(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 693 31 845 T3** 2006.10.05

(12) Übersetzung der geänderten europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 649 537 B2**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **693 31 845.7**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US93/06309**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **93 916 942.1**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1994/001778**
(86) PCT-Anmeldetag: **02.07.1993**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **20.01.1994**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **26.04.1995**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **24.04.2002**
(97) Veröffentlichungstag des geänderten Patents beim EPA: **22.02.2006**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **05.10.2006**

(51) Int Cl.[8]: ***G01N 33/576*** (2006.01)

(30) Unionspriorität:
910759 **07.07.1992** **US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:
Chiron Corp. (n.d.Ges.d. Staates Delaware), Emeryville, Calif., US

(72) Erfinder:
CHIEN, Y., David, Alamo, US

(74) Vertreter:
Patent- und Rechtsanwälte Kraus & Weisert, 80539 München

(54) Bezeichnung: **IMMUNOASSAYS FÜR ANTI-HCV-ANTIKÖRPER UNTER VERWENDUNG VON ANTIGENEN MIT KONFORMATIONSEPITOPEN**

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

TECHNISCHES GEBIET

[0001] Die Erfindung betrifft Materialien und Methodologien zur Bekämpfung der Ausbreitung von Hepatitis C-Virus (HCV)-Infektion. Sie betrifft insbesondere Polypeptide, die als immunologische Reagenzien beim Nachweis, der Prävention und Behandlung von HCV-Infektionen verwendbar sind, wie auch Immunoassays und Kits, die diese verwenden.

HINTERGRUND

[0002] HCV wurde erstmals von Houghton et al. identifiziert und als primärer Grund von Nicht-A, Nicht-B-Hepatitis (NANBH) nach Transfusion charakterisiert. Außer dass sie wesentliche Information bezüglich HCV lieferten, haben Houghton et al. und seine Mitarbeiter eine Reihe allgemeiner und spezifischer immunologischer Reagenzien und Methoden beschrieben. Siehe z.B. Houghton et al., EPO Pub. Nr. 318,216; Houghton et al., EPO Pub. Nr. 388,232; Choo et al., Science (1989) 244:359-362; Kuo et al., Science (1989) 244:362-364; Takeuchi et al., J. Gen Virol. (1990) 71:3027-3033; Takeuchi et al., Gene (1990) 91:287-291; Takeuchi et al., Nucl. Acids Res. (1990) 18:4626; Miyamura et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1990) 87:983-987; Saito et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1990) 87:6547-6549; Choo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991) 88:2451-2455; Han et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 1711-1715; Houghton et al., Hepatology (1991) 14:381-388; Weiner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89:3468-3472. Diese Publikationen beschreiben das Fachgebiet mit einem umfangreichen Hintergrund über HCV im Allgemeinen wie auch über die Herstellung und Verwendung immunologischer HCV-Polypeptid-Reagenzien. zur Abkürzung wird die Offenbarung dieser Publikationen hier als Referenz aufgenommen.

[0003] Andere haben das Werk von Houghton et al. angewendet und erweitert. Siehe z.B. Highfield et al., UK Pat App. 2,239,245 (The Welcome Foundation Ltd.); Wang, EPO Pub. Nr. 442,394 (United Biomedical Inc.); Leung et al., EPO Pub. Nr. 445,423 (Abbott Laboratories); Habits et al.; EPO Pub. Nr. 451,891 (Akzo N.V.); Reyes et al., PCT Pub Nr. WO 91/15516 (Genelabs Inc.); Maki et al., EPO Pub. Nr. 468,657 (Tonen Corp.); und Kamada et al., EPO Pub. Nr. 469,348 (Shionogi Seiyaku K.K.). Siehe auch Matsuura et al., (1992) J. Virology 66:1425; Kato et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1990) 87:9524-9528: Takamizawa et al., J. Virol, (1991) 65:1105-1113; Chiba et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991) 88:4641-4645; Harada et al., J. Virol. (1990) 65:3015-3021; Hijikata et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991) 88:5547-5551; Okamoto et al., Jpn. J. Exp. Med. (1990) 60:167-177; Yuasa et al., J. Gen. Virol. (1991) 72:2021-2024; Watanabe et al., Int. J. Cancer (1991) 48: 340-343.

[0004] Empfindliche spezifische Methoden zur Durchmusterung und Identifizierung von HCV-Trägern und HCV-kontaminiertem Blut oder Blutprodukten sind ein wichtiger Fortschritt in der Medizin. Post-Transfusions-Hepatitis (PTH) tritt bei etwa 10 % der Patienten mit Transfusion auf und HCV wurde für bis zu 90 % dieser Fälle verantwortlich gemacht. Das Hauptproblem bei dieser Krankheit ist verglichen mit anderer Hepatitis, wie zum Beispiel Typ B, das häufige Fortschreiten zu chronischer Leberschädigung (25-55 %).

[0005] Die Patientenpflege wie auch die Prävention einer Übertragung von HCV durch Blut und Blutprodukte oder durch engen Personenkontakt erfordert eine zuverlässige Diagnose und zuverlässige Prognosewerkzeuge, z.B. HCV-Polypeptide, um Antikörper, die mit HCV in Verbindung stehen, nachzuweisen. Solche Polypeptide sind als Vaccine und immuntherapeutische Mittel zur Prävention und/oder Behandlung der Erkrankung nützlich. Da HCV ein relativ neues Agens ist, existiert ein fortlaufender Bedarf, um zusätzliche immunologische Reagenzien zu definieren, die eine weitere Untersuchung des klinischen Verlaufs der Krankheit und der Epidemiologie von HCV in der Bevölkerung erlauben.

OFFENBARUNG DER ERFINDUNG

[0006] Die Anmelder haben zusätzliche serologische Untersuchungen an HCV-Antigenen durchgeführt und haben entdeckt, dass Immunoassays, die HCV-Hüllantigene (bzw. HCV-Membranantigene) verwenden, die Konformationsepitope aufrecht erhalten, zum Nachweis von Anti-HCV-Antikörpern wirksamer sind als die, die dieselben Antigene mit linearen Epitopen verwenden.

[0007] Dementsprechend besteht ein Aspekt der vorliegenden Erfindung in einem in vitro-Verfahren zum Nachweis von Antikörpern, die relativ früh im Infektionsverlauf gebildet werden, in einer Körperkomponente eines Säugerwerts auf Hepatitis C-Virus (HCV), umfassend die Schritte

(a) in Kontakt bringen der Körperkomponente, von der vermutet wird, dass sie Antikörper gegen HCV enthält, mit (1) einem HCV-Antigen, dass aus einem Antigen, das in der E1-Domäne (Aminosäuren 192-383) des HCV-Genoms, das in der E2-Domäne (Aminosäuren 384-800) des HCV-Genoms oder das in Aggregaten davon codiert wird, ausgewählt wird, wobei das HCV-Antigen unter nicht-denaturierenden Bedingungen gereinigt wird, oder (2) einer Standardkontrolle unter Bedingungen, die es zulassen, dass eine immunologische Reaktion auftritt; und
(b) Nachweisen des Vorliegens von Immunkomplexen aus diesen Antikörpern und dem Antigen, wobei das Fehlen der Immunkomplexe, die die Standardkontrolle enthalten, und das Vorliegen der Immunkomplexe, die das HCV-Antigen enthalten, eine Serokonversion auf HCV anzeigen.

[0008] In anderen Ausführungsformen werden die Antigene in der E1- und/oder E2-Domäne codiert oder sind die E1- und/oder E2-Antigene. In einigen Ausführungsformen können die Antigene von Vaccinia-Vektoren exprimiert werden oder in CHO-Zellen exprimiert werden. Außerdem sind in einigen Ausführungsformen der Erfindung Aggregate dieser Antigene enthalten.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNG

[0009] Fig. 1 ist eine schematische Darstellung, die die vermeintlichen Domänen des HCV-Polyproteins anzeigt.

[0010] Fig. 2 ist eine schematische Darstellung, die einige der Merkmale des Vektors pSC59 zeigt.

[0011] Die Fig. 3A, Fig. 3B und Fig. 3C zeigen den prozentualen Anteil der Patienten der Gruppe I, II und III, die in ELISA-Assays gegen einzelne HCV-Antigene reaktiv sind.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0012] „HCV-Antigen" bezieht sich auf ein Polypeptid oder Polypeptid-Analogon (z.B. Mimitope), dass eine Aminosäuresequenz (und/oder Aminosäureanaloga), die mindestens ein HCV-Epitop definiert, umfasst. Typischerweise entsprechen die Sequenzen, die das Epitop definieren der Aminosäuresequenz eines HCV-Proteins (entweder identisch oder über Substitution von Analogen des nativen Aminosäurerests, die das Epitop nicht zerstören). Im Allgemeinen wird die das Epitop definierende Sequenz 5 oder mehr Aminosäuren lang, typischerweise 8 oder mehr Aminosäuren lang und sogar typischerweise mehr als 10 oder mehr Aminosäuren lang sein. Was die Konformationsepitope angeht, so kann die Länge der Epitop-definierenden Sequenz großen Schwankungen unterliegen, da angenommen wird, dass diese Epitope durch die dreidimensionale Gestalt des Antigens gebildet werden (z.B. Faltung). So können die Aminosäuren, die das Epitop definieren, in relativ geringer Anzahl vorliegen, aber entlang der Länge des Moleküls weitverstreut sein (oder im Fall von Dimeren sogar an verschiedenen Molekülen vorliegen, usw.), dass via Faltung in die korrekte Epitopkonformation gebracht wird. Die Teile des Antigens zwischen den Resten, die das Epitop definieren, können für die Konformationsstruktur des Epitops nicht kritisch sein. Beispielsweise kann eine Deletion oder Substitution dieser dazwischen liegenden Sequenzen das Konformationsepitop nicht beeinflussen, vorausgesetzt Sequenzen, die für die Epitopkonformation kritisch sind, werden beibehalten (z. B. Cysteine, die bei der Disulfidbindung involviert sind, Glycosylierungsstellen, usw.).

[0013] Die HCV-Antigene der vorliegenden Erfindung umfassen Konformationsepitope aus der E1- und/oder E2-(Hüll)-Domäne von HCV. Derzeit wird geschätzt, dass sich die E1-Domäne, von der angenommen wird, dass sie dem viralen Hüllprotein entspricht, über die Aminosäuren 192-383 des HCV-Polyproteins erstreckt (PCT-Publikation Nr. WO/15771, Fig. 1). Es wird angenommen, dass sie bei Expression in einem CHO-System (glycosyliert) ein ungefähres Molekulargewicht von 35kD, wie es durch SDS-PAGE bestimmt wird, hat. Von E2-Protein, dass vorher NS1 genannt wurde, wird angenommen, dass es die Aminosäuren 384-800 des Polyproteins überspannt und auch ein Hüllprotein ist. Es wird davon ausgegangen, dass es bei Expression in einem CHO-System (glycosyliert) ein scheinbares Gelmolekulargewicht von etwa 72kD hat. Dies ist so zu verstehen, dass diese Proteinendpunkte Näherungen sind (z.B. könnte das Carboxyende von E2 irgendwo in der 750-820-Aminosäure-Region liegen). Es sollte auch verständlich sein, dass die Prototyp-Isolat-HCV-1-Sequenz in der vorgenannten PCT-Anmeldung nur zur Erläuterung angeführt ist und das ein HCV-Isolat (siehe z.B. die Referenzen, die im Abschnitt „Hintergrund" angegeben sind) zur Durchführung der vorliegenden Erfindung eine geeignete Quelle für die E1- und/oder E2-Sequenz ist.

[0014] Die E1- und E2-Antigene, die in der vorliegenden Erfindung verwendet werden, können virale Proteine voller Länge, Versionen davon mit im Wesentlichen voller Länge oder funktionelle Fragmente davon sein (z.B.

Fragmente, denen keine Sequenz fehlt, die zur Bildung oder Retention eines Konformationsepitops essentiell ist). Darüber hinaus können die HCV-Antigene der vorliegenden Erfindung auch andere Sequenzen umfassen, die die Bildung des interessierenden Konformationsepitops nicht blockieren oder verhindern. Das Vorliegen oder Fehlen eines Konformationsepitops kann in einfacher Weise durch Durchmustern des interessierenden Antigens mit einem Antikörper (polyklonales Serum oder monoklonal zum Konfirmationsepitop) und Vergleichen seiner Reaktivität zu dem einer denaturierten Version des Antigens, das nur lineare Epitope (wenn überhaupt) beibehält, bestimmt werden. Bei einem solchen Durchmustern unter Verwendung polyklonaler Antikörper kann es vorteilhaft sein, das polyklonale Serum zuerst mit dem denaturierten Antigen zu adsorbieren und zu sehen, ob es Antikörper zu dem interessierenden Antigen zurückhält.

[0015] Die HCV-Antigene der vorliegenden Erfindung können nach einem zweckdienlichen Ver fahren hergestellt werden, das das interessierende Konformationsepitop bereitstellt. Beispielsweise ist eine rekombinante Expression in Säuger- oder Insektenzellen ein bevorzugtes Verfahren, um sekretierte glycosylierte E1- und/oder E2-Antigene in „nativer" Konformation bereitzustellen. Es kann allerdings auch möglich sein, wie es für Proteine bekannt ist, die Antigene in anderen rekombinanten Wirten zu exprimieren und das Protein nach Isolierung zu renaturieren. Es heißt auch, dass eine chemische Synthese auch Konformationsantigen-Mimitope bereitstellen kann, die mit dem „nativen" Konformationsepitop des Antigens kreuzreagieren.

[0016] Komplexe von E1 und/oder E2 (auch Aggregate genannt), die mehr als ein E1- oder E2-Monomer enthalten, sind ebenfalls bevorzugte Antigene. E1:E1-Dimere, E2:E2-Dimere und E1:E2-Heterodimere sind alle Antigene im Rahmen der vorliegenden Erfindung. Aggregate können auch größere Formen umfassen und können Molekulargewichte über 800kD haben.

[0017] „Fusionspolypeptid" meint ein Polypeptid, in dem das HCV-Antigen (die HCV-Antigene) Teil einer einzelnen kontinuierlichen Aminosäurekette ist (sind), wobei diese Kette nicht in der Natur auftritt. Die HCV-Antigene können durch andere Peptide direkt aneinander gebunden sein oder können durch dazwischenliegende Aminosäuresequenzen getrennt sein. Die Fusionspolypeptide können auch Aminosäuresequenzen enthalten, die gegenüber HCV exogen sind.

[0018] „Gemeinsame feste Matrix" bezeichnet einen festen Körper, an den die einzelnen HCV-Antigene oder das Fusionspolypeptid, das in den HCV-Antigenen enthalten ist, kovalent oder durch nicht kovalente Mittel z.B. hydrophobe Adsorption, gebunden ist (sind).

[0019] „Körperkomponente" meint eine Flüssigkeit oder ein Gewebe eines Säugers (z.B. ein Anthropoid, ein Mensch), die üblicherweise Antikörper enthält, welche durch das Individuum produziert werden. Solche Komponenten sind auf dem Fachgebiet bekannt und umfassen, ohne Beschränkung, Blut, Plasma, Serum, spinale Flüssigkeit, Lymphflüssigkeit, Sekrete des Respirationstrakts, des Magen-Darm-Kanals oder des Urogenitaltrakts, Tränen, Speichel, Milch, Erythrozyten und Myelom. Körperkomponenten umfassen biologische Flüssigkeiten. Der Ausdruck „biologische Flüssigkeit" bezieht sich auf eine Flüssigkeit, die aus einem Organismus erhalten wird. Einige biologische Flüssigkeiten werden als Quelle für andere Produkte verwendet, z.B. Gerinnungsfaktoren (z.B. Faktor VIII:C), Serumalbumin, Wachstumshormon und dergleichen. In solchen Fällen ist es wichtig, dass die Quelle der biologischen Flüssigkeit von einer Kontamination durch Virus, z.B. HCV, frei ist.

[0020] „Immunologisch reaktiv" meint, dass das betreffende Antigen spezifisch mit Anti-HCV-Antikörpern, die in einer Körperkomponente von einem HCV-infizierten Individuum vorliegen, reagieren wird.

[0021] „Immunkomplex" meint die Kombination, die gebildet wird, wenn ein Antikörper an ein Epitop oder ein Antigen bindet.

[0022] Der Ausdruck „E1 ", wie er hier verwendet wird, bezieht sich auf ein Protein oder Polypeptid, das in den ersten 400 Aminosäuren eines HCV-Polyproteins exprimiert wird und wird manchmal als das E- oder S-Protein bezeichnet. In seiner natürlichen Form ist es ein 35kD-Glycoprotein, dass in starker Assoziation mit Membranen gefunden wird. In den meisten natürlichen HCV-Stämmen ist das E1-Protein im viralen Polyprotein, dass auf das C (Kern)-Protein folgt, codiert. Das E1-Protein erstreckt sich etwa von Aminosäure (aa) 192 bis etwa aa 383 des Volllängen-Polyproteins. Der Ausdruck „E1", wie er hier verwendet wird, umfasst auch analoge und beschnittene Formen, die mit natürlichem E1 immunologisch kreuzreaktiv sind.

[0023] Der Ausdruck „E2", wie er hier verwendet wird, bezieht sich auf ein Protein oder Polypeptid, das innerhalb der ersten 900 Aminosäuren eines HCV-Polyproteins exprimiert wird und das manchmal als das NS1-Protein bezeichnet wird. In seiner natürlichen Form ist es ein 72kD-Glycoprotein, das in starker Assoziation mit

einer Membran gefunden wird. In den meisten natürlichen HCV-Stämmen wird das E2-Protein im viralen Polyprotein nach dem E1-Protein codiert. Das E2-Protein erstreckt sich von etwa aa 384 bis etwa aa 820. Der Ausdruck „E2", wie er hier verwendet wird, umfasst auch analoge und gestutzte Formen, die mit natürlichem E2 immunologisch kreuzreaktiv sind.

[0024] Der Ausdruck „Aggregat", wie er hier verwendet wird, bezieht sich auf einen Komplex aus E1 und/oder E2, der mehr als ein E1- oder E2-Monomer enthält. E1:E1-Dimere, E2:E2-Dimere und E1:E2-Heterodimere sind alle „Aggregate" im Rahmen der vorliegenden Erfindung. Aggregate können auch größere Formen beinhalten und können Molekulargewichte von über 800kD haben.

[0025] Der Ausdruck „gereinigt", wie er hier auf Proteine angewendet wird, bezieht sich auf eine Zusammensetzung, in der das gewünschte Protein mindestens 35 % der gesamten Proteinkomponente in der Zusammensetzung umfasst. Das gewünschte Protein umfasst vorzugsweise mindestens 40 %, bevorzugter mindestens etwa 50 %, noch bevorzugter mindestens etwa 60 %, weiter bevorzugt mindestens etwa 70 %, noch stärker bevorzugt mindestens etwa 80 %, noch besser etwa 90 % und am günstigsten mindestens etwa 95 % der gesamten Proteinkomponente. Die Zusammensetzung kann andere Verbindungen wie z.B. Kohlenhydrate, Salze, Lipide, Lösungsmittel und dergleichen enthalten, ohne dass die Bestimmung der prozentualen Reinheit, wie sie hier verwendet wird, beeinträchtigt wird. Ein „isoliertes" HCV-Protein meint eine HCV-Protein-Zusammensetzung, die zu mindestens 35 % rein ist.

[0026] Der Ausdruck „isoliertes Polypeptid" bezieht sich auf ein Polypeptid, das im Wesentlichen frei von anderen viralen HCV-Komponenten, insbesondere von genomischem HCV-Polynukleotid, ist. Eine Polypeptid-Zusammensetzung ist „im Wesentlichen frei" von einer anderen Komponente, wenn das Gewicht des Polypeptids in der Zusammensetzung mindestens 70 % des Gewichts des Polypeptids und einer anderen kombinierten Komponente, bevorzugter mindestens etwa 89 %, noch bevorzugter etwa 90 % und am bevorzugtesten 95 % oder mehr ist.

MODI ZUR DURCHFÜHRUNG DER ERFINDUNG

[0027] Die Immunoassay-Verfahren der Erfindung nutzen HCV-Antigene aus der E1- und E2-Domäne, die die Konfirmationsepitope aufrechterhalten, die durch Antikörper in den Seren von Individuen, welche mit HCV infiziert sind, erkannt werden. Die Antigene haben jeweils mindestens ein Konformationsepitop, dass in dem natürlich auftretenden HCV-Partikel oder seinem infektiösen Produkt vorkommt, was durch die Immunreaktivität des Antigens mit Antikörpern in einer Körperkomponente aus einem HCV-infizierten Individuum und einen Verlust der Immunreaktivität des Epitops bei Denaturierung des Antigens deutlich wird. Die Länge des Antigens ist ausreichend, um ein immunreaktives Konfirmationsepitop, dass mit dem Epitop assoziert ist, aufrechtzuerhalten. Es liegt im Rahmen der Erfindung, dass mehr als ein Konfirmationsepitop an einem Antigen vorhanden ist. Oft können die nativen Hüllantigene, die in den Immunoassays verwendet werden, fast volle Länge besitzen, können aber auch, z.B. um die Löslichkeit zu erhöhen oder die Sekretion zu verbessern, gestutzt sein (z.B. Deletion von Membranbindungsdomänen). Es liegt auch im Rahmen der Erfindung, entweder einzelne Antigene oder Kombinationen oder Aggregate von Antigenen zu verwenden. So können die Immunoassays E1-Epitope, E2-Epitope, Aggregate oder Kombinationen von nativen E1 und E2 verwenden. Es wird auch als im Rahmen der vorliegenden Erfindung angesehen, Antigene mit linearen Epitopen in Kombination mit HCV-Hüll-Konformationsepitopen zu verwenden.

[0028] Verfahren zum Nachweis des Vorliegens von Konformationsepitopen sind auf dem Fachgebiet bekannt und einige werden in den späteren Beispielen erläutert.

[0029] Auf der Basis der vermeintlichen Aminosäuren, die in der Nukleotidsequenz von HCV1 codiert werden und eines weiteren Beweises sind mögliche Proteindomänen des codierten HCV-Polyproteins wie auch entsprechende Grenzen wie folgt:

Vermeintliche Domäne	Entsprechende Grenzen (Aminosäure-Nrn.)
C (Nucleocapsid-Protein)	1-191
E1 (Virion-Hüllprotein)	192-383
E2/NS1	384-800
NS2	800-1050
NS3 (Protease?)	1050-1650
NS4	1651-2100

NS5 (Polymerase)	2100-3011 (Ende)

[0030] Diese Domänen sind allerdings versuchsweise. Beispielsweise ist die E2-NS2-Grenze wahrscheinlich in der 750-810-Region; die NS3-NS4-Grenze ist etwa 1640-1650. Es gibt auch einen Beweis, dass die 191aa-Version von C eine Vorstufe ist, die weiter verarbeitet wird (z.B. auf eine Länge von etwa 170aa) und das die NS2-, NS4- und NS-5-Proteine jeweils zu zwei reifen Proteinen weiterverarbeitet werden. Die Beziehung der Domänen ist in **Fig. 1** dargestellt.

[0031] Verfahren zur Herstellung von E1- und E2-Antigenen einschließlich der mit nativen Konformationen sind in Spaete R. et al., Virology (1992) 188:819-830 und in WO 92/08734, die hier als Referenz aufgenommen werden, beschrieben. Im Allgemeinen werden Wirtzellen ausgewählt, die die Bildung von nativen Konformationsepitopen innerhalb der exprimierten Hüllproteine erlauben; diese Wirtzellen können z.B. Tierzellen, Insektenzellen, Hefezellen und dergleichen umfassen.

[0032] Eukaryontische Wirte umfassen Hefe- und Sorgerzellen in Kultursystemen. Saccharomyces cerevisiae und Saccharomyces carlsbergensis sind die am gängigsten verwendeten Hefewirte und sind zweckdienliche Pilzwirte. Mit Hefe kompatibler Vektoren tragen Marker, die eine Selektion erfolgreicher Transformanten durch Verleihung von Prototropie an auxotrophe Mutanten oder Resistenz gegenüber Schwermetallen bei Wildtyp-Stämmen verleihen. Mit Hefe kompatibler Vektoren können den zwei Mikron Replikationsursprung (Broach et al. (1983) Meth. Enz. 101:307.), die Kombination von CEN3 und ARS1 oder andere Mittel zur Sicherstellung einer Replikation, z.B. Sequenzen, die in einer Einarbeitung eines geeigneten Fragments in das Wirtzellgenom resultieren, verwenden. Kontrollsequenzen für Hefevektoren sind auf dem Fachgebiet bekannt und umfassen Promotoren für die Synthese glycolytischer Enzyme (Hess et al. (1968) J. Adv. Enzyme Reg. 7:149; Holland et al. (1978) Biochemistry 17:4900), einschließlich des Promotors für 3-Phosphoglyceratkinase (Hitzemann (1980) J. Biol. Chem. 255:2073). Terminatoren können auch enthalten sein, z.B. die, die vom Enolasegen stammen (Holland (1981) J. Biol. Chem. 256:1385). Besonders verwendbare Kontrollsysteme sind die, die den Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)-Promotor oder den Alkoholdehydrogenase (ADH)-regulierbaren Promotor, Terminatoren, die auch von GAPDH abgeleitet sind, und wenn eine Sekretion erwünscht ist, eine Leadersequenz aus Hefe-alpha-Faktor umfassen. Außerdem können die Transkriptionsregulationsregion und die Transkriptionsinitiationsregion, die funktionell gebunden sind, so sein, dass sie im Wildtyporganismus nicht natürlich assoziiert sind. Diese Systeme sind detailliert in EPO 120551, veröffentlicht am 3. Oktober 1984; EPO 116201, veröffentlicht am 22. August 1984 und in EPO 164556, veröffentlicht am 18. Dezember 1985 beschrieben, die alle bestimmt wurden, hier genannt zu werden und die hiermit als Referenz eingearbeitet werden.

[0033] Säugertierzell-Linien, die als Wirte zur Expression verfügbar sind, sind auf dem Fachgebiet bekannt und umfassen viele immortalisierte Zelllinien, die von der American Type Culture Collection (ATCC) erhältlich sind, einschließlich HeLa-Zellen, Eierstockzellen von chinesischen Hamstern (CHO), Nierenzellen von Babyhamstern (BHK-Zellen) und einer Reihe anderer Zelllinien. Geeignete Promotoren für Sorgerzellen sind auf dem Fachgebiet bekannt und umfassen virale Promotoren wie z.B. den aus Simian Virus 40 (SV40) (Fiers (1978) Nature 273:113), Rous Sarcoma-Virus (RSV), Adenovirus (ADV) und Rinder-Papillom-Virus (BPV). Säugerzellen können auch Terminatorsequenzen und PolyA-Additionssequenzen erfordern; Enhancersequenzen, die die Expression verstärken, können enthalten sein und Sequenzen, die eine Amplifikation des Gens verursachen, können auch wünschenswert sein. Diese Sequenzen sind auf dem Fachgebiet bekannt.

[0034] Vektoren, die zur Replikation in Säugerzellen geeignet sind, sind auf dem Fachgebiet bekannt und können virale Replikons oder Sequenzen, die die Integration der geeigneten Sequenzen, die NANBV-Epitope codieren in das Wirtsgenom gewährleisten, umfassen.

[0035] Ein Vektor, der zur Expression von Fremd-DNA verwendet wird und der in einem Vaccin-Präparat verwendet werden kann, ist Vaccinia-Virus. In diesem Fall wird die heterologe DNA in das Vaccinia-Genom insertiert. Techniken zur Insertion von Fremd-DNA in das Vaccinia-Virus-Genom sind auf dem Fachgebiet bekannt und verwenden z.B. homologe Rekombination. Die Insertion der heterologen DNA erfolgt im Allgemeinen in ein Gen, dass in der Natur nicht-essentiell ist, z.B. in das Thymidinkinase-Gen (tk), dass auch einen selektierbaren Marker liefert. Plasmidvektoren, die den Aufbau von rekombinanten Viren stark erleichtern, wurden bereits beschrieben (siehe z.B. Mackett et al. (1984) J. Virol. 49:857., Chakrabarti et al. (1985) Mol. Cell Biol. 5:3403; Moss (1987) in GENE TRANSFER VECTORS FOR MAMMALIAN CELLS (Miller and Calos, Herausg., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.), S. 10.). Eine Expression des HCV-Polypeptids tritt dann in Zellen oder Individuen auf, die mit dem lebenden rekombinanten Vaccinia-Virus immunisiert sind.

[0036] Das Segment der HCV-cDNA, das für die gewünschte Sequenz codiert, wird in einen Vaccinia-Vektor insertiert. Die das Polypeptid codierende Sequenz kann an eine Leadersequenz geheftet werden. Die Leadersequenz kann die für Gewebe-Plasminogen-Aktivator (TPA) sein oder aus einer anderen Quelle stammen, z.B. die für beta-Globin sein. Das heterologe Polynukleotid kann in Folge des Zusatzes einer Polylinkersequenz, die eine Klonierungsstelle enthält, in einen Vaccinia-Vektor, der eine modifizierte Version von pSC11 ist, insertiert werden.

[0037] Um nachzuweisen, ob das HCV-Polypeptid aus dem Vaccinia-Vektor exprimiert wird oder nicht, können BSC1-Zellen mit dem rekombinanten Vektor infiziert werden und auf Mikroskop-Objektträger unter Bedingungen, die eine Expression ermöglichen, wachsen gelassen werden. Die Zellen können dann durch Aceton fixiert werden und es können Immunfluoreszenzassays durchgeführt werden, die Serum verwenden, von dem bekannt ist, dass es Anti-HCV-Antikörper auf ein Polypeptid (auf Polypeptide) enthält, das (die) in der Region des HCV-Genoms codiert wird (werden), aus dem das HCV-Sequenz in rekombinanten Expressionsvektor abgeleitet wurde.

[0038] Andere Systeme zur Expression eukaryontischer oder viraler Genome umfassen Insektenzellen und Vektoren, die zur Verwendung in diesen Zellen geeignet sind. Diese Systeme sind auf dem Fachgebiet bekannt und umfassen z.B. Insektenexpressionstransfervektoren, die vom Baculovirus Autographa californica-Kern-Polyhydrose-Virus (AcNPV) stammen, der ein Helfer-unabhängiger viraler Expressionsvektor ist. Expressionsvektoren, die aus diesem System stammen, verwenden üblicherweise den starken viralen Polyhedringenpromotor, um die Expression heterologer Gene zu steuern. Der derzeit am häufigsten verwendete Transfervektor zur Einführung von fremden Genen in AcNPV ist pAc373. Es wurden viele Vektoren, die dem Fachmann auf diesem Gebiet bekannt sind, für eine verbesserte Expression konstruiert. Diese umfassen z.B. pVL985 (der das Polyhedrin-Startcodon von ATG in ATT ändert und der eine BamHI-Klonierungsstelle 32 Basenpaare stromabwärts vom ATT einführt; siehe Luckow und Summers (1989) Virology 17:31). Eine gute Expression nicht-fusionierter fremder Proteine erfordert normalerweise Fremdgene, die idealerweise eine kurze Leadersequenz haben, die geeignete Translationsinitiationssignale enthält, welche einem ATG-Startsignal vorausgehen. Das Plasmid enthält auch das Polyhedrin-Polyadenylierungs-Signal und das Ampicillin-Resistenz-(amp)-Gen und einen Replikationsursprung zur Selektion und Vermehrung in E. coli.

[0039] Verfahren zur Einführung von heterologer DNA in die gewünschte Stelle im Baculovirus-Virus sind auf dem Fachgebiet bekannt (siehe Summer und Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin Nr. 1555; Ju et al. (1987); Smith et al. (1983) Mol.& Cell Biol. 3:2156-2165; und Luckow und Summers (1989) Virology 17:31). Beispielsweise kann die Insertion in ein Gen, z.B. das Polyhedringen, durch homologer Rekombination erfolgen; eine Insertion kann auch in eine Restriktionsenzymstelle, die im gewünschten Baculovirus-Gen eingerichtet wurde, erfolgen. Die insertierten Sequenzen können die, die für alle oder variierende Segmente des Polyproteins codieren, oder andere Orfs, die für virale Polypeptide codieren, sein.

[0040] Die Signale für posttranslationale Modifikationen, z.B. Signalpeptidspaltung, proteolytische Spaltung und Phosphorylierung, scheinen durch Insektenzellen erkannt zu werden. Die Signale, die zur Sekretion und Kernakkumulation notwendig sind, scheinen zwischen den Invertebratenzellen und Vertebratenzellen konserviert zu werden. Beispiele für die Signalsequenzen aus Vertebratenzellen, die in Invertebratenzellen wirksam sind, sind auf dem Fachgebiet bekannt, z.B. das humane Interleukin-2-Signal ($IL\text{-}2_S$), das ein Signal für den Transport aus der Zelle ist, wird in Insektenzellen erkannt und geeigneterweise entfernt.

Die Immunoassay-Formate

[0041] Die HCV-E1- und E2-Antigene der vorliegenden Erfindung können tatsächlich in einem beliebigen Assayformat verwendet werden, das ein bekanntes Antigen verwendet, um Antikörper nachzuweisen. Selbstverständlich sollten Formate, die das interessierende HCV-Konformationsepitop denaturieren, vermieden oder modifiziert werden. Ein allgemeines Merkmal all dieser Assays besteht darin, dass das Antigen mit der Körperkomponente, von der vermutet wird, dass sie HCV-Antikörper enthält, unter Bedingungen in Kontakt gebracht wird, die es ermöglichen, dass das Antigen an einen solchen in der Komponente vorliegenden Antikörper gebunden wird. Solche Bedingungen werden typischerweise physiologische Temperatur, physiologischer pH und physiologische Ionenstärke unter Verwendung eines Antigenüberschusses sein. Auf die Inkubation des Antigens mit der Probe folgt die Detektion von Immunkomplexen, die das Antigen enthalten.

[0042] Das Konzept des Immunoassays unterliegt einer großen Variationsbreite und auf dem Fachgebiet sind viele Formate bekannt. Protokolle können z.B. feste Träger oder eine Immunpräzipitation verwenden. die meisten Assays beinhalten die Verwendung von markiertem Antikörper oder Polypeptid; die Markierungen können

z.B. enzymatische, fluoreszierende, chemielumineszierende, reaktive oder Farbstoff-Moleküle sein. Assays, die die Signale aus dem Immunkomplex amplifizieren, sind auch bekannt; Beispiele dafür sind Assays, die Biotin und Avidin verwenden sowie Enzym-markierte und vermittelte Immunoassays, z.B. ELISA-Assays.

[0043] Der Immunoassay kann, ohne Beschränkung, in einem heterogenen oder in einem homogenen Format vorliegen und zum Standard-Typ oder kompetitiven Typ gehören. In einem heterogenen Format wird das Polypeptid typischerweise an eine feste Matrix oder einen Träger gebunden, um die Abtrennung der Probe vom Polypeptid nach Inkubation zu erleichtern. Beispiele für feste Träger, die verwendet werden können, sind Nitrocellulose (z.B. in Membranform oder in Mikrotiter-Vertiefungs-Form), Polyvinylchlorid (z.B. in Folien oder Mikrotitervertiefungen), Polystyrollatex (z.B. in Perlen oder Mikrotiterplatten, Polyvinylidinfluorid (bekannt als Immunlon™), diazotiertes Papier, Nylonmembranen, aktivierte Perlen und Protein A-Perlen. Beispielweise können Dynatech Immunlon™ 1- oder Immunlon™ 2-Mikrotiterplatten oder Polystyrolperlen (6,4 mm(0,25 inch)) (Präzision Plastic Ball) im heterogenen Format verwendet werden. Der feste Träger, der die antigenen Polypeptide enthält, wird typischerweise nach seinem Abtrennen von der Testprobe und vor der Detektion gebundener Antikörper gewaschen. Beide Formate, sowohl das Standardformat wie auch das kompetitive Format, sind auf dem Fachgebiet bekannt.

[0044] In einem homogenen Format wird die Testprobe mit der Antigenkombination in Lösung inkubiert. Dies kann z.B. unter Bedingungen geschehen, die Antigen-Antikörper-Komplexe, die gebildet werden, ausfällen. Sowohl Standardformate wie auch kompetetive Formate sind auf dem Fachgebiet für diese Assays bekannt.

[0045] In einem Standardformat wird die Menge an HCV-Antikörpern in den Antikörper-Antigen-Komplexen direkt überwacht. Dies kann geschehen, indem bestimmt wird, ob markierte Anti-Xenogene (z.B. anti-humane) Antikörper, die ein Epitop an Anti-HCV-Antikörpern erkennen, in Folge Komplexbildung binden werden. In einem kompetetiven Format wird die Menge an HCV-Antikörpern in der Probe abgeleitet, indem der kompetetive Effekt auf die Bindung einer bekannten Menge an markiertem Antikörper (oder anderem konkurrierendem Liganden) im Komplex überwacht wird.

[0046] Gebildete Komplexe, die Anti-HCV-Antikörper (oder im Fall von kompetetiven Assays die Menge an konkurrierendem Antikörper) umfassen werden nach einer Reihe bekannter Techniken, die vom Format abhängen, nachgewiesen. Unmarkierte HCV-Antikörper im Komplex können z.B. unter Verwendung eines Konjugats aus antixenogenem Ig, das mit einer Markierung komplexiert ist (z.B. einer Enzymmarkierung), nachgewiesen werden.

[0047] In einem Immunpräziptations- oder Agglutinations-Assayformat bildet die Reaktion zwischen den HCV-Antigenen und dem Antikörper ein Netzwerk, dass aus der Lösung oder Suspension ausfällt und eine sichtbare Schicht oder einen Präzipitatfilm bildet. Wenn in der Testprobe kein Anti-HCV-Antikörper vorliegt, wird kein sichtbares Präzipitat gebildet.

[0048] Es gibt derzeit drei spezifische Typen von Partikelagglutinations(PA)-Assays. Diese Assays werden zum Nachweis von Antikörpern gegen verschiedene Antigene, wenn sie auf einen Träger aufgetragen sind, verwendet. Ein Typ dieses Assays ist der Hämagglutinationsassay, der Erythrozyten (RBCs) verwendet, die durch passives Adsorbieren von Antigen (oder Antikörper) an die RBC sensibilisiert sind. Der Zusatz von spezifischen Antigen-Antikörpern, die in der Körperkomponente, wenn überhaupt, vorliegen, bewirkt, dass die RBCs, die mit dem gereinigten Antigen überzogen sind, agglutinieren.

[0049] Um potentielle nicht-spezifische Reaktionen im Hämagglutinations-assay zu eliminieren, können zwei künstliche Träger anstelle von RBC bei der PA eingesetzt werden. Der gängigste unter diesen sind Latexpartikel. Allerdings können auch Gelatinepartikel verwendet werden. Die Assays, die einen dieser Träger verwenden, basieren auf der passiven Agglutination der Partikel, die mit gereinigten Antigenen überzogen sind.

[0050] Die HCV-E1- und E2-Antigene, die in Konformationsepitopen enthalten sind, werden typischerweise in Form eines Kits zur Verwendung in diesen Immunoassays verpackt sein. Der Kit wird normalerweise in getrennten Behältern das native HCV-Antigen, Kontrollantikörperformulierungen (positiv und/oder negativ), markierten Antikörper, wenn das Assayformat denselben verlangt, und Signalerzeugungsreagenzien (z.B. Enzymsubstrat), wenn die Markierung nicht direkt ein Signal erzeugt, enthalten. Das native HCV-Antigen kann bereits an einer feste Matrix oder getrennt mit Reagenzien zu seiner Bindung an die Matrix vorliegen. Instruktionen (z.B. geschrieben, auf Band, auf CD-ROM, usw.) zur Durchführung des Assays werden üblicherweise im Kit mitenthalten sein.

[0051] Immunoassays, die das native HCV-Antigen verwenden, sind zum Durchmustern von Blut für die Herstellung einer Konserve, die frei von potentiell infektiösem HCV ist, verwendbar. Das Verfahren zur Herstellung der Blutkonserve umfasst die folgenden Schritte. Reagieren einer Körperkomponente, vorzugsweise Blut oder einer Blutkomponente, des Individuums, das Blut spendet, mit nativem HCV E1- oder nativen HCV E2-Antigen, um eine immunologische Reaktion zwischen HCV-Antikörpern, wenn vorhanden, und dem HCV-Antigen zu ermöglichen; Nachweisen, ob Anti-HCV-Antikörper-HCV-Antigen-Komplexe als Resultat der Umsetzung gebildet wurden. Blut, das zur Blutkonserve (Blutzuführung) beiträgt, ist von Spendern, die keine Antikörper gegen die nativen HCV-Antigene, E1 oder E2, aufweisen.

[0052] In Fällen einer positiven Reaktivität zu dem HCV-Antigen ist es bevorzugt, den Immunoassay zu wiederholen, um die Möglichkeit falschpositiver Resultate zu verringern. Beim Durchmustern von Blut im großem Maßstab zur Herstellung von Blutprodukten (z.B. Bluttransfusion, Plasma, Faktor VIII, Immunglobulin, usw.) werden „Screening"-Tests typischerweise formatiert, um die Empfindlichkeit (um sicherzustellen, dass kein kontaminiertes Blut durchgeht) auf Kosten der Spezifität zu erhöhen; d.h. die Rate an falsch-positiven Ergebnissen wird erhöht. Somit ist es typisch, dass nur bei Spendern, die „wiederholt reaktiv" waren, d.h. in zwei oder mehr Läufen des Immunoassays bei der gegebenen Probe positiv waren, eine weitere Untersuchung vorzunehmen.

[0053] Die folgenden Beispiele sollen die Erfindung erläutern, sie aber in keiner Weise beschränken.

BEISPIEL 1

Konstruktion von PSC59 Poly

[0054] Die HCV-Sequenz, die für die Konstruktion verwendet wurde, wurde aus Plasmid pC5P-1 als ein teilweises StuI/BglII-Fragment isoliert. Dieses Fragment erstreckt sich vom ersten Methionin des HCV-1-Polyproteins bis zur Asparaginsäure in Position 966. Die enthaltenen Domänen sind das Nucleocapsid C, beide vermeintliche Hüllglycoproteine, E1 und eine gestutzte Form von NS2. Außerdem enthält das Fragment auch etwa 60 bp, die dem Teil der 5'-untranslatierten Region des HCV-Genoms entsprechen.

[0055] Das Fragment wurde mit Klenow-Polymerase behandelt, um die Enden zu glätten, dann wurde es in die StuI-Stelle eines Vaccinia-Vektors, PSC59 (erhalten von Dr. B. Moss an The National Institutes of Health, Bethesda, Md) cloniert. Der Vektor ist in **Fig. 2** dargestellt. Als Resultat der Ligation in die Polylinkersequenz des Vektors enthält das C'-Ende der NS2-Region eine zusätzliche Pro-Tyr-Sequenz.

BEISPIEL 2

Herstellung von Vorratsstämmen von Vaccinia-Virus, das für das HCV-Polyproteinfragment, das E1 und E2 einschließt, codiert

[0056] Das Screening auf rekombinantes Vaccinia-Virus wurde im Wesentlichen durchgeführt, wie es von Mackett et al. in DNA Cloning, Bd. II (Herausg. D.M: Glover, IRL Press, Oxford, England, 1985, S. 191-211) beschrieben wird. Genauer ausgedrückt, eine konfluente Einzelzellschicht (6cm-Schale) aus Nierenzellen grüner afrikanischer Affen, BSC40, wurde durch Mehrfachinfektionen (MOI) von 0,05 mit Vaccinia-Virus vom Wildtyp (Stamm WR) infiziert. Nach zweistündiger Inkubation bei 37°C wurden die Zellen mit 25 µg PSC59 Poly-DNA unter Verwendung des Calciumphosphatverfahrens einer Transfektion unterzogen. Nach vier Stunden Inkubation wurde das Medium in normales Medium geändert, die Zellen wurden für weiter 48 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden durch Abkratzen von der Schale gewonnen und das Virus wurde durch drei Gefrier-Auftau-Zyklen freigesetzt, dann wurde das freigesetzte Virus im Zelllysat bei –80°C gelagert.

[0057] Um auf rekombinantes Virus durchzumustern, wurde eine konfluente Einzelzellschicht aus humanen 143 TK-Zellen zwei Stunden lang mit dem Zelllysat in zehnfachen Reihenverdünnungen infiziert. Nach Entfernung des Inoculums wurde 1 % Agarose in Serummedium, enthaltend 25 µg/ml 5-Bromdesoxyuridin, zugesetzt; die Zellen wurden 72 Stunden bei 37°C inkubiert. Plaques wurden durch Überschichten der Zellschicht mit 1% Agarose plus 0,01% Neutralrot und Inkubieren der Zellen über Nacht bei 37°C sichtbar gemacht. Die Agarosedeckschicht wurde dann vorsichtig entfernt und die Zellschicht wurde mit einem Master-Nitrocellulosefilter (Schleir und Schuell, BA85, 0,45 µm) einem Blotting unterzogen. Es wurde eine Replicaplatte des Masterfilters hergestellt und mit einer ^{32}P-markierten Hybridisierungssonde an die HCV-Sequenz hybridisiert. Vom Masterfilter wurden positive Plaque isoliert, in 0,5 ml serumfreies Medium gelegt und zweimal für 30 Sekunden mit Ultraschall behandelt. Der Durchmusterungsprozess wurde zweimal wiederholt, um das Virus einer

Plaquereinigung zu unterwerfen.

[0058] Um das rekombinante Vaccinia-Virus zu vermehren, wurden zehn Schalen (150 cm^2) plus BSC40-Zellen bei einer MOI von 0,5 mit dem viralen Vorratsstamm infiziert. Die Infektion wurde zwei Stunden lang bei 37°C durchgeführt und der virale Vorratsstamm durch frisches Medium ersetzt. Nach 72 Stunden wurden die Zellen geerntet, in 10 Mm Tis-HCl, pH 9,0 suspendiert und in einem Wheaton Dounce-Gewebe-Zerkleinerer homogenisiert. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation entfernt, die Überstände wurde trypsiniert und mit Ultraschall behandelt, dann wurden Aliquots der viralen Suspensionen bei –80°C gelagert.

BEISPIEL 3

Herstellung von E1/E2-Antigenen

[0059] Ein Liter Hela S3-Spinnenzellen (Hela S 3 Spinner cell) wurden in einem Spinnenkolben zu einer Dichte von 10^6 Zellen pro ml wachsen gelassen. Die Zellen wurden mit dem rekombinanten Vaccinia-Virus, das für das HCV-Polyproteinfragment codiert, unter Anwendung einer MOI von 1,0 über Nacht inkubiert, geerntet und als Zellenpellet bei –80°C gelagert.

[0060] Das E1/E2-Expressionsprodukt wurde gereinigt, indem die Zellen in hypotonischem Puffer lysiert wurden, worauf eine Extraktion in einen Puffer, der ein nichtionisches Detergens enthielt, folgte. Der zelluläre Extrakt wurde durch eine Lektin (GNA)-Agarosesäule chromatographiert. Die gewünschten Proteine wurden mit Methyl- -D-Mannopyranosid (Sigma Corp.) aus der Säule eluiert. Die eluierten Fraktionen wurden durch Western blots unter Verwendung eines spezifischen Antiserums gegen E1 oder E2 auf E1 und E2 überwacht. Die Fraktionen, die die Antigene enthielten, wurden gesammelt und an einer S-Sepharosesäule (Pharmacia) konzentriert. Die Reinheit des Endprodukts war etwa 70%.

BEISPIEL 4

Verwendung von E1/E2 für Immunoassays

Patienten

[0061] Serumproben wurden von statistisch ausgewählten bezahlten Plasmaspendern, die aus dem Osten, Westen, Mittelwesten und Süden der Vereinigten Staaten gesammelt worden waren, erhalten und wurden von Uniglobe Research Corporation (Reseda, ICA) bezogen. Serumproben, die von H. Tong (Huntington Memorial Hospital at Pasadena, Kalifornien) bereitgestellt wurden, wurden aus einer Gruppe von 38 Transfusionspatienten, die chronische NANBH hatten und einer weiteren Gruppe aus 39 Patienten, die Drogenkonsumenten IV waren und chronische NANBH hatten, erhalten. Diese 77 Patienten hatten keine Lebererkrankung, waren Anti-HIV und Anti-Hbsag nicht reaktiv und die anti-nukleären Antikörper (ANA) waren normal. Drei Transfusion-assoziierte HCV-Seroconversions-Panele wurden von H. Alter (the National Institute of Health, Bethesda, Maryland) und Serologicals Incorporation at Clarkston, Georgia erhalten. Die akuten aufgelösten HCV-Proben wurden vom Max von Pettenkofer-Institut, Universität München, München, Deutschland, bereitgestellt. Die 19 Fälle akuter auflösender NANBH wurden auf der Basis der Leberbiopsie und normaler Alanin-Aminotransferase (ALT)-Spiegel während Langzeituntersuchungen (2-11 Jahre) diagnostiziert.

Expression und Reinigung von rekombinanten HCV-Antigenen

[0062] Die Antigene C22 (119aa), E1 (130aa), E2 (251aa), NSS (942aa) und chimäres C25 (auch c200/c22 genannt) (858aa) wurden als innere Antigene in Hefe S. cerevisiae als C-terminale Fusionen mit humander Superoxiddismutase (SOD) unter Verwendung der Verfahren, die vorher von Kuo, G. et al., Science (1989) 244: 362-364, und Cousens L., et al., Gene (1987) 61: 265-272 beschrieben wurden, exprimiert. Das Antigen C33C (266aa) wurde als inneres SOD-Fusionspolypeptid in E. coli unter Anwendung von Verfahren, die bereits früher zur Synthese des Antigens 5-1-1 beschrieben wurden (siehe PCT WO89/046699; EPO Nr. 318,216 und Houghton et al., Science 244:359 (1989), die hier als Referenz aufgenommen werden, exprimiert. Nach einer Zellzerkleinerung und Zentrifugation wurden die unlöslichen SOD-Fusionspolypeptide aus den Zellpellets extrahiert, indem entweder 5 M Harnstoff oder 1% SDS verwendet wurde; dann wurden sie entweder unter Anwendung von Gelfiltration oder einer Kombination aus Ionenaustauscherchromatographie (Q- und S-Sepharose) und Gelfiltrationschromatographie (Sephacryl S-300 HR) gereinigt.

[0063] Das HCV-native E1- und E2-Antigen [auch rVV (e1 & e2) genannt] wurde aus dem endoplasmatischen

Reticulum von mit rekombinantem Vaccinia-Virus (rvv)-infizierten Zellen, die die HCV-E1- und E2-Gene voller Länge enthielten, gereinigt. Eine Reinigung wurde durch Affinitätschromatographie, gefolgt von Ionenaustauscherchromatographie unter nicht-denaturierenden Bedingungen erreicht. Diese Verfahren waren so, wie sie in WO 92/08734 beschrieben sind, die hier als Referenz aufgenommen ist.

[0064] Das native HVC-E2-Antigen, CHO-e2, wurde im Wesentlichen nach Spaete et al., Virology (1992) 188:819-830 hergestellt. Genauer ausgedrückt, die Säuger-CHO-Zelllinie, die CHO-e2-Antigen produziert, wurde aus einem Plasmid konstruiert, die eine HCV-1-Sequenz enthält, die für Ala383 bis Glu661 codiert. Das Plasmid wurde dann in CHO-Zellen transfiziert, um eine stabile Linie zu erzeugen, die e2 (auch e2/ns1 genannt)-Antigen voller Länge zu exprimiert. Klone, die eine hohe Expression aufweisen, wurden selektiert und in Rollenflaschen durch Wachstum in DME/H21 mit 10 % dialysiertem fetalem Kälberserum und den üblichen Ergänzungen plus 1.6 µm Methotrexat vermehrt. Der Überstand des Kulturmediums wurde gesammelt und zur Reinigung des CHO-e2-Antigens verwendet. Das Reinigungsschema umfasste Affinitäts- und Ionenaustauscherchromatographie unter nicht-denaturierenden Bedingungen.

[0065] Um die nativen vermeintlichen e2-Konformationsepitope zu stören, wurde denaturiertes CHO-e2 durch Zusatz von DL-Dithiothreitol (DTT) zu einer Endkonzentration von 10 mM, 0.2 % Natriumdodecylsulfat (SDS) hergestellt und 5 Minuten bei 100°C gekocht. Alle gereinigten rekombinanten HCV-Antigene wurden beurteilt, um eine mindestens 90 %-ige Reinheit durch SDS-Polyacrylamidgelanalyse und Färbung mit Coomassie-Blau zu erreichen.

ELISA-Assays

[0066] Die RVV(e1 & e2)-, CHO-e2- und denaturierten CHO-e2-Antigene wurden in Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) (pH 7,4) zu einer optimalen Konzentration verdünnt und auf Immulon™ 1-Platten (Dynatech, Chantilly, FA) aufgetragen. Die ELISA-Assays wurden wie folgt durchgeführt. Testproben auf der Platte wurden 40-fach in Probenverdünnungsmittel verdünnt und 1 Stunde bei 37°C inkubiert, dann mit Waschpuffer gewaschen. In jede Vertiefung wurde polyklonaler Ziege-Anti-humanes IgG (H + L)-Antikörper, gebunden an Meerrettichperoxidase (HRPO), gegeben. Die Platten wurden 1 Stunde bei 37°C inkubiert und dann gewaschen. o-Phenylendiamin-2 HCl (OPD) und Wasserstoffperoxid wurden zu HRP-Farbentwicklung zugesetzt. Die Resultate wurden unter Verwendung eines Plattenlesegeräts bei 492/620 nm gelesen. Die ELISA-cut-off-O.D.-Werte für die Antigene RVV (e1 & e2), SOD, C25, C22, C33C und ns-5 waren 0,4 plus O.D. aus dem Mittelwert der Negtivkontrolle. Die cut-off-Werte von CHO-e2 und denaturiertem CHO-e2 waren 0.3 O.D. plus dem O.D. aus der entsprechenden negativen Antigenkontrolle. Der cut-off-Wert von Anti-C100-3 war 0,45 O.D. plus dem mittleren O.D. der negativen Kontrolle.

Immunoassay-Resultate

[0067] Die Resultate des ELISA-Assays unter Verwendung der oben beschriebenen Antigene zum Nachweis von Anti-HCV-Antikörpern in Blutkomponenten von Patientengruppen aus den USA sind in Tabelle 1 angegeben.

TABELLE 1

Prävalenz von HCV-Antikörpern in US-Patientengruppen

		---	--	--	----	Anti-	HCV-	positiv			
Gruppe	Anzahl der Patienten	C22	Y-e1	Y-e2	CHO-e2	rVV (e1&e2)	C33C	C100-3	Ns5	C25	ANY
A. bezahlte Spender	158	29 18%	19 12%	15 9%	30 19%	30 19%	30 19%	26 17%	27 17%	32 20%	32 20%
B. Patienten mit chronischer Transfusion-assoziierter NANBH	38	35 92%	22 58%	21 55%	36 95%	36 95%	36 95%	27 71%	28 74%	36 95%	36 95%
C.	39	39	17	13	39	39	39	27	32	39	39
NANBH-Patienten mit Drogenkonsum IV		100%	44%	33%	100%	100%	100%	69%	82%	100%	100%

A. Statistisch ausgewählte bezahlte Plasmaspender aus dem Osten, Westen, Mittelwesten und Süden der Vereinigten Staaten von Amerika.
B. & C. Serumproben von 77 Patienten mit chronischer NANBH aus dem Hunington Memorial Hospital in Pasadena, CA, die Bluttransfusionen erhalten hatten oder bei denen der Nachweis von Drogenkonsum IV erbracht worden war.

[0068] Die Resultate in Tabelle 1 erläutern, dass die durch Hefe produzierten HCV-Hüllantigene e1 & e2 viel weniger immunreaktiv sind als die rekombinanten Antigene, die in Vaccinia-Virus produziert werden, RVV (e1 & e2), und die in CHO-Zellen produziert werden, CHO-e2. In jeder untersuchten Gruppe war die Reaktivität der durch Hefe produzierten Antigene, e1 und e2, nur 2/3 oder weniger der der Antigene, die in Tierzellen produziert wurden. Es ist bemerkenswert, dass die Hefeantigene e1 und e2 in Hefezellen produziert wurden und unter denaturierenden Bedingungen gereinigt wurden. Damit ist klar, dass nur lineare Epitope in diesen Antigenen vorliegen. Dagegen wurden die nativen HCV-Antigene RVV (e1 & e2) und CHO-e2 aus den Wirtstierzellen unter nicht-denaturierenden Bedingungen isoliert, was die Existenz nativer Konformationsepitope zulässt.

[0069] Die rekombinanten nativen HCV-Antigene, die aus den E1- und E2-Genen in Zellen exprimiert wurden, schienen so immunreaktiv wie C33C und wahrscheinlich C25 zu sein und immunreaktiver als jedes der anderen untersuchten HCV-Antigene zu sein. C25 ist ein chimäres Polyprotein, dass Teile des NS_3-,NS_4 und des C-Polypeptids, die wie in Fig. 1 dargestellt, verschmolzen sind, umfasst.

[0070] Die Rolle der Konformationsepitope bei der Stimulation einer frühen Antwort im Wirtsimmunsystem wurde durch einen Immunoassay mit HCV-Serokonversions-Panels beurteilt. Die Resultate in Tabelle 2 zeigen die Immunreaktivität der nativen HCV-Hüllantigene, RVV (e1 & e2) und CHO-e2, mit den Proben in drei Kon-

versions-Panels. Die Proben in den Panels stellen aufeinanderfolgende Blutentnahmen aus einem Individuum mit Post-Transfusions-NANBH dar. Wie aus den Resultaten in Tabelle 2 ersichtlich ist, weisen die nativen HCV-Hüll-Antigene, d.h. die mit natürlichen Konformationsepitopen, Antikörper nach, die verglichen mit denen, die durch die anderen untersuchten HCV-Antigene nachgewiesen werden, relativ früh im Verlauf der Infektion gebildet werden. Somit können diese Antigene eine besondere Verwendung in Immunoassays für die Diagnose einer HCV-Infektion finden.

TABELLE 2

Vergleich von CHO-e2, rVV (e1 & e2) und Multi-Antigen-ELISA mit HCV-Serokonversions-Panels

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

TABELLE 2 FORTSETZUNG

Probe	Datum der Blutentnahme	Tage* ab Transfusion	CHO-e2 ELISA S/CO	rVV (e1 & e2) ELISA S/CO	C22 ELISA S/CO	C33C ELISA S/CO	C100-3 ELISA S/CO	ns5 ELISA S/CO	C25 ELISA S/CO	ALT Level IU/L
(4) Serokonversions-Panel B										
B1	07/19/88	0	0.08	0.09	0.08	0.09	0.08	0.21	0.09	11
B10	08/26/88	39	0.11	0.35	0.12	0.17	0.10	0.28	0.18	78
B11	08/30/88	43	0.06	0.48	0.63	0.15	0.08	0.27	0.48	180
B12	09/28/88	72	0.26	1.63	6.38	5.19	0.18	0.54	5.88	401
B13	11/09/88	114	0.16	2.18	4.95	5.99	4.15	8.16	6.78	72

* Werte sind Datum der Probensammlung.
S/CO: Assay-Signal-OD/cut-off-OD-Values.

[0071] Die Resultate in Tabelle 3 zeigen einen Vergleich von nativen HCV-Antigenen, die aus den E1- und E2-Genen exprimiert werden, mit den vergleichbaren denaturierten Antigenen. In der Tabelle wurde die Immunreaktivität mit Serum von Patienten mit akuter auflösender NANBH mit der Zeit verfolgt und mit der von Patienten mit chronischer NANBH verglichen. Wie aus Tabelle 3 zu ersehen ist, sind die nativen HCV-Hüll-Antigene, die Konformations- und lineare Epitope enthalten, RVV (e1 & e2) und CHO-e2, immunreaktiver als die Antigene, die nur lineare Epitope enthalten, e1 und e2 (in Hefen hergestellt) und denaturiertes CHO-e2.

[0072] Die Gesamtbeobachtung ist, dass die Immunreaktivität von nativen HCV-Hüll-Antigenen bei akuten auflösenden Patienten um das 8- bis 9-Fache erhöht ist und bei chronischen NANBH-Patienten um das 2-Fache erhöht ist. Demnach scheint es, dass der Hauptteil der immunologischen Antwort bei Patienten mit der auflösenden Form von NANBH Konformationsepitopen zuzuschreiben ist, während sie bei der akuten Form etwa gleichmäßig auf Konformations- und lineare Epitope verteilt ist.

[0073] Diese Untersuchungen liefern den ersten Beweis, dass Konformationsepitope bei der immunologischen Antwort eines Wirts auf HCV beteiligt sein können.

TABELLE 3

Prävalenz von Anti-HCV-Antigenen, die Konformationsepitope enthalten, vs. Antigenen, die nur lineare Epitope enthalten, bei auflösender und chronischer NANBH

	Anzahl (%) Anti-HCV-positiver Personen nach Transfusion			
Diagnose		Akute auflösende NANBH		chronische NANBH
Zeit nach Transfusion	0-6 Monate	6-12 Monate	> 12 Monate	
HCV Antigene				
C25	19/19*	19/19*	18/19*	9/9*

	(100%)	(100%)	(95%)	(100%)
rVV (e1 & e2)	16/19*	17/19*	16/19*	9/9*
	(84%)	(89%)	(84%)	(100%)
CHO-e2	11/19*	12/19*	13/19*	9/9*
	(58%)	(63%)	(68%)	(100%)
CHO-e2 (denaturiert)	1/19*	3/19*	4/19*	5/9*
	(5%)	(16%)	(21%)	(56%)
e1	1/19*	1/19*	4/19*	4/9*
	(5%)	(5%)	(21%)	(44%)
e2	2/19*	4/19*	4/19*	4/9*
	(11%)	(21%)	(21%)	(44%)

* Zahl der positiven Personen/Zahl der Personen
** Die Diagnose akuter auflösender NANBH basierte auf Biopsie (überwiegender Teil biopsiert) und Auflösung der Persistenz von Transaminasen.

Beispiel 5

E1/E2-Immunoassay: Vergleich von immunkompetenten und immunsupprimierten Patienten

Patienten

[0074] Es wurden drei Patientengruppen untersucht. Alle Patienten waren auf Antikörper gegen humanes Immundefizienzvirus (HIV) negativ. Gruppe I bestand aus 20 immunkompetenten Patienten mit chronischer HCV-Infektion, die mit einer Transfusion in Verbindung stand, die aber sonst gesund waren. Alle Patienten waren anti-HCV- und HCV-RNA-positiv. Gruppe II umfasste 15 Patienten, die Hämodialyse erhielten. 11 Patienten waren bei der Vorstellung anti-HCV-positiv, einer erhielt danach eine Nierentransplantation. 4 Patienten wurden in der Folge anti-HCV-positiv. Gruppe III umfasste 17 Nierentransplantat-Empfänger. 7 Patienten waren anti-HCV- und HCV-RNA-positiv bei der Vorstellung. 7 wurden in der folge anti-HCV-positiv, 2 von ihnen waren zu Beginn nur HCV-RNA-positiv. 2 Patienten waren bei der Vorstellung nur HCV-RNA-positiv, beide blieben HCV-RNA-positiv, wurden in der Folge aber anti-HCV-negativ. 1 Patient wurde in der Folge nur für HCV-RNA positiv.

Seren

[0075] Seren wurden im voraus zwischen Juli 1989 und April 1992 gesammelt und zum Testen in Aliquots bei –70°C gelagert. Zwei bis vier Proben, die in Intervallen von 6-12 Monaten gesammelt worden waren, wurden für die Patienten in Gruppe I untersucht. Zwei Proben, die in einem Intervall von 1.5 bis 2 Jahren gesammelt worden waren, wurden für alle Patienten in Gruppe II und III untersucht; zusätzliche Proben in dem dazwischenliegenden Zeitraum und darauffolgende Proben wurden für Patienten getestet, bei denen Änderungen im Anti-HCV- und/oder HCV-RNA-Status in der zweiten Probe erfolgt wurden.

ELISA-Assay

[0076] Die HCV-Antigene wurden wie in Beispiel 4 hergestellt und in einem ELISA-Assay, wie in Beispiel 4 beschrieben, verwendet. Im N-e1 & e2-Assay wurden falsch-positive Resultate in Folge einer Bindung an Vaccinia-Proteine durch (i) Zusatz von Vaccinia-Zelllysat zum Probenverdünnungsmittel, um als kompetetives Antigen zu dienen, und (ii) Verwendung von Vaccinia-reaktiven Proben als negative Kontrollen reduziert.

[0077] Die Resultate sind in den Fig. 3A bis Fig. 3C dargestellt. Nur 55 % der immunkompetenten Patienten der Gruppe I reagierten auf e1- oder e2-Antigene, die in Hefe exprimiert wurden; aber alle Patienten reagierten auf native, glycolysierte e1 & e2-Antigene, die in Vaccinia-Virus exprimiert worden waren. Als immunkompetente Patienten waren die meisten Hämodialyse-Patienten der Gruppe II auf die Antigene C25, C22 und N e1 & e2 reaktiv. Ein deutlich geringerer Anteil der Patienten reagierte auf C100-3, C33C, NS-5, e1 & e2. Verglichen mit den immunkompetenten Patienten reagierten deutlich weniger Nierentransplantat-Empfänger der Gruppe

II auf alle untersuchten HCV-Antigene.

[0078] Alle immunkompetenten Patienten reagierten auf C25, C22 und C33C; 90 % reagierten auf NS-5 und 80 % C100-3. Nur 55 % reagierten auf e1 & e2-Antigene, die aus Hefe stammten, aber alle reagierten gegen N e1 & e2-Antigene, die in Vaccinia exprimiert worden waren, was anzeigt, dass die Hüllepitope Konformations-Epitope sind und glycosyliert sind. 65% bis 90% der Dialyse- und Nierentransplantat-Patienten reagierten auf C25, C22 und N e1 & e2, aber nur 12% bis 60% reagierten auf C100-3, C33C und NS-5. Eine Verringerung oder ein Verlust der Reaktivität auf Hepatitis C-Virus-Antigene wurde nach einer Nieren- und Rückenmarkstransplantation beobachtet, wobei C25 und N e1 & e2 weniger beeinträchtigt werden.

[0079] Dies legt nahe, dass die e1 & e2-Epitope Konformationsepitope sind und dass die Reaktivität auf diese Epitope verglichen mit anderen HCV-Antigenen durch eine Immunsuppression minimal beeinträchtigt wird.

Patentansprüche

1. In vitro-Verfahren zum Nachweis einer frühen Serokonversion in einer Körperkomponente eines Säugerwirts auf Hepatitis C-Virus (HCV), umfassend die Schritte:
(a) Inkontaktbringen der Körperkomponente, von der vermutet wird, dass sie Antikörper gegen HCV enthält, mit (1) einem HCV-Antigen, das aus einem Antigen, das in der E1-Domäne eines HCV-Genoms, das in der E2-Domäne eines HCV-Genoms oder das in Aggregaten davon codiert wird, ausgewählt wird, wobei das HCV-Antigen unter nicht-denaturierenden Bedingungen gereinigt wird, oder (2) einer Standardkontrolle unter Bedingungen, die es zulassen, dass eine immunologische Reaktion auftritt; und
(b) Nachweisen des Vorliegens von Immunkomplexen aus diesen Antikörpern und dem Antigen, wobei das Fehlen der Immunkomplexe, die die Standardkontrolle enthalten, und das Vorliegen der Immunkomplexe, die das HCV-Antigen enthalten, eine Serokonversion auf HCV anzeigen.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das HCV-Antigen in der E1-Domäne eines HCV-Genoms codiert wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei das HCV-Antigen E1 ist.

4. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das HCV-Antigen in der E2-Domäne eines HCV-Genoms codiert wird.

5. Verfahren nach Anspruch 1 oder 4, wobei das HCV-Antigen E2 ist.

6. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das HCV-Antigen ein E1/E2-Aggregat ist.

7. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das HCV-Antigen ein E1/E1-Aggregat ist.

8. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das HCV-Antigen ein E2/E2-Aggregat ist.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei das HCV-Antigen oder das Aggregat von rekombinantem Vaccinia-Virus exprimiert wird.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei das HCV-Antigen oder das Aggregat in CHO-Zellen exprimiert wird.

Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

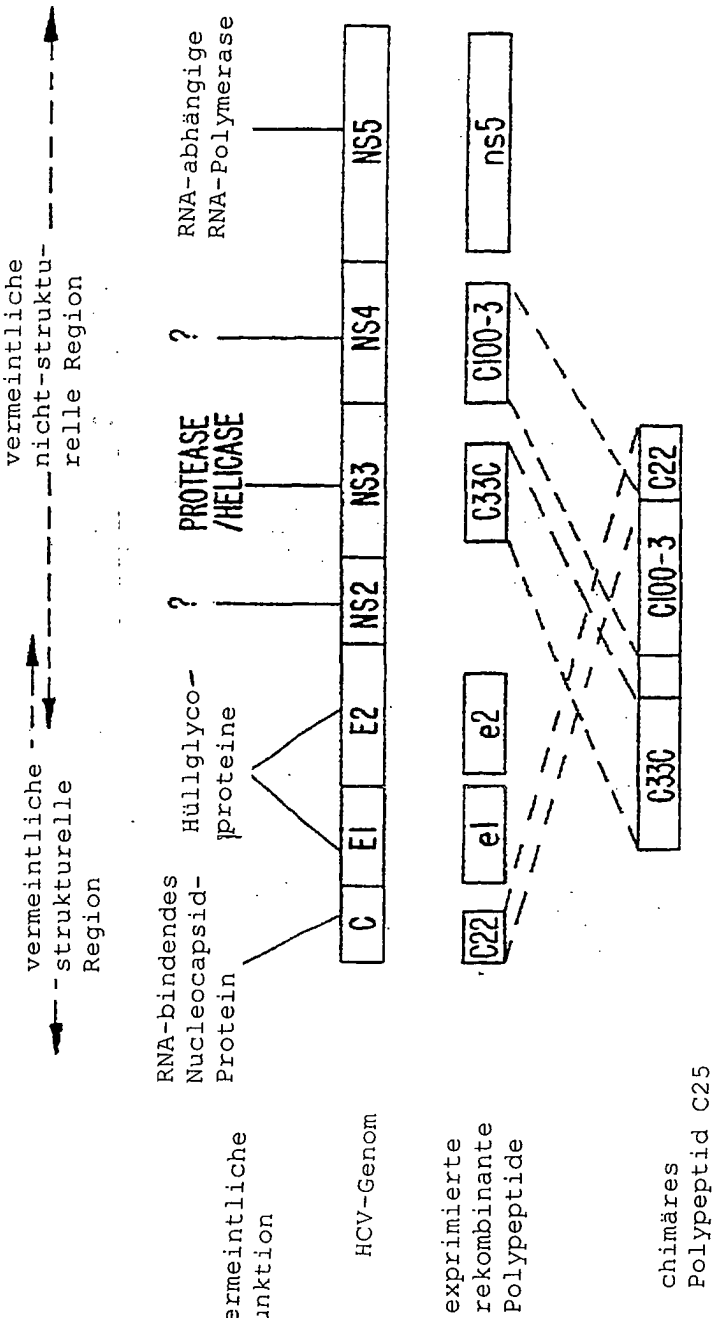
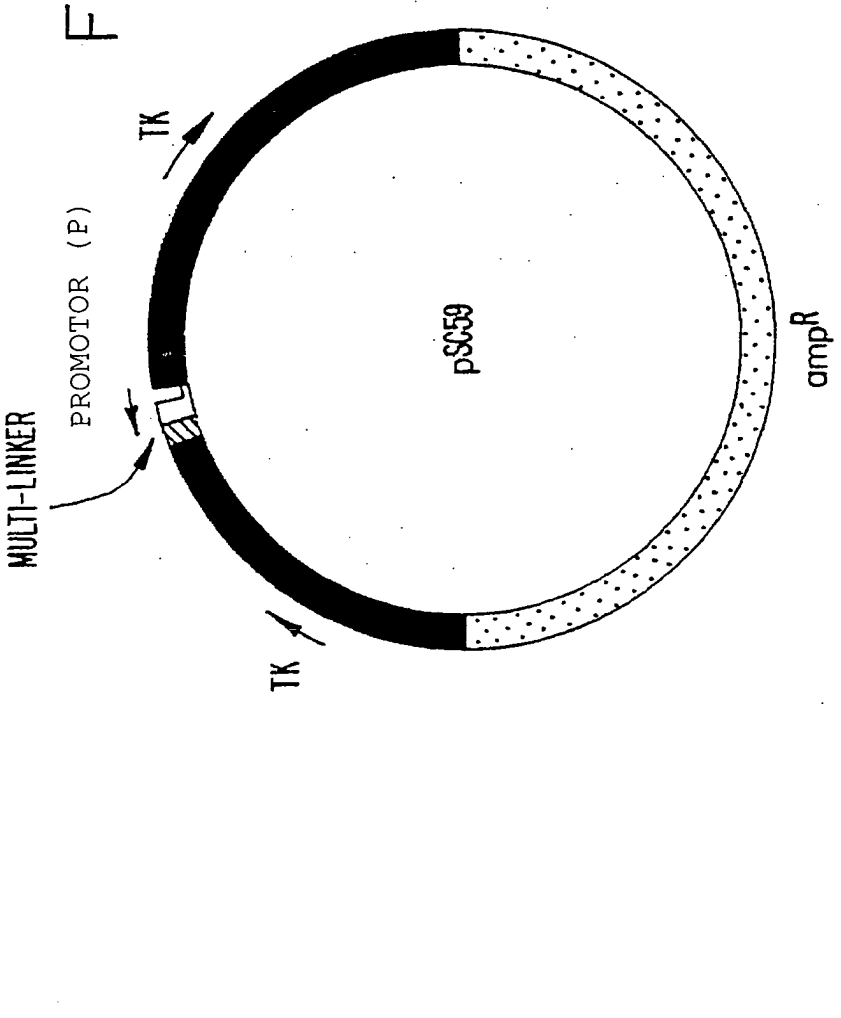


FIG. 1

FIG. 2



VacT: Transcriptionsterminations-Signal für frühe Vaccinia-Virus-mRNA

P: synthetischer Promotor mit etwa 60bp

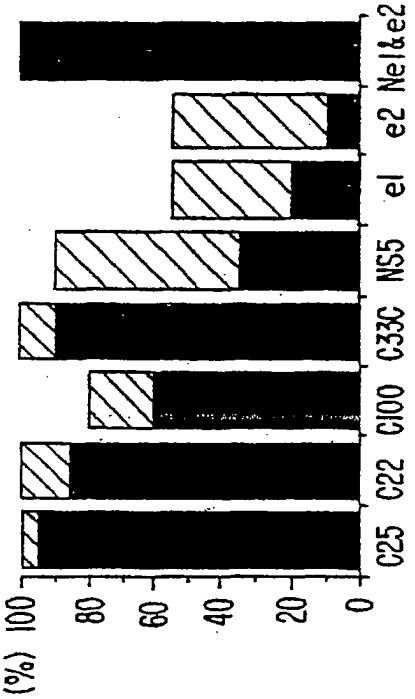


FIG. 3A

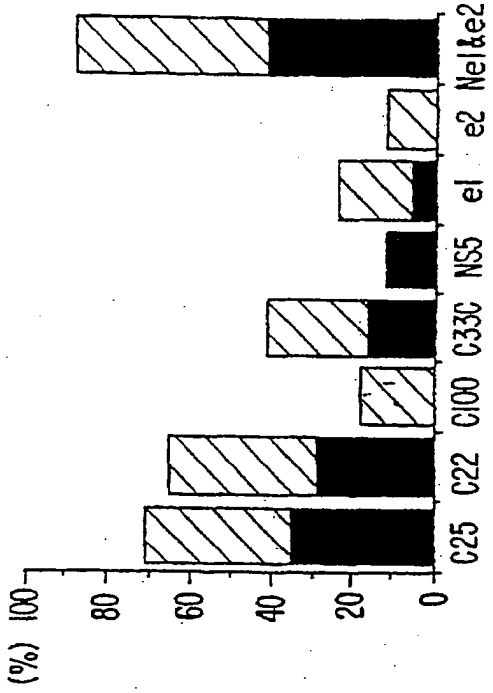


FIG. 3C

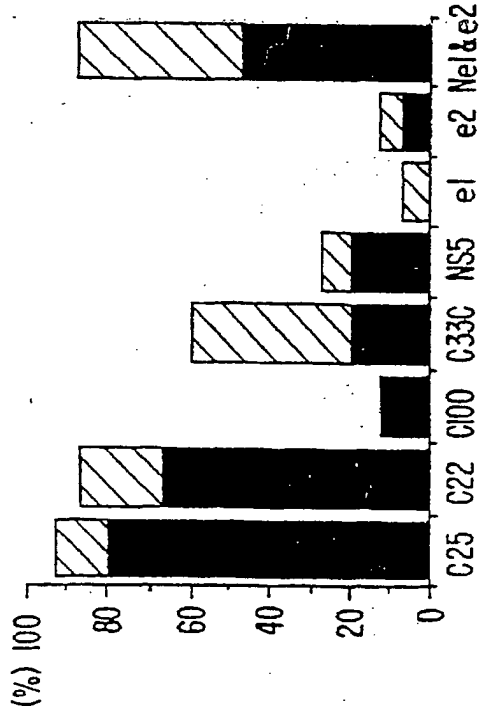


FIG. 3B