PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 5 :
C07K 7/04, G01N 33/576
A61K 39/29

A2

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 93/01210

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 21. Januar 1993 (21.01.93)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP92/01468

(22) Internationales Anmeldedatum: 30. Juni 1992 (30.06.92)

(30) Prioritätsdaten:

P 41 22 160.5	4. Juli 1991 (04.07.91)	DE
P 41 41 304.0	14. Dezember 1991 (14.12.91)	DE
P 42 09 215.9	21. März 1992 (21.03.92)	DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten ausser US):* BOEHRINGER MANNHEIM GMBH [DE/DE]; Sandhoferstr. 116, D-6800 Mannheim 31 (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US) :* SEIDEL, Christoph [DE/DE]; Steinstr. 6 B, D-8120 Weilheim (DE). EHRLICH-WEINREICH, Gertraud [DE/DE]; Jahnstr. 2, D-8032 Gräfeling (DE). BAYER, Hubert [DE/DE]; Am Ölschlag 2, D-8120 Weilheim (DE). WIENHUES, Ursula-Henrike [DE/DE]; Schleissheimerstr. 205, D-8000 München 40 (DE). JUNG, Günther-Gerhard [DE/DE]; Ob der Grafenhalde 5, D-7400 Tübingen (DE). IHLENFELDT, Hans, Georg [DE/DE]; Weilerhalde 22, D-7400 Tübingen (DE).

(74) Anwälte: FOUQUET, Herbert usw. ; Boehringer Mannheim GmbH, Sandhoferstr. 116, D-6800 Mannheim 31 (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, JP, KR, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LU, MC, NL, SE).

Veröffentlicht
Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

(54) Title: HCV peptide-antigens and a method of testing for the hepatitis C virus (HCV)

(54) Bezeichnung: HCV PEPTIDANTIGENE UND VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG VON HCV

(57) Abstract

Described are new HCV peptide antigens representing part-sequences of C-100-3 and the env/core, including the C-region. These peptide antigens are suitable for use in testing for HCV antibodies, as immunogens in the production of antibodies against HCV and as vaccines against HCV.

(57) Zusammenfassung

Es werden neue HCV Peptidantigene, die Teilsequenzen des C-100-3 und env/core mit C-Bereich darstellen, beschrieben. Diese Peptidantigene sind zur Bestimmung von HCV-Antikörpern als Immunogene zur Herstellung von Antikörpern gegen HCV und als Vakzine zur Herstellung von Impfstoffen gegen HCV geeignet.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	FI	Finnland	MN	Mongolei
AU	Australien	FR	Frankreich	MR	Mauritanien
BB	Barbados	GA	Gabon	MW	Malawi
BE	Belgien	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GN	Guinea	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	GR	Griechenland	PL	Polen
BJ	Benin	HU	Ungarn	RO	Rumänien
BR	Brasilien	IE	Irland	RU	Russische Föderation
CA	Kanada	IT	Italien	SD	Sudan
CF	Zentrale Afrikanische Republik	JP	Japan	SE	Schweden
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SN	Senegal
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SU	Soviet Union
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	TD	Tschad
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	TG	Togo
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DE*	Deutschland	MC	Monaco		
DK	Dänemark	MG	Madagaskar		
ES	Spanien	ML	Mali		

HCV Peptidantigene und Verfahren zur Bestimmung von HCV

Die Erfindung betrifft neue HCV Peptidantigene, ein Verfahren zur Herstellung dieser Peptidantigene, sowie ein Verfahren zur Bestimmung von HCV unter Verwendung der Peptidantigene.

Das Vorkommen von Virushepatitis in Abwesenheit serologischer Marker von bisher bekannten hepatotropen Agenzien (z.B. Hepatitis-A-Virus, Hepatitis-B-Virus, Hepatitis-A-Virus, Cytomegalie-Virus und Epstein-Barr-Virus) wird als Non-A, Non-B-Hepatitis (NANB-Hepatitis) bezeichnet. NANB-Hepatitis wird wiederum unterteilt in parenteral und sporadisch übertragene Non-A, Non-B-Hepatitis und enteral übertragene Non-A, Non-B-Hepatitis. Für die parenteral und sporadisch übertragene NANB-Hepatitis wurde vor kurzem das ursächliche Agenz, das Hepatitis-C-Virus (HCV) isoliert (Choo Q.-L. et. al. Science 244 (1989) 359 - 362 und Kuo, G. et. al. Science 244 (1989) 362 - 364).

HCV ist weltweit eine wichtige Ursache von NANB-Hepatitis und wird durch kontaminiertes Blut oder Blutprodukte, Blutübertragungen oder durch engen persönlichen Kontakt übertragen.

Die Aminosäuresequenz der HCV-Virusproteine ist aus EP-A 0 318 216, EP-A 0 363 025, EPA 388 232 und EP-A 0 396 748 bekannt. Das Genom des HCV hat eine Länge von 10,862 nt. Die durch Translation hervorgehenden Proteine besitzen eine

Gesamtlänge von ca. 3000 Aminosäuren. Die Proteine lassen sich in Strukturproteine (Hülle- und Kernproteine) und Nicht-Strukturproteine (NS1 - NS5) einteilen.

Die Bestimmung von HCV erfolgt zweckmäßig dadurch, daß durch immunologische Tests Antikörper gegen in Körperflüssigkeiten HCV nachgewiesen werden. Für derartige immunologische Tests werden deshalb Bindepartner für Anti-HCV-Antikörper benötigt.

So ist es bekannt, in immunologischen Tests beispielsweise das nicht-strukturelle C 100-3-HCV-Protein als Bindepartner zu verwenden (Tests von ABBOTT LABORATORIES, USA und ORTHO DIAGNOSTIC SYSTEMS INC., USA; Science 244 (1989) 359 - 364; Van der Poel C. L. et. al. Lancet 337(1991)317; Alter H.J. J. Gastroent. Hepatol. (suppl.) 1990, 78).

Nachteil dieser Tests ist, daß als Antigen ein rekombinantes Protein verwendet wird. Proteine sind wegen ihrer Denaturierungsanfälligkeit und damit verringerter Löslichkeit und Funktion in diagnostischen Tests schwer zu handhaben. Auch die Größe des Meßsignals ist aufgrund der niedrigen Epitopdichte auf einem Protein geringer als bei einem Test, bei dem ein kurzkettiges Peptidantigen als Bindepartner des Antikörpers verwendet wird. Weiter können bei Verwendung von Proteinen oder langkettigen Peptiden als Antigene in einem immunologischen Test vermehrt Kreuzreaktivitäten und unspezifische Bindungen von Antikörpern auftreten. Reaktionen mit Proteinen sind zudem oft diffusionskontrolliert, was den erwünschten kurzen Zeiten für immunologische Tests entgegensteht. Außerdem ist die Herstellung von für die Diagnostik einsetzbarem Protein in ausreichender Menge und Qualität zeitraubend und kostenintensiv. Peptide sind durch Synthese leicht zugänglich und sind definierte Moleküle.

Es ist demzufolge vorteilhaft, in einem immunologischen Test auf Anti-HCV-Antikörper möglichst kurzkettige Peptidantigene, die nur Ausschnitte der gesamten Proteine darstellen, zu verwenden. Ein derartiges immunologisches Verfahren ist von Okamoto (Japan J. Exp. Met. 60 (1990) 223 - 234) beschrieben. Es hat sich jedoch gezeigt, daß das dort beschriebene kurzkettige Peptidantigen (Sequenz 9), welches aus der core-Region stammt, nicht ausreichend sensitiv für HCV ist.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es deshalb, Peptidantigene zur Verfügung zu stellen, die spezifisch für Anti-HCV-Antikörper sind und für immunologische Tests auf Anti-HCV-Antikörper geeignet sind.

Diese Aufgabe wird gelöst durch die Peptidantigene der Sequenzen

1: SerGlyLysProAlaIleIleProAspArgGluValLeuTyrArgGluPheAsp
2: GluCysSerGlnHisLeuProTyrIleGluGlnGlyMetMetLeuAlaGluGlnPheLysGlnLysAlaLeuGlyLeuLeuGlnThrAlaSerArgGln
3: AlaValGlnThrAsnTrpGlnLysLeuGluThrPheTrpAlaLysHisMetTrpAsn
4: AsnProLysProGlnLysLysAsnLysArgAsnThrAsnArgArg
5: AsnProLysProGlnArgLysThrLysArgAsnThrAsnArgArg
6: ProGlnAspValLysPheProGlyGlyGlyGlnIleValGlyGlyVal
7: ProArgGlySerArgProSerTrpGlyProThrAspProArgArg
8: GlnLeuPheThrPheSerProArgArgHisTrpThrThrGlnGlyCysAsnCysSerIleTyrProGlyHisIleThrGlyHisArgMetAlaTrpAspMetMetMetAsnTrpSerProThrThrAlaLeuValMetAla
10: GlnLysLysAlaAlaArgAsnThrAsnArgArg
11: HisTrpThrThrGlnGlySerAsnSerSerIleTyrProGlyHis
12: SerSerIleTyrProGlyHisIleThrGlyHisArgMetAlaTrpAspMetMet
13: ProGluGlyArgThrTrpAlaGlnProGlyTyrProTrpProLeuTyr

oder Peptidantigene, die Teilsequenzen dieser Peptidantigene von mindestens vier, vorzugsweise von mindestens sieben, Aminosäuren Länge darstellen.

Geeignete Teilsequenzen sind in den Sequenzprotokollen dargestellt und mit Buchstaben/Zahl-Kombinationen (z.B. 6 a, 2 b) bezeichnet.

Besonders bevorzugte Teilsequenzen sind:

aus Sequenz 2:

GluCysSerGlnHisLeuProTyrIleGluGlnGlyMetMetLeu
(Sequenz 2a)

MetMetLeuAlaGluGlnPheLysGlnLysAlaLeuGlyLeuLeuGlnThrAla
(Sequenz 2b)

MetMetLeuAlaGluGlnPheLysGlnLysAlaLeuGlyLeuLeuGlnThrAlaSerArg
Gln (Sequenz 2c)

HisLeuProTyrIleGlu (Sequenz 2d)

Ser Gln His Leu Pro Tyr Ile Glu Gln (Sequenz 2e)

Lys Ala Leu Gly Leu Leu Gln (Sequenz 2f)

Gln Lys Ala Leu Gly Leu Leu Gln Thr (Sequenz 2g)

aus Sequenz 4:

Lys Asn Lys Arg Asn Thr Asn Arg Arg (Sequenz 4a)

aus Sequenz 6:

ProGlnAspValLysPheProGlyGlyGlyGlnIle (Sequenz 6a)

Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Phe (Sequenz 6b)

Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val (Sequenz 6d)

Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly (Sequenz 6e)

Besonders bevorzugt werden Teilsequenzen, deren Länge maximal 9 Aminosäuren beträgt. Insbesondere sind dies die Sequenzen 6b, 6d, 6e, 2e, 2f, 2d, 2g, 4a.

Die Peptidantigene mit den Sequenzen 1 - 3 sind im C 100-3-Bereich der HCV-Proteine und die Peptidantigene mit den Sequenzen 4 - 8, 10 - 13 im env/core-Bereich der HCV-Proteine enthalten. Die erfindungsgemäßen Peptidantigene mit den Sequenzen 1 - 8, 10 - 13 und das Peptidantigen der Sequenz 9 (ArgGlyProArgLeuGlyValArgAlaThrArgLysThrSerGluArgSerGln-ProArgGlyArgArgGlnProIleProLysAlaArgArgProGluGlyArgThr-TrpAlaGlnProGlyTyrProTrpPro, Okamoto loc. cit) sind durch die Sequenzprotokolle SEQ ID NO: 1 - 32 beschrieben.

Die Durchführung eines Anti-HCV-Antikörper-Nachweis erfolgt nach den dem Fachmann geläufigen Methoden. Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist deshalb ein Verfahren zur Bestimmung von HCV-Antikörpern, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß die Probe mit einer Kombination von mindestens zwei Peptidantigenen aus der Gruppe der Sequenzen 1 - 13 oder Peptid-antigenen, die Teilsequenzen dieser Peptidantigene von mindestens vier, vorzugsweise von mindestens 7, Aminosäuren Länge darstellen, inkubiert und unter Bedingungen, die die Bildung eines Antikörper-Antigenkomplexes ermöglichen, die Menge der ~~an~~ das Peptidantigen gebundenen Anti-HCV-Antikörper bestimmt wird.

Erfindungsgemäß wird eine Kombination von mindestens zwei der erfindungsgemäßen Peptidantigene oder Teilsequenzen davon verwendet. Besonders bevorzugt ist es, die Peptidantigene der Sequenzen 1 - 3 oder Teilsequenzen davon mit mindestens einem Peptidantigen aus der Gruppe der Sequenzen 4 - 13 oder Teilsequenzen davon zu kombinieren.

Geeignete Teilsequenzen von Sequenz 9 sind:

ArgGlyProArgLeuGlyValArgAlaThrArgLysThrSerGlnArgSerGlnProArg Gly (Sequenz 9a)

SerGlnProArgGlyArgArgGlnProIleProLysAlaArgArgProGluGlyArgThr (Sequenz 9b).
Lys Ala Arg Arg Pro Glu Gly Arg Thr Trp Ala Gln Pro Gly Tyr (Sequenz 9c)
Die Kombination der Antigene kann beispielsweise dadurch erfolgen, daß mehrere einzelne Peptidantigene verwendet werden oder daß Peptidantigene kovalent, zweckmäßig über eine Aminosäurenbrücke, die sich von natürlicherweise in HCV-Proteinen vorkommenden Aminosäuren-Sequenzfolgen unterscheidet oder einen Peptid-Linker, aneinander gebunden sind.

Besonders bevorzugt sind Kombinationen der Antigene:

Sequenz 2b, 4 und 6
Sequenz 2b, 2c, 4 und 6
Sequenz 2a, 2b, 2c, 4 und 6
Sequenz 2a, 2b, 2c, 4, 6, 9a und 9b
Sequenz 2a, 2b, 4, 6, 9a und 3
Sequenz 2a, 2b, 4, 6 und 9a
Sequenz 2e, 2g, 4a, 6d, 6e
Sequenz 2d, 2f, 4a, 6c, 9c
Sequenz 11, 12, 8a

In Kombinationen werden die Antigene bevorzugt in etwa gleichen molaren Mengen verwendet.

Die Kombination der Antigene mit den Sequenzen 11, 12, 8a ist besonders geeignet zur Erkennung von Seren von Patienten, bei denen eine HCV-Infektion ausgeheilt ist (Rekonvaleszenzseren).

Vorzugsweise werden die Antigene einzeln, ohne kovalente Bindung aneinander, oder kovalent aneinander gebunden unter Verwendung eines Peptid-Linkers eingesetzt.

Auf Grund der erhöhten Empfindlichkeit, die bei dem Infektionsparameter HCV notwendig ist, werden vorzugsweise zum Nachweis heterogene Immunoassays verwendet. Diese heterogenen Tests erlauben Waschschritte, die den Meßsignal-Hintergrund erheblich reduzieren wodurch die Empfindlichkeit gesteigert wird.

Beispielsweise kann die Bestimmung durch einen Radio-Immunoassay, Enzym-Immunoassay oder durch Immunfloureszenz erfolgen. Üblicherweise wird hierzu das Peptidantigen immobilisiert. Die Probe, welche auf Anti-HCV-Antikörper untersucht werden soll, wird zugegeben und die an das Antigen gebundenen Antikörper über einen markierten Anti-Human-Immunglobulin-Antikörper bestimmt. Die Immobilisierung des erfindungsgemäßen Peptidantigens kann adsorbtiv, kovalent oder über ein biologisches Bindungspaar wie Biotin/Streptavidin, Antikörper/Antigen, oder Zucker/Lektin erfolgen. Dabei wird das Peptidantigen an diesen Partner kovalent gebunden.

Die erfindungsgemäßen Peptidantigene können für Immunoassays vorzugsweise nach dem Fachmann geläufigen Methoden, beispielsweise an Kugeln (beads), Kunststoffröhrchen oder Mikrotiterplatten (bevorzugt Polystyrol oder Copolymere von Polystyrol), immobilisiert werden. Dies erfolgt vorzugsweise dadurch, daß das Peptidantigen unspezifisch an der Oberfläche adsorbiert oder kovalent an funktionalisierte oder aktivierte Oberflächen gebunden wird. Die unspezifische Adsorption kann dadurch verbessert werden, daß man das Peptidantigen mit einem Protein zu einem Konjugat verknüpft und dieses Konjugat zur Adsorption verwendet (vgl. z.B. EP-A 0 269 092). Die Bin-

dung kann auch über einen immobilisierten Antikörper erfolgen. Dazu sollte das Peptidantigen so verändert werden, daß das Epitop nicht durch die Bindung des Antikörpers blockiert wird z.B. durch Bildung eines Peptid-Protein-Konjugats.

Die Konjugation des Peptidantigens an den Bindungspartner erfolgt vorzugsweise über einen Spacer. Dieser Spacer enthält zweckmäßig 10 - 50, vorzugsweise 10 - 30 Atome und ist ebenfalls bevorzugt ein im wesentlichen lineares Molekül. Beispiele hierfür sind Spacer aus Alkyl-, Polyether- oder Polyamidketten. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist ein Peptidantigen einer Länge von 4 - 9 Aminosäuren über einen linearen Spacer von 10 - 30 Atomen an den Träger gebunden. Falls ein Spacer aus Aminosäuren verwendet werden soll, besteht dieser zweckmäßig aus Aminosäuren, die nicht der Sequenzfolge in unmittelbarer Umgebung des Peptidantigens im HCV-Gen entsprechen.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird das erfindungsgemäße Peptidantigen kovalent an Biotin gebunden, wobei die Immobilisierung über eine Avidin/Streptavidin-Festphase erfolgt.

Ebenso geeignet sind Bestimmungsverfahren, bei denen die Detektion nicht über einen markierten Antikörper, sondern über ein markiertes, weiteres Peptidantigen Sequenzen 1 - 13 oder Teilsequenzen davon erfolgt.

Die Herstellung der erfindungsgemäßen Peptidantigene ist nach den dem Fachmann geläufigen Methoden zur Peptidsynthese möglich. Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist deshalb ein Verfahren zur Herstellung des erfindungsgemäßen Peptidantigens, welches darin besteht, daß die das C-terminale Ende

bildende Aminosäure an einen Träger gebunden wird, vom C-terminalen Ende das Peptidantigen schrittweise aufgebaut und anschließend vom Träger abgespalten wird.

Im einzelnen wird dazu eine Aminosäure beispielsweise über ihre Carboxygruppe an ein unlösliches, leicht filtrierbares Polymer geknüpft, und dann vom C-terminalen Ende her die Peptidkette schrittweise aufgebaut. Zu diesem Zweck wird eine N-geschützte Aminosäure mit einer reaktiven Gruppierung des Kunstharzes zur Reaktion gebracht. Von der am Trägerpartikel kovalent verankerten Aminosäure wird die Nα-Schutzgruppe entfernt und das resultierende Aminoacylpolymer mit der nächsten N-geschützten Aminosäure umgesetzt. Von dem am Trägerharz kovalent gebundenen Dipeptid wird die Nα-Schutzgruppe entfernt und das resultierende Aminoacylpolymer mit der nächsten N-geschützten Aminosäure umgesetzt. Alle überschüssigen Reagentien und Beiprodukte werden durch einfaches Filtrieren entfernt.Ist die gewünschte Peptidsequenz auf diese Weise hergestellt, wird die kovalente Bindung zwischen der C-terminalen Aminosäure und der Ankergruppierung des polymeren Trägers gespalten. Der unlösliche Träger wird durch einfache Filtration von dem nun in Lösung befindlichen Peptid entfernt. Das Peptid wird mittels chromatographischer Methoden gereinigt.

Beispielsweise können die erfindungsgemäßen Peptidantigene nach Merrifield, JACS 85(1964)2146 hergestellt werden. Eine gegebenenfalls erforderliche Biotinylierung kann beispielsweise nach PNAS USA 80 (1983) 4045 erfolgen. Ein bevorzugtes Biotinylierungsmittel hierfür ist Biotinylaminocapronsäure-N-hydroxysuccinimidester.

Ein bevorzugtes Verfahren zur Herstellung von biotinylierten Peptidantigenen ist die Einführung des Biotinrestes am N-Terminus während einer Festphasensynthese des Peptidantigens.

Dieses Verfahren wird bevorzugt dann verwendet, wenn das Peptidantigen mehrere ϵ-Lysin-Aminogruppen enthält, die nicht biotinyliert werden sollen. Dies ist beispielsweise dann der Fall, wenn man N-α-Fmoc-N-ϵ-biotinyl-aminocaproyl)lysin, N-α-Fmoc-N-ϵ-Biotinyllysin oder bei Biotinylierung der N-terminalen Aminosäuren Biotin, Biotinylaminocapronsäure oder Dimethoxytritylbiotin mit einem Aktivierungsreagenz wie zum Beispiel Dicyclohexylcarbodiimid oder als Aktivester einsetzt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird ein Nachweisantikörper der beispielsweise gegen den Fc-Teil von humanem IgG gerichtet ist, immobilisiert. Vorzugsweise wird hierzu ein monoklonaler Antikörper verwendet. Das Peptidantigen befindet sich dann in Lösung. Der nachzuweisende Antikörper (Analyt) und auch alle anderen Antikörper der Probenflüssigkeit werden vom Wandantikörper gebunden. Der gebundene Antikörper kann dann den Analyten binden, der mit einem geeigneten Nachweissystem, z.B. kompetitiv mit einem Peptidantigen-Enzymkonjugat nachgewiesen werden kann.

Mit den erfindungsgemäßen Peptidantigenen ist es auch möglich, durch die dem Fachmann geläufigen Verfahren der Immunisierung Antikörper zu erhalten, mit denen das Virus selbst in einem immunologischen Test nachgewiesen werden kann.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist deshalb ein Verfahren zur Herstellung von Antikörpern, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß ein Säugetier mit einem erfindungsgemäßen Peptid, welches gegebenenfalls an einen Träger gebunden ist, immunisiert wird und die Antikörper nach bekannten Verfahren z.B. aus dem Serum oder der Milz gewonnen werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden B-Lymphozyten der immunisierten Tiere in Gegenwart von transformierenden Agen-

zien mit einer geeigneten Zellinie fusioniert, die Zellinie, welche die gewünschten Antikörper produziert, kloniert und kultiviert und aus den Zellen oder dem Kulturüberstand die monoklonalen Antikörper gewonnen.

Mit diesem Antikörper ist es möglich, HCV-Viren direkt zu bestimmen. Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist deshalb ein Verfahren zur Bestimmung von HCV-Viren, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß die Probe mit einem erfindungsgemäßen Antikörper unter Bedingungen, die eine Antigen-Antikörperkomplexbildung erlauben, inkubiert, und die Menge des gebildeten Antikörper-Antigenkomplexes bestimmt wird.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von Impfstoffen unter Verwendung der erfindungsgemäßen Peptidantigene sowie ein Vakzin zur Behandlung von HCV-Infektionen, enthaltend als Immunogen ein gegebenenfalls trägergebundenes Peptidantigen der Sequenzen 1 - 8, 10 - 13 oder Teilsequenzen davon oder mindestens zwei Peptidantigene der Sequenzen 1 - 13 oder Teilsequenzen davon in einer pharmakologisch effektiven Dosis und in einer pharmazeutisch akzeptablen Formulierung.

Die Herstellung dieser Impfstoffe kann nach den bekannten Methoden durchgeführt werden. Bevorzugt werden jedoch die Peptidantigene zunächst lyophilisiert und anschließend, ggf. unter Zusatz von Hilfsstoffen, suspendiert.

Die Impfung mit dem erfindungsgemäßen Vakzin oder Vakzinkombinationen kann durch die dem Fachmann geläufigen Methoden erfolgen, beispielsweise intradermal, intramuskulär, intraperitoneal, intravenös, subkutan und intranasal.

Zur intramuskulären oder subkutanen Gabe kann das Vakzin beispielsweise in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert

sein. Zur intranasalen oder intraoccularen Applikation kann das Vakzin, beispielsweise in Form eines Sprays oder einer wäßrigen Lösung angewendet werden. Für lokale, beispielsweise orale Gabe ist es häufig erforderlich, die Immunogene zeitweise gegen Inaktivierung zu schützen, beispielsweise gegen proteolytische Enzyme in der Mundhöhle oder im Magen. Ein derartiger vorübergehender Schutz kann beispielsweise durch Verkapselung der Immunogene erfolgen. Diese Verkapselung kann beispielsweise durch Überziehen mit einem Schutzmittel (Mikroverkapselung) oder bei Einbettung einer Vielzahl von erfindungsgemäßen Immunogenen in einen schützenden Träger (Makroverkapselung) erfolgen.

Das Verkapselungsmaterial kann semipermiabel sein oder beim Einbringen in den menschlichen oder tierischen Körper semipermeabel werden. Üblicherweise wird für die Verkapselung eine biologisch abbaubare Substanz als Träger verwendet.

Die nachfolgenden Beispiele und Sequenzprotokolle erläutern die Erfindung weiter.

In den Sequenzprotokollen bedeuten:

Sequenz	SEQ ID NO
1	1
2	2
2 a	3
2 b	4
2 c	5
2 d	6
2 e	7
2 f	8
2 g	9
2 h	10

Sequenz	SEQ ID NO
3	11
4	12
4 a	13
4 b	14
5	15
6	16
6 a	17
6 b	18
6 c	19
6 d	20
6 e	21
7	22
8	23
8 a	24
9	25
9 a	26
9 b	27
9 c	28
10	29
11	30
12	31
13	32

Beispiel 1

Synthese von H-ProArgGlySerArgProSerTrpGlyProThrAspProArgArg-OH

Das Peptid wurde mittels Fmoc(Fluorenyloxycarbonyl)-Festphasensynthese hergestellt. Die Reaktionen wurden an einem Labortec (Schweiz) SP 640 Peptidsynthesizer durchgeführt. Die Kupplungsreaktionen wurden bezüglich Fmoc-Aminosäure-Derivat

mit 2.4 Äquivalenten Dicyclohexylcarbodiimid und 2.2 Äquivalenten N-Hydroxybenzotriazol während 90 Minuten durchgeführt. Als Reaktionsmedium kam Dimethylformamid zum Einsatz. Die Fmoc-Gruppe wurde mittels 20 % Piperiden in DMF in 10 und 20 Minuten abgespalten. 2.0 Äquivalente von den folgenden Aminosäure-Derivaten kamen zum Einsatz: Pro, Arg(mit PMC (Pentamethylchroman)-Schutzgruppe), Gly, Ser(mit tert.-Butyl-Schutzgruppe), Trp, Thr(mit tert.-Butyl-Schutzgruppe), Asp(mit tert.-Butylester-Schutzgruppe). Die Kupplungsreaktionen wurden mit der Hälfte der Reagentien wiederholt. Der Kupplungserfolg wurde mittels Kaiser-Test (Anal. Biochemistry 34(1970)595) geprüft, die Harzbeladung wurde mittels UV-Absorption der freigesetzten Fulven-Gruppe nach jeder Piperidin-Spaltung ermittelt. Das Peptid wurde an 5 g Wang-Harz (Polystyrol/1 % Divinylbenzol) mit einer Ladung von 0.50 mMol/g synthetisiert (JACS 95(1973)1328). Nach der Synthese betrug der Beladungsgrad noch 0.39 mMol/g.

Die Freisetzung des Peptids wurde mit 200 ml Trifluoressigsäure, 200 ml Dichlormethan, 10 ml Ethandithiol, 10 ml m-Kresol, 5 ml Ethylmethylsulfid und 5 ml Wasser in 30 Minuten bei Raumtemperatur. Die Abspaltlösung wurde mehrmals mit Toluol eingeengt, dann das Peptid mit Diethylether gefällt.

Zur Entfernung der Scavenger und anderer kleiner Moleküle wurde das Rohmaterial über eine Sephadex G10-Säule gereinigt. Es wurden nach Lyophilisieren 3.2 g Material einer Reinheit von 42 % (RP-HPLC) erhalten. Um das Material auf die Endreinheit von >95 % zu bringen, wurden 400 mg Peptid über eine präparative RP-HPLC-Säule (40mmx250mm) gefüllt mit C18-Material (5 Mikrometer, 300 Angström) und einem Wasser/Trifluoressigsäure-, Acetonitril/Trifluoressigsäure-Gradienten gereinigt. Es fielen nach Lyophilisation 118 mg 96.5 %iges (HPLC) weißes Material an. Die Identität des Materials wurde mittels FAB-MS geprüft.

Beispiel 2

Zur Biotinylierung des Peptidantigens aus Beispiel 1 wurde ein Moläquivalent möglichst konzentriert (Löslichkeit ist von der Aminosäuresequenz abhängig) in Argon-gesättigtem Kaliumphosphatpuffer (0,1 mol/l, pH 8,0) gelöst und mit 3 Äquivalenten D-Biotinyl-ϵ-aminocapronsäure-N-hydroxysuccinimidester gelöst in Argon-gesättigtem Dimethylformamid (Lösung von 1 µmol Reagenz in 5 µl DMF) versetzt.

Man rührte das Reaktionsgemisch 2 Stunden bei Raumtemperatur unter Argon unter ständiger Kontrolle mittels analytischer RP-HPLC. Wenn < 5% Edukt vorhanden waren, wurde der Reaktionsansatz direkt auf eine präparative RP-HPLC-Säule gegeben und das Produktmaterial mittels einem 0.1% Trifluoressigsäure/Wasser- zu 0.1% Trifluoressigsäure/ Acetonitril-Gradienten (Steigung: 0% auf 100% in 90 Minuten) gereinigt. Das Produktmaterial wurde durch Einengen und Lyophilisation der Produktfraktionen erhalten. Die Ausbeuten lagen zwischen 40 % und 90%. Als Analytik dienten für die Reinheit HPLC, HPCE und TLC, für die Identität FAB-MS (Molpeak) und TLC mit spezifischen Anfärbereagentien (p-Dimethylaminozimtaldehyd auf Biotin) und Gehaltsbestimmung über Mikroanalyse (Nitrogen).

Beispiel 3

HCV-Antikörper werden in einem 2-Schritt-Sandwich-Immunoassay bestimmt. Zum Nachweis werden die Reagentien mit folgender

Zusammensetzung verwendet:

Reagenz 1:
0.10 µg/ml (Peptidantigene 1,3,4,5,6) oder 0.25 µg/ml (Peptidantigene 2,4,7), biotinyliertes Peptidantigen oder eine 1:1 Mischung solcher Peptidantigene

40 mmol/l Phosphatpuffer pH 7.0
0.9 Gew.-% NaCl
10 Vol.-% Rinderserum

Reagenz 2:
20 mU/ml eines Konjugats aus polyklonalem Antikörper gegen humanes Immunglobulin (Schaf) und Peroxidase

40 mmol/l Phosphatpuffer pH 7.0
0.05 Gew.-% Tween® 20

0.2% Rinderserumalbumin
0.2% Rinder-IgG

In einem mit Streptavidin beschichteten Polystyrolröhrchen (hergestellt nach Beispiel 1 von EP-A 0 344 578) werden 1 ml Reagenz 1 und 10 µl Probe eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird dreimal mit Leitungswasser gewaschen und mit 1 ml Reagenz 2 für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird dreimal mit Leitungswasser gewaschen. Zur Nachweisreaktion werden 1 ml ABTS® (2,2'-Azino-di-[3-ethyl-benzthiazolinsulfonat(6)]-Diammoniumsalz, 1,9 mmol/l, in 100 mmol/l Phosphatcitratpuffer pH 4.4 mit 3.2 mmol/l Natrium-perborat) zugegeben. Nach 60 min wird die Extinktion bei 420 nm photometrisch gemessen. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 1:

Tabelle 1:

Serum	Peptidantigene (Sequenz Nr.)										
	9	1	2	3	4	5	6	7	8	1+4	3+6
1	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
2	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+
3	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+
4	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
5	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+
6	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
7	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+

Erläuterungen zu Tabelle 1:

-/+: negativ/positiv (Der Cutoff für ein positives Signal im ELISA ist definiert als die mittlere Extinktion bei 420 nm plus 3 Standardabweichungen eines Kollektivs von 10 negativen Kontrollseren. Die Proben wurden bei einer Probenverdünnung von 1:250 vermessen).

Serum 1 war negativ im Test im Ortho-HCV-Antikörper ELISA-Testsystem von ORTHO DIAGNOSTIC SYSTEMS INC. jedoch positiv aufgrund des klinischen Bildes.

Die Seren 2 - 5 wurden nach dem Test von Ortho Laboratories, die Seren 6 und 7 mit dem ABBOTT HCV EIA, Kat.No. 3 A53-24, ABBOTT LABORATORIES INC. als positiv identifiziert.

Die Peptidantigene 1 - 6 wurden mit Dimethoxytrityl-Biotin festphasenbiotinyliert an der ∈-Aminogruppe eines zusätzlich N-terminal eingeführten Lysins.

Die Peptidantigenmischungen 1 + 4 und 3 + 6 wurden in einem molaren Mischungsverhältnis von 1:1 eingesetzt.

Beispiel 4

Es wurden weitere Seren mit Peptiden und Peptidmischungen in einem Zweischritt-Sandwich-Immunoassay auf mit Streptavidin beschichteten Mikrotiterplatten geprüft.

Die Durchführung der Bestimmung erfolgte weitgehend analog Beispiel 3. Dabei wurden folgende Reagentien verwendet:

Reagenz 1:

50 ng Peptid (oder die in den Tabellenerklärungen genannten Mengen) in 100 µl Inkubationspuffer (40 mmol/l Phosphatpuffer, pH 7,0, 0,9 Gew.-% NaCl, 10 Vol.-% Rinderserum.

Reagenz 2:

Konjugat aus polyklonalem Antikörper gegen humanes Immunglobulin (Schaf) und Peroxidase (Peroxidaseaktivität 20 mU/ml), 40 mmol/l Phosphatpuffer pH 7,0, 0,05 Gew.-% Tween© 20, 0,2 % Rinderserumalbumin, 0,2 % Rinder-IgG.

Waschlösung

40 mmol/l Phosphatpuffer pH 7,0, 0,9 Gew.-% Natriumchlorid, 0,05 Gew.-% Tween© 20.

Farbreagenz

10 mg ABTS©, 80 µl 0,4 % H_2O_2 in 10 ml Citrat-Phosphatpuffer (pH 4,4, 100 mmol/l).

Pro Napf (well) einer mit Streptavidin beschichteten Mikrotiterplatte werden Serum (1 : 10 verdünnt in 50 µl Inkubationspuffer und 100 µl Reagenz 1 zugegeben. Es wird eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend fünfmal mit je 200 µl Waschlösung gewaschen. Es werden 150 µl Reagenz 2 zugegeben, eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und dreimal mit je 200 µl Waschlösung gewaschen. Es werden 150 µl Farbreagenz zugegeben, eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und die Extinktion bei 420 nm photometrisch gemessen.

Die Tabellen II, III, IV, V, VI und VII zeigen die Ergebnisse.

In den Tabellen bedeuten:

Tabelle II:

Ortho: relative Größe des Meßsignals im Test von Ortho (vgl. Beispiel 3.

leeres Feld: Meßwert kleiner als zweifacher Leerwert oder identisch mit Leerwert (bestimmt mit biotinyliertem, mit HCV-Antikörpern nicht reaktivem Peptid (nonsens-Sequenz)).

voller Kreis: Meßwert dreifacher Leerwert oder größer bei 50 ng Peptid pro Napf.

leerer Kreis: Meßwert zweifacher Leerwert bei 50 ng Peptid pro Napf

volles Quadrat: Meßwert dreifacher Leerwert oder größer bei 250 ng Peptid pro Napf.

leeres Quadrat: Meßwert zweifacher Leerwert oder größer bei 250 ng Peptid pro Napf.

* : Negativkontrollen

Tabelle III

leeres Feld: wie Tabelle II

voller Kreis: Meßwert vierfacher Leerwert oder größer bei 50 ng Peptid pro Napf.

leerer Kreis: Meßwert dreifacher Leerwert oder größer bei 50 ng Peptid pro Napf.

n.t.: Messung nicht durchgeführt

2a, 2b, 3, 4, 6: Anstelle eines einzelnen Peptidantigens wurde in Reagenz 1 eine Mischung aus je 10 ng der genannten Peptide verwendet.

*: Negativkontrollen

Tabelle IV

Die Bedeutung der Symbole entspricht den Angaben zu Tabelle II.

Die Peptidmischungen enthielten jeweils 50 ng der einzelnen Peptide.

Beispiel 5:

Tabellen V, VI und VII

Ergebnisse von Immunoassays analog Beispiel 3, wobei im Reagenz 1 folgende Peptidkonzentrationen eingesetzt wurden:

Bei Verwendung von mehreren Antigenen in Kombination werden die Einsatzmengen entsprechend der Anzahl der verschiedenen Antigene reduziert.

Sequenz	2a	50 µg/ml
Sequenz	2b	50 µg/ml

Sequenz	2d	100 µg/ml
Sequenz	2f	100 µg/ml
Sequenz	2h	100 µg/ml
Sequenz	4	400 µg/ml
Sequenz	4a	350 µg/ml
Sequenz	4b	250 µg/ml
Sequenz	4c	300 µg/ml
Sequenz	6	350 µg/ml
Sequenz	6a	350 µg/ml
Sequenz	6b	350 µg/ml
Sequenz	6c	250 µg/ml
Sequenz	6d	300 µg/ml
Sequenz	8a	900 µg/ml
Sequenz	9a	350 µg/ml
Sequenz	9c	350 µg/ml
Sequenz	11	300 µg/ml
Sequenz	12	550 µg/ml

+/- : pos./neg. (Der Cutoff für ein positives Signal im Immunoassay wie Beispiel 3 ist definiert als die mittlere Extinktion bei 420 nm plus 2 Standardabweichungen eines Kollektivs von 6 negativen Kontrollseren. Die Proben sind mit Inkubationspuffer 1 : 100 verdünnt).

Tabelle II

Peptid / Seren	Ortho	C100-3 Region					Core-env-Region						Ortho
		1	2a	2c	2b	3	4	6	9a	9b	7	8	
S1	•			○			●	●	●	●	●		4
S2	2	○			○		●	●	●	●	●	○	4
S3	1	○					●	●	●	●			4
S4 (*)	•												-
S5	+/-		●	○				●					4
S6	1	●					●	●	●	○			4
S7 (*)	•												-
S8	+/-								■	□			-
S9	•			●	●		●	●	●	●			4
S1o	+/-		□										-
S11	+/-	○		●				●	●	○			3
S12	2			○	●			○					3
S13	4	●	●	●	●		●	●	●				4
S14	+/-						●	●	○				4
S15	+/-			●	●	○	●	●	●				4
S16	4		●	●	●		●	●	○	●	●	●	4
S17	4	●	○		●		●	●		●			4
S18	2							●					3
S19 (*)	+/-												-
S2o	1		□		□		■			□			+/-
S21	+/-						●	●	○	●			4
S22	•						○	●					4
S23	3		●	●	●		●	●					4
S24	4						●	●	●	●			4
S25	1	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	4
Dü1		○	●	●	●	○	●	●	●	●	●	○	
pi-421533		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	
56-138481		●	●			●	●	●	●	●	■	□	
19o71				●	○		●	●					
19o75			●	○	●	●	○		○	■	□	■	
19575		●					●	●			■		
2ooo4			○				●						
2oo69			●	●	●	○	●	●		■	□		
RS (*)													
HG (*)													
AB (*)													

(*) Negativseren

Tabelle III

Serum	Peptidantigene							
	2a	2b	3	4	6	9a		2a,2b, 3,4,6
LL485561*								
LL488301	●	●	●	●	●	●		●
LL491001*								
LL493411*								
LL496131*								
LL504111*								
FF194591*								
FF206011*								
FF200311	●	○	○	●	●	●		●
FF211511*								
FF210051	●	●						●
FF804511*								
B1	nt	●		●	○			●
B2	nt		○	●	●	○		●
B3	nt	●	●	●	●	●		●
B4	nt	○		●	●	○		●
B5	nt	●	○	●	●	●		●
B6	nt			●				●
B7	nt	●	●	●	●	●		●
B8	nt	●	●	●	●	●		●
B9	nt	●	●	●	●	●		●
B10	nt	●	●	●	●	●		●
B11								
B12	●			●				●
B13	●	●	●	●	●	●		●
B14	nt	●	●	●	●	●		●
B15	●	●		○	○	●		●
B16	●	●	○	●	●	●		●
B17	●	●	●	●	●	●		●
B18	nt	●	●	●	●	●		●
B19	nt	●	●	●	●	●		●
B20	○	○		●	●	●		●
01-421533	●	●	●	●	●	●		●
S23	●	●	○	●	●	●		●

Tabelle IV

Serum	Peptidantigene			
	2b,4,6	2b,2c,4,6	2a,2b,2c,4,6	2a,2b,2c,4,6,9a,9b,
S1	●	●	●	●
S2	●	●	●	●
S3	●	●	●	●
S4(*)				
S5	●	●	●	●
S6	●	●	●	●
S7 (*)				
S8	○			
S9	●	●	●	●
S10			○	○
S11	●	●	●	●
S12	●	●	●	●
S13	●	●	●	●
S14	●	●	●	●
S15	●	●	●	●
S16	●	●	●	●
S17	●	●	●	●
S18	●	●	●	●
S19 (*)				
S20			○	●
S21	●	●	●	●
S22	●	●	●	●
S23	●	●	●	●
S24	●	●	●	●

(*) Negativseren

Peptid / Serum	2a,2b, 4,6, 9a	2d,2f, 4a,6c, 9 c	8a,11 12
1	+	+	-
2	-	-	-
3	+	+	+
4	+	+	+
5	-	-	+
6	-	-	-
7	+	+	+
8	-	-	-
9	+	+	-
10	+	+	-
11	+	+	-
12	+	+	+
13	+	+	-
14	+	+	-
15	+	+	-
16	+	+	-
17	-	-	-
18	-	-	+
19	+	+	+
20	+	+	-
21	+	+	-
22	+	+	+
23	+	+	+
24	+	+	-
25	+	+	-
26	+	+	+
27	+	+	-
28	+	+	-
29	-	-	-
30	-	-	-
31	-	-	-
32	+	+	-
33	-	-	-
34	+	+	+
35	+	+	+

Tabelle V

Tabelle VI

Peptid / Serum	2d	2f	4a	6b	6c,6d	9c	11
1"	+	-	+	+	+	-	-
2'	+	-	+	-	-	-	-
3'	-	-	-	+	+	+	-
4'	+	-	+	+	+	-	-
5'	-	+	+	+	+	-	-
6'	-	-	-	-	-	-	-
7'	-	-	-	-	-	-	-
8'	-	-	-	-	-	-	-
9'	+	+	+	+	+	+	+
10'	-	-	-	-	-	-	-
11'	+	+	+	+	+	-	-
12'	-	-	-	+	+	+	+

Tabelle VII

Peptid / Serum	2h	4b	4c	6a
1"	+	-	-	+
2"	-	-	-	+
3"	-	+	+	-

SEQ ID NO: 1

ART DER SEQUENZ: Peptid
SEQUENZLÄNGE: 18 Aminosäuren

Ser Gly Lys Pro Ala Ile Ile Pro Asp Arg Glu Val Leu Tyr Arg
5 10 15
Glu Phe Asp

SEQ ID NO: 2

ART DER SEQUENZ: Peptid
SEQUENZLÄNGE: 33 Aminosäuren

Glu Cys Ser Gln His Leu Pro Tyr Ile Glu Gln Gly Met Met Leu
5 10 15
Ala Glu Gln Phe Lys Gln Lys Ala Leu Gly Leu Leu Gln Thr Ala
20 25 30
Ser Arg Gln

SEQ ID NO: 3

ART DER SEQUENZ: Peptid
SEQUENZLÄNGE: 15 Aminosäuren

Glu Cys Ser Gln His Leu Pro Tyr Ile Glu Gln Gly Met Met Leu
5 10 15

SEQ ID NO: 4

ART DER SEQUENZ: Peptid
SEQUENZLÄNGE: 18 Aminosäuren

Met Met Leu Ala Glu Gln Phe Lys Gln Lys Ala Leu Gly Leu Leu
5 10 15
Gln Thr Ala

SEQ ID NO: 5

ART DER SEQUENZ: Peptid
SEQUENZLÄNGE: 21 Aminosäuren

Met Met Leu Ala Glu Gln Phe Lys Gln Lys Ala Leu Gly Leu Leu
5 10 15
Gln Thr Ala Ser Arg Gln
20

SEQ ID NO: 6

ART DER SEQUENZ: Peptid
SEQUENZLÄNGE: 6 Aminosäuren

His Leu Pro Tyr Ile Glu
5

SEQ ID NO: 7

ART DER SEQUENZ: Peptid
SEQUENZLÄNGE: 9 Aminosäuren

Ser Gln His Leu Pro Tyr Ile Glu Gln
5

SEQ ID NO: 8

ART DER SEQUENZ: Peptid
SEQUENZLÄNGE: 7 Aminosäuren

Lys Ala Leu Gly Leu Leu Gln
5

SEQ ID NO: 9

ART DER SEQUENZ: Peptid
SEQUENZLÄNGE: 9 Aminosäuren

Gln Lys Ala Leu Gly Leu Leu Gln Thr
5

SEQ ID NO: 10

ART DER SEQUENZ: Peptid
SEQUENZLÄNGE: 10 Aminosäuren

Gln Lys Ala Leu Gly Leu Leu Gln Thr Ala
5 10

SEQ ID NO: 11

ART DER SEQUENZ: Peptid
SEQUENZLÄNGE: 19 Aminosäuren

Ala Val Gln Thr Asn Trp Gln Lys Leu Glu Thr Phe Trp Ala Lys
5 10 15

His Met Trp Asn

SEQ ID NO: 12

ART DER SEQUENZ: Peptid
SEQUENZLÄNGE: 15 Aminosäuren

Asn Pro Lys Pro Gln Lys Lys Asn Lys Arg Asn Thr Asn Arg Arg
5 10 15

SEQ ID NO: 13

ART DER SEQUENZ: Peptid
SEQUENZLÄNGE: 9

Lys Asn Lys Arg Asn Thr Asn Arg Arg
5

SEQ ID NO: 14

ART DER SEQUENZ: Peptid
SEQUENZLÄNGE: 10 Aminosäuren

Gln Lys Lys Asn Lys Arg Asn Thr Asn Arg
5 10

SEQ ID NO: 15

ART DER SEQUENZ: Peptid
SEQUENZLÄNGE: 15 Aminosäuren

Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Asn Arg Arg
5 10 15

SEQ ID NO: 16

ART DER SEQUENZ: Peptid
SEQUENZLÄNGE: 16 Aminosäuren

Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly Gly
5 10 15

Val

SEQ ID NO: 17

ART DER SEQUENZ: Peptid
SEQUENZLÄNGE: 12 Aminosäuren

Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile
5 10

SEQ ID NO: 18

ART DER SEQUENZ: Peptid
SEQUENZLÄNGE: 9 Aminosäuren

Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Phe
5

SEQ ID NO: 19

ART DER SEQUENZ: Peptid
SEQUENZLÄNGE: 12 Aminosäuren

Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val
5 10

SEQ ID NO: 20

ART DER SEQUENZ: Peptid
SEQUENZLÄNGE: 9 Aminosäuren

Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val
5

SEQ ID NO: 21

ART DER SEQUENZ: Peptid
SEQUENZLÄNGE: 9 Aminosäuren

Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly
5

SEQ ID NO: 22

ART DER SEQUENZ: Peptid
SEQUENZLÄNGE: 15 Aminosäuren

Pro Arg Gly Ser Arg Pro Ser Trp Gly Pro Thr Asp Pro Arg Arg
5 10 15

SEQ ID NO: 23

ART DER SEQUENZ: Peptid
SEQUENZLÄNGE: 47 Aminosäuren

Gln Leu Phe Thr Phe Ser Pro Arg Arg His Trp Thr Thr Gln Gly
5 10 15
Cys Asn Cys Ser Ile Tyr Pro Gly His Ile Thr Gly His Arg Met
20 25 30
Ala Trp Asp Met Met Met Asn Trp Ser Pro Thr Thr Ala Leu Val
35 40 45
Met Ala

SEQ ID NO: 24

ART DER SEQUENZ: Peptid
SEQUENZLÄNGE: 18 Aminosäuren

Met Ala Trp Asp Met Met Met Asn Trp Ser Pro Thr Thr Ala Leu
5 10 15
Val Met Ala

SEQ ID NO: 25

ART DER SEQUENZ: Peptid
SEQUENZLÄNGE: 45 Aminosäuren

Arg Gly Pro Arg Leu Gly Val Arg Ala Thr Arg Lys Thr Ser Glu
5 10 15
Arg Ser Gln Pro Arg Gly Arg Arg Gln Pro Ile Pro Lys Ala Arg
20 25 30
Arg Pro Glu Gly Arg Thr Trp Ala Gln Pro Gly Tyr Pro Trp Pro
35 40 45

SEQ ID NO: 26

ART DER SEQUENZ: Peptid
SEQUENZLÄNGE: 21 Aminosäuren

Arg Gly Pro Arg Leu Gly Val Arg Ala Thr Arg Lys Thr Ser Glu
5 10 15
Arg Ser Gln Pro Arg Gly
20

SEQ ID NO: 27

ART DER SEQUENZ: Peptid
SEQUENZLÄNGE: 20 Aminosäuren

Ser Gln Pro Arg Gly Arg Arg Gln Pro Ile Pro Lys Ala Arg Arg
5 10 15
Pro Glu Gly Arg Thr
20

SEQ ID NO: 28

ART DER SEQUENZ: Peptid
SEQUENZLÄNGE: 15 Aminosäuren

Lys Ala Arg Arg Pro Glu Gly Arg Thr Trp Ala Gln Pro Gly Tyr
5 10 15

SEQ ID NO: 29

ART DER SEQUENZ: Peptid
SEQUENZLÄNGE: 11 Aminosäuren

Gln Lys Lys Ala Ala Arg Asn Thr Asn Arg Arg
5 10

SEQ ID NO: 30

ART DER SEQUENZ: Peptid
SEQUENZLÄNGE: 15 Aminosäuren

His Trp Thr Thr Gln Gly Ser Asn Ser Ser Ile Tyr Pro Gly His
5 10 15

SEQ ID NO: 31

ART DER SEQUENZ: Peptid
SEQUENZLÄNGE: 18 Aminosäuren

Ser Ser Ile Tyr Pro Gly His Ile Thr Gly His Arg Met Ala Trp
5 10 15
Asp Met Met

SEQ ID NO: 32

ART DER SEQUENZ: Peptid
SEQUENZLÄNGE: 16 Aminosäuren

Pro Glu Gly Arg Thr Trp Ala Gln Pro Gly Tyr Pro Trp Pro Leu
5 10 15
Tyr

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. HCV Peptidantigene mit den Aminosäuresequenzen SEQ ID NO: 1, 2, 11, 12, 15, 16, 22, 23, 29-32 oder mit Teilsequenzen davon mit mindestens 4 Aminosäuren Länge.

2. HCV Peptidantigene nach Anspruch 1 mit Teilsequenzen von maximal 9 Aminosäuren Länge.

3. HCV Peptidantigene nach Anspruch 2 mit den Teilsequenzen

4. HCV Peptidantigene gemäß Anspruch 1 mit den Teilsequenzen SEQ ID NO: 3, 4, 5, 10, 14, 17, 19, 24.

5. Kombination von HCV-Peptidantigenen aus

   SEQ ID NO: 4, 12, 16
   SEQ ID NO: 4, 5, 12 und 16
   SEQ ID NO: 3, 4, 5, 12 und 16
   SEQ ID NO: 3, 4, 5, 12, 16, 26 und 27
   SEQ ID NO: 3, 4, 11, 12, 16 und 26
   SEQ ID NO: 3, 4, 12, 16 und 26
   SEQ ID NO: 7, 9, 13, 20, 21
   SEQ ID NO: 6, 8, 13, 19, 28 oder
   SEQ ID NO: 25, 30, 31

6. Verfahren zur Herstellung von Peptidantigenen nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die das C-terminale Ende bildende Aminosäure an einen Träger gebunden wird, vom C-terminalen Ende das Peptidantigen schrittweise aufgebaut und anschließend vom Träger abgespalten wird.

7. Verfahren zur Bestimmung von HCV-Antikörpern, dadurch gekennzeichnet, daß die Probe mit einer Kombination von mindestens zwei Peptidantigenen aus der Gruppe SEQ ID NO: 1, 2, 11, 12, 15, 16, 22, 23, 25, 29-32 oder Peptidantigenen, die Teilsequenzen dieser Peptidantigene von mindestens 4 Aminosäuren Länge darstellen, inkubiert und, unter Bedingungen, die die Bildung eines Antikörper-Antigenkomplexes ermöglichen die Menge der an das Peptidantigen gebundenen HCV-Antikörper bestimmt wird.

8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Kombination mindestens ein Peptidantigen mit 4 - 9 Aminosäuren Länge enthält, welches eine Teilsequenz von SEQ ID NO: 1, 2, 11, 12, 15, 16, 22, 23, 25, 29-32 darstellt.

9. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß eine Kombination von mindestens zwei HCV-Antigenen aus der Gruppe SEQ ID NO: 1-32 verwendet wird.

10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß als Kombinationen

SEQ ID NO: 4, 12, 16
SEQ ID NO: 4, 5, 12 und 16
SEQ ID NO: 3, 4, 5, 12 und 16
SEQ ID NO: 3, 4, 5, 12, 16, 26 und 27
SEQ ID NO: 3, 4, 11, 12, 16 und 26
SEQ ID NO: 3, 4, 12, 16 und 26
SEQ ID NO: 7, 9, 13, 20, 21
SEQ ID NO: 6, 8, 13, 19, 28 oder
SEQ ID NO: 24, 30, 31

verwendet werden.

11. Verfahren zur Herstellung von Antikörpern gegen HCV-Antigene, dadurch gekennzeichnet, daß ein Säugetier mit einem gegebenenfalls trägergebundenen Peptidantigen SEQ ID NO: 1, 2, 11, 12, 15, 16, 22, 23, 29-32 oder einer Teilsequenz davon immunisiert wird, polyklonale Antikörper gewonnen werden oder Zellen dieser Tiere, die Antikörper produzieren, zu Zellinien immortalisiert werden und aus diesen Zellinien monoklonale Antikörper gewonnen werden.

12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß als Peptidantigene, die Teilsequenzen darstellen, SEQ ID NO: 1-32 verwendet werden.

13. Verfahren zur Bestimmung von HCV-Viren, dadurch gekennzeichnet, daß die Probe mit einem Antikörper nach Anspruch 11 oder 12 unter Bedingungen, die eine Antigen-Antikörperkomplexbildung erlauben, inkubiert wird, und die Menge des gebildeten Antikörper-Antigenkomplexes bestimmt wird.

14. Vakzin zur Behandlung von HCV-Infektionen, enthaltend ein gegebenenfalls trägergebundenes Peptidantigen SEQ ID NO: 1, 2, 11, 12, 15, 16, 22, 23, 29-32 oder mindestens zwei Peptidantigene SEQ ID NO: 1-32 oder Peptidantigene, die Teilsequenzen dieser Peptidantigene von mindestens 4 Aminosäuren Länge darstellen als Immunogen, in einer pharmakologisch effektiven Dosis und in einer pharmazeutisch akzeptablen Formulierung.

15. Vakzin nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß als Peptidantigene, die Teilsequenzen

SEQ ID NO: 4, 12, 16
SEQ ID NO: 4, 5, 12 und 16
SEQ ID NO: 3, 4, 5, 12 und 16
SEQ ID NO: 3, 4, 5, 12, 16, 26 und 27
SEQ ID NO: 3, 4, 11, 12, 16 und 26
SEQ ID NO: 3, 4, 12, 16 und 26
SEQ ID NO: 7, 9, 13, 20, 21
SEQ ID NO: 6, 8, 13, 19, 28 oder
SEQ ID NO: 24, 30, 31

verwendet werden.

16. Verfahren zur Herstellung von Impfstoffen unter Verwendung der Peptidantigene SEQ ID NO 1, 2, 11, 12, 15, 16, 22, 23, 29-32 oder von mindestens zwei der Peptidantigene SEQ ID NO: 1-32 oder Peptidantigene, die Teilsequenzen dieser Peptidantigene von mindestens 4 Aminosäuren Länge darstellen, als Immunogene.