion zu erhalten. Üblicherweise verwendete prokaryontischen Kontrollsequenzen umfassen B-Lactamase (Penicillinase)- und Lactose-Promotorsysteme (Chang et al., *Nature* (1977) 198: 1056); das Tryptophan (*trp*)-Promotorsystem (Goeddel et al., *Nucleic Acids Res.* (1980) 8: 4057) und die von λ abgeleitete P_L -Promotor- und N-Gen-Ribosomenbindungsstelle (Shimatake et al., *Nature* (1981) 292: 128) und den hybriden *tac*-Promotor (De Boer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1983) 292: 128), der abgeleitet ist von Sequenzen des *trp*- und *lac*-UVS-Promotors. Die vorstehenden Systeme sind insbesondere mit *E. coli* kompatibel; wenn gewünscht, können andere prokaryontische Wirte wie Stämme von *Bacillus* oder *Pseudomonas* verwendet werden, mit entsprechenden Kontrollsequenzen.

[0061] Eukaryontische Wirte umfassen Hefe und Säugerzellen in Kultursystemen. *Saccharomyces cerevisiae* und *Saccharomyces carlsbergensis* sind die am häufigsten verwendeten Hefewirte, und sind einfache Pilzwirte. Mit Hefe kompatible Vektoren tragen Marker, die die Selektion von erfolgreichen Transformanten erlauben, weil sie auf auxotrophen Mutanten Prototrophie übertragen oder Resistenz gegen Schwermetalle auf Wildtyp-Stämme. Mit Hefe kompatible Vektoren können den 2μ -Replikationsursprung verwenden (Broach et al., *Meth. Enz.* (1983) 101: 307), die Kombination von CEN3 und ARS1 oder andere Mittel zur sicheren Replikation wie Sequenzen, die im Einbau eines geeigneten Fragments in das Genom der Wirtszelle resultieren. Kontrollsequenzen für Hefevektoren sind im Stand der Technik bekannt und umfassen Promotoren für die Synthese von glycolytischen Enzymen (Hess et al., *J. Adv. Enzyme Reg.* (1968) 7: 149; Holland et al., *Biochemistry* (1978) 17: 4900), einschließlich des Promotors für 3-Phosphoglycerat-Kinase (Hitzeman, *J. Biol. Chem.* (1980) 255: 2073). Auch Terminatoren können eingeschlossen sein, so wie diejenigen, die vom Enolase-Gen abgeleitet sind (Holland, *J. Biol. Chem.* (1981) 256: 1385). Insbesondere nützliche Kontrollsysteme sind diejenigen, die den Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH)-Promotor oder den regulierbaren Alkoholdehydrogenase (ADH)-Promotor, Terminatoren, die ebenfalls von GAPDH abgeleitet sind, und falls Sekretion gewünscht wird, die Leadersequenz von Hefe- α -Faktor enthalten. Zusätzlich können die Transkriptionsregulationsregion und die Transkriptionsinitiationsregion, die operativ verknüpft sind, so sein, dass sie im Wildtyp-Organismus nicht natürlich assoziiert sind. Dieses Systeme sind im Detail in der EPO 120,551, offengelegt am 3. Oktober 1984; in der EPO 116,201, offengelegt am 22. August 1984; und in der EPO 164,556, offengelegt am 18. Dezember 1985, beschrieben, die alle dem hierin genannten Rechtsnachfolger übertragen sind und durch Bezugnahme hier eingeschlossen werden.

[0062] Säugerzelllinien, die als Wirte für die Expression zur Verfügung stehen, sind im Stand der Technik bekannt und umfassen viele unsterbliche Zelllinien, die bei der American Type Culture Collection (ATCC) verfügbar sind, einschließlich HeLa-Zellen, Eierstockzellen des Chinesischen Hamsters (CHO), Babyhamster-Nierenzellen (BHK) und eine Reihe von anderen Zelllinien. Geeignete Promotoren für Säugerzellen sind auch im Stand der Technik bekannt und umfassen virale Promotoren wie den vom Affenvirus 40 (SV40) (Fiers, *Nature* (1978) 273: 113), Roussarcom-Virus (RSV), Adenovirus (ADV) und Rinder-Papillomvirus (BPV). Säugerzellen können auch Terminatorsequenzen und Poly-A-Zusatzsequenzen benötigen; Enhancersequenzen, die die Expression erhöhen, können auch eingeschlossen sein, und Sequenzen, die die Amplifikation des Gens verursachen, können auch erwünscht sein. Diese Sequenzen sind im Stand der Technik bekannt.

[0063] Vektoren, die für die Replikation in Säugerzellen geeignet sind, sind im Stand der Technik bekannt, und können virale Replicons umfassen, oder Sequenzen, die die Integration der geeigneten Sequenzen, die NAN-BV-Epitope codieren, in das Genom des Wirts sicherstellen.

[0064] Ein Vektor, der für die Expression von fremder DNA verwendet wird und der bei der Impfstoffherstellung verwendet werden kann, ist das Vaccinia-Virus. In diesem Fall wird die heterologe DNA in das Vaccinia-Genom inseriert. Verfahren für die Insertion von fremder DNA in das Genom des Vaccinia-Virus sind im Stand der Technik bekannt und verwenden zum Beispiel die homologe Rekombination. Die Insertion von heterologer DNA erfolgt im Allgemeinen in ein Gen, das in der Natur nicht essentiell ist, zum Beispiel das Thymidin-Kinasegen (*tk*), das auch einen selektierbaren Marker bereitstellt. Plasmidvektoren, die die Konstruktion von rekombinanten Viren beträchtlich erleichtern, wurden beschrieben (vgl. zum Beispiel Mackett et al., *J. Virol.* (1984) 49: 857; Chakrabarti et al., *Mol. Cell. Biol.* (1985) 5: 3403; Moss (1987) in *GENE TRANSFER VECTORS FOR MAMMALIAN CELLS* (Miller und Calos Hrsg., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.), S. 10). Die Expression des HCV-Polypeptids geschieht dann in Zellen oder Individuen, die mit dem le-

benden rekombinanten Virus immunisiert sind.

[0065] Andere Systeme für die Expression von eukaryontischen oder viralen Genomen umfassen Insektenzellen und Vektoren, die für die Verwendung in diesen Zellen geeignet sind. Diese Systeme sind im Stand der Technik bekannt und umfassen zum Beispiel Insektenexpressions-Transfervektoren, die von dem Baculovirus *Autographa californica* kernpolyedrer Virus (AcNPV) abgeleitet sind, welcher ein Helfer-unabhängiger viraler Expressionsvektor für die Verwendung in zum Beispiel *Spodoptera frugiperda*-Zellen in Kultur ist. Expressionsvektoren, die von diesem System abgeleitet sind, verwenden üblicherweise den starken viralen Polyhedringen-Promotor, um die Expression von heterologen Genen anzutreiben. Der am häufigsten verwendete Transfervektor für die Einbringung von fremden Genen in AcNPV ist zur Zeit pAc373 (**Fig. 70**). Viele andere Vektoren, die dem Durchschnittsfachmann auf dem Fachgebiet bekannt sind, wurden auch für eine verbesserte Expression entwickelt. Diese umfassen zum Beispiel pVL985 (der das Polyhedrin-Startcodon von ATG zu ATT ändert und der 32 Basenpaare stromabwärts vom ATT eine BamHI-Clonierungsstelle einführt; vgl. Luckow und Summers, *Virology* (1989) 17: 31).

[0066] Verfahren für die Einbringung von heterologer DNA an der gewünschten Stelle im Baculovirus sind im Stand der Technik bekannt. (Vgl. Summer und Smith, *Texas Agricultural Experiment Station Bulletin* Nr. 1555; Smith et al., *Mol. & Cell Biol.* (1983) 3: 2156–2165; und Luckow und Summers (1989)). Zum Beispiel kann die Insertion in ein Gen wie dem Polyhedringen mittels der homologen Rekombination erfolgen; die Insertion kann auch in eine Restriktionsenzymstelle erfolgen, die in das gewünschte Baculovirusgen eingeführt wurde.

C. Impfstoffbehandlung von HCV

[0067] In einer Ausführungsform der Erfindung werden immunogene Zusammensetzungen bereitgestellt, die aus einem immunogenen Polypeptid der Erfindung bestehen, für die Verwendung bei einem Verfahren der Behandlung eines Individuums einer HCV-Infektion, d. h. für Impfstoffanwendungen, um die Immunreaktion auf eine antigene Determinante/antigene Determinanten zu stimulieren, die das Motiv enthalten.

[0068] Vorläufige Ergebnisse legen nahe, dass die hypervariable(n) Domäne(n) von E2/NS1 für Escapemutanten verantwortlich sein können, was zu chronischen HCV-Infektionen führt. Eine konservierte Region innerhalb der hypervariablen Region legt jedoch nahe, dass die konservierte Region eine wichtige Funktion hat und bei der Bindung des Virus an die und/oder dem Eintritt in die und/oder bei der Replikation in der Wirtszelle eine essentielle Rolle spielt. Bei der Bindung des Virus nimmt man an, dass die Bindung an die Zelle und/oder an ein anderes Molekül erfolgt, welches die Bindung und/oder den Eintritt und/oder die Replikation des Virus erleichtert. Die nachstehend gezeigten Beispiele legen nahe, dass die Bindung des Virus an Transthyretin und/oder das Thyroid-Bindungsglobulin (TBG) in den Prozeß der Infektion involviert sind. Somit kann die Erhöhung einer Immunantwort gegen antigene Determinanten, die die konservierte SLF--G-Sequenz enthalten, nicht nur zum Schutz und/oder zur Erleichterung bei der HCV-Infektion führen, sondern auch zu einer Reduktion bei der Chronizität der HCV-Infektion. Zusätzlich ist es angesichts der konservierten Region auch naheliegend, dass die Impfstoffe, die aus immunreaktiven Polypeptiden bestehen, die eine Region mit dem SLF--G-Motiv haben, kreuzreaktiv sein können.

[0069] In bevorzugten Anwendungen für Impfstoffe werden die hier beschriebenen Polypeptidzusammensetzungen mit anderen HCV-Untereinheitsantigenen kombiniert, zum Beispiel mit denen, die in der PCT-Offenlegung Nr. WO92/08734 beschrieben sind. In Fällen, in denen die Zusammensetzung für die Behandlung von HCV verwendet werden soll, ist es erwünscht, dass die Zusammensetzung immunogen ist. In den Fällen, in denen das synthetisierte Polypeptid korrekt konfiguriert ist, so daß es das korrekte Epitop bereitstellt, aber zu klein ist, um immunogen zu sein, kann das Polypeptid mit einem geeigneten Träger verknüpft sein. Eine Reihe von Techniken zur Herstellung solcher Verknüpfungen sind im Stand der Technik bekannt, einschließlich der Bildung von Disulfid-Bindungen unter Verwendung von N-Succinimidyl-3-(2-pyridyl-thio)propionat (SPDP) und N-Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexan-1-carboxylat (SMCC) (wenn dem Peptid eine Sulfhydrylgruppe fehlt, kann diese durch Zugabe von einem Cysteinrest bereitgestellt werden). Diese Reagentien schaffen eine Disulfidbindung zwischen sich selbst und Peptidcysteinresten auf einem Protein und eine Amidbindung durch die ϵ -Aminogruppe an einem Lysin oder anderen freien Aminogruppen in anderen Aminosäuren. Eine Reihe von solchen Disulfid/Amid-bildenden Mitteln sind bekannt. Vgl. zum Beispiel *Immun. Rev.* (1982) 62: 185. Andere bifunktionelle Kupplungsmittel stellen eine Thioether- und nicht eine Disulfidbindung bereit. Viele dieser Thioether bildenden Mittel sind kommerziell erhältlich und umfassen reaktive Ester von 6-Maleimidocaproin-Säure, 2-Bromessigsäure, 2-Iodessigsäure, 4-(N-Maleimidomethyl)cyclohexan-1-carboxylsäure und dergleichen. Die Carboxylgruppen können durch Kombination mit Succinimid oder dem Natriumsalz der 1-Hydroxyl-2-nitro-4-sulfonsäure aktiviert werden. Zusätzliche Verfahren zur Kopplung von Antigenen verwenden das Rotavirus/"Bindungspeptid"-System, das in der EPO-Offenlegung Nr. 259,149 beschrieben ist. Die vorstehende Liste ist nicht als erschöpfend gedacht, und es können offensichtlich Modifikationen der genannten Verbindungen verwendet werden.

[0070] Es kann jeder Träger verwendet werden, der nicht selbst die Produktion von Antikörpern induziert, die

für den Wirt schädlich sind. Geeignete Träger sind üblicherweise große, langsam metabolisierte Makromoleküle wie Proteine; Polysaccharide wie Latexfunktionalisierte Sepharose, Agarose, Cellulose, Cellulosekugeln und dergleichen; polymere Aminosäuren wie Polyglutaminsäure, Polylysin und dergleichen; Aminosäure-Copolymere; und inaktive Viruspartikel (vgl. nachstehend). Speziell nützliche Proteinsubstrate sind Serumalbumine, KLH ("keyhole limpet hemocyanin") Immunglobulin-Moleküle, Thyroglobulin, Ovalbumin, Tetanus-Toxoid und andere Proteine, die dem Durchschnittsfachmann auf dem Fachgebiet wohl bekannt sind.

[0071] Die Immunogenität der Antigene, die das SLF--G-Motiv enthalten, kann auch durch ihre Herstellung in eukaryontischen Systemen erhöht werden, die mit teilchenbildenden Proteinen fusioniert oder zusammengesetzt sind, wie zum Beispiel dasjenige, das mit dem Hepatitis B-Oberflächenantigen assoziiert ist. Vgl. z. B. U.S.-Patent Nr. 4,722,840. Diese Konstrukte können unter Verwendung des SV40-Dihydrofolatreduktase-Vektors (Michelle et al. (1984), INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON VIRAL HEPATITIS) auch in Säugerzellen wie CHO-Zellen exprimiert werden.

[0072] Außerdem können Teile der codierenden Sequenz für das teilchenbildende Protein durch Codons ersetzt werden, die das SLF--G-Epitop von einer hypervariablen Domäne von HCV codieren. Bei diesem Ersatz können die Regionen, die nicht erforderlich sind, um Aggregation der Einheiten zu vermitteln, um immunogene Partikel in Hefe oder Säuger zu bilden, deletiert werden, womit vermieden wird, daß zusätzliche antigene Stellen von HBV mit dem(n) HCV-Epitop(en) konkurrieren.

[0073] Diese Impfstoffe können entweder prophylaktisch (um die Infektion zu verhindern) oder therapeutisch (um nach der Infektion die Erkrankung zu behandeln) sein.

[0074] Solche Impfstoffe umfassen ein Antigen oder Antigene, üblicherweise in Kombination mit "pharmazeutisch verträglichen Trägern", welche jeden Träger umfassen, der nicht selbst die Produktion von Antikörpern induziert, die schädlich für das Individuum sind, das die Zusammensetzung erhält. Geeignete Träger sind üblicherweise große, langsam metabolisierte Makromoleküle wie Proteine, Polysaccharide, Polymilchsäuren, Polyglycolsäuren, polymere Aminosäuren, Aminosäure-Copolymere, Lipidaggregate (wie Öltröpfchen oder Liposome) und inaktive Viruspartikel. Solche Träger sind dem Durchschnittsfachmann auf dem Fachgebiet wohl bekannt sind. Zusätzlich können solche Träger als immunstimulierende Mittel ("Adjuvantien") fungieren. Darüber hinaus kann das Antigen mit einem bakteriellen Toxoid konjugiert sein, wie einem Toxoid von den Pathogenen für Diphtherie, Tetanus, Cholera, von *H. pylori* usw.

[0075] Bevorzugte Adjuvantien zur Erhöhung der Wirksamkeit der Zusammensetzung umfassen, sind aber nicht beschränkt auf: (1) Aluminiumsalze (Alaun) wie Aluminiumhydroxid, Aluminiumphosphat, Aluminiumsulfat usw.; (2) Öl-in-Wasser Emulsionsformulierungen (mit oder ohne andere spezifische immunstimulierende Mittel wie Muramylpeptiden (vgl. nachstehend) oder Bakterienzellwandkomponenten) wie zum Beispiel (a) MF59 (PCT-Offenlegungsschrift Nr. WO 90/14837), enthaltend 5% Squalen, 0,5% Tween 80 und 0,5% Span 85 (ggf. enthaltend verschiedene Mengen an MTP-PE (vgl. nachstehend), obwohl nicht erforderlich), formuliert in Submikron-Partikel unter Verwendung eines Mikroverflüssigers wie das Modell 110Y-Mikroverflüssigers (Microfluidics, Newton, MA), (b) SAF, enthaltend 10% Squalen, 0,4% Tween 80, 5% pluronisch geblocktes Polymer L121 und thr-MDP (vgl. nachstehend), entweder mikroverflüssigt in eine Submikron-Emulsion oder mit einem Vortex-Gerät behandelt, um eine Emulsion mit größeren Partikeln zu erzeugen, und (c) das RibiTM-Adjuvantensystem (RAS), (Ribi Immunochem, Hamilton, MT), enthaltend 2% Squalen, 0,2% Tween 80 und eine oder mehrere Bakterienzellwandkomponenten aus der Gruppe, die besteht aus Monophosphorylipid A (MPL), Trehalose-dimycolat (TDM) und Zellwandskelett (CWS), vorzugsweise MPL + CWS (DetoxTM); (3) Saponin-Adjuvantien wie StimulonTM (Cambridge Bioscience, Worcester, MA) können verwendet werden oder davon erzeugte Partikel wie ISCOMS (immunstimulierende Komplexe); (4) Vollständiges Freundesches Adjuvans (CFA) und Unvollständiges Freundesches Adjuvans (IFA); (5) Cytokine wie Interleukine (IL-1, IL-2 usw.), Makrophagenkoloniestimulierender Faktor (M-CSF), Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) usw.; und (6) andere Verbindungen, die als immunstimulierende Mittel wirken, um die Wirksamkeit der Zusammensetzung zu erhöhen. Alaun und MF59 sind bevorzugt.

[0076] Wie vorstehend erwähnt umfassen Muramylpeptide, sind aber nicht beschränkt auf, N-Acetyl-muramyl-L-threonyl-D-isoglutamin (thr-MDP), N-Acetyl-normuramyl-L-alanyl-D-isoglutamin (nor-MDP), N-Acetyl-muramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-L-alanin-2-(1'-2'-dipalmitoyl-sn-glycero-3-hydroxyphosphoryloxy)-ethylamin (MTP-PE), usw.

[0077] Die immunogenen Zusammensetzungen (d. h. das Antigen, der pharmazeutisch verträgliche Träger und das Adjuvans) werden üblicherweise Verdünnungsmittel wie Wasser, Salzlösung Glycerin, Ethanol usw. enthalten. Zusätzlich können Hilfssubstanzen wie Feuchtmittel oder emulgierende Mittel, pH-Puffersubstanzen und dergleichen in solchen Vehikeln vorhanden sein.

[0078] Üblicherweise werden die immunogenen Zusammensetzungen als injizierbare Mittel hergestellt, entweder als flüssige Lösungen oder Suspensionen; es können auch feste Formen für die Lösung oder Suspension in flüssigen Trägern vor der Injektion hergestellt werden. Die Herstellungen können auch für eine verbesserte Adjuvans-Wirkung emulgiert oder in Liposomen eingekapselt werden, wie vorstehend unter pharmazeutisch verträglichen Trägern diskutiert.

[0079] Immunogene Zusammensetzungen, die als Impfstoffe verwendet werden, umfassen eine immunologisch wirksame Menge der antigenen Polypeptide ebenso wie jede andere der vorstehend erwähnten Komponenten, falls erforderlich. „Immunologisch wirksame Menge“ bedeutet die Verabreichung derjenigen Menge an ein Individuum, entweder als Einzeldosis oder als Teil einer Reihe, die für die Behandlung wirksam ist. Diese Menge variiert in Abhängigkeit von der Gesundheit und der physischen Kondition des zu behandelnden Individuums, der taxonomischen Gruppe des zu behandelnden Individuums (z. B. nicht-menschlicher Primat, Primat, usw.), der Kapazität des Immunsystems des Individuums zur Synthese von Antikörpern, dem Ausmaß des gewünschten Schutzes, der Formulierung des Impfstoffs, der Einschätzung der medizinischen Situation durch den behandelnden Arzt und anderen relevanten Faktoren. Es ist zu erwarten, dass die Menge in einen relativ breiten Bereich fallen wird, der durch Routinetests bestimmt werden kann.

[0080] Die immunogenen Zusammensetzungen werden herkömmlich parenteral verabreicht, d. h. durch Injektion, entweder subkutan oder intramuskulär. Zusätzliche Formulierungen, die für andere Arten der Verabreichung geeignet sind, umfassen orale und Lungenformulierungen, Zäpfchen und transdermale Anwendungen. Die Dosierungsbehandlung kann ein Einzeldosierungsschema oder ein Vielfachdosierungsschema sein. Der Impfstoff kann in Verbindung mit anderen immunregulierenden Mitteln verabreicht werden.

[0081] Zusätzlich zum Vorstehenden ist es auch möglich, Lebendimpfstoffe von attenuierten Mikroorganismen herzustellen, die rekombinante Polypeptide exprimieren, die eine Region mit dem SLF--G-Motiv enthalten. Geeignete attenuierte Mikroorganismen sind im Stand der Technik bekannt und umfassen zum Beispiel Viren (z. B. Vaccinia-Virus) ebenso wie Bakterien.

[0082] Zusätzlich kann der Impfstoff, der das Polypeptid mit einer antigenen Determinante enthält, die aus dem konservierten SLF--G-Motiv besteht, in Verbindung mit anderen immunregulierenden Mitteln, zum Beispiel Immunglobulinen, verabreicht werden.

D. Antikörper

[0083] Immunogene Polypeptide der Erfindung, die, wie vorstehend beschrieben, hergestellt wurden, können verwendet werden, um Antikörper zu produzieren, einschließlich polyclonale und monoclonale. Wenn polyclonale Antikörper gewünscht werden, wird ein ausgesuchter Säuger (z. B. Maus, Kaninchen, Schaf, Ziege, Pferd, usw.) mit einem immunogenen Polypeptid immunisiert, das (ein) HCV-Epitop(e) trägt. Serum von dem immunisierten Tier wird gesammelt und gemäß bekannter Verfahren behandelt. Wenn Serum, das polyclonale Antikörper gegen (eine) antigene Determinante(n) enthält, die aus dem konservierten SLF--G-Motiv besteht/bestehen, Antikörper gegen andere Antigene enthält, können die polyclonalen Antikörper durch Immunaффinitätschromatographie gereinigt werden. Verfahren für die Produktion und Verarbeitung von polyclonalen Antiseren sind im Stand der Technik bekannt, vgl. zum Beispiel Mayer und Walker (1987).

[0084] In einer anderen Ausführungsform können polyclonale Antikörper von einem Säuger isoliert werden, der zuvor mit HCV infiziert worden war, und Antikörper isoliert werden, die gegen (eine) antigene Determinante(n) gerichtet sind, die aus dem konservierten SLF--G-Motiv besteht/bestehen. Monoclonale Antikörper, die gegen HCV-Epitope gerichtet sind, können durch den Durchschnittsfachmann auf dem Fachgebiet leicht produziert werden. Das allgemeine Verfahren zur Herstellung von monoclonalen Antikörpern durch Hybridome ist wohl bekannt. Immortalisierte, Antikörper produzierende Zelllinien können durch Zellfusion erzeugt werden und auch durch andere Techniken wie der direkten Transformation von B-Lymphocyten mit oncogener DNA oder Transfektion mit Epstein-Barr-Virus. Vgl. z. B. M. Schreier et al., (1980) HYBRIDOMA TECHNIQUES; Hammerling et al., (1981) MONOCLONAL ANTIBODIES AND T-CELL HYBRIDOMAS; Kennett et al., (1980) MONOCLONAL ANTIBODIES; vgl. auch U.S.-Patent Nr. 4,341,761; 4,399,121; 4,427,783; 4,444,887; 4,466,917; 4,472,500; 4,491,632; und 4,493,890. Muster von monoclonalen Antikörpern, die gegen (ein) HCV-Epitop(e) gerichtet sind, das/die aus dem konservierten SLF--G-Motiv besteht bestehen, können auf verschiedene Eigenschaften durchmustert werden; z. B. Isotypie, Epitopaffinität, usw.

[0085] Antikörper, monoclonal und polyclonal, die gegen (ein) HCV-Epitop(e) gerichtet sind, das/die aus dem konservierten SLF--G-Motiv besteht bestehen, sind vor allem bei der Diagnose von Nutzen, und diejenigen, die neutralisierend sind, sind bei der passiven Immuntherapie von Nutzen. Monoclonale Antikörper können insbesondere verwendet werden, um anti-idiotypische Antikörper zu erzeugen.

[0086] Anti-idiotypische Antikörper sind Immunglobuline die ein "inneres Bild" des Antigens des infektiösen Mittels tragen, gegen das Schutz gewünscht wird. Vgl. zum Beispiel Nisonoff, A., et al., Clin. Immunol. Immunopathol. (1981) 21: 397–406; und Dreesman et al., J. Infect. Disease (1985) 151: 761. Verfahren zur Erzeugung von anti-idiotypischen Antikörpern sind im Stand der Technik bekannt. Vgl. zum Beispiel Grzych, Nature (1985) 316: 74; MacNamara et al., Science (1984) 226: 1325; und Uytdehaag et al., J. Immunol. (1985) 134: 1225. Diese anti-idiotypischen Antikörpern können auch für die Behandlung, die Impfung und/oder die Diagnose der HCV-Infektion ebenso wie für die Ermittlung der immunogenen Regionen) des HCV-Antigens, die das SLF--G-Motiv enthalten, von Nutzen sein.

E. Diagnostische Tests

[0087] Für diagnostische Anwendungen kann es von Nutzen sein, die Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung als Antigene zu verwenden, womit die Möglichkeit verbessert wird, Antikörper gegen verschiedene HCV-Isolate nachzuweisen. Üblicherweise können die Polypeptide direkt in einem homogenen oder heterogenen Immuntestformat verwendet werden, wobei das letztere vorzugsweise die Immobilisierung des Polypeptids an einem festen Substrat umfaßt (z. B. Mikrotiterplattenmulden, Plastikkügelchen, Nitrocellulose, usw.). Vgl. z. B. PCT-Offenlegungsschrift Nr. WO90/11089; EPO Offenlegungsschrift Nr. 360,088; IMMUNOASSAYS: A PRACTICAL GUIDE, vorstehend. Die immunogenen Zusammensetzungen, die ein Polypeptid enthalten, das eine Region mit dem SLF--G-Motiv enthält, werden verwendet, um in biologischen Proben anti-HCV-Antikörper nachzuweisen, einschließlich zum Beispiel Blut- oder Serumproben. Der Immuntest wird mindestens ein Antigen mit einer antigenen Determinante verwenden, die aus dem SLF--G-Motiv besteht. Es ist auch beabsichtigt, dass Antikörper, die gegen antigene Determinanten gerichtet sind, die aus dem SLF--G-Motiv bestehen, verwendet werden können, um Antigene mit diesem Motiv in biologischen Proben nachzuweisen. Die Planung der Immuntests ist Gegenstand großer Variationmöglichkeiten, und eine Vielzahl davon sind im Stand der Technik bekannt. Protokolle für den Immuntest können zum Beispiel auf Konkurrenz oder auf direkter Reaktion oder auf Tests vom Sandwichtyp beruhen. Protokolle können zum Beispiel feste Träger verwenden, oder können mittels Immunpräzipitation arbeiten. Die meisten Tests umfassen die Verwendung von markiertem Antikörper oder Polypeptid; die Markierungen können zum Beispiel fluoreszierende, chemilumineszierende, radioaktive oder Farbstoffmoleküle sein. Tests, die die Signale von der Sonde amplifizieren, sind auch bekannt; Beispiele dafür sind Tests, die Biotin und Avidin verwenden, und Enzym-markierte oder -vermittelte Immuntests wie ELISA-Tests.

[0088] Kits, die für die Immundiagnose geeignet sind und die die passenden markierten Reagentien enthalten, werden durch Verpacken der geeigneten Materialien einschließlich der Zusammensetzung der Erfindung in geeigneten Behältern zusammen mit den verbleibenden Reagentien und Materialien (zum Beispiel geeigneten Puffern, Salzlösungen, usw.), die zur Durchführung des Tests erforderlich sind, ebenso wie einem geeigneten Satz an Testvorschriften hergestellt.

Beispiele

[0089] Nachstehend werden Beispiele nur zu Illustrationszwecken bereitgestellt und nicht, um den Umfang der Erfindung zu beschränken. Angesichts der vorliegenden Offenbarung werden dem Durchschnittsfachmann auf dem Fachgebiet zahlreiche Ausführungsformen im Umfang der Ansprüche offensichtlich werden.

Beispiel 1

Identifikation eines konservierten Motivs in E2HV

[0090] Ein konserviertes Motiv/konservierte Motive innerhalb der E2HV-Domäne wurde(n) durch Überprüfung von 90 E2HV-Sequenzen aus Isolaten aus der ganzen Welt auf konservierte Eigenschaften identifiziert. Die untersuchten HCV-Sequenzen sind in **Fig. 2** gezeigt. Die Überprüfung zeigte eine signifikante Variabilität der E2HV-Sequenzen.

[0091] E2HV-Sequenzdaten von Patienten, die im Anschluß an die HCV-Infektion erhalten wurden, zeigen, dass Mutationen zwischen den Aminosäuren 395 bis 407 mit höherer Frequenz erscheinen und mit der Zeit in der gesamten restlichen E2HV-Domäne erscheinen. Vgl. **Fig. 3** die die Sequenzdaten von drei Patienten darstellt: Hutchinson (H) (Ogata et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991) 88: 3392–3396); HC-J4 (Okamoto et al., Virology (1992) 188: 331–341); und NY/RS (Kato et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. (1992) 181: 279–285).

[0092] In **Fig. 3** ist auch zu beobachten, dass der Patient RS ein verschiedenes Muster mit weniger, zufällig verteilten Punktmutationen zu haben scheint, die im Laufe der Zeit akkumulieren. Das RS-Muster an Aminosäuresubstitutionen wurde in einer Subgruppe von HCV-infizierten Patienten und in einem chronisch infizierten Schimpansen beobachtet (Vgl. zum Beispiel Weiner et al., Vaccines 92, vorstehend). Eine Erklärung für den Unterschied im Muster an Mutationen, die im Lauf der Zeit zum Beispiel in den Patienten RS und NY akkumulieren, ist, dass Individuen wie RS keine Antikörper gegen das/die E2HV-Epitop(e) machen. In der Abwesenheit einer positiven Immunselektion mutiert die Sequenz zufällig, wenn sich eine Quasispezies-Verteilung von HCV-Varianten entwickelt. Der chronisch infizierte Schimpanse, der eine schwache Immunantwort auf HCV-Antigene hatte, zeigte ein ähnliches Muster an E2HV-Mutationen wie der Patient RS.

[0093] Die Ergebnisse der Überprüfung von Sequenzen ist in **Fig. 4** gezeigt, die das Maß der Konservierung der Charakteristika der Aminosäuren 384 bis 407 zeigt. Obwohl nicht zwei E2HV-Sequenzen identisch sind, sind die Aminosäuren 401 bis 403 und 406 bis 407 stark konserviert bezüglich der Charakteristika der Amino-

säuren an diesen Positionen. Die Aminosäure 401 ist S, G, A, D, K, R oder T; die Aminosäure 402 ist L, F, I, M oder W; die Aminosäure 403 ist F oder L; die Aminosäure 406 ist G oder A; die Aminosäure 407 ist A, P oder S. Die relative Häufigkeit der Aminosäuren an diesen Positionen in den 90 untersuchten Sequenzen ist in Tabelle 2 gezeigt.

Tabelle 2. Übersicht über die Aminosäuresubstitutionen in dem konservierten E2HV-Motiv

S aa401	L aa402	F aa403	G aa406	A/P/S aa407
62 S	68 L	77 F	89 G	45A
18 G	12 F	13 L	1 A	35 P
2 A	6 I			10 S
2 T	3 M			
1 D	1 W			
1 K				
4 R				

Beispiel 2

Kartierung der HCV1-E2HV-Epitope

[0094] Für die Epitop-Kartierung der E2HV-Region von E2/NS1 vgl. PCT-Offenlegungsschrift Nr. WO93/00365 mit den folgenden Modifikationen. Es wurden überlappende Peptide von der Sequenz, die die Aminosäurepositionen 384 bis 413 von HCV1 überspannen, an Nadeln gebunden, hergestellt. Die Peptide wurden mit einer IgG-Präparation vom Schaf zur Reaktion gebracht, das mit einem konjugierten 30-Mer-Peptid aus derselben Region immunisiert worden war.

[0095] Die Schaf-IgG-Präparationen, die anti-HVE2-Antikörper enthielten, wurden vom Schaf dargestellt, das mit einem an Diphtherie-Toxoid gekoppelten Peptid immunisiert worden war. Das Peptid überspannte die HCV1-E2HV-Region und hatte die folgende Sequenz:

Acetyl-C-B-E-T-H-V-T-G-G-S-A-G-H-T-V-S-G-F-V-S-L-L-A-P-G-A-K-Q-N-V-Q-L-Säure, worin B Butylalanin ist.

[0096] Die Ergebnisse der Durchmusterung unter Verwendung von Schafserum-IgG s1634-2 und s1635-2 vom Schaf, das mit dem konjugierten 30-Mer immunisiert worden war, sind in **Fig. 5** gezeigt. Die Resultate zeigen, dass Schaf 1634-2-IgG mit dem minimalen Epitop ⁴⁰⁰VSLLA⁴⁰⁴ reagiert. IgG vom Schaf 1635-2 hat ein breiteres Reaktivitätsprofil – das Serum reagiert mit den Peptiden, die das minimale-Epitop ⁴⁰⁰VSLLA⁴⁰⁴ enthalten, und zusätzlich mit Peptiden, die das minimale Epitop ⁴⁰¹VSLLA⁴⁰⁷ und ⁴⁰³VSLLA⁴⁰⁷ enthalten. Somit ist die IgG-Präparation vom Schaf, das mit dem 30-Mer-Peptid von E2HV immunisiert worden war, reaktiv mit dem/den linearen Epitop(en) zwischen den Aminosäuren 400 bis 407.

[0097] Die bei diesen Beispielen verwendeten Verfahren werden nachstehend beschrieben.

Synthese von überlappenden Peptiden

[0098] Die Synthese von überlappenden Peptiden wurde wie folgt durchgeführt. Speziell hergestellte und derivatisierte Polyethylen-Nadeln, die auf einem Block in einer 8 × 12-Muster angeordnet waren (Coselco Minotopes, Victoria, Australien) wurden durch 30 Minuten Platzieren der Nadeln bei Raumtemperatur in einem Bad (20% Vol./Vol. Piperidin in Dimethylformamid (DMF)) hergestellt. Die Nadeln wurden dann entfernt, 5 min in DMF gewaschen, dann viermal in Methanol (2 min/Waschvorgang) gewaschen. Die Nadeln wurden mindestens 10 min an der Luft trocknen gelassen, dann ein letztes Mal in DMF gewaschen (5 min). 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt, 367 mg) wurde in DMF (80 ml) zur Verwendung bei der Kopplung Fmoc-geschützter Aminosäuren gelöst: Fmoc-L-Ala-OPfp, Fmoc-L-Cys(Trt)-OPfp, Fmoc-L-Asp(O-tBu)-OPfp, Fmoc-L-Glu(O-tBu)-OPfp, Fmoc-L-Phe-OPfp, Fmoc-Gly-OPfp, Fmoc-L-His(Boc)-OPfp, Fmoc-L-Ile-OPfp, Fmoc-L-Lys(Boc)-OPfp, Fmoc-L-Leu-OPfp, Fmoc-L-Met-OPfp, Fmoc-L-Asn-OPfp, Fmoc-L-Pro-OPfp, Fmoc-L-Gln-OPfp, Fmoc-L-Arg(Mtr)-OPfp, Fmoc-L-Ser(tBu)-ODhbt, Fmoc-L-Thr(tBu)-ODhbt, Fmoc-L-Val-OPfp und Fmoc-L-Tyr-OPfp.

[0099] Die geschützten Aminosäuren wurden in Mikrotiterplattenmulden mit HOBt gebracht, und der Nadelblock über der Platte angebracht, wobei die Nadeln in die Mulden eintauchten. Die Vorrichtung wurde dann in einem Plastikbeutel versiegelt und 18 Stunden bei 25°C reagieren gelassen, um die ersten Aminosäuren an die Nadeln zu koppeln. Der Block wurde dann entfernt und die Nadeln mit DMF (2 min), mit MeOH (4 × 2 min) und erneut mit DMF (2 min) gewaschen, um die gebundene Aminosäure zu reinigen und die Schutzgruppe zu entfernen. Das Verfahren wurde für jede zusätzlich gekoppelte Aminosäure wiederholt, bis alle Octamere hergestellt waren. Die freien N-Termini wurden dann acetyliert, um das freie Amid zu kompensieren, da die meisten Epitope nicht am N-Terminus gefunden werden und somit nicht die assoziierte positive Ladung haben würden. Die Acetylierung wurde durch Füllung der Mulden der Mikrotiterplatte mit DMF/Essigsäureanhydrid/Triethylamin (5 : 2 : 1 Vol./Vol./Vol.) und durch Reaktion der Nadeln 90 min bei 20°C in den Mulden erreicht. Die Nadeln wurden dann mit DMF (2 Min.) und mit MeOH (4 × 2 min) gewaschen und mindestens 10 min an der Luft getrocknet.

[0100] Die Seitenkettenschutzgruppen wurden durch 4 Stunden Behandlung der Nadeln mit Trifluoressigsäure/Phenol/Dithioethan (95 : 2,5 : 2,5 Vol./Vol./Vol.) in Propylenbeuteln bei Raumtemperatur entfernt. Die Nadeln wurden dann in Dichlormethan (2 × 2 min), 5% Diisopropylethylamin/Dichlormethan (2 × 5 min) und Dichlormethan (5 min) gewaschen und mindestens 10 min an der Luft getrocknet. Die Nadeln wurden dann in Wasser (2 min) und MeOH (18 Stunden) gewaschen, im Vakuum getrocknet und in versiegelten Plastikbeuteln über Silicagel aufbewahrt.

Bindungstest

[0101] Um die Bindung an die Peptide zu testen, wurden die, wie vorstehend beschrieben hergestellten, Octamer tragenden Nadeln 30 min mit Ultraschall in einem Aufbrechpuffer (1% Natriumdodecylsulfat, 0,1% 2-Mercaptoethanol, 0,1 M NaHP₂O₄) bei 60°C behandelt. Die Nadeln wurden dann mehrfach in Wasser (60°C) eingetaucht, gefolgt von kochendem MeOH (2 nun) und an der Luft trocknen gelassen.

[0102] Die Nadeln wurden dann unter Schütteln 1 Stunde bei 25°C in Mikrotitermulden vorbeschichtet, die 200 µl Blockierungspuffer (1% Ovalbumin, 1% BSA, 0,1% Tween® und 0,05% NaN₃) enthielten. Die Nadeln wurden dann in Mikrotitermulden eingetaucht, die zwei Präparationen von IgG vom Schaf enthielten, das mit dem E2HV-Peptid immunisiert worden war.

Herstellung von IgG, das anti-HCV-HVE2-Antikörper enthielt

[0103] Die Herstellung von Schaf-IgG und von dem konjugierten Peptid war wie folgt. Die Schafe wurden mit 50 bis 100 nMol des konjugierten Peptids in vollständigem Freundschens Adjuvans (CFA) immunisiert; 14 Tage später wurden die Schafe ein zweites Mal immunisiert, das konjugierte Peptid war aber in Unvollständigem Freundschens Adjuvans. Drei bis vier Wochen später wurde den Schafen Blut entnommen, und das IgG im Serum wurde mit 50%-igem Ammonsulfat ausgefällt. Der Niederschlag wurde gesammelt und mit einer Lösung behandelt, die 1% Triton X-100 und 0,3% Tri-N-butylphosphat (TNBP) enthielt. Nach der Behandlung wurde das Detergens entfernt, indem die IgG-Fraktion mit 50%-igem Ammonsulfat ausgefällt, gesammelt und der Niederschlag zweimal mit einer Lösung gewaschen wurde, die 50% Ammonsulfat enthielt, gefolgt von Solubilisierung in und zwei Tagen Dialyse gegen phosphatgepufferte Salzlösung (PBS). Die resultierende IgG-Herstellung wurde vor der Verwendung für die Immunisierung durch Durchgang durch ein Filter sterilisiert.

Kopplung von Diphtherie-Toxoid-Trägerprotein mit MCS

[0104] Die Peptid-Diphtherie-Toxoid-Konjugate wurden unter Verwendung des folgenden Protokolls hergestellt.

Materialien:

Ethylenamintetraessigsäure (EDTA Na₂·2H₂O) (MG 372)
 6-Maleimidocaprinsäure-N-hydroxysuccinimidester (MCS) (Sigma) – 95% rein
 Natriumdihydrogenorthophosphat (NaH₂PO₄)
 Stickstoff
 Dimethylformamid (DMF)
 Milli Q^(RTM)-Wasser
 0,1 M Phosphatpuffer, der 5 mM EDTA enthielt, pH 6,66
 0,1 M Phosphatpuffer, pH 8,0
 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,0
 Natriumsuccinat [(CH₂COONa)₂·6H₂O]

Cystein
 Salzsäure (2%-ige Lösung)
 0,1 M Natriumsuccinat/0,1 EDTA, pH 5,6

[0105] Gereinigtes Diphtherie-Toxoid (Commonwealth Serum Laboratories, Victoria, Australien) wurde gemäß dem von Lee et al., Mol. Immunol. (1980) 17: 749; Partis et al., Prot. Chem. (1983) 2: 263; Peeters et al., J. Immunol. Methods (1989) 120: 133; Jones et al., J. Immunol. Methods (1989) 123: 211 beschriebenen Verfahren an MCS gekoppelt. 100 ml Diphtherie-Toxoid wurde durch eine G25 Sephadex^(RTM)-Säule (17 cm × 4 cm) gegeben, um Thiomersal zu entfernen. Das Toxoid wurde mit 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,0, eluiert, und der Proteingehalt des Eluats wurde unter Verwendung der BCA-Proteinbestimmung (Pierce) getestet. Die resultierende Lösung wurde unter Verwendung einer Amicon-Ultrafiltrationseinheit auf eine Endkonzentration von 10 mg/ml konzentriert.

[0106] Ein Milliliter der Toxoidlösung wurde gegen 0,1 M Phosphatpuffer, pH 8,0, dialysiert und dann mit einer Lösung von 1,5 mg MCS in 200 µl DMF gemischt. Die resultierende Lösung wurde 1 Stunde im Dunkeln bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Mischen inkubiert. Um das ungekoppelte MCS von dem MCS-Toxoid zu trennen, wurde die Lösung durch eine Sephadex PD10-Säule gegeben, die mit 0,1 M Phosphatpuffer, pH 6,66, äquilibriert worden war, und die Proteinfraction wurde gesammelt.

[0107] Die Anzahl an Maleimidogruppen, die pro Trägermolekül gekoppelt war, wurde vor der Kopplung der HCV-Peptide daran bestimmt. 30 Milliliter des Succinat/EDTA-Puffers wurden 2 Minuten mit Stickstoff gespült. Fünf Milligramm Cystein wurden in eine volumetrische Flasche von 25 ml gegeben und in einem Endvolumen von 25 ml des gespülten Puffers aufgelöst. Teilmengen der in Tabelle 3 gezeigten Lösungen wurden in Doppelansätzen in Flaschen mit Schraubverschluß von 25 ml übertragen. Unter Verwendung von getrennten Pipetten wurde jede Teilmenge mit Stickstoff gespült. Jede Flasche wurde dann versiegelt und im Dunkeln bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Schütteln 40 Minuten inkubiert.

Tabelle 3

<u>Lösung</u>	<u>Probe (ml)</u>	<u>Standard (ml)</u>	<u>Blindprobe (ml)</u>
aktivierter Träger	0,3	-	-
Phosphatpuffer	-	0,3	0,3
Cysteinlösung	1,0	1,0	-
Succinatpuffer	-	-	1,0

* eine Teilmenge von 0,1 ml von jeder der 3 Lösungen wurde für eine Ellman-

Bestimmung entnommen

Ellman-Test für die quantitative Bestimmung von Sulfhydryl

Benötigte Materialien:

Phosphatpuffer, pH 8,0

Löse 15,6 g NaH₂P₂O₄ oder 12,0 g wasserfreies NaH₂P₂O₄ in etwa 700 ml Milli Q-Wasser. Stelle den pH unter Verwendung von 50%-iger NaOH auf 8,0 ein. Füge Milli Q-Wasser bis zu einem Endvolumen von 1000 ml zu und stelle den pH ein, falls erforderlich.

Ellman-Reagens

Löse 10,0 mg 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure (DTNB) in 2,5 ml Phosphatpuffer, pH 8,0.

0,1 ml Ellman-Reagens wurden zu jeder der Teilmengen von 0,1 ml der vorstehend hergestellten Lösungen zugegeben, nämlich der Probe, dem Standard und der Blindprobe. Dann wurden 5 Milliliter Phosphatpuffer, pH 8,0, zu jeder Teilmenge zugegeben, gut gemischt und 15 Minuten stehen gelassen. Die Absorption von jeder Teilmenge wurde in einer Zelle mit 1 cm Weglänge bei 412 nm gemessen.

[0108] Die Anzahl an Maleimidogruppen, die auf dem Trägerprotein vorhanden war, wurde gemäß dem folgenden Verfahren bestimmt. 0,01 µMol pro ml Lösung an SH erzeugt eine Absorption von 0,136 bei einem Lichtweg von 1 cm bei 412 nm. Die Absorption der Standardprobe (A) ist gleich der Menge an Cystein, die mit den gekoppelten Maleimidogruppen auf dem aktivierten Trägerprotein reagierten. Da 1 Mol von verfügbarem -SH mit einem Mol Maleimido reagiert, ist die Konzentration der in der getesteten Teilmenge vorhandenen Maleimidogruppen in µMol gleich A(0,01)/0,136 µMol/ml. Das Gesamtvolumen der Lösung war 5,2 ml. Deshalb

war die Gesamtzahl an vorhandenen μMol gleich $A(0,01)(5,2)/0,136$. Die Probenlösung hatte ein Gesamtvolumen von 1,3 ml, von denen 0,3 ml aus dem aktiviertem Trägerprotein bestanden. Die Menge an Maleimidogruppen, die in der Probenlösung vorhanden war, wurde zu $A(0,01)(5,2)(1,3)/0,136(0,1)(0,3) = A(16,57)$ $\mu\text{Mol/ml}$ berechnet. Das MCS-aktivierte Trägerprotein wurde bei -20°C aufbewahrt.

Reduktion der HCV-Peptide

[0109] Vor der Kopplung der HCV-Peptide an das MCS-aktivierte Trägerprotein wurden die Peptide reduziert, um sicherzustellen, dass die auf den Peptiden vorhandenen Thiogruppen in der vollständig reduzierten -SH-Form vorlagen.

Benötigte Materialien:

Dithiothreitol (DTT)

Ammoniumhydrogencarbonat (NH_4HCO_3), Methanol

SEP-PAKs^(RTM) (C18 Kartusche, Waters), 1 Kartusche für je 8 mg Peptid

0,1 M Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer

Löse 7,9 g NH_4HCO_3 in 1 l Milli Q-Wasser

Puffer A, 0,1% Vol./Vol. Trifluoressigsäure (TFA) in Milli Q-Wasser

Puffer B, 60% Vol./Vol. Acetonitril, 0,1% Vol./Vol. TFA in Milli Q-Wasser

[0110] 15 mg HCV-Peptid wurden zu 2,5 ml 0,1 M Ammoniumhydrogencarbonat zugegeben, das einen 10-fachen molaren Überschuß an DTT enthielt. Die resultierende Lösung wurde gemischt, bis sich das Peptid aufgelöst hatte, und wurde dann 1 Stunde bei Raumtemperatur stehen gelassen. Ein Paar SEP-PAKs wurde in Serie verbunden und wurde durch Durchgang von etwa 20 ml Methanol und dann 20 ml Puffer A durch das Paar SEP-PAKs aktiviert. Die Peptid/DTT-Probe wurde langsam durch ein Paar SEP-PAKs gegeben. Das DTT wurde mit etwa 20 ml Puffer A eluiert. Das reduzierte Peptid wurde mit 7 ml Puffer B in eine zuvor gewogene Flasche eluiert und dann übernacht gefriergetrocknet. Die Flaschen wurden dann gewogen, um die Menge an gewonnenem Peptid zu bestimmen. Das reduzierte Peptid wurde dann unmittelbar an das MCS-aktivierte Trägerprotein gekoppelt.

Kopplung von HCV-Peptiden an MCS aktiviertes Trägerprotein

[0111] Etwa 100 ml 0,1 M Phosphatpuffer mit 5 mM EDTA, pH 6,66 wurden unter Vakuum entgast und dann 10 Minuten mit Stickstoff gespült. 20 Milliliter einer Lösung von 10 mg/ml MCS aktiviertem Trägerprotein wurden sorgfältig mit Stickstoff gespült, um überschüssiges Schäumen zu verhindern. 5 mg des reduzierten Peptids wurden in etwa 0,2 ml des entgasten gespülten Phosphat/EDTA-Puffers, pH 6,66, aufgelöst und dann mit der MCS aktivierten Trägerproteinlösung gemischt. Das resultierende Gemisch wurde in eine Flasche mit Schraubverschluß überführt, die dann mit Stickstoff gefüllt und versiegelt wurde. Die Lösung wurde weiterhin entgast, indem die Flasche 2 Minuten in ein Branson 2000[®] Ultraschallbad gehalten wurde. Die Flasche wurde mit Aluminiumfolie abgedeckt und unter langsamem Mischen auf einem Schüttelbrett über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

[0112] Das resultierende Konjugat war löslich, und nicht gekoppeltes Peptid wurde durch Durchgang des Gemisches durch eine Sephadex PD 10-Säule entfernt, die mit dem Phosphat/EDTA-Puffers, pH 6,66, äquilibriert worden war. Die Proteinfraktion wurde gesammelt. Die Menge an Peptid, die an das Trägerprotein konjugiert war, wurde mittels Aminosäureanalyse bestimmt.

[0113] Eine Aminosäureanalyse von Teilmengen von 150 μl des Konjugats und des Trägerproteins wurde durchgeführt. Das mittlere Verhältnis der Menge von Aminosäuren, die allein vom Trägerprotein beigetragen wurden, wurde bestimmt, um die Menge an produziertem konjugiertem Peptid zu berechnen. Die Mengen an Serin, Threonin, Tryptophan, Methionin, Tyrosin und Cystein wurden nicht bestimmt, da diese Aminosäuren unter den Standard-Hydrolysebedingungen modifiziert werden.

Beispiel 3

Bindung von monoklonalen anti-Thyroxin-Antikörpern an Peptide der HCV-E2HV-Domäne

[0114] Monoklonale Antikörper, die an Thyroxin (T4) binden, wurden von Dr. Mario Geysen, Chiron Mimitopes Ltd. Australien, hergestellt. Die Bindung dieser Antikörper an überlappende Peptide, die die E2HV-Region überspannen, wurde getestet. Peptide auf Nadeln wurden, im Wesentlichen wie vorstehend in Beispiel 2 beschrieben, hergestellt, außer dass die HCV-E2HV-Sequenz die Aminosäuren 383 bis 413 von HCV1 über-

spannte. Die Bindung der monoclonalen anti-T4-Antikörper an die HCV-E2HV-Mimotope wurde in doppelten Ansätzen durchgeführt. Die Bindungsergebnisse sind in dem Balkendiagramm in **Fig. 6** gezeigt, wo die gefüllten und schattierten Balken jeweils die Bindung der doppelten Proben darstellen. Wie in diesen Figuren zu sehen, waren die anti-T4-Antikörper immunologisch reaktiv mit (einem) Epitope(n), das/die von der HCV1-Sequenz umfaßt wird werden, die aa395 bis aa407 überspannte.

Beispiel 4

Bindung von Serumproteinen an HCV

[0115] Die Bindung von drei Serumproteinen, menschlichem Präalbumin, menschlichem Serumalbumin und Tyroid bindendem Globulin (TBG), an überlappende Peptide, die die E2HV-Region überspannen, wurde durchgeführt. Octamer-tragende Nadeln wurden, wie in Beispiel 1 beschrieben, hergestellt. Die Bindung der bezeichneten Serumproteine an die Octameren wurde unter Verwendung von Antikörpern, die gegen die spezifischen Proteine gerichtet sind, mittels eines ELISA-Tests bestimmt. Kontrollen wurden in der Abwesenheit der Serumproteine, aber in der Anwesenheit der jeweiligen Antikörper durchgeführt. Die Ergebnisse, als Differenzaustragung gezeigt, sind in **Fig. 7** gezeigt. Auf der Basis der Ergebnisse scheint es, dass Transthyretin mindestens an ein Minimalepitop in der hypervariablen Region bindet. Zusätzlich legen die Ergebnisse nahe, dass TBG an zwei Minimalepitope bindet, von denen eins das SLF--G-Motiv umfaßt.

Patentansprüche

1. Immunogenes Polypeptid, das ein 31-Mer ist, mit der Consensus-Sequenz .T.VTGG.AARTT.G..SLF..G.SQ.IQLI, abgeleitet von der hypervariablen E2HV-Region des HCV oder eine verkürzte Version davon, die das SLF..G-Motiv oder Varianten davon beibehält, die das SLF..G-Motiv beibehalten, und wobei an einer oder mehreren Aminosäurerestpositionen der Aminosäurerest durch einen anderen Aminosäurerest oder durch ein nicht natürlich vorkommendes Analog davon ersetzt ist, wobei die Immunreaktivität der verkürzten Versionen oder Varianten aufrechterhalten wird.

2. Immunogenes Polypeptid nach Anspruch 1, das ein 31-Mer ist, mit der Sequenz .T.VTGG.AARTT.G..SLF..G.SQ.IQLI oder eine Variante davon, wobei der Aminosäurerest an einer oder an mehreren Aminosäurerestpositionen durch ein nicht natürlich vorkommendes Analog ersetzt ist, wobei die Immunreaktivität der Variante aufrechterhalten wird.

3. Immunogenes Polypeptid nach Anspruch 1, das ein 31-Mer mit der Sequenz .T.VTGG.AARTT.G..SLF..G.SQ.IQLI ist.

4. Immunogenes Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 3, das an ein Trägerprotein gekoppelt ist.

5. Immunogenes Polypeptid, nach einem der Ansprüche 1 bis 4, zur Verwendung in einem Verfahren zur Behandlung einer Person bei einer Hepatitis-C-Virus-(HCV)-Infektion.

6. Zusammensetzung, enthaltend ein immunogenes Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 4, zusammen mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger.

7. Zusammensetzung nach Anspruch 6, zur Verwendung in einem Verfahren zur Behandlung einer Person bei einer HCV-Infektion.

8. Immunogenes Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 3, das auf einem festen Träger immobilisiert ist.

9. Immunoassay-Verfahren zum Nachweis von anti-Hepatitis-C-Virus-(HCV)-Antikörpern in einer biologischen Probe, wobei das Verfahren die Schritte umfasst:

(a) Inkubation einer antikörperenthaltenden biologischen Probe, von der angenommen wird, dass sie anti-HCV-Antikörper enthält, mit einem immunogenen Polypeptid nach einem der Ansprüche 1, 2, 3 und 8, um die Bildung eines Antikörper-Antigen-Komplexes zu ermöglichen und

(b) Nachweis, ob ein Antikörper-Antigen-Komplex gebildet wird, der das immunogene Polypeptid enthält.

Es folgen 8 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

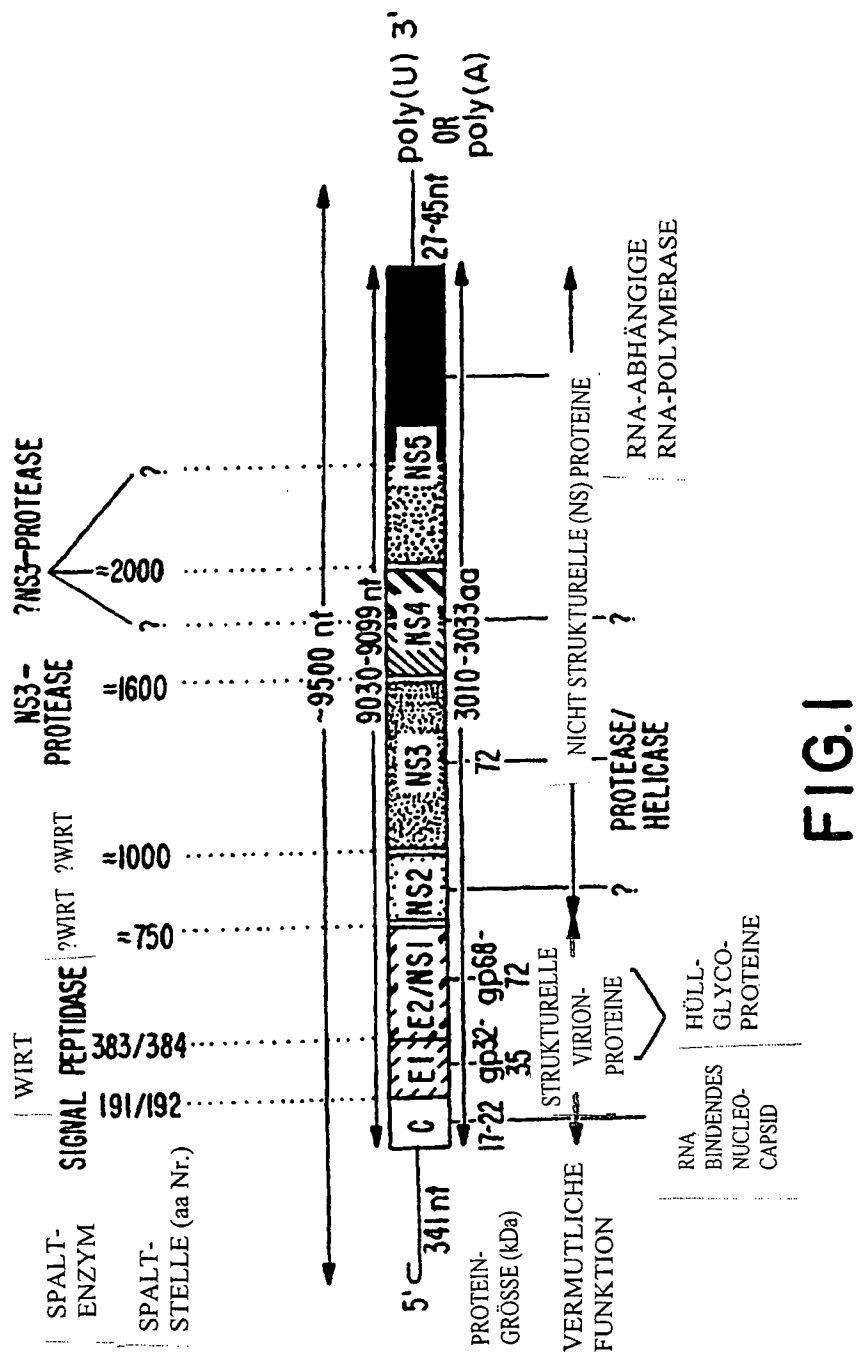


FIG.1

Consensus	.T.VTGG.AARTT.G..SLF..G.SQ.IQLI	31
re3 (15-45)	A.YA..AAQGH.A.NSFV...RS.A..NLK.V	45
hcj7.pep (15-45)	S.Q....Q..H.VR.VA.I.SP.SR.D.S..	45
nyl.pep (15-45)	S.R....QQG.AVH.IA...SL.A..K...V	45
GE11.2 (15-45)	S.H.M.AQQG.VAK.FT...GP.PA.K....	45
s71957.p (15-45)	S.H...AVQGH.SIR.LT...TS.PA.K...V	45
ec10 (15-45)	E.H....I..K..ASLTG..NL.AK.N....	45
sp2.tc (15-45)	E.H....N.G.AAA.IAG..TL.AK.NV...	45
M2.2 (15-45)	Q.R....T..QS.ARIAG..SL.AR.N....	45
rela (15-45)	Q.H.M..T.G.NAY.LT.FLSV.A..K....	45
168 (15-45)	E.H.M..A.SS..YRFA...TS.PA.K...V	45
M1.5 (15-45)	E.H....S..S..ATFSK..MP.A..N....	45
hpcprc1a.pl (14-44)	G.TRV..A....SSFA..LTH.P..N...V	44
gm2.tc (15-45)	G.H....A...DAFRFS...TR.P..N....	45
s71864.pl (15-45)	A.NM...AP....YKLT..SY.A..K....	45
i15.tc (15-45)	HNH....TS..N.F.ITT..TQ.P..KL..V	45
sp1.tc (15-45)	G.H....A...NAHSLT..LAP.A..K....	45
re37b (15-45)	T.R.S..T..H..A.LT...SP.PR.N.H.V	45
re39 (15-45)	T.H.S..T.G...ASLT.F.AP.A..R...V	45
hpchc12.p (15-45)	T.H....ATGH..S.IA...LP.A..K....	45
hpccgenom.pl (15-45)	D.YAS..AQG.S.L.FT...TP.A..K....	45
hpcprc4a.p2 (14-44)	D.YAS..A.G.A.Y.IT...AP.A..N....	44
hpcprc11a.pl (4-34)	R.YAS..A.G...H.FT...ST.AR.N....	34
re72b (15-45)	Q.Y....K..Q.VS.FTG..SS.P..K....	45
hpcprc3a.pl (4-34)	D.Y.S..A...SIS.FT...TP.A..K...V	34
re70 (15-45)	S.Y....E.S...R.FA...TL.S..K....	45
re42 (15-45)	N.Y....S.G.AVA.FAG.LQP.AK.NV...	45
63 (15-45)	H.R....QV.FR.H.LV...TQ.P..K...V	45
hcvj (15-45)	H.H....RV.SS.QSLV.WLSQ.P..K...V	45
hcvj1 (15-45)	H.R....VQGHV.STLT...RP.A..K...V	45
re38 (15-45)	N.R....VQG.D.S.LV...SL.P..K...V	45
bk (15-45)	D.H....AQ.K..NRLV.M.AS.P..K....	45
re5 (15-45)	E.H....AS....QRFT.F.DL.P..K...V	45
re35 (15-45)	T.YM...AN....Q.FV...TP.PA.K...V	45
re36 (15-45)	E.H....TS....Q.FV...SA.A..K...V	45
re54 (15-45)	G.H....Q....QSFT...SP.PQ.K....	45
re56 (15-45)	R.H....K..H..K.FA...TP.P..N....	45
64 (15-45)	E.R...AVQGHGAL.LA...TP.P..K....	45
re62 (15-45)	E.R...AI.G..ASSFAG..TS.A..K...V	45
re41 (15-45)	E.R...QQVG...QSLT...TP.P..T....	45
hpcvjk3.p (15-45)	Q.R...AQVG...SSLT...TP.P..N...V	45
jk2 (15-45)	R.Q...AQ.GH..S.LA...TP.P..K...V	45
hcv1 (15-45)	E.H....S.GH.VS.FV..LAP.AK.NV...	45
us5.tc (15-45)	E.H....S.GH.VT.IA...TS.AK.N....	45

FIG. 2A

121.tc (15-45)	S.H....T..H.VA.FS...TV.PK.N....	45
M3.1 (15-45)	E.H....A..Y.AA.LA...TS.AK.N....	45
H77 (15-45)	E.H....S.G...A.LVG.LTP.AK.N....	45
re43 (15-45)	G.H....S.G.A.A.IAG.LTP.AR.N...V	45
Ge6.3 (15-45)	K.H....S.....S.IA...LTP.AK.NV...	45
C011 (15-45)	K.Y....SQ.QA.F.FT...LQQ.AK.N....	45
TH (15-45)	E.T....S..HGAL.IA...NQ.AR.N....	45
0115 (15-45)	E.Y....AS..S.FTLVG...KQ.SQ.N...V	45
re4a (15-45)	Q.Y.S...SSG...S.LV.I.SP.A...NL...	45
q1 (15-45)	E.Y.S...A..Q..ARFAGF.QS.AK.N....	45
q3 (15-45)	E.Y.S...S..Q..A.FVR..ET.PK.N....	45
gh1.tc (15-45)	S.Y.S...AQ...AAQ.IT...SR.S...K...V	45
M4.1 (15-45)	S.Y....TQG.AAS.LT...SA.A...N....	45
nac5.tc (15-45)	N.Y.S...T.GH.GH.LTA...SP.A...N....	45
hpcgenanti.p3 (15-45)	S.I.S...TV....HSLA...TQ.A...K....	45
hcj4 (15-45)	E.YTS..A.SH..STLA...SP.A...R...V	45
hpchcv.p2 (15-45)	H.LT...H...L.S.FAG..TP.P...R....	45
hcj1 (15-45)	E.I.S...Q...AMS.LV...TP.AK.N....	45
hct18 (15-45)	E.YTS..N.GH.MT.IVRF.AP.PK.NVH..	45
hct27 (15-45)	T.YT...N.....QALT.F.SP.AK.D....	45
hcve1 (15-45)	E.YT...ST....Q.LV...SR.AK.D....	45
gel2 (15-45)	A.YTS..S.....Q.FA...SL.SQ.K...V	45
LG (15-45)	A.YT...SV....H.FS...SQ.AK.N....	45
jt.p3.x (15-45)	V.YT...SQ...H.QSVT.F.TQ.PA.R....	45
us4.tc (15-45)	H.YT...TV...S.Q.LVGFLSP.P...N....	45
jk1 (15-45)	T.Y.SV.H.SQ...RRVA.F.SP.SA.K...V	45
hpcvjk4.p (15-45)	T.T.S..H.SQI.R.VT.F.SP.SA.K...V	45
hpce2cor.p (15-45)	K.SL..VTR..AAARLTA..SS.P...R....	45
hpcns34d.p (15-45)	G.SL...AR...AAS.LAG..SS.P...R....	45
FT0.1 (15-45)	V.Q.SPPQ.GY...SVLTGILSP.AK.N...V	45
Gj6.1 (15-45)	V.Q.S...Q.GY...SVLTGILSP.AK.N...V	45
re7 (15-45)	G.YTV..AS.F..SRLT...AL.P...R...V	45
hcvkf (16-46)	N.HTV..TEGFA.QRLT...AL.P...K....	46
arg2.tc (15-45)	S.RTA..AQ.FN.Y.VA.I.SP.P...R...V	45
hcj6 (15-45)	Q.HTV..ST.HNARTLTGM.SL.AR.K....	45
hpchcj5.p (15-45)	N.RTVA.S...A...R.FT.M.SS.SK.NL...	45
rs1.pep (15-45)	Q.RTV..QVGHSVR.FT...SA.SA.N....	45
re71 (15-45)	E.HT...AVSGH..NVLT...SS.S...N....	45
re6 (15-45)	V.RT...EV....ANTFA...TT.P...N...I.	45
hcj8.pep (15-45)	T.YSS.QE.G...VA.FAG..TT.AK.NLY..	45
re40 (15-45)	S.S.V...RQ.SA.FRFT.F.SR.PT.E.K...	45
hpcencr.p (15-45)	N.YT.A.SM.QSIYRLTDI.ST.P...KL...V	45
re55b (15-45)	R.ILMA.RQ.EV.QSFPG..SLAP..K.H...	45
aus1.tc (15-45)	D.YA...SV.SIMA.IARF.SP.AR.D....	45
PC2.1 (15-44)	E.YA..AS.GHDVSSFAR..AP.AR.N....-	44
hct23 (15-45)	E.HR...S...S.A.VA...TP.AR.N....	45
re34 (15-45)	N.RAV.MVQS...YALT...DS.AA.KL...V	45

FIG. 2B

Hutchinson-Stämme		:	395	407	
H77	384	ETHVTGGSAGRTTAGLVGLLTPGAKQNIQLI	41	1977	
H90		-----SVL-IASF--R-P-----		1990	
HC-J4		Stämme :	395	407	
HPCJ483	384	ETYTSGGAASHTTSTLASLSPGASQRIQLV	414	1983	
J48711		A-----V-----RFT-----S-----			
J48712		A-----AV-----RFT-F--S-----			
J48713		A-----AV-----RFT-----S-----		1987	
J48714		A-----AV-----GFT-----S-----			
J48715		-----RV-G-----GFT-----S-----			
HPCJ491		A-----V-GR---GFT-----S---K---			
J49120		--H-T-RV-G---RFT-----S---K---			
J49121		--H-T-RVVG---GFT-----S---K---		1991	
J49122		--H-T-RV-GR---GFT-----S---K---			
J49126		T-----V-GR---GFT-----S---K---			
J49127		K-----RFT-----			
NY		Stämme :	395	407	
NY1.1	384	STRVTGGQQGRAVHGIASLFLGASQKIQLV	414	t ₀	
NY1.2		-----Q-F---R---E---			
NY1.3		-----N---			
NY2.1		-----H-A-SLT---R---N---		6mo	
NY2.2		-----H-A-SLT---R---N---			
NY3.1		N-----R---A-SLT---P---N---			
NY3.2		N-----R---A-SLT---P---N---		-8mo	
NY3.3		G-----R---A-SLT---P---EN-R---			
NY3.4		---S-----A-SLT---T---N---			
NY3.5		--H---AL---AY-T-FL-H-P-----			
NY4.1		--Q-M-----AYSL---L-P-N-----			
NY4.2		--Q-M-----AYSL---LGP-----		14mo	
NY4.3		--Q-M-----AYSL---L-P-----			
RS		Stämme :	395	407	
RS1.1.	384	RTRTVGGQVGHSVRGFTSLFSAGSAQNIQLI	414	t ₀	
RS1.2.		Q-----			
RS1.3.		Q-----D---			
RS2.4.		Q-----L-----		2mo	
RS3.1.		Q-----L-----		6mo	
RS4.1.		Q-----M-G---L-----R---			
RS4.2.		Q-H-----M-G---L-----		8mo	
RS5.1.		Q-H-----M-G---L-N-----		11mo	

FIG. 3

Aminosäureposition:

4
G.
F

* \$#	*	##	##	#	+	##	+	##	+	#	*	*	##	#	#	a	\$#	##					
384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407

% Konservierter AA-Charakter für jede AA-Position:

49 99 58 100 100 97 73 77 100 75 90 100 63 89 100 99 93 100 100 87 100 100

Erklärung

# \$	99-100%	identische Aminosäuren (nicht variant konserviert)
# #	100%	konservierte Aminosäuresubstitutionen (nicht variant konserviert)
#	90-99%	konservierte Aminosäuresubstitutionen
@	80-89%	konservierte Aminosäuresubstitutionen
±	70-79%	konservierte Aminosäuresubstitutionen
*	49-69%	konservierte Aminosäuresubstitutionen (hoch variabel)

12 Position mit den wenigsten konservierten Aminosäuresubstitutionen zu zeitlich aufeinanderfolgenden Punkten in einzelnen Patienten

Anmerkungen:

Positionen 403 (F, L), 406 (G, A) bzw. 407 (A, P, S) verwenden nur 2 oder 3 Aminosäuren von homologem Charakter.

Position 394 stellt die einzige stark konservierte basische Aminosäure dar, alle anderen sind konserviert bezüglich des hydrophoben Charakters und/oder der Größe im Falle der Aminosäureposition 407.

Position 398 scheint am wenigsten konserviert zwischen AA 395-407 in zeitlich aufeinanderfolgenden HCV-Isolaten in einzelnen Patienten (vgl. Fig. 3)

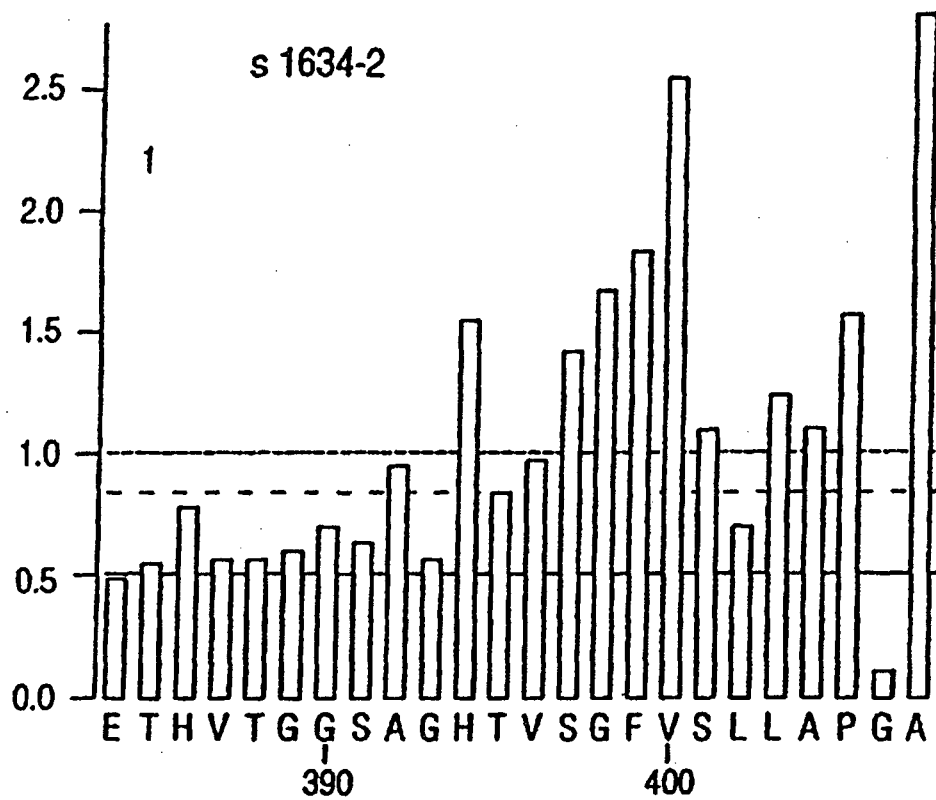


FIG.5A

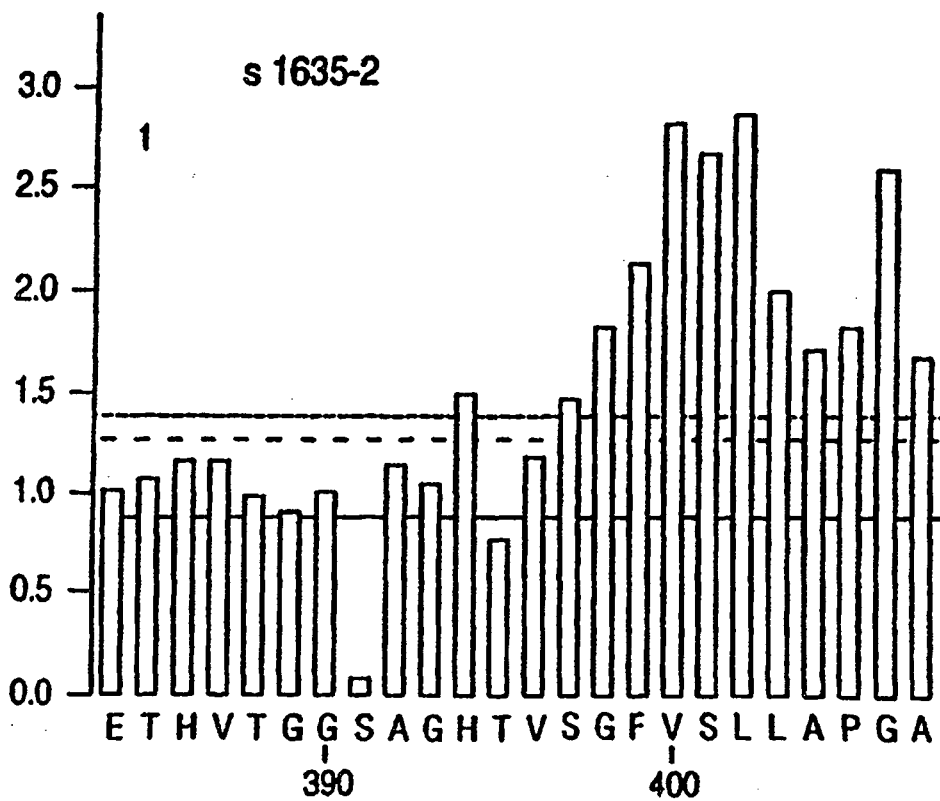


FIG.5B

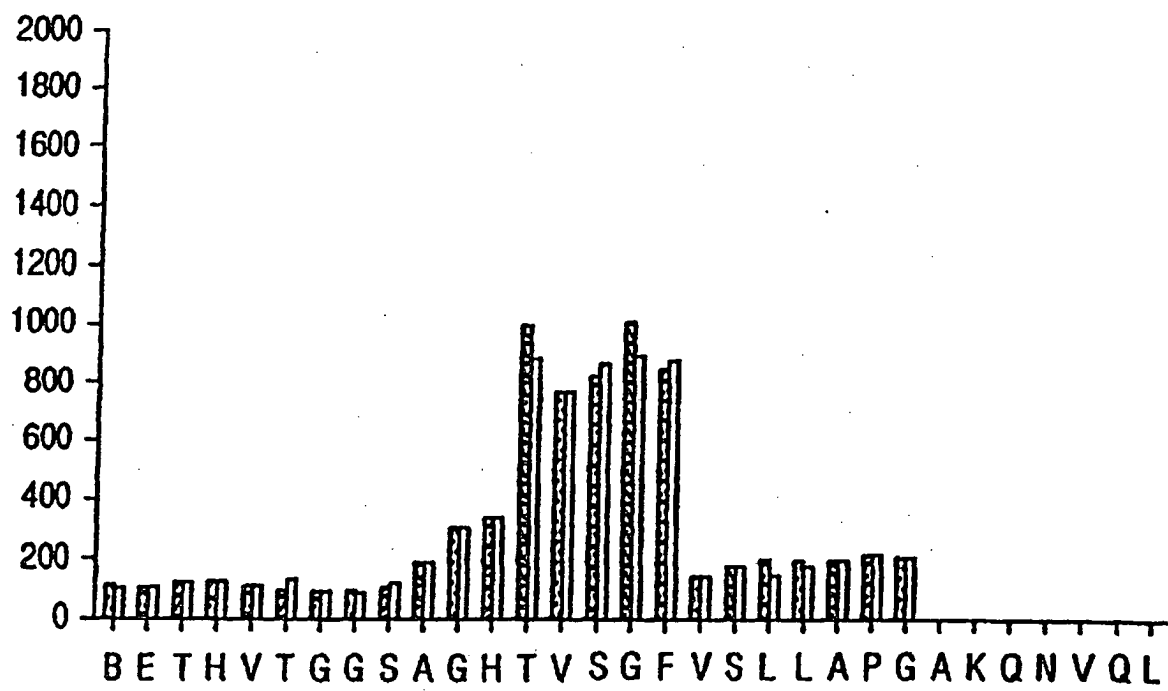


FIG.6

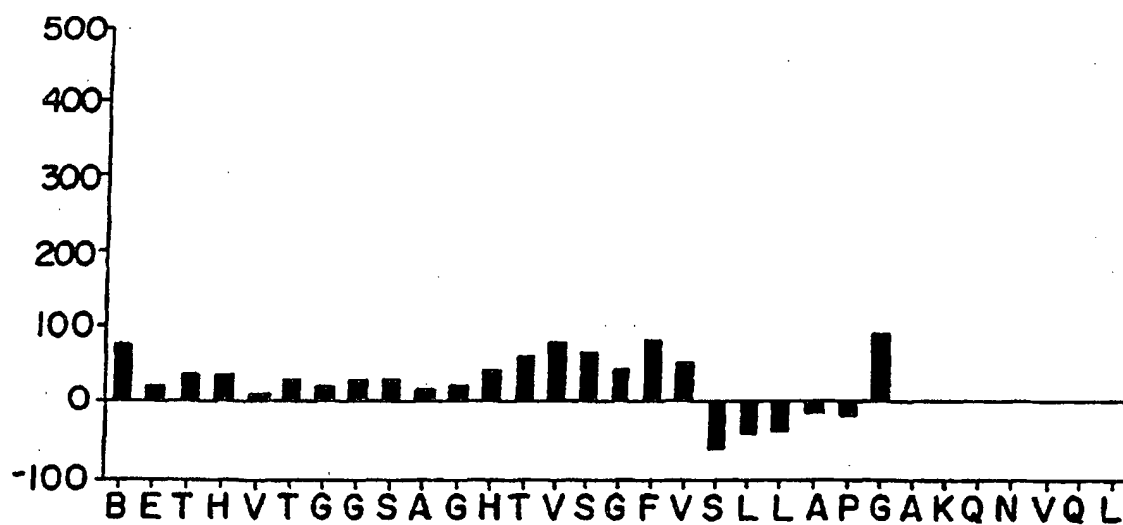


FIG.7A

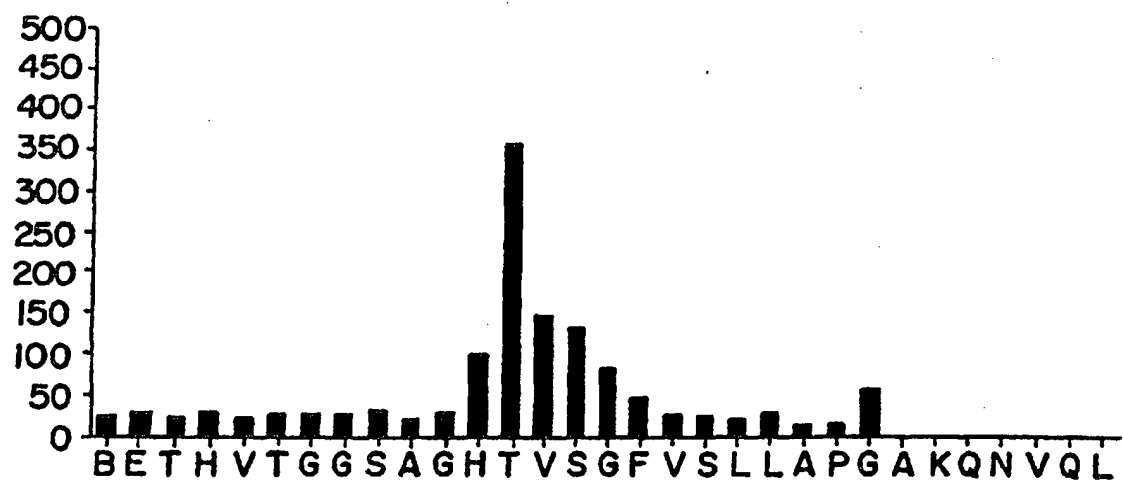


FIG.7B

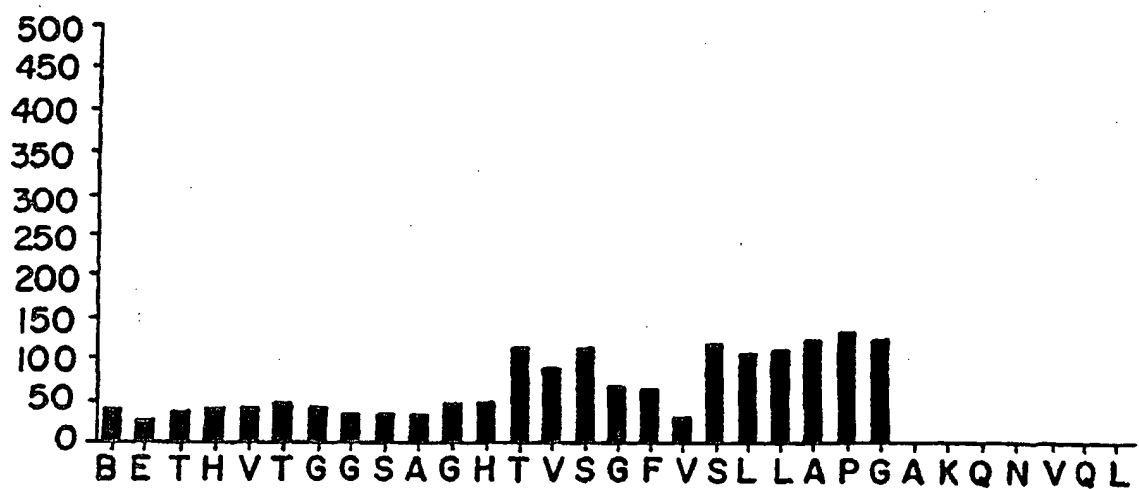


FIG.7C