



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 695 33 067 T2 2005.05.12

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 0 787 190 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 695 33 067.5

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US95/13703

(96) Europäisches Aktenzeichen: 95 940 546.5

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 96/012807

(86) PCT-Anmeldetag: 23.10.1995

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 02.05.1996

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 06.08.1997

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 19.05.2004

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 12.05.2005

(51) Int Cl.⁷: C12N 15/40

C07K 14/08, G01N 33/569, A61K 39/12

(30) Unionspriorität:

327952 24.10.1994 US

542634 13.10.1995 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:

Genelabs Technologies, Inc., Redwood City, Calif.,
US

(72) Erfinder:

FUERST, R., Thomas, San Antonio, US; McATEE, Patrick, C., Mountain View, US; YARBOUGH, O., Patrice, Fremont, US; ZHANG, Yi-Fan, Mountain View, US

(74) Vertreter:

LEINWEBER & ZIMMERMANN, 80331 München

(54) Bezeichnung: HEPATIS E-VIRUS ANTIGENE UND DESSEN VERWENDUNGEN

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 eingelebt, 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**Gebiet der Erfindung**

[0001] Diese Erfindung betrifft Antigene, die von einem enterisch übertragenen nonA/nonB-Hepatitis-Virus-
reger stammen, der hierin auch als Hepatitis-E-Virus (HEV) bezeichnet wird, und betrifft Diagnoseverfahren,
Diagnosetests, Vakzinezusammensetzungen und Vakzineverfahren, die solche Antigene einsetzen.

Literaturverzeichnis

Arankalle, V. A., et al., *The Lancet* 550 (12. März 1988)

Ausubel, F. M., et al., *CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY*, John Wiley and Sons, Inc., Media PA.

Beames, et al., *Biotechniques* 11: 378 (1991).

Bradley, D., et al., *J. Gen. Virol.* 69: 731 (1988).

Bradley, D. W., et al., *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, 84: 6277–6281 (1987).

Chauhan, et al., *Lancet*, 341: 149 (1993).

Chomczynski, P., et al., *Anal. Biochem.* 162: 156 (1987).

Cleland, W. W., *Biochem.* 3: 480–495 (1964).

Earl, P. L., et al., "Expression of proteins in mammalian cells using vaccinia" In *CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY* (F. M. Ausubel, et al. Hrsg.), Greene Publishing Associates & Wiley Interscience, New York (1991).

Elliott, J. I., et al., *Anal. Biochem.* 211: 94–101 (1993).

Gellissen, G., et al., *Antonie Van Leeuwenhoek*, 62(1–2): 79–93 (1992).

Goeddel, D. V., *Methods in Enzymology* 185 (1990).

Guthrie, C., and G. R. Fink, *Methods in Enzymology* 194 (1991).

Harlow, E., et al., *ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988).

Haynes, J., et al., *Nuc. Acid. Res.* 11: 687–706 (1983).

Huang, C-C., et al., *Virology*, 191: 550–558 (1992).

Kaufman, R. J., "Selection and coamplification of heterologous genes in mammalian cells," in *METHODS IN ENZYMOLOGY*, vol. 185, S. 537–566. Academic Press, Inc., San Diego CA (1991).

Kawasaki, E. S., et al., in *PCR TECHNOLOGY: PRINCIPLES AND APPLICATIONS OF DNA AMPLIFICATION* (H. A. Erlich, ed.) Stockton Press (1989).

Khuroo, M. S., *Am. J. Med.*, 48: 818 (1980).

Khuroo, M. S., et al., *Am. J. Med.* 70: 58 (1981).

Koonin, E. V., et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 89: 8259 (1992).

Krawczynski, K. and D. W. Bradley, *J. Inf. Diseases* 159: 1042–1049 (1989).

Lanford, R. E., et al., *In Vitro Cellular and Devel Biol*, 25(2): 174 (1989).

Lau, Y. F., et al., *Mol. Cell. Biol.* 4: 1469–1475 (1984).

Maniatis, T., et al., *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL*, Cold Spring Harbor Laboratory (1982).

McCaustland, K., et al., *J. Virological Methods* 35: 331–342 (1991).

Moss, B., et al., *CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY* (Abschnitt IV, Einheit 16) (1991).

Moss, B., et al., U.S. Patent Nummer 5,135,855, ausgegeben am 4. August 1992.

Mullis, K. B., U.S. Patent Nr. 4,683,202, ausgegeben am 28. Juli 1987.

Mullis, K. B., et al., U.S. Patent Nr. 4,683,195, ausgegeben am 28. Juli 1987.

Pearson, W. R. and Lipman, D. J., *PNAS* 85: 2444–2448 (1988).

Pearson, W. R., *Methods in Enzymology* 183: 63–98 (1990).

Purdy, M. A., et al., *J. Medical Virology* 41: 90–94 (1993).

Reyes, G., et al., *Science* 247: 1335 (1990).

Reyes, G. R., *Arch. Virol. Supp. (Review)* 7: 15 (1993).

Reilly, P. R., et al., *BACULOVIRUS EXPRESSION VECTORS: A LABORATORY MANUAL* (1992).

Romanos, M. A., et al., *Yeast* 8(6): 423–488 (1992).

Rosenfeld, J., et al., *Anal. Biochem.* 203: 173–185 (1992).

Rozanov, M. N., et al., *J. Gen. Virol.*, 73: 2129 (1992).

Sambrook, J., et al., *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL*, Cold Spring Harbor Laboratory (1989).

Schagger, E. and von Jagow, O., *Anal. Biochem.* 166: 368–379 (1987).

Scoble, H. A., et al., in *A PRACTICAL GUIDE TO PROTEIN AND PEPTIDE PURIFICATION* (Matsudaira, P., Ed.) Academic Press, NY S. 125–153 (1993).

Smith, D. B., et al., Gene 67: 31 (1988).

Summers, M. D., et al., A MANUAL OF METHODS FOR BACULOVIRUS VECTORS AND INSECT CELL CULTURE PROCEDURES, Texas Agricultural Experimental Station Bulletin Nr. 1555, 1988.

Tam, A., et al., Virology, 185: 120–131 (1991-a).

Tam, A., et al., "Hepatitis E virus: cDNA isolation and sequencing," In Hollinger, F. B. et al. (Hrsg.) VIRAL HEPATITIS AND LIVER DISEASE Williams and Wilkens, Baltimore, S. 521–524 (1991-b).

Tsarev, S. A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 559–563 (1992).

Velazquez, O., et al., JAMA 263: 3281–3285 (1990).

Wang, A. M., et al. in PCR PROTOCOLS: A GUIDE TO METHODS AND APPLICATIONS (M. A. Innis, et al., Hrsg.) Academic Press (1990).

Williams, K. R. and Stone, K. L., in TECHNIQUES IN PROTEIN CHEMISTRY VI (Crabb, J., Ed.) Academic Press, NY S. 143–153 (1995).

Yarbough, P. O., "Serology of HEV in developed and developing countries," INTERaction 2: 15–17 (1994).

Yarbough, P. O., et al., J. Virology 65: 5790–5797 (1991).

Yarbough, P. O., et al., "Assay Development of Diagnostic Tests for Hepatitis E," In VIRAL HEPATITIS AND LIVER DISEASE, Hrsg. K. Nishioka, H. Suzuki, S. Mishiro, T. Oda, S. 367–370 (1994).

Hintergrund der Erfindung

[0002] Der enterisch übertragene non-A/non-B-Hepatitis-Viruserreger (ET-NANB; hierin auch als HEV bezeichnet) ist die berichtete Ursache von Hepatitis in mehreren Epidemien und sporadischen Fällen in Asien, Afrika, Europa, Mexiko und am Indischen Subkontinent. Die Infektion erfolgt üblicherweise durch mit Fäkalien verunreinigtes Wasser, obgleich es manche Belege von Übertragungen von Person auf Person gibt. Das Virus scheint keine chronische Infektion zu verursachen. Die Virusätiologie bei ET-NANB ist durch Infektion von Freiwilligen mit gepoolten Fäkalienisolaten nachgewiesen worden; immunoelektronenmikroskopische (IEM-)Untersuchungen haben Virusteilchen mit Durchmessern von 27–34 nm im Stuhl von infizierten Individuen nachgewiesen. Die Virusteilchen reagierten mit Antikörpern im Serum von infizierten Individuen aus geographisch unterschiedlichen Regionen, was nahe legt, dass ein einziger Viruserreger oder eine einzige Virusklasse für den Großteil der weltweit beobachteten ET-NANB-Hepatitis verantwortlich ist. Keine Antikörperreaktion wurde im Serum aus Individuen beobachtet, die mit parenteral übertragenem NANB-Virus (auch als Hepatitis-C-Virus oder HCV bekannt) infiziert waren, was auf eine unterschiedliche Spezifität zwischen den beiden NANB-Typen hinweist.

[0003] Zusätzlich zu serologischen Unterschieden zeigen die beiden Typen der NANB-Infektion deutliche klinische Unterschiede. ET-NANB ist charakteristischerweise eine akute Infektion, die häufig mit Fieber und Arthralgie sowie mit Pfortaderentzündung und assoziierter Gallenflusstauung in Leberbiopsieproben verbunden ist (Arankalle (1988)). Symptome lösen sich üblicherweise innerhalb von sechs Wochen auf. Parenteral übertragene NANB ruft im Gegensatz dazu eine chronische Infektion in ungefähr 50% der Fälle hervor. Fieber und Arthralgie werden selten beobachtet, und die Entzündung weist eine vorwiegend parenchymatöse Verteilung auf (Khuroo (1980)). Der Verlauf von ET-NANB ist in gesunden Individuen im Allgemeinen ereignislos, und die überwiegende Mehrheit dieser Infizierten erholt sich ohne die bei HCV beobachteten chronischen Folgeerscheinungen. Gelegentlich kann der Krankheitsverlauf jedoch ernst sein, wie neulich von einem menschlichen Freiwilligen gezeigt worden ist (Chauhan (1993)). Eine der besonderen epidemiologischen Eigenschaften dieser Krankheit ist jedoch die bei schwangeren Frauen beobachtete, ausgesprochen hohe Sterblichkeit; in zahlreichen Studien wird berichtet, dass diese Sterblichkeit in der Größenordnung von 10–20% liegt (Khuroo (1981), Reyes (1993)). Dieser Befund ist in einer Reihe von epidemiologischen Studien beobachtet worden, kann jedoch zurzeit nicht erklärt werden. Ob diese die virale Pathogenität die letale Konsequenz der Wechselwirkung zwischen Virus und immunosupprimiertem (schwangerem) Wirt widerspiegelt oder eine Widerspiegelung der geschwächten pränatalen Gesundheit einer anfälligen fehlernährten Population ist, bleibt abzuklären.

[0004] Die beiden Viruserreger können auch auf Basis der Primatenwirt-Empfänglichkeit unterschieden werden. ET-NANB, nicht jedoch der parenteral übertragene Erreger kann auf Cynomolgus-Affen übertragen werden. Der parenteral übertragene Erreger wird auf Schimpansen leichter übertragen als ET-NANB (Bradley (1987)).

Zusammenfassung der Erfindung

[0005] Die vorliegende Erfindung umfasst eine Hepatitis-E-Virus-(HEV-)Polypeptidzusammensetzung, die aus zumindest einem Polypeptid besteht, das aus den carboxyterminalen 549 Aminosäuren des offenen Leserasters (ORF) 2 von HEV besteht, wobei bei diesem Polypeptid zumindest eine Aminosäure des Carboxy-

terminus der 549 Aminosäuren deletiert ist. In einer der Ausführungsformen enthält zumindest ein Polypeptid der Zusammensetzung eine carboxyterminale Deletion von bis zu etwa 24 carboxyterminalen Aminosäuren des 549 Aminosäuren umfassenden HEV-ORF2-Polypeptids. Beispielhafte Polypeptide umfassen, sind jedoch nicht eingeschränkt auf die folgenden: Seq.-ID Nr. 15, Seq.-ID Nr. 16, Seq.-ID Nr. 25, Seq.-ID Nr. 26, Seq.-ID Nr. 27, Seq.-ID Nr. 28 und Sequenzen, die zu den hierin dargestellten homolog sind.

[0006] In einer ihrer Ausführungsformen umfasst die Zusammensetzung der vorliegenden Erfindung zumindest zwei derartige Polypeptide, beispielsweise zwei Polypeptide, welche die als Seq.-ID Nr. 25 und Seq.-ID Nr. 27 oder Seq.-ID Nr. 26 und Seq.-ID Nr. 28 dargestellten Sequenzen aufweisen (homologe Sequenzen sind ebenfalls umfasst).

[0007] In einer anderen Ausführungsform umfasst die Erfindung einen Expressionsvektor zur Produktion einer Hepatitis-E-Virus-Polypeptidantigenzusammensetzung. Ein solcher Vektor enthält eine Nucleinsäuresequenz, die für ein Polypeptid kodiert, das aus den carboxyterminalen 549 Aminosäuren des offenen Leserasters 2 von HEV besteht, wobei zumindest eine Aminosäure im Carboxyterminus der 549 Aminosäuren des Polypeptids deletiert ist, wobei die Nucleinsäuresequenz (i) in einen Expressionsvektor insertiert wird und (ii) operabel an einen Promotor gebunden ist, der zur Initiation der Transkription in einer gewählten Wirtszelle fähig ist. Der Expressionsvektor kann in einem Expressionssystem enthalten sein, das den Expressionsvektor in eine geeignete Wirtszelle transportiert, wobei die Wirtszellen die Expression der Polypeptide der Erfindung ermöglichen. In einer ihrer Ausführungsformen umfasst das Expressionssystem einen Baculovirus-Expressionsvektor, wobei die Wirtszelle eine Insektenzelle ist. Zahlreiche zweckdienliche Expressionsvektoren und Systeme sind dem Fachkundigen auf dem Gebiet der Erfindung bekannt und werden hierin beschrieben.

[0008] In einer weiteren Ausführungsform umfasst die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Produktion einer Hepatitis-E-Virus-(HEV-)Polypeptidzusammensetzung durch Züchten einer Insektenzelle, die einen oben beschriebenen Expressionsvektor enthält unter Bedingungen, die hinreichend sind, um ein Polypeptid zu exprimieren, das aus den 549 carboxyterminalen Aminosäuren des offenen Leserasters von HEV besteht, wobei zumindest eine Aminosäure im Carboxyterminus der 549 Aminosäuren deletiert ist. Eine solche Zusammensetzung kann zumindest ein Polypeptid enthalten, das eine Aminosäuresequenz aufweist, die aus der aus Seq.-ID Nr. 15, Seq.-ID Nr. 16, Seq.-ID Nr. 25, Seq.-ID Nr. 26, Seq.-ID Nr. 27, Seq.-ID Nr. 28 und dazu homologen Sequenzen bestehenden Gruppe gewählt ist.

[0009] Die vorliegende Erfindung umfasst außerdem ein weiteres Verfahren zur Produktion einer Hepatitis-E-Virus-(HEV-)Polypeptidzusammensetzung („62K-Antigen“). Bei diesem Verfahren wird eine Zelle, die einen der oben beschriebenen Expressionsvektoren enthält, unter Bedingungen gezüchtet, die hinreichend sind, um ein Polypeptid zu exprimieren, das aus den carboxyterminalen 549 Aminosäuren des offenen Leserasters 2 von HEV besteht, wobei zumindest eine Aminosäure im Carboxyterminus der 549 Aminosäuren deletiert ist.

[0010] Die Erfindung umfasst weiters ein Verfahren zur Detektion einer Hepatitis-E-Virusinfektion in einem Individuum. Bei diesem Verfahren wird eine Hepatitis-E-Virus-(HEV-)Polypeptidzusammensetzung, die aus zumindest einem Polypeptid besteht, das aus den carboxyterminalen 549 Aminosäuren des offenen Leserasters 2 von HEV besteht, wobei zumindest eine Aminosäure im Carboxyterminus der 549 Aminosäuren deletiert ist, mit einer aus dem Individuum entnommenen Serumprobe umgesetzt. Die HEV-Polypeptide werden dann auf die Gegenwart von gebundenem Antikörper untersucht. Bei diesem Verfahren werden die Polypeptide der HEV-Polypeptidzusammensetzung an einen festen Träger gebunden, wobei die Umsetzung das Kontaktieren eines solchen Serums mit dem Träger umfasst und die Untersuchung das Umsetzen von Träger und gebundenem Antikörper mit einem reportermarkierten Anti-Human-Antikörper umfasst. Die Erfindung umfasst außerdem ein Set zum Nachweisen der Gegenwart von Antikörpern gegen HEV in einer einem Individuum entnommenen Serumprobe. Typischerweise umfasst das Set einen festen Träger mit oberflächengebundenen Antigenen, worin die oberflächengebundenen Antigene Polypeptide der hierin beschriebenen HEV-Polypeptid-(„62K-Antigen“)-Zusammensetzung sind.

[0011] Weiters umfasst die Erfindung Vakzinezusammensetzungen, welche die HEV-Polypeptidantigene der vorliegenden Erfindung einsetzen. Eine Vakzinezusammensetzung, die bei der Immunisierung eines Individuums gegen Hepatitis-E-Virus (HEV) verwendet wird, enthält zumindest ein Polypeptid, das aus den carboxyterminalen 549 Aminosäuren des offenen Leserasters 2 von HEV besteht, wobei zumindest eine Aminosäure im Carboxyterminus der 549 Aminosäuren deletiert ist. Die Polypeptide der vorliegenden Erfindung können in einen pharmazeutisch annehmbaren Träger formuliert werden. In einer der Ausführungsformen enthält zumindest ein Polypeptid der Vakzinezusammensetzung eine carboxyterminale Deletion von bis zu etwa 24 carboxyterminalen Aminosäuren des HEV-ORF2-Polypeptids mit 549 Aminosäuren. Beispielhafte Polypeptide um-

fassen, sind jedoch nicht eingeschränkt auf, die folgenden: Seq.-ID Nr. 15, Seq.-ID Nr. 16, Seq.-ID Nr. 25, Seq.-ID Nr. 26, Seq.-ID Nr. 27, Seq.-ID Nr. 28 und Sequenzen, die zu den hierin präsentierten homolog sind. Die Erfindung umfasst außerdem ein Verfahren zur Hemmung der Infektion eines Individuums durch HEV. Bei diesem Verfahren wird eine Vakzinezusammensetzung der vorliegenden Erfindung unter Verwendung einer therapeutisch wirksamen Menge an einen Patienten verabreicht.

[0012] Die Erfindung umfasst außerdem Sets, welche die Polypeptide der HEV-Polypeptidzusammensetzung der vorliegenden Erfindung enthalten, zur Verwendung bei der praktischen Umsetzung der oben beschriebenen Verfahren.

[0013] In einer weiteren Ausführungsform umfasst die vorliegende Erfindung eine Hepatitis-E-Virus-(HEV-)Polypeptidzusammensetzung, die aus zumindest einem Polypeptid besteht, das aus den carboxy-terminalen 549 Aminosäuren des offenen Leserasters (ORF) 2 von HEV besteht, wobei zumindest eine Aminosäure im Carboxyterminus der 549 Aminosäuren deletiert ist, wobei das/die Polypeptid(e) der Zusammensetzung fähig ist/sind, virusartige Teilchen (VLPs) auszubilden.

[0014] Diese und andere Ziele und Merkmale der Erfindung werden verständlicher, wenn die folgende ausführliche Beschreibung der Erfindung gemeinsam mit den begleitenden Figuren gelesen wird.

Kurzbeschreibung der Abbildungen

[0015] [Fig. 1](#) stellt eine schematische Grafik des genomischen Aufbaus von HEV dar und zeigt das HEV-Genom, die Anordnung der offenen Leseraster im Genom und die ungefähren kodierenden Regionen für HEV-Antigene 406.3-2, 406.4-2, SG3 und 62K;

[0016] Die [Fig. 2A](#) bis [Fig. 2E](#) stellen die Nucleotidsequenz von ORF2 und ORF3 dar und zeigen die Nucleotidsequenzen von HEV-ORF2 und -ORF3 für Burma-(obere Zeile) und Mexiko-(untere Zeile)HEV-Stämme;

[0017] [Fig. 3](#) stellt die Aminosäuresequenz von ORF3 dar und zeigt die Aminosäuresequenzen des ORF3-Proteins für Burma-(obere Zeile) und Mexiko-(untere Zeile)HEV-Stämme;

[0018] Die [Fig. 4A](#) und [Fig. 4B](#) stellen die Aminosäuresequenz von ORF2 dar und zeigen die Aminosäuresequenzen des ORF2-Proteins für Burma-(obere Zeile) und Mexiko-(untere Zeile)HEV-Stämme sowie den Aminoterminus für jedes der 62K-, C-2-, SG3-, 406.3-2-Antigene;

[0019] [Fig. 5](#) stellt eine schematische Grafik der Konstruktion eines Plasmids zur Expression des neu konstruierten r62K-Antigens in Baculovirus dar und zeigt ein Flussdiagramm der Konstruktion von pBBIII-62K. Die Balken stellen die für r62K kodierenden DNA-Fragmente dar.

[0020] Die [Fig. 6a](#) und [Fig. 6b](#) stellen Daten dar, welche die Erzeugung von ORF2-73K-Protein voller Länge in Sf9-Suspensionskultur und die Spaltung von 73K betreffen, um die 62K-Spezies in Sf9-Monolayer-Zellen zu bilden. [Fig. 6a](#) zeigt PBS-lösliche (S) und -unlösliche (I) Proteine aus dem Lysat von mit rekombinantem Baculovirus infizierten Sf9-Suspensionskulturzellen, wobei ORF2-rAcMNPV an verschiedenen Tagen nach der Infektion (DPI) mittels SDS-PAGE analysiert wurde. Der Pfeil zeigt auf das produzierte rekombinante ORF-2-Protein. [Fig. 6b](#) ist im Wesentlichen mit [Fig. 6a](#) identisch mit der Ausnahme, dass Immunoblotting anstelle von Coomassieblauauffärbung durchgeführt wurde. Die Pfeile zeigen auf die Migration von 73K- bzw. 62K-Proteinen.

[0021] [Fig. 7](#), „Proteolytische Spaltung von HEV-ORF2-Protein in vitro“, zeigt die In-vitro-Spaltung des unlöslichen (I) 73K-ORF2-Proteins voller Länge zum löslichen (S) 62K-Protein zu verschiedenen Zeitpunkten. Die Gegenwart (+) oder Abwesenheit (-) von Proteinaseinhibitoren ist bezeichnet.

[0022] [Fig. 8](#), „73–62K-Umsetzung durch Sf9-Suspensionskulturzellen“, ist ein Vergleich der Spaltung von 73K zu 62K zwischen den löslichen Extrakten von mit Baculovirus der Wildform infizierten (obere Tafel) Suspensionskulturzellen oder jenen von nicht infizierten (untere Tafel) Suspensionskulturzellen. Die Beladung der Proben in den beiden äußersten rechten Bahnen der unteren Tafel wurde vertauscht.

[0023] [Fig. 9](#), „73K-ORF2-Prozess-Gel“, zeigt verschiedene Fraktionen, die während des Reinigungsprozesses von 73K entnommen und an einer 4- bis 20%igen SDS-PAGE getrennt wurden, sowie den entsprechenden Western-Blot. Bahn 1, Hyper-D-S-Beladung; Bahn 2, vereinigte Fraktionen pH 8,5; Bahn 3, Eluat pH 7,5; Bahn

4, Eluat pH 8,5; Bahn 5, BioRad-MW-Standards; Bahn 6, Hyper-D-S-Beladung; Bahn 7, vereinigte Fraktionen pH 8,5; Bahn 8, Eluat pH 7,5; Bahn 9, Eluat pH 8,5; Bahn 10, Promega-MW-Standards. MW-Standards (Promega mittlerer MW-Bereich) wie folgt (von oben nach unten): Phosphorylase B, 97 kDa; BSA, 66 kDa; Glutamindehydrogenase, 55 kDa; Ovalbumin, 43 kDa; Aldolase, 40 kDa; Carboanhydrase, 31 kDa; Sojabohnentrypsininhibitor, 21 kDa; Lysozym, 14 kDa. Bahnen 1–5, nicht reduzierende Bedingungen; Bahnen 6–10, mit Beta-Mercaptoethanol im Probenherstellungspuffer reduziert.

[0024] [Fig. 10](#), „Endgültiges gereinigtes 62K“, zeigt gereinigtes lösliches c62K-Protein, aufgetrennt an einer 4- bis 20%igen SDS-PAGE. Bahn 1, Novex „SeeBlue™“-vorgefärbte MW-Standards; Bahn 2, endgültiges gereinigtes c62K-Protein; MW-Standards im folgenden Bereich (von oben nach unten): Myosin, 250 kDa; BSA, 98 kDa; Glutamindehydrogenase, 64 kDa; Alkoholdehydrogenase, 50 kDa; Carboanhydrase, 36 kDa; Myoglobin, 30 kDa; Lysozym, 16 kDa; Aprotinin, 6 kDa, Insulin-B-Kette, 4 kDa. Das Reinigungsverfahren für c62K ist in Beispiel 6B ausführlich beschrieben.

[0025] Die [Fig. 11a](#) und [Fig. 11b](#) zeigen einen Vergleich zwischen elektronenmikroskopischen Abbildungen der gereinigten rekombinanten ORF2-Proteine c62K bzw. 73K. Die Vergrößerung in [Fig. 11a](#) beträgt $\times 95.000$, in [Fig. 11b](#) $\times 200.000$. [Fig. 11b](#) zeigt die Bildung virusartiger Teilchen durch das 73K-Protein.

[0026] [Fig. 12](#), „Expression von ORF2-62K in Baculovirus“, zeigt die Expression mehrerer Isolate von BBI-II-62K in Suspensionskulturzellen.

[0027] [Fig. 13](#), „S-1000-Chromatographie“, zeigt die Bestimmung der Viruspartikelgröße von neu konstruiertem r62K und gespaltenem c62K mittels Sephadryl-S-1000-Größenausschlusschromatographie. Virusteilchen-Standards (Vaccinia-Virus und Hepatitis-B-Oberflächenantigen, HBsAg), Rinderserumalbumin (BSA) und gereinigte c62K- und r62K-Präparate wurden der Chromatographie an einer mit Sephadryl-S-1000-Superfine-Harz gepackten Waters-AP-2-Säule von 2×60 cm bei einer linearen Oberflächengeschwindigkeit von 120 cm/Stunde unterzogen. Retentionszeiten (Minuten) und relative Absorption (280 nm) sind für die einzelnen Proben bezeichnet.

[0028] Die [Fig. 14A](#) und [Fig. 14B](#) stellen die Ergebnisse einer Analyse des Reinigungsverfahrens für r62-K unter Verwendung von 4- bis 20%iger SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ([Fig. 14A](#)) und eines entsprechenden Western-Blots ([Fig. 14B](#)) dar.

[0029] [Fig. 15](#) stellt Ergebnisse dar, welche die Gegenwart neutralisierender Antikörper in mit r62K-HEV-Antigen inkulierten Cyano-Affen nachweisen.

[0030] [Fig. 16](#) zeigt einen Homologievergleich zwischen Burma-(B-) und Mexiko-(M-)Stämmen für das 406.4-2-Antigen.

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

I. Definitionen

[0031] Die unten definierten Ausdrücke haben hierin die folgenden Bedeutungen:

A. Unter „enterisch übertragenem non-A/non-B-Hepatitis-Virusreger“, „Hepatitis-E-Virus“ oder „HEV“ wird ein Virus, Virustyp oder eine Virusklasse verstanden, das/der/die (i) durch Wasser übertragene infektiöse Hepatitis verursacht, (ii) auf Cynomolgus-Affen übertragbar ist, (iii) sich vom Hepatitis-A-Virus (HAV), Hepatitis-B-Virus (HBV), Hepatitis-C-Virus (HCV) und Hepatitis-D-Virus (HDV) serologisch unterscheidet und (iv) eine genomische Region umfasst, die zum 1,33-kb-cDNA-Insert im Plasmid pTZKF1(ET1.1) homolog ist, das im durch die ATCC-Zugriffsnummer 67717 identifizierten E.-coli-Stamm BB4 vorliegt.

B. „HEV-Varianten“ sind als Virusisolale definiert, die zumindest ungefähr 40%, vorzugsweise 50% und bevorzugter 70% Gesamtsequenzhomologie, d. h. Sequenzidentität über eine Länge der Virusgenom-Polynucleotidsequenz (z. B. ORF2) mit bekannten, hierin offenbarten Polynucleotidsequenzen (z. B. Seq.-ID Nr. 1 oder Seq.-ID Nr. 2) aufweisen.

„Sequenzhomologie“ wird im Wesentlichen wie folgt ermittelt: Zwei Polynucleotidsequenzen derselben Länge (vorzugsweise das gesamte Virusgenom) werden als homolog zueinander betrachtet, wenn bei Angleichung unter Verwendung des ALIGN-Programms über 40%, vorzugsweise 50% oder bevorzugter 70% der Nucleinsäuren in der am höchsten bewerteten Angleichung identisch angeglichen sind, und zwar unter Verwendung einer ktup von 1, von Standardparametern und der Standard-PAM-Matrix.

Das ALIGN-Programm findet sich im FASTA-Version-1.7-Paket von Sequenzvergleichsprogrammen (Pear-

son et al. (1988); Pearson (1990); Programm erhältlich von William R. Pearson, Department of Biological Chemistry, Box 440, Jordan Hall, Charlottesville, VA).

Bei der Ermittlung, ob zwei Viren „höchst homolog“ zueinander sind, wird die vollständige Sequenz aller Virusproteine für ein Virus optimal in ihrer Gesamtheit an die Virusproteine oder Polyproteine des anderen Virus angeglichen, indem das ALIGN-Programm des obigen Programmpekts mit einer ktup von 1, den Standardparametern und der Standard-PAM-Matrix verwendet wird. Regionen der Unähnlichkeit oder Ähnlichkeit werden nicht von der Analyse ausgeschlossen. Unterschiede hinsichtlich der Längen zwischen den beiden Sequenzen werden als Fehlanpassungen betrachtet. Alternativ dazu werden Virusstrukturproteinregionen typischerweise verwendet, um die Verwandtschaft zwischen Virusisolaten zu bestimmen. Höchst homologe Viren weisen eine Gesamtpolypeptidsequenzidentität von über 40% oder vorzugsweise 50% oder bevorzugter 70% auf.

C. Zwei Nucleinsäurefragmente werden als „selektiv hybridisierbar“ an ein HEV-Polynucleotid betrachtet, wenn sie fähig sind, (1) spezifisch an HEV oder eine Variante davon zu hybridisieren oder (2) spezifisch eine Polymerasekettenreaktion zu primen: (i) unter typischen Hybridisierungs- und Waschbedingungen, wie beispielsweise in Maniatis et al., Seiten 320–328 und 382–389, beschrieben, (ii) unter Anwendung von Waschbedingungen verminderter Stringenz, die höchstens 25–30% Basenpaar-Fehlpaarungen erlauben, beispielsweise: 2 × SSC, 0,1% SDS, zweimal Raumtemperatur, zweimal je 30 Minuten; anschließend 2 × SSC, 0,1% SDS, 37°C, einmal 30 Minuten; anschließend 2 × SSC, zweimal bei Raumtemperatur, je 10 Minuten, oder (iii) Selektieren von Primern zur Verwendung in typischen Polymerasekettenreaktionen (PCR) unter Standardbedingungen (beispielsweise in R. K. Saiki; Mullis; Mullis et al.), die in der spezifischen Amplifikation von Sequenzen von HEV oder seiner Varianten resultiert.

Die oben erörterten Ausmaße an Homologie (Sequenzidentität) können durch Hybridisierung unter Verwendung von Waschbedingungen geeigneter Stringenz gewählt werden, und zwar zur Identifizierung von Klonen aus Genbibliotheken (oder anderen Quellen von genetischen Materials), wie auf dem Gebiet der Erfindung bekannt ist.

D. Ein „HEV-Polypeptid“ ist hierin als ein beliebiges Polypeptid definiert, das zu einem HEV-Polypeptid homolog ist. „Homologie“ ist bei Verwendung hierin wie folgt definiert. In einer der Ausführungsformen ist ein Polypeptid zu einem HEV-Polypeptid homolog, wenn es von Nucleinsäure kodiert wird, die selektiv an Sequenzen von HEV und oder seiner Varianten hybridisiert.

In einer weiteren Ausführungsform ist ein Polypeptid zu einem HEV-Polypeptid homolog, wenn es wie oben definiert von HEV oder seinen Varianten kodiert wird, wobei Polypeptide dieser Gruppe typischerweise größer als 15, vorzugsweise 25, bevorzugter 35 zusammenhängende Aminosäuren sind. Weiters werden für Polypeptide, die länger als ungefähr 60 Aminosäuren sind, Sequenzvergleiche zum Zwecke der Ermittlung von „Polypeptidhomologie“ unter Verwendung des Angleichungsprogramms LALIGN durchgeführt. Die Polypeptidsequenz wird gegen die HEV-Aminosäuresequenz oder beliebige ihrer Varianten wie oben definiert unter Verwendung des LALIGN-Programms mit einer ktup von 1 und Standardparametern und Standard-PAM verglichen.

Jegliches Polypeptid mit einer optimalen Angleichung von mehr als 60 Aminosäuren und mehr als 40%, vorzugsweise 50% oder bevorzugter 70% identisch angeglichenen Aminosäuren wird als ein „homologes Polypeptid“ betrachtet. Das LALIGN-Programm findet sich im FASTA-Version-1.7-Paket von Sequenzvergleichsprogrammen (Pearson et al. (1988); Pearson (1990); Programm erhältlich von William R. Pearson, Department of Biological Chemistry, Box 440, Jordan Hall, Charlottesville, VA).

E. Ein Polynucleotid ist „hergeleitet von“ HEV, wenn es dieselbe oder im Wesentlichen dieselbe Basenpaarsequenz wie die Region eines HEV-Genoms, einer cDNA von HEV oder Komplementen davon aufweist oder wenn es die unter „B“ oder „C“ erwähnte Homologe zeigt.

Ein Polypeptid oder Polypeptid-„Fragment“ ist „hergeleitet von“ HEV, wenn es (i) von einem offenen LeseRaster eines HEV-Polynucleotids hergeleitet ist oder (ii) die oben unter „B“ und „D“ erwähnte Homologie zu HEV-Polypeptiden zeigt oder (iii) spezifisch mit HEV-positiven Seren immunoreaktiv ist.

F. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung umfasst der Ausdruck „Nucleinsäuresequenzen“ bei Bezugnahme auf Sequenzen, die für ein Protein, Polypeptid oder Peptid kodieren, degenerierte Nucleinsäuresequenzen, die für homologe Protein-, Polypeptid- oder Peptidsequenzen sowie für die offenbare Sequenz kodieren.

G. Ein „Epitop“ ist eine Antigendeterminante, die als spezifischer Abschnitt eines Antigens definiert ist, mit dem der antigenbindende Abschnitt eines spezifischen Antikörpers in Wechselwirkung tritt. Die Ausdrücke „immunogene Reaktion“ oder „Epitop“ werden wechselseitig verwendet.

H. Ein Antigen oder Epitop ist „spezifisch immunoreaktiv“ mit HEV-positiven Seren, wenn das Epitop/Antigen an Antikörper bindet, die in HEV-infizierten Seren vorhanden sind, jedoch nicht an Antikörper bindet, die in den meisten (mehr als ungefähr 90%, vorzugsweise mehr als ungefähr 95%) Seren aus Individuen vorhanden sind, die nicht mit HEV infiziert sind oder mit HEV infiziert waren. „Spezifisch immunoreaktive“ Antigene oder Epitope können auch mit monoklonalen oder polyklonalen Antikörpern immunoreaktiv sein,

die gegen spezifische HEV-Epitope oder -Antigene erzeugt wurden.

Ein Antikörper oder eine Antikörperzusammensetzung (z. B. polyklonale Antikörper) ist „spezifisch immunoreaktiv“ mit HEV, wenn der Antikörper oder die Antikörperzusammensetzung mit einem HEV-Antigen immunoreaktiv ist, nicht jedoch mit einem nicht verwandten Hepatitis-Virus-(z. B. HAV-, HBV-, HCV- oder HDV-)Antigen. Weiters sind „spezifisch immunoreaktive Antikörper“ nicht mit Antigenen immunoreaktiv, die typischerweise in normalen Seren vorkommen.

I. Bei zwei oder mehr bekannten Peptidsequenzen, die hinsichtlich der Aminosäuresequenz nicht mehr als zu 70% homolog sind, ist eine dritte Aminosäuresequenz „mit den bekannten Sequenzen intern konsistent“, wenn jede Aminosäure in der dritten Sequenz mit zumindest einer der Aminosäuren in den bekannten Sequenzen identisch ist.

J. Das „Epitop, gebildet aus“ einer gegebenen Aminosäuresequenz ist das von der Sekundär/Tertiär-Struktur dieser Sequenz in wässriger Lösung gebildete Epitop.

K. Die „Antigenbindungsstelle“ ist jene Region eines Antikörpermoleküls, die in den variablen Regionen des Antikörpers enthalten ist, die direkt an der Bindung des Antigens teilnimmt.

L. Ein bestimmtes „Peptidantigen, enthaltend das Epitop, gebildet von“ einer bestimmten Aminosäuresequenz, umfasst die bestimmte Sequenz selbst oder einen Abschnitt davon, der hinreicht, um das in der bestimmten Sequenz vorliegende Epitop zu definieren, wie mittels Immunoreaktivität gegen einen in einer menschlichen Serumprobe vorhandenen Antikörper nachgewiesen werden kann. Das bestimmte Peptidantigen kann Aminosäuresubstitutionen umfassen, die das Epitop erhalten.

M. „Im Wesentlichen isoliert“ und „gereinigt“ werden in mehreren Zusammenhängen verwendet und beziehen sich typischerweise auf die zumindest teilweise Reinigung eines HEV-Virusteilchens, einer HEV-Viruskomponente (z. B. Polynukleotid oder Polypeptid) oder von damit in Beziehung stehenden Komponenten (z. B. Anti-HEV-Antikörper), um damit nicht in Beziehung stehende oder verunreinigende Komponenten (z. B. Serumzellen, Proteine, Nicht-HEV-Polynukleotide und Nicht-Anti-HEV-Antikörper) zu entfernen. Verfahren zur Isolation oder Reinigung von Verbindungen oder Komponenten von Interesse werden unten beschrieben (z. B. Reinigung von Proteinen und rekombinanter Produktion von HEV-Polypeptiden).

N. „62K-Antigen“ ist der allgemeine Ausdruck für ein Protein oder ein Gemisch von Proteinen, wobei das Protein oder die Proteine von den carboxyterminalen 549 Aminosäuren hergeleitet sind, die vom HEV-ORF2 kodiert werden (z. B. Seq.-ID Nr. 15 oder Seq.-ID Nr. 16 oder dazu homologe Sequenzen); hergeleitete Proteine können einen mit dem Protein von 549 Aminosäuren vergleichbaren Aminoterminus und eine Deletion von 24 Aminosäuren vom carboxyterminalen Ende aufweisen (z. B. Seq.-ID Nr. 25, Seq.-ID Nr. 26, Seq.-ID Nr. 27 und Seq.-ID Nr. 28).

[0032] Ähnliche Proteine von der carboxyterminalen Aminosäuresequenz anderer Varianten können durch Angleichung der Varianten, beispielsweise mit den Burma- oder Mexiko-Varianten, ermittelt werden (Internationale PCT-Anmeldung US 91/02368, Einreichungsdatum 5. April 1991; WO 91/15603; Internationale PCT-Anmeldung US 89/02648, eingereicht am 16. Juni 1989, WO 89/12462).

[0033] Beispielhafte „62K-Antigen“-Polypeptide umfassen die folgenden, von den Burma- und Mexiko-HEV-Varianten hergeleiteten Polypeptide: Seq.-ID Nr. 15/Seq.-ID Nr. 16, Seq.-ID Nr. 25/Seq.-ID Nr. 26 und Seq.-ID Nr. 27/Seq.-ID Nr. 28 oder eine dazu homologe Sequenz. Weiters umfasst „62K-Antigen“ Gemische solcher Polypeptide, beispielsweise ein Präparat, das die Polypeptide enthält, deren Sequenzen als Seq.-ID Nr. 25 und Seq.-ID Nr. 27 dargelegt sind.

[0034] In der Bedeutung von „62K-Antigen“ umfasst sind Proteine, die größer als 549 Aminosäuren sind, so lange sie die gerade festgelegten carboxyterminalen Sequenzen enthalten, die vom HEV-ORF2 kodiert werden. Beispielsweise kann ein neu konstruiertes 62K-Antigen, „r62K“, gegebenenfalls ein N-terminales Methionin, d. h. eine Sequenz von 550 Aminosäuren, aufweisen. Alternativ dazu kann das 62K-Antigen als Fusionsprotein erzeugt werden, das beispielsweise die carboxyterminale Sequenz von 549 Aminosäuren von HEV-ORF2 zusätzlich zu Sequenzen enthält, die für β-Galactosidase kodieren.

II. HEV-Antigene

[0035] Dieser Abschnitt beschreibt Verfahren zur Herstellung von HEV-Antigenen, die als Diagnosereagenzien und in Vakzinezusammensetzungen gemäß der Erfindung zweckdienlich sind.

A. HEV-Genomsequenzen

[0036] Genomische HEV-Klone und Sequenzen, die dem gesamten HEV-Genom für verschiedene HEV-Stämme entsprechen, wurden nach veröffentlichten Verfahren (Huang (1992), Yarbough (1991)) und wie

in der Internationalen PCT-Anmeldung US 91/02368 (Einreichungsdatum 5. April 1991, WO 91/15603) und Internationalen PCT-Anmeldung US 89/02648 (eingereicht am 16. Juni 1989, WO 89/12462) beschrieben erhalten. Zusammenfassend wurde aus der Galle eines Cynomolgus-Affen mit einer bekannten HEV-Infektion isolierte RNA als cDNA-Fragmente kloniert, um eine Fragment-Bibliothek zu bilden, und die Bibliothek wurde durch Differentialhybridisierung an radioaktiv markierte cDNAs aus infizierten und nicht infizierten Gallenquellen gescreent.

[0037] Die Basenpaarsequenz klonierter Regionen der HEV-Fragmente in identifizierten Klonen wurde mittels Standardsequenzierungsverfahren bestimmt. Unter Bezugnahme auf [Fig. 1](#) ist HEV ein Virus mit einem einzelsträngigen und polyadenylierten RNA-Genom von ungefähr 7,5 Kilobasen (kb) und einer Positiv-Sinn-Polarität. Drei offene Leseraster (ORFs) sind dem HEV als ORF1, der für Polypeptide mit Domänen der RNA-gerichteten RNA-Polymerase und einer Helicase kodiert, ORF2, der für das mutmaßliche Kapsidprotein des Virus kodiert, und ORF3, einem zweiten mutmaßlichen Strukturprotein, zugeordnet worden.

[0038] Der genomische Aufbau von HEV ordnet sein(e) nichtstrukturelles/n Gen(e) dem 5'-Terminus mit dem/den Struktur(en) am 3'-Ende zu. Zwei subgenomische polyadenylierte Transkripte einer Größe von ungefähr 2,0 kb und 3,7 kb werden in infizierter Leber detektiert und werden an ihren 3'-Enden mit dem genomischen Transkript von 7,5 kb voller Länge gemeinsam terminiert. Der genomische Aufbau und die Expressionsstrategie von HEV legen nahe, dass es der Prototyp eines menschlichen Pathogens für eine neue Klasse von RNA-Virus oder vielleicht eine gesonderte Gattung innerhalb der Caliciviridae-Familie sein könnte.

[0039] Die in [Fig. 2](#) dargestellten Genom- und Peptidsequenzen entsprechen den ORF-2- und ORF-3-Regionen von Burma-(B-) (obere Zeilen) und Mexiko-(M-)Stämmen (untere Zeilen) von HEV. Die in den mittleren Zeilen dargestellten Basen stellen konservierte Nucleotide dar. Das im Vergleich verwendete Nummerierungssystem basiert auf der Burma-Sequenz. Die ORF2 entsprechende Region hat die Seq.-ID Nr. 1 und Seq.-ID Nr. 2 für die Burma- bzw. Mexikostämme. Die dem 62-kDa-Antigen entsprechende Region hat die Seq.-ID Nr. 2 und Seq.-ID Nr. 4 für die Burma- bzw. Mexikostämme. Die SG3 entsprechende Region hat die Seq.-ID Nr. 5 und Seq.-ID Nr. 6 für die Burma- bzw. Mexikostämme. Die 406.3-2 entsprechende Region hat die Seq.-ID Nr. 7 und Seq.-ID Nr. 8 für die Burma- bzw. Mexikostämme. Die ORF3 entsprechende Region hat die Seq.-ID Nr. 9 und Seq.-ID Nr. 10 für die Burma- bzw. Mexikostämme. Die 406.4-2 entsprechende Region hat die Seq.-ID Nr. 11 und Seq.-ID Nr. 12 für die Burma- bzw. Mexikostämme.

B. HEV-Antigensequenzen

[0040] Die den dritten und zweiten offenen Leserastern der Burma- und Mexikostämme von HEV entsprechenden Aminosäuresequenzen sind in [Fig. 3](#) bzw. [Fig. 4](#) dargelegt. Die dargestellten Sequenzaufstellungen sind die folgenden:

[0041] Seq.-ID Nr. 13 und Seq.-ID Nr. 14 entsprechen den Aminosäuresequenzen für das gesamte vom Burma- bzw. Mexikostamm-ORF2 kodierte mutmaßliche Kapsidprotein.

[0042] Seq.-ID Nr. 15 und Seq.-ID Nr. 16 entsprechen den Aminosäuresequenzen für die 62K-Antigene des Burma- bzw. Mexikostamm-ORF2.

[0043] Seq.-ID Nr. 17 und Seq.-ID Nr. 18 entsprechen den Aminosäuresequenzen für die Peptide SG3(B) bzw. SG3(M). Jedes Peptid umfasst die 327 Carboxy-Aminosäuren des HEV-Kapsids.

[0044] Seq.-ID Nr. 19 und Seq.-ID Nr. 20 entsprechen den Aminosäuresequenzen für 406.4-2(B) bzw. 406.4-2(M) ([Fig. 3](#)). Diese sind vom ORF3 kodierte Sequenzen von 33 Aminosäuren.

[0045] Seq.-ID Nr. 21 und Seq.-ID Nr. 22 entsprechen den Aminosäuresequenzen für das gesamte von ORF3 der Burma- bzw. Mexikostämme kodierte Protein.

[0046] Seq.-ID Nr. 23 und Seq.-ID Nr. 24 entsprechen den Aminosäuresequenzen für die Peptide 406.3-2(B) bzw. 406.3-2(M). Jedes Peptid ist ein Peptid von 42 Aminosäuren in der C-terminalen Endregion des von ORF2 kodierten Kapsidproteins und ist in der ORF2-Sequenz ([Fig. 4](#)) bezeichnet.

[0047] Ebenfalls vorgesehen sind Sequenzen aus anderen Stämmen von HEV-Antigenen, die mit den oben spezifizierten Sequenzen intern konsistent sind. Diese umfassen Seq.-ID Nr. 13; Seq.-ID Nr. 14 und intern konsistente Variationen zwischen Seq.-ID Nr. 13 und Seq.-ID Nr. 14; Seq.-ID Nr. 15; Seq.-ID Nr. 16 und intern kon-

sistente Variationen zwischen Seq.-ID Nr. 15 und Seq.-ID Nr. 16; Seq.-ID Nr. 17; Seq.-ID Nr. 18 und intern konsistente Variationen zwischen Seq.-ID Nr. 17 und Seq.-ID Nr. 18; Seq.-ID Nr. 19; Seq.-ID Nr. 20 und intern konsistente Variationen zwischen Seq.-ID Nr. 19 und Seq.-ID Nr. 20; Seq.-ID Nr. 21; Seq.-ID Nr. 22 und intern konsistente Variationen zwischen Seq.-ID Nr. 21 und Seq.-ID Nr. 22; Seq.-ID Nr. 23; Seq.-ID Nr. 24 und intern konsistente Variationen zwischen Seq.-ID Nr. 23 und Seq.-ID Nr. 24.

[0048] Beispielsweise weisen die HEV-406.4-2-Antigene die in [Fig. 16](#) dargestellte Sequenzhomologie für die Burma-(B-) und Mexiko-(M)-Stämme auf. Die einzelnen Punkte im Sequenzvergleich bezeichnen erkannte Hochwahrscheinlichkeits- oder „neutrale“ Aminosäuresubstitutionen. Die Leerstellen bezeichnen eine nicht-neutrale Substitution.

[0049] Eine Sequenz, die mit diesen beiden Sequenzen intern konsistent ist, würde eine der in Seq.-ID Nr. 31 dargestellten Sequenzen aufweisen.

[0050] Die ORF3-Aminosäuresequenzen der Länge von 124 Aminosäuren für die Burma- und Mexikostämme weisen eine Identität von 87,1% in den 124 Aminosäuren auf. Die ORF2-Aminosäuresequenzen mit einer Überlappung von 659 Aminosäuren weisen eine Identität von 93,0% in den 659 Aminosäuren auf.

C. Herstellung von HEV-Antigenen

[0051] Um das 406.3-2(M)-Peptid herzustellen, wurden in Beispiel 1 beschriebene DNA-Fragmente aus dem Lambda-gt11 406.3-2 in den Glutathion-S-Transferase-Vektor pGEX™ kloniert, um das 406.3-2(M)-Antigen wie in Beispiel 1 und in der Arbeit von Tam (1991-b) ausführlich beschrieben zu exprimieren.

[0052] Das 406.3-2(B)-Antigen kann mittels PCR-Amplifikation der obigen Burma-Seq.-ID Nr. 5 mittels PCR-Amplifikation des pBET1-Plasmids (Tam (1991-b)) hergestellt werden. Dieses Plasmid enthält ein 2,3-kb-Insert, das ORF2 und ORF3 für die Burma-Stamm-HEV-Sequenz umspannt. Das Plasmid wird mittels PCR-Amplifikation unter Verwendung eines eine Ncol-Stelle enthaltenden 5'-Primers und eines eine BamHI-Stelle enthaltenden 3'-Primers amplifiziert (Sakai). Das amplifizierte Fragment wird in die Ncol/BamHI-Stelle eines pGEX™-Vektors insertiert und in einem E.-coli-Expressionssystem wie in Beispiel 1 beschrieben exprimiert.

[0053] Das SG3(B)-Peptid wurde hergestellt, indem zuerst die Sequenz der Seq.-ID Nr. 7 mit 5'-EcoRI-Ncol- und 3'-BamHI-Linkern unter Verwendung eines pBET1-Klon-Plasmids amplifiziert wurde, das die gesamten ORF2- und ORF3-Regionen von HEV (B) enthielt. Das amplifizierte Fragment wurde in die EcoRI/BamHI-Stelle eines Bluescript™-Vektors (Stratagene, La Jolla, CA) nach den Anleitungen des Herstellers insertiert. Nach Vektorvermehrung und Gewinnung wurde das klonierte Insert durch Verdau mit Ncol und BamHI freigesetzt und gelgereinigt. Das gereinigte Fragment wurde in die Ncol/BamHI-Stelle eines pGEX™-Vektors insertiert und in einem E.-coli-Expressionssystem wie in Beispiel 1 beschrieben exprimiert. Das SG3(M)-Peptid kann auf ähnliche Weise unter Verwendung der Seq.-ID Nr. 8 anstelle der Seq.-ID Nr. 7 hergestellt werden.

[0054] Das Kapsidprotein (B) wurde im Wesentlichen wie oben beschrieben mittels PCR-Amplifikation der Seq.-ID Nr. 1 aus einem pBET1-Plasmid unter Verwendung eines eine Ncol-Stelle enthaltenden 5'-Primers und eines eine BamHI-Stelle enthaltenden 3'-Primers hergestellt. Das amplifizierte Fragment wurde in die Ncol/BamHI-Stelle eines pGEX™-Vektors insertiert und in einem E.-coli-Expressionssystem wie in Beispiel 1 beschrieben exprimiert. Das Kapsidprotein (M) wird auf ähnliche Weise hergestellt.

[0055] Um das 406.4-2(M)-Peptid herzustellen, wurde das in Beispiel 1 beschriebene Lambda-gt11-406.4-2 in den Glutathion-S-Transferase-Vektor subkloniert, um das 406.4-2(M)-Antigen wie in Beispiel 1 ausführlich beschrieben zu exprimieren.

[0056] Das 406.4-2(B)-Antigen kann mittels PCR-Amplifikation der obigen Burma-Seq.-ID Nr. 9 mittels PCR-Amplifikation unter Verwendung eines eine Ncol-Stelle enthaltenden 5'-Primers und eines eine BamHI-Stelle enthaltenden 3'-Primers hergestellt werden. Das amplifizierte Fragment wird in die Ncol/BamHI-Stelle eines pGEX™-Vektors insertiert und in einem E.-coli-Expressionssystem wie in Beispiel 1 beschrieben exprimiert.

D. Reifes Kapsidprotein

[0057] HEV-Peptidantigene können auch aus gereinigtem HEV-Virus erhalten werden, die in aus Prima-

ten-Leber, vorzugsweise aus menschlicher oder Cynomolgus-Affen-Leber, erhaltenen primären Hepatozyten vermehrt wurden. Verfahren zur Herstellung primärer Hepatozyten für die Kultur und Kulturmediumsbedingungen, die zur Erhaltung leberspezifischer Funktionen für längere Zeiträume in Kultur wirksam sind, werden für menschliche Hepatozyten im untenstehenden Beispiel 2 ausführlich beschrieben.

[0058] Nach 3 Tagen Wachstum in Kultur werden die Zellen mit einem gepoolten Inokulum von HEV-infiziertem Cynomolgus-Affen-Stuhlpool (vierte Passage) wie in Beispiel 3 ausführlich beschrieben infiziert. Die Ge- genwart und Menge des sich in den Zellen vermehrenden HEV-Virus kann durch indirekte Immunfluoreszenz gemessen werden. Wo beispielsweise die primären Zellen Cynomolgus-Zellen sind, können die Zellen mit menschlichen HEV-Antiseren immunologisch zur Reaktion gebracht werden, gefolgt von Immunoreaktion mit Kaninchen-Anti-Human-IgG-Antikörpern.

[0059] Alternativ dazu kann das HEV-Virus mit selektiven Amplifikationsverfahren nachgewiesen und gemes- sen werden, die anfängliche cDNA-Bildung und PCR-Amplifikation von HEV-cDNA-Sequenzen mittels PCR-Amplifikation umfassen, wie im Beispiel 3 ausführlich beschrieben wird. Virusteilchen können aus HEV-infizierten menschlichen Hepatozyten im Kulturmedium isoliert werden, indem das Virus mittels Ultrazen- trifugation durch einen 30%igen Saccharosepolster hindurch pelletiert wird. Das pelletierte Virus kann, falls er- wünscht, mittels Zonenzentrifugation durch einen 10- bis 40%igen Saccharosegradienten und Vereinigen von Virus-Peakfraktionen weiter gereinigt werden.

[0060] Andere Verfahren zur Trennung von Virusteilchen von löslichen Kulturmediumskomponenten können verwendet werden. Beispielsweise kann geklärtes Kulturmedium durch eine Größenausschlussmatrix ge- schickt werden, um die löslichen Komponenten durch Größenausschluss zu trennen.

[0061] Alternativ dazu kann das geklärte Kulturmedium durch eine Ultrafiltrationsmembran mit einer Poren-größe von 10–20 nm geschickt werden, die zur Zurückhaltung von Virusteilchen fähig ist, jedoch gelöste (nicht-partikuläre) Kulturmediumskomponenten durchlässt.

[0062] Die vorliegende Erfindung ermöglicht die Glykosylierung und andere posttranskriptionelle Modifizierun- gen des intakten HEV-Kapsidproteins. Die Kapsid-Isolierung aus Virusteilchen kann durch Standardverfahren durchgeführt werden, wie z. B. Ionenaustausch- und Größenausschlusschromatographie und HPLC-Reini- gung, und zwar nach Solubilisierung der Virusteilchen in einem solubilisierenden Medium, wie z. B. einer Lö- sung eines nichtionischen Tensids. Das Protein kann mittels Affinitätschromatographie gereinigt werden, in- dem beispielsweise aus Anti-HEV-Antiseren gereinigte Antikörper eingesetzt werden. Abbauverfahren können eingesetzt werden, um Teilfragmente und Peptide aus dem intakten Kapsidprotein (sowie rekombinant produ- zierte Proteine) zu erhalten; z. B. können Proteasen eingesetzt werden. Solche Verfahren sind dem Fachkun- digen auf dem Gebiet der Erfindung bekannt.

E. Produktion von Kapsidantigen, gespaltenem 62K-Antigen und rekombinantem 62K-Antigen in Insektenzel- len

[0063] Dieser Abschnitt beschreibt die Produktion von ORF2 voller Länge (73K), gespaltenen ORF2-Spezies (c62K) und neu konstruierten 62K-Spezies von ORF2 (r62K) in Insektenzellen.

1. Expression von ORF2 in Insektenzellen

[0064] Allgemeine Verfahren, beispielsweise zur Handhabung und Herstellung von Baculovirus-Vektoren und Baculovirus-DNA, sowie Insektenzellkultur-Verfahren sind in A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures (M. D. Summers et al. (1988), hierin durch Verweis aufgenommen, dargelegt. Das rekombinante Baculovirus ORF2-Autographica-californica-Nuclear-Polyhedrosis-Virus (ORF2-rAcNPV) wurde wie früher beschrieben (J. He et al., J. Clin. Microbiology 31, 2167 (1993), hierin durch Verweis aufge- nommen) hergestellt. Das das HEV-ORF2-Protein exprimierende rekombinante Baculovirus ORF2-rAcMNPV wurde verwendet, um *Spodoptera-frugiperda-9-(Sf9-)*Suspensionskulturen und Monolayer-Zellkulturen gemäß den in He (1993) ausführlich beschriebenen und im unten stehenden Beispiel 4 beschriebenen Verfahren zu infizieren.

[0065] Zu verschiedenen Zeiten nach der Infektion hergestellte infizierte Zelllysate wurden mittels Zentrifuga- tion getrennt, um in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) lösliche sowie unlösliche Fraktionen zu erzeu- gen. Proteine aus beiden Fraktionen wurden der Elektrophorese an SDS-Polyacrylamidgelen unterzogen, die entweder mit Coomassieblau-Lösung ([Fig. 6A](#)) gefärbt oder auf Nitrocellulosepapier übertragen wurden, ge-

folgt von einer Western-Blot-Analyse ([Fig. 6B](#)) gemäß Beispiel 5.

[0066] Ein markantes Virusprotein einer Größe von ungefähr 73 kDa wurde nahezu ausschließlich in PBS-unlöslichen Fraktionen von Suspensionskulturzellen 2–7 Tage nach Infektion beobachtet ([Fig. 6A](#)). Die Migration dieses Proteins korreliert gut mit dem vorhergesagten Molekulargewicht von ORF-2 voller Länge. Ein gesonderter Westernblot bestätigte, dass dieses 73K-Protein mit ORF2-spezifischem Antiserum 1L6 reagierte, das den äußersten C-Terminus von ORF2 erkennt. Obgleich ein Abbau von Wirtsproteinen in späten Stadien der Infektion (lösliche Fraktionen 4–7 Tage nach Infektion) offensichtlich war, schien das 73K-ORF2-Protein über die gesamte Infektion hinweg stabil zu sein.

[0067] Wenn dasselbe rekombinante Virus verwendet wurde, um die Sf-9-Monolayer-Zellen zu infizieren, wurde ein anderes Expressionsmuster beobachtet ([Fig. 6B](#)). Anstatt eine unlösliche 73K-Proteinspezies zu beobachten, wurde das ORF2-Protein in eine lösliche Form umgewandelt, die eine Bande einer Größe von ungefähr 62 kDa 4–7 Tagen nach Infektion lieferte. Diese Beobachtungen legen nahe, dass das unlösliche ORF-2-(73K-)Protein proteolytisch gespalten wird, um ein lösliches oder gespaltenes, als „c62K“ bezeichnetes 62K-Protein in den Monolayer-Zellen zu erzeugen. Mehrere kleinere Spezies, die um oder unter 30 kDa migrierten, wurden bei späten Infektionsstadien ebenfalls beobachtet. Die kleineren Spezies waren Abbauprodukte des 73K-Proteins.

2. Proteolytische Prozessierung von ORF2

[0068] Es wurde beobachtet, dass eine progressive Umsetzung des 73K-Proteins zur löslichen c62K-Spezies im Verlauf der Infektion auftrat. Folglich könnte die Umsetzung das Ergebnis autokatalytischer Spaltung, Stimulation von Proteaseaktivität im Verlauf der Infektion oder zum Zeitpunkt der Zellernte oder eine Kombination dieser Ereignisse sein. Um diese Frage zu behandeln, wurden Zelllysate am Tag 5 nach der Infektion hergestellt, gefolgt von Inkubation für variierende Zeiten, bevor die Proteine in den Lysaten denaturiert wurden. Die Umsetzung von 73K zu c62K wurde gegen die Inkubationszeit wie in [Fig. 7](#) gezeigt gemessen.

[0069] Wenn Zelllysate unmittelbar nach Aufbrechen der Zellen (0 Minuten Inkubationszeit) denaturiert wurden, war das ORF2-Protein hauptsächlich als unlösliches 73K-Polypeptid vorhanden, und es wurde sehr wenig lösliches c62K-Protein beobachtet. Wenn jedoch die Inkubationszeit zwischen 30 bis 300 Minuten erhöht wurde, erhöhte sich die Menge von c62K-Proteinen in der löslichen Fraktion proportional. Im Gegensatz dazu erniedrigte sich die Menge an 73K-Protein in der unlöslichen Fraktion, was auf eine bedeutende Rolle von Proteinase nach dem Aufbrechen der Zellen hinweist. Die Schlussfolgerung dieses Experiments ist, dass das 72K-Protein nach dem Aufbrechen der Zellen durch Proteinaseaktivität zum c62K gespalten werden könnte.

[0070] Das in [Fig. 6B](#) dargestellte, bei späten Infektionen *in vivo* beobachtete c62K-Protein könnte durch die anhaltende Virusinfektion erklärt werden, bei der ein signifikanter prozentueller Anteil an Zellen nicht lebensfähig war, was eine Freisetzung der Proteinaseaktivität verursacht.

3. Umsetzung von 73K zu c62K könnte für die Baculovirus-Infektion spezifisch sein

[0071] Die für die Spaltung von 73K zu c62K verantwortliche Quelle der Proteinase könnte aus Sf9-Zellen, Baculovirus-infizierten Sf9-Zellen oder beiden stammen. Um diese Frage zu behandeln, wurde ein Extrakt-Mischungsexperiment durchgeführt, um zwischen diesen Möglichkeiten zu unterscheiden. Ein unlösliches 73K-Präparat aus Sf9-Suspensionskulturzellen wurde mit verschiedenen löslichen Extrakten gemischt und die Spaltung mittels Immunoblotanalyse beobachtet ([Fig. 8](#), obere Tafel). Nicht infizierte Zellextrakte aus Suspensionskultur sowie Monolayer hatten keine Wirkung auf die Spaltung, was nahe legt, dass die Spaltung durch Virusinfektion ausgelöst wurde. PBS zeigte wie erwartet keinerlei Wirkung. Nur bei Verwendung eines Extrakts aus einem infizierten Zellextrakt wurde die Spaltung des 73K-Proteins beobachtet.

[0072] Die gleichzeitige Spaltung des 73K- und Anreicherung des c62K-Proteins wurde in einem zweiten Experiment weitergehend bewiesen, bei dem ein unlösliches 73K-Präparat mit löslichem Extrakt aus mit Baculovirus der Wildform infizierten Suspensionskulturzellen gemischt wurde ([Fig. 8](#), untere Tafel). Obgleich eine Spaltung 1 Stunde nach Inkubation beobachtet werden konnte, trat sie für bis zu 24 Stunden nicht auf, wenn der infizierte Zellextrakt durch einen nicht infizierten Zellextrakt ersetzt wurde ([Fig. 8](#), untere Tafel).

4. Reinigung der 73K- und c62K-Proteine

[0073] Um zu ermitteln, ob in Baculovirus-infizierten Zellen exprimierte ORF2-Proteine komplexe Protein-

strukturen gebildet haben, sowie um die in der Bildung des c62K-Proteins resultierende Spaltstelle zu ermitteln, wurden hochgereinigte Proteinpräparate hergestellt. Eine die Reinigung des 73K-Proteins zusammenfassende SDS-PAGE-Analyse ist in [Fig. 9](#) dargestellt. Einzelheiten des Reinigungsprozesses sind in Beispiel 6A beschrieben. Die Hyper-D-S-Säulenbeladung ist in Bahnen 1 und 6 dargestellt, und das nachfolgende Eluat und eluierte Säulenfraktionen sind in Bahnen 2–4 und 7–9 dargestellt. Bei denjenigen Bahnen, wo Beta-Mercaptoethanol aus dem Probenaufschlusspuffer entfernt wurde (Bahnen 2–4), ist klar, dass eine Intraketten-Disulfidbindung im 73K-Protein vorliegt und dass diese Bindung unter reduzierenden Bedingungen leicht beseitigt wird.

[0074] In prokaryotischen und Baculovirus-Expressionssystemen im hohen Ausmaß exprimierte rekombinante Proteine können sich innerhalb der Zelle in Form von Einschlusskörperchen anreichern, wie es für das 73K-Protein beobachtet wurde. Unter diesen Bedingungen war es notwendig, ein Verfahren zur Extraktion, Solubilisierung und Neufaltung des Proteins zu entwickeln. Es wurden Standardansätze verwendet, um Einschlusskörperchen in einem Puffer zu isolieren und zu waschen, um zelluläre Verunreinigungen zu entfernen, gefolgt von der Solubilisierung der Pellets mit 0,5% SDS als starkem Denaturierungsmittel. Das Denaturierungsmittel wurde dann durch schnelle Verdünnung und Dialyse entfernt, um die Neufaltung des Proteins in seinen nativen Zustand zu ermöglichen. Um Aggregation während des Neufaltungsvorgangs zu vermeiden, wurde dem Puffer Polyethylenglykol als Co-Lösungsmittel zugesetzt, was die Neufaltung des 73K-Proteins in eine stabile lösliche Form zu steigern schien.

[0075] Das Endprodukt des c62K-Reinigungsverfahrens ist in [Fig. 10](#) dargestellt. Einzelheiten des Reinigungsverfahrens sind in Beispiel 6B beschrieben. Zusammenfassend wurde das c62K/Sf9-Zelllysat abzentrifugiert und der Überstand dann auf eine DEAE-EMD-650(S)-Säule von E. Merck aufgegeben, an der das 62-kDa eingefangen und mit einer Reinheit von mehr als 80% eluiert wurde. Die DEAE-Peakfraktionen wurden vereinigt und der Chromatographie an einer Sephadryl-S-100-Säule unterzogen. c62K enthaltende Fraktionen aus der Sephadryl-S-100-Säule wurden dann an einer Poros-HQ/F-Säule gereinigt und konzentriert. Die in Bahn 2 der [Fig. 10](#) zu sehende Bahn stellt das endgültige gereinigte Protein aus der Poros-HQ/F-Säule dar.

[0076] Um die Reinigung des c62K-Proteins zu erleichtern, wurde ein Reduktionsmittel, z. B. DTT, zum Lyse-überstand zugegeben, gefolgt von einem zweistufigen Austausch des reduzierenden Puffers gegen ein anfänglich weniger reduzierendes Milieu (50 mM DTT bis 0,5 mM DTT) zu einem nicht reduzierenden Endmilieu. Unter diesen Bedingungen wird eine mögliche Aggregation des c62K-Proteins an verunreinigende Zellproteine eliminiert. Das c62K-Protein kann dann leicht in einer höchst gereinigten homogenen Form gewonnen werden. Auf Basis der Coomassieblaufärbung beträgt die geschätzte Reinheit der 73K- sowie c62K-Proteine 95 bis 99 Prozent.

5. Nachweis von VLPs – Elektronenmikroskopie

[0077] Gereinigte rekombinante 73K- und c62K-Proteine wurden negativgefärbt und mittels direkter Elektronenmikroskopie untersucht (Beispiel 7). Elektronenmikroskopische Aufnahmen des c62K-Proteins offenbarten determinante Teilchen ([Fig. 11A](#)) einer Größe von ungefähr 30 nm, was gut mit publizierten Berichten übereinstimmt, die echte Viruspartikel (28–34 nm) beschreiben, die sich in Stuhl und Galle finden (Bradley (1988); Reyes (1993)). Neugefaltetes 73K-Protein erzeugte eine Reihe von pleomorphen Teilchen einer Größe von 25–40 nm, wovon die meisten eine unbestimmte Morphologie zeigen ([Fig. 11b](#)).

6. N-terminale Sequenz des c62K-Proteins

[0078] Die vom gereinigten c62K-Protein gezeigte virusartige Teilchenstruktur sowie seine Löslichkeit legte nahe, dass dieses Protein eine Konformationsstruktur aufweisen könnte, die dem nativen Virion, d. h. einem Virusteilchen oder virusartigen Teilchen, ähnlich ist. Demgemäß war es wünschenswert, die dem c62K-Protein entsprechende kodierende Sequenz zu identifizieren und so die anschließende Expression in Suspensionszellkultur zu ermöglichen, um den Spaltungsprozess zur Produktion dieses Proteins zu umgehen. Aus diesem Grund wurde die N-terminale Sequenzanalyse von gereinigtem c62K-Protein durchgeführt.

[0079] Die ermittelte Sequenz der ersten 10 sequenzierten Aminosäuren war die folgende: Ala-Val-Ala-Pro-Ala-His-Asp-Thr-Pro-Pro. Diese Sequenz war völlig homolog zu Aminosäureresten beginnend an der Restposition 112 im ORF-2 (Seq.-ID Nr. 13). Folglich trat die Spaltung zwischen Thr und Ala auf, die den Aminosäuren 111 bzw. 112 entsprechen.

[0080] Folglich kann ein c62K-Protein durch Transfizieren von Insektenzellen mit einem Baculovirus-Expres-

sionsvektor produziert werden, der eine Nucleinsäuresequenz enthält, die für ein Kapsidprotein von HEV kodiert. Allgemeiner gesprochen wird anerkannt, dass nur derjenige Abschnitt der ORF2-Nucleotidsequenz, der für das c62K-Fragment kodiert (z. B. Sequenzen, die für die von der ORF2-73K-Sequenz hergeleiteten Aminosäuren 112–660 kodieren; Beispiele für solche Sequenzen sind die durch Seq.-ID Nr. 3 und Seq.-ID Nr. 4 vertretenen Sequenzen), und damit homologe Sequenzen exprimiert werden müssen, da eine Protease die überschüssigen N-terminalen Aminosäuren zum c62K-Protein spalten wird.

[0081] Andere Baculoviren sind dem Fachkundigen auf dem Gebiet der Erfindung bekannt, beispielsweise ist *Orygia pseudotsugata* ein häufig verwendet Vektor. Baculoviren haben relativ enge Wirtsbereiche und sind im Allgemeinen auf die Replikation in Lepidoptera-Insektenzellen beschränkt. Geeignete Lepidoptera-Zelllinien, die nicht *Spodoptera frugiperda* sind, sind dem Fachkundigen auf dem Gebiet der Erfindung bekannt, beispielsweise *Lamantria dispar* und *Helicos zea*.

[0082] Der Fachkundige auf dem Gebiet der Erfindung wird weiters anerkennen, dass, obgleich das bevorzugte Expressionssystem ein Baculovirus-Expressionssystem ist, die ORF2-Sequenz, welche die kodierende Region für die von HEV-ORF2 (relativ zur Burma-Stamm-Variante) kodierten C-terminalen 549 Aminosäuren enthält, aus der zumindest eine Aminosäure vom Carboxyterminus der 549 Aminosäuren deletiert ist, auch in anderen Expressionssystemen exprimiert und von in diesen Systemen vorliegenden Proteinases oder anschließend von einem Baculovirus-infizierten Zellextrakt in vitro gespalten werden kann. Weiters können die HEV-Kapsidproteine aus HEV erhalten werden, das in menschlicher oder Affen-Leber in vivo oder in vitro wie oben beschrieben vermehrt wurde, und diese Kapsidproteine können mit Baculovirus-infiziertem Insektenzelllysat gespalten werden, um ebenfalls die 62K-Antigene zu bilden.

[0083] Außerdem kann die im Kapsidprotein enthaltene Spaltstelle als eine künstlich insertierte Spaltstelle zur Verwendung in rekombinanten Proteinprodukten, Expressionssystemen und industriellen Verfahren zur Herstellung dieser Produkte verwendet werden. Beispielsweise ist es vorteilhaft, rekombinante Proteine so zu konstruieren, dass sie als Fusionsproteine erzeugt werden. Einer der Vorteile ist es, dass der Fusionspartner als Hilfsmittel zur Reinigung des rekombinanten Proteins von Interesse verwendet werden kann. Beispielsweise ist ein besonders zweckdienlicher Fusionspartner ein Polyhistidinfragment, das mithilfe einer Metallchelat-Affinitätschromatographie an NTA-Harz effizient gereinigt wird, wie im hierin durch Verweis aufgenommen US-Patent Nr. 5.310.553 beschrieben wird. Es ist zweckdienlich, eine Spaltstelle zwischen den Fusionspartner und das rekombinante Protein zu konstruieren, so dass das rekombinante Protein vom Fusionspartner nach der Reinigung befreit werden kann. Folglich stellt die Entdeckung einer neuen spezifischen Baculovirus-Spaltstelle eine Alternative zu herkömmlichen Stellen bereit, die gegenwärtig für in Nicht-Baculovirus-Systemen produzierte rekombinante Proteine verwendet werden.

[0084] Die Spaltstelle kann auch für Baculovirus-Systeme vorteilhaft sein. Beispielsweise kann ein Fusionspartner, der dazu zweckdienlich ist, das neue Polypeptid in das Zytoplasma zu leiten, bevorzugt gespalten werden, wenn er sich erst einmal im Zytoplasma befindet.

[0085] Die Grenzen, welche die Spaltstelle umfassenden Aminosäuren definieren, können durch Techniken ermittelt werden, die dem Fachkundigen auf dem Gebiet der Erfindung bekannt sind. Eine solche Technik verwendet ortsgerichtete Mutagenese, um einzelne die Spaltstelle flankierende Aminosäuren zu verändern, und anschließendes Testen der Proteinaseaktivität an den mutierten Peptiden.

[0086] Außerdem kann die Identität der Baculovirus-spezifischen Proteinase bestimmt und ihre Nucleinsäuresequenz durch Techniken kloniert und exprimiert werden, die dem Fachkundigen auf dem Gebiet der Erfindung bekannt sind. Dies wird die Verwendung der spezifischen Proteinase in gereinigter Form anstelle des Baculovirus-infizierten Zelllysats ermöglichen.

7. Rekombinante Produktion und Reinigung eines neu konstruierten r62K-HEV-Antigens

[0087] Es blieb die Frage offen, ob eine „neu konstruierte“, hierin als r62K bezeichnete 62K-Proteinspezies in der Bildung eines stabilen Proteins mit ähnlichen biochemischen und strukturellen Eigenschaften wie die prozessierte Form von c62K resultieren würde. Daher wurde die DNA-Sequenz von der Aminosäure 112 bis zur letzten Aminosäure des 3'-Endes von ORF2 (Burma-Stamm) in den Baculovirus-Expressionsvektor pBluBacIII wie in [Fig. 5](#) dargestellt und in Beispiel 4 beschrieben kloniert. Ein Methionincodon wurde am 5'-Ende inkorporiert, um die korrekte Translationsinitiation zu gewährleisten.

[0088] Nach Transfektion und 4 Runden von Plaque-Reinigungen wurden Virus-Stammkulturen und Zelllys-

te aus 10 einzelnen Plaque-Isolaten hergestellt. Es wurde Western-Blot-Analyse durchgeführt, um auf diejenigen Virusisolaten zu screenen, die lösliches r62K-Protein im höchsten Ausmaß produzierten (Fig. 12). Nahezu alle Virusisolaten produzierten lösliches r62K. Die Löslichkeit von r62K lag im Bereich. von ungefähr 60–70% des Gesamtextrakts. Es wurde eines der Isolate zur Amplifikation für weitere Untersuchungen ausgewählt.

[0089] Das r62K erwies sich als in Lysepuffer vollständig löslich mit quantitativer Gewinnung des Moleküls im Zellyseüberstand. Der Zellyseüberstand wurde anschließend durch drei Chromatographieschritte verarbeitet, um gereinigtes r62K-Protein gemäß Beispiel 6b zu erhalten. Der anfängliche Chromatographieschritt wurde an einer E.-Merck-DEAE-EMD-650(S)-Säule durchgeführt. Es wurde gefunden, dass die Verwendung des EMD-DEAE-Derivats die Gewinnung von r62K im Vergleich zu anderen, ähnlichen schwachen Anionentauscherharzen steigerte (Toyopearl 650(S), DEAE Sepharose Fast Flow, usw.). Die gesteigerte Gewinnung wurde der „Tentakelarm“-Struktur des derivatisierten E.-Merck-Harzes zugeschrieben.

[0090] Weitere Reinigung wurde unter Verwendung einer Sephacryl-S-100-Säule erreicht, die hauptsächlich für den Pufferaustausch mit etwas geringer Reinigung verwendet wurde. Das endgültige Material wurde aus den Höchstwert-Faktionen erhalten, die an einem starken Anionen-Austauschharz Poros HQ/F gereinigt wurden.

[0091] Es wurde mittels Limulus-Amöbozyten-Lysat-test ermittelt, dass das durch dieses Verfahren erhaltene Endmaterial zu mehr als 95% rein und im Wesentlichen endotoxinfrei war. Zum Zwecke des Western-Blottings wurden die entsprechenden Gelproben vor der SDS-PAGE und dem Transfer auf eine PVDF-Membran 1 : 10 verdünnt. Die r62K-Bande erscheint als eine Doppelbande, was die Existenz einer modifizierten Form des r62K nahe legt. N-terminale Aminosäuresequenzanalyse, Peptid-Kartierung und Massenspektroskopiedaten unterstützen die Existenz einer einzigen Aminosäuresequenz für das neu konstruierte 62K.

[0092] Die weitere biochemische Charakterisierung des gereinigten 62-kDa-Proteins wurde unter Verwendung einer Reihe von Verfahren vorgenommen (Beispiel 9). Der Transfer der rekombinanten 62-kDa-Sequenz auf PVDF und die anschließende Aminosäuresequenzanalyse wies darauf hin, dass der Aminoterminus des 62-kDa-Proteins intakt war mit der Ausnahme, dass das zur Gewährleistung der korrekten Initiation der Translation eingeführte N-terminale Methionin entfernt worden war. Die Gesamtausbeuten bei jedem der ersten fünf Zyklen während der Sequenzierung waren niedrig, was darauf hinweist, dass ein signifikanter Anteil des 62-kDa wahrscheinlich am Aminoterminus blockiert war.

[0093] Die tryptische Peptidanalyse offenbarte nicht weniger als 143 Peaks mittels Umkehrphasen-HPLC. Acht Peaks wurden für LDMS gewählt, um die strukturelle Unversehrtheit und mögliche posttranskriptionelle Modifizierungen festzustellen (Beispiel 9). Von diesen acht Peaks lieferten vier Einzelspezies-Peptide. Drei dieser Peptide stimmten mit verschiedenen internen Regionen des 62-kDa-Proteins überein, wie mittels Edman-Abbau-Sequenzierung ermittelt wurde. Einer der Peaks, Peak 65, lieferte keine Sequenz durch Edman-Abbau. Jedoch stimmte die Molmasse bei Berücksichtigung der Entfernung des N-terminalen Methionins durch eine zelluläre Aminopeptidase, gefolgt von der Acetylierung des benachbarten Alaninrests sehr gut mit der vorhergesagten Masse für das aminotermrale tryptische Peptid überein. Die Ergebnisse legen nahe, dass der Aminoterminus der 62K-Antigenpolypeptide blockiert, wahrscheinlich acetyliert ist.

[0094] Post-Source-Decay-Analyse mittels Laserdesorptionsmassenspektrometrie zeigte an, dass Peak 65 das aminotermrale tryptische Peptid war (Beispiel 9). Die anderen vier HPLC-Peaks des tryptischen Verdaus, die mehrere Peptidspezies lieferten, wurden ebenfalls sequenziert und lieferten eine weitere Bestätigung dafür, dass das authentische sequenzierte HEV konserviert wurde.

[0095] LC-MS-Daten (Beispiel 9) ermittelten die wahren Molmassen der Komponenten der mittels Western-Blotting beobachteten 62-kDa-Doppelbande. Mit der Aufklärung des Aminoterminus in vorhergehenden Experimenten war es möglich, aus den ES-MS-Daten die mutmaßlichen carboxyterminalen Prozessierungs-schritte vorherzusagen, welche zu den bimodal verteilten „62-kDa“-Spezies führten.

[0096] Die vorhergesagte Molmasse des 62-kDa-Proteins unter Verwendung der kodierenden Sequenz vom Rest 112 zum Rest 660 der ORF-2-Region beträgt 59,1 kDa. Die in Beispiel 9 dargestellten Daten legten nahe, dass eine Deletion im Molekül auftrat und dass die Deletion sich wahrscheinlich am Amino- oder Carboxyterminus befand.

[0097] In Kombination mit der Bestätigung des Aminoterminus legten die ES-MS-Daten nahe, dass der Carboxyterminus zwischen den Resten 539–540 und den Resten 536–537 (relativ zur vorhergesagten

62-kDa-Proteinsequenz) befestigt („clipped“) sein könnte. Die automatisierte carboxyterminale Sequenzierung bestätigte die carboxyterminale Prozessierung des Proteins und etablierten Reste 539–540 (eine carboxyterminale Deletion von 23 Aminosäuren; z. B. Seq.-ID Nr. 25 und Seq.-ID Nr. 26) und Reste 524–525 (eine carboxyterminale Deletion von 23 Aminosäuren; z. B. Seq.-ID Nr. 27 und Seq.-ID Nr. 28) als die Carboxytermini der 58,1-kDa- bzw. 56,5-kDa-Proteine. Demgemäß ist das aus Insektenzellen isolierte ursprüngliche 62K-Antigen aus diesen beiden verwandten Polypeptidspezies zusammengesetzt.

[0098] Folglich wurde das gewünschte Protein in hohen Mengen exprimiert und auf mehr als 95% Reinheit gereinigt, obgleich die offensichtliche carboxyterminale Prozessierung nicht erwartet wurde. Diese Prozessierung schien nicht die Fähigkeit des Proteins zu stören, als ein wirksames Antigen zu dienen, wie z. B. in den in Tabelle 1 (Beispiel 9) dargestellten Ergebnissen. Viel mehr stellt das 62K-Antigen ein verbessertes Antigen im Vergleich zu bakteriell exprimierten Proteinen in HEV-Diagnosetests dar.

[0099] Die ausgezeichneten immunogenen Eigenschaften dieses Antigens waren auch aufgrund der Fähigkeit des 62K-Antigenpräparats offensichtlich, schützende Immunantworten in Primaten nach heterologer Exposition mit HEV hervorzurufen (siehe Abschnitt IV unten). Diese Beobachtungen legen nahe, dass das Baculovirus-exprimierte Protein eine immunologische Struktur enthalten könnte, welche dem nativen Viruskapsidprotein sehr gleicht.

8. Größenbestimmung von 62K-Untereinheiten-VLPs

[0100] Gelfiltration ist eine attraktive Technik zur Reinigung und analytischen Charakterisierung von Virusteilchen, da sie weit weniger zeitaufwendig als die Dichtegradienten-Ultrazentrifugation ist und chromatographische Auflösung und Entfernung von Teilchen ermöglicht, die größer oder kleiner als das gewünschte Virusteilchen sind. Sephadryl-S-1000-Superfine weist ein hohe Porosität auf, wodurch das Harz für Anwendungen geeignet ist, welche die Trennung von Virusteilchen, subzellulären Teilchen und mikrosomalen Vesikeln, wie z. B. Percoll, umfassen. Die Ausschlussvolumina von S-1000 entsprechen Teilchen von ungefähr 300–400 nm Durchmesser.

[0101] Das Absorptionsprofil der Sephadryl-S-100-Superfine-Chromatographie der gereinigten c62K- und r62K-Virusteilchen ist in [Fig. 13](#) dargestellt. Die Elution der c62K- und r62K-Teilchen entsprach einer Teilchengröße von ungefähr 20–30 nm Durchmesser. Die S-1000-Säule wurde auch mit drei Standards kalibriert; zwei Teilchenstrukturen und einer monomeren Struktur. Vaccinia-Virus (250 nM) wies eine Retentionszeit von ungefähr 48 Minuten auf. Hepatitis-B-Plasma-hergeleitete Oberflächenantigen-(HBsAg)-Teilchen (22 nm) wiesen eine Retentionszeit von 95 Minuten auf, während Rinderserumalbumin (monomerer Proteinstandard) eine Retentionszeit von 132 Minuten aufwies.

[0102] Die 62K-Antigene der vorliegenden Erfindung (bestehend aus den C-terminalen 549 von HEV-ORF2 kodierten Aminosäuren, relativ zur Burma-Stamm-Variante, wobei zumindest eine Aminosäure vom Carboxyterminus der 549 Aminosäuren deletiert ist, sowie dazu homologen Sequenzen) können auf ähnliche Weise in anderen Arten von Expressionssystemen, vorzugsweise eukaryotischen Systemen (z. B. Säugetier und Hefe), unter Verwendung der obigen HEV-Genom-Insert-Plasmide hergestellt werden, wobei die gewünschten Sequenzen amplifiziert und in einen geeigneten Expressionsvektor kloniert werden. Die bei der Herstellung der neu konstruierten Peptide verwendeten kodierenden Sequenzen können von den oben beschriebenen und an anderer Stelle ausführlich beschriebenen (Tam (1991-a)) Klonierungsvektoren oder von der synthetischen Nucleotidsynthese hergeleitet werden, und zwar unter Verwendung von PCR-Spleißverfahren, um Oligonucleotidfragmente nach bekannten Verfahren beim Aufbau von Nucleotidsequenzen zu verbinden. Solche Modifizierungen können vom Fachkundigen auf dem Gebiet der Erfindung leicht vorgenommen werden.

[0103] Auf diese Weise hergestellte 62K-Antigene der vorliegenden Erfindung können mit dem in Beispiel 6b beschriebenen Verfahren auf Antigenität gescreent werden. Zusammenfassend werden die Antigene nach dem in Beispiel 6b ausführlich beschriebenen Verfahren gereinigt und in die Näpfe von Mikrotiterplatten platziert. Die Polypeptide werden mit Blocklösung gewaschen und dann mit Seren umgesetzt, die bekanntermaßen Anti-HEV-Antikörper enthalten. Die ungebundenen Antikörper werden ausgewaschen, und ein an ein Reportermolekül konjugierter zweiter Antikörper wird dann mit den Peptid-Antikörper-Komplexen umgesetzt. Ergebnisse können nach dem Auswaschen von ungebundenem zweitem Antikörper durch Nachweis des Reportermoleküls erhalten werden.

[0104] Auf diese Weise gemäß der Erfindung hergestellte 62K-Antigene der vorliegenden Erfindung sind jene, die eine im Wesentlichen ähnliche Immunreaktivität mit HEV-positiven Seren aufweisen, die der eines in

Insektenzellen produzierten 62K-Antigens mit der Sequenz von Seq.-ID Nr. 15 ähnlich ist. Die Immunoreaktivität ist im Wesentlichen ähnlich, wenn der prozentuelle Anteil von Serumproben, der mit beiden Antigenen reaktiv ist, vorzugsweise größer als 80%, bevorzugter größer als 90% und sogar noch bevorzugter größer als 95% ist.

F. Herstellung von antigenen Polypeptiden und Antikörpern

[0105] Wie hierin beschrieben wird, umfasst das 62K-Antigen Gemische von Proteinen (z. B. die 58,1-kDa- und 56,5-kDa-Spezies, Beispiele 6 und 9) oder einzelne Polypeptide (z. B. Seq.-ID Nr. 15, Seq.-ID Nr. 16, Seq.-ID Nr. 25, Seq.-ID Nr. 26, Seq.-ID Nr. 27 und Seq.-ID Nr. 28), die sich von den carboxyterminalen 549 Aminosäuren des ORF2 von HEV herleiten. Eine der Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung umfasst die Herstellung eines 62K-Antigens, das zwei Polypeptide enthält, die durch Expression einer kodierenden Sequenz in Insektenzellen erhalten werden (Beispiele 4 und 6). Andere Expressionssysteme können verwendet werden, um die einzelnen Polypeptide oder Gemische von Polypeptiden der vorliegenden Erfindung herzustellen.

[0106] Beispielsweise können Polynukleotidsequenzen, die für ein Antigen oder für Antigene der vorliegenden Erfindung kodieren, in das Plasmid p-GEX oder in verschiedene Varianten davon kloniert werden. Das Plasmid pGEX (Smith et al. (1988)) und seine Derivate exprimieren die Polypeptidsequenzen eines klonierten Inserts, das im Leseraster an das Protein Glutathion-S-Transferase fusioniert ist (sj26). In einer der Vektorkonstruktionen wird das Plasmid pGEX-hisB, eine Aminosäuresequenz von 6 Histidinen, am Carboxyterminus des Fusionsproteins eingeführt.

[0107] Die verschiedenen rekombinanten pGEX-Plasmide können in geeignete Stämme von *E. coli* transformiert werden, und die Fusionsproteinproduktion kann durch Zugabe von IPTG (Isopropylthiogalactopyranosid) induziert werden. Solubilisiertes rekombinantes Fusionsprotein kann dann aus Zellysaten der induzierten Kulturen unter Verwendung von Glutathion-Agarose-Affinitätschromatographie gereinigt werden.

[0108] Im Falle von β -Galactosidase-Fusionsproteinen (wie z. B. jene, die von Lambda-gt11-Klonen produziert werden) kann das fusionierte Protein leicht mittels Affinitätschromatographie gereinigt werden oder indem das Zellysatmaterial über einen festen Träger mit einem oberflächengebundenen Anti- β -Galactosidase-Antikörper geschickt wird.

[0109] Ebenfalls in der Erfindung umfasst ist ein Expressionsvektor, wie z. B. die oben beschriebenen Lambda-gt11- oder pGEX-Vektoren, welche die für die Polypeptide der vorliegenden Erfindung kodierenden Sequenzen (z. B. Seq.-ID Nr. 15/Seq.-ID Nr. 16, Seq.-ID Nr. 25/Seq.-ID Nr. 26 und Seq.-ID Nr. 27/Seq.-ID Nr. 28 oder eine dazu homologe Sequenz) und Expressionskontrollelemente enthalten, welche die Expression der kodierenden Regionen in einem geeigneten Wirt ermöglichen. Die Kontrollelemente umfassen im Allgemeinen einen Promotor, ein Translationsinitiationscodon und Translations- und Transkriptionsterminationssequenzen sowie eine Insertionsstelle zur Einführung des Inserts in den Vektor.

[0110] Die für das gewünschte antigene Polypeptid kodierende DNA kann in eine beliebige Anzahl von im Handel erhältlichen Vektoren kloniert werden, um die Expression des Polypeptids in einem geeigneten Wirt hervorzurufen. Diese Systeme umfassen, sind jedoch nicht eingeschränkt auf, die folgenden: Baculovirus-Expression (Reilly et al.; Beames et al.; Pharmingen; Clontech, Palo Alto, Kalifornien), Vaccinia-Expression (Earl (1991); Moss et al.), Expression in Bakterien (Ausubel et al.; Clontech), Expression in Hefe (Gellison (1992); Romanos (1992); Goeddel; Guthrie und Fink), Expression in Säugetierzellen (Clontech; Gibco-BRL, Ground Island, NY), Chinahamster-Eierstock-(CHO-)Zelllinien (Haynes (1983), Lau (1984), Kaufman (1990)). Diese rekombinanten Polypeptidantigene können direkt oder als Fusionsproteine exprimiert werden.

[0111] Die Expression in Hefesystemen hat den Vorteil großtechnischer Produktionsmöglichkeit. Die rekombinante Proteinproduktion durch Vaccinia und CHO-Zelllinien haben den Vorteil, dass sie Säugetierexpressionssysteme sind. Weiters hat die Vaccinia-Virus-Expression mehrere Vorteile, einschließlich der folgenden: (i) ihr breites Wirtsspektrum; (ii) getreue posttranskriptionelle Modifizierung, Prozessierung, Faltung, Transport, Sekretion und Assemblierung rekombinanter Proteine; (iii) hohes Ausmaß an Expression von relativ löslichen rekombinanten Proteinen; und (iv) die hohe Fähigkeit, fremde DNA aufzunehmen.

[0112] Die rekombinant exprimierten Polypeptidantigene werden typischerweise aus lysierten Zellen oder aus Kulturmédien isoliert. Die Reinigung kann durch hierin beschriebene Verfahren durchgeführt werden.

[0113] Mit irgendeinem dieser Verfahren erhaltene Antigene können zur Antikörpererzeugung, für Diagnose-
tests und Vakzineentwicklung verwendet werden.

[0114] Es können gegen die Polypeptidantigene der vorliegenden Erfindung gerichtete spezifische (polyklo-
nale oder monoklonale) Antikörper hergestellt werden. Beispielsweise kann gereinigtes Antigen oder fusionier-
tes Antigenprotein der vorliegenden Erfindung zur Herstellung von monokonalen Antikörpern verwendet wer-
den. In diesem Fall werden die Milz oder Lymphozyten aus einem immunisierten Tier entfernt und immortalisi-
ert oder dazu verwendet, um Hybridome mittels Verfahren herzustellen, die dem Fachkundigen auf dem Ge-
biet der Erfindung bekannt sind (Harlow et al.). Um ein vom Menschen stammendes Hybridom herzustellen,
wird ein menschlicher Spender gewählt. Ein mit den Polypeptiden der vorliegenden Erfindung geimpfter Spen-
der kann als ein geeigneter Lymphozytenspender dienen. Lymphozyten können aus einer Peripherblutprobe
isoliert werden. Das Epstein-Barr-Virus (EBV) kann verwendet werden, um menschliche Lymphozyten zu im-
mortalisieren, oder es kann ein geeigneter Fusionspartner verwendet werden, um vom Menschen stammende
Hybridome herzustellen. Primäre In-vitro-Sensibilisierung mit virusspezifischen Polypeptiden kann bei der Er-
zeugung menschlicher monoklonaler Antikörper verwendet werden.

[0115] Von den immortalisierten Zellen sekretierte Antikörper werden gescreent, um jene Klone zu ermitteln,
die Antikörper der gewünschten Spezifität sekretieren, beispielsweise unter Verwendung der ELISA- oder
Western-Blot-Verfahren.

[0116] In einem weiteren Aspekt umfasst die vorliegende Erfindung Nucleinsäuremoleküle (z. B. DNA oder
RNA), die für die Polypeptidantigene der vorliegenden Erfindung kodieren.

G. Synthetische Produktion von HEV-Peptiden

[0117] Zusätzlich zu den Verfahren zur Herstellung der oben beschriebenen Peptide, können Peptide einer
Länge von bis zu fünfzig Aminosäuren durch herkömmliche Festphasensyntheseverfahren hergestellt werden.
Solche Verfahren sind dem Fachkundigen auf dem Gebiet der Erfindung bekannt. Auf diese Weise hergestellte
Peptide können kovalent an andere Peptide oder Proteinkonjugate oder Gruppierungen gebunden werden, die
beispielsweise rekombinant in einem Fusionsprotein gebildet werden würden.

III. Diagnoseverfahren

[0118] In einem ähnlichen Verfahren betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Diagnose von Individuen mit
HEV-Infektionen, worin HEV-hergeleitete Peptidantigene verwendet werden, um das Serum eines Individuums
auf die Gegenwart von Anti-HEV-Antikörpern zu untersuchen.

A. Immunoreaktivität von HEV-Antigenen

[0119] Im Anschluss an die Produktion von HEV-Antigenen werden Serumproben aus Individuen, die bekann-
termaßen mit HEV infiziert sind, auf ihre Fähigkeit hin getestet, an solche Antigene zu binden. Tests für Anti-
körper-Antigen-Bindung sind auf dem Gebiet der Erfindung wohl bekannt (Harlow (1988)). Festphasentests,
wie z. B. der Enzyme-linked-immunosorbent-assay-(ELISA-)Bindungstest, sind zum Messen der Antikör-
per-Peptidantigen-Bindung besonders zweckdienlich. Solche Tests können in direkten oder kompetitiven Bin-
dungstestformaten durchgeführt werden. Im direkten Verfahren wird das Testpeptid an eine Festphase adsor-
biert. Test-Anti-HEV-Antiseren werden dem Peptid zugegeben, und die Bindung von menschlichem Antikörper
an das Peptid wird beispielsweise wie im Verfahren von Beispiel 8 gemessen.

[0120] Alternativ dazu können, wenn Peptide als Fusionsproteine einer Größe exprimiert werden, die für die
Zurückhaltung an einer SDS-PAGE ausreicht, Western-Blots verwendet werden, um die Bindung des Pepti-
dabschnitts des Fusionsproteins an eine Serumprobe zu bestimmen.

[0121] Es konnte gezeigt werden, dass die Klone 406.3-2(M) und 406.4-2(M) für immunoreaktive Peptide ko-
dieren (Internationale PCT-Anmeldung PCT/US 93100475, eingereicht am 15. Jänner 1993; Internationale
PCT-Anmeldung PCT/US 93/00459, eingereicht am 15. Jänner 1993; Internationale PCT-Anmeldung PCT/US
91/02368, eingereicht am 5. April 1991, WO 91/15603, veröffentlicht am 17. Oktober 1991). Bei weiteren Un-
tersuchungen mit diesen Peptiden und ihren Analoga aus dem Burma-Stamm mit HEV-positiven menschlichen
Seren (aus fünf verschiedenen Epidemien) war Peptid 406.3-2(M) mit acht von elf getesteten Proben positiv,
und Peptid 406.4-2(M) war mit neun von elf getesteten Proben positiv, und die Peptide 406.3-2(B) und 406.4-2
waren beide mit allen sechs von sechs getesteten Proben positiv (Yarbough (1991), hierin durch Verweis auf-

genommen). Eine Beschreibung von Experimenten, die zu den obigen Ergebnissen führten, findet sich in Beispiel 1. Das Peptidantigen SG3 erwies sich als höchst immunoreaktiv mit infizierten Seren (Internationale PCT-Anmeldung PCT/US 93/00475, eingereicht am 15. Jänner 1993; Internationale PCT-Anmeldung PCT/US 93/00459, eingereicht am 15. Jänner 1993).

[0122] Um die Antigenität eines gereinigten c62K-Proteinpräparats in der vorliegenden Erfindung zu beurteilen, wurden Immuntests unter Verwendung einer Palette von menschlichen Seren der akuten Phase und konvaleszenten Phase durchgeführt, die während verschiedenen Hepatitis-E-Epidemien entnommen wurden. Die Seren wurden mittels ELISA auf IgG- und IgM-Antikörper gegen HEV gemäß dem Verfahren von Beispiel 8 getestet. Drei vom mutmaßlichen HEV-Kapsidprotein hergeleitete Antigene wurden verwendet: (1) SG3, 327 Aminosäuren von ORF2 (Seq.-ID Nr. 17), exprimiert in *E. coli*; (2) 73K, 660 Aminosäuren von ORF2 (Seq.-ID Nr. 13), exprimiert in Baculovirus; und (3) c62K, 549 Aminosäuren von ORF2 (Seq.-ID Nr. 15), prozessiert durch (eine) Baculovirus-Proteinase(n).

[0123] Die Serumproben stammten aus bestätigten und vermuteten Hepatitis-E-Fällen in endemischen Regionen. Wie in untenstehender Tabelle 1 dargestellt, detektierte das in Baculovirus exprimierte c62K-Protein messbaren Antikörper gegen HEV in mehreren reinrassigen Proben aus akuten Hepatitis-E-Fällen, die bei Verwendung von SG3, dem besten in *E. coli* exprimierten HEV-Antigen (Yarbough (1994)), nicht nachgewiesen worden wären. Proben, die nur gegen das c62K-Antigen positiv waren, sind durch einen Stern gekennzeichnet. Für IgG-Anti-HEV waren 3/18 Serumproben (17%) ausschließlich mit dem c62K-Protein antikörperpositiv. Für IgM-Anti-HEV waren 7/18 Serumproben (39%) ausschließlich mit dem c62K-Protein antikörperpositiv. In den meisten Fällen legten die O. D.-Werte nahe, dass das vom SG3-Protein oder 73K-Protein detektierte Anti-HEV gerade unter dem Schwellwert der zuverlässigen Detektion lag.

| TABELLE 1 | | | |
|--|-------|-------|-------|
| Vergleichende Antigenitätsstudien E.-coli- und Baculovirus-exprimierte Proteine | | | |
| ELISA für Anti-HEV-IgG | | | |
| | SG3 | c62K | 73K |
| Borneo S89 | 0.895 | 2.579 | 1.077 |
| FVH 3 | 0.338 | 1.298 | 0.374 |
| FVH 11 | 1.237 | 2.416 | 1.247 |
| FVH 26 | 0.397 | 1.353 | 0.571 |
| FVH 29 | 0.515 | 1.051 | 0.540 |
| FVH 31 | 0.401 | 2.474 | 0.494 |
| MB0283 | 2.602 | 2.771 | 2.558 |
| MB0288 | 2.088 | 2.506 | 2.311 |
| Som 002 | 1.357 | 2.616 | 1.301 |

| | | | |
|------------------------|-------|-------|-------|
| Som 010 | 2.489 | 2.617 | 2.588 |
| Som 032 | 2.456 | 2.503 | 2.351 |
| Som 055 | 1.930 | 2.386 | 1.539 |
| *Som 428 | 0.284 | 1.687 | 0.312 |
| *Som 443 | 0.246 | 0.727 | 0.337 |
| *Som 458 | 0.206 | 2.441 | 0.257 |
| Som Pool #3 | 2.305 | 2.474 | 2.235 |
| Sudan 54 | 2.159 | 2.717 | 2.310 |
| Sudan 60 | 2.264 | 2.541 | 2.402 |
| ELISA für Anti-HEV-IgM | | | |
| | SG3 | c62K | 73K |
| *Boreno S89 | 0.237 | 2.527 | 0.356 |
| FVH 3 | 0.064 | 0.164 | 0.061 |
| *FVH 11 | 0.091 | 0.405 | 0.115 |
| *FVH 26 | 0.077 | 0.319 | 0.069 |
| *FVH 29 | 0.149 | 0.493 | 0.115 |
| FVH 31 | 0.080 | 0.223 | 0.061 |
| *MB0283 | 0.123 | 0.892 | 0.147 |
| *MB0288 | 0.083 | 0.335 | 0.090 |
| Som 002 | 0.508 | 2.598 | 0.681 |
| Som 010 | 0.534 | 2.526 | 0.939 |
| Som 032 | 0.722 | 2.861 | 0.877 |
| Som 055 | 1.342 | 2.560 | 1.283 |
| Som 428 | 1.165 | 2.463 | 0.863 |
| Som 443 | 0.411 | 1.106 | 0.392 |
| *Som 458 | 0.279 | 1.525 | 0.248 |
| Som Pool #3 | 0.942 | 2.397 | 1.428 |
| Sudan 54 | 0.532 | 2.652 | 0.754 |
| Sudan 60 | 0.396 | 0.529 | 0.414 |

[0124] Insgesamt bewiesen die Ergebnisse, dass die Empfindlichkeit und Spezifität des Tests unter Verwendung von c62K als Antigenquelle signifikant verbessert war. Diese Beobachtung legt nahe, dass die an c62K vorliegenden strukturellen Determinanten, die von während einer natürlichen Infektion hervorgerufenen Anti-HEV-Antikörpern erkannt werden, dem nativen Virion näher kommen als Baculovirus-73K- und in E. coli exprimierte rekombinante Proteine. Insgesamt stellt das 62K-Antigen einen signifikanten Fortschritt zur Detektion niedriger Mengen von gegen das Hepatitis-E-Virus gerichteten Antikörpern dar.

B. Vergleich der Immunoreaktivität zwischen c62K und r62K

[0125] Es wurden vergleichende ELISA-Tests durchgeführt, um die antigenen Ähnlichkeiten zwischen diesen beiden Proteinen zu messen und die Übereinstimmung der r62K- und c62K-Proteinpräparate weiter zu untermauern. Gemäß dem Verfahren von Beispiel 8 wurden äquivalente Mengen von c62K- und r62K-Proteinen verwendet, um die antigenen Ähnlichkeiten zwischen diesen beiden Proteinpräparaten zu messen. Die IgG-Anti-HEV-Detektion mit verschiedenartigen Serumproben zeigte, dass gespaltene (c) und neu konstruierte (r) 62K-Proteinspezies hinsichtlich ihrer Spezifität und Empfindlichkeit zum Nachweis von Anti-HEV vergleichbar waren (Tabelle 2, unten).

TABELLE 2
Vergleichende Antigenitätsstudien
Endpunkttitrationen für *E. coli* und Baculovirus
exprimierte Proteine

ELISA für Anti-HEV-IgG

| | SG3 | r62K | 73K |
|--|--------------------------------------|---|-----------------------------------|
| Cyno 9004 Schimpanse Rusten | 1:1000 1:500 | 1:5000 1:5000 | 1:500 1:200 |
| K. Sa A. Za | 1:1000 1:200 | 1:5000 1:5000 | 1:500 nd |
| Mex 387 Sudan 60 ABTD 80 Som Pool | 1:2500 1:1000 1:1000 1:1000 | 1:10000 1:5000 1:25000 1:25000 | 1:1000 1:500 1:200 1:200 |

ELISA für Anti-HEV-IgM

| | SG3 | 62K | 73k |
|--|----------------------------|---------------------------------|----------------------|
| Cyno 9004 Schimpanse Rusten | nd nd | nd 1:1000 | nd nd |
| K. Sa A. Za | nd 1:100 | 1:200 1:2000 | nd nd |
| Mex 387 Sudan 60 ABTD 80 Som Pool | nd nd 1:200 1:100 | 1:200 nd 1:5000 1:5000 | nd nd nd nd |

C. Empfindlichkeit des r62K-Antigens

[0126] Eine kleine Untergruppe menschlicher und nichtmenschlicher Primatenserien wurde verdünnt und auf Anti-HEV-IgG und -IgM getestet, um die Empfindlichkeit des r62K-Proteinpräparats genau zu bestimmen (Tabelle 3, unten). Verdünnte Seren wurden mit jedem der in *E. coli* und Baculovirus exprimierten Antigene getestet. Der ELISA-Endpunkt wurde als die höchste Verdünnung von Seren definiert, welche immer noch ein positives Ergebnis im Test ermöglichte. Die Endpunkttritutionsdaten etablierten, dass das r62K-Protein eine Nachweisgrenze für Anti-HEV-IgG aufwies, die jene des gegenwärtig verwendeten, in *E. coli* exprimierten SG3-Antigens zumindest um das 5fache übertrifft. Der Nachweis von Anti-HEV-IgM wurde folgerichtig unter Verwendung des r62K-Proteinpräparats als Antigen der Wahl um das 25fache erhöht. Das 62K-Antigen stellt einen signifikanten Fortschritt zum Nachweis geringer Mengen von gegen das Hepatitis-E-Virus gerichteten Antikörpern dar.

TABELLE 3

Vergleichende Antigenitätsstudien
 Gespaltene und neu konstruierte in Baculovirus exprimierte Proteine
 ELISA für Anti-HEV-IgG

| | c62K | r62K | 73K |
|--|-------|-------|-------|
| Bestätigte Fälle in endemischen Regionen | | | |
| ABTD 80 | 2.212 | 2.229 | 0.344 |
| ABTD 86 | 1.689 | 2.399 | 0.309 |
| MB 2/88 | 2.083 | 1.961 | 0.724 |
| Mex F387 | 2.664 | 2.635 | 1.069 |
| Som Pool | 1.679 | 2.264 | 0.342 |
| Sudan 60 | 2.493 | 2.298 | 1.024 |

| Reisende zu endemischen Regionen | | | |
|-------------------------------------|-------|-------|-------|
| A. Za (1/100) | 1.598 | 1.887 | 0.138 |
| A. Za (1/500) | 0.807 | 1.060 | 0.045 |
| K. Sa (1/100) | 1.983 | 1.905 | 0.800 |
| K. Sa (1/500) | 1.226 | 1.314 | 0.219 |
| B. Ka (1/100) | 0.097 | 0.080 | 0.105 |
| B. Ka (1/500) | 0.058 | 0.050 | 0.054 |
| S. Ha (1/100) | 0.116 | 0.122 | 0.122 |
| S. Ha (1/500) | 0.088 | 0.062 | 0.047 |
| Sporadische Fälle - akute Hepatitis | | | |
| HEP 31 | 0.071 | 0.075 | 0.078 |
| HEP 35 | 0.541 | 0.542 | 0.157 |
| HEP 69 | 0.085 | 0.090 | 0.086 |
| HEP 28 | 0.087 | 0.083 | 0.090 |

IV. Therapeutische Anwendungen

[0127] Die immunogene In-vivo-Wirksamkeit des ORF2-62K-Antigens, Schutz gegen eine heterologe Exposition zu verleihen, wurde untersucht (Beispiel 11). Das r62K-Antigen (Beispiele 4, 6 und 9) wurde verwendet, um Cynomolgus-Makak-Affen zu inokulieren, die anschließend mit dem heterologen HEV-Mexikostamm expontan wurden. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass dieses Kandidat-Antigen bei der Entwicklung einer Vakzine zur Prävention akuter Hepatitis E in Entwicklungsländern und dazu zweckdienlich sein könnte, für den Schutz von Reisenden in endemischen Krankheitsregionen zu sorgen.

[0128] Die Immunisierung von Cynomolgus mit dem ORF2-r62K-Protein schützte gegen die anschließende Infektion mit heterologem HEV der Wildform und gegen die Erkrankung. Anerkannte Kriterien zum Nachweis von HEV-Infektion und Virusreplikation umfassen: (1) Nachweis von HEV-Antigen in der Leber, (2) Nachweis von HEV-RNA in den Fäkalien oder im Serum, (3) Serokonversion gegen HEV-Antikörper positiv. Die Hepatitis-E-Krankheit ist definiert als HEV-Infektion und (1) Anstieg von ALT-Spiegeln um mehr als zwei Standardabweichungen über der Basislinie und (2) mit viraler Hepatitis kompatibler Histopathologie.

[0129] Zur Untermauerung der vorliegenden Erfindung durchgeführte Experimente beweisen, dass mit einem vom HEV-Burmastamm hergeleiteten rekombinanten Kapsidprotein immunisierte Tiere von der Exposition mit Virus der Wildform des aufgespaltenen HEV-Mexikostamms geschützt sind. Es traten keine signifikanten Erhöhungen von Leberenzymen und keine histopathologischen Anzeichen für hepatozelluläre Schädigung in irgendeinem der drei immunisierten Tiere auf. Die Inokulation verlieh folglich Schutz gegen Erkrankung bei allen der mit r62K immunisierten Cynomolgus-Affen.

[0130] Für zwei dieser drei inokulierten Tiere wurde der völlige Schutz gegen HEV-Infektion durch die Abwe-

senheit von messbarem/r Virusantigen in der Leber oder Virus-RNA im Stuhl untermauert. Weiters wurden in diesen beiden Tieren die Gegenwart von neutralisierenden Antikörpern nachgewiesen (Beispiel 11, [Fig. 15](#)). Der partielle Schutz gegen Infektion bei einem Cynomolgus, der durch die verzögerte und vorübergehende Gegenwart von Virus-RNA im Stuhl nachgewiesen wurde, könnte mit den relativ niedrigen Mengen an messbaren Anti-HEV-Antikörpern in Verbindung stehen. Trotzdem scheint es, dass in Abwesenheit von nekroentzündlichen Veränderungen Hepatitis durch Immunisierung mit der r62K-Vakzine verhindert wurde, obgleich der völlige Schutz vor Infektion in diesem einen Tier nicht erreicht wurde.

[0131] Wenn benötigt, können die Mengen an neutralisierenden Antikörpern durch Verwendung höherer Dosen Antigen und/oder wiederholter Inokulierungen vor der Exposition mit dem infektiösen Virus erhöht werden. Derartige wiederholte Impfungen werden gegenwärtig für Impfungen beispielsweise gegen Hepatitis-A-Virus (HAV) und Hepatitis-B-Virus (HBV) verwendet.

[0132] Beide Ergebnisse, jene der vakzinierten Tieren und jene der Tiere, die zur Titration des Expositionsinokulumsvirus verwendet wurden, bestätigen, dass die Entwicklung von HEV-Infektion und damit verbundener Krankheit von einer Schwellwertwirkung abhängen, die mit der Menge des Inokulums und der Gegenwart und den Eigenschaften einer vorher bestehenden spezifischen Immunantwort in Beziehung steht. Bei der Titrationsuntersuchung unter Verwendung von HEV-infizierten Tieren standen das Ausmaß an Hepatitis im Verhältnis und der Zeitpunkt des Beginns von ALT-Erhöhungen im umgekehrten Verhältnis zur erhaltenen Menge an Inokulum.

[0133] Im Vakzineabschnitt der Untersuchung legen die Ergebnisse mit Cynomolgus 9339 nahe, dass die Gegenwart von HEV-spezifischer Immunität zum Zeitpunkt der Exposition, obgleich die HEV-Infektion nicht verhindert wurde, in einer begrenzten Infektion resultierte, die durch eine verzögerte Latenz bis zum Beginn nachweisbarer Virusreplikation, eine verkürzte Dauer nachweisbarer Virusreplikation und die Abwesenheit charakteristischer Eigenschaften der von HEV ausgelösten Krankheit gekennzeichnet war.

[0134] In einer früheren Untersuchung (Purdy et al. (1993)) lieferte die Immunisierung mit einer trunkierten, in *E. coli* exprimierten Version von HEV-Burma-ORF2, trpE-C2, verschiedene Schutzausmaße gegen HEV-Infektion und Erkrankung. Für einen Cynomolgus wurde ein völliger Schutz gegen Virusinfektion und Hepatitis nach Exposition mit einem homologen Stamm der Wildform berichtet. Jedoch waren mit dem heterologen HEV-Mexikostamm exponierte Tiere nur teilweise geschützt. Obgleich einer der immunisierten Cynomolgus vor Hepatitis geschützt zu sein schien, war im Tier nach heterologer Exposition der Wildform Virusantigen in der Leber und Virus-RNA im Stuhl nachzuweisen.

[0135] Die in der vorliegenden Patentschrift beschriebenen Daten etablieren erstmals die Durchführbarkeit der Entwicklung einer wirksamen Vakzine für Hepatitis E, das fähig ist, gegenseitigen Schutz gegen die meisten bisher isolierten und charakterisierten divergierenden HEV-Stämme bereitzustellen. Innerhalb der in einem „62K“-ORF2-Vakzinekandidat exprimierten 549 Aminosäuren liegen 31 Aminosäureänderungen zwischen den Burma- und Mexikostämmen (Tam et al. (1991); Huang et al. (1992)) und nicht mehr als 4 Aminosäureänderungen zwischen den näher verwandten Burma-, China- und Pakistanstämmen (Tsarev et al. (1992)) vor.

V. HEV-spezifische Peptidantigene für HEV-Tests

[0136] Dieser Abschnitt beschreibt die Peptidantigene, die im Testset und in Testverfahren eingesetzt werden, die im untenstehenden Abschnitt VI beschrieben werden.

[0137] Gemäß der Erfindung umfassen HEV-Antigene, die sich zur Diagnose von HEV hierin als zweckdienlich auszeichnen, das 62K(B)- oder -(M)-Antigen, das beispielsweise aus einer aus der aus Seq.-ID Nr. 15/Seq.-ID Nr. 16, Seq.-ID Nr. 25/Seq.-ID Nr. 26 und Seq.-ID Nr. 27/Seq.-ID Nr. 28 oder dazu homologen Sequenz bestehenden Gruppe ausgewählten Aminosäuresequenz besteht. Das 62K-Antigen kann durch Spaltung von entweder nativen oder rekombinanten ORF2-Proteinen mit einer Protease, vorzugsweise einer Baculovirus-Protease, hergestellt werden. Alternativ dazu kann das 62K-Antigen neu konstruiert und in einem rekombinanten Expressionssystem exprimiert werden. Neu konstruiertes 62K-Antigen oder „r62K“ enthält vorzugsweise ein Methionin am N-Terminus und wird vorzugsweise von einem Baculovirus-Expressionsvektor in einer Insektenzelle produziert.

[0138] Die 62K-Antigene der Erfindung bestehen aus den carboxyterminalen 549 Resten des Kapsidproteins, das vom offenen Leseraster-2 (relativ zum Burmastamm) kodiert wird, wobei zumindest ein Aminosäurerest vom Carboxyterminus der 549 Aminosäuren deletiert ist. Diese Peptidantigene können wie im obigen Abschnitt

II und im folgenden Beispiel 4 beschrieben hergestellt werden.

[0139] Zur Untermauerung der vorliegenden Erfindung durchgeführte und oben erörterte Experimente beweisen, dass das 62K-Antigen für HEV spezifisch ist; d. h. 62K immunoreagiert mit im Serum von HEV-infizierten Individuen vorhandenen Antikörpern. Das Antigen detektiert möglicherweise nicht alle HEV-positiven Seren und erfasst möglicherweise einige falsch positive, d. h. nicht infizierte Individuen. Es kann erwartet werden, dass das vom Mexikostamm (oder anderen Variantenstämmen) von HEV hergeleitete 62K-Antigen mit HEV-positiven Seren spezifisch immunoreaktiv ist.

[0140] Mehrere HEV-Peptidantigene sind bereits früher charakterisiert worden (Internationale PCT-Anmeldung PCT/US 93/00475, eingereicht am 15. Jänner 1993; Internationale PCT-Anmeldung PCT/US 93/00459, eingereicht am 15. Jänner 1993; Internationale PCT-Anmeldung PCT/US 91/02368, eingereicht am 5. April 1991, WO 91/15603, veröffentlicht am 17. Oktober 1991). Diese Peptide können in Tests in Kombination mit den 62K-Antigenen der vorliegenden Erfindung verwendet werden.

[0141] Ein erstes Antigen in der Gruppe früher charakterisierter HEV-Peptidantigene enthält das vom 406.4-2(B)-Peptid (Seq.-ID Nr. 19) oder 406.4-2(M)-Peptid (Seq.-ID Nr. 20) gebildete Epitop. Ebenfalls vorgesehen sind Peptidantigene, die das von einer zu Seq.-ID Nr. 19 und Seq.-ID Nr. 20 homologen Aminosäuresequenz oder das von einer zwischen Seq.-ID Nr. 19 und Seq.-ID Nr. 20 intern konsistenten Variation gebildete Epitop enthalten. Dieses erste Peptidantigen leitet sich vom Carboxyterminus des vom offen Leseraster-3 kodierten Proteins her. Ein zweites Peptidantigen enthält das vom 406.3-2(B)-Peptid (Seq.-ID Nr. 23) oder 406.3-2(M)-Peptid (Seq.-ID Nr. 24) gebildete Epitop. Ebenfalls als ein zweites Peptidantigen vorgesehen sind Peptidantigene, die das von einer zu Seq.-ID Nr. 11 und Seq.-ID Nr. 12 homologen Aminosäuresequenz oder das von einer zwischen Seq.-ID Nr. 11 und Seq.-ID Nr. 12 intern konsistenten Variation gebildete Epitop enthalten. Ein drittes Peptidantigen enthält das vom SG3(B)-Peptid (Seq.-ID Nr. 17) und SG3(M)-Peptid (Seq.-ID Nr. 18) gebildete Epitop. Ebenfalls als ein drittes Peptidantigen vorgesehen sind Peptidantigene, die das von einer zu Seq.-ID Nr. 17 und Seq.-ID Nr. 18 homologen Aminosäuresequenz oder das von einer zwischen Seq.-ID Nr. 17 und Seq.-ID Nr. 18 intern konsistenten Variation gebildete Epitop enthalten. Diese zweiten und dritten Peptidantigene leiten sich vom Carboxyterminus des vom offenen Leseraster-2 kodierten Kapsidproteins her. [Fig. 3](#) stellt die Sequenz der 406.4-2(B)- und -(M)-Peptide dar, und [Fig. 4](#) stellt die Sequenz der 406.3-2(B)- und -(M)- und SG3(B)- und SG3(M)-Peptide dar. Verfahren zum Erlangen der bestätigenden Peptide sind oben beschrieben und werden in den folgenden Beispielen ausführlich beschrieben.

[0142] Gemäß der vorliegenden Erfindung ist die Reaktivität von Antikörpern in einer Serumprobe aus einem Individuum, bei dem eine Infektion mit einem Hepatitis verursachendem Mittel vermutet wird, gegen ein 62K-Antigen der vorliegenden Erfindung ein zuverlässiges Verfahren zur Diagnose des verursachenden Mittels als HEV. Die Reaktivität gegen die bekannten, in Verbindung mit einem 62K-Antigen verwendeten Peptide kann die Empfindlichkeit und Zuverlässigkeit des unten beschriebenen Diagnoseverfahrens erhöhen.

VI. Nutzen

[0143] Dieser Abschnitt beschreibt Verwendungen der antigenen Peptide und Proteine der Erfindung als Diagnosereagenzien zur Diagnose von Hepatitis-E-Virusinfektion und in Vakzinezusammensetzungen zum Schutz eines Individuums vor Infektion mit HEV.

A. Diagnoseverfahren und Sets

[0144] Drei grundlegende Typen von diagnostischen Anwendungen der Antigene werden beschrieben. Der erste basiert auf der Hemmung von Komplement-vermittelter, Antikörper-abhängiger Zytolyse durch das Antigen. Bei diesem Verfahren wird Serum aus einem Testindividuum mit HEV-infizierten gezüchteten menschlichen Hepatozyten in Gegenwart des Komplements umgesetzt. Die Gegenwart von Anti-HEV-Antikörper wird durch Zelllyse nachgewiesen, wie z. B. mittels Trypanblau-Farbstoffausschluss beurteilt werden kann. Bei Beobachtung von Zelllyse wird die Spezifität des Anti-HEV-Antikörpers für das HEV-Antigen nachgewiesen, indem zuerst das Serum mit überschüssigem Antigen umgesetzt und das Serum dann mit den Zellen in Gegenwart von Komplement gemischt wird. Antikörperspezifität wird durch eine wesentliche Verminderung der Zelllyse angezeigt. Das Verfahren kann auch dazu verwendet werden, um den Antikörpertiter im Analytenserum zu titrieren, indem das Serum mit ansteigenden Antigenmengen bis zu derjenigen Konzentration titriert wird, bei der als Erstes eine merkliche Wirkung auf das Ausmaß an Zelllyse zu beobachten ist.

[0145] Der zweite allgemeine Testtyp ist ein Festphasenimmuntest. Bei diesem Verfahren wird ein Festpha-

senreagens mit oberflächengebundenem Antigen mit Analytserum unter Bedingungen umgesetzt, die eine Antikörperbindung an das Antigen am Reagens ermöglichen. Nach dem Waschen des Reagens zur Entfernung von ungebundenen Serumkomponenten wird das Reagens mit reportermarkiertem Anti-Human-Antikörper umgesetzt, um den Reporter an das Reagens proportional zur Menge von gebundenem Anti-HEV-Antikörper am festen Träger zu binden. Das Reagens wird wiederum gewaschen, um ungebundenen markierten Antikörper zu entfernen, und die am Reagens gebundene Reportermenge wird bestimmt. Typischerweise ist der Reporter wie im in Beispiel 1 beschriebenen System ein Enzym, das durch Inkubieren des festen Reagens in Gegenwart eines geeigneten fluorimetrischen oder kalorimetrischen Substrats detektiert wird. Jedoch können radioaktive Marker und andere Reporter verwendet werden.

[0146] Nach dem Umsetzen des Analytenserums mit dem festphasengebundenen Antigen und Waschen zum Entfernen der ungebundenen Serumkomponenten kann man alternativ dazu anstelle der Verwendung eines Anti-Human-Antikörpers als Reporter-Vermittler das an den Reporter gebundene Antigen selbst als Detektionsreagens verwenden. Der kompetitive Test nutzt die Zweiwertigkeit von Antikörpern aus. Es können bei dieser Ausführungsform des Festphasentests dieselben Reporter verwendet werden, wie sie oben beschrieben wurden.

[0147] Es können mehrere Antigene zusammen oder hintereinander in jedem der oben beschriebenen Tests verwendet werden. Außerdem kann die Reaktion gegen jedes Antigen unterschieden werden. Beispielsweise können im oben beschriebenen Festphasentest zwei oder mehrere verschiedene Antigene an getrennten Orten an eine Festphase gebunden werden, so dass Reaktionen gegen jedes Antigen gesondert quantifiziert werden können. Alternativ dazu können mit unterscheidbaren Reportern markierte Antigene verwendet werden, um Antigene zu detektieren, die untereinander zerstreut sind.

[0148] Das Festphasenreagens im obigen Test wird mit bekannten Techniken zur Bindung von Proteinmaterial an festes Trägermaterial, wie z. B. Polymerperlen, Tauchstäbchen oder Filtermaterial, hergestellt. Diese Bindungsverfahren umfassen im Allgemeinen unspezifische Adsorption des Proteins an den Träger oder kovalente Bindung des Proteins, typischerweise über eine freie Aminogruppe an eine chemisch reaktive Gruppe am festen Träger, wie z. B. einer aktivierten Carboxy-, Hydroxy- oder Aldehydgruppe.

[0149] Der dritte allgemeine Testtyp ist ein homogener Test, bei dem die Antikörperbindung an einen festen Träger eine gewisse Änderung im Reaktionsmedium hervorruft. Bekannte, vordem vorgeschlagene allgemeine Typen homogener Tests umfassen: (a) spinmarkierte Reporter, wo die Antikörper-Bindung an das Antigen durch eine Änderung der Reportermobilität detektiert wird (Verbreiterung des Spinaufspaltungspeaks); (b) Fluoreszenzreporter, wo die Antikörperbindung Enzym/Substrat-Wechselwirkungen bewirkt; und (d) Liposom-gebundene Reporter, wo die Bindung zur Liposom-Lyse und Freisetzung des eingekapselten Reporters führt. Die Adaptierung dieser Verfahren für die Antigene der vorliegenden Erfindung folgt herkömmlichen Verfahren zur Herstellung homogener Testreagenzien.

[0150] Bei jedem dieser drei oben beschriebenen allgemeinen Tests umfasst das Testverfahren das Umsetzen des Serums aus einem Testindividuum mit dem Antigen und die Untersuchung des Antigens auf die Gegenwart von gebundenem Antikörper. Im ersten Test wird die Untersuchung durchgeführt, indem die Abnahme der bei Bindung des Antikörpers an das Antigen beobachteten, vom Antikörper ausgelösten Zytolyse beobachtet wird. Im Festphasentest umfasst das Untersuchen die Bindung eines markierten Anti-Human-Antikörpers (oder markierten Antigens) an den untersuchten Antikörper und das Messen der an den festen Träger gebundenen Reportermenge. Und im dritten Testtyp wird die Untersuchung durchgeführt, indem die Wirkung der Antikörperbindung auf ein homogenes Testreagens beobachtet wird.

B. Vakzinezusammensetzungen und Verfahren

1. Herstellung von Vakzinezusammensetzungen

[0151] Die rekombinanten oder gespaltenen 62K-Antigene der Erfindung können nach bekannten Verfahren in eine Vakzinezusammensetzung aufgenommen werden, um die Antigenität der injizierten Antigene zu verstärken.

[0152] In einer der Zusammensetzungen wird das HEV-Antigen kovalent an ein Trägerprotein, wie z. B. Schlüsselloch-Napfschnecke-Hämocyanin, gekoppelt und entweder in Lösungsform oder in Kombination mit einem Adjuvans injiziert. Alternativ dazu kann die Nicht-HEV-Gruppierung des Proteins, wo das Antigen als Teil eines Fusionsproteins hergestellt wird, als das Trägerprotein dienen.

[0153] Das derivisierte Protein oder Fusionsprotein wird in einem pharmazeutisch annehmbaren Träger aufgenommen, wie z. B. in einer Lösung oder in einem Adjuvans, wie z. B. umgesetztes Alaun.

[0154] Alternativ dazu kann das freie Antigen selbst, wie z. B. das HEV-62K-Antigen, in Alaun formuliert oder ohne Adjuvans verwendet werden. Eine geeignete Vakzine mit Adjuvans weist eine bevorzugte Antigenkonzentration von ungefähr 1 mg Antigen/mg Alaun auf und darf 80 mg Alaun pro Injektion nicht überschreiten.

2. Antigen-Vakzine-Verfahren

[0155] Die Erfindung kann ein Verfahren der Hemmung der Infektion eines Individuums durch Hepatitis-E-Virus ermöglichen, indem dem Patienten durch parenterale Injektion, z. B. durch intramuskuläre oder intravenöse Injektion, die Vakzinezusammensetzung der Erfindung verabreicht wird. Bevorzugte Vakzinezusammensetzungen zur Verwendung im Verfahren sind jene, bei denen das HEV-Antigen diejenige Sequenz in den Peptiden umfasst, die durch Seq.-ID Nr. 15, Seq.-ID Nr. 16, Seq.-ID Nr. 25, Seq.-ID Nr. 26, Seq.-ID Nr. 27 und Seq.-ID Nr. 28 mit oder ohne einem aminoterminalen Methionin und dazu homologe Sequenzen festgelegt sind. Die Antigenvakzinezusammensetzung wird vorzugsweise intramuskulär in einer Reihe von Impfungen verabreicht, beispielsweise zwei oder drei Injektionen, wobei jede in vierwöchigen Intervallen verabreicht wird.

[0156] Einzelne Dosierungen der Vakzinezusammensetzung werden in einer therapeutisch wirksamen Menge verabreicht. Solche Dosierungen werden von Ärzten, beispielsweise auf Basis von klinischen Versuchsdaten, ermittelt. Beispielhafte Dosierungsbereiche für die Vakzinezusammensetzung betragen ungefähr 0,05 µg bis 1 mg, vorzugsweise ungefähr 0,1 µg bis 30 µg. Einzelne Dosierungen können einzelnes 62K-Antigenpolypeptid oder mehrere von der carboxyterminalen Region von HEV-ORF2 mit 549 Aminosäuren hergeleitete Polypeptide enthalten. Außerdem können solche 62K-Antigene mit anderen bekannten HEV-antigenen Polypeptiden für Vakzineformulierungen kombiniert werden.

[0157] Das 62K-Antigenpräparat der vorliegenden Erfindung kann zweckdienlich sein, um (i) Epidemien und sporadische Fälle von Hepatitis E in Entwicklungsländern zu verhindern und (ii) Schutz für Reisende in diese Regionen bereitzustellen. Die hierin beschriebenen In-vitro- und In-vivo-Experimente können verwendet werden, um das optimale Immunisierungsregime mit dem 62K-Antigenpräparat zu bestimmen.

[0158] Wie oben erörtert wurde, können die 62K-Antigene der vorliegenden Erfindung bei der Vakzineherstellung verwendet werden. Weiters können gegen die Polypeptidantigene der vorliegenden Erfindung erzeugten Antikörper zur passiven Immuntherapie oder passiven Immunprophylaxe verwendet werden. Gegen die Antigene der vorliegenden Erfindung gerichtete Antikörper können in ähnlichen Mengen verabreicht werden, wie sie für andere therapeutische Antikörperverabreichungen verwendet werden. Beispielsweise wird gepooltes Gamma-Globulin mit 0,02–0,1 mg/Pfund Körpergewicht während der frühen Inkubation anderer Viruskrankheiten, wie z. B. Tollwut, Masern und Hepatitis B, verabreicht, um die Etablierung einer Infektion zu behindern. Folglich können mit den 62K-Antigenen reaktive Antikörper passiv für sich alleine oder in Verbindung mit einem weiteren Anti-Virus-Wirkstoff einem mit HEV infizierten Wirt verabreicht werden, um die Fähigkeit des Wirts zu verstärken, mit der Infektion zurecht zu kommen.

[0159] Die Zweckdienlichkeit und Wirksamkeit der oben beschriebenen therapeutischen Verfahren kann in vitro unter Verwendung der oben beschriebenen Zellsysteme und in vivo unter Verwendung der oben beschriebenen Tiermodellsysteme beurteilt werden.

[0160] Die folgenden Beispiele, welche die verschiedenen Verfahren und Zusammensetzungen der Erfindung illustrieren, dienen der Illustration, schränken jedoch den Schutzmfang der Erfindung nicht ein.

Materialien

[0161] Enzyme: DNase I und Alkalische Phosphatase wurden von Boehringer Mannheim Biochemicals (BMB, Indianapolis, IN) erhalten; EcoRI, EcoRI-Methylase, DNA-Ligase und DNA-Polymerase I wurden von New England Biolabs (NEB, Beverly, MA) erhalten; und RNase A wurde von Sigma (St. Louis, MO) erhalten.

[0162] Andere Reagenzien: EcoRI-Linker wurden von NEB erhalten; und Nitroblau-Tetrazolium (NBT), 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP), 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-B-D-galactopyranosid (Xgal), p-Nitropheophenylphosphat und Isopropyl-B-D-thiogalactopyranosid (IPTG) wurden von Sigma erhalten. cDNA-Synthese-Set und Random-Priming-Markierungssets sind von Boehringer-Mannheim Biochemicals (BMB, Indianapolis, IN) erhältlich.

[0163] Klonierungs- und Expressionsvektoren, wie z. B. pBluescriptTM (pBS) können von Stratagene Cloning Systems (La Jolla, CA) erhalten werden, der pGEXTM-Expressionsvektor kann von Pharmacia (Piscataway, NJ) erhalten werden, und pBluBacIII kann von Invitrogen (San Diego, CA) erhalten werden.

[0164] Immunodiagnose-Testsets für Hepatitis-A-Virus (HAV), Hepatitis-B-Virus (HBV), Hepatitis-C-Virus (HCV) sind von Abbott Diagnostics (Abbott Park, IL, USA) erhältlich. Immunodiagnose-Testsets für Hepatitis-E-Virus (HEV) sind von Genelabs Diagnostics USA (Redwood City, CA) erhältlich.

[0165] DEAE EMD 650(S) wurde von E. Merck Separations (Darmstadt, Deutschland) erhalten. Sephadryl S-100 und S-1000 wurden von Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ) erhalten. Poros-Q/F- und -HQ/F-Chromatographiesäulen wurden von PerSeptive Biosystems (Cambridge, MA) erhalten. Pufferbestandteile wurden von AMRESCO (Solon, OH) erhalten, und Proteine wurden an einem Waters-650E-Chromatographiearbeitsplatz (Milford, MA) gereinigt, wobei das Datenmanagement von Millenium 2010 Software (Milford, MA) bereitgestellt wurde.

Beispiel 1

Herstellung von 406.3-2-, 406.4-2- und SG3-Antigenen

A. Produktion von Random-HEV-DNA-Fragmenten

[0166] Ein pBET1-Plasmid (Tam et al. (1991a)) wurde mit EcoRI verdaut, um das Insert freizusetzen, das aus dem linearisierten Plasmid mittels Gelektrophorese gereinigt wurde. Das gereinigte Fragment wurde in Standard-Verdauungspuffer (0,5 M Tris-HCl, pH 7,5; 1 mg/ml BSA; 10 mM MnCl₂) auf eine Konzentration von ungefähr 1 mg/ml suspendiert und mit DNase I ungefähr 5 Minuten lang bei Raumtemperatur verdaut. Diese Reaktionsbedingungen wurden aus einer vorhergehenden Kalibrierungsuntersuchung ermittelt, bei der die zur vorwiegenden Produktion von 100- bis 300-Basenpaarfragmenten erforderliche Inkubationszeit bestimmt wurde. Das Material wurde vor der Ethanolpräzipitation mit Phenol/Chloroform extrahiert.

[0167] Die Enden der Fragmente im Verdauungsgemisch wurden abgestumpft und mit EcoRI-Linkern ligiert. Die resultierenden Fragmente wurden mittels Elektrophorese (5–10 V/cm) an einem 1,2%igen Agarosegel unter Verwendung von PhiX174/HaeIII- und Lambda/HindIII-Größermarkern analysiert. Die 100- bis 300-bp-Fraktion wurde auf NA45-Streifen (Schleicher und Schuell, Keene, NH) eluiert, die dann in 1,5-ml-Mikroröhrchen mit Elutionslösung (1 M NaCl, 50 mM Arginin, pH 9,0) gegeben und 30–60 Minuten lang bei 67°C inkubiert wurden. Die eluierte DNA wurde mit Phenol/Chloroform extrahiert und dann mit zwei Volumenanteilen Ethanol präzipitiert. Das Pellet wurde in 20 ml TE (0,01 M Tris-HCl, pH 7,5, 0,001 M EDTA) resuspendiert.

B. Klonierung in einen Expressionsvektor

[0168] Lambda-gt11-Phagenvektor (Huynh) wurde von Promega Biotech (Madison, WI) erhalten. Dieser Klonierungsvektor weist eine einzigartige EcoRI-Klonierungsstelle 53 Basenpaare stromauf des Beta-Galactosidase-Translationsterminationscodons auf. Die obigen, entweder direkt aus den kodierenden Sequenzen oder nach Amplifikation von cDNA bereitgestellten genomischen Fragmente wurden durch Mischen von 0,5–1,0 µg von EcoRI-gespaltenem gt11, 0,3–3 µl der obigen großenfraktionierten Fragmente, 0,5 µl IOX-Ligationspuffer (oben), 0,5 µl Ligase (200 Einheiten) und destilliertem Wasser auf 5 µl in die EcoRI-Stelle eingeführt. Das Gemisch wurde über Nacht bei 14°C inkubiert, gefolgt von In-vitro-Verpackung gemäß Standardverfahren (Maniatis (1982), S. 256–268).

[0169] Die verpackten Phagen wurden verwendet, um E.-coli-Stamm KM392, der von Dr. Kevin Moore, DNAX (Palo Alto, CA), erhalten wurde, zu infizieren. Alternativ dazu kann E.-coli-Stamm Y1090 verwendet werden, der von der American Type Culture Collection (ATCC-Nr. 37197) erhältlich ist. Die infizierten Bakterien wurden ausplattiert und die resultierenden Kolonien auf Verlust der Beta-Galactosidase-Enzymaktivität (durchsichtige Plaques) in Gegenwart von X-Gal unter Verwendung eines standardmäßigen X-Gal-Substrat-Plaquetestverfahren (Maniatis) überprüft. Ungefähr 50% der Phagenplaques zeigten Verlust von Beta-Galactosidase-Aktivität (Rekombinanten).

C. Screening auf rekombinante HEV-Proteine

[0170] Konvaleszentes HEV-Antiserum wurde aus Patienten erhalten, die während dokumentierten HEV-Ausbrüchen in Mexiko, Borneo, Pakistan, Somalia und Burma infiziert wurden. Die Seren waren mit VLPs

in Stuhlproben von jedem von mehreren anderen Patienten mit ETNANB-Hepatitis immunoreaktiv.

[0171] Ein Rasen von E.-coli-KM392-Zellen, die mit ungefähr 10^4 pfu der Phagenstammkultur infiziert waren, wurde an einer 150-mm-Platte hergestellt und verkehrt 15–18 Stunden lang bei 37°C inkubiert. Der Rasen wurde mit einer Nitrozellulosefolie bedeckt, was den Transfer von exprimiertem rekombinantem Protein von den Plaques auf das Papier bewirkte. Platte und Filter wurden zur Abgleichung von entsprechenden Platten- und Filterpositionen markiert.

[0172] Das Filter wurde zweimal in TBST-Puffer (10 mM Tris, pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20) gewaschen, mit AIB (TBST-Puffer mit 1% Gelatine) geblockt, wiederum in TBST gewaschen und nach Zugabe von Antiserum (verdünnt auf 1 : 50 in AIB, 12–15 ml/Platte) über Nacht inkubiert. Die Folie wurde zweimal in TBST gewaschen und dann mit enzymmarkiertem Anti-Human-Antikörper kontaktiert, um den markierten Antikörper an Filterstellen zu binden, die vom Antiserum erkannte Peptide enthielten. Nach einem letzten Waschschritt wurde das Filter in einem Substratmedium entwickelt, das 33 ml NBT (50-mg/ml-Stammlösung, auf 4°C gehalten), gemischt mit 16 ml BCIP (50-mg/ml-Stammlösung, auf 4°C gehalten) in 5 ml Alkalische-Phosphatase-Puffer (100 mM Tris, pH 9,5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) enthielt. Eine violette Färbung trat an Stellen der vom Antiserum erkannten Peptidproduktion auf.

D. Screening-Ausplattieren

[0173] Die Bereiche der im vorhergehenden Schritt bestimmten Peptidproduktion wurden mit ungefähr 100–200 pfu an einer 82-mm-Platte neu ausplattiert. Die obigen Schritte, beginnend mit einer 15- bis 18-stündigen Inkubation bis zur NBT-BCIP-Entwicklung, wurden zur Plaque-Reinigung derjenigen Phagen wiederholt, die ein Antigen sekretierten, das zur Reaktion mit dem HEV-Antikörper fähig war. Die identifizierten Plaques wurden entnommen und in Phagenpuffer (Maniatis, S. 443) eluiert.

[0174] Zwei Subklone, die ausgewählt wurden, waren die 406.3-2- und 406.4-2-Klone, deren Sequenzen oben dargelegt sind. Diese Sequenzen wurden aus einer amplifizierten, von einer menschlichen Mexiko-HEV-Stuhlprobe hergeleiteten cDNA-Bibliothek isoliert. Unter Verwendung der in diesem Abschnitt beschriebenen Techniken sind die von diesen Klonen exprimierten Polypeptide auf Immunoreaktivität gegen eine Anzahl von verschiedenen menschlichen HEV-positiven Seren getestet worden, die von Quellen überall in der Welt erhalten wurden.

[0175] Wie in der untenstehenden Tabelle 4 gezeigt ist, immunoreagierten 9 Seren mit dem von 406.4-2 exprimierten Polypeptid, und 8 Seren immunoreagierten mit vom 406.3-2-Klon exprimierten Polypeptid.

[0176] Zum Vergleich zeigt die Tabelle auch die Reaktivität der verschiedenen menschlichen Seren mit dem Nicht-Strukturpeptid Y2. Nur eines der Seren reagierte mit dem von diesem Klon exprimierten Polypeptid. Keine Immunoreaktivität wurde für normale Expressionsprodukte des gt11-Vektors beobachtet.

TABELLE 4

Immunoreaktivität von rekombinanten HEV-Proteinen: Menschliche Seren

| Seren | Quelle | Stadium | 406.4-2(M) | 406.3-2(M) | 406.4-2(B) | 406.3-2(B) | Y2 | Igt11 |
|--------|----------|---------|------------|------------|------------|------------|----|-------|
| FVH-21 | Burma | A | - | - | NT | NT | - | - |
| FVH-8 | Burma | A | + | - | NT | NT | + | - |
| B-IgG | Burma | C | + | + | + | + | NT | - |
| SOM-19 | Somalia | A | + | + | + | + | - | - |
| SOM-20 | Somalia | A | + | + | + | + | - | - |
| IM-35 | Borneo | A | + | + | NT | NT | - | - |
| IM-36 | Borneo | A | - | - | NT | NT | - | - |
| PAK-1 | Pakistan | A | + | + | NT | NT | - | - |

TABELLE 4

Immunoreaktivität von rekombinanten HEV-Proteinen: Menschliche Seren

| | | | | | | | | |
|---------|--------|---|---|---|---|---|----|---|
| FFI-4 | Mexico | A | + | + | + | + | - | - |
| FFI-125 | Mexico | A | + | + | + | + | - | - |
| F387-C | Mexico | C | + | + | + | + | NT | - |
| Normal | U.S. | | - | - | - | - | - | - |

+ Reaktion

- keine Reaktion

NT nicht getestet

A akut

C konvaleszent

[0177] Y2 stellt eine Aminosäuresequenz dar, die von einer Nucleinsäuresequenz von 157 Basenpaaren aus dem ersten offenen Leseraster des HEV-Genoms kodiert wird.

[0178] Seren der akuten Phase werden zwischen 1 und 12 Tagen nach Beginn von HEV-bezogenen Symptomen gesammelt.

[0179] Seren der konvaleszenten Phase werden zwischen 30 und 90 Tagen nach Beginn der Gelbsucht gesammelt.

E. Herstellen des 406.3-2(M)-Antigens

[0180] Das obige 406.3-2-gt11-Plasmid wurde mit EcoRI verdaut und das freigesetzte HEV-Fragment mittels PCR in Gegenwart von Linkern amplifiziert, die eine Ncol-Stelle am 5'-Fragmentende und eine BamHI-Stelle am 3'-Fragmentende anfügten. Das amplifizierte Material wurde mit Ncol und BamHI verdaut und in die Ncol/BamHI-Stelle des Glutathion-S-Transferase-Vektor-pGEX™-Expressionsvektors nach den Anleitungen

des Herstellers insertiert.

[0181] Das pGEXTM-Plasmid wurde verwendet, um E.-coli-Wirtszellen zu transformieren, und diejenigen Zellen, die mit dem pGESTM-Vektor erfolgreich transformiert sind, werden mittels Immunfluoreszenz unter Verwendung von Anti-HEV-Human-Antiseren identifiziert.

F. Herstellen des 406.4-2-Antigens

[0182] Das obige 406.4-2-gt11-Plasmid wurde mit EcoRI verdaut und das freigesetzte HEV-Fragment mittels PCR amplifiziert und das amplifizierte Fragment in die Ncol/BamHI-Stelle des pGEXTM-Vektors wie oben insertiert. Die Peptidexpression des 406.4-2-Peptids war ähnlich der für das 406.3-2-Fusionspeptid beschriebenen.

G. Herstellen des SG3-Antigens

[0183] Das SG3-Peptid wurde hergestellt, indem zunächst die Sequenz der Seq.-ID Nr. 7 mit 5'-EcoRI-Ncol- und 3'-BamHI-Primer-Linkern unter Verwendung eines die gesamten ORF2- und ORF3-Regionen von HEV (B) enthaltenden gt10-Phagen-BET1-Klon-Plasmids amplifiziert wurde. Das amplifizierte Fragment wurde in die EcoRI/BamHI-Stelle eines pBluescriptTM-Vektors (Stratagene, La Jolla, CA) nach den Anleitungen des Herstellers insertiert. Nach Vektor-Vermehrung und Gewinnung wurde das klonierte Insert durch Verdau mit Ncol und BamHI freigesetzt und gelgereinigt. Das gereinigte Fragment wurde in die Ncol/BamHI-Stelle eines pGEXTM-Vektors insertiert und in einem E.-coli-Expressionssystem exprimiert. Die Peptidexpression des SG3-Peptids war ähnlich der für das 406.3-2-Fusionspeptid beschriebenen.

H. Herstellen des Kapsidproteins

[0184] Das Kapsidprotein (B) wurde im Wesentlichen wie oben beschrieben durch PCR-Amplifikation der Seq.-ID Nr. 1 aus einem pBET1-Plasmid unter Verwendung eines Ncol-Stelle enthaltenden 5'-Primers und eines 3'-Primers enthaltenden 3'-Primers hergestellt. Das amplifizierte Fragment wurde in die Ncol/BamHI-Stelle eines pGEXTM-Vektors insertiert und in einem E.-coli-Expressionssystem exprimiert. Das Kapsidprotein (M) wurde auf ähnliche Weise hergestellt.

I. Peptidreinigung

[0185] HEV-Peptidantigene, die wie 406.4-2 und 406.3-2 löslich waren, wurden mittels Polyacrylamidgelektrophorese von bakteriell exprimierten Gesamtzelllysaten gereinigt. Lysat-Rohpräparate wurden auf 7,5%ige SDS-PAGE-Gele geladen und laufen gelassen, bis die der vorhergesagten Größe jedes Proteins entsprechenden Größenmarker nahezu aus dem Gel gelaufen waren. Der Gel-Laufpuffer wurde durch frischen Puffer ersetzt und das Gel für 5-minütige Intervalle weiter laufen gelassen. Der Gel-Laufpuffer wurde nach jedem Intervall gesammelt und durch frischen Puffer ersetzt. Die Fraktionen wurden dialysiert und konzentriert, und jede Fraktion wurde hinsichtlich der Immunreakтивität gegen einen für einen pGEXTM-Fusionspartner, Glutathion-S-Transferase, spezifischen monoklonalen Antikörper getestet. Hochreaktive Fraktionen wurden vereinigt.

[0186] Alternativ dazu wurden die Peptide bei Expression als GST-Fusionen (pGEXTM) mittels Säulenchromatographie unter Verwendung von Glutathion-Sepharose 4B (Pharmacia, Piscataway, NJ) gereinigt. Zusammenfassend wurden Nicht-GST-Fusionsproteine aus der Säule ausgewaschen und gebundenes Protein dann mit 10 mM Glutathion in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, eluiert.

[0187] Unlösliche HEV-Peptide, wie z. B. SG3, wurden wie folgt gereinigt. Zur Expression des pGEXTM-Fusionsproteins induzierte Zellen wurden mittels zwei Passagen durch eine French-Presse lysiert. Das Lysat wurde auf eine 40%ige Lösung von Glycerin überschichtet und bei 3.500 U/min in einem J-20-Rotor in einer Beckman-J221-Zentrifuge 5 Minuten lang zentrifugiert. Das Pellet wurde in PBS resuspendiert und dann nochmals pelletiert. Das Pellet wurde dann in 6 M Harnstoff, 6 M Guanidin in PBS bei pH 8,0 mit Homogenisierung 5 Minuten lang resuspendiert und nochmals pelletiert. Die Suspension wurde durch ein 0,22-µm-Filter (Nalgene, Kent, U.K.) filtriert und auf eine IMAC-Säule (Pharmacia) geladen, die nach den Anleitungen des Herstellers mit 3 Säulenvolumina einer CoCl₂-Lösung beladene Fast-Flow-SepharoseTM (Pharmacia) enthielt.

[0188] Das gebundene Protein wurde mit einem Gradienten von 6 M Harnstoff, 6 M Guanidin und 0 bis 1 M Imidazol in PBS mit einem pH-Bereich von 8,0–6,0 eluiert. Die Säule wurde mit 0,1 M EDTA in PBS gestript und die Fraktionen analysiert; z. B. mittels in Beispielen 6, 8 oder 10 ausführlich beschriebenem ELISA-Protokoll.

Beispiel 2

Menschliche primäre Hepatozyten in Kultur

A. Isolierung von Hepatozyten

[0189] Hepatozyten wurden aus menschlicher Leber isoliert, die vom Stanford University Medical Center erhalten wurde. Die Leber wurde entweder *in situ* 10 Minuten lang bei 60 ml/min unter Verwendung von Ca²⁺-, Mg²⁺-freier balancierter, mit 10 mM HEPES (pH 7,4) und 0,5 mM [Ethylenbis(oxyethylenitrilo)]tetraessigsäure ergänzter Hank-Salzlösung perfundiert. Die Perfusion wurde weitere 20 Minuten lang unter Verwendung von mit 10 mM HEPES (pH 7,4) und 100 U/ml Collagenase (Typ I, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) ergänztem William-Medium E (WME) fortgesetzt.

[0190] Nach der Perfusion wurde die Leberkapsel unter Verwendung feiner Pinzetten entfernt und die Hepatozyten durch sanftes Schütteln in Collagenase-Lösung entfernt. Die Hepatozyten-Suspension wurde durch mehrere Schichten Gaze filtriert und mit einem gleichen Volumen 10% Fötalkälberserum (FBS) enthaltendem WMW gemischt. Hepatozyten wurden durch 5-minütige Zentrifugation bei 50 × g sedimentiert und in 5% FBS enthaltendem WME resuspendiert. Die Hepatozyten wurden auf diese Weise zwei weitere Male sedimentiert und resuspendiert. Das endgültige Zellpräparat wurde nochmals durch mehrere Schichten Gaze filtriert, bevor es unter Verwendung von Trypanblau auf Lebensfähigkeit untersucht wurde. Die Zellen wurden in einer Dichte von 2×10^6 Zellen je 60-mm-Primaria-Platte (Falcon/Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), die mit Collagen vorbeschichtet war (Collaborative Research, Bedford, MA), ausplattiert.

[0191] Die Kulturen wurden bei 37°C in 5% CO₂ für 3 Stunden inkubiert, um die Anhaftung zu ermöglichen. Im Anschluss daran und alle 48 Stunden wurde das Medium gegen eine serumfreie Formulierung ausgetauscht. Die serumfreie Formulierung war ein bereits beschriebenes Medium (Landford (1989)) auf Basis von WME, das mit Wachstumsfaktoren, Hormonen, 10 mM HEPES (pH 7,4), 100 µg/ml Gentamycin ergänzt war.

B. Detektion von leberspezifischen Proteinen

[0192] Menschliche Hepatozytenkulturen wurden in serumfreiem Medium für verschiedene Zeiträume gehalten und mit [³⁵S]-Methionin für 24 Stunden markiert. Das Medium wurde so eingestellt, dass es 1 mM PMSF, 1 mM EDTA und 1% NP40 enthielt. Für die verschiedenen Plasmaproteine spezifische Antikörper wurden an Protein-A-Agaroseperlen gebunden, die Perlen mit PBS gewaschen und Aliquote des markierten Mediums für 16 Stunden bei 4°C mit den Antikörper-Perlen-Komplexen inkubiert. Die Perlen wurden 3-mal mit 1% NP40 enthaltendem Puffer gewaschen, und immunopräzipitierte Proteine wurden mit 2% SDS und 2% 2-Mercaptoethanol enthaftendem Gelelektrophorese-Probenpuffer eluiert. Die Proben wurden mittels Gradienten-SDS-PAGE (4–15%) und Autoradiographie analysiert.

Beispiel 3

In-vitro-HEV-Infektion primärer menschlicher Hepatozyten

A. HEV-Infektion menschlicher Hepatozyten

[0193] Der Stuhlpool Nr. 73 (vierte Passage) vom HEV-infizierten Cynomolgus-Affen wurde als Inokulum für Infektionen primärer menschlicher Hepatozyten verwendet. Verschiedene Mengen Inokulum wurden in 1 ml serumfreiem Medium (SFM) verdünnt und während eines 3-stündigen Inkubationszeitraums auf die Kultur aufgegeben. Diese Lösung wurde dann mit 2 ml frischem SFM ergänzt und das gesamte Gemisch über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellmonoschichten mit WME (10 mM HEPES, pH 7,4) drei Mal gewaschen und mit frischem SFM versetzt, das danach in zweitägigen Intervallen gewechselt wurde.

B. Immunfluoreszenzfärbungstest

[0194] Primäre Cynomolgus-Affen-Hepatozyten wurden isoliert und in Gewebekulturplatten mit Collagen-be-schichteten Deckgläsern wie beschrieben ausplattiert. Die Zellen an den Deckgläsern wurden entweder mit dem HEV-infizierten Cynomolgus-Affen-Stuhlpool Nr. 73 oder mit einem normalen menschlichen Serum drei Tage nach der anfänglichen Ausplattierung infiziert.

[0195] Die Zellen an den Deckgläsern wurden in 90% Aceton bei Raumtemperatur für 1 Minute fixiert. Die

Deckgläser wurden dann luftgetrocknet. Die Deckgläser wurden mit 1%igem Ziegenserum in PBS für 1 Stunde geblockt, drei Mal mit PBS gewaschen und mit einem Gemisch von Kaninchen-Antiseren gegen die rekombinanten HEV-Proteine 406.3-2(B), 406.4-2(M) und 406.4-2(B) bei Raumtemperatur 3 Stunden lang inkubiert. Die Deckgläser wurden wiederum mit PBS 3-mal gewaschen und mit in PBS-1% Ziegenserum verdünntem, Fluorescein-Isothiocyanat-konjugierten (FITC) Ziegen-Anti-Kaninchen-IgG(H + L) (Zymed) 30 Minuten lang umgesetzt. Nachdem die Deckgläser 3-mal mit PBS gewaschen und luftgetrocknet worden waren, wurden sie mit FITC-Glycerin-Lösung montiert und unter einem Fluoreszenzmikroskop untersucht.

C. Reverse Transkription/Polymerasekettenreaktion (RT/PCR)

[0196] Die HEV-Infektion primärer Cynomolgus-Makak-Hepatozyten wurde mittels RT/PCR-Tests beurteilt. Die Primer für die cDNA-Synthese und PCR basierten auf den Nucleotidsequenzen von HEV-cDNA voller Länge (Tam et al. (1991a, 1991b)). Die Primer HEV3.2SF1 (nt 6578-6597) und HEV3.2SF3 (nt 6650-6668) weisen Sinn-Polarität aus der ORF2-Region des Virusgenoms auf, und HEV3.2SR1 (nt 7108-7127) und HEV3.2SR2 (nt 7078-7097) sind Antisense-Primer innerhalb der Region.

[0197] Nach Extraktion von Gesamtzell-RNA aus HEV-infizierten Zellen unter Verwendung des einstufigen Guanidinium-Verfahrens oder aus HEV-infizierten Überständen gemäß dem Verfahren von Chomczynski et al. (Chomczynski (1987)) wurden Aliquote von RNA-Proben bei 95°C 5 Minuten lang hitzedenaturiert und der reversen Transkription unterzogen, und zwar bei Raumtemperatur 5 Minuten lang und bei 42°C 60 Minuten lang unter Verwendung von 200 Einheiten reverser MMLV-Transkriptase (BRL) in einem Reaktionsvolumen von 20 µl, die 20 Einheiten RNasin (Promega), 1 × PCR-Puffer (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT) mit einer Konzentration von 1 mM je Desoxyribonucleotid (Perkin-Elmer Cetus) und 2,5 µM HEV3.2SR1-Primer enthielten. Das Reaktionsgemisch wurde dann bei 95°C 5 Minuten lang hitzebehandelt, um die reverse MMLV-Transkriptase zu denaturieren.

[0198] Zehn Mikroliter des cDNA-Syntheseprodukts wurden für die PCR in einem Endvolumen von 50 µl mit 0,5 µM HEV3.2SF1-Primer, 1,25 Einheiten Taq-DNA-Polymerase (AmpliTaq, Perkin-Elmer Cetus) und 1 × PCR-Puffer überschichtet mit 50 µl Mineralöl verwendet und 40 PCR-Zyklen in einem Thermocycler von Perkin-Elmer unterzogen (95°C × 1 Minute; 52° × 2 Minuten; 72°C × 30 Sekunden). Zehn Mikroliter des PCR-Produkts der ersten Runde wurden dann weiteren 40 Zyklen von Nested-PCR (95°C × 1 Minute; 55°C × 2 Minuten; 72°C × 30 Sekunden) unterzogen, und zwar in einem Gesamtvolume von 50 µl, welche die internen PCR-Primer HEV3.2SF2 und HEV3.2SR2 enthielten.

[0199] PCR-Produkte der ersten und zweiten Runde wurden der Agarosegelektrophorese unterzogen, mit Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht fotografiert. Es wurde ein Southern-Transfer durchgeführt und die Filter mit der [³²P-dCTP]-markierten internen Sonde HEVORF2-7 ohne Primer (nt 6782-6997) hybridisiert und eine Autoradiographie durchgeführt.

Beispiel 4

Herstellung eines 62-kDa-HEV-Antigens

[0200] Die 62K-Antigene wurden durch ein Baculovirus-Expressionssystem in Insektenzellen wie folgt hergestellt.

A. Konstruktion rekombinanter Baculoviren

[0201] Das das gesamte ORF2 des Burmastamms von Hepatitis-E-Virus exprimierende rekombinante Baculovirus ORF-2-rAcNPV wurde wie früher beschrieben konstruiert (J. He et al., J. Clin. Microbiol. 31, 2167 (1993), hierin durch Verweis aufgenommen).

[0202] Die Konstruktion des die C-terminalen 549 Aminosäuren von ORF2 exprimierenden rekombinanten Baculovirus pBBIII-62K wird wie unten folgt und in [Fig. 5](#) zusammengefasst beschrieben. Kurz gefasst wurde ein DNA-Fragment von 204 Basenpaaren (bp), das die Nucleotide 5480 bis 5684 von ORF-2 aus dem Burmastamm von HEV ([Fig. 2](#)) enthielt, unter Verwendung der Polymerasekettenreaktion (PCR) und eines HEV-cDNA-Plasmidtemplates, pBBIII-ORF2, gemeinsam mit zwei Primern (5'-Primer, Seq.-ID Nr. 29 und 3'-Primer, Seq.-ID Nr. 30) synthetisiert. Der 5'-Primer enthielt eine BamHI-Stelle, und der 3'-Primer weist eine HindIII-Stelle auf, um die Plasmidkonstruktion zu erleichtern. Das PCR-Produkt wurde mit BamHI/HindIII verdaut und an einen Baculovirus-Expressionsvektor, pBluBacIII (Invitrogen, San Diego), ligiert, der vorher mit densel-

ben Restriktionsendonukleasen verdaut worden war, um Plasmid pYZ1 ([Fig. 1](#)) zu bilden.

[0203] Ein HindIII-DNA-Fragment von 1,5 Kilobasen (kbp), das dem 3'-Abschnitt von HEV-ORF-2 entspricht, wird aus einem vorher konstruierten Plasmid, pBBIII-OF2, herausgeschnitten und in das Plasmid pYZ1 an der HindIII-Stelle insertiert, um den endgültigen Baculovirus-Transfervektor pBBIII-62K zu bilden, der anschließend bei der rekombinanten Viruskonstruktion verwendet wird. Die von der PCR hergeleitete Nucleotidsequenz wird mittels DNA-Sequenzierung bestätigt, und die korrekte Ausrichtung des HindIII/HindIII-Inserts in pBBIII-62K wird durch Restriktionsverdauanalyse verifiziert. Die Transfektion, Plaque-Reinigung und Virusamplifikation des rekombinanten Baculovirus BBIII-62K wird nach beschriebenen Protokollen durchgeführt (Invitrogen, San Diego).

B. Zellkultur und Expressionsbedingungen

[0204] Spodoptera-frugiperda-(Sf9-)Zellen in Suspensionskulturgefäßen wurden bei 27°C in Grace-Insektenmedium gehalten, das mit 5 Vol.-% Fötalkälberserum, 50 µg/ml Gentamycin und 0,1% Pluronic F-68 ergänzt war. Alle Kulturbestandteile wurden von Gibco/BRL (Gaithersburg, MD) erhalten, und die Zellen wurden nach den vom Hersteller (Invitrogen, La Jolla, CA) beschriebenen Protokollen gezüchtet. Lebensfähige Zellen mit einer Dichte von 2×10^6 /ml wurden mittels Zentrifugation pelletiert. Das Zellpellet wurde in 1/10 des ursprünglichen Volumens resuspendiert, das das rekombinante Virus BBIII-62K in einer Infektionsmultiplizität von 2 Plaque-bildenden Einheiten (PFU) pro Zelle enthielt. Die Infektion wurde eine Stunde lang ohne Rühren durchgeführt. Die infizierten Zellen wurden mit frischem Medium auf die ursprüngliche Dichte verdünnt und bei 27°C 2–7 Tage lang unter Schütteln (75–95 U/min) gehalten.

[0205] Verfahren zur Infektion von Monolayer-Zellen sind in den von Invitrogen Inc. bereitgestellten Protokollen beschrieben.

Beispiel 5

SDS-PAGE und Immunoblot von in Sf-9-Suspensionskultur und Monolayer-Zellen produziertem ORF2

[0206] Infizierte Zelllysate aus obigem Beispiel 5, hergestellt nach verschiedenen Zeiten nach der Infektion, wurden mittels Zentrifugation getrennt, um in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) lösliche sowie unlösliche Fraktionen zu erzeugen. Proteine aus beiden Fraktionen wurden wie folgt der Elektrophorese an SDS-Polyacrylamidgelen unterzogen, die entweder mit Coomassieblau-Lösung gefärbt ([Fig. 6a](#)) oder auf Nitrocellulosepapier mit anschließender Western-Blot-Analyse ([Fig. 6b](#)) übertragen wurden.

A. Anti-HEV-Antiserum

[0207] Zwei polyklonale Kaninchen-Antiseren, Anti-SG3 und Anti-1L6, wurden gegen den 3'-Abschnitt von ORF-2 in einer Länge von 327 und 42 Aminosäuren erzeugt, der denselben C-Terminus wie das früher beschriebene (Yarbough (1991, 1994), hierin durch Verweis aufgenommen) ORF-2 aus dem Burmastamm von HEV aufweist.

B. SDS-PAGE und Immunoblot

[0208] Um Proteinproben für die SDS-PAGE herzustellen, wurden ungefähr 2×10^6 Baculovirus-infizierte Sf9-Zellen in der Mikrozentrifuge pelletiert und in 150 µl phosphatgepufferter Kochsalzlösung resuspendiert. Die Zellen werden mittels Beschallung lysiert. Das Lysat wurde in einer Mikrozentrifuge bei 4°C 15 Minuten lang zentrifugiert. Überstand und Pellet wurden getrennt und in 20 mM Tris (pH 6,8), 10% 2-Mercaptoethanol, 2% SDS, 30 Vol.-% Glycerin und 0,1 mg/ml Bromphenolblau enthaltendem Proteindenaturierungspuffer denukturiert. Proteinproben wurden an 4- bis 20%igen Polyacrylamid-SDS-Gelen der Elektrophorese unterzogen und dann auf eine PVDF-Membran transferiert. Immunoblotting wurde unter Verwendung der oben beschriebenen polyklonalen Kaninchen-Antiseren und eines Chemilumineszenz-Detektionstests (ECL-Set von Amersham) durchgeführt.

Beispiel 6

Reinigung von 73K-, c62K- und r62K-ORF-2-Produkten

A. Reinigung von ORF2 voller Länge (73K)

[0209] Mit rekombinantem Baculovirus ORF2-rAcNPV infizierte Zellpellets wurden in 1 mM EDTA, 1 µg/ml Aprotinin, 10 µg/ml Leupeptin, 0,5 mg/ml Pefabloc SC und 10 µg/ml Pepstatin enthaltender phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) in einer Zelldichte von 20% (Gew./Vol.) resuspendiert. Die Suspension wurde durch drei Passagen durch einen Microfluidics-M-110S-Mikroverflüssiger bei einem Flüssigkeitsdruck von 14.000 psi lysiert, gefolgt von Zentrifugation des Lysats bei 10.000 × g für 30 Minuten bei 5°C.

[0210] Der Überstand wurde abdekantiert und das unlösliche Pellet in 25 mM BICINE bei pH 8,5 resuspendiert. Die Suspension wurde unter denselben Bedingungen nochmals zentrifugiert und das gewaschene Pellet in 0,5% (Gew./Vol.) SDS enthaltendem 25 mM BICINE 30 Minuten lang bei Raumtemperatur extrahiert. Das extrahierte Material wurde 30 Minuten lang bei 10.000 × g bei Raumtemperatur zentrifugiert, wobei der resultierende Überstand abgetrennt und 1 : 5 in 25 mM BICINE, pH 8,5, und 8 M Harnstoff verdünnt wurde.

[0211] Dieses Material wurde an einer Hyper-D-S-(BioSep, Framingham, MA)Säule, einem starken Kationentauscher, im selben Puffer bei einer linearen Oberflächengeschwindigkeit von 3.000 cm/Stunde chromatographiert. Nach Beladung und Waschen der Säule wurde das 73K-Protein in einem linearen Gradienten von 0 bis 400 mM NaCl im selben Puffer eluiert.

[0212] Die das 73K-Protein enthaltenden Fraktionen aus der Hyper-D-S-Säule wurden gegen das 500fache Volumen Wasser über Nacht dialysiert, gefolgt von Zentrifugation des Dialysats bei 10.000 × g bei 4°C. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 0,5% SDS in 25 mM Tris, pH 8,5, extrahiert. Festes Cleland-Reagens (DTT) wurde auf eine Konzentration von 50 mM zugegeben und die Lösung drei Minuten lang auf 100°C erhitzt, gefolgt von sofortiger Verdünnung in einen 100fachen Volumenüberschuss einer Lösung, die 50 mM Glycin, pH 10,5, 10% Glycerin, 5 mM Glutathion (reduziert), 0,5 mM Glutathion (oxidiert) und 1 g/l PEG 3500 enthielt. Die Lösung wurde über Nacht in Luft oxidieren gelassen. Nach der Oxidation wurde die Lösung konzentriert und mittels Querstromfiltration gegen 25 mM Tris, pH 8,5, diafiltriert. Das Material wurde mittels Zentrifugalultrafiltration weiter konzentriert.

B. Herstellung von Zelllysat und Reinigung von rekombinantem 62K-Antigen

[0213] Gefreone, mit rekombinantem Baculovirus BBIII-62K infizierte Sf9-Zellen wurden in 1 µg/ml Aprotinin, 1 mM EDTA, 10 µg/ml Leupeptin (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN), 0,5 mg/ml Pefabloc SC (Boehringer Mannheim), 10 µg/ml Pepstatin (Boehringer Mannheim) enthaltender phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) in einer Konzentration von 20% (Gew./Vol.) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in einem Microfluidics-M110S-Mikroverflüssiger (Newton, MA) durch zwei Passagen bei 14.000 psi lysiert. Die lysierten Zellen wurden zentrifugiert (15.000 × g, 4°C, 30 Minuten). Der Zellüberstand wurde dann durch Zugabe von festem Dithiothreit (DTT) (Cleland (1964)) auf eine Konzentration von 50 mM vorbehandelt und anfänglich gegen 100 Volumina 10 mM Tris, pH 8,5, 50 mM NaCl und 0,5 mM DTT 8 Stunden lang bei 4°C dialysiert.

[0214] Die Dialyse wurde für weitere 8 Stunden gegen frischen Puffer minus DTT fortgesetzt. Unter Verwendung dieses zweistufigen Dialyseverfahrens wurde die Aggregation des 62-kDa-Proteins mit verunreinigenden Zellproteinen nahezu eliminiert. Das r62-kDa-Protein erwies sich als vollständig in Lysepuffer löslich mit quantitativer Gewinnung des Moleküls im Zellyseüberstand.

[0215] Das Dialysat wurde durch ein Millipore-0,22-µm-Filter vorfiltriert und dann direkt auf eine DEAE-EMD-650(S)-Säule (E. Merck) geladen, die mit 10 mM Tris, pH 8,6, 50 mM NaCl äquilibriert war. Das r62-kDa-Protein wurde in einem linearen Gradienten von 50–500 mM NaCl über 15 Säulenvolumina bei einer linearen Oberflächengeschwindigkeit von 100 cm/Stunde eluiert. Das 62-kDa-Protein eluierte früh im Gradienten.

[0216] Die Gegenwart des ORF-2-bezogenen 62-kDa wurde mittels Western-Blotting von Säulenfraktionen mit dem polyklonalen Kaninchen-Antiserum 1L6 (Yarbough et al. (1991), einem gegen die carboxyterminale Region des elterlichen ORF-2-Proteins hergestellten Antikörper, bestätigt.

[0217] Die r62K enthaltenden Fraktionen aus der DEAE-Säule wurden vereinigt und mittels Zentrifugalultra-

filtration (Amicon, Beverly, MA) konzentriert. Das r62-kDa-Protein wurde an einer in 25 mM Tris, pH 7,2, äquilibrierten Sephadryl-S-100-Säule (5 × 100 cm, Pharmacia, Piscataway, NJ) bei einer linearen Oberflächengeschwindigkeit von 30 cm/Stunde weiter gereinigt und der Puffer ausgetauscht. 62-kDa enthaltende Fraktionen wurde vereinigt und mittels Zentrifugalultrazentrifugation konzentriert. Dieser Schritt im Verfahren wurde in erster Linie als Pufferaustauschschritt verwendet.

[0218] Der 62-kDa enthaltende Pool aus der S-100-Säule wurde auf die mit Puffer B (25 mM Tris, pH 7,2) bei einer linearen Oberflächengeschwindigkeit von 3.000 cm/Stunde äquilierte starke Anionentauschersäule Poros Q/F (4,6 × 10 mm) (Perseptive Biosystems, Cambridge, MA) aufgegeben. Die Säule wurde mit 5 Säulenvolumina Puffer B gewaschen. Das 62-kDa wurde mit einem linearen Gradienten von 0 bis 1 M NaCl (insgesamt 10 Säulenvolumina) in Puffer B eluiert. Das 62-kDa-Protein eluierte bei ungefähr 300 mM NaCl. Wenn erforderlich, wurde der Puffer des r62-kDa-Eluats durch Diafiltration mittels Querstromfiltration unter Verwendung einer spiralgewickelten Kartusche (Millipore Prep TFF; Millipore, Bedford, MA) ausgetauscht. In diesem Stadium war das Protein auf Basis von SDS-PAGE und Western-Blotting nahezu homogen.

[0219] Bei den oben beschriebenen Reinigungsschritten wurden die Pufferleitfähigkeiten und pH-Werte mit einem Radiometer-Copenhagen-CDM-83-Konduktometer (Westlake, OH) bzw. einem PHM-Referenzstandard-pH-Meter aufgezeichnet. Alle Pufferbestandteile wiesen Biotechnologie- oder USP-Qualität auf und wurden mittels Amöbozyten-Lysat test als im Wesentlichen pyrogenfrei ermittelt.

[0220] Weiters wurde zur Quantifizierung der Gewinnung von 62K-Antigen aus Insektenzelllysaten die folgende Doppelantikörper-Sandwich-(ELISA-)Technik eingesetzt. Anti-1L6-Antikörper, ein gegen den carboxyterminalen Abschnitt des ORF-2-Proteins gerichteter polyklonaler Kaninchen-Antikörper, wurde mittels Protein-G-Sepharose-Affinitätschromatographie gereinigt und in einer Konzentration von 1,6 µg/ml pro Nafp in Carbonat/Bicarbonat-Puffer auf Mikrotiterplatten beschichtet. Nach dem Waschen und Blocken wurden gereinigtes 62-kDa-Antigen (mittels Aminosäureanalyse quantifiziert) oder Prozessproben der Platte zugegeben und in Reihen von zweifachen Verdünnungen verdünnt. Nach Inkubation des Antigens und Waschen wurde ein zweiter Antikörper, an Biotin konjugiertes Anti-SG3, der Platte zugegeben und inkubiert. Das SG3-Antigen entspricht den carboxyterminalen 328 Aminosäuren des 62-kDa-Proteins (Yarbough et al. (1994)). Dieser Inkubation folgte eine letzte Inkubation mit Streptavidin-konjugierter Meerrettich-Peroxidase. Nach dem letzten Waschschritt wurde Substrat zugegeben und die Platten bei einer Absorptionswellenlänge von 490 nm gemessen.

[0221] Proteinkonzentrationen von Proben wurden unter Verwendung des Bradford-Tests (Pierce, Rockford, IL) bestimmt.

Beispiel 7

Elektronenmikroskopie

[0222] Proteinproben wurden auf Formvar-beschichtete Kohlenstoffgitter gegeben und mit 2% Uranylacetat oder 2% Phosphowolframsäure, pH 6,5, kontrastiert, bevor sie in einem Elektronenmikroskop betrachtet wurden. Wenn eine Fixierung erforderlich war, wurden die Proteinproben in 2% Glutaraldehyd enthaltendem PBS 30 Minuten lang fixiert. Pufferaustausch wurde mittels Zentrifugation in Centricon-30 (Amicon, Beverly, MA) durchgeführt, um den Probenpuffer gegen PBS auszutauschen.

Beispiel 8

ELISA-Tests

[0223] ELISA wurde verwendet, um die Antigenität von in *E. coli* und Baculovirus exprimierten HEV-Proteinprodukten zu vergleichen. Small-scale-paneling kodierter Seren wurden verwendet, um die Empfindlichkeit und Spezifität eines Diagnosemittels festzulegen, das Baculovirus-exprimierte Proteine inkorporiert.

A. Menschliche Seren

[0224] Menschliche Seren stammten von früher im Verlauf von verschiedenen Epidemien von Hepatitis E an verschiedenen geographischen Orten gesammelten Paletten. Seren von nichtmenschlichen Primaten stammten von Cynomolgus-Affen und Schimpansen, die am Center for Disease Control, Atlanta, GA, im Experiment mit Hepatitis-E-Virus infiziert wurden.

B. ELISA

[0225] Die zur Immunodiagnose verwendeten Proteine umfassen: (1) SG3, kodierend für 327 Aminosäuren des als Fusionsprotein in *E. coli* exprimierten ORF2 (Seq.-ID Nr. 17), (2) 73K, kodierend für 660 Aminosäuren des in Baculovirus exprimierten ORF2, und (3) 62K, kodierend für 549 Aminosäuren des in Baculovirus exprimierten ORF2. Die Antigene wurden einzeln an die Näpfe von Polystyrol-Mikrotiterplatten beschichtet (Yarbough et al. (1994)). Jeder Napf wurde mit 200 ng jedes Proteins in 100 µl 0,05 M Natriumcarbonatpuffer, pH 9,5, (1,59 g Na₂CO₃, 2,93 g NaHCO₃, 0,02% Natriumazid, pH 9,5, auf 1000 µl aufgefüllt) über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dem Waschen in PBS-0,05% Polyoxyethylen-(20)-Monolaureat („Tween 20™“, Sigma) und Blocken mit 200 ml 1% Rinderserumalbumin (BSA) in PBS für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur wurden die Serumproben 1 : 100 in Antikörper-Verdünnner (1.000 ml Tris-gepufferte Kochsalzlösung (40 mM Tris, pH 7,5, 1 M NaCl), 30 ml Ziegenserum, 10 g Rinderserumalbumin, Fraktion V, 10 g Magermilch (Carnation), 1 g Gelatine EIA-Qualität und 0,2 g Thimersol (Konservierungsmittel), siehe Antikörperverdünnner-Herstellung, wie folgt) verdünnt und 30 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Nach der Entfernung des Primärantikörpers und Waschen zum Entfernen von jeglichem ungebundenen ersten Antikörper wurden die Näpfe 30 Minuten lang bei 37°C mit Sekundärantikörper inkubiert, und zwar mit HRP-konjugiertem Ziege-Anti-Human-IgG (spezifisch für Gamma-Kette) oder Ziege-Anti-Human-IgM (spezifisch für mu-Kette).

[0226] Nach dem letzten Waschschritt wurde Substrat zugegeben und die Platten wurden bei einer Absorptionswellenlänge von 490 nm gemessen. Seren, die einen O. D.-Wert von 0,300 oder höher hervorriefen, wurden als positiv für HEV-Antikörper gewertet. Dies stimmt mit einem P/N-Verhältnis von mehr als 3,0 und einem Minimum von 5 Standardabweichungen über dem Mittelwert normaler Seren überein.

C. Antikörperverdünnner-Produktion

[0227] Antikörperverdünnner wurde wie folgt hergestellt: 200 ml TBS wurden auf 60°C erwärmt und 1 g Gelatine darin geschmolzen. Das Volumen wurde mit TBS auf 1000 ml gebracht. 10 g BSA wurden zugegeben, als die Temperatur auf 40°C abgekühlt war. Das Gemisch wurde bei Raumtemperatur gerührt, bis das BSA gelöst war. 30 µl Ziegenserum wurden dann zugegeben, gefolgt von der Zugabe von Thimeresol auf 0,02%. Das Reagens konnte zwei Wochen Lang bei 4°C gelagert werden. Vor der Verwendung wurde Milch auf 1% bei Raumtemperatur für 30 Minuten eingerührt.

Beispiel 9

Weitere Charakterisierung des 62K-Antigens

A. Charakterisierung des rekombinanten 62-kDa-Proteins mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blotting

[0228] Verarbeitete Fraktionen des 62-kDa-Proteins (Beispiele 4 und 6B) wurden denaturiert und mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert. Zusammenfassend wurde Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach dem Tricin-SDS-PAGE-Verfahren (Schagger und von Jagow (1987)) durchgeführt. Western-Blotting wurde wie früher beschrieben (Yarbough et al. (1994)) durchgeführt. Ein gegen die carboxyterminalen Regionen von ORF-2 gerichteter polyklonaler Kaninchen-Antikörper, 1L6, wurde verwendet, um gereinigtes Protein zu beurteilen (Beispiel 5). Das Tricin-Puffersystem wurde verwendet, um eine höhere Auflösung zu erhalten und die Störung der Edman-Reagenzien bei der Festphasensequenzierung aus PVDF-(Polyvinylidendifluorid-)Membranen zu minimieren.

[0229] Die Ergebnisse einer Analyse des r62-K-Reinigungsprozesses unter Verwendung von 4- bis 20%iger SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und des entsprechenden Western-BLOTS sind in den [Fig. 14A](#) und [Fig. 14B](#) dargestellt. [Fig. 14A](#): Bahn 1, Molekulargewichtsmarker; Bahn 2, Zelllysat; Bahn 3, Zelllysat-Überstand; Bahn 4, DEAE-Peakpool; Bahn 5, Sephacryl-S-100-Peakpool; Bahn 6, Poros-HQ/F-Peakpool. Molmassenmarker sind Novex-SeeBlue-Pre-Stained-Standards (San Diego, CA) und liegen im folgenden Bereich (von oben nach unten): Myosin, 250-kDa; BSA, 98-kDa; Glutamindehydrogenase, 64-kDa; Alkoholdehydrogenase, 50-kDa; Carboanhydrase, 36-kDa; Myoglobin, 30-kDa; Lysozym, 16-kDa; Aprotinin, 6-kDa; Insulin-B-Kette, 4-kDa. [Fig. 14B](#) stellt einen Western-Blot der obigen Bahnen 1–6 dar. Die Proben wurden vor SDS-PAGE und Transfer 15fach verdünnt. 1L6-Antikörper wurde als Anfangsantikörper verwendet.

[0230] Die Analyse des anfänglichen Zelllysats ([Fig. 14A](#), Bahn 2) zeigte, dass das 62-kDa-Protein im Baculovirus-Expressionssystem zulänglich exprimiert wurde und für die weitere Verarbeitung geeignet war. Der Zell-

lyseüberstand ([Fig. 14A](#), Bahn 3) schien eine im Wesentlichen quantitative Ausbeute des 62-kDa-Proteins als ein lösliches Produkt zu liefern. Der DEAE-Pool ([Fig. 14A](#), Bahn 4) lieferte eine signifikante Reinigung von 62-kDa aus dem vorhergehenden Lysatüberstandspool, wobei Sephadryl-S-100- und Poros-HQ/F-Chromatographieschritte in der weiteren Reinigung des 62-kDa-Proteins resultierten ([Fig. 14A](#), Bahnen 5 und 6).

[0231] Ein sonderbarer Aspekt der Gelelektrophoreseprofile war die offensichtliche Reinigung der 62-kDa-Bande als Doppelbande. Der in [Fig. 14B](#) illustrierte Western-Blot enthält eine 15fache Verdünnung der an der SDS-PAGE parallel gelaufenen Proben. Im Western-Blot wurde das Protein als Doppelbande sichtbar, wobei sich die untere Bande über den Verlauf der Reinigung anzureichern schien. Jedoch schien die Proteolyse minimal zu sein. Dieses Ergebnis legte nahe, dass das Protein durch mögliche Seitenkettenmodifizierungen, wie z. B. Glykosylierung, N-terminale oder C-terminale Modifizierung, als eine heterogene Spezies vorliegen könnte. Die folgenden Experimente wurden durchgeführt, um die Quelle der Heterogenität zu ermitteln.

B. Aminoterminale Sequenz- und Aminosäurezusammensetzung

[0232] Das 62-kDa-Protein wurde mittels SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und auf PVDF-(Biorad, Richmond, CA)Membranen transferiert. Die Aminosäurezusammensetzung und aminoterminalen Sequenzen wurden für das Protein bestimmt.

[0233] Die Analyse der Aminosäurezusammensetzung wurde an einem Beckman-Model-6300-Ionentauschergerät (Fullerton, CA) im Anschluss an eine 16-stündige Hydrolyse bei 115°C in 100 µl 6 N HCl, 0,02% Phenolblau plus 2 nmol Norleucin durchgeführt. Im Anschluss an die Hydrolyse wurden die Proben an einer Speedvac getrocknet und die resultierenden Aminosäuren in 100 µl Probenpuffer (Beckman, Fullerton, CA) aufgelöst, der 2 nmol Homoserin enthielt, wobei das Homoserin als zweiter interner Standard zur unabhängigen Messung des Transfers der Probe auf den Analysator fungierte (Rosenfeld et al. (1992)). Das Instrument wurde mit einem 2-nmol-Gemisch von Aminosäuren kalibriert und nach den Vorschriften des Herstellers betrieben. Die Analyse der Aminosäurezusammensetzung wurde verwendet, im Proteinkonzentrationen in Proben genau zu bestimmen.

[0234] Die aminoterminale Sequenzierung wurde an einem Applied Biosystem 470A oder 477 (Foster City, CA) durchgeführt, das mit On-line-HPLCs zur Identifizierung der resultierenden Phenylthiohydantoin-(Pth-)Aminosäurederivate ausgestattet war. Vor der Probenaufgabe wurden zuerst 25 pmol eines 16 Reste umfassenden internen Sequenzierstandardpeptids der Formel [Norleucin-(Succinyl-Lysin)₄]₃-Norleucin auf das Sequenzierfilter gespottet (Elliott et al. (1993)). Die 470A- und 477-Geräte wurden auf Basis der Empfehlungen des Herstellers betrieben, und es wurden routinemäßig 3-pmol-Pth-Standards verwendet. Alle Sequenzen wurden über das vom National Center for Biotechnology Information betriebene BLAST Network Service durchsucht.

[0235] Die Mengen an in den ersten fünf Zyklen vorhandenen Aminosäuren waren 10-mal niedriger als erwartet, was nahe legt, dass ein Großteil des 62-kDa-Moleküls am N-Terminus blockiert war. Die erhaltene Sequenz schien mit der prozessierten Form des ursprünglich in ORF-2 voller Länge exprimierenden Sf9-Zellen produzierten 62-kDa identisch zu sein. Vermutlich spaltete eine in mit Baculovirus infizierten Sf9-Zellen vorhandene Methionin-Aminopeptidase das N-terminale Methionin, das zur Gewährleistung der korrekten Translationsinitiation in die kodierende Sequenz des rekombinanten Proteins eingeführt war.

C. Tryptische Peptidanalyse

[0236] Einhundertzwei pmol des 62-kDa-Proteins wurden in einem herausgeschnittenen Polyacrylamidstück in situ mit Trypsin verdaut. Ein leeres Gelstück und ein 50 pmol Transferrin enthaltendes Gelstück wurden ebenfalls verdaut und parallel dazu als Kontrollen analysiert. Die resultierenden Peptide wurden mittels Umkehrphasen-HPLC aufgetrennt.

[0237] Der enzymatische Gelverdau wurde gemäß Williams und Stone (Williams und Stone (1995)) unter Verwendung von Perfusion in einem Verhältnis von ungefähr 1 : 5 (Enzymgewicht : Substratgewicht) des modifizierten Trypsins (Promega, Madison, WI) und Verdauung für 24 Stunden bei 37°C durchgeführt. Die resultierenden Peptide wurden reduziert/carboxymethyliert, mit 0,1% TFA, 60% CH₃CN extrahiert und dann der Hydrolyse/Aminosäureanalyse unterzogen, so dass die Menge und Dichte (µg Protein/mm³) bestimmt werden konnten, wobei beide Parameter als nützliche Kriterien dienten, um die Erfolgswahrscheinlichkeit des bevorstehenden Verdaus einzuschätzen. Die Analyse der Aminosäurezusammensetzung wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

[0238] Umkehrphasen-HPLC wurde an einem Hewlett-Packard-1090-HPLC-System (Palo Alto, CA) durchgeführt, das mit einem ISCO Model 2150 Peak Separator und einer Vydac-C-18-(5 µm, 300 Ångström)Säule (25 cm) (Hesperin, CA) ausgestattet war, wobei die Säule mit 98% Puffer A (0,06% Trifluoressigsäure; TFA) und 2% Puffer B (0,052% TFA, 80% Acetonitril) wie in Williams und Stone (1995) äquilibriert war. Peptide wurden dann mit dem folgenden Gradientenprogramm eluiert: 0–60 Minuten (2–37% Puffer B), 60–90 Minuten (37–75% Puffer B) und 90–105 Minuten (75–98 Puffer B); und wurden durch ihre Absorption bei 210 nm detektiert. Aliquote der Verdauungen im 25- bis 250-pmol-Bereich wurden an einer mit 0,15 ml/min eluierten Säule mit einem Innendurchmesser (ID) von 2,1 mm fraktioniert. Die Fraktionen wurden in Eppendorf-Röhrchen ohne Kappen aufgefangen.

[0239] Von insgesamt 38 möglichen tryptischen Peptiden und 143 möglichen, mittels Umkehrphasen-HPLC-Analyse des verdauten 62-kDa-Proteins detektierten Peaks wurden 8 Peaks für die Laserdesorptionsmassenspektroskopie ausgewählt, da das HPLC-Profil nahe legte, dass diese Peaks nur eine Hauptspezies enthalten.

D. Laserdesorptionsmassenspektrometrie (LDMS)

[0240] Die Peaks 45, 50, 62, 65, 73, 82, 101 und 116 wurden mittels LDMS weiter evaluiert. LDMS wurde verwendet, um mehrere Fragen zu klären:

- (i) Ob der Peak ein Artefakt-Peak oder tatsächlich ein Peptid war? Die Analyse bestätigte, dass keiner der Peaks ein Artefakt war;
- (ii) ob der Peak mehr als ein Peptid enthielt? Die Analyse konnte nachweisen, dass die Peaks in einigen wenigen Fällen Peptidgemische darstellten; und
- (iii) ob die mittels LDMS berechnete Masse mit der vorhergesagten Masse vergleichbar war, die aus von der Virus-RNA kodierten, vorhergesagten Aminosäuresequenz hergeleitet worden ist. In allen Fällen war die Masse des Peptids gleich der vorhergesagten Masse mit Ausnahme von Peak 65, der blockiert zu sein schien.

[0241] Weiters ermöglicht diese Analyse die einfache Ermittlung von jeglichen posttranskriptionellen Modifizierungen.

[0242] Um die LDMS durchzuführen, wurden 3-µl-Aliquote der mittels Umkehrphasen-HPLC isolierten Peptide auf 1 µl auf ein neues Träger gespotteter Alpha-Cyano-4-hydroxyzimtsäure-(Alpha-CHCA-)Matrixlösung aufgegeben. Das Vermischen der Matrix wurde durch wiederholtes Ansaugen und Ausstoßen der Probe mit einer Mikropipette erzielt. Die Proben wurden dann bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Um Kreuzkontaminierung zu vermeiden, wurden alle Targets nur einmal verwendet. Die Alpha-CHCA-Matrixlösung wurde in einer Konzentration von 10–20 mg/ml in 40% CH₃CN/0,1% TFA (Trifluoressigsäure) bereit und nach Vortexen und Stehen lassen für wenige Minuten verwendet. Matrixlösungen wurden für maximal 2 Tage bei –20°C gelagert. Die zur externen Kalibrierung der Peptide verwendeten Kalibriersubstanzen waren Gramicidin S (m/z = 1142,5) und Insulin (m/z = 5734,5). Beide Kalibriersubstanzen wurden bei –20°C als Stammlösungen von 10 pmol/µl entweder in 50% CH₃CN, 0,1% TFA oder in 0,1% TFA gelagert. LDMS wurde an einem VG/Fisons-Tof-Spec-Massenspektrometer (VG Organics, Manchester, UK) durchgeführt, das im linearen +ve-Ionenmodus bei einer Beschleunigungsspannung von 25 kV betrieben wurde und mit einem Stickstofflaser (337 nm) und einer linearen Flugröhre von 0,65 m ausgestattet war.

[0243] Routinemäßig wurden für jedes Spektrum 30 Einspritzungen gemittelt, wobei 3–6 Spektren für jede Probe erfasst wurden. Die vorhergesagten Massen basierten auf der mittleren isotypischen, einzelprotonierten Masse, und die erwartete Massengenauigkeit betrug ungefähr +/–0,25%.

[0244] Zerfallssequenzierung nach der Quelle wurde im Reflectron-Modus durchgeführt, wobei die Leitersequenzierung auf eine 2-pmol-Sequenz des Adrenocorticotropin-Fragments ACTH-Clip-Fragment 18–39 kalibriert wurde.

[0245] Die Peaks 65, 73, 101 und 116 schienen für die direkte Sequenzierung geeignet zu sein, da die LDMS-Ergebnisse auf die Gegenwart von nur einer Hauptspezies hinwiesen. Peaks 45, 50, 62 und 82 wurden ebenfalls sequenziert. Obgleich die Peaks Gemische zu sein schienen, die im Optimalfall eine nochmalige HPLC-Reinigung vor der individuellen Sequenzierung erfordern würden, wurde entschieden, diese Gemische in Anbetracht der bekannten Masseninformation und vorhergesagten Aminosäuresequenz direkt zu sequenzieren.

E. Sequenzanalyse von LDMS-Peptiden

[0246] Peptid 65 lieferte keine interpretierbare Sequenz. Bei weiterer Untersuchung stand die mittels LDMS beobachtete Masse bei Anfügung einer N-terminalen Acetylgruppe (vorhergesagte 1786,9 Dalton gegenüber beobachteten 1785,5 Dalton; entsprechend einem Fehler von 0,03%) mit den N-terminalen Resten des 62-kDa-Proteins im Einklang. Die Auswertung einer Datenbank für tryptische Peptide unter Verwendung der vorhergesagten Sequenz des 62-kDa-Proteins offenbarte nur ein anderes Peptid, das hinsichtlich des Molekulargewichts ähnlich war (Reste 408–423). Die Zerfallsanalyse nach der Quelle offenbarte, dass Peak 65 tatsächlich das vorhergesagte aminoterminale tryptische Peptid war.

[0247] Die Sequenzanalyse der den Peaks 45, 50, 62, 73, 82, 101 und 116 entsprechenden Peptide bestätigte, dass die interne Sequenz des vorhergesagten 62K-Proteins intakt war. Zusammenfassend stimmte Peak 73 mit den Resten 327–355 der bekannten Sequenz überein. Peak 101 stimmte mit den Resten 123–139 der bekannten Sequenz überein. Peak 116 stimmte mit den Resten 424–431 der bekannten Sequenz überein. Peak 45 stimmte mit den Resten 412–423 der ORF-2-Sequenz mit einer vorhergesagten Masse von 1396,49 Dalton überein. Peak 50 stimmte mit den Resten 334–348 der ORF-2-Sequenz überein. Peak 62 enthielt einen kurzen Rest von 6 Peptiden mit einer vorhergesagten Masse von 749,84 Dalton, der mit den Resten 513–518 der ORF-2-Sequenz übereinstimmte. Peak 82 war ein Gemisch von drei Peptiden, die mit den Resten 424–437 (Primärsequenz), Resten 438–466 (Sekundärsequenz) und Resten 555–578 (Tertiärsequenz) übereinstimmen. Zusammen weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass die internen Sequenzen des vorhergesagten 62K-Polypeptids intakt und zur vorhergesagten Sequenz co-lineär sind.

F. LC-MS- und carboxyterminale Sequenzanalyse

[0248] Um die Beschaffenheit der mittels SDS-PAGE beobachteten 62-kDa-Protein-Doppelbande zu beurteilen, wurde das gereinigte 62-kDa-Protein an einer Vydac-C18-Umkehrphasen-Kapillarsäule (Hesperin, CA) chromatographiert, wobei der eluierende Peak mittels Elektrospray-Massenspektrometrie (ES-MS) beurteilt wurde. Das gereinigte 62-kDa-Protein wurde an einer amorphen Vydac-C18-Umkehrphasen-Kapillarsäule unter Verwendung von AB1-Model-410-Spritzenpumpen bei einer Flussrate von 50 ml pro Minute chromatographiert. Das Protein wurde in einem Lösungsmittelsystem von 0,1 Vol.-% TFA in Wasser bis 0,1% TFA in Acetonitril chromatographiert. Es wurde ein In-line-Splitter verwendet, um Peaks bei einer Flussrate von 10 ml pro Minute in ein VG-BioQ-Dreifach-Quadrupol-Massenspektrometer (VG Organics, Manchester, UK) umzuleiten, das im Positionen-Elektrospray-Ionisierungsmodus betrieben wurde. Das 62-kDa-Protein wurde durch ES-MS in zwei Hauptpeaks aufgetrennt, die 56,1- und 58,6-kDa entsprachen.

[0249] Die vorhergesagte Masse des 62-kDa-Proteins unter Verwendung der kodierenden Sequenz von Rest 112 bis zum Rest 660 der ORF-2-Region beträgt 59,1-kDa. Diese Daten legen nahe, dass eine Deletion im Molekül aufgetreten ist und dass die Deletion höchstwahrscheinlich am Carboxyterminus auftrat. Das Protein erwies sich mittels Periodat-Oxidation sowie GC-MS als nicht glykosyliert.

[0250] Die Molmassenbestimmtheit mittels ES-MS beträgt typischerweise 0,01% (Scoble et al. (1993)). Mit der Bestätigung des Aminoterminus legen die ES-MS-Daten nahe, dass der Carboxyterminus zwischen den Resten 551–552 und den Resten 536–537 befestigt sein könnte. Es wurde eine automatisierte carboxyterminale Sequenzierung unter Verwendung von intaktem 62-kDa durchgeführt, um die mutmaßliche carboxyterminale Prozessierung zu bestätigen.

[0251] Für die automatisierte C-terminale Sequenzanalyse wurden Proteinproben auf mit Isopropanol vorbehandelte Zitex-Membranen (Norton Performance Plastics, Wayne, NJ) aufgegeben und in inerte Kel-F-Säulen (Norton Performance Plastics, Wayne, NJ) eingebracht. Die Sequenzierersäule wurde an einen G1009A-Sequenzer von Hewlett Packard (Palo Alto, CA) zur chemischen Kopplung und Zyklyse angeschlossen. Das gekoppelte Peptidylthiohydantoin und zyklierte Produkt wurde zum C-terminalen Thiohydantoin-Aminosäurerest und dem verkürzten Peptid unter Verwendung eines Alkalalisalzes von Trimethylsilanolat (KOTMS) gespalten. Die derivatisierte Probe wurde mit einem 1090-Flüssigkeitschromatographen von Hewlett Packard (Palo Alto, CA) mit filterphotometrischer Detektion bei 269 nm unter Verwendung einer speziellen analytischen Umkehrphasen-PTH-HPLC-Säule (2,1 mm × 25 cm) von Hewlett Packard analysiert.

[0252] Es wurde ein binärer Gradient von 39 Minuten (Lösungsmittel A: Phosphatpuffer pH 2,9; Lösungsmittel B: Acetonitril) unter Einsatz von Alkylsulfonat als Ionenpaarungsmittel entwickelt. Thiohydantoin-Aminosäure-standards mit 100 pmol wurden verwendet, um die Analyse zu standardisieren. Der anfängliche Sequenzierungsszyklus lieferte zwei stark ausgeprägte Peaks, die Glutamin und Lysin entsprachen, die beide nicht am

vorhergesagten Carboxyterminus des 62-kDa-Protein lokalisiert sind.

[0253] Der zweite Zyklus offenbarte einen stark ausgeprägten (> 200 pmol) Leucinpeak, der auf die Gegenwart von mehr als einem Leucin im Polypeptidgemisch hinwies. Der dritte Zyklus war wegen des ansteigenden Hintergrunds etwas unklar. Jedoch war Arginin in dritten Zyklus gemeinsam entweder mit einem Glutaminsäure- oder mit einem Glycinrest eindeutig vorhanden. Die Daten der Carboxysequenzierung bestätigen das Vorliegen eines heterogenen, trunkierten Proteins.

Beispiel 10

Die 62-kDa-HEV-Antigen-Vakzine verleiht vollständigen Schutz gegen heterologes HEV der Wildform in Tieren

A. Titration der Expositions-Stammkultur

[0254] Von einer 10%igen Stuhlsuspension (Mex Nr. 14) einer während einer HEV-Epidemie in Telixtac, Mexiko, infizierten Person (Velazquez et al. (1990)) wurde früher berichtet, dass sie in experimentell infizierten Cynomolgus-Affen Hepatitis E verursacht (Purdy et al. (1993)). Zur Titration der Expositions-Stammkultur wurden vier Paaren von Cynomolgus-Affen i. v. mit in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) hergestellten Verdünnungen einer 10%igen Mexiko-14-Stuhlsuspension injiziert. Jede Gruppe erhielt 1 ml der Verdünnungen von entweder 10^{-2} , 10^{-5} , 10^{-6} oder 10^{-7} .

[0255] Die Tiere wurden folgendermaßen auf Anzeichen von Infektion beobachtet: 1) Serumwerte von ALT und SICD, 2) Bildung von Antikörpern gegen HEV, 3) Abstoßung von HEV in die Fäkalien, 4) Nachweis von HEV-Antigen in der Leber und 5) histopathologische Veränderungen (Tabelle 5).

[0256] Die Daten in Tabelle 5 stellen die Titration des Mexiko-14-HEV-Inokulums dar. Anti-HEV wurde mittels ELISA getestet. HEV-Antigen in der Leber wurde mittels Immunfluoreszenztest von Leberbiopsieproben nachgewiesen. Leberbiopsien wurden gemäß den Regeln für nekroentzündliche Veränderungen untersucht. ALT-Werte wurden mittels Standardverfahren getestet (Purdy et al. (1993)).

TABELLE 5
Titration von HEV-Inokulum – Mexikostamm

| Cyno Nr. | Inokulums-verdünnung | ALT-Erhöhung (Tage) | | Histo-path. | HEV-Ag in Leber | Anti-HEV (Tag der Serokonversion) |
|----------|----------------------|----------------------------|--------------------------------|-------------|-----------------|-----------------------------------|
| | | Bereich | Höchstwert (Wert) ¹ | | | |
| 9218 | 10^{-2} | 23-65 | 37(5.4) | + | + Tage 13-28 | + Tag 20 |
| 9219 | 10^{-2} | 16-58 | 30(7.8) | + | + Tage 13-27 | + Tag 20 |
| 9214 | 10^{-5} | keine ALT-Erhöhung | | - | - | - |
| 9220 | 10^{-5} | 30-37 | 34(4.6) | + | + Tage 20,27 | + Tag 35 |
| 9213 | 10^{-6} | 37-52 | 52(1.1) | -/+ | - | + Tag 35 |
| 9215 | 10^{-6} | 49-52 | 49(1.3) | - | - | + Tag 49 |
| 9212 | 10^{-7} | erhöhte Werte vom Tag 3 an | | - | - | - |
| 9217 | 10^{-7} | keine ALT-Erhöhung | | - | - | - |

¹Peakwert/negativer Cutoff (Vertrauensintervall 99%)

[0257] Wöchentliche Serumproben wurden auf Alanin-Aminotransferase (ALT) und auf Anti-HEV-Antikörper

mittels ELISA getestet. Beide mit einer 10^{-2} -Verdünnung inokulierten Tiere wiesen erhöhte ALT-Werte auf und serokonvertierten auf Anti-HEV innerhalb von drei Wochen nach Infektion. Nur einer der beiden (50%) mit einer 10^{-5} -Verdünnung inokulierten Cynomolgus-Affen wiesen erhöhte ALT-Werte auf. Dieses Tier, Cyno Nr. 9220, serokonvertierte am Tag 35 nach der Infektion. Während beide mit der 10^{-6} -Verdünnung inokulierten Tiere nur vorübergehende und minimale ALT-Erhöhungen zeigten, serokonvertierten diese Tiere (Cynos Nr. 9213 und 9215) dennoch am Tag 35 und 49. Bei keinem der mit der 10^{-7} -Verdünnung inokulierten Tiere traten ALT-Erhöhungen und Antikörper-Serokonversion auf. Wöchentliche Leberbiopsieproben wurden histopathologisch und mittels Immunofluoreszenzanalyse auf die Gegenwart von HEV-Antigen beurteilt. Das Auftreten von HEV-Antigen in der Leber und histopathologische Veränderungen standen im Einklang mit der Erhöhung des ALT-Wertes und wurden nur in den Cynomolgus-Affen Nr. 9218, 9219 und 9220 beobachtet. HEV-RNA im Cynomolgus-Stuhl wurde mittels RT-PCR gestestet.

[0258] Der Titer der Stammkultur (CID_{50}) wurde als diejenige HEV-Konzentration definiert, die sich in 50% der getesteten Cynomolgus-Affen als infektiös erwies. Der CID_{50} -Titer des Mex-Nr.-14-Inokulums wurde auf Basis des biochemischen und histologischen Nachweises von Hepatitis in einem von zwei mit einer 10^{-5} -Verdünnung der 10%igen (Gew./Vol.) menschlichen Stuhlsuspension inokulierten Cynomolgus-Affen auf $10^{-5}/\text{ml}$ geschätzt. Eine Suspension, die so verdünnt war, dass sie 1.000 für Cynomolgus infektiöse Dosierungen (CID_{50}) enthielt, wurde für die intravenöse Exposition der vakzinierten und Kontroll-Cynomolgus-Affen verwendet.

B. Infektion von Kontroll- und vakzinierten Testtieren

1. Immunisierung und Exposition von Tieren

[0259] Vierzehn Cynomolgus-Makaken (Cynos) wurden in der vorliegenden Studie verwendet. Acht Cynos wurden i. v. mit Verdünnungen einer 10%igen Stuhlsuspension der Mexiko-14-Suspension für die Titration der Expositions-Stammkultur (siehe oben) injiziert. Sechs Cynos, drei vakzinierter und drei nicht vakzinierter, wurden verwendet, um die In-vivo-Wirksamkeit des r62K-Antigens (Beispiele 4 und 6B) zu testen. Die Affen wurden für die Dauer der Studie unter BSL-2-Containment für biologische Gefährdung am Center for Disease Control and Prevention (Atlanta, GA) gehalten.

[0260] Die Tiere standen für sechs Wochen unter Quarantäne, und Serumproben wurden wöchentlich für die nächsten sechs Wochen abgenommen, um die Basislinienverte für ALT und SICD festzustellen. Vor der Virusinokulation von Vakzination wurden alle Cyno-Seren mittels ELISA auf die Gegenwart von mit HEV-ORF2- und -ORF3-Proteinen reaktiven Antikörpern getestet (Beispiele 1 und 8). Alle Tiere waren vor der Inokulation HEV-Antikörper-negativ.

[0261] Das r62K (wie oben beschrieben gereinigt, Beispiele 4 und 6) wurde nach Standardprotokollen mit Alaun präzipitiert. Der Protein-Alaun-Komplex wurde vor der Immunisierung bei 4°C gelagert. Drei Cynomolgus-Affen (Cynos Nr. 9338, 9339 und 9340) dienten als Kontrolltiere. Jedes der Tiere erhielt am Tag 0 und am Tag 31 intramuskuläre Injektionen von Alaun. Drei Cynomolgus-Affen (Cynos Nr. 9327, 9330 und 9331) wurden am Tag 0 und am Tag 31 durch intramuskuläre Injektion mit 20 μg Alaun-präzipitiertem r62K-Protein in 0,5 ml Puffer immunisiert.

[0262] Alle sechs Tiere wurden am Tag 74, 6 Wochen nach der letzten Immunisierung, mit einer 10^{-2} -Verdünnung einer 10%igen menschlichen Stuhlsuspension exponiert, die 1.000 CID_{50} Mexiko-HEV der Wildform (Mex Nr. 14) enthielt.

2. Probenabnahme

[0263] Den acht zur Titration der Mexiko-14-Stammkultur verwendeten Tieren wurden zweimal wöchentlich Blutproben von 1,5 ml abgenommen. Den sechs für die Vakzine-Phase der Untersuchung verwendeten Tieren wurden wöchentlich Blutproben von 1,5 ml abgenommen. Die Blutabnahme wurde für zumindest 120 Tage fortgesetzt. Jede Probe wurde auf Alanin-Aminotransferase (ALT), Serum-Isocitratdehydrogenase (SICD) und Anti-HEV-IgG-Antikörper getestet. Eine Basislinie und Vertrauensgrenze von 99% für ALT- und SICD-Aktivität wurde für jedes Tier unter Verwendung der Werte vor der Inokulation festgelegt.

[0264] Punktionsbiopsieproben der Leber wurden wöchentlich entnommen. Die Proben wurden für die Histopathologie und Identifizierung von Antigen aufgeteilt. Biopsien wurden nach der Rückkehr der Leberenzymwerte auf Basislinienniveau für zumindest weitere 30 Tage entnommen.

[0265] Stuhlproben wurden täglich für zumindest 90 Tage nach Exposition gesammelt und bis zur Analyse des Virus-RNA-Gehalts bei -70°C gelagert.

C. Beurteilung der gesammelten Proben

1. ELISA für Anti-HEV

[0266] Der Anti-HEV-ELISA war eine Modifizierung des früher beschriebenen EIA-Protokolls (Beispiel 8). An Polystyrol-ELISA-Platten als Antigene beschichtete Proteine umfassten: ORF2 SG3 (Yarbough et al. (1994)), ORF3 4-2M (Yarbough et al. (1991)) und ORF2 r62K. Testseren wurden in mit Antigen beschichteten Näpfen inkubiert, gefolgt von Gammaketten-spezifischem, HRP-konjugiertem Zeige-Anti-Human-IgG (Zymed, South San Francisco, CA). Der Signal-Rausch-Abstand (S/N) für jede Probe nach Inokulation wurde als Absorption bei 490 nm, dividiert durch die Absorption bei 490 nm für die Seren desselben Tieres vor der Inokulation berechnet. Die Basislinien-Anti-HEV-Werte wurden für jeden der Affen mit ihren fünf wöchentlichen Serumproben vor der Inokulierung ermittelt.

[0267] Der Cutoff für die Anti-HEV-Reaktivität wurde als OD₄₉₀ von 0,200 definiert, die mit einem S/N-Verhältnis von 3,39 und mehr als 30 Standardabweichungen über dem Mittelwert des O. D.-Werts vor der Inokulation korrelierte. Antikörpertiter wurden durch 2fache Reihenverdünnungen bestimmt, wobei der Endpunkt-Titer als höchste Serumverdünnung in einer 2fach-verdünnten Probe berechnet wurde, die immer noch eine O. D. von zumindest 0,200 lieferte.

2. Polymerasekettenreaktion (PCR)

[0268] Ein Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktions-(RT-PCR-)Verfahren (Kawasaki et al.; Wang et al. (1990)) wurde verwendet, um auf HEV-RNA in Cyno-Stuhlproben zu testen. Die Tests wurden unter Verwendung von HEV-spezifischen Primern durchgeführt, die sich von publizierten HEV-Sequenzen herleiteten (Tam et al. (1991a, 1991b); McCaustland et al. (1991)).

3. Immunofluoreszenztest

[0269] Immunofluoreszenztests für Hepatitis-E-Virusantigen in Leberbiopsiegewebe wurden nach Krawczynski und Bradley (1989) durchgeführt.

D. Hepatitis E in nicht immunisierten Tieren

[0270] Biochemische und histologische Anzeichen von Hepatitis wurden in zwei Cynos (Cynos Nr. 9218 und 9219) beobachtet, die mit einer 10⁻²-Verdünnung der Expositions-Stammkultur in der Titrationsstudie inkuliert waren. ALT-Erhöhungen wurden zwei bis drei Wochen nach der Inokulation beobachtet. Nekroentzündliche Veränderungen traten gleichzeitig mit dem biochemischen Nachweis von Leberzellenschäden auf. HEV-Antigen wurde in der Leber von Affen zwei bis drei Wochen nach der Inokulation nachgewiesen. Virus-Verbreitung im Stuhl wurde mittels RT-PCR beobachtet.

[0271] Antikörper gegen ORF2 des HEV war am Tag 20 messbar. Bis zum Tag 65 begannen die ALT-Werte abzufallen, gefolgt von der Eliminierung des Virus und Resolution der Krankheit.

[0272] Biochemische und histologische Anzeichen von Hepatitis wurden in drei Kontrolltieren (Cynos 9338, 9339 und 9340) beobachtet, die mit einer 10⁻²-Verdünnung der Expositions-Stammkultur bei der In-vivo-Wirkungsuntersuchung mit r62K inkuliert waren (Tabelle 6).

[0273] Die in Tabelle 6 dargestellten Daten zeigen den Verlauf von Hepatitis E in nicht immunisierten und immunisierten Cynos. Drei Cynos wurden durch intramuskuläre Injektion mit 0,5 ml von 20 µg Alaun-präzipitiertem r62K-Protein am Tag 0 und am Tag 31 immunisiert. Sechs Cynos wurden mit 1.000 CID₅₀ des Mexiko-HEV der Wildform (Mex Nr. 14) am Tag 74 exponiert. Anti-HEV wurde mittels ELISA getestet. HEV-Antigen in der Leber wurde mittels Immunofluoreszenztest von Leberbiopsieproben nachgewiesen. Leberbiopsien wurden gemäß den Regeln für nekroentzündliche Veränderungen untersucht. ALT-Werte wurden mittels Standardverfahren getestet. HEV-RNA wurde mittels RT-PCR nachgewiesen (Purdy et al. (1993); Kawasaki et al., Wang et al. (1990)).

TABELLE 6
HEV-Vakzine-Experiment: Exposition mit Mexiko-HEV

| Tier Nr. | Immunisierung (62K-Antigen) | Anti-HEV bei Exposition | Erhöhte ALT (u/l) Bereich (Tage) | Erhöhte ALT (u/l) Bereich | |
|----------|--|----------------------------|-------------------------------------|------------------------------|------|
| | | | | Tag | S/CO |
| CY9327 | 2 X 20 µg | positiv | 24-87 ¹ | 83 | 1.3 |
| CY9330 | 2 X 20 µg | positiv | 14-104 ¹ | 41 | 1.5 |
| CY9331 | 2 X 20 µg | positiv | einzeln | 97 | 1.5 |
| CY9338 | Alaun (X 2) | negativ | 11-14 | 20 | 4.5 |
| CY9339 | Alaun (X 2) | negativ | 20-34 | 27 | 4.7 |
| CY9340 | Alaun (X 2) | negativ | 27-31 | 27 | 2.5 |
| Tier Nr. | Histopathologie (nekroent- zündliche Veränderungen) | | HEV-Ag in Leber (Tag) | HEV-RNA im Stuhl (Tag) | |
| CY9327 | 0 | | negativ | negativ | |
| CY9330 | 0 | | negativ | 30,34 | |
| CY9331 | 0 | | negativ | negativ | |
| CY9338 | positiv | | 14 | nd ² | |
| CY9339 | positiv | | 14,20 | 8-20 | |
| CY9340 | positiv | | 14,20 | nd | |

¹einzelner Tag, vereinzelte Erhöhungen

²nicht ermittelt

[0274] ALT-Erhöhungen mit Höchstwerten größer als Signal/Cutoff-Verhältnisse von 2,5 zeigten sich zwei bis drei Wochen nach Exposition für jeden der Kontrollaffen. Nekroenzündliche Veränderungen traten gleichzeitig mit dem biochemischen Nachweis von Leberzellenschaden auf.

[0275] HEV-Antigen wurde in der Leber der drei Tiere innerhalb von zwei Wochen nach Exposition nachgewiesen. Virus-Verbreitung im Stuhl wurde mittels RT-PCR schon eine Woche nach der Exposition in drei Kontrolltieren beobachtet. Virus-Verbreitung wurde für bis zu drei Wochen aufrechterhalten. ALT-Werte gingen für jedes der nicht vakzinierten Tiere bis zum Tag 38 nach Exposition auf die Basislinie zurück. Antikörper gegen ORF2 des HEV waren für jedes der Kontrolltiere innerhalb von drei Wochen nach Exposition mit der Wildform messbar. Ein Tier, Cyno Nr. 9340, baute auch eine gleichzeitige ORF3-Antikörper-Antwort auf.

[0276] Gleichzeitig mit der Resolution der Krankheit erreichte der Antikörper gegen ORF2 des HEV bis zum Tag 36–41 sein Maximum und blieb für zumindest 12 Wochen nach der Exposition bestehen. Der Antikörper gegen ORF3 war kurzlebig, wobei die Antikörperwerte bis zur Woche 12 nach Exposition abfielen. Ein Kontrolltier, Cyno Nr. 9340, verendete 15–16 Wochen nach der Exposition. Die Todesursache stand im Wesentlichen nicht mit der HEV-Infektion in Beziehung. Die verbleibenden beiden Tiere, Cyno Nr. 9338 und 9339, wiesen 21 Wochen nach Exposition einen abfallenden, jedoch nach wie vor messbaren Anti-HEV-Antikörper auf.

E. Vollständiger Schutz gegen Hepatitis E bei vakzinierten Cynos

[0277] Drei Cynos (Nr. 9327, 9331 und 9330) wurden zweimal mit 20-µg-Dosierungen des Alaun-präzipitierten r62K-ORF2 immunisiert (Tabelle 6). Gegen ORF2 gerichteter Antikörper wurde anfänglich 1–2 Wochen nach der anfänglichen Immunisierung nachgewiesen. Ein Anti-HEV-ORF2-Antikörpertiter von bis zu 1 : 2.000 wurde in allen immunisierten Cynos erzielt. Der Anti-HEV-Titer stieg nach der Booster-Immunisierung für die Cynos 9327 und 9331 weiter an. Anti-HEV war im Cyno Nr. 9330 nach wie vor messbar, jedoch waren die An-

tikörperwerte während des 6-wöchigen Zeitraums zwischen dem letzten Boost und der Exposition mit der Wildform abgefallen. Cynos 9327 und 9331 wiesen geschätzte Titer von 1 : 5.000 auf; Cyno 9330 wies einen niedrigeren Titer von 1 : 2.500 auf (Tabelle 7).

TABELLE 7
Inverse Serum-Anti-HEV-Titer: Vakzinierter Tiere

| Cyno-Probe | Antigenreaktivität | | |
|------------------------------|--------------------|----------|----------|
| | Anti-62K | Anti-SG3 | Anti-4-2 |
| Tag der Exposition | 5,000 | 1,000 | < 100 |
| Sechs Wochen nach Exposition | 2,500 | 500 | < 100 |
| Tag der Exposition | 2,500 | 400 | < 100 |
| Sechs Wochen nach Exposition | 20,000 | 2,500 | 1,000 |
| Tag der Exposition | 5,000 | 1,000 | < 100 |
| Sechs Wochen nach Exposition | 2,500 | 500 | < 100 |

[0278] Nach Exposition mit 1.000 CID₅₀ des heterologen HEV der Wildform, waren die Werte der gegen ORF2 gerichteten, messbaren Antikörper in den Cynos 9327 und 9331 stabil. Jedoch wurde bei Cyno 9330 eine offensichtliche anamnestische Reaktion sechs Wochen nach der Exposition beobachtet; Endpunkttitre stiegen um nahezu das 10fache auf 1 : 20.000 (Tabelle 7). Gleichzeitig mit dem Anstieg von Anti-HEV-ORF2 zeigte Cyno 9330 eine gegen ORF3 gerichtete Antikörperantwort.

[0279] Obgleich die Antikörperwerte für die nächsten vier Wochen weiter anstiegen, folgte dem ein plötzlicher und kontinuierlicher Abfall des Antikörpers gegen HEV. 12 Wochen nach Exposition waren die Anti-HEV-Titer im Cyno 9330 signifikant abgefallen; Anti-HEV-Titer blieben für Cynos 9327 und 9331 konstant. Ein vakzinierter Tier, Cyno Nr. 9331, verendete 16–21 Wochen nach der Exposition. Die Todesursache stand im Wesentlichen nicht mit der HEV-Infektion in Beziehung. 21 Wochen nach Exposition zeigte Cyno 9327 einen langsamen Abfall des gegen ORF2 gerichteten Antikörpers; Endpunkttitre variierten nur um das 2fache. 21 Wochen nach Exposition wies Nr. 9330 keinen messbaren Antikörper gegen ORF3 auf, und der Antikörpertiter gegen ORF2 warum mehr als das 20fache abgefallen.

[0280] Bei allen der vakzinierter Tiere lagen die ALT-Werte für den Zeitraum der Studie nahe der Basislinie. Es wurde weder Antigen in der Leber nachgewiesen, noch wurden irgendwelche nekroentzündlichen Veränderungen beobachtet (Tabelle 6). In zwei der immunisierten Cynos wurde mittels RT-PCR kein Virus in den Fäkalien detektiert; bei einem der immunisierten Cynos war die Virus-Verbreitung verzögert und dauerte nur kurz an. Da keine biochemischen oder histopathologischen Anzeichen für Leberzellenschaden in irgendeinem der drei immunisierten Tiere auftraten, scheint die Vakzination bei allen der mit r62K immunisierten Tieren Schutz gegen Krankheit verliehen zu haben.

F. Beweis für „Durchbruch“-Hepatitis-E-Infektion ohne Erkrankung

[0281] Das Auftreten von gegen das ORF3 des HEV gerichteten Antikörpern im Cyno Nr. 9330 sechs Wochen nach Exposition legte nahe, dass das Tier tatsächlich mit dem Expositionsvirus infiziert war. Diese Beobachtung wurde durch die anamnestische Antikörperantwort gegen ORF2 untermauert. Die Virus-Verbreitung im Stuhl von Cyno 9330 wurde mittels RT-PCR detektiert, war jedoch verzögert und dauerte im Vergleich zu Kontrolltieren weniger lange an (Tabelle 6). Insgesamt stehen diese Befunde mit einer „Durchbruchs“-Infektion im Einklang: Eingeschränkte und verzögerte Virusreplikation in Abwesenheit von Erkrankung.

[0282] Der partielle Schutz gegen Infektion bei Cyno 9330 kann der Tatsache zugeschrieben werden, dass das Tier vor der Exposition niedrigere Werte von Anti-HEV aufwies. Trotzdem scheint es, dass in Abwesenheit von nekroentzündlichen Veränderungen oder biochemischen Anzeichen von Hepatitis ein Leberzellenschaden und Hepatitis durch Immunisierung verhindert wurden.

Beispiel 11

In-vitro-HEV-Infektion und Neutralisierung

A. Zellkultur und Antikörperherstellung

[0283] Seren aus nicht vakzinierten und vakzinierten Cynos (in Beispiel 10 beschrieben) wurden unter Verwendung von In-vitro-Neutralisierungstests (siehe unten) auf mögliche neutralisierende Antikörper getestet. Wöchentliche, 5 Wochen vor der Vakzination abgenommene Seren wurden kombiniert, um einen Prä-Blutabnahme-Serenpool zu bereiten. Serumproben wurden am Tag der Exposition vor der Inokulierung der Tiere mit HEV abgenommen.

[0284] Seren aus der Kontrollgruppe von drei Tieren (Cynos Nr. 9338, 9339, 9340) wurden vor der Affinitätsreinigung der Gesamtimmunglobuline (Igs) mittels Protein-G-Säulenchromatographie (Perseptive Biosystems, Cambridge, MA) gepoolt. Seren aus den vakzinierten Tieren Nr. 9327 und 9330 wurden einzeln auf Igs gereinigt.

[0285] Gereinigte IgG-Proben wurden vor der Verwendung im In-vitro-Neutralisierungstest mittels Speed-vac-Zentrifugation konzentriert. Äquivalente Mengen an ORF2-reaktivem Antikörper aus jedem Ig-Pool wurden durch Normalisierung gemäß dem ELISA-Endpunkttilter gegen das ORF2-SG3-Protein angenähert.

[0286] Normale primäre Cyno-Hepatozyten wurden aus einer keilförmigen Leberbiopsie isoliert. Hepatozyten wurden in einer Dichte von 1×10^6 Zellen pro ml in jeden Napf von Collagen-beschichteten 6-Napf-Platten ausplattiert. Die In-vitro-Züchtung von Hepatozyten erfolgte in einer wie beschrieben (Beispiel 2) mit Wachstumsfaktoren und Hormonen ergänzten serumfreien Mediumsformulierung (SFM). Die ausplattierten Leberzellen wurden sechs Tage nach Isolation entweder mit einem bekannten infektiösen HEV-Inokulum oder einem vorinkubierten Gemisch von Testantikörpern und Virus-Stammkultur inkuliert.

[0287] Das zur HEV-Exposition der Hepatozyten verwendete Inokulum war aus Cyno 11708 erhaltene infektiöse Galle. Das Tier ist vorher experimentell mit einer 10%igen Stuhlsuspension aus dem Stuhl der dritten Passage, Cyno Nr. 73, infiziert worden (HEV-Burmastamm, Bradley et al. (1987); Purdy et al. (1993)).

[0288] Igs aus jedem Prä-Blutabnahme-Pool und Expositionspool wurden gesondert mit dem Virusinokulum 1 Stunde lang bei 37°C unter sanftem Schütteln inkubiert. Warmes serumfreies Medium (SFM) wurde dem Antikörper-Virus-Gemisch zugegeben und dazu verwendet, um die gezüchteten Hepatozyten zu inkulieren. In 24-stündigen und 48-stündigen Intervallen wurde das Medium vollständig ausgetauscht. Doppelt ausgeführte Näpfe von Hepatozytenkulturen wurden verwendet, um die mögliche neutralisierende Aktivität jedes Antikörperpräparats über das Experiment hinweg zu untersuchen.

[0289] Aus Medium und Gewebekulturzellen bereitete RNA wurde auf Gegenwart von Positiv- und Negativstrang-HEV-RNA mittels Verwendung eines strangspezifischen RT-PCR-Tests analysiert.

B. In-vitro-Neutralisierung des Hepatitis-E-Virus durch Serumantikörper aus vakzinierten Tieren

[0290] Aus nicht vakzinierten und vakzinierten Cynos gereinigte Gesamt-IgGs wurden auf Gegenwart von möglichen neutralisierenden Antikörpern gegen HEV wie gerade beschrieben untersucht.

[0291] Seren aus der Kontrollgruppe nicht vakzinerter Tiere wurden vereinigt. Aus am Tag 14 nach der Infektion geernteten Medien und Gewebekulturzellen hergestellte RNA wurde auf die Gegenwart von Positiv- und Negativstrang-RNA durch Verwendung eines strangspezifischen RT-PCR-Tests analysiert.

[0292] IgGs (Prä-Blutabnahme), die für alle Cynos vor der Vakzination erhalten wurden, waren unfähig, die In-vitro-HEV-Infektion zu blockieren ([Fig. 15](#), „Prä-NV-(nicht vakzinierte)Cynos“, „Prä-Cy9327“ und „Prä-Cy-9330“), wie mittels Positivstrang-PCR-Test ermittelt wurde. Das beobachtete PCR-Produkt korrelierte mit der für Kontrollen infizierter Kulturen beobachteten Produktmenge, wobei die Kontrollen in Abwesenheit

jeglicher IgGs durchgeführt wurden.

[0293] Vereinigte IgGs aus nicht vakzinierten Cynos (9338, 9339, 9340) zum Zeitpunkt der Exposition blockierten nicht die In-vitro-Infektion der gezüchteten Hepatozyten ([Fig. 15](#), „Challenge-NV-Cynos“). Wiederum korrelierten die beobachteten PCR-Produkte mit der Produktmenge für Kontrollen infizierter Kulturen, die in Abwesenheit jeglicher IgGs durchgeführt wurden.

[0294] Zum Zeitpunkt der Exposition aus zwei der vakzinierten Cynos (Cynos 9327, 9330) entnommene IgGs schienen eine neutralisierende Immunantwort entwickelt zu haben, die fähig war, die Virusinfektion in vitro vollständig zu blockieren ([Fig. 15](#), „Challenge CY9327“ und „Challenge CY9330“). Mittels Positivstrang-RT-PCR-Messung wurden keine detektierbaren Produkte festgestellt, wodurch die Abwesenheit von viraler HEV-RNA verifiziert und die neutralisierende Aktivität dieser Cyno-Antikörper bestätigt wurden. In [Fig. 15](#): Mit „N“ bezeichnete Bahnen enthielten keine Probe; es sind zwei Bahnen von Hepatozyten-Kontrollen gezeigt, eine aus einer Zellkultur einer „nicht infizierten Kontrolle“ und die andere aus einer Zellkultur einer „infizierten Kontrolle“; die mit „Spike“ bezeichnete Bahn ist eine positive Kontrolle, um das maximal mögliche Signal darzustellen, das aus dem Inokulum selbst erhalten werden könnte; und die Bahnen „RNA-Kontrolle“ wurden zur Quantifizierung und Beurteilung der RT-PCR-Reaktionen verwendet – 1 fg Positivstrang-RNA, 10 fg Positivstrang-RNA und 100 fg Negativstrang-RNA.

[0295] Diese Beobachtungen bekräftigen den biochemischen und histopathologischen Nachweis, dass in Reaktion auf Vakzination mit dem 62K-Antigenpräparat gebildete Antikörper das HEV-Virus neutralisieren und Schutz gegen Infektion und anschließende Erkrankung verleihen.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE INFORMATIONEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Genelabs Technologies, Inc.
- (B) ADRESSE: 505 Penobscot Drive
- (C) STADT: Redwood City
- (D) BUNDESSTAAT: Kalifornien
- (E) LAND: USA
- (F) POSTLEITZahl: 94063-4738

(ii) TITEL DER ERFINDUNG: Hepatitis-E-Virus-Antigene und Verwendungen dafür

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 31

(iv) KORRESPONDENZADRESSE:

- (A) ADRESSAT: Dehlinger & Associates
- (B) STRASSE: P.O. Box 60850
- (C) STADT: Palo Alto
- (D) BUNDESSTAAT: Kalifornien
- (E) LAND: USA
- (F) POSTLEITZahl: 94306-0850

(v) COMPUTERLESBARE FORM:

- (A) ART DES MEDIUMS: Floppy Disk
- (B) COMPUTER: IBM PC-kompatibel
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release Nr. 1.0, Version Nr. 1.25

(vi) AKTUELLE ANMELDUNGSDATEN:

- (A) ANMELDUNGSDATUM:
- (B) EINREICHDATUM:
- (C) KLASIFIZIERUNG:

(viii) INFORMATIONEN ÜBER ANWALT/VERTRETER:

- (A) NAME: Fabian, Gary R.
- (B) REGISTRATIONSNUMMER: 33.875
- (C) KENNZAHL/ZEICHEN: 4600-0293.41

(ix) TELEKOMMUNIKATIONSANGABEN:

- (A) TELEFON: (415) 324-0880
- (B) TELEFAX: (415) 324-0960

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 1:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 2049 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: doppelt
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: Nein

(vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE:

(C) INDIVIDUELLES ISOLAT: Hepatitis-E-Virus- (Burma-Stamm) ORF-2

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 1:

| | | | | | | |
|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|------|
| ATGCGCCCTC | GGCCTATTT | GTTGCTGCTC | CTCATGTTT | TGCCTATGCT | GCCC GCGCCA | 60 |
| CCGCCCCGGTC | AGCCGTCTGG | CCGCCGTCGT | GGGC GGCGCA | GCGGC GGTTTC | CGGC GGTTGGT | 120 |
| TTCTGGGTG | ACCGGGTTGA | TTCTCAGCCC | TTCGCAATCC | CCTATATTCA | TCCAACCAAC | 180 |
| CCCTTCGCC | CCGATGTCAC | CGCTGCGGCC | GGGGCTGGAC | CTCGTGTTCG | CCAACCCGCC | 240 |
| CGACCACTCG | GCTCCGCTTG | GGGTGACCAAG | GCCCAGCGCC | CCGCCGTTGC | CTCACGTCGT | 300 |
| AGACCTACCA | CAGCTGGGC | CGCGCCGCTA | ACCGCGGTG | CTCCGGCCCA | TGACACCCCG | 360 |
| CCAGTGCCTG | ATGTCGACTC | CCGC GGCGCC | ATCTTGC | GGCAGTATAA | CCTATCAACA | 420 |
| TCTCCCTTA | CCTCTCCGT | GGCCACCGGGC | ACTAACCTGG | TTCTTTATGC | CGCCCCTCTT | 480 |
| AGTCCGCTT | TACCCCTCA | GGACGGCACC | AATACCCATA | TAATGGCCAC | GGAAGCTTCT | 540 |
| AATTATGCC | AGTACCGGGT | TGCCC GTGCC | ACAATCCGTT | ACCGCCCGCT | GGTCCCCAAT | 600 |
| GCTGTCGGCG | GTTACGCCAT | CTCCATCTCA | TTCTGGCCAC | AGACCACCAAC | CACCCCGACG | 660 |
| TCCGTTGATA | TGAATTCAAT | AACCTCGACG | GATGTTCGTA | TTTTAGTCCA | GCCCCGGCATA | 720 |
| GCCTCTGAGC | TTGTGATCCC | AAAGTGAGCGC | CTACACTATC | GTAACCAAGG | CTGGCGCTCC | 780 |
| GTCGAGACCT | CTGGGGTGGC | TGAGGAGGAG | GCTACCTCTG | GTCTTGTAT | GCTTTGCATA | 840 |
| CATGGCTCAC | TCGTAAATT | CTATACTAAT | ACACCCCTATA | CCGGTGCCCT | CGGGCTGTTG | 900 |
| GACTTTGCC | TTGAGCTTGA | GTTCGCAAC | CTTACCCCCG | GTAACACCAA | TACGGGGTC | 960 |
| TCCCGTTATT | CCAGCACTGC | TCGCCACCGC | CTTCGTCGCG | GTGCGGACGG | GACTGCCGAG | 1020 |
| CTCACCA | CGGCTGCTAC | CCGCTTTATG | AAGGACCTCT | ATTTTACTAG | TACTAATGGT | 1080 |
| GTCGGTGAGA | TCGGCCGCGG | GATAGCCCTC | ACCCCTGTTCA | ACCTTGCTGA | CACTCTGCTT | 1140 |
| GGCGGCCTGC | CGACAGAATT | GATTCGTGCG | GCTGGTGGCC | AGCTGTTCTA | CTCCCGTCCC | 1200 |
| GTTGTCTCAG | CCAATGGCGA | GCCGACTGTT | AAGTTGTATA | CATCTGTAGA | GAATGCTCAG | 1260 |
| CAGGATAAGG | GTATTGCAAT | CCCCCATGAC | ATTGACCTCG | GAGAATCTCG | TGTGGTTATT | 1320 |
| CAGGATTATG | ATAACCAACA | TGAACAAAGAT | CGGCCGACGC | CTTCTCCAGC | CCCATCGCGC | 1380 |
| CCTTTCTCTG | TCCTTCGAGC | TAATGATGTG | CTTTGGCTCT | CTCTCACCGC | TGCCCAGTAT | 1440 |
| GACCAGTCCA | CTTATGGCTC | TTCGACTGGC | CCAGTTTATG | TTTCTGACTC | TGTGACCTTG | 1500 |
| GTAAATGTTG | CGACCGGGCGC | GCAGGCCGTT | GCCCGGTGCG | TCGATTGGAC | CAAGGTCACA | 1560 |
| CTTGACGGTC | GCCCCCTCTC | CACCATCCAG | CAGTACTCGA | AGACCTTCTT | TGTCCTGCCG | 1620 |
| CTCCGCGGTA | AGCTCTCTT | CTGGGAGGCA | GGCACAACTA | AAGCCGGGTA | CCCTTATAAT | 1680 |
| TATAACACCA | CTGCTAGCGA | CCAAGTGCTT | GTCGAGAATG | CCGCCGGGCA | CCGGGTGCGCT | 1740 |

| | |
|---|------|
| ATTTCCACTT ACACCACTAG CCTGGGTGCT GGTCCCGTCT CCATTCTGC GGTTGCCGTT | 1800 |
| TTAGCCCCCC ACTCTGCGCT AGCATTGCTT GAGGATACCT TGGACTACCC TGCCCGCGCC | 1860 |
| CATACTTTG ATGATTCTG CCCAGAGTGC CGCCCCCTTG GCCTTCAGGG CTGCGCTTTC | 1920 |
| CAGTCTACTG TCGCTGAGCT TCAGGCCCTT AAGATGAAGG TGGGTAACAC TCGGGAGTTG | 1980 |
| TAGTTTATTT GCTTGTGCC CCGCTCTTTC TGTTGCTTAT TTCTCATTTC TGCGTTCCGC | 2040 |
| GCTCCCTGA | 2049 |

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 2:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 2058 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: doppelt
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: Nein

(vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE:

- (C) INDIVIDUELLES ISOLAT: Hepatitis-E-Virus- (Mexiko-Stamm) ORF-2-Region

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 2:

| | |
|---|------|
| ATGCGCCCTA GGCTCTTT GCTGTTGTTCTCTCTGTTGTTGCCTATGTT GCGCCGCGCCA | 60 |
| CCGACCGGTC AGCCGTCTGG CCGCCGTCGT GGGCGCGCA GCGGCGGTAC CGGCGGTGGT | 120 |
| TTCTGGGTG ACCGGGTTGA TTCTCAGCCC TTGCAATCC CCTATATTCA TCCAACCAAC | 180 |
| CCCTTGCCC CAGACGTTGC CGCTGCGTCC GGGCTGGAC CTCGCCTTCG CCAACCAGCC | 240 |
| CGGCCACTTG GCTCCACTTG GCGAGATCAG GCCCAGCGCC CCTCCGCTGC CTCCCGTCG | 300 |
| CGACCTGCCA CAGCCCCGGC TCGGGCGCTG ACGGCTGTGG CGCCTGCCA TGACACCTCA | 360 |
| CCCGTCCCCG ACGTTGATTC TCGGGGTGCA ATTCTACGCC GCCAGTATAA TTTGTCTACT | 420 |
| TCACCCCTGA CATCCTCTGT GGCTCTGGC ACTAATTAG TCCTGTATGC AGCCCCCTT | 480 |
| AATCCGCCTC TGCGCTGCA GGACGGTACT AATACTCACA TTATGGCAC AGAGGGCTCC | 540 |
| AATTATGCAC AGTACCGGGT TGCCCGCGCT ACTATCCGTT ACCGGCCCT AGTGCCTAAT | 600 |
| GCAGTTGGAG GCTATGCTAT ATCCATTCT TTCTGGCTC AAACAACCAAC AACCCCTACA | 660 |
| TCTGTTGACA TGAATTCCAT TACTTCCACT GATGTCAGGA TTCTGTTCA ACCTGGCATA | 720 |
| GCATCTGAAT TGGTCATCCC AAGCGAGCGC CTTCACTACC GCAATCAAGG TTGGCGCTCG | 780 |
| GTTGAGACAT CTGGTGTGCTG TGAGGAGGAA GCCACCTCCG GTCTTGTCA GTTATGCATA | 840 |
| CATGGCTCTC CAGTTAACTC CTATACCAAT ACCCCTTATA CCGGTGCCCT TGGCTTACTG | 900 |
| GACTTTGCCT TAGAGCTTGA GTTTCGCAAT CTCACCACCT GTAACACCAA TACACGTGTG | 960 |
| TCCCGTTACT CCAGCACGGC CCGTCACCGG CTCCGCCAG GGGCCGACGG GACTGCGGAG | 1020 |
| CTGACCACAA CTGCAGCCAC CAGGTTCATG AAAGATCTCC ACTTTACCGG CCTTAATGGG | 1080 |
| GTAGGTGAAG TCGGCCGCGG GATAGCTCTA ACATTACTTA ACCTTGCTGA CACGCTCCTC | 1140 |

| | |
|--|------|
| GGCGGGCTCC CGACAGAATT AATTCGTG GCTGGCGGGC AACTGTTTA TTCCCGCCCG | 1200 |
| GTTGTCTCAG CCAATGGCGA GCCAACCGTG AAGCTCTATA CATCAGTGGA GAATGCTCAG | 1260 |
| CAGGATAAGG GTGTTGCTAT CCCCCACGAT ATCGATCTTG GTGATTGCGC TGTGGTCATT | 1320 |
| CAGGATTATG ACAACCAGCA TGAGCAGGAT CGGCCACCC CGTCGCCTGC GCCATCTCGG | 1380 |
| CCTTTTCTG TTCTCCGAGC AAATGATGTA CTTGGCTGT CCCTCACTGC AGCCGAGTAT | 1440 |
| GACCAGTCCA CTTACGGGTC GTCAACTGGC CGGGTTTATA TCTCGGACAG CGTGACTTTG | 1500 |
| GTGAATGTTG CGACTGGCGC GCAGGCCGTA GCCCGATCGC TTGACTGGTC CAAAGTCACC | 1560 |
| CTCGACGGGC GGCCCCTCCC GACTGTTGAG CAATATTCCA AGACATTCTT TGTGCTCCCC | 1620 |
| CTTCGTGGCA AGCTCTCCTT TTGGGAGGCC GGCACAAACAA AAGCAGGTTA TCCTTATAAT | 1680 |
| TATAATACTA CTGCTAGTGA CCAGATTCTG ATTGAAAATG CTGCCGGCCA TCGGGTCGCC | 1740 |
| ATTTCAACCT ATACCACCAAG GCTTGGGGCC GGTCCGGTCG CCATTTCTGC GGCCGCGGTT | 1800 |
| TTGGCTCCAC GCTCCGCCCT GGCTCTGCTG GAGGATACTT TTGATTATCC GGGGCGGGCG | 1860 |
| CACACATTTG ATGACTTCTG CCCTGAATGC CGCGCTTAG GCCTCCAGGG TTGTGCTTTC | 1920 |
| CAGTCAACTG TCGCTGAGCT CCAGCGCCTT AAAGTTAAGG TGGGTAAAAC TCGGGAGTTG | 1980 |
| TAGTTTATTT GGCTGTGCC ACCTACTTAT ATCTGCTGAT TTCCCTTATT TCCTTTTCT | 2040 |
| CGGTCCCGCG CGTCCCTGA | 2058 |

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 3:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 1647 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: doppelt
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: Nein

(vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE:

- (C) INDIVIDUELLES ISOLAT: Hepatitis-E-Virus- (Burma) r62kDa, Figur 2

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 3:

| | | | | | | |
|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|-------------|------|
| CGGGTCGCTC | CGGCCCATGA | CACCCGCCA | GTGCCTGATG | TCGACTCCCG | CGGCGCCATC | 60 |
| TTGCCCGGC | AGTATAACCT | ATCAACATCT | CCCCTTACCT | CTTCCGTGGC | CACCGGCACT | 120 |
| AACCTGGTTC | TTTATGCCGC | CCCTCTTAGT | CCGCTTTAC | CCCTTCAGGA | CGGCACCAAT | 180 |
| ACCCATATAA | TGGCCACGGA | AGCTTCTAAT | TATGCCAGT | ACCGGGTTGC | CCGTGCCACA | 240 |
| ATCCGTTACC | GCCCCGTGGT | CCCCAATGCT | GTCGGCGTT | ACGCCATCTC | CATCTCATTC | 300 |
| TGGCCACAGA | CCACCACAC | CCCGACGTCC | GTTGATATGA | ATTCAATAAC | CTCGACGGAT | 360 |
| GTTCGTATTT | TAGTCCAGCC | CGGCATAGCC | TCTGAGCTTG | TGATCCCAAG | TGAGCGCCTA | 420 |
| CACTATCGTA | ACCAAGGCTG | GCGCTCCGTC | GAGACCTCTG | GGGTGGCTGA | GGAGGAGGCT | 480 |
| ACCTCTGGTC | TTGTTATGCT | TTGCATACAT | GGCTCACTCG | TAAATTCTTA | TACTAATACA | 540 |
| CCCTATACCG | GTGCCCTCGG | GCTGTTGGAC | TTTGCCCTTG | AGCTTGAGTT | TCGCAACCTT | 600 |
| ACCCCCGGTA | ACACCAATAC | GCGGGTCTCC | CGTTATTCCA | GCACTGCTCG | CCACCGCCTT | 660 |
| CGTCGCGGTG | CGGACGGGAC | TGCCGAGCTC | ACCACCAACGG | CTGCTACCCG | CTTTATGAAG | 720 |
| GACCTCTATT | TTACTAGTAC | TAATGGTGTC | GGTGAGATCG | GCCGCGGGAT | AGCCCTCACCC | 780 |
| CTGTTCAACC | TTGCTGACAC | TCTGCTTGGC | GGCCTGCCGA | CAGAATTGAT | TTCGTCGGCT | 840 |
| GGTGGCCAGC | TGTTCTACTC | CCGTCCCCGTT | GTCTCAGCCA | ATGGCGAGCC | GAETGTTAAG | 900 |
| TTGTATACAT | CTGTAGAGAA | TGCTCAGCAG | GATAAGGGTA | TTGCAATCCC | GCATGACATT | 960 |
| GACCTCGGAG | AATCTCGTGT | GGTTATTCAG | GATTATGATA | ACCAACATGA | ACAAGATCGG | 1020 |
| CCGACGCCCTT | CTCCAGCCCC | ATCGCGCCCT | TTCTCTGTCC | TTCGAGCTAA | TGATGTGCTT | 1080 |
| TGGCTCTCTC | TCACCGCTGC | CGAGTATGAC | CAGTCCACTT | ATGGCTCTTC | GACTGGCCCA | 1140 |
| GTTTATGTTT | CTGACTCTGT | GACCTTGGTT | AATGTTGCGA | CCGGCGCGCA | GGCCGTTGCC | 1200 |
| CGGTCGCTCG | ATTGGACCAA | GGTCACACTT | GACGGTCGCC | CCCTCTCCAC | CATCCAGCAG | 1260 |
| TACTCGAAGA | CCTTCTTGT | CCTGCCGCTC | CGCGGTAAGC | TCTCTTCTG | GGAGGCAGGC | 1320 |
| ACAACTAAAG | CCGGGTACCC | TTATAATTAT | AACACCACTG | CTAGCGACCA | ACTGCTTGTC | 1380 |
| GAGAATGCCG | CCGGGCACCG | GGTCGCTATT | TCCACTTACA | CCACTAGCCT | GGGTGCTGGT | 1440 |
| CCCGTCTCCA | TTTCTGCGGT | TGCCGTTTTA | GCCCCCCACT | CTGCGCTAGC | ATTGCTTGAG | 1500 |
| GATACCTTGG | ACTACCCCTGC | CCGCGCCCAT | ACTTTGATG | ATTCTGCC | AGAGTGCCGC | 1560 |
| CCCCTTGGCC | TTCAGGGCTG | CGCTTCCAG | TCTACTGTG | CTGAGCTTCA | GCGCCTTAAG | 1620 |
| ATGAAGGTGG | GTAAAACCTCG | GGAGTTG | | | | 1647 |

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 4:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 1647 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: doppelt
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: Nein

(vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE:

- (C) INDIVIDUELLES ISOLAT: Hepatitis-E-Virus- (Mexiko-Stamm) r62kDa, Figur 2

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 4:

| | | | | | | |
|-------------|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|------|
| GCTGTGGCGC | CTGCCCATGA | CACCTCACCC | GTCCCGGACG | TTGATTCTCG | CGGTGCAATT | 60 |
| CTACGCCGCC | AGTATAATTT | GTCTACTTCA | CCCCTGACAT | CCTCTGTGGC | CTCTGGCACT | 120 |
| AATTTAGTCC | TGTATGCAGC | CCCCCTTAAT | CCGCCTCTGC | CGCTGCAGGA | CGGTACTAAT | 180 |
| ACTCACATTA | TGGCCACAGA | GGCCTCCAAT | TATGCACAGT | ACCGGGTTGC | CCGCGCTACT | 240 |
| ATCCGTTACC | GGCCCCTAGT | GCCTAATGCA | GTTGGAGGCT | ATGCTATATC | CATTTCTTTC | 300 |
| TGGCCTCAAA | CAACCACAAAC | CCCTACATCT | GTTGACATGA | ATTCCATTAC | TTCCACTGAT | 360 |
| GTCAGGATTC | TTGTTCAACC | TGGCATAGCA | TCTGAATTGG | TCATCCCAAG | CGAGCGCCTT | 420 |
| CACTACCGCA | ATCAAGGTTG | GCGCTCGGTT | GAGACATCTG | GTGTTGCTGA | GGAGGAAGCC | 480 |
| ACCTCCGGTC | TTGTCATGTT | ATGCATACAT | GGCTCTCCAG | TTAACTCCTA | TACCAATACC | 540 |
| CCTTATACCG | GTGCCCTTGG | CTTACTGGAC | TTTGCCTTAG | AGCTTGAGTT | TCGCAATCTC | 600 |
| ACCACCTGTA | ACACCAATAC | ACGTGTGTCC | CGTTACTCCA | GCACGGCCCG | TCACCGGCTC | 660 |
| CGCCGAGGGG | CCGACGGGAC | TGCGGAGCTG | ACCACAACTG | CAGCCACCAAG | GTTCATGAAA | 720 |
| | | | | | | |
| GATCTCCACT | TTACCGGCCT | TAATGGGGTA | GGTGAAGTCG | GCCGGGGAT | AGCTCTAACAA | 780 |
| TTACTTAACC | TTGCTGACAC | GCTCCTCGGC | GGGCTCCCGA | CAGAATTAAT | TTCGTCGGCT | 840 |
| GGCGGGCAAC | TGTTTATTTC | CCGCCCCGTT | GTCTCAGCCA | ATGGCGAGCC | AACCGTGAAG | 900 |
| CTCTATACAT | CAGTGGAGAA | TGCTCAGCAG | GATAAGGGTG | TTGCTATCCC | CCACGATATC | 960 |
| CATCTTGGTG | ATTCGCGTGT | GGTCATTCAAG | GATTATGACA | ACCAGCATGA | GCAGGATCGG | 1020 |
| CCCACCCCGT | CGCCTGCGCC | ATCTCGGCCT | TTTCTGTTC | TCCGAGCAA | TGATGTACTT | 1080 |
| TGGCTGTCCC | TCACTGCAGC | CGAGTATGAC | CAGTCCACTT | ACGGGTCGTC | AACTGGCCCG | 1140 |
| GTTTATATCT | CGGACAGCGT | GACTTTGGTG | AATGTTGCGA | CTGGCGCGCA | GGCCGTAGCC | 1200 |
| CGATCGCTTG | ACTGGTCAA | AGTCACCCCTC | GACGGGCGGC | CCCTCCCGAC | TGTTGAGCAA | 1260 |
| TATTCCAAGA | CATTCTTTGT | GCTCCCCCTT | CGTGGCAAGC | TCTCCTTTG | GGAGGCCGGC | 1320 |
| ACAACAAAAG | CAGGTTATCC | TTATAATTAT | AATACTACTG | CTAGTGACCA | GATTCTGATT | 1380 |
| GAAAAATGCTG | CCGGCCATCG | GGTCGCCATT | TCAACCTATA | CCACCAGGCT | TGGGGCCGGT | 1440 |

| | | | | | | |
|------------|-------------|-------------|------------|------------|------------|------|
| CCGGTCGCCA | TTTCTGCGGC | CGCGGTTTG | GCTCCACGCT | CCGCCCTGGC | TCTGCTGGAG | 1500 |
| GATACTTTG | ATTATCCGGG | GCAGGGCGCAC | ACATTTGATG | ACTTCTGCC | TGAATGCCGC | 1560 |
| GCTTTAGGCC | TCCAGGGTTG | TGCTTCCAG | TCAACTGTCG | CTGAGCTCCA | GCGCCTTAAA | 1620 |
| GTAAAGGTGG | GTAAAACCTCG | GGAGTTG | | | | 1647 |

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 5:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 984 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: doppelt
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
- (iii) HYPOTHETISCH: Nein
- (vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE:
 - (C) INDIVIDUELLES ISOLAT: Hepatitis-E-Virus- (Burma-Stamm) SG3-Region
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 5:

| | | | | | | |
|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| GGTGC GGACG | GGACTGCCGA | GCTCACCA | ACGGCTGCTA | CCCCGTTTAT | GAAGGACCTC | 60 |
| TATTTTACTA | GTACTAATGG | TGTCGGTGAG | ATCGGCCGCG | GGATAGCCCT | CACCCCTGTT | 120 |
| AACCTTGCTG | ACACTCTGCT | TGGCGGCCTG | CCGACAGAAT | TGATTTGTC | GGCTGGTGGC | 180 |
| CAGCTGTTCT | ACTCCCGTCC | CGTTGTC | TCA | GCCAA | TGGCGACTGT | 240 |
| ACATCTGTAG | AGAATGCTCA | GCAGGATAAG | GGTATTGCAA | TCCC | CATGACCTC | 300 |
| GGAGAATCTC | GTGTGGTTAT | TCAGGATTAT | GATAACCAAC | ATGAACAAGA | TGGGCCGACG | 360 |
| CCTTCTCCAG | CCCCATCGCG | CCCTTCTCT | GTCCTTCGAG | CTAATGATGT | GCTTGGCTC | 420 |
| TCTCTCACCG | CTGCCGAGTA | TGACCAGTCC | ACTTATGGCT | CTTCGACTGG | CCCAGTTTAT | 480 |

| | | | | | | |
|------------|-------------|------------|------------|------------|-------------|-----|
| GTTTCTGACT | CTGTGACCTT | GGTTAACGTT | GCGACCGGCG | CGCAGGCCGT | TGCCCCGGTCG | 540 |
| CTCGATTGGA | CCAAGGTCAC | ACTTGACGGT | CGCCCCCTCT | CCACCATCCA | GCAGTACTCG | 600 |
| AAGACCTTCT | TTGTCCCTGCC | GCTCCGCGGT | AAGCTCTCTT | TCTGGGAGGC | AGGCACAACT | 660 |
| AAAGCCGGGT | ACCCTTATAA | TTATAACACC | ACTGCTAGCG | ACCAACTGCT | TGTCGAGAAT | 720 |
| GCCGCCGGGC | ACCGGGTCGC | TATTTCCACT | TACACCACTA | GCCTGGGTGC | TGGTCCCCTC | 780 |
| TCCATTTCTG | CGGTTGCCGT | TTTAGCCCCC | CACTCTGCAC | TAGCATTGCT | TGAGGATACC | 840 |
| TTGGACTACC | CTGCCCGCGC | CCATACTTTT | GATGATTCT | GCCCAGAGTG | CCGCCCCCTT | 900 |
| GGCCTTCAGG | GCTGCCCTTT | CCAGTCTACT | GTCGCTGAGC | TTCAGCGCCT | TAAGATGAAG | 960 |
| GTGGGTAAAA | CTCGGGAGTT | GTAG | | | | 984 |

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 6:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 984 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: doppelt
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: Nein

(vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE:

- (C) INDIVIDUELLES ISOLAT: Hepatitis-E-Virus- (Mexiko-Stamm) SG3-Region

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 6:

| | | | | | | |
|------------|------------|-------------|-------------|------------|------------|-----|
| GGGGCCGACG | GGACTGCGGA | GCTGACCAACA | ACTGCAGCCA | CCAGGTTCAT | GAAAGATCTC | 60 |
| CACTTTACCG | GCCTTAATGG | GGTAGGTGAA | GTCGGCCGCG | GGATAGCTCT | AACATTACTT | 120 |
| AACCTTGCTG | ACACGCTCCT | CGGCGGGCTC | CCGACAGAAAT | TAATTTGTC | GGCTGGCGGG | 180 |
| CAACTGTTT | ATTCCCGCCC | GGTTGTCTCA | GCCAATGGCG | AGCCAACCGT | GAAGCTCTAT | 240 |
| ACATCAGTGG | AGAATGCTCA | GCAGGATAAG | GGTGTGCTA | TCCCCCACGA | TATCGATCTT | 300 |
| GGTGATTCGC | GTGTGGTCAT | TCAGGATTAT | GACAAACCAGC | ATGAGCAGGA | TCGGCCCACC | 360 |
| CCGTCGCCTG | CGCCATCTCG | GCCTTTTCT | GTTCTCCGAG | CAAATGATGT | ACTTTGGCTG | 420 |
| TCCCTCACTG | CAGCCGAGTA | TGACCAGTCC | ACTTACGGGT | CGTCAACTGG | CCCGGTTTAT | 480 |
| ATCTCGGACA | GCGTGACTTT | GGTGAATGTT | GCGACTGGCG | CGCAGGCCGT | AGCCCGATCG | 540 |
| CTTGACTGGT | CCAAAGTCAC | CCTCGACGGG | CGGCCCCCTCC | CGACTGTTGA | GCAATATTCC | 600 |

| | |
|--|-----|
| AAGACATTCT TTGTGCTCCC CCTTCGTGGC AAGCTCTCCT TTTGGGAGGC CGGCACAAACA | 660 |
| AAAGCAGGTT ATCCTTATAAA TTATAATACT ACTGCTAGTG ACCAGATTCT GATTGAAAAT | 720 |
| GCTGCCGGCC ATCGGGTCGC CATTCAACC TATACCACCA GGCTTGGGGC CGGTCCGGTC | 780 |
| GCCATTCTG CGGCCGCGGT TTTGGCTCCA CGCTCCGCC CGGCTCTGCT GGAGGATACT | 840 |
| TTTGATTATC CGGGGCGGGC GCACACATTT GATGACTTCT GCCCTGAATG CCGCGCTTTA | 900 |

| | |
|---|-----|
| GGCCTCCAGG GTTGTGCTTT CCAGTCAACT GTCGCTGAGC TCCAGGCCCT TAAAGTTAAG | 960 |
| GTGGGTAAAA CTCGGGAGTT GTAG | 984 |

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 7:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 147 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: doppelt
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
- (iii) HYPOTHETISCH: Nein
- (vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE:
 - (C) INDIVIDUELLES ISOLAT: Hepatitis-E-Virus- (Burma-Stamm) 406.3-2
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 7:

| | |
|---|-----|
| ACCTTGGACT ACCCTGCCCG CGCCCATACT TTTGATGATT TCTGCCAGA GTGCCGCC | 60 |
| CTTGGCCTTC AGGGCTGCAG TTTCCAGTCT ACTGTCGCTG AGCTTCAGCG CCTTAAGATG | 120 |
| AAGGTGGGTA AAACTCGGGA GTTGTAG | 147 |

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 8:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 147 Basenpaare

- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: doppelt
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: Nein

(vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE:

(C) INDIVIDUELLES ISOLAT: Hepatitis-E-Virus- (Mexiko-Stamm) 406.3-2

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 8:

| | | | | | | |
|----------------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| ACTTTGATT ATCCGGGGCG | GGCGCACACA | TTTGATGACT | TCTGCCCTGA | ATGCCGCGCT | 60 | |
| TTAGGCCTCC | AGGGTTGTGC | TTTCCAGTCA | ACTGTCGCTG | AGCTCCAGCG | CCTTAAAGTT | 120 |
| AAGGTGGGTA | AAACTCGGGA | GTTGTAG | | | | 147 |

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 9:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 372 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: doppelt
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: Nein

(vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE:

(C) INDIVIDUELLES ISOLAT: Hepatitis-E-Virus- (Burma-Stamm) ORF-3-Region

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 9:

| | | | | | | |
|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| ATGAATAACA | TGTCTTTGC | TGCGCCCAG | GGTCGCGAC | CATGCGCCCT | CGGCCTATTT | 60 |
| TGTTGCTGCT | CCTCATGTTT | TTGCCTATGC | TGCCCGCGCC | ACCGCCCGGT | CAGCCGTCTG | 120 |
| GCCGCCGTG | TGGGCGGCGC | AGCGGCGGTT | CCGGCGGTGG | TTTCTGGGGT | GACCGGGTTG | 180 |
| ATTCTCAGCC | CTTCGCAATC | CCCTATATTC | ATCCAACCAA | CCCCTTCGCC | CCCGATGTCA | 240 |
| CCGCTGCGGC | CGGGGCTGGA | CCTCGTGTTC | GCCAACCCGC | CCGACCACTC | GGCTCCGCTT | 300 |
| GGCGTGACCA | GGCCCAGCGC | CCCGCCGTTG | CCTCACGTG | TAGACCTACC | ACAGCTGGGG | 360 |
| CCCGCGCCGCT | AA | | | | | 372 |

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 10:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 372 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: doppelt

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: Nein

(vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE:

(C) INDIVIDUELLES ISOLAT: Hepatitis-E-Virus- (Mexiko-Stamm) ORF-3-Region

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 10:

| | | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| ATGAATAACA | TGTGGTTTGC | TGCGCCCATG | GGTTGCCAC | CATGCCCT | AGGCCTCTT | 60 |
| TGCTGTTGTT | CCTCTTGT | CTGCCTATGT | TGCCCGCGCC | ACCGACCGGT | CAGCCGTCTG | 120 |
| GCCGCCGTG | TGGGCGGCGC | AGCGGCGGTA | CCGGCGGTGG | TTTCTGGGT | GACCGGGTTG | 180 |
| ATTCTCAGCC | CTTCGCAATC | CCCTATATT | ATCCAACCAA | CCCCTTGCC | CCAGACGTTG | 240 |
| CCGCTGCGTC | CGGGTCTGGA | CCTCGCCTTC | GCCAACCAGC | CCGGCCACTT | GGCTCCACTT | 300 |
| GGCGAGATCA | GGCCCAGCGC | CCCTCCGCTG | CCTCCCGTGG | CCGACCTGCC | ACAGCCGGGG | 360 |
| CTGCGGCGCT | GA | | | | | 372 |

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 11:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 99 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: doppelt

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: Nein

(vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE:

(C) INDIVIDUELLES ISOLAT: Hepatitis-E-Virus- (Burma-Stamm) 406.4-2-Region

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 11:

| | | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|----|
| GCCAACCCGC | CCGACCACTC | GGCTCCGCTT | GGCGTGACCA | GGCCCAGCGC | CCCGCCGTTG | 60 |
| CCTCACGTG | TAGACCTACC | ACAGCTGGGG | CCGCGCCCGC | | | 99 |

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 12:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 99 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: doppelt

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: Nein

(vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE:

(C) INDIVIDUELLES ISOLAT: Hepatitis-E-Virus- (Mexiko-Stamm) 406.4-2-Region

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 12:

| | |
|--|----|
| GCCAAACCAGC CCGGCCACTT GGCTCCACTT GGCGAGATCA GGCCCAGCGC CCCTCCGCTG | 60 |
| CCTCCCCGTCG CCGACCTGCC ACAGCCGGGG CTGCGGCGC | 99 |

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 13:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 660 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYPO: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: Nein

(vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE:

(C) INDIVIDUELLES ISOLAT: Hepatitis-E-Virus- (Burma-Stamm) ORF-2

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 13:

| | |
|---|--|
| Met Arg Pro Arg Pro Ile Leu Leu Leu Leu Met Phe Leu Pro Met | |
| 1 5 10 15 | |
| Leu Pro Ala Pro Pro Pro Gly Gln Pro Ser Gly Arg Arg Arg Gly Arg | |
| 20 25 30 | |
| Arg Ser Gly Gly Ser Gly Gly Phe Trp Gly Asp Arg Val Asp Ser | |
| 35 40 45 | |
| Gln Pro Phe Ala Ile Pro Tyr Ile His Pro Thr Asn Pro Phe Ala Pro | |
| 50 55 60 | |
| Asp Val Thr Ala Ala Ala Gly Ala Gly Pro Arg Val Arg Gln Pro Ala | |
| 65 70 75 80 | |
| Arg Pro Leu Gly Ser Ala Trp Arg Asp Gln Ala Gln Arg Pro Ala Val | |
| 85 90 95 | |
| Ala Ser Arg Arg Arg Pro Thr Thr Ala Gly Ala Ala Pro Leu Thr Ala | |
| 100 105 110 | |
| Val Ala Pro Ala His Asp Thr Pro Pro Val Pro Asp Val Asp Ser Arg | |
| 115 120 125 | |
| Gly Ala Ile Leu Arg Arg Gln Tyr Asn Leu Ser Thr Ser Pro Leu Thr | |
| 130 135 140 | |
| Ser Ser Val Ala Thr Gly Thr Asn Leu Val Leu Tyr Ala Ala Pro Leu | |
| 145 150 155 160 | |
| Ser Pro Leu Leu Pro Leu Gln Asp Gly Thr Asn Thr His Ile Met Ala | |
| 165 170 175 | |
| Thr Glu Ala Ser Asn Tyr Ala Gln Tyr Arg Val Ala Arg Ala Thr Ile | |
| 180 185 190 | |
| Arg Tyr Arg Pro Leu Val Pro Asn Ala Val Gly Gly Tyr Ala Ile Ser | |
| 195 200 205 | |

Ile Ser Phe Trp Pro Gln Thr Thr Thr Pro Thr Ser Val Asp Met
 210 215 220
 Asn Ser Ile Thr Ser Thr Asp Val Arg Ile Leu Val Gln Pro Gly Ile
 225 230 235 240
 Ala Ser Glu Leu Val Ile Pro Ser Glu Arg Leu His Tyr Arg Asn Gln
 245 250 255
 Gly Trp Arg Ser Val Glu Thr Ser Gly Val Ala Glu Glu Ala Thr
 260 265 270
 Ser Gly Leu Val Met Leu Cys Ile His Gly Ser Leu Val Asn Ser Tyr
 275 280 285
 Thr Asn Thr Pro Tyr Thr Gly Ala Leu Gly Leu Leu Asp Phe Ala Leu
 290 295 300
 Glu Leu Glu Phe Arg Asn Leu Thr Pro Gly Asn Thr Asn Thr Arg Val
 305 310 315 320
 Ser Arg Tyr Ser Ser Thr Ala Arg His Arg Leu Arg Arg Gly Ala Asp
 325 330 335
 Gly Thr Ala Glu Leu Thr Thr Ala Ala Thr Arg Phe Met Lys Asp
 340 345 350
 Leu Tyr Phe Thr Ser Thr Asn Gly Val Gly Glu Ile Gly Arg Gly Ile
 355 360 365
 Ala Leu Thr Leu Phe Asn Leu Ala Asp Thr Leu Leu Gly Gly Leu Pro
 370 375 380
 Thr Glu Leu Ile Ser Ser Ala Gly Gly Gln Leu Phe Tyr Ser Arg Pro
 385 390 395 400
 Val Val Ser Ala Asn Gly Glu Pro Thr Val Lys Leu Tyr Thr Ser Val
 405 410 415
 Glu Asn Ala Gln Gln Asp Lys Gly Ile Ala Ile Pro His Asp Ile Asp
 420 425 430
 Leu Gly Glu Ser Arg Val Val Ile Gln Asp Tyr Asp Asn Gln His Glu
 435 440 445
 Gln Asp Arg Pro Thr Pro Ser Pro Ala Pro Ser Arg Pro Phe Ser Val
 450 455 460
 Leu Arg Ala Asn Asp Val Leu Trp Leu Ser Leu Thr Ala Ala Glu Tyr
 465 470 475 480
 Asp Gln Ser Thr Tyr Gly Ser Ser Thr Gly Pro Val Tyr Val Ser Asp
 485 490 495
 Ser Val Thr Leu Val Asn Val Ala Thr Gly Ala Gln Ala Val Ala Arg
 500 505 510
 Ser Leu Asp Trp Thr Lys Val Thr Leu Asp Gly Arg Pro Leu Ser Thr
 515 520 525
 Ile Gln Gln Tyr Ser Lys Thr Phe Phe Val Leu Pro Leu Arg Gly Lys
 530 535 540

Leu Ser Phe Trp Glu Ala Gly Thr Thr Lys Ala Gly Tyr Pro Tyr Asn
 545 550 555 560
 Tyr Asn Thr Thr Ala Ser Asp Gln Leu Leu Val Glu Asn Ala Ala Gly
 565 570 575
 His Arg Val Ala Ile Ser Thr Tyr Thr Ser Leu Gly Ala Gly Pro
 580 585 590
 Val Ser Ile Ser Ala Val Ala Val Leu Ala Pro His Ser Ala Leu Ala
 595 600 605
 Leu Leu Glu Asp Thr Leu Asp Tyr Pro Ala Arg Ala His Thr Phe Asp
 610 615 620
 Asp Phe Cys Pro Glu Cys Arg Pro Leu Gly Leu Gln Gly Cys Ala Phe
 625 630 635 640
 Gln Ser Thr Val Ala Glu Leu Gln Arg Leu Lys Met Lys Val Gly Lys
 645 650 655
 Thr Arg Glu Leu
 660

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 14:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 660 Aminosäuren
 - (B) TYP: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Protein
- (iii) HYPOTHETISCH: Nein
- (vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE:
 - (C) INDIVIDUELLES ISOLAT: Hepatitis-E-Virus- (Mexiko-Stamm) ORF-2
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 14:

Met Arg Pro Arg Pro Leu Leu Leu Phe Leu Leu Phe Leu Pro Met
 1 5 10 15
 Leu Pro Ala Pro Pro Thr Gly Gln Pro Ser Gly Arg Arg Arg Gly Arg
 20 25 30
 Arg Ser Gly Gly Thr Gly Gly Phe Trp Gly Asp Arg Val Asp Ser
 35 40 45

Gln Pro Phe Ala Ile Pro Tyr Ile His Pro Thr Asn Pro Phe Ala Pro
 50 55 60
 Asp Val Ala Ala Ala Ser Gly Ser Gly Pro Arg Leu Arg Gln Pro Ala
 65 70 75 80
 Arg Pro Leu Gly Ser Thr Trp Arg Asp Gln Ala Gln Arg Pro Ser Ala
 85 90 95
 Ala Ser Arg Arg Arg Pro Ala Thr Ala Gly Ala Ala Ala Leu Thr Ala
 100 105 110
 Val Ala Pro Ala His Asp Thr Ser Pro Val Pro Asp Val Asp Ser Arg
 115 120 125
 Gly Ala Ile Leu Arg Arg Gln Tyr Asn Leu Ser Thr Ser Pro Leu Thr
 130 135 140
 Ser Ser Val Ala Ser Gly Thr Asn Leu Val Leu Tyr Ala Ala Pro Leu
 145 150 155 160
 Asn Pro Pro Leu Pro Leu Gln Asp Gly Thr Asn Thr His Ile Met Ala
 165 170 175
 Thr Glu Ala Ser Asn Tyr Ala Gln Tyr Arg Val Ala Arg Ala Thr Ile
 180 185 190
 Arg Tyr Arg Pro Leu Val Pro Asn Ala Val Gly Gly Tyr Ala Ile Ser
 195 200 205
 Ile Ser Phe Trp Pro Gln Thr Thr Thr Pro Thr Ser Val Asp Met
 210 215 220
 Asn Ser Ile Thr Ser Thr Asp Val Arg Ile Leu Val Gln Pro Gly Ile
 225 230 235 240
 Ala Ser Glu Leu Val Ile Pro Ser Glu Arg Leu His Tyr Arg Asn Gln
 245 250 255
 Gly Trp Arg Ser Val Glu Thr Ser Gly Val Ala Glu Glu Glu Ala Thr
 260 265 270
 Ser Gly Leu Val Met Leu Cys Ile His Gly Ser Pro Val Asn Ser Tyr
 275 280 285
 Thr Asn Thr Pro Tyr Thr Gly Ala Leu Gly Leu Leu Asp Phe Ala Leu
 290 295 300
 Glu Leu Glu Phe Arg Asn Leu Thr Thr Cys Asn Thr Asn Thr Arg Val
 305 310 315 320
 Ser Arg Tyr Ser Ser Thr Ala Arg His Arg Leu Arg Arg Gly Ala Asp
 325 330 335
 Gly Thr Ala Glu Leu Thr Thr Ala Ala Thr Arg Phe Met Lys Asp
 340 345 350
 Leu His Phe Thr Gly Leu Asn Gly Val Gly Glu Val Gly Arg Gly Ile
 355 360 365
 Ala Leu Thr Leu Leu Asn Leu Ala Asp Thr Leu Leu Gly Gly Leu Pro
 370 375 380
 Thr Glu Leu Ile Ser Ser Ala Gly Gly Gln Leu Phe Tyr Ser Arg Pro
 385 390 395 400
 Val Val Ser Ala Asn Gly Glu Pro Thr Val Lys Leu Tyr Thr Ser Val

| | | |
|---|-----|-----|
| 405 | 410 | 415 |
| Glu Asn Ala Gln Gln Asp Lys Gly Val Ala Ile Pro His Asp Ile Asp | | |
| 420 | 425 | 430 |
| Leu Gly Asp Ser Arg Val Val Ile Gln Asp Tyr Asp Asn Gln His Glu | | |
| 435 | 440 | 445 |
| Gln Asp Arg Pro Thr Pro Ser Pro Ala Pro Ser Arg Pro Phe Ser Val | | |
| 450 | 455 | 460 |
| Leu Arg Ala Asn Asp Val Leu Trp Leu Ser Leu Thr Ala Ala Glu Tyr | | |
| 465 | 470 | 475 |
| Asp Gln Ser Thr Tyr Gly Ser Ser Thr Gly Pro Val Tyr Ile Ser Asp | | |
| 485 | 490 | 495 |
| Ser Val Thr Leu Val Asn Val Ala Thr Gly Ala Gln Ala Val Ala Arg | | |
| 500 | 505 | 510 |
| Ser Leu Asp Trp Ser Lys Val Thr Leu Asp Gly Arg Pro Leu Pro Thr | | |
| 515 | 520 | 525 |
| Val Glu Gln Tyr Ser Lys Thr Phe Phe Val Leu Pro Leu Arg Gly Lys | | |
| 530 | 535 | 540 |
| Leu Ser Phe Trp Glu Ala Gly Thr Thr Lys Ala Gly Tyr Pro Tyr Asn | | |
| 545 | 550 | 555 |
| Tyr Asn Thr Thr Ala Ser Asp Gln Ile Leu Ile Glu Asn Ala Ala Gly | | |
| 565 | 570 | 575 |
| His Arg Val Ala Ile Ser Thr Tyr Thr Arg Leu Gly Ala Gly Pro | | |
| 580 | 585 | 590 |
| Val Ala Ile Ser Ala Ala Ala Val Leu Ala Pro Arg Ser Ala Leu Ala | | |
| 595 | 600 | 605 |
| Leu Leu Glu Asp Thr Phe Asp Tyr Pro Gly Arg Ala His Thr Phe Asp | | |
| 610 | 615 | 620 |
| Asp Phe Cys Pro Glu Cys Arg Ala Leu Gly Leu Gln Gly Cys Ala Phe | | |
| 625 | 630 | 635 |
| 640 | | |
| Gln Ser Thr Val Ala Glu Leu Gln Arg Leu Lys Val Lys Val Gly Lys | | |
| 645 | 650 | 655 |
| Thr Arg Glu Leu | | |
| 660 | | |

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 15:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 549 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: Nein

(vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE:

- (C) INDIVIDUELLES ISOLAT: Hepatitis-E-Virus- (Burma-Stamm) r62kDa, Figur 4

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 15:

Ala Val Ala Pro Ala His Asp Thr Pro Pro Val Pro Asp Val Asp Ser
 1 5 10 15

Arg Gly Ala Ile Leu Arg Arg Gln Tyr Asn Leu Ser Thr Ser Pro Leu
 20 25 30

Thr Ser Ser Val Ala Thr Gly Thr Asn Leu Val Leu Tyr Ala Ala Pro
 35 40 45

Leu Ser Pro Leu Leu Pro Leu Gln Asp Gly Thr Asn Thr His Ile Met
 50 55 60

Ala Thr Glu Ala Ser Asn Tyr Ala Gln Tyr Arg Val Ala Arg Ala Thr
 65 70 75 80

Ile Arg Tyr Arg Pro Leu Val Pro Asn Ala Val Gly Gly Tyr Ala Ile
 85 90 95

Ser Ile Ser Phe Trp Pro Gln Thr Thr Thr Pro Thr Ser Val Asp
 100 105 110

Met Asn Ser Ile Thr Ser Thr Asp Val Arg Ile Leu Val Gln Pro Gly
 115 120 125

Ile Ala Ser Glu Leu Val Ile Pro Ser Glu Arg Leu His Tyr Arg Asn
 130 135 140

Gln Gly Trp Arg Ser Val Glu Thr Ser Gly Val Ala Glu Glu Glu Ala
 145 150 155 160

Thr Ser Gly Leu Val Met Leu Cys Ile His Gly Ser Leu Val Asn Ser
 165 170 175

Tyr Thr Asn Thr Pro Tyr Thr Gly Ala Leu Gly Leu Leu Asp Phe Ala
 180 185 190

Leu Glu Leu Glu Phe Arg Asn Leu Thr Pro Gly Asn Thr Asn Thr Arg
 195 200 205

Val Ser Arg Tyr Ser Ser Thr Ala Arg His Arg Leu Arg Arg Gly Ala
 210 215 220

Asp Gly Thr Ala Glu Leu Thr Thr Ala Ala Thr Arg Phe Met Lys
 225 230 235 240

Asp Leu Tyr Phe Thr Ser Thr Asn Gly Val Gly Glu Ile Gly Arg Gly
 245 250 255

Ile Ala Leu Thr Leu Phe Asn Leu Ala Asp Thr Leu Leu Gly Gly Leu
 260 265 270

Pro Thr Glu Leu Ile Ser Ser Ala Gly Gly Gln Leu Phe Tyr Ser Arg
 275 280 285

Pro Val Val Ser Ala Asn Gly Glu Pro Thr Val Lys Leu Tyr Thr Ser
 290 295 300

Val Glu Asn Ala Gln Gln Asp Lys Gly Ile Ala Ile Pro His Asp Ile
 305 310 315 320

Asp Leu Gly Glu Ser Arg Val Val Ile Gln Asp Tyr Asp Asn Gln His
 325 330 335

Glu Gln Asp Arg Pro Thr Pro Ser Pro Ala Pro Ser Arg Pro Phe Ser
 340 345 350

Val Leu Arg Ala Asn Asp Val Leu Trp Leu Ser Leu Thr Ala Ala Glu
 355 360 365
 Tyr Asp Gln Ser Thr Tyr Gly Ser Ser Thr Gly Pro Val Tyr Val Ser
 370 375 380
 Asp Ser Val Thr Leu Val Asn Val Ala Thr Gly Ala Gln Ala Val Ala
 385 390 395 400
 Arg Ser Leu Asp Trp Thr Lys Val Thr Leu Asp Gly Arg Pro Leu Ser
 405 410 415
 Thr Ile Gln Gln Tyr Ser Lys Thr Phe Phe Val Leu Pro Leu Arg Gly
 420 425 430
 Lys Leu Ser Phe Trp Glu Ala Gly Thr Thr Lys Ala Gly Tyr Pro Tyr
 435 440 445
 Asn Tyr Asn Thr Thr Ala Ser Asp Gln Leu Leu Val Glu Asn Ala Ala
 450 455 460
 Gly His Arg Val Ala Ile Ser Thr Tyr Thr Ser Leu Gly Ala Gly
 465 470 475 480
 Pro Val Ser Ile Ser Ala Val Ala Val Leu Ala Pro His Ser Ala Leu
 485 490 495
 Ala Leu Leu Glu Asp Thr Leu Asp Tyr Pro Ala Arg Ala His Thr Phe
 500 505 510
 Asp Asp Phe Cys Pro Glu Cys Arg Pro Leu Gly Leu Gln Gly Cys Ala
 515 520 525
 Phe Gln Ser Thr Val Ala Glu Leu Gln Arg Leu Lys Met Lys Val Gly
 530 535 540
 Lys Thr Arg Glu Leu
 545

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 16:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 549 Aminosäuren
 - (B) TYP: Aminosäure
 - (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: Nein

(vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE:

(C) INDIVIDUELLES ISOLAT: Hepatitis-E-Virus- (Mexiko-Stamm) r62kDa, Figur 4

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 16:

Ala Val Ala Pro Ala His Asp Thr Ser Pro Val Pro Asp Val Asp Ser
 1 5 10 15

Arg Gly Ala Ile Leu Arg Arg Gln Tyr Asn Leu Ser Thr Ser Pro Leu
 20 25 30

Thr Ser Ser Val Ala Ser Gly Thr Asn Leu Val Leu Tyr Ala Ala Pro
 35 40 45

-

Leu Asn Pro Pro Leu Pro Leu Gln Asp Gly Thr Asn Thr His Ile Met
 50 55 60

Ala Thr Glu Ala Ser Asn Tyr Ala Gln Tyr Arg Val Ala Arg Ala Thr
 65 70 75 80

Ile Arg Tyr Arg Pro Leu Val Pro Asn Ala Val Gly Gly Tyr Ala Ile
 85 90 95

Ser Ile Ser Phe Trp Pro Gln Thr Thr Thr Pro Thr Ser Val Asp
 100 105 110

Met Asn Ser Ile Thr Ser Thr Asp Val Arg Ile Leu Val Gln Pro Gly
 115 120 125

Ile Ala Ser Glu Leu Val Ile Pro Ser Glu Arg Leu His Tyr Arg Asn
 130 135 140

Gln Gly Trp Arg Ser Val Glu Thr Ser Gly Val Ala Glu Glu Ala
 145 150 155 160

Thr Ser Gly Leu Val Met Leu Cys Ile His Gly Ser Pro Val Asn Ser
 165 170 175

Tyr Thr Asn Thr Pro Tyr Thr Gly Ala Leu Gly Leu Leu Asp Phe Ala
 180 185 190

Leu Glu Leu Glu Phe Arg Asn Leu Thr Thr Cys Asn Thr Asn Thr Arg
 195 200 205

Val Ser Arg Tyr Ser Ser Thr Ala Arg His Arg Leu Arg Arg Gly Ala
 210 215 220

Asp Gly Thr Ala Glu Leu Thr Thr Ala Ala Thr Arg Phe Met Lys
 225 230 235 240

Asp Leu His Phe Thr Gly Leu Asn Gly Val Gly Glu Val Gly Arg Gly
 245 250 255

Ile Ala Leu Thr Leu Leu Asn Leu Ala Asp Thr Leu Leu Gly Gly Leu
 260 265 270

Pro Thr Glu Leu Ile Ser Ser Ala Gly Gly Gln Leu Phe Tyr Ser Arg
 275 280 285

Pro Val Val Ser Ala Asn Gly Glu Pro Thr Val Lys Leu Tyr Thr Ser
 290 295 300

Val Glu Asn Ala Gln Gln Asp Lys Gly Val Ala Ile Pro His Asp Ile
 305 310 315 320

Asp Leu Gly Asp Ser Arg Val Val Ile Gln Asp Tyr Asp Asn Gln His
 325 330 335

Glu Gln Asp Arg Pro Thr Pro Ser Pro Ala Pro Ser Arg Pro Phe Ser
 340 345 350

Val Leu Arg Ala Asn Asp Val Leu Trp Leu Ser Leu Thr Ala Ala Glu
 355 360 365

Tyr Asp Gln Ser Thr Tyr Gly Ser Ser Thr Gly Pro Val Tyr Ile Ser
 370 375 380

Asp Ser Val Thr Leu Val Asn Val Ala Thr Gly Ala Gln Ala Val Ala
 385 390 395 400

Arg Ser Leu Asp Trp Ser Lys Val Thr Leu Asp Gly Arg Pro Leu Pro

405 410 415

Thr Val Glu Gln Tyr Ser Lys Thr Phe Phe Val Leu Pro Leu Arg Gly
 420 425 430

Lys Leu Ser Phe Trp Glu Ala Gly Thr Thr Lys Ala Gly Tyr Pro Tyr
 435 440 445

Asn Tyr Asn Thr Thr Ala Ser Asp Gln Ile Leu Ile Glu Asn Ala Ala
 450 455 460

Gly His Arg Val Ala Ile Ser Thr Tyr Thr Arg Leu Gly Ala Gly
 465 470 475 480

Pro Val Ala Ile Ser Ala Ala Val Leu Ala Pro Arg Ser Ala Leu
 485 490 495

Ala Leu Leu Glu Asp Thr Phe Asp Tyr Pro Gly Arg Ala His Thr Phe
 500 505 510

Asp Asp Phe Cys Pro Glu Cys Arg Ala Leu Gly Leu Gln Gly Cys Ala
 515 520 525

Phe Gln Ser Thr Val Ala Glu Leu Gln Arg Leu Lys Val Lys Val Gly
 530 535 540

Lys Thr Arg Glu Leu
 545

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 17:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 327 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: Nein

(vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE:

(C) INDIVIDUELLES ISOLAT: Hepatitis-E-Virus- (Burma-Stamm) SG3-Region

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 17:

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Ala | Asp | Gly | Thr | Ala | Glu | Leu | Thr | Thr | Thr | Ala | Ala | Thr | Arg | Phe |
| 1 | | | | | 5 | | | | 10 | | | | | 15 | |
| Met | Lys | Asp | Leu | Tyr | Phe | Thr | Ser | Thr | Asn | Gly | Val | Gly | Glu | Ile | Gly |
| | | | | 20 | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| Arg | Gly | Ile | Ala | Leu | Thr | Leu | Phe | Asn | Leu | Ala | Asp | Thr | Leu | Leu | Gly |
| | | | | | 35 | | | 40 | | | | | 45 | | |
| Gly | Leu | Pro | Thr | Glu | Leu | Ile | Ser | Ser | Ala | Gly | Gly | Gln | Leu | Phe | Tyr |
| | | | | | 50 | | 55 | | | | | 60 | | | |
| Ser | Arg | Pro | Val | Val | Ser | Ala | Asn | Gly | Glu | Pro | Thr | Val | Lys | Leu | Tyr |
| | | | | | 65 | | 70 | | | | 75 | | 80 | | |
| Thr | Ser | Val | Glu | Asn | Ala | Gln | Gln | Asp | Lys | Gly | Ile | Ala | Ile | Pro | His |
| | | | | | 85 | | | 90 | | | | 95 | | | |
| Asp | Ile | Asp | Leu | Gly | Glu | Ser | Arg | Val | Val | Ile | Gln | Asp | Tyr | Asp | Asn |
| | | | | | 100 | | | 105 | | | | 110 | | | |
| Gln | His | Glu | Gln | Asp | Arg | Pro | Thr | Pro | Ser | Pro | Ala | Pro | Ser | Arg | Pro |
| | | | | | 115 | | | 120 | | | | 125 | | | |
| Phe | Ser | Val | Leu | Arg | Ala | Asn | Asp | Val | Leu | Trp | Leu | Ser | Leu | Thr | Ala |
| | | | | | 130 | | | 135 | | | | 140 | | | |
| Ala | Glu | Tyr | Asp | Gln | Ser | Thr | Tyr | Gly | Ser | Ser | Thr | Gly | Pro | Val | Tyr |
| | | | | | 145 | | 150 | | | | 155 | | 160 | | |
| Val | Ser | Asp | Ser | Val | Thr | Leu | Val | Asn | Val | Ala | Thr | Gly | Ala | Gln | Ala |
| | | | | | 165 | | | 170 | | | | 175 | | | |
| Val | Ala | Arg | Ser | Leu | Asp | Trp | Thr | Lys | Val | Thr | Leu | Asp | Gly | Arg | Pro |
| | | | | | 180 | | | 185 | | | | 190 | | | |
| Leu | Ser | Thr | Ile | Gln | Gln | Tyr | Ser | Lys | Thr | Phe | Phe | Val | Leu | Pro | Leu |
| | | | | | 195 | | | 200 | | | | 205 | | | |

Arg Gly Lys Leu Ser Phe Trp ~~Lys~~ Ala Gly Thr Thr Lys Ala Gly Tyr
 210 215 220

Pro Tyr Asn Tyr Asn Thr Thr Ala Ser Asp Gln Leu Leu Val Glu Asn
 225 230 235 240

Ala Ala Gly His Arg Val Ala Ile Ser Thr Tyr Thr Thr Ser Leu Gly
 245 250 255

Ala Gly Pro Val Ser Ile Ser Ala Val Ala Val Leu Ala Pro His Ser
 260 265 270

Ala Leu Ala Leu Leu Glu Asp Thr Leu Asp Tyr Pro Ala Arg Ala His
 275 280 285

Thr Phe Asp Asp Phe Cys Pro Glu Cys Arg Pro Leu Gly Leu Gln Gly
 290 295 300

Cys Ala Phe Gln Ser Thr Val Ala Glu Leu Gln Arg Leu Lys Met Lys
 305 310 315 320

Val Gly Lys Thr Arg Glu Leu
 325

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 18:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 327 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: Nein

(vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE:

- (C) INDIVIDUELLES ISOLAT: Hepatitis-E-Virus- (Mexiko-Stamm) SG3-Region

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 18:

Gly Ala Asp Gly Thr Ala Glu Leu Thr Thr Thr Ala Ala Thr Arg Phe
 1 5 10 15

Met Lys Asp Leu His Phe Thr Gly Leu Asn Gly Val Gly Glu Val Gly
 20 25 30

Arg Gly Ile Ala Leu Thr Leu Leu Asn Leu Ala Asp Thr Leu Leu Gly
 35 40 45

Gly Leu Pro Thr Glu Leu Ile Ser Ser Ala Gly Gly Gln Leu Phe Tyr
 50 55 60

Ser Arg Pro Val Val Ser Ala Asn Gly Glu Pro Thr Val Lys Leu Tyr
 65 70 75 80

Thr Ser Val Glu Asn Ala Gln Gln Asp Lys Gly Val Ala Ile Pro His
 85 90 95

Asp Ile Asp Leu Gly Asp Ser Arg Val Val Ile Gln Asp Tyr Asp Asn
 100 105 110

Gln His Glu Gln Asp Arg Pro Thr Pro Ser Pro Ala Pro Ser Arg Pro
 115 120 125

Phe Ser Val Leu Arg Ala Asn Asp Val Leu Trp Leu Ser Leu Thr Ala
 130 135 140
 Ala Glu Tyr Asp Gln Ser Thr Tyr Gly Ser Ser Thr Gly Pro Val Tyr
 145 150 155 160
 Ile Ser Asp Ser Val Thr Leu Val Asn Val Ala Thr Gly Ala Gln Ala
 165 170 175
 Val Ala Arg Ser Leu Asp Trp Ser Lys Val Thr Leu Asp Gly Arg Pro
 180 185 190
 Leu Pro Thr Val Glu Gln Tyr Ser Lys Thr Phe Phe Val Leu Pro Leu
 195 200 205
 Arg Gly Lys Leu Ser Phe Trp Glu Ala Gly Thr Thr Lys Ala Gly Tyr
 210 215 220
 Pro Tyr Asn Tyr Asn Thr Thr Ala Ser Asp Gln Ile Leu Ile Glu Asn
 225 230 235 240
 Ala Ala Gly His Arg Val Ala Ile Ser Thr Tyr Thr Arg Leu Gly
 245 250 255
 Ala Gly Pro Val Ala Ile Ser Ala Ala Val Leu Ala Pro Arg Ser
 260 265 270
 Ala Leu Ala Leu Leu Glu Asp Thr Phe Asp Tyr Pro Gly Arg Ala His
 275 280 285
 Thr Phe Asp Asp Phe Cys Pro Glu Cys Arg Ala Leu Gly Leu Gln Gly
 290 295 300
 Cys Ala Phe Gln Ser Thr Val Ala Glu Leu Gln Arg Leu Lys Val Lys
 305 310 315 320
 Val Gly Lys Thr Arg Glu Leu
 325

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 19:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 33 Aminosäuren
 - (B) TYP: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Protein
- (iii) HYPOTHETISCH: Nein
- (vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE:
 - (C) INDIVIDUELLES ISOLAT: Hepatitis-E-Virus- (Burma-Stamm) 406.4-2
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 19:

```

Ala Asn Pro Pro Asp His Ser Ala Pro Leu Gly Val Thr Arg Pro Ser
1          5          10          15

Ala Pro Pro Leu Pro His Val Val Asp Leu Pro Gln Leu Gly Pro Arg
20         25          30

Arg

```

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 20:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 33 Aminosäuren
 - (B) TYP: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Protein
- (iii) HYPOTHETISCH: Nein
- (vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE:
 - (C) INDIVIDUELLES ISOLAT: Hepatitis-E-Virus- (Mexiko-Stamm) 406.4-2
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 20:

```

Ala Asn Gln Pro Gly His Leu Ala Pro Leu Gly Glu Ile Arg Pro Ser
1          5          10          15

Ala Pro Pro Leu Pro Pro Val Ala Asp Leu Pro Gln Pro Gly Leu Arg
20         25          30

Arg

```

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 21:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 124 Aminosäuren
 - (B) TYP: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Protein
- (iii) HYPOTHETISCH: Nein
- (vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE:
 - (C) INDIVIDUELLES ISOLAT: Hepatitis-E-Virus- (Burma-Stamm) ORF-3
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 21:

```

Met Asn Asn Met Ser Phe Ala Ala Pro Met Gly Ser Arg Pro Cys Ala
1          5          10          15

Leu Gly Leu Phe Cys Cys Cys Ser Ser Cys Phe Cys Leu Cys Cys Pro
20         25          30

```

```

Arg His Arg Pro Val Ser Arg Leu Ala Ala Val Val Gly Gly Ala Ala
35          40          45

Ala Val Pro Ala Val Val Ser Gly Val Thr Gly Leu Ile Leu Ser Pro
50          55          60

Ser Gln Ser Pro Ile Phe Ile Gln Pro Thr Pro Ser Pro Pro Met Ser
65          70          75          80

Pro Leu Arg Pro Gly Leu Asp Leu Val Phe Ala Asn Pro Pro Asp His
85          90          95

Ser Ala Pro Leu Gly Val Thr Arg Pro Ser Ala Pro Pro Leu Pro His
100         105         110

Val Val Asp Leu Pro Gln Leu Gly Pro Arg Arg Glx
115         120

```

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 22:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 124 Aminosäuren
 - (B) TYP: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Protein
- (iii) HYPOTHETISCH: Nein
- (vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE:
 - (C) INDIVIDUELLES ISOLAT: Hepatitis-E-Virus- (Mexiko-Stamm) ORF-3
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 22:

```

Met Asn Asn Met Trp Phe Ala Ala Pro Met Gly Ser Pro Pro Cys Ala
1          5          10          15

Leu Gly Leu Phe Cys Cys Cys Ser Ser Cys Phe Cys Leu Cys Cys Pro
20         25          30

Arg His Arg Pro Val Ser Arg Leu Ala Ala Val Val Gly Gly Ala Ala
35          40          45

Ala Val Pro Ala Val Val Ser Gly Val Thr Gly Leu Ile Leu Ser Pro
50          55          60

```

```

Ser Gln Ser Pro Ile Phe Ile Gln Pro Thr Pro Leu Pro Gln Thr Leu
65          70          75          80

Pro Leu Arg Pro Gly Leu Asp Leu Ala Phe Ala Asn Gln Pro Gly His
85          90          95

Leu Ala Pro Leu Gly Glu Ile Arg Pro Ser Ala Pro Pro Leu Pro Pro
100         105         110

Val Ala Asp Leu Pro Gln Pro Gly Leu Arg Arg Glx
115         120

```

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 23:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 48 Aminosäuren
 - (B) TYP: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Protein
- (iii) HYPOTHETISCH: Nein
- (vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE:
 - (C) INDIVIDUELLES ISOLAT: Hepatitis-E-Virus- (Burma-Stamm) 406.3-2
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 23:

```

Thr Leu Asp Tyr Pro Ala Arg Ala His Thr Phe Asp Asp Phe Cys Pro
1          5          10          15

Glu Cys Arg Pro Leu Gly Leu Gln Gly Cys Ala Phe Gln Ser Thr Val
20         25          30

Ala Glu Leu Gln Arg Leu Lys Met Lys Val Gly Lys Thr Arg Glu Leu
35         40          45

```

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 24:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 48 Aminosäuren
 - (B) TYP: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Protein
- (iii) HYPOTHETISCH: Nein

(vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE:

(C) INDIVIDUELLES ISOLAT: Hepatitis-E-Virus- (Mexiko-Stamm) 406.3-2-Region

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 24:

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Thr | Phe | Asp | Tyr | Pro | Gly | Arg | Ala | His | Thr | Phe | Asp | Asp | Phe | Cys | Pro |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| Glu | Cys | Arg | Ala | Leu | Gly | Leu | Gln | Gly | Cys | Ala | Phe | Gln | Ser | Thr | Val |
| | 20 | | | | | 25 | | | | | | | 30 | | |
| Ala | Glu | Leu | Gln | Arg | Leu | Lys | Val | Lys | Val | Gly | Lys | Thr | Arg | Glu | Leu |
| | 35 | | | | | 40 | | | | | | 45 | | | |

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 25:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 540 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: Nein

(vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE:

(C) INDIVIDUELLES ISOLAT: Hepatitis-E-Virus- (Burma-Stamm) r62kDa, 58,1 kDa

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 25:

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Val | Ala | Pro | Ala | His | Asp | Thr | Pro | Pro | Val | Pro | Asp | Val | Asp | Ser |
| 1 | | | | 5 | | | | 10 | | | | | 15 | | |
| Arg | Gly | Ala | Ile | Leu | Arg | Arg | Gln | Tyr | Asn | Leu | Ser | Thr | Ser | Pro | Leu |
| | 20 | | | | | 25 | | | | | | 30 | | | |
| Thr | Ser | Ser | Val | Ala | Thr | Gly | Thr | Asn | Leu | Val | Leu | Tyr | Ala | Ala | Pro |
| | 35 | | | | | 40 | | | | | | 45 | | | |
| Leu | Ser | Pro | Leu | Leu | Pro | Leu | Gln | Asp | Gly | Thr | Asn | Thr | His | Ile | Met |
| | 50 | | | | 55 | | | | | | 60 | | | | |
| Ala | Thr | Glu | Ala | Ser | Asn | Tyr | Ala | Gln | Tyr | Arg | Val | Ala | Arg | Ala | Thr |
| | 65 | | | | 70 | | | | 75 | | | 80 | | | |
| Ile | Arg | Tyr | Arg | Pro | Leu | Val | Pro | Asn | Ala | Val | Gly | Gly | Tyr | Ala | Ile |
| | 85 | | | | | 90 | | | | | | 95 | | | |
| Ser | Ile | Ser | Phe | Trp | Pro | Gln | Thr | Thr | Thr | Pro | Thr | Ser | Val | Asp | |
| | 100 | | | | 105 | | | | | | 110 | | | | |
| Met | Asn | Ser | Ile | Thr | Ser | Thr | Asp | Val | Arg | Ile | Leu | Val | Gln | Pro | Gly |
| | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | | | | |
| Ile | Ala | Ser | Glu | Leu | Val | Ile | Pro | Ser | Glu | Arg | Leu | His | Tyr | Arg | Asn |
| | 130 | | | | | 135 | | | | | 140 | | | | |

Gln Gly Trp Arg Ser Val Glu Thr Ser Gly Val Ala Glu Glu Ala
 145 150 155 160
 Thr Ser Gly Leu Val Met Leu Cys Ile His Gly Ser Leu Val Asn Ser
 165 170 175
 Tyr Thr Asn Thr Pro Tyr Thr Gly Ala Leu Gly Leu Leu Asp Phe Ala
 180 185 190
 Leu Glu Leu Glu Phe Arg Asn Leu Thr Pro Gly Asn Thr Asn Thr Arg
 195 200 205
 Val Ser Arg Tyr Ser Ser Thr Ala Arg His Arg Leu Arg Arg Gly Ala
 210 215 220
 Asp Gly Thr Ala Glu Leu Thr Thr Ala Ala Thr Arg Phe Met Lys
 225 230 235 240
 Asp Leu Tyr Phe Thr Ser Thr Asn Gly Val Gly Glu Ile Gly Arg Gly
 245 250 255
 Ile Ala Leu Thr Leu Phe Asn Leu Ala Asp Thr Leu Leu Gly Gly Leu
 260 265 270
 Pro Thr Glu Leu Ile Ser Ser Ala Gly Gly Gln Leu Phe Tyr Ser Arg
 275 280 285
 Pro Val Val Ser Ala Asn Gly Glu Pro Thr Val Lys Leu Tyr Thr Ser
 290 295 300
 Val Glu Asn Ala Gln Gln Asp Lys Gly Ile Ala Ile Pro His Asp Ile
 305 310 315 320
 Asp Leu Gly Glu Ser Arg Val Val Ile Gln Asp Tyr Asp Asn Gln His
 325 330 335
 Glu Gln Asp Arg Pro Thr Pro Ser Pro Ala Pro Ser Arg Pro Phe Ser
 340 345 350
 Val Leu Arg Ala Asn Asp Val Leu Trp Leu Ser Leu Thr Ala Ala Glu
 355 360 365
 Tyr Asp Gln Ser Thr Tyr Gly Ser Ser Thr Gly Pro Val Tyr Val Ser
 370 375 380
 Asp Ser Val Thr Leu Val Asn Val Ala Thr Gly Ala Gln Ala Val Ala
 385 390 395 400
 Arg Ser Leu Asp Trp Thr Lys Val Thr Leu Asp Gly Arg Pro Leu Ser
 405 410 415
 Thr Ile Gln Gln Tyr Ser Lys Thr Phe Phe Val Leu Pro Leu Arg Gly
 420 425 430
 Lys Leu Ser Phe Trp Glu Ala Gly Thr Thr Lys Ala Gly Tyr Pro Tyr
 435 440 445
 Asn Tyr Asn Thr Thr Ala Ser Asp Gln Leu Leu Val Glu Asn Ala Ala
 450 455 460

Gly His Arg Val Ala Ile Ser Thr Tyr Thr Ser Leu Gly Ala Gly
 465 470 475 480
 Pro Val Ser Ile Ser Ala Val Ala Val Leu Ala Pro His Ser Ala Leu
 485 490 495
 Ala Leu Leu Glu Asp Thr Leu Asp Tyr Pro Ala Arg Ala His Thr Phe
 500 505 510
 Asp Asp Phe Cys Pro Glu Cys Arg Pro Leu Gly Leu Gln Gly Cys Ala
 515 520 525
 Phe Gln Ser Thr Val Ala Glu Leu Gln Arg Leu Lys
 530 535 540

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 26:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 540 Aminosäuren
 - (B) TYP: Aminosäure
 - (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfache
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Protein
- (iii) HYPOTHETISCH: Nein
- (vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE:
 - (C) INDIVIDUELLES ISOLAT: Hepatitis-E-Virus- (Mexiko-Stamm) r62kDa, 58,1 kDa

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 26:

Ala Val Ala Pro Ala His Asp Thr Ser Pro Val Pro Asp Val Asp Ser
 1 5 10 15
 Arg Gly Ala Ile Leu Arg Arg Gln Tyr Asn Leu Ser Thr Ser Pro Leu
 20 25 30
 Thr Ser Ser Val Ala Ser Gly Thr Asn Leu Val Leu Tyr Ala Ala Pro
 35 40 45
 Leu Asn Pro Pro Leu Pro Leu Gln Asp Gly Thr Asn Thr His Ile Met
 50 55 60
 Ala Thr Glu Ala Ser Asn Tyr Ala Gln Tyr Arg Val Ala Arg Ala Thr
 65 70 75 80

Ile Arg Tyr Arg Pro Leu Val Pro Asn Ala Val Gly Gly Tyr Ala Ile
 85 90 95
 Ser Ile Ser Phe Trp Pro Gln Thr Thr Thr Pro Thr Ser Val Asp
 100 105 110
 Met Asn Ser Ile Thr Ser Thr Asp Val Arg Ile Leu Val Gln Pro Gly
 115 120 125
 Ile Ala Ser Glu Leu Val Ile Pro Ser Glu Arg Leu His Tyr Arg Asn
 130 135 140
 Gln Gly Trp Arg Ser Val Glu Thr Ser Gly Val Ala Glu Glu Glu Ala
 145 150 155 160
 Thr Ser Gly Leu Val Met Leu Cys Ile His Gly Ser Pro Val Asn Ser
 165 170 175
 Tyr Thr Asn Thr Pro Tyr Thr Gly Ala Leu Gly Leu Leu Asp Phe Ala
 180 185 190
 Leu Glu Leu Glu Phe Arg Asn Leu Thr Thr Cys Asn Thr Asn Thr Arg
 195 200 205
 Val Ser Arg Tyr Ser Ser Thr Ala Arg His Leu Arg Arg Gly Ala
 210 215 220
 Asp Gly Thr Ala Glu Leu Thr Thr Thr Ala Ala Thr Arg Phe Met Lys
 225 230 235 240
 Asp Leu His Phe Thr Gly Leu Asn Gly Val Gly Glu Val Gly Arg Gly
 245 250 255
 Ile Ala Leu Thr Leu Leu Asn Leu Ala Asp Thr Leu Leu Gly Gly Leu
 260 265 270
 Pro Thr Glu Leu Ile Ser Ser Ala Gly Gly Gln Leu Phe Tyr Ser Arg
 275 280 285
 Pro Val Val Ser Ala Asn Gly Glu Pro Thr Val Lys Leu Tyr Thr Ser
 290 295 300
 Val Glu Asn Ala Gln Gln Asp Lys Gly Val Ala Ile Pro His Asp Ile
 305 310 315 320
 Asp Leu Gly Asp Ser Arg Val Val Ile Gln Asp Tyr Asp Asn Gln His
 325 330 335
 Glu Gln Asp Arg Pro Thr Pro Ser Pro Ala Pro Ser Arg Pro Phe Ser
 340 345 350
 Val Leu Arg Ala Asn Asp Val Leu Trp Leu Ser Leu Thr Ala Ala Glu
 355 360 365
 Tyr Asp Gln Ser Thr Tyr Gly Ser Ser Thr Gly Pro Val Tyr Ile Ser
 370 375 380
 Asp Ser Val Thr Leu Val Asn Val Ala Thr Gly Ala Gln Ala Val Ala
 385 390 395 400
 Arg Ser Leu Asp Trp Ser Lys Val Thr Leu Asp Gly Arg Pro Leu Pro
 405 410 415
 Thr Val Glu Gln Tyr Ser Lys Thr Phe Phe Val Leu Pro Leu Arg Gly
 420 425 430
 Lys Leu Ser Phe Trp Glu Ala Gly Thr Thr Lys Ala Gly Tyr Pro Tyr

| | | |
|---|-----|-----|
| 435 | 440 | 445 |
| Asn Tyr Asn Thr Thr Ala Ser Asp Gln Ile Leu Ile Glu Asn Ala Ala | | |
| 450 | 455 | 460 |
| Gly His Arg Val Ala Ile Ser Thr Tyr Thr Arg Leu Gly Ala Gly | | |
| 465 | 470 | 475 |
| 480 | | |
| Pro Val Ala Ile Ser Ala Ala Ala Val Leu Ala Pro Arg Ser Ala Leu | | |
| 485 | 490 | 495 |
| Ala Leu Leu Glu Asp Thr Phe Asp Tyr Pro Gly Arg Ala His Thr Phe | | |
| 500 | 505 | 510 |
| Asp Asp Phe Cys Pro Glu Cys Arg Ala Leu Gly Leu Gln Gly Cys Ala | | |
| 515 | 520 | 525 |
| Phe Gln Ser Thr Val Ala Glu Leu Gln Arg Leu Lys | | |
| 530 | 535 | 540 |

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 27:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 525 Aminosäuren
 - (B) TYP: Aminosäure
 - (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfache
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Protein
- (iii) HYPOTHETISCH: Nein
- (vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE:
 - (C) INDIVIDUELLES ISOLAT: Hepatitis-E-Virus- (Burma-Stamm) r62kDa, 56,5 kDa
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 27:

Ala Val Ala Pro Ala His Asp Thr Pro Pro Val Pro Asp Val Asp Ser
 1 5 10 15

Arg Gly Ala Ile Leu Arg Arg Gln Tyr Asn Leu Ser Thr Ser Pro Leu
 20 25 30

Thr Ser Ser Val Ala Thr Gly Thr Asn Leu Val Leu Tyr Ala Ala Pro
 35 40 45

Leu Ser Pro Leu Leu Pro Leu Gln Asp Gly Thr Asn Thr His Ile Met
 50 55 60

Ala Thr Glu Ala Ser Asn Tyr Ala Gln Tyr Arg Val Ala Arg Ala Thr
 65 70 75 80

Ile Arg Tyr Arg Pro Leu Val Pro Asn Ala Val Gly Gly Tyr Ala Ile
 85 90 95

Ser Ile Ser Phe Trp Pro Gln Thr Thr Thr Pro Thr Ser Val Asp
 100 105 110

Met Asn Ser Ile Thr Ser Thr Asp Val Arg Ile Leu Val Gln Pro Gly
 115 120 125

Ile Ala Ser Glu Leu Val Ile Pro Ser Glu Arg Leu His Tyr Arg Asn
 130 135 140

Gln Gly Trp Arg Ser Val Glu Thr Ser Gly Val Ala Glu Glu Ala

145 150 155 160

Thr Ser Gly Leu Val Met Leu Cys Ile His Gly Ser Leu Val Asn Ser
 165 170 175

Tyr Thr Asn Thr Pro Tyr Thr Gly Ala Leu Gly Leu Leu Asp Phe Ala
 180 185 190

Leu Glu Leu Glu Phe Arg Asn Leu Thr Pro Gly Asn Thr Asn Thr Arg
 195 200 205

Val Ser Arg Tyr Ser Ser Thr Ala Arg His Arg Leu Arg Arg Gly Ala
 210 215 220

Asp Gly Thr Ala Glu Leu Thr Thr Thr Ala Ala Thr Arg Phe Met Lys
 225 230 235 240

Asp Leu Tyr Phe Thr Ser Thr Asn Gly Val Gly Glu Ile Gly Arg Gly
 245 250 255

Ile Ala Leu Thr Leu Phe Asn Leu Ala Asp Thr Leu Leu Gly Gly Leu
 260 265 270

Pro Thr Glu Leu Ile Ser Ser Ala Gly Gly Gln Leu Phe Tyr Ser Arg
 275 280 285

Pro Val Val Ser Ala Asn Gly Glu Pro Thr Val Lys Leu Tyr Thr Ser
 290 295 300

Val Glu Asn Ala Gln Gln Asp Lys Gly Ile Ala Ile Pro His Asp Ile
 305 310 315 320

Asp Leu Gly Glu Ser Arg Val Val Ile Gln Asp Tyr Asp Asn Gln His
 325 330 335

Glu Gln Asp Arg Pro Thr Pro Ser Pro Ala Pro Ser Arg Pro Phe Ser
 340 345 350

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Val | Leu | Arg | Ala | Asn | Asp | Val | Leu | Trp | Leu | Ser | Leu | Thr | Ala | Ala | Glu |
| 355 | | | | | | | 360 | | | | | 365 | | | |
| Tyr | Asp | Gln | Ser | Thr | Tyr | Gly | Ser | Ser | Thr | Gly | Pro | Val | Tyr | Val | Ser |
| 370 | | | | | | 375 | | | | | 380 | | | | |
| Asp | Ser | Val | Thr | Leu | Val | Asn | Val | Ala | Thr | Gly | Ala | Gln | Ala | Val | Ala |
| 385 | | | | | | 390 | | | | 395 | | | | 400 | |
| Arg | Ser | Leu | Asp | Trp | Thr | Lys | Val | Thr | Leu | Asp | Gly | Arg | Pro | Leu | Ser |
| | | | | | | | 405 | | | 410 | | | 415 | | |
| Thr | Ile | Gln | Gln | Tyr | Ser | Lys | Thr | Phe | Phe | Val | Leu | Pro | Leu | Arg | Gly |
| | | | | | | | 420 | | | 425 | | | 430 | | |
| Lys | Leu | Ser | Phe | Trp | Glu | Ala | Gly | Thr | Thr | Lys | Ala | Gly | Tyr | Pro | Tyr |
| | | | | | | | 435 | | | 440 | | | 445 | | |
| Asn | Tyr | Asn | Thr | Thr | Ala | Ser | Asp | Gln | Leu | Leu | Val | Glu | Asn | Ala | Ala |
| | | | | | | | 450 | | | 455 | | | 460 | | |
| Gly | His | Arg | Val | Ala | Ile | Ser | Thr | Tyr | Thr | Ser | Leu | Gly | Ala | Gly | |
| | | | | | | | 465 | | | 470 | | | 475 | | 480 |
| Pro | Val | Ser | Ile | Ser | Ala | Val | Ala | Val | Leu | Ala | Pro | His | Ser | Ala | Leu |
| | | | | | | | 485 | | | 490 | | | 495 | | |
| Ala | Leu | Leu | Glu | Asp | Thr | Leu | Asp | Tyr | Pro | Ala | Arg | Ala | His | Thr | Phe |
| | | | | | | | 500 | | | 505 | | | 510 | | |
| Asp | Asp | Phe | Cys | Pro | Glu | Cys | Arg | Pro | Leu | Gly | Leu | Gln | | | |
| | | | | | | | 515 | | | 520 | | | 525 | | |

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 28:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 525 Aminosäuren
 - (B) TYP: Aminosäure
 - (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Protein
- (iii) HYPOTHETISCH: Nein

(vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE:

(C) INDIVIDUELLES ISOLAT: Hepatitis-E-Virus- (Mexiko-Stamm) r62kDa, 56,5 kDa

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 28:

Ala Val Ala Pro Ala His Asp Thr Ser Pro Val Pro Asp Val Asp Ser
 1 5 10 15

Arg Gly Ala Ile Leu Arg Arg Gln Tyr Asn Leu Ser Thr Ser Pro Leu
 20 25 30

Thr Ser Ser Val Ala Ser Gly Thr Asn Leu Val Leu Tyr Ala Ala Pro
 35 40 45

Leu Asn Pro Pro Leu Pro Leu Gln Asp Gly Thr Asn Thr His Ile Met
 50 55 60

Ala Thr Glu Ala Ser Asn Tyr Ala Gln Tyr Arg Val Ala Arg Ala Thr
 65 70 75 80

Ile Arg Tyr Arg Pro Leu Val Pro Asn Ala Val Gly Gly Tyr Ala Ile
 85 90 95

Ser Ile Ser Phe Trp Pro Gln Thr Thr Thr Pro Thr Ser Val Asp
 100 105 110

Met Asn Ser Ile Thr Ser Thr Asp Val Arg Ile Leu Val Gln Pro Gly
 115 120 125

Ile Ala Ser Glu Leu Val Ile Pro Ser Glu Arg Leu His Tyr Arg Asn
 130 135 140

Gln Gly Trp Arg Ser Val Glu Thr Ser Gly Val Ala Glu Glu Ala
 145 150 155 160

Thr Ser Gly Leu Val Met Leu Cys Ile His Gly Ser Pro Val Asn Ser
 165 170 175

Tyr Thr Asn Thr Pro Tyr Thr Gly Ala Leu Gly Leu Leu Asp Phe Ala
 180 185 190

Leu Glu Leu Glu Phe Arg Asn Leu Thr Thr Cys Asn Thr Asn Thr Arg
 195 200 205

Val Ser Arg Tyr Ser Ser Thr Ala Arg His Arg Leu Arg Arg Gly Ala
 210 215 220

Asp Gly Thr Ala Glu Leu Thr Thr Ala Ala Thr Arg Phe Met Lys
 225 230 235 240

Asp Leu His Phe Thr Gly Leu Asn Gly Val Gly Glu Val Gly Arg Gly

245

250

255

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ile | Ala | Leu | Thr | Leu | Leu | Asn | Leu | Ala | Asp | Thr | Leu | Leu | Gly | Gly | Leu |
| 260 | | | | | | 265 | | | | | | 270 | | | |
| Pro | Thr | Glu | Leu | Ile | Ser | Ser | Ala | Gly | Gly | Gln | Leu | Phe | Tyr | Ser | Arg |
| 275 | | | | | | 280 | | | | | | 285 | | | |
| Pro | Val | Val | Ser | Ala | Asn | Gly | Glu | Pro | Thr | Val | Lys | Leu | Tyr | Thr | Ser |
| 290 | | | | | | 295 | | | | | 300 | | | | |
| Val | Glu | Asn | Ala | Gln | Gln | Asp | Lys | Gly | Val | Ala | Ile | Pro | His | Asp | Ile |
| 305 | | | | | 310 | | | | | 315 | | | 320 | | |
| Asp | Leu | Gly | Asp | Ser | Arg | Val | Val | Ile | Gln | Asp | Tyr | Asp | Asn | Gln | His |
| 325 | | | | | | | | | 330 | | | 335 | | | |
| Glu | Gln | Asp | Arg | Pro | Thr | Pro | Ser | Pro | Ala | Pro | Ser | Arg | Pro | Phe | Ser |
| 340 | | | | | | 345 | | | | | | 350 | | | |
| Val | Leu | Arg | Ala | Asn | Asp | Val | Leu | Trp | Leu | Ser | Leu | Thr | Ala | Ala | Glu |
| 355 | | | | | | 360 | | | | | | 365 | | | |
| Tyr | Asp | Gln | Ser | Thr | Tyr | Gly | Ser | Ser | Thr | Gly | Pro | Val | Tyr | Ile | Ser |
| 370 | | | | | | 375 | | | | | | 380 | | | |
| Asp | Ser | Val | Thr | Leu | Val | Asn | Val | Ala | Thr | Gly | Ala | Gln | Ala | Val | Ala |
| 385 | | | | | | 390 | | | | | | 395 | | | 400 |
| Arg | Ser | Leu | Asp | Trp | Ser | Lys | Val | Thr | Leu | Asp | Gly | Arg | Pro | Leu | Pro |
| 405 | | | | | | | | | 410 | | | 415 | | | |
| Thr | Val | Glu | Gln | Tyr | Ser | Lys | Thr | Phe | Phe | Val | Leu | Pro | Leu | Arg | Gly |
| 420 | | | | | | | | 425 | | | | | 430 | | |
| Lys | Leu | Ser | Phe | Trp | Glu | Ala | Gly | Thr | Thr | Lys | Ala | Gly | Tyr | Pro | Tyr |
| 435 | | | | | | | | 440 | | | | | 445 | | |
| Asn | Tyr | Asn | Thr | Thr | Ala | Ser | Asp | Gln | Ile | Leu | Ile | Glu | Asn | Ala | Ala |
| 450 | | | | | | | | 455 | | | | | 460 | | |
| Gly | His | Arg | Val | Ala | Ile | Ser | Thr | Tyr | Thr | Arg | Leu | Gly | Ala | Gly | |
| 465 | | | | | | | | 470 | | | | | 475 | | 480 |
| Pro | Val | Ala | Ile | Ser | Ala | Ala | Ala | Val | Leu | Ala | Pro | Arg | Ser | Ala | Leu |
| 485 | | | | | | | | | 490 | | | | | 495 | |
| Ala | Leu | Leu | Glu | Asp | Thr | Phe | Asp | Tyr | Pro | Gly | Arg | Ala | His | Thr | Phe |
| 500 | | | | | | | | | 505 | | | | | 510 | |
| Asp | Asp | Phe | Cys | Pro | Glu | Cys | Arg | Ala | Leu | Gly | Leu | Gln | | | |
| 515 | | | | | | | | | 520 | | | 525 | | | |

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 29:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 43 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(iii) HYPOTHETISCH: Nein

(vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE:
 (C) INDIVIDUELLES ISOLAT: HEV-5'-Primer

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 29:

GGGGGGGATC CATATGGCGG TCGCTCCGGC CCATGACACC CCG

43

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 30:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 27 Basenpaare
 (B) TYP: Nucleinsäure
 (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(iii) HYPOTHETISCH: Nein

(vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE:
 (C) INDIVIDUELLES ISOLAT: HEV-3'-Primer

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 30:

ATTAGAACGCT TCCGTGGCCA TTATATG

27

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 31:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 33 Aminosäuren
 (B) TYP: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: Ja

(iv) ANTI-SENSE: Nein

(v) FRAGMNET-ART: intern

(vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE:
 (C) INDIVIDUELLES ISOLAT: intern konsistente Sequenz von zwei HEV-406.4-2-Antigenen

(ix) MERKMALE
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
 (B) POSITION: 3
 (C) ANDERE INFORMATION: /note= „where Xaa is Q or P“

(ix) MERKMALE
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
 (B) POSITION: 5
 (C) ANDERE INFORMATION: /note= „where Xaa is G or D“

(ix) MERKMAL

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
- (B) POSITION: 7
- (C) ANDERE INFORMATION: /note= „where Xaa is L or S“

(ix) MERKMAL

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
- (B) POSITION: 12
- (C) ANDERE INFORMATION: /note= „where Xaa is E or V“

(ix) MERKMAL

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
- (B) POSITION: 13
- (C) ANDERE INFORMATION: /note= „where Xaa is I or T“

(ix) MERKMAL

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
- (B) POSITION: 22
- (C) ANDERE INFORMATION: /note= „where Xaa is P or H“

(ix) MERKMAL

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
- (B) POSITION: 24
- (C) ANDERE INFORMATION: /note= „where Xaa is A or V“

(ix) MERKMAL

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
- (B) POSITION: 29
- (C) ANDERE INFORMATION: /note= „where Xaa is P or L“

(ix) MERKMAL

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
- (B) POSITION: 31
- (C) ANDERE INFORMATION: /note= „where Xaa is L or P“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 31:

Ala Asn Xaa Pro Xaa His Xaa Ala Pro Leu Gly Xaa Xaa Arg Pro Ser
 1 5 10 15

Ala Pro Pro Leu Pro Xaa Val Xaa Asp Leu Pro Gln Xaa Gly Xaa Arg
 20 25 30
 Arg

Patentansprüche

1. Hepatitis-E-Virus-(HEV-)Polypeptid-Zusammensetzung, umfassend zumindest ein Polypeptid, das aus den 549 carboxyterminalen Aminosäuren des offenen Leserasters (ORF) 2 von HEV besteht, wobei zumindest eine Aminosäure im Carboxyterminus der 549 Aminosäuren deletiert ist.
2. Polypeptidzusammensetzung nach Anspruch 1, worin zumindest ein Polypeptid eine carboxyterminale Deletion von bis zu etwa 24 carboxyterminalen Aminosäuren des 549 Aminosäuren umfassenden HEV-ORF2-Polypeptids umfasst.
3. Polypeptidzusammensetzung nach Anspruch 1, worin die 549 carboxyterminalen Aminosäuren des offenen Leserasters (ORF) 2 von HEV die als Seq.-ID Nr. 15 oder Seq.-ID Nr. 16 bezeichnete Sequenz aufweisen.
4. Polypeptidzusammensetzung nach Anspruch 1, worin die 549 carboxyterminalen Aminosäuren des offenen Leserasters (ORF) 2 von HEV eine Sequenz aufweisen, die eine intern konsistente Variation zwischen Seq.-ID Nr. 15 und Seq.-ID Nr. 16 ist.
5. Polypeptidzusammensetzung nach Anspruch 1, worin die Zusammensetzung ein Polypeptid mit einer

als Seq.-ID Nr. 25 oder Seq.-ID Nr. 26 dargestellten Sequenz enthält.

6. Polypeptidzusammensetzung nach Anspruch 1, worin die Zusammensetzung ein Polypeptid mit einer Sequenz enthält, die eine intern konsistente Variation zwischen Seq.-ID Nr. 25 und Seq.-ID Nr. 26 ist.

7. Polypeptidzusammensetzung nach Anspruch 1, worin die Zusammensetzung ein Polypeptid mit einer als Seq.-ID Nr. 27 oder Seq.-ID Nr. 28 dargestellten Sequenz enthält.

8. Polypeptidzusammensetzung nach Anspruch 1, worin die Zusammensetzung ein Polypeptid mit einer Sequenz enthält, die eine intern konsistente Variation zwischen Seq.-ID Nr. 27 und Seq.-ID Nr. 28 ist.

9. Polypeptidzusammensetzung nach Anspruch 1, worin die Zusammensetzung zwei Polypeptide mit den als Seq.-ID Nr. 25 und Seq.-ID Nr. 27 oder Seq.-ID Nr. 26 und Seq.-ID Nr. 28 dargestellten Sequenzen enthält.

10. Polypeptidzusammensetzung nach Anspruch 1, worin die Zusammensetzung zwei Polypeptide enthält, die intern konsistente Variationen zwischen Seq.-ID Nr. 25 und Seq.-ID Nr. 26 und zwischen Seq.-ID Nr. 27 und Seq.-ID Nr. 28 sind.

11. Im Wesentlichen isolierte Nucleinsäuresequenz, die für ein Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 10 kodiert.

12. Expressionsvektor zur Herstellung einer Hepatitis-E-Virus-Polypeptid-Antigen-Zusammensetzung, umfassend:

eine Nucleinsäuresequenz, die für ein Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 10 kodiert, wobei die Nucleinsäuresequenz in einen Expressionsvektor insertiert ist und worin die Nucleinsäuresequenz operabel an einen Promotor gebunden ist, der zur Initiierung der Transkription in einer gewählten Wirtszelle fähig ist.

13. Expressionssystem zur Herstellung einer Hepatitis-E-Virus-Polypeptid-Antigen-Zusammensetzung, umfassend:

eine Nucleinsäuresequenz, die für ein Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 10 kodiert, wobei die Nucleinsäuresequenz in einen Expressionsvektor insertiert ist und worin die Nucleinsäuresequenz operabel an einen Promotor gebunden ist, der zur Initiierung der Transkription in einer gewählten Wirtszelle fähig ist, und wobei der Expressionsvektor in der Wirtszelle getragen wird.

14. Expressionssystem nach Anspruch 13, worin der Expressionsvektor ein Baculovirus-Expressionsvektor und die Wirtszelle eine Insektenzelle ist.

15. Hepatitis-E-Virus-(HEV-)Polypeptid-Zusammensetzung, die durch ein Verfahren hergestellt wird, das Folgendes umfasst:

Züchten einer einen Expressionsvektor nach Anspruch 12 enthaltenden Insektenzelle unter Bedingungen, die zur Expression eines Polypeptids ausreichen, für das die Nucleinsäure kodiert.

16. Zusammensetzung nach Anspruch 15, worin zumindest ein Polypeptid der Zusammensetzung eine Aminosäuresequenz aufweist, die aus der aus Seq.-ID Nr. 15, Seq.-ID Nr. 16, Seq.-ID Nr. 25, Seq.-ID Nr. 26, Seq.-ID Nr. 27, Seq.-ID Nr. 28 und dazu homologen Sequenzen bestehenden Gruppe ausgewählt ist.

17. Verfahren zur Herstellung einer Hepatitis-E-Virus-(HEV-)Polypeptid-Zusammensetzung, die folgenden Schritte umfassend:

Züchten einer einen Expressionsvektor nach Anspruch 12 enthaltenden Zelle unter Bedingungen, die zur Expression einer Polypeptidsequenz ausreichen, für welche die Nucleinsäure kodiert.

18. In-vitro-Verfahren zum Detektieren einer Hepatitis-E-Virusinfektion bei einem Individuum, Folgendes umfassend:

a) Umsetzen einer vom Individuum erhältlichen Serumprobe mit einer Hepatitis-E-Virus-(HEV-)Polypeptid-Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 10; und

b) Untersuchen eines Polypeptids der Zusammensetzung auf die Gegenwart eines gebundenen Antikörpers.

19. Verfahren nach Anspruch 18, worin Polypeptide der HEV-Polypeptid-Zusammensetzung an einen festen Träger gebunden sind, wobei die Umsetzung das Kontaktieren eines solchen Serums mit dem Träger und die Untersuchung das Umsetzen des Trägers und von gebundenem Antikörper mit einem reportermarkierten

Antihumanantikörper umfasst.

20. Set zum Nachweisen der Gegenwart von Antikörpern gegen HEV in einer Serumprobe, die einem Individuum abgenommen wurde, Folgendes umfassend:
einen festen Träger mit oberflächengebundenen Antigenen, worin die oberflächengebundenen Antigene Polypeptide einer HEV-Polypeptid-Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 10 sind.

21. Vakzinenzusammensetzung zur Verwendung bei der Immunisierung eines Individuums gegen das Hepatitis-E-Virus (HEV), umfassend:
eine HEV-Polypeptid-Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 10 in einem pharmakologisch annehmbaren Träger.

22. Vakzinenzusammensetzung nach Anspruch 21, worin zumindest ein Polypeptid der Zusammensetzung eine aus der aus Seq.-ID Nr. 15, Seq.-ID Nr. 16, Seq.-ID Nr. 25, Seq.-ID Nr. 26, Seq.-ID Nr. 27, Seq.-ID Nr. 28 und dazu homologen Sequenzen bestehenden Gruppe ausgewählte Aminosäuresequenz aufweist.

23. Verwendung einer Polypeptidzusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 10, Anspruch 15 oder Anspruch 16 bei der Herstellung einer Vakzinenzusammensetzung zur Immunisierung eines Individuums gegen HEV.

Es folgen 19 Blatt Zeichnungen

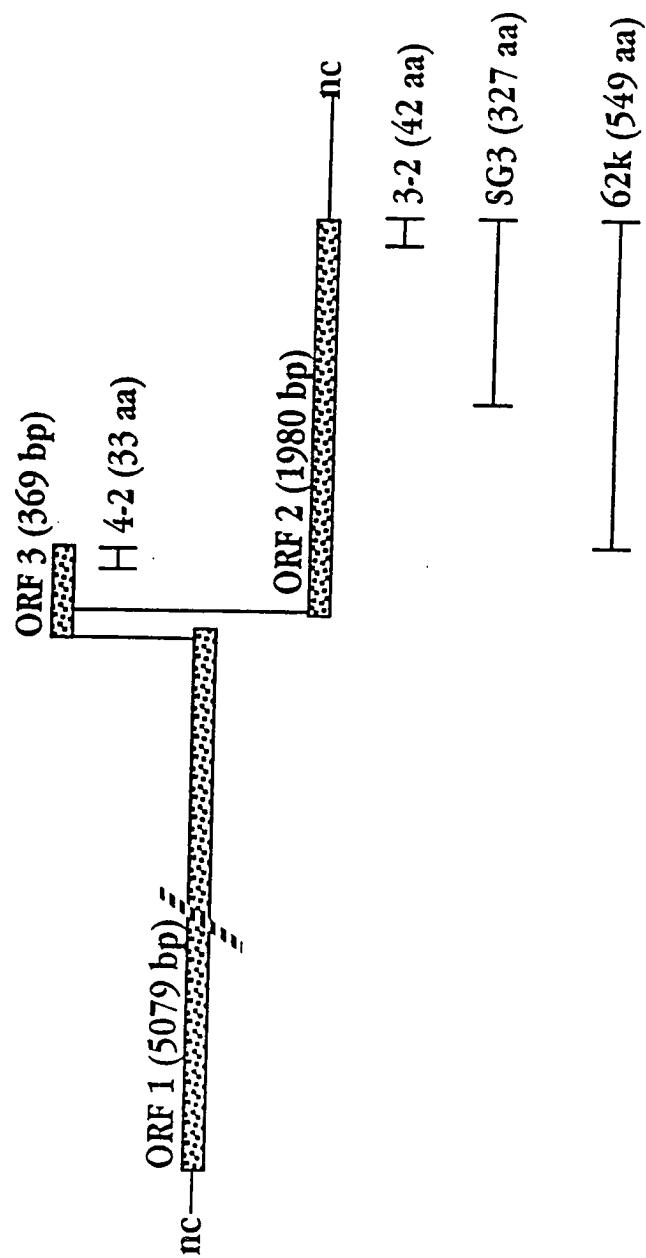


Fig. 1

Fig. 2A

I-ORF3-->
 5110v 5120v 5130v 5140v 5150v 5160v
 TGGAATGAATAACATGTCTTTGCTGCGCCCATGGGTCGCGACCATGCGCCCTCGGCCT
 GAATGAATAACATGT TTTGCTGCGCCCATGGGTCGC ACCATGCGCCCT GGCCT
 CTGAATGAATAACATGTGGTTGCTGCGCCCATGGGTCGCCACCATGCGCCCTAGGCCT

5170v 5180v 5190v 5200v 5210v 5220v
 ATTTTGTGCTGCTCCTCATGTTTTGCCTATGCTGCCCGGCCACCGGCCGGTCAGCCG
 TTTTG TG TG TCCTC TGTTT TGCCSTATG TGCCCGGCCACCG CCGGTCAGCCG
 CTTTGCTGTTGTCCTCTGCTATGCTGCCATGTTGCCCGGCCACCGACCGGTAGCCG

5230v 5240v 5250v 5260v 5270v 5280v
 TCTGGCCGCCGTCTGGGGCGCGCAGCGGCCGGTCCGGCGGTGGTTCTGGGGTGACCGG
 TCTGGCCGCCGTCTGGGGCGCGCAGCGGCCGGT CCGGCCGGTGGTTCTGGGGTGACCGG
 TCTGGCCGCCGTCTGGGGCGCGCAGCGGCCGGTACCGGCCGGTGGTTCTGGGGTGACCGG

5290v 5300v 5310v 5320v 5330v 5340v
 GTTGATTCTCAGCCCTTCGCAATCCCCTATATTCAACCAACCCCTTCGCCCGAT
 GTTGATTCTCAGCCCTTCGCAATCCCCTATATTCAACCAACCCCTT GCCCG GA
 GTTGATTCTCAGCCCTTCGCAATCCCCTATATTCAACCAACCCCTTGGCCAGAC

I-406.4-2-->
 5350v 5360v 5370v 5380v 5390v 5400v
 GTCACCGCTGCCGCCGGGCTGGACCTCGTGTTCGCCAACCGGCCGACCACTGGCTCC
 GT CCGCTGCG CCGGG CTGGACCTCG TTGCAACCC GCCCG CCACT GGCTCC
 GTTGGCGCTGCGTCCGGTCTGGACCTCGCCTCGCCAACCAGCCGGCCACTTGGCTCC

5410v 5420v 5430v 5440v 5450v 5460v
 GCTTGGCGTGACCAAGGCCAGCGCCCCGCCGTTGCCCTACGTCGTAGACCTACCAAGCT
 CTTGGCG GA CAGGCCAGCGCCCC CCG TGCCTC CGTCG GACCT CCACAGC
 ACTTGGCGAGATCAGGCCAGCGCCCCCTCCGCTGCCCTCGACCTGCCACAGCC

<-406.4-2-I
<-ORF3--I
 5470v 5480v 5490v 5500v 5510v 5520v
 GGGGCCGCGCCGCTAACCGCGGTGCTCCGGCCATGACACCCGCCAGTGCCTGATGTC
 GGGGC GCG CGCT AC GC GT GC CC GCCCATGACACC C CC GT CC GA GT
 GGGGCTGCGGGCGCTGACGGCTGTGGCGCCTGCCATGACACCTCACCCGTCCGGACGTT

Fig. 2B

5530v 5540v 5550v 5560v 5570v 5580v
 GACTCCCGCGGCCATCTTGCAGGGCAGTATAACCTATCAACATCTCCCTTACCTCT
 GA TC CGCGG GC AT T CGCCG CAGTATAA T TC AC TC CCCCT AC TC
 GATTCTCGCGGTGCAATTCTACGCCAGTATAATTGTCTACTTCACCCCTGACATCC

5590v 5600v 5610v 5620v 5630v 5640v
 TCCGTGGCCACCGGCACTAACCTGGTTCTTATGCCGCCCTCTTAGTCCGCTTTACCC
 TC GTGGCC C GGCCTAA T GT CT TATGC GCCCC CTTA TCCGC T T CC
 TCTGTGGCCTCTGGCACTAATTAGTCCTGTATGCAGCCCCCTTAATCCGCTCTGCCG

5650v 5660v 5670v 5680v 5690v 5700v
 CTTCAGGACGGCACCAATACCCATATAATGGCCACGGAAAGCTTCTAATTATGCCAGTAC
 CT CAGGACGG AC AATAC CA AT ATGGCAC GA GC TC AATTATGC CAGTAC
 CTGCAGGACGGTACTAATACTCACATTATGGCACAGAGGCCTCCAATTATGCACAGTAC

5710v 5720v 5730v 5740v 5750v 5760v
 CGGGTTGCCCGTGCACAAATCCGTTACGCCCGCTGGTCCCCAATGCTGTGGCGGTTAC
 CGGGTTGCCCG GC AC ATCCGTTACCG CC CT GT CC AATGC GT GG GG TA
 CGGGTTGCCCGCGCTACTATCCGTTACCGGCCCTAGTGCCTAATGCAGTTGGAGGCTAT

trpE-C2 I->

5770v 5780v 5790v 5800v 5810v 5820v
 GCCATCTCCATCTCATTCTGGCACAGACCACCAACCCGACGTCCGTTGATATGAAT
 GC AT TCCAT TC TTCTGGCC CA AC ACCAC ACCCC AC TC GTTGA ATGAAT
 GCTATATCCATTCTTCTGGCCTCAAACAACCACAACCCCTACATCTGTTGACATGAAT

5830v 5840v 5850v 5860v 5870v 5880v
 TCAATAACCTCGACGGATTTGTCTGTTAGTCCAGGCCGGCATAGCCTCTGAGCTTGTG
 TC AT AC TC AC GATGT G ATT T GT CA CC GGCATAGC TCTGA T GT
 TCCATTACTCCACTGATGTCAGGATTCTGTTAACCTGGCATAGCATCTGAATTGGTC

5890v 5900v 5910v 5920v 5930v 5940v
 ATCCCAAGTGAGCGCCTACACTATCGTAACCAAGGCTGGCGCTCGTCGAGACCTCTGGG
 ATCCCAAG GAGCGCCT CACTA CG AA CAAGG TGGCGCTC GT GAGAC TCTGG
 ATCCCAAGCGAGCGCCTCACTACCGCAATCAAGGTTGGCGCTCGGTTGAGACATCTGGT

5950v 5960v 5970v 5980v 5990v 6000v
 GTGGCTGAGGAGGAGGCTACCTCTGGTCTTGTATGCTTGCATACATGGCTCACTCGTA
 GT GCTGAGGAGGA GC ACCTC GGTCTGT ATG T TGCATACATGGCTC C GT
 GTTGCTGAGGAGGAAGCCACCTCCGGTCTTGTATGCATACATGGCTCTCCAGTT

6010v 6020v 6030v 6040v 6050v 6060v
 AATTCCCTATACTAATACACCCCTATACCGGTGCCCTCGGGCTGGACTTTGCCCTTGAG
 AA TCCTATAC AATAC CC TATACCGGTGCCCT GG T TGGACTTTGCC T GAG
 AACTCCTATAACCAATACCCCTTATACCGGTGCCCTGGCTACTGGACTTTGCCCTAGAG

Fig. 2C

6070v 6080v 6090v 6100v 6110v 6120v
 CTTGAGTTTCGCAACCTAACCCCCGGTAACACCAATACGCCGGTCTCCGTTATTCCAGC
 CTTGAGTTTCGCAA CT ACC CC GTAACACCAATAC CG GT TCCCGTTA TCCAGC
 CTTGAGTTTCGCAATCTCACCAACCTGTAACACCAATACACGTGTCCCGTTACTCCAGC

 I-SG3-->
 6130v 6140v 6150v 6160v 6170v 6180v
 ACTGCTGCCACCGCCTCGTCGCGGTGCGGACGGACTGCCGAGCTACCCACGGCT
 ACTGCTCG CAC C CG G G GACGGGACTGC GAGCT ACCAC AC GC
 ACTGCTCGTCACTCCGCCGAGGGGCC-- GACGGGACTGCGGAGCTGACCACAACTGCA

 6190v 6200v 6210v 6220v 6230v 6240v
 GCTACCCGCTTATGAAGGGACCTCTATTAACTAGTACTAAATGGTGTGGTGAGATCGGC
 GC ACC G TT ATGAA GA CTC A TTTAC G TAATGG GT GGTGA TCGGC
 GCCACCAGGTTCATGAAAGATCTCCACTTACCGGCCTTAATGGGGTAGGTGAAGTCGGC

 6250v 6260v 6270v 6280v 6290v 6300v
 CGCGGGATAGCCCTCACCCCTGTTAACCTGCTGACACTCTGCTTGGCGGCCTGCCGACA
 CGCGGGATAGC CT AC T T AACCTGCTGACAC CT CT GGC GG CT CCGACA
 CGCGGGATAGCTCTAACATTACTAACCTGCTGACACGCTCCTCGCGGGCTCCGACA

 6310v 6320v 6330v 6340v 6350v 6360v
 GAATTGATTTCGTCGGCTGGTGGCCAGCTGTTCTACTCCCGTCCCGTTGTCTCAGCCAAT
 GAATT ATTCGTCGGCTGG GG CA CTGTT TA TCCCG CC GTTGTCTCAGCCAAT
 GAATTAAATTTCGTCGGCTGGCGGGCAACTGTTTATTCCCGCCGGTTGTCTCAGCCAAT

 6370v 6380v 6390v 6400v 6410v 6420v
 GGCAGGCCACTGTTAACGGTATACATCTGTAGAGAATGCTCAGCAGGATAAGGGTATT
 GGCAGGCC AC GT AAG T TATACATC GT GAGAATGCTCAGCAGGATAAGGGT TT
 GGCAGGCCAACCGTGAAGCTCTATACATCAGTGGAGAATGCTCAGCAGGATAAGGGTGT

 6430v 6440v 6450v 6460v 6470v 6480v
 GCAATCCCGCATGACATTGACCTCGGAGAATCTCGTGTGGTTATTAGGATTATGATAAC
 GC ATCCC CA GA AT GA CT GG GA TC CGTGTGGT ATTAGGATTATGA AAC
 GCTATCCCCACGATATCGATCTGGTGATTCGCGTGTGGTCATTAGGATTATGACAAC

 6490v 6500v 6510v 6520v 6530v 6540v
 CAACATGAACAAAGATCGGCCGACGCCCTCTCCAGCCCCATCGGCCCTTCTGTCCCTT
 CA CATGA CA GATCGGCC AC CC TC CC GC CCATC CG CCTTT TCTGT CT
 CAGCATGAGCAGGATCGGCCACCCCGTCGCCATCTCGGCCCTTTCTGTCTC

 6550v 6560v 6570v 6580v 6590v 6600v
 CGAGCTAATGATGTGCTTGGCTCTCTCACCGCTGCCAGTATGACCAGTCCACTTAT
 CGAGC AATGATGT CTTGGCT TC CTCAC GC GCCGAGTATGACCAGTCCACTTA
 CGAGCAAATGATGTACTTGGCTGCCCTCACTGCAGCCGAGTATGACCAGTCCACTTAC

Fig. 2D

6610v 6620v 6630v 6640v 6650v 6660v
 GGCTCTCGACTGGCCCAGTTATGTTCTGACTCTGTGACCTTGGTTAATGTTGCGAC
 GG TC TC ACTGGCCC GTTTAT T TC GAC GTGAC TTGGT AATGTTGCGAC
 GGGTCGTCAACTGGCCCGGTTATATCTCGGACAGCGTGACTTGGTGAATGTTGCGACT

6670v 6680v 6690v 6700v 6710v 6720v
 GGCGCGCAGGCCGTTGCCCGGTCGCTCGATTGGACCAAGGTACACACTGACGGTCGCC
 GGCGCGCAGGCCGT GCCCG TCGCT GA TGG CCAA GTCAC CT GACGG CG CCC
 GGCGCGCAGGCCGTAGCCGATCGCTGACTGGTCAAAGTCACCGCTCGACGGCGGCC

6730v 6740v 6750v 6760v 6770v 6780v
 CTCTCCACCATCCAGCAGTACTCGAAGACCTTCTTGTCCCTGCCGCTCCGGTAAGCTC
 CTC C AC T AGCA TA TC AAGAC TTCTTGT CT CC CT CG GG AAGCTC
 CTCCCGACTGTTGAGCAATATTCCAAGACATTCTTGTGCTCCCCCTCGTGGCAAGCTC

6790v 6800v 6810v 6820v 6830v 6840v
 TCTTTCTGGGAGGCAGGCACAACTAAAGCCGGTACCCCTATAATTATAACACCACTGCT
 TC TT TGGGAGGC GGACAAC AAAGC GG TA CCTTATAATTATAA AC ACTGCT
 TCCTTTGGGAGGCCGGCACAAACAAAAGCAGGTTATCCTTATAATTATAACTACTGCT

6850v 6860v 6870v 6880v 6890v 6900v
 AGCGACCAACTGCTTGTGAGAATGCCGCCGGCACCGGGTCGCTATTCACCTACACC
 AG GACCA T CT T GA AATGC GCCGG CA CGGGTCGC ATTTC AC TA ACC
 AGTGACCAGATTCTGATTGAAAATGCTGCCGGCATCGGGTCGCCATTCAACCTATACC

6910v 6920v 6930v 6940v 6950v 6960v
 ACTAGCCTGGGTGCTGGTCCCCTCCATTCTGCGGTTGCCGTTAGCCCCCCCACACT
 AC AG CT GG GC GGTCC GTC CCATTCTGCGG GC GTTT GC CC C CTC
 ACCAGGCTGGGGCCGGTCCGGCTGCCCCCTGCGGTTGGCTCCACGCTCC

I-406.3-2-->

6970v 6980v 6990v 7000v 7010v 7020v
 GCGCTAGCATTGCTTGGAGGATACCTGGACTACCCCTGCCCGGCCATACTTTGATGAT
 GC CT GC TGCT GAGGATAC TT GA TA CC G CG GC CA AC TTTGATGA
 GCCCTGGCTCTGCTGGAGGATACTTTGATTATCCGGGGCGGGCGCACACATTGATGAC

7030v 7040v 7050v 7060v 7070v 7080v
 TTCTGCCAGAGTGCCGCCCTTGGCCTTCAGGGCTGCGCTTCCAGTCTACTGTCGCT
 TTCTGCC GA TGCGC C T GGCCT CAGGG TG GCTTCCAGTC ACTGTCGCT
 TTCTGCCCTGAATGCCCGCTTAAAGGTAAAGGTGGGTTAGGCCTCCAGGGTTGTGCTTCCAGTCAGTCAACTGTCGCT

<- SG3 -I

<- 406.3-2-I

7090v 7100v 7110v 7120v 7130v 7140v
 GAGCTTCAGCGCCTTAAGATGAAGGTGGGAAAACCTGGGAGTTGTAGTTATTTGCTTG
 GAGCT CAGCGCCTAA T AAGGTGGGAAAACCTGGGAGTTGTAGTTATTTG TG
 GAGCTCCAGCGCCTAAAGTTAAGGTGGGAAAACCTGGGAGTTGTAGTTATTTGGCTG

7150v 7160v 7170v 7180v 7190v
TGCCCCCTTCTTCTGTTGC-----TTATTTCTCATTTCTGCGTTCCGCGCTCCC
TGCCC CCT CTT TGC TTATTC TTTCT GT CCGCGCTCCC
TGCCCACCTACTTATATCTGCTGATTCTTTATTTCTCGGTCCCGCGCTCCC

<-I ORF2 <-I trpE-C2
v 7195
TGA
TGA
TGA

Fig. 2E

| | | | | | |
|---|--|---|----|----|----|
| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |
| MNNMSFAAPMGSRPCALGLFCCCSSCFCLCCPRHRPVSRLAAVVGAAAVPAVVSGVTGL | X::::: ::::::::::::::::::::: ::::::::::::::::::::: ::::::::::::::::::::: | MNNMWFAAPMGSPPCALGLFCCCSSCFCLCCPRHRPVSRLAAVVGAAAVPAVVSGVTGL | | | |
| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |

406.4-2

| | | | | | |
|--|---|--|-----|------|-----|
| 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 |
| ILSPSQSPIFIQPTPSPPMSPLRPGLDLVAFANPPDHSAAPLGVTAPSAPPLPHVVDLPQLG | ::::::::::::: . ::::::::::::::: . ::::::::::::::: . ::::::::::::::: . | ILSPSQSPIFIQPTPLPQTLPLRPGLDLAFANQPGHLAPLGEIRPSAPPLPPVADLPQPG | | | |
| 70 | 80 | 90 | 100 | 110. | 120 |

PRRZ
::X
LRRZ

Fig. 3

Fig. 4A

10 20 30 40 50 60
 MRPRPILLLMFLPMLPAPPPGQPSGRRGRSGSGGGFWGDRVDSQPFAIPYIHPTT
 X:...:...:...:...:...:...:...:...:...:...:...:...:...:...:...:...:
 MRPRPILLFLFLPMLPAPPTGQPSGRRGRSGGTGGGFWGDRVDSQPFAIPYIHPTT
 10 20 30 40 50 60

70 80 90 100 110 120 62k
 PFAPDVTAAAGAGPRVRQPARPLGSAWRDQAQRPAVASRRPTTAGAAPLTAVAPAHDT
 :::::::::::::::::::::...:...:...:...:...:...:...:...:...:...:...:
 PFAPDVAAASGSGPRLRQPARPLGSTWRDQAQRPSAASRRPATAGAAALTAVAPAHDT
 70 80 90 100 110 120

130 140 150 160 170 180
 PVPDVDSRGAILRRQYNLSTSPLTSSVATGTNLVLYAAPLSPLLPLQDGTNTTHIMATEAS
 :::::::::::::::::::::...:...:...:...:...:...:...:...:...:...:
 PVPDVDSRGAILRRQYNLSTSPLTSSVASGTNLVLYAAPLNPPPLQDGTNTTHIMATEAS
 130 140 150 160 170 180

190 200 210 220 230 240 C-2
 NYAQYRVARATIRYRPLVPNAVGGYAIISISFWPQTTTPTSVDMNSITSTDVRILVQPGI
 :::::::::::::::::::::...:...:...:...:...:...:...:...:...:
 NYAQYRVARATIRYRPLVPNAVGGYAIISISFWPQTTTPTSVDMNSITSTDVRILVQPGI
 190 200 210 220 230 240

250 260 270 280 290 300
 ASELVIPSERLHYRNQGWRSVETSGVAEEEATSGLVMLCIH GSLVNSYTNTPYTGALGL
 :::::::::::::::::::::...:...:...:...:...:...:...:...:
 ASELVIPSERLHYRNQGWRSVETSGVAEEEATSGLVMLCIH GSPVNSYTNTPYTGALGL
 250 260 270 280 290 300

310 320 330 340 350 360 SG3
 DFALELEFRNLTPGNTNTRVSRYSSTARHRLRRGADGTAELTTAAATRFMKDLYFTSTNG
 :::::::::::::::::::::...:...:...:...:...:...:...:...:
 DFALELEFRNLTTCNTNTRVSRYSSTARHS-ARGADGTAELTTAAATRFMKDLHFTGLNG
 310 320 330 340 350

370 380 390 400 410 420
 VGEIGRGIALTLFLNLA DTL LGGLPTELI SAGGQLFY S R P V V S A N G E P T V K L Y T S V E N A Q
 :::::::::::::::::::::...:...:...:...:...:...:...:...:
 VGEVGRGIALTLLNLA DTL LGGLPTELI SAGGQLFY S R P V V S A N G E P T V K L Y T S V E N A Q
 60 370 380 390 400 410

430 440 450 460 470 480
 QDKGIAIPHDIDLGE RVVIQDYDNQHEQDRPTSPAPSRPFSVLRANDVLWLSLTAAEY
 :::::::::::::::::::::...:...:...:...:...:...:...:...:
 QDKGVAIPHDIDLGD SRVVIQDYDNQHEQDRPTSPAPSRPFSVLRANDVLWLSLTAAEY
 20 430 440 450 460 470

Fig. 4B

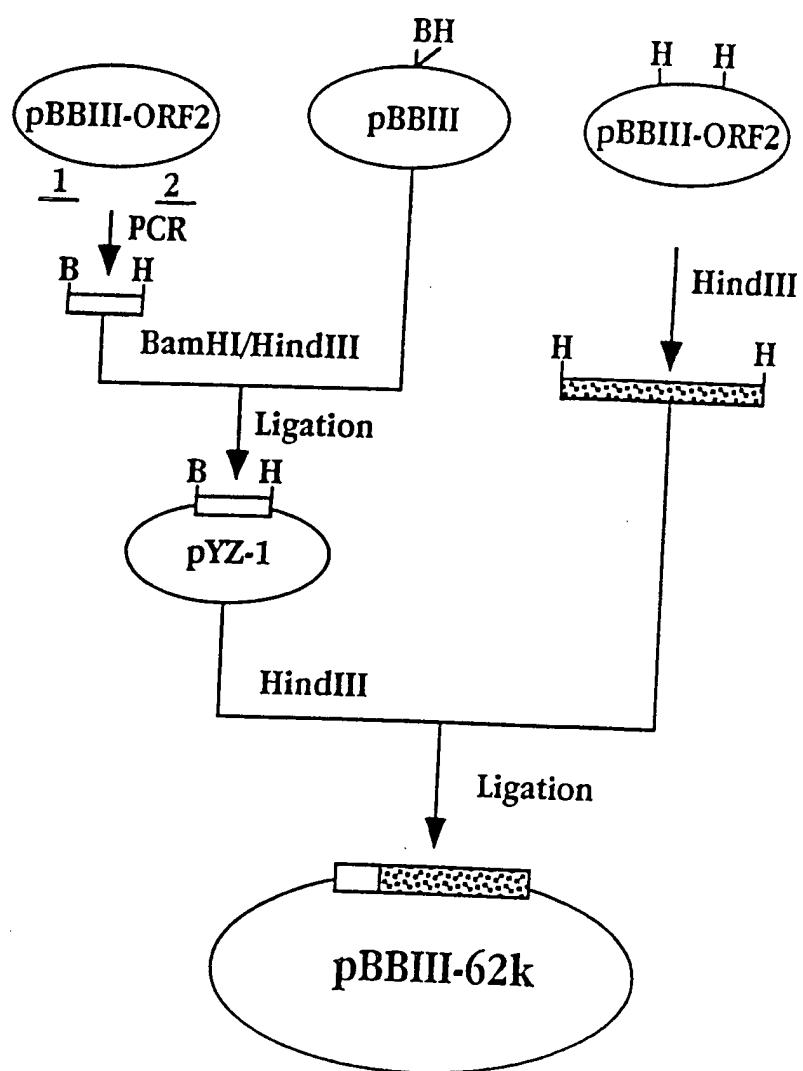
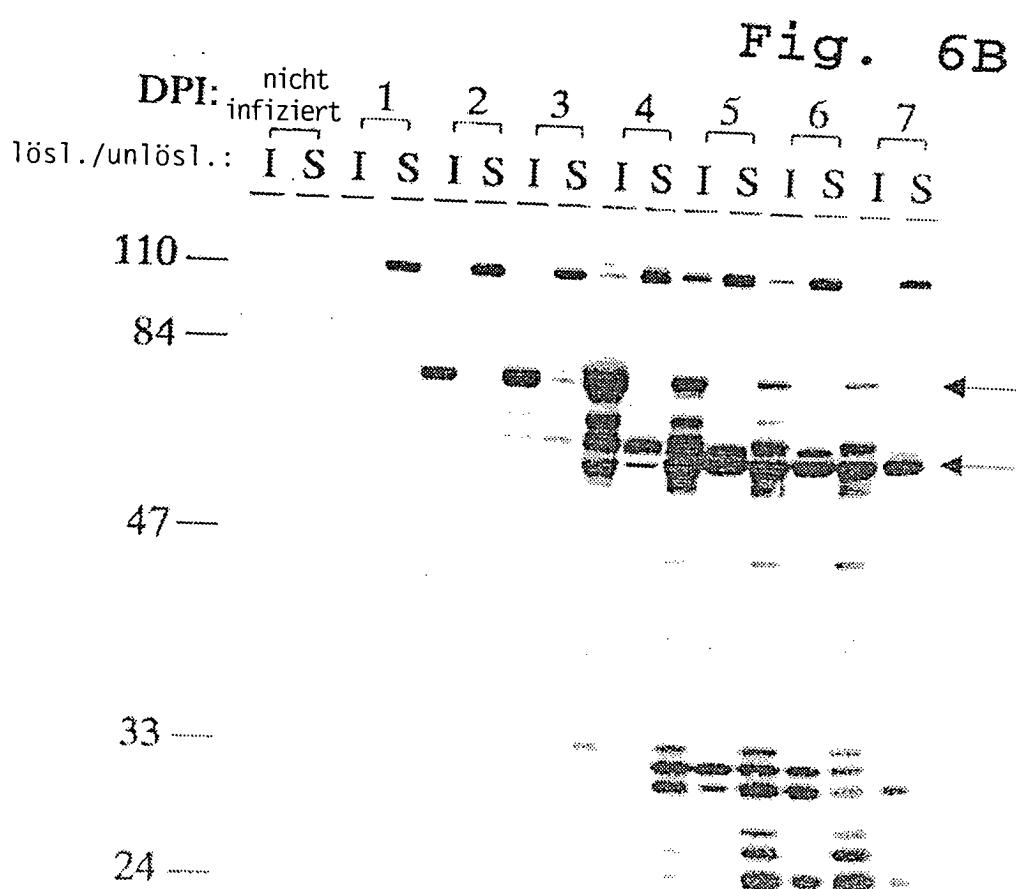
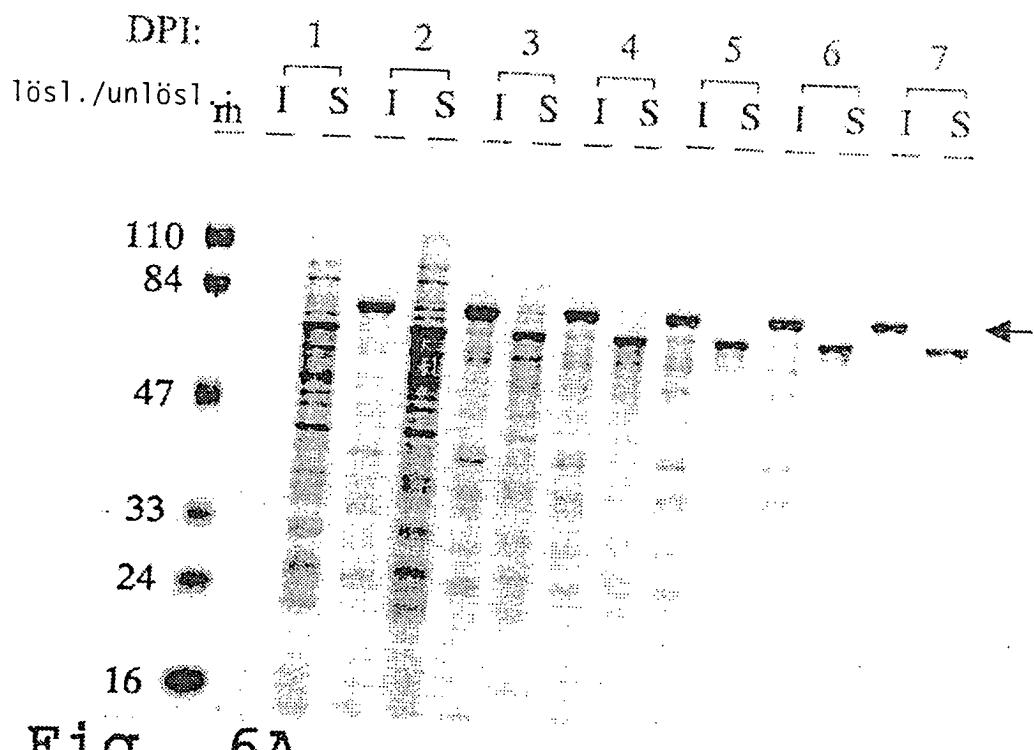
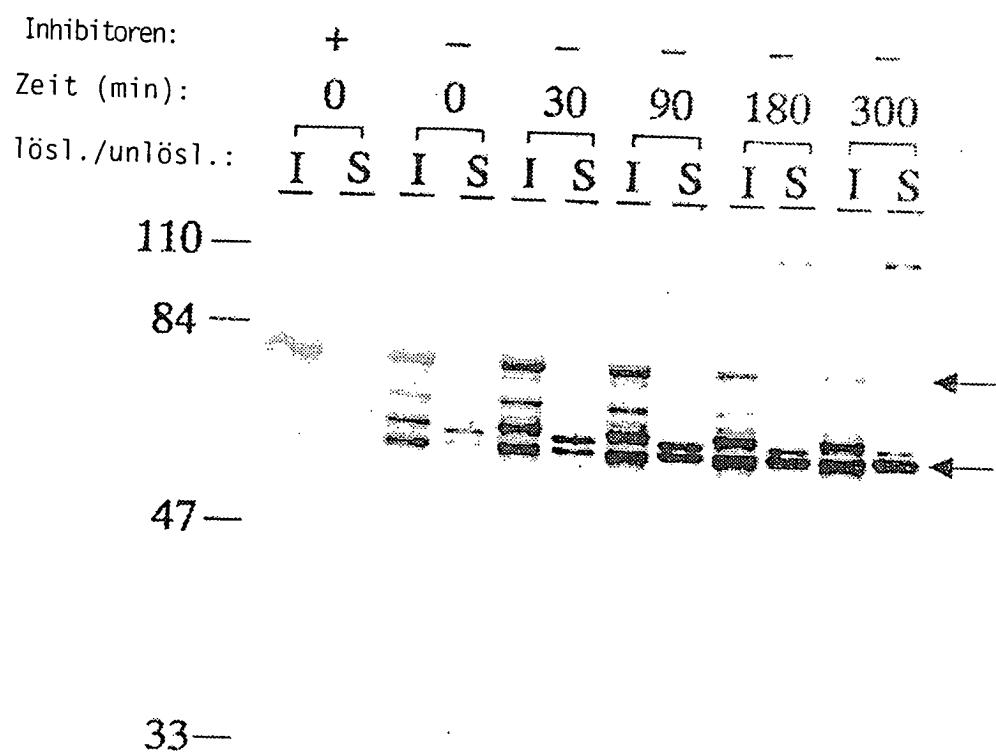
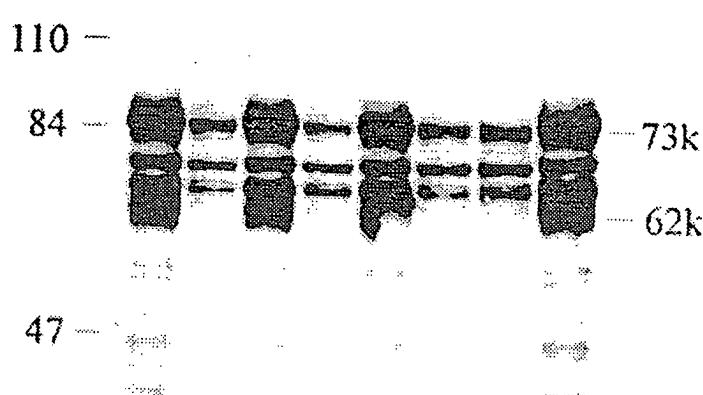
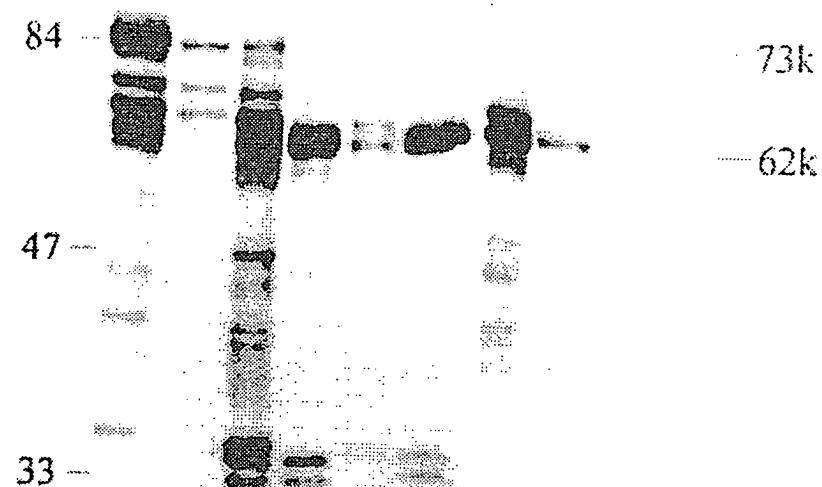


Fig. 5





Zeit: 0 1 2 4 24h
Löslichkeit: I S I S I S I S I S



33

Fig. 8

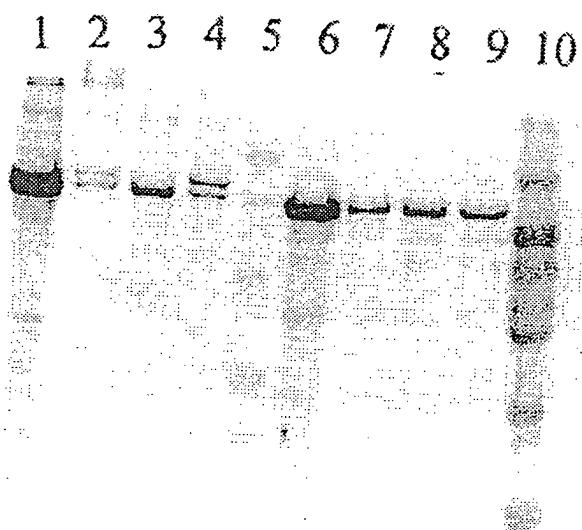


Fig. 9

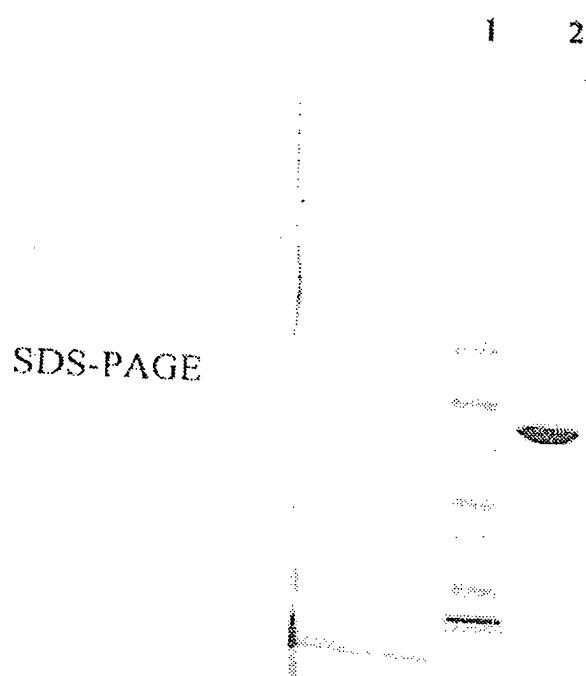


Fig. 10

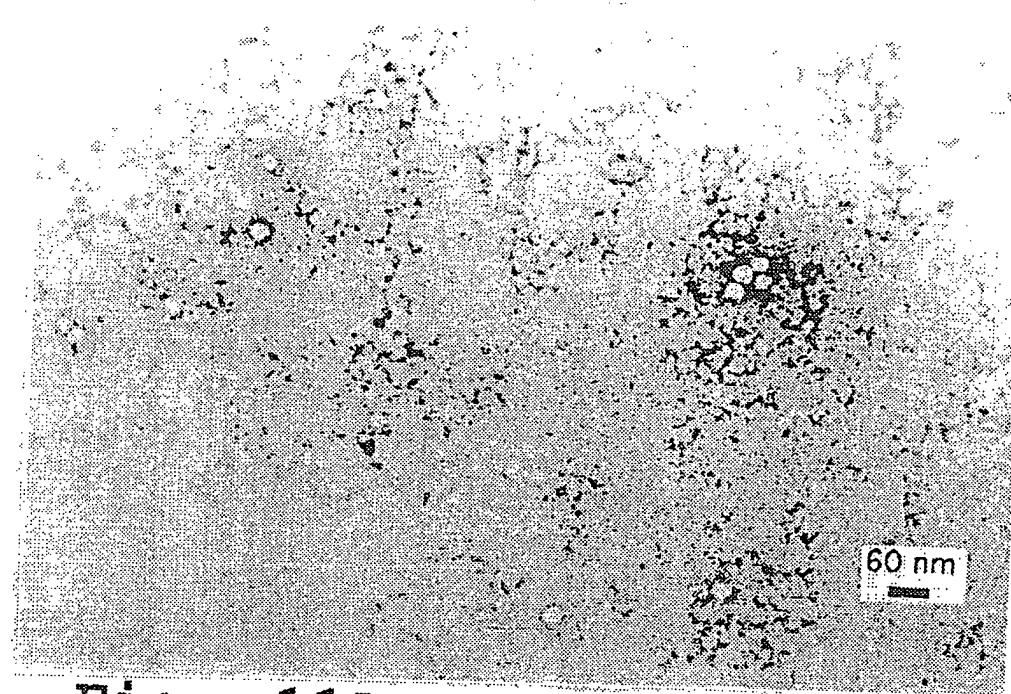


Fig. 11A

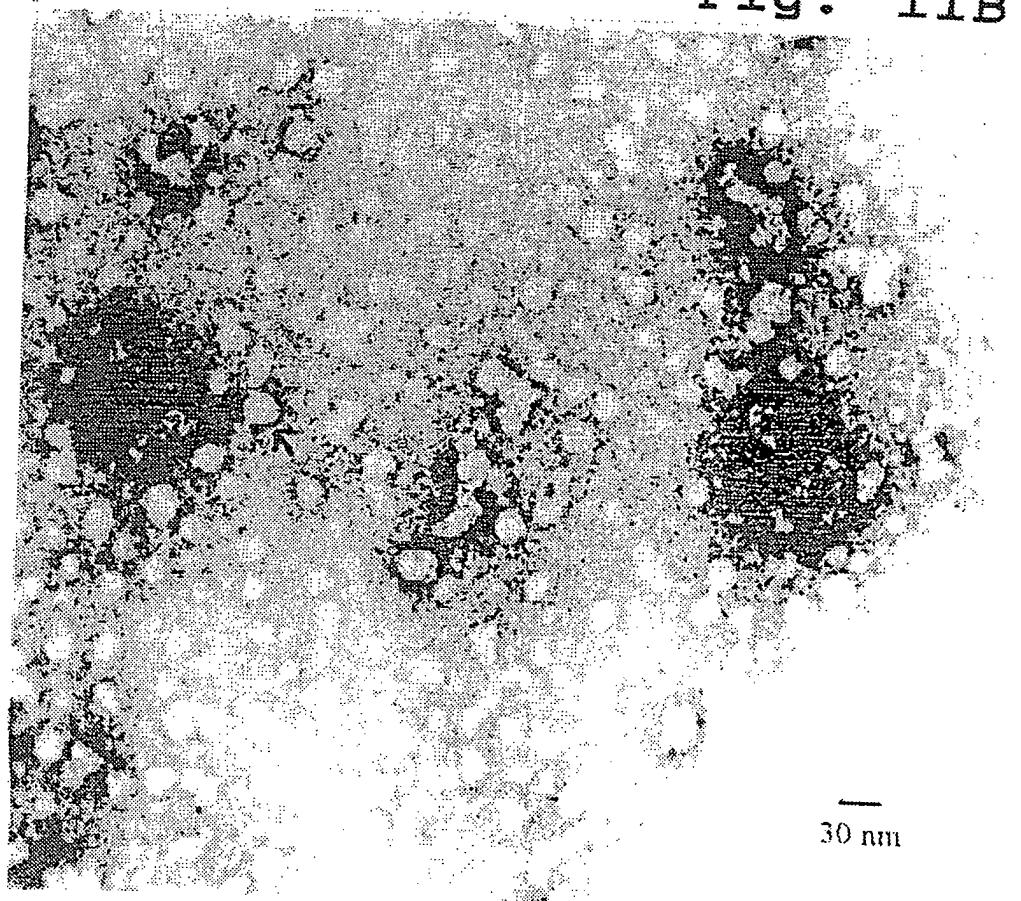


Fig. 11B

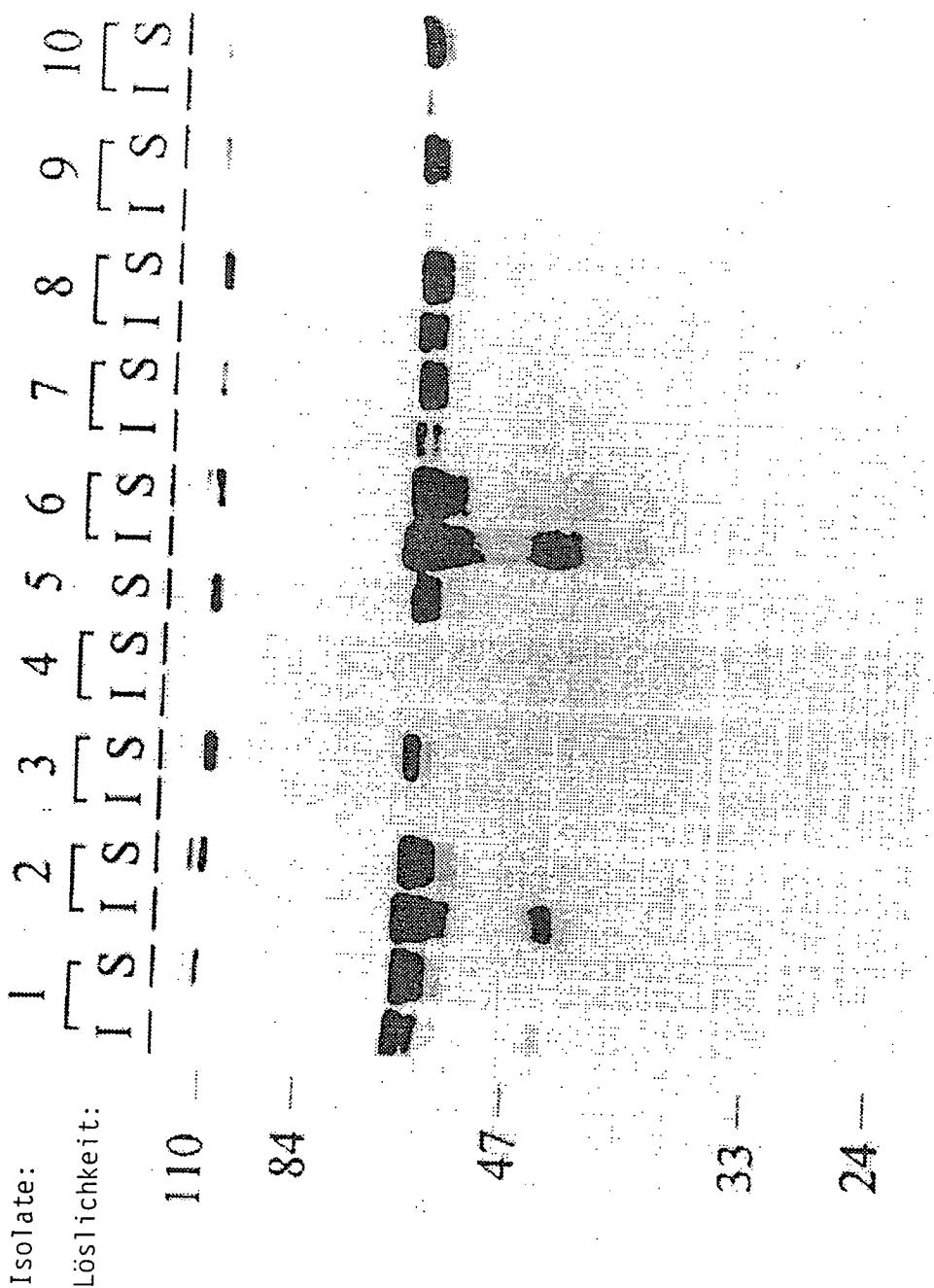


Fig. 12

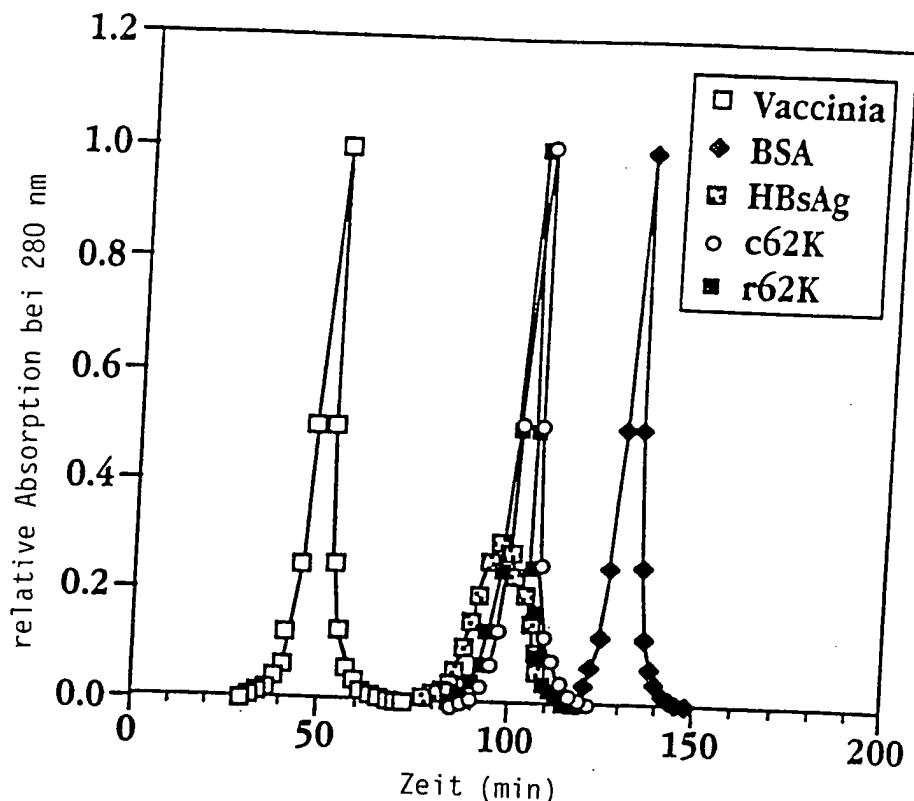


Fig. 13

10 20 30
 Mexican (SEQ-ID NR:18) ANQPGHLAPLGEIRPSAPPLPPVADLPQPGLRR
 :
 Burma (SEQ-ID NR:17) ANPPDHSAAPLGVTRPSAPPLPHVVVDLPQLGPRR
 10 20 30

Fig. 16

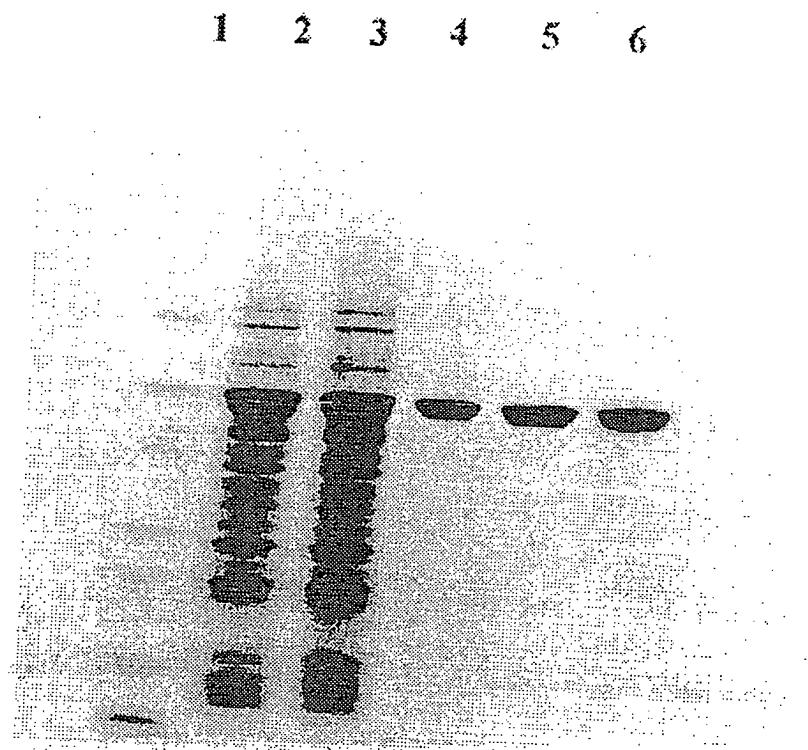


Fig. 14B

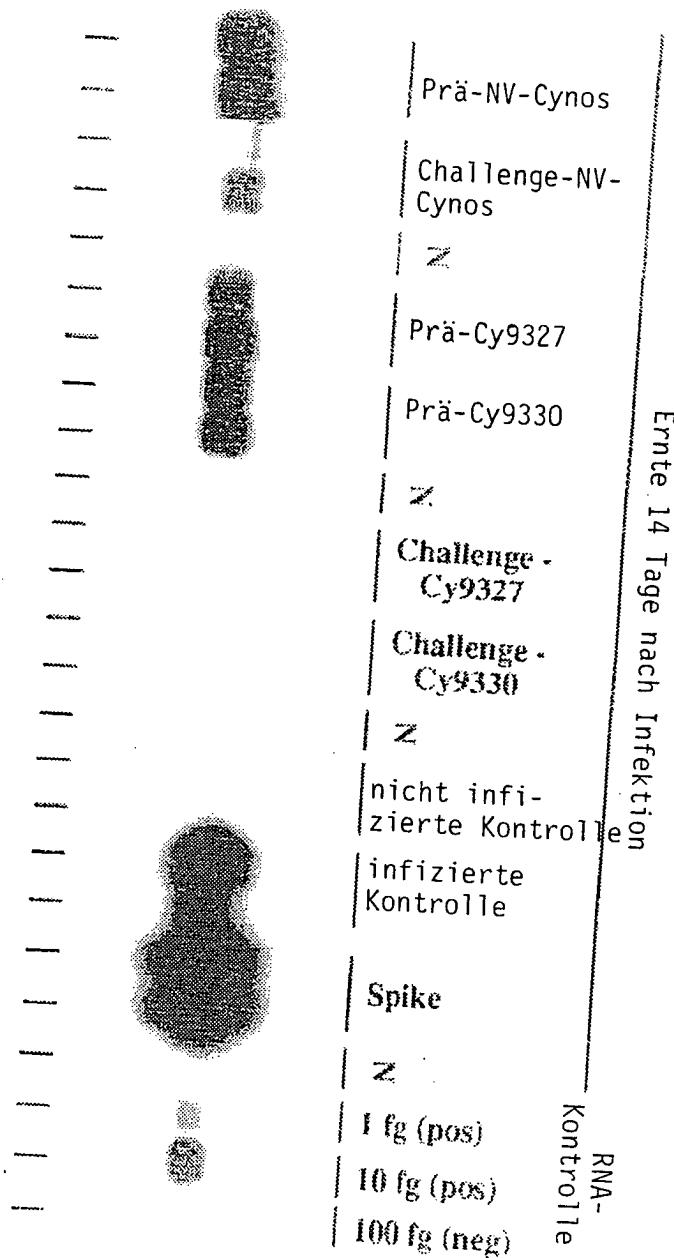


Fig. 15