



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 697 34 776 T2 2006.08.17

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 0 935 662 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 697 34 776.1

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US97/08950

(96) Europäisches Aktenzeichen: 97 927 767.0

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 1997/044469

(86) PCT-Anmeldetag: 23.05.1997

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: 27.11.1997

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 18.08.1999

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: 30.11.2005

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 17.08.2006

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: C12N 15/62 (2006.01)

C12N 15/51 (2006.01)

C12N 15/48 (2006.01)

C07K 14/18 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

653226 24.05.1996 US  
859524 20.05.1997 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, 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:

VALENZUELA, D., Pablo, Berkeley, US; CHIEN,  
Ying, David, Alamo, US

(74) Vertreter:

Uexküll & Stolberg, 22607 Hamburg

(54) Bezeichnung: Fusionsprotein mit multiplen Epitopen

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

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

**Beschreibung****Gebiet der Erfindung**

**[0001]** Diese Erfindung bezieht sich allgemein auf die Gebiete der Proteinsynthese und Immunassays und bezieht sich spezifisch auf Verfahren zur Synthese langer Ketten von Aminosäuren, die mehrere Kopien von Epitopen für Viren wie HCV enthalten, und auf Assay-Vorrichtungen, die mehrere Epitope verwenden, um die Anwesenheit von Antikörpern nachzuweisen.

**Hintergrund der Erfindung**

**[0002]** Im Allgemeinen werden Immunassays hergestellt, indem zunächst spezifisch mit einem Virus assoziierte Epitope bestimmt werden und dann bestimmt wird, welches der Epitope für den Assay, den man entwickelt, bevorzugt ist. Wenn die immundominanten Epitope isoliert werden, werden ihre Sequenzen bestimmt, und genetisches Material zur Herstellung der immundominanten Epitope wird hergestellt. Verfahren zur Herstellung von Proteinen mit entweder chemischen oder biologischen Mitteln sind bekannt, genau wie Assays, die zur Bestimmung des Vorliegens von Antikörpern gegen bestimmte Epitope verwendet werden.

**[0003]** Bei der Herstellung von Immunassays ist das Gesamtziel, einen Immunassay zu erhalten, welcher sowohl hochgradig sensitiv als auch hochgradig selektiv ist. Der Immunassay muss so entworfen werden, dass er selbst sehr geringe Mengen des Materials nachweisen kann, für dessen Nachweis er entworfen wurde, d.h. er ist hochgradig sensitiv. Ein Assay mit einem hohen Sensitivitätsgrad stellt sicher, dass eine getestete Probe nicht mit dem Material kontaminiert ist, für dessen Nachweis der Assay entworfen wurde. Zum Beispiel ist ein hochgradig sensitiver Assay, welcher selbst die geringste Anwesenheit eines Antikörpers gegen ein gegebenes Virus nachweist, erwünscht, da er es möglich macht, Proben nachzuweisen und damit zu entsorgen, die irgendeine Menge des Antikörpers enthalten, welcher darauf hinweist, dass die Proben das Virus enthalten.

**[0004]** Obwohl ein hoher Grad an Sensitivität in einem Assay erwünscht ist, ist es nicht erwünscht, wenn der Assay fälschlicherweise auf die Anwesenheit des Materials hinweist, d.h. der Assay ein falsch positives Ergebnis liefert. Solche falsch positiven Ergebnisse können auftreten, wenn der Analyt einen hohen Grad an Ähnlichkeit mit einem anderen in der Probe vorliegenden Material aufweist. Die Fähigkeit eines Tests, zwischen zwei ähnlichen, aber unterschiedlichen Materialien zu differenzieren, bezieht sich auf seine Selektivität.

**[0005]** Ein Immunassay mit einem hohen Grad an Selektivität wird die Anwesenheit eines Materials, auf das untersucht wird, selbst dann nachweisen, wenn das Material in der Probe in Kombination mit anderen Materialien mit einer ähnlichen Struktur vorliegt. Damit wird ein hochgradig selektiver Immunassay die meisten falsch positiven Ergebnisse eliminieren. Im Allgemeinen nimmt, wenn die Selektivität steigt, die Sensitivität ab. Dies tritt teilweise wegen des hohen Grads an Variabilität bei Viren auf. Damit müssen Assays, welche entworfen wurden, um hochgradig sensitiv zu sein, die Variabilität zwischen verschiedenen Viren in Betracht ziehen. Wenn Virus-Variabilität in Betracht gezogen wird, um die Sensitivität zu verbessern, nimmt die Selektivität ab. Alternativ steigt, wenn man ein in Bezug auf ein bestimmtes Virus mehr und mehr selektives Immunassay produziert, die Wahrscheinlichkeit des Assays, so selektiv zu werden, dass die Sensitivität abnimmt.

**[0006]** Das Problem des Zurverfügungstellens von verbesserter Selektivität (weniger falsch Positive) wird zu einem hohen Grad dadurch bewältigt, dass man nach den am immundominantesten Epitopen sucht und sie findet. Das Problem der Sensitivität (Detektion geringer Konzentrationen) wird dadurch bewältigt, dass man immundominante Epitope von einer Vielzahl unterschiedlicher Regionen des Virus zur Verfügung stellt.

**[0007]** Immunologische Eigenschaften eines aus ausgewählten Determinanten von Hüllproteinen von Hepatitis B Virus bestehenden rekombinannten Polypeptids wurden durch Kumar A. et al. (Vaccine 1994 Band 12 Nr. 3: 259–266) untersucht. Ein Mehr-Antigen-Epitop von Hepatitis C Virus und seine Verwendung zur Serodiagnose von HCV-Infektionen wird von Chien D. et al. (J. Gastroenterology and Hepatology 1993, Band 8: S33.39) beschrieben. Ein Immunassay zur verbesserten Detektion von HIV-1 Gruppe 0 positiven Proben, die von verschiedenen HIV-Isolaten abgeleitete Antigene einschließt, wird von Binsbergen J. et al. (J. Virol. Methods 1996, Band 60: 131–137) beschrieben.

**[0008]** Die derzeitigen Assays sind so gestaltet, dass sie relativ wenige Peptide verwenden, welche als "Hauptepitope" oder hochgradig immundominante Epitope ausgewählt werden. Die Sensitivität der Assays hängt von der Anzahl der auf dem festen Träger verfügbaren Hauptepitope ab. Wenn die Verfügbarkeit von Epitopen durch die Anzahl von Peptiden begrenzt ist, die auf die feste Phase aufgeschichtet werden können,

wird dieser Test eine verminderte Sensitivität aufweisen. Diese Ergebnisse können als schlechte Sensitivität bei Assay-Verdünnung, schlechte Sensitivität bei Serokonversion und/oder falsch negative Bestimmungen nachgewiesen werden (Chien, D.Y. et al. (1993) J. Gastroent. Hepatol. 8: S33–39).

**[0009]** Dementsprechend gibt es im Moment einen Bedarf, die Sensitivität und Selektivität von Assays für Antikörper gegen Pathogene in biologischen Flüssigkeiten zu verbessern und damit die Diagnose von Pathogeninfektionen zu verbessern, was zu verbesserter Reihenuntersuchung von Blutvorräten führt.

#### Zusammenfassung der Erfindung

**[0010]** Mehr-Kopien-Fusionsantigen (multiple copy fusion antigen, MEFA)-Immunassays, die in der Lage sind, Antikörper von mehreren Stämmen eines Pathogens in einem einzigen Assay nachzuweisen, werden hergestellt, indem man (1) Nukleotidsequenzen identifiziert, die für eine Vielzahl von verschiedenen Epitopen kodieren, einschließlich immundominanter Komponenten; (2) die Nukleotidsequenzen in einer Expressionskassette einbringt, wobei mindestens zwei Kopien einer für die gleiche Epitop-Region eines Organismus, wie eines Virus, oder für entsprechende Regionen verschiedener Stämme des Virus kodierende Sequenz in eine einzige Kassette eingebracht werden; (3) einen geeigneten Wirt mit einer oder mehreren Kopien der Kassette transformiert, um für Epitope kodierende Sequenzen zu exprimieren, wobei die Sequenzen zwei oder mehr Kopien von mindestens einem Epitop in einem Antigen mit einer einzigen Kette einschließen werden; (4) das exprimierte Mehr-Epitop-Antigen aufreinigt; und (5) das auf gereinigte Mehr-Epitop-Antigen für einen Immunassay anpasst, wobei das Anpassen das Folgende einschließen kann, aber nicht darauf begrenzt ist: das Beschichten des Mehr-Epitop-Antigens auf die Oberfläche eines Substrats, kovalentes Verbinden eines detektierbaren Markers mit dem Mehr-Epitop-Antigen und Ähnliches.

**[0011]** Die auf gereinigten Epitopen werden von der allgemeinen Strukturformel  $(A)_x-(B)_y-(C)_z$  umfasst, welche eine lineare Aminosäuresequenz darstellt. B ist eine Aminosäuresequenz von mindestens 5 und nicht mehr als 1.000 Aminosäuren einer antigenen Determinante oder eines Clusters von Antigen-Determinanten, und y ist eine ganze Zahl von 2 oder mehr. Jede Kopie von B ist eine äquivalente Antigen-Determinante (z.B. ist jede Kopie ein Epitop aus einem unterschiedlichen Virus-Stamm). A und C sind jeweils unabhängig voneinander eine Aminosäuresequenz eines Epitops oder eines Clusters von Epitopen, die in der Natur nicht direkt an B grenzt/grenzen; und x und z sind jeweils unabhängig voneinander eine ganze Zahl von 0 oder mehr, wobei mindestens eins von x und z 1 oder mehr ist. Bevorzugterweise sind die y-Epitope von B äquivalente Antigen-Determinanten von unterschiedlichen viralen Stämmen, wodurch die Vielzahl von Pathogenen, die mit einem einzigen Mehr-Epitop-Antigen detektierbar ist, zunimmt.

**[0012]** Die Selektivität wird weiterhin gesteigert, indem man immundominante Epitope aus der gleichen Region von zwei oder mehr unterschiedlichen Stämmen des gleichen Virus einschließt. Mehr bevorzugt weisen die äquivalenten Antigen-Determinanten von B eine unterschiedliche Serotyp-Spezifität auf. Die erfindungsgemäßen Epitope sind löslicher und daher leichter aufzureinigen als konventionelle Epitope. Weiterhin verringert die Anwesenheit von sich wiederholenden Epitop-Sequenzen Maskierungsprobleme und steigert die Sensitivität beim Nachweis von Antikörpern, indem eine größere Anzahl von Epitopen auf einer Flächeneinheit des Substrats möglich wird. Die Sensitivität wird weiter verbessert, indem die erfindungsgemäßen Mehr-Kopien-Epitope auf kleinen sphärischen oder unregelmäßig geformten Kugelchen oder Mikropartikeln aufgebracht werden, wodurch die exponierte Oberfläche pro gegebener Fläche einer Assay-Vorrichtung gesteigert wird.

**[0013]** Ein Ziel der Beschreibung ist es, eine Aminosäuresequenz zur Verfügung zu stellen, welche eine Mehrzahl von Epitopen umfasst, wobei zumindest der Antigen-Determinanten-Teil von mindestens einem der Epitope zwei- oder mehrfach wiederholt wird.

**[0014]** Ein anderes Ziel der Beschreibung ist es, ein Verfahren zur Verfügung zu stellen, um ein Immunassay unter Verwendung von Mehr-Epitop-Fusionsantigenen herzustellen.

**[0015]** Ein beschriebenes Merkmal ist es, dass Aminosäuresequenzen, die mehrere Kopien einer gegebenen Epitop-Sequenz aufweisen, im Vergleich zu Aminosäuresequenzen, welche nur eine einzige Kopie eines jünglichen gegebenen Epitops umfassen, eine größere Löslichkeit aufweisen.

**[0016]** Ein anderes Merkmal der Erfindung ist es, dass die für die Epitope kodierenden Nukleotidsequenzen eine lineare Reihenfolge aufweisen, die sich von ihrer linearen Reihenfolge in dem Genom des Pathogens unterscheiden kann. Damit können die Antigen-Determinanten von A, B und C eine lineare Reihenfolge unterschiedlich von den natürlich vorkommenden Antigen-Determinanten A, B und C aufweisen. Die lineare Reihen-

folge der erfindungsgemäßen Sequenzen wird bevorzugt im Hinblick auf optimale Antigenität der exprimierten Aminosäuresequenzen, welche das Mehr-Epitop-Fusionsantigen umfassen, arrangiert.

**[0017]** Ein Vorteil der Erfindung ist es, dass die Mehr-Epitop-Antigene von Formel (I) leichter auf gereinigt werden können als konventionelle Epitope.

**[0018]** Ein anderer Vorteil der Erfindung ist es, dass eine Maskierung einer Antigen-Determinante verringert werden kann.

**[0019]** Ein anderer Vorteil der Erfindung ist es, dass die die Mehr-Epitop-Fusionsantigene verwendenden Immunassays verbesserte Sensitivität und Selektivität aufweisen.

**[0020]** Noch ein weiterer Vorteil der Erfindung ist es, dass die mehreren Epitope, insbesondere die wiederholten Epitope von B, einen Test ermöglichen, der in der Lage ist, basierend auf der Spezifität der Epitope mehr als einen Stamm eines einzigen Virus nachzuweisen.

**[0021]** Ein anderes Merkmal der Erfindung ist es, dass die Mehr-Epitop-Sequenzen von Formel (I) so gestaltet sein können, dass sie eine größere Anzahl und/oder längere Sequenzen einschließen, als sie im Allgemeinen in nur eine einzige Kopie eines jeglichen gegebenen Epitop enthaltenden Epitop-Sequenzen vorliegen.

**[0022]** Ein weiterer Vorteil der Erfindung ist es, dass die Struktur der Mehr-Epitop-Antigene nach Formel (I) es möglich macht, im Vergleich zu nur eine einzige Kopie eines jeglichen gegebenen Epitops enthaltenden Antigenen eine größere Anzahl von Antigen-Determinanten auf einer Oberflächeneinheit eines Immunassays einzubringen.

**[0023]** Die Erfindung stellt auch den Vorteil zur Verfügung, die allgemeine Spezifität und Sensitivität serologischer Tests zu verbessern, wenn mehrere Epitope benötigt werden und die Oberfläche der festen Phase begrenzend ist. Zusätzlich werden auf einem einzigen chimären Antigen basierende Immunassays-Tests den Herstellungsprozess stark vereinfachen, insbesondere bei Tests, für die mit detektierbaren Markern markierte Antigene nötig sind.

**[0024]** Eine Ausführungsform der Erfindung stellt weiterhin unter Verwendung von Mehr-Epitop-Fusions-Antigenen einen schnellen, Liganden einfangenden Immunassay zur Verfügung, der leicht und bequem durchzuführen ist, da es ein gleichzeitiger Einschritt-Assay ist. Die Detektion wird durch das Anhängen eines detektierbaren Markers an ein Mitglied des Antigen/Antikörper-Komplexes durchgeführt, bevorzugt an das Antigen. Das Anhängen kann durch kovalente Mittel oder durch folgende Bindung detektierbarer markierter Antikörper durchgeführt werden, wie in einem Standard-Sandwich-Assay, oder durch eine Enzymreaktion, deren Produkt detektierbar ist. Der detektierbare Marker kann ein Chromophor, einen Antikörper, ein Antigen, ein Enzym, eine mit einem Enzym reaktive Verbindung, deren Spaltungsprodukt nachweisbar ist, Rhodamin oder ein Rhodamin-derivat, Biotin, Streptavidin, eine fluoreszierende Verbindung, eine chemolumineszente Verbindung wie Dimethylacridiniumester (DMAE, Ciba Corning Diagnostics Corp.), Derivate und/oder Kombinationen dieser Marker einschließen, ist aber nicht darauf begrenzt.

**[0025]** In einer anderen Ausführungsform der Erfindung enthält das einen Liganden einfangende Assay-Format ein MEFA als Antigen, genau wie ein zusätzliches detektierbares Epitop, welches zur Assaymischung hinzugefügt wird. Das zusätzliche detektierbare Epitop kann ein einziges Epitop oder mehrere Epitope sein und kann die in dem MEFA eingeschlossenen Epitope, bevorzugt Epitope aus Regionen wie E1, E2 und c33c einschließen, ist aber nicht darauf begrenzt. Gemäß dieser Ausführungsform der Erfindung wird das zusätzliche Epitop mit einem nachweisbaren Marker, wie oben beschrieben, verbunden oder ist damit zu verbinden. Wenn das zusätzliche Epitop bevorzugte Charakteristika wie Konformation, Glykosylierung und ähnliches aufweist, wird das zusätzliche Epitop als rekombinantes Polypeptid in einer Zelle exprimiert, wobei die Expression des Epitop in einer gewünschten Form zur Verfügung stellt. Bevorzugt ist das Epitop aus der Zelle unter Verwendung sanfter Isolationsbedingungen erhältlich, welche die gewünschten Charakteristika des Epitops bewahren. Die Zelle kann jegliche angemessene Zelle sein, wie eine Säugetier-Zelle, bevorzugt eine Ovarzelle eines Chinesischen Hamsters (Chinese hamster ovary, CHO) oder eine Bakterien-, Hefe- oder Insekten-Zelle, aus der das zusätzliche Epitop in der gewünschten Form isoliert werden kann.

**[0026]** Diese und andere Ziele, Vorteile und Merkmale der vorliegenden Erfindung werden den Fachleuten beim Lesen der Details über Mehr-Kopien-Epitope, Immunassays und Verfahren zur Herstellung von solchen, wie unten in weiterem Detail beschrieben, offensichtlich werden, wobei Bezug auf die begleitende allgemeine

Strukturformel genommen wird, die ein Teil hiervon bildet, wobei ähnliche Symbole sich durchgängig auf ähnliche molekulare Einheiten beziehen.

#### Kurze Beschreibung der Abbildungen

**[0027]** [Fig. 1](#) ist eine schematische Zeichnung, welche die Identifizierung, die Aminosäuren und das Arrangement von Epitopen in den MEFA-3-, MEFA-5- und MEFA-6-Antigenen zeigt.

**[0028]** [Fig. 2](#) ist eine schematische Zeichnung, welche die MEFA-5-Antigen-Epitope und ihre Lokalisierung innerhalb des HCV-Genoms zeigt. Ein Diagramm von pmefa-5, einem Expressionsvektor für MEFA-5, wird auch zur Verfügung gestellt.

**[0029]** [Fig. 3](#) ist eine schematische Zeichnung, welche die MEFA-6-Antigen-Epitope und ihre Lokalisierung in dem HCV-Genom zeigt. Ein Diagramm von pmefa-6, einem Expressionsvektor für MEFA-6, wird auch zur Verfügung gestellt.

**[0030]** [Fig. 4](#) ist eine schematische Zeichnung eines Enzyme-linked immunosorption assay (ELISA), in dem ein MEFA auf der Oberfläche eines festen Trägers absorbiert ist.

**[0031]** [Fig. 5](#) ist ein schematisches Diagramm eines Antikörper-Einfang-Formats zur Detektion von anti-HCV-Antikörpern durch Chemolumineszenz, wobei ein MEFA mit einem detektierbaren Marker-Molekül, DMAE, verbunden ist. Es wird auch auf ein Format hingewiesen, in dem ein MEFA (MEFA-6) und ein zusätzliches Epitop (c33c) die Antigene des Assays sind.

**[0032]** [Fig. 6](#) ist ein schematisches Diagramm eines einen Antikörper einfangenden Formats zur Detektion von humanen anti-Pathogen Antikörpern durch Chemolumineszenz, wobei ein Antigen (MEFA) mit Biotin (B) verbunden ist, welches mit DMAE markiertes Streptavidin bindet.

**[0033]** [Fig. 7](#) ist eine Grafik, die Sensitivität bei Verdünnung von MEFA-6-DMAE und MEFAF-6-DMAE + c33c-DMRE mit der Sensitivität bei Verdünnung von einem kommerziellen ELISA, HCV 2.0G (zweite Generation) ELISA vergleicht.

**[0034]** [Fig. 8](#) ist eine Grafik, welche einen kommerziellen ELISA (Abbott Laboratories), MEFA-6, MEFA-6 + c33c und RIBA® 3.0 in Bezug auf die Sensitivität bei Serokonversion vergleicht. Proben wurden nach und nach (Daten der Blutentnahme) aus einem chronisch infizierten Patienten entnommen.

**[0035]** [Fig. 9](#) ist ein Diagramm, in welchem HCV-Antikörpernachweis (positiv oder negativ) in Proben mit HCV-ELISA zweiter Generation mit dem Nachweis mit einem MEFA Chemolumineszenz-Immunassay (CLIA) korreliert wird.

**[0036]** [Fig. 10](#) ist eine die Genauigkeit des erfindungsgemäßen ME-FA-6-DMAE CLIA illustrierende Zeichnung. Alle bekannten negativen Proben zeigten relative Lichteinheiten (relative light units, RLU) unter dem Schwellenwert, während bekannte positive Proben RLUs deutlich über dem Schwellenwert zeigten.

#### Detaillierte Beschreibung von Ausführungsformen

**[0037]** Bei der Durchführung der vorliegenden Erfindung werden, wenn nicht anderweitig angegeben, konventionelle Verfahren der Virologie, Immunologie, Mikrobiologie, Molekularbiologie und Gentechnik im Rahmen der Fähigkeiten des Fachmanns genutzt werden. Solche Techniken werden in der Literatur vollständig erklärt. Siehe z.B. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2. Auflage, 1989); DNA Cloning: A Practical Approach, Band I & II (D. Glover, Hrsg.); Methods In Enzymology (S. Colowick und N. Kaplan, Hrsg., Academic Press, Inc.); und Handbook of Experimental Immunology, Band I-IV (D.M. Wier und C.C. Blackwell, Hrsg., Blackwell Scientific Publications); Fundamental Virology, 2. Ausgabe, Band I & II (B.N. Fields und D.M. Knipe, Hrsg.).

**[0038]** Bevor die vorliegenden Mehr-Epitop-Fusions-Proteine, Immunassays und Verfahren zur Herstellung und Verwendung derselben beschrieben werden, sollte es verstanden werden, dass diese Erfindung nicht auf die bestimmten Aminosäuresequenzen, Immunassays oder Verfahren zu deren Herstellung beschränkt ist, da diese selbstverständlich variieren können. Es sollte auch verstanden werden, dass die vorliegend verwendete Terminologie nur dem Zwecke dienen soll, bestimmte Ausführungsformen zu beschreiben, und nicht beschrän-

kend sein soll, da der Rahmen der vorliegenden Erfindung nur durch die angehängten Ansprüche begrenzt werden wird.

**[0039]** Sofern nicht anders definiert, haben alle vorliegend verwendeten technischen und wissenschaftlichen Begriffe die gleiche Bedeutung, wie sie im Allgemeinen von einem Fachmann auf dem Gebiet, zu dem diese Erfindung gehört, verstanden wird. Obwohl jegliche zu den vorliegend Beschriebenen ähnliche oder äquivalente Verfahren und Materialien bei der Durchführung oder dem Testen der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, werden die bevorzugten Verfahren und Materialien nun beschrieben.

#### Definitionen

**[0040]** Wie vorliegend verwendet, beschreibt die Bezeichnung "Mehr-Kopien" eine Folge von Aminosäuren, die mindestens etwa 5 und nicht mehr als etwa 1.000 Aminosäuren auf lineare Art enthält, welche zwei- oder mehrfach innerhalb eines linearen Moleküls wiederholt werden. Die sich wiederholende Sequenz braucht nicht direkt mit sich selbst verbunden zu sein, wird in der Natur nicht auf dieselbe Art wiederholt und kann weiterhin innerhalb einer größeren Sequenz vorliegen, die andere, nicht wiederholte oder "kopierte" Aminosäuresequenzen einschließt. Die Sequenz von mindestens 5 und nicht mehr als 1.000 Aminosäuren umfasst ein Epitop, wie unten definiert. Für die Zwecke dieser Erfindung kann eine "Kopie" einer Aminosäuresequenz entweder eine Kopie der genauen Sequenz oder eine Sequenz sein, welche dem gleichen Epitop eines anderen viralen Stammes entspricht, d.h. Kopien sind entweder genaue Kopien oder Sequenzen, welche "äquivalente Antigen-Determinanten", wie unten definiert, sind.

**[0041]** Die Bezeichnung "Epitop", wie vorliegend verwendet, bezieht sich auf eine Sequenz von mindestens etwa 5 und nicht mehr als etwa 1.000 Aminosäuren, die auf eine lineare Art verbunden sind, wobei die Aminosäuren entweder selbst oder als Teil einer größeren Sequenz an einen als Antwort auf eine solche Sequenz hergestellten Antikörper binden. Ein Epitop zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung ist nicht auf ein Polypeptid mit der genauen Sequenz des Teils des Ausgangsproteins, von dem es abgeleitet ist, beschränkt. Tatsächlich befinden sich virale Genome in einem Zustand eines stetigen Flusses und enthalten mehrere variable Domänen, die einen relativ hohen Grad an Variabilität zwischen Isolaten zeigen. Damit schließt die Bezeichnung "Epitop" Sequenzen ein, die zu der nativen Sequenz identisch sind, genau wie Modifikationen der nativen Sequenz, wie Deletionen, Additionen und Substitutionen (im Allgemeinen konservativ in ihrer Art).

**[0042]** Wie vorliegend verwendet, bezieht sich die Bezeichnung "Konformations-Epitop" auf ein rekombinantes Epitop mit strukturellen Merkmalen, welche für die Aminosäuresequenz nativ sind, die das Epitop in dem natürlichen Protein ganzer Länge kodiert. Native strukturelle Merkmale schließen Glykosylierung und dreidimensionale Struktur ein, sind aber nicht darauf begrenzt. Im Allgemeinen wird ein Konformations-Epitop der MEFA-enthaltenen Immunassay-Mischung hinzugefügt, um die Sensitivität und Selektivität des Assays zu verbessern. Bevorzugt wird ein rekombinantes Konformations-Epitop in einer Zelle exprimiert, aus der es unter Bedingungen extrahierbar ist, welche seine gewünschten strukturellen Merkmale bewahren, z.B. ohne Denaturierung des Epitops. Solche Zellen schließen Bakterien-, Hefe-, Insekten- und Säugetier-Zellen ein. Bevorzugterweise ist eine Zelle, in der ein Konformations-Epitop exprimiert wird, eine Säugetier-Zelle, wie eine Ovar-Zelle eines Chinesischen Hamsters (Chinese hamster ovary cell, CHO). Expression und Isolation rekombinanter Konformations-Epitop aus den E1- und E2-Regionen von HCV sind in WO 96/04301, WO 94/01778, WO 95/33053, WO 92/08734 beschrieben.

**[0043]** Die Bezeichnung "Expressionskassette", wie vorliegend verwendet, bezieht sich auf eine DNA-Sequenz, welche eine kodierende Region enthält, die funktionell mit einer oder mehreren geeigneten Kontrollsequenzen verbunden ist, die in der Lage sind, eine Expression der kodierenden Region in einem kompatiblen Wirt zu bewirken. Expressionssysteme umfassen unabweichlich einen Promotor, können aber, abhängig von dem beabsichtigten Wirt, zusätzliche kritische Nukleotidsequenzen wie eine Ribosomen-Bindungsstelle oder CAP-Stelle, Terminations-Sequenz und möglicherweise Enhancer-Sequenzen oberhalb des Promotors oder an anderen funktionellen Stellen enthalten. Die erfindungsgemäßigen rekombinanten Expressionskassetten umfassen hierbei eine erfindungsgemäße DNA, die für ein funktionell mit zusätzlichen DNA-Sequenzen, die in der Lage sind, seine Expression zu bewirken, verbundenes MEFA kodiert. Die Expressionskassette kann sich auf einem Transfervektor wie einem Plasmid oder einem anderen, sich unabhängig von dem Chromosom der Wirtszelle selbst replizierenden Vektor befinden oder kann so konstruiert sein, dass sie in der Lage ist, sich in das Chromosom zu integrieren, wenn sie in eine Wirtszelle eingeführt wird.

**[0044]** Unter "äquivalente Antigen-Determinante" wird eine Antigen-Determinante aus unterschiedlichen Unterspezies oder Stämmen eines gegebenen Organismus verstanden, z.B. einem unterschiedlichen Stamm ei-

nes Virus, wie von Stämmen 1, 2 oder 3 des Hepatitis C Virus. Genauer sind für ein Virus wie Hepatitis C Epitope bekannt, wie 5-1-1, und solche Epitope unterscheiden sich zwischen den bekannten Stämmen 1, 2 und 3. Die Epitope 5-1-1 aus den drei unterschiedlichen Stämmen sind damit äquivalente Antigen-Determinanten und sind damit sogar "Kopien", obwohl ihre Sequenzen nicht identisch sind. Im Allgemeinen werden die Aminosäuresequenzen von äquivalenten Antigen-Determinanten einen hohen Grad an Sequenzhomologie aufweisen.

**[0045]** Die Bezeichnung "Tracer" soll jegliches nachweisbare Marker-Molekül bezeichnen, welches mit einem Epitop oder einem MEFA verbunden ist. Die Verbindung findet bevorzugt mit kovalenten Mitteln statt. Nachweisbare Marker-Moleküle, die als Tracer in der Erfindung nützlich sind, schließen Dimethylacridiniumester (DMAE), ein Chromophor, Biotin, Streptavidin, einen Antikörper, ein Antigen, Enzyme, fluorogene Verbindungen, Rhodamin-Verbindungen, Fluorescein, FITC und ähnliches ein, sind aber nicht darauf beschränkt.

#### Immunassays – allgemein

**[0046]** Hochgradig sensitive und selektive Immunassays können unter Verwendung der erfindungsgemäßen Mehr-Epitop-Fusionsantigene hergestellt werden. Um solche Immunassays herzustellen, ist es zunächst notwendig, ein Ziel zu identifizieren, auf das eine Probe untersucht werden soll, z.B. ein bestimmtes Virus in einer Probe einer Körperflüssigkeit. Nach der Identifizierung des Virus von Interesse werden die bevorzugten immundominanten Epitope des Virus isoliert, sequenziert und für die Aminosäuresequenzen der Epitope kodierenden Nukleotidsequenzen festgestellt und hergestellt. Die für die Aminosäuresequenzen kodierenden Nukleotidsequenzen können unter Verwendung von Standard-Gentechnik-Verfahren miteinander fusioniert werden. Die Sequenzen können auch mit zusätzlichen Polypeptiden fusioniert werden, um ihre Expression und Aufreinigung zu erleichtern.

**[0047]** Die fusionierte Sequenz muss mindestens 2 Kopien der für ein gegebenes Epitop kodierenden Nukleotidsequenz enthalten. Die Nukleotidsequenz wird dann in eine Expressionskassette eingebracht und ein geeigneter Wirt wird mit der Kassette transformiert. Dem Wirt wird erlaubt, die Sequenz zu exprimieren, um die Mehr-Kopien-Epitope (Mehr-Epitop-Fusionsantigen, MEFA) zur Verfügung zu stellen. Die hergestellten Mehr-Kopien-Epitope werden dann aufgereinigt, z.B. mit Affinitätschromatographie, wobei dieses Verfahren zu einem bestimmten Grad wegen der Anwesenheit der mehreren Kopien eines gegebenen Epitops erleichtert wird. Für ELISA-artige Assays wird dann die Oberfläche des Substrats mit den aufgereinigten MFAs beschichtet. Alternativ werden die aufgereinigten MFAs zur Detektion von Antikörperbindung mit einem detektierbaren Marker-Tracer-Molekül verbunden, wie in einem Chemolumineszenz-Assay (CLIA).

**[0048]** Das Wesen der Erfindung liegt in den aufgereinigten Mehr-Kopien-Epitopen, d.h. aufgereinigten Fusionsproteinen, die mehrere Kopien eines gegebenen Epitops einschließen, in einer linearen Art fusioniert mit anderen Epitopen, die normalerweise in der Natur nicht miteinander auf diese Art verbunden sind (MFAs). Die aufgereinigten Epitope werden von der allgemeinen Strukturformel (I) wie folgt umfasst:  $(A)_x\text{-(B)}_y\text{-(C)}_z$ , welche eine lineare Aminosäuresequenz darstellt. B ist eine Aminosäuresequenz eines Epitops oder Clusters von Epitopen und jedes B enthält mindestens 5 und nicht mehr als 1.000 Aminosäuren, y ist eine ganze Zahl von zwei oder mehr, A und C sind jeweils unabhängig voneinander eine Aminosäuresequenz eines Epitops oder eines Clusters von Epitopen, die in der Natur nicht direkt an B grenzt/grenzen, und x und z sind unabhängig voneinander jeweils eine ganze Zahl von 0 oder mehr, wobei mindestens eins von x oder z 1 oder mehr ist. Wenn sowohl x, y als auch z größer als 1 ist, oder wenn sowohl x, y als auch z größer als 1 sind, können die mehreren Kopien von A, B und C identisch sein, d.h. jede Kopie von A (unterschiedlich von B und C) ist die genau gleiche Aminosäuresequenz, jede Kopie von B (unterschiedlich von A und C) ist die genau gleiche Aminosäuresequenz und jede Kopie von C (unterschiedlich von A und B) ist die genau gleiche Aminosäuresequenz. Alternativ kann jede Kopie von A, B oder C eine äquivalente Antigen-Determinante von unterschiedlichen Stämmen des gleichen Virus sein. Damit kann z.B., wenn y 3 ist, jedes B eine identische Aminosäuresequenz oder drei unterschiedliche Sequenzen von äquivalenten Antigen-Determinanten aus den HCV-Stämmen 1, 2 und 3 sein. Die Erfindung kann genetisches Material nutzen, welches für bekannte Epitope oder Gruppen von Epitopen kodiert, indem man das Material in einem Nukleinsäurekonstrukt verbindet, welches ein Mehr-Kopien-Epitop der Formel (I) herstellt.

**[0049]** HCV-Antikörper einfangende Assays, in denen ein fester Träger mit individuellen einzelnen Epitope beschichtet wird, sind weniger sensitiv als Einfang-Assays, in denen ein fester Träger mit einem chimären Mehr-Epitop-Polyprotein wie (C25), enthaltend Epitope aus den immundominanten Sequenzen aus Core-, c33c (NS3)- und c100 (NS4)-Region (Chien, D.A., et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10011–10015), beschichtet wird. Wiederum ist ein Einfang-Assay unter Verwendung des C25 chimären Polyproteins weniger

sensitiv als ein HCV-Antikörper Einfang-Assay unter Verwendung eines erfindungsgemäßen MEFA, wobei MEFA mehrere Kopien von mindestens einem Epitop enthält und mindestens eine Kopie von einem unterschiedlichen HCV-Stamm stammt. Damit enthält ein bevorzugtes MEFA der Erfindung mit der allgemeinen Formel Ax-By-Cz mehr als eine Kopie eines Epitops (d.h. y ist eine ganze Zahl von 2 oder mehr) und mindestens eins der Epitope von B ist eine unterschiedliche äquivalente Antigen-Determinante (d.h. ein Epitop aus einem unterschiedlichen Pathogenstamm).

**[0050]** Die vorliegend offenbare Erfindung verwendet Gentechnik und Proteintechnik, um ein rekombinantes Polyprotein zu entwerfen, welches eine Vielzahl unterschiedlicher immundominanter Epitope von einer Vielzahl von Pathogenen oder Pathogenstämmen als das chimäre Antigen zur Entwicklung von Immunassays verschmilzt. Weiterhin nutzt die Erfindung mehrere Kopien ausgewählter Epitope von strukturellen genau wie nichtstrukturellen kodierenden Regionen eines Gens, welche kombiniert und als rekombinantes Polyprotein exprimiert werden, um die Sensitivität und Selektivität eines Immunassays deutlich zu verbessern.

**[0051]** Zur Herstellung der erfindungsgemäßen Mehr-Kopien-Epitope verwendete Epitope können von einer Vielzahl unterschiedlicher Organismen stammen. Zum Beispiel kann das Epitop eine Aminosäuresequenz aus einem Bakterium, einem Protozoon, einem Virus, einer Rickettsia, einem Parasiten oder einem Fungus sein. Eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung verwendet Epitope, die von einem Bakterium oder Virus abgeleitet sind, wobei besonders bevorzugte Epitope solche sind, die von einem Virus abgeleitet sind, wie von einem humanen Immundefizienz-Virus (HIV) und, am meisten bevorzugt, von Hepatitis C Virus (HCV). Zum Beispiel können HIV-Epitope von jeglicher der verschiedenen viralen Regionen abgeleitet sein, welche Immunreakтивität zeigen, wie z.B. jegliches der verschiedenen Hüllproteine wie gp120, gp160 und gp41, gag-Antigene wie p24gag und p55gag, genau wie von der pol-Region abgeleitete Proteine, aber nicht begrenzt darauf. Ähnlich können HCV-Epitope von einer jeglichen der verschiedenen viralen Regionen abgeleitet sein, wie z.B den C-, E1-, E2/NS1-, NS2-, NS3-, NS4- und NS5 Regionen, aber nicht begrenzt darauf.

**[0052]** [Fig. 1](#) zeigt beispielhafte MEFA-Antigene, die von HCV abgeleitet sind, zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung. Es soll jedoch verstanden werden, dass andere aus dem HCV-Genom abgeleitete Epitope bei den vorliegenden Assays auch Verwendung finden werden. Zum Beispiel können zusätzliche Epitope in dem MEFA-Antigen eingeschlossen sein, abgeleitet z.B. aus der hypervariablen Region von E2, wie einer die Aminosäuren 384–410 oder 390–410 umspannende Region. Ein besonders effektives E2-Epitop ist eines, welches eine aus dieser Region abgeleitete Konsensus-Sequenz einschließt, wie die Konsensus-Sequenz Gly-Ser-Ala-Ala-Arg-Thr-Ser-Gly-Phe-Val-Ser-Leu-Phe-Ala-Pro-Gly-Ala-Lys-Gln-Asn, welche eine Konsensus-Sequenz der Aminosäuren 390–410 des HCV Typ-1-Genoms darstellt. Ein in einem erfindungsgemäßen MEFA-Antigen vorliegendes beispielhaftes E2-Epitop kann ein die Aminosäuren 390–444 umfassendes Hybrid-Epitop umfassen. Ein solches Hybrid-E2-Epitop kann eine Konsensus-Sequenz einschließen, die Aminosäuren 390–410 fusioniert mit der nativen Aminosäuresequenz für Aminosäuren 411–444 von HCV-E2 darstellt.

**[0053]** Es ist wohlbekannt, dass sich jeglicher gegebener Organismus von einem individuellen Organismus zu einem anderen unterscheidet und, weiterhin, dass ein gegebener Organismus, wie ein Virus, eine Anzahl unterschiedlicher Stämme aufweisen kann. Zum Beispiel existieren eine Vielzahl von HIV-Isolaten, und Hepatitis C Virus schließt mindestens die Stämme 1, 2 und 3 ein. Jeder dieser Stämme wird äquivalente Antigen-Determinanten einschließen. Spezifischer wird jeder Stamm eine Anzahl an Antigen-Determinanten einschließen, welche auf allen Stämmen des Virus vorliegen werden, aber von einem Virusstamm zum nächsten leicht unterschiedlich sein werden. Zum Beispiel schließt Hepatitis C die als 5-1-1 (in der NS3-Region des viralen Genoms) bekannte Antigen-Determinante ein. Diese bestimmte Antigen-Determinante taucht in drei unterschiedlichen Formen in den drei unterschiedlichen Virusstämmen von Hepatitis C auf. Dementsprechend tauchen in einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung alle drei Formen von 5-1-1 auf dem erfindungsgemäßen Mehr-Epitop-Fusionsantigen auf. Ein erfindungsgemäßes MEFA weist die obige Strukturformel I auf, wobei y 3 ist und damit jedes der drei "Bs" eine äquivalente Antigen-Determinante von 5-1-1 ist, die aus den drei unterschiedlichen viralen Stämmen von Hepatitis C genommen wurden.

**[0054]** Das Mehr-Kopien-Epitop der vorliegenden Erfindung kann auch mehrere Kopien enthalten, die gleiche Kopien des gleichen Epitops sind. Zum Beispiel ist es erstrebenswert, zwei Kopien eines Epitops aus der Core-Region von Hepatitis C einzuschließen. Eine besonders bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist das Mehr-Kopien-Epitop wie in [Fig. 3](#) gezeigt. Dieses Mehr-Kopien-Epitop schließt zwei gleiche Kopien eines Epitops aus der Core-Region und drei Kopien eines Epitops aus der 5-1-1 Region ein, wobei die Kopien äquivalente Antigen-Determinanten sind, was bedeutet, dass sie Antigen-Determinanten sind, die aus den drei verschiedenen Virusstämmen von Hepatitis C entnommen wurden. Im Allgemeinen weisen äquiva-

lente Antigen-Determinanten einen hohen Grad an Homologie in Bezug auf die Aminosäuresequenz auf.

### HCV-Immunassays

**[0055]** Hochselektive und sensitive Immunassays enthalten im Allgemeinen hauptsächliche immundominante Epitope des Pathogens, von dem vermutet wird, dass es einen Patienten infiziert. Vorher nutzten Immunassays individuelle Epitope, um anti-HCV-Antikörper in biologischen Proben zu binden.

**[0056]** Bei dem Virus HCV wurden die hauptsächlichen immundominanten linearen Epitope in den Core-, NS3- (nonstructural, nicht strukturell), NS4- und NS5-Regionen des Virus-Polyproteins identifiziert. Sallberg et al. testeten HCV-Core-Protein und wahrscheinliche Matrixproteine mit menschlichen Serumproben, die Antikörper gegen HCV enthielten, und definierten mehrere immundominante Regionen innerhalb der HCV-Proteine (Sallberg, M. et al. (1992) J. Clin. Microbiol. 30: 1989–1994). Proteindomänen von HCV-1-Polyproteinen, einschließlich der Domänen C, E1, E2/NS1, NS2, NS3, NS4 und NS5 wurden identifiziert und ihre ungefähren Grenzen von Chien und Rutter (Chien, D.Y. und Rutter, W., WO 93/00365, internationales Veröffentlichungs-Datum 7. Januar 1993) zur Verfügung gestellt. Kotwal et al. entwarfen individuelle Polypeptide mit von der strukturellen Region von HCV abgeleiteten Sequenzen, um ein beim Testen von Seren von HCV-Patienten nützliches immundominantes Epitop zu erhalten (Kotwal, G.J., et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. 89: 4486–4489).

**[0057]** Serologisch definierbare Subtypen von HCV wurden von Chien et al. als virale Subtypen, die eine unterschiedliche Antigenität zeigten, identifiziert (präsentiert beim Third International Hepatitis Meeting, Tokyo, Mai 1993 und in Chien, D.Y. et al. (1994) Viral Hepatitis and Liver Disease, S. 320–324). Es wurde gefunden, dass HCV-1 Core-, NS4- und NS5-Regionen Serotyp-spezifische Epitope enthalten. Individuelle wahrscheinliche Core-Proteine aus HCV-1 und HCV-2 wurden als individuelle Antigene verwendet, um Antikörper für Enzyme-linked immunosorbent assays herzustellen, um HCV-Infektionen unter Verwendung serologisch unterscheidbarer Core-Antigen-Subtypen nachzuweisen (Machida et al. (1992) Hepatology 16: 886–891). Simmonds et al. untersuchten durch Epitopkartierung und durch Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) den Effekt von Sequenzvariabilität zwischen unterschiedlichen HCV-Typen auf die Antigenität des NS4-Proteins. Diese Autoren kartierten zwei hauptsächliche antigene Regionen in dem HCV NS4-Polyprotein, die durch von natürlicher Infektion mit HCV hervorgerufenen Antikörpern erkannt wurden. Typ-spezifische Antikörper gegen bestimmte HCV-Typen wurden auch nachgewiesen (Simmonds P. et al. (1993) J. Clin. Microbiol. 31: 1493–1503). Ching et al. stellten Serien synthetischer Peptide basierend auf der Sequenz einer hochgradig konservierten Region des wahrscheinlichen HCV-Nukleokapsid ("Kern", Core)-Proteins her und fanden eine immundominante Region, die von menschlichen und Schimpansen-Seren erkannt wurden (Ching W.-M. et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. 89: 3190–3194).

**[0058]** Assays, bei denen einzelne Epitope als Testantigene eine Rolle spielen, haben den Nachteil, dass es schwierig ist, die Festphase-Beschichtung der Trägeroberfläche mit einer großen Anzahl individueller, kurze Peptide enthaltenden Epitope zu kontrollieren. In solchen Fällen wird, wenn in dem Assay die Ablagerung eines immunogenen Antigens auf einem festen Trägers eine Rolle spielt, die Sensitivität des Assays von der Menge von Antigen begrenzt, mit der die Oberfläche des festen Trägers beschichtet werden kann.

**[0059]** Ein Beispiel eines Immunassays, welcher immundominante Epitope aus unterschiedlichen Regionen eines einzigen Virus-Subtyps einschließt, ist in Chien et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10011–10015 (1992)) offenbart. Der von Chien beschriebene Assay nutzt rekombinante HCV-Polypeptide, die aus vielen unterschiedlichen Regionen des HCV Typ 1 Polyproteins abgeleitet sind, einschließlich des chimären rekombinanten Polyproteins C25, das immundominante Komponenten umfasst, die sowohl in den strukturellen als auch nicht-strukturellen Regionen vorkommen. Die hergestellten Polypeptide sind rekombinant hergestellte virale Polypeptide und sind auf der Oberfläche eines Immunassays eingeschlossen, um Antikörper einzufangen, d.h. die Anwesenheit von als Antwort auf Infektion mit HCV hergestellten Antikörpern nachzuweisen. Diese Polypeptide enthalten jedoch Epitope aus einem einzigen Virusstamm, wodurch die Fähigkeit begrenzt wird, anti-HCV-Antikörper von unterschiedlichen Stämmen des Virus nachzuweisen.

### BEISPIELE

**[0060]** Die folgenden Beispiele werden aufgeführt, um den Fachleuten vollständig zu offenbaren und zu beschreiben, wie man die Mehr-Kopien-Epitope und Reagenzien zur Verwendung in den erfindungsgemäßen Immunassays herstellt, und wie man diese verwendet, und es ist nicht beabsichtigt, dass sie den Rahmen dessen begrenzen sollen, was die Erfinder als ihre Erfindung betrachten. Es wurde Mühe aufgewendet, um Genaugigkeit

keit in Bezug auf die verwendeten Zahlen sicherzustellen (z.B. Mengen, Temperatur usw.), wobei aber ein gewisser experimenteller Fehler und eine Abweichung der Beschreibung inhärent sein mag. Sofern nicht anders angegeben ist, beziehen sich Anteile auf Mengenanteile, Molekulargewicht ist durchschnittliches Molekulargewicht, Temperatur ist in °C und Druck ist atmosphärisch oder diesem nahe.

#### Beispiel 1: Konstruktion und Expression einer HCV-Epitop-Polyprotein-Expressionskassette

**[0061]** Das folgende Beispiel verdeutlicht das Konzept, eine Polyproteinkassette von Haupt-Epitopen herzustellen, besonders eine Kassette mit mehreren Epitopen. Das Beispiel verdeutlicht ferner den Erfolg der Verwendung von Epitopen aus unterschiedlichen Stämmen eines Pathogens. Es wird auch gezeigt, dass ein hydrophiles Mehr-Epitop-Antigen die Löslichkeit des Polyproteins erhöht. Es wird gezeigt, dass die Epitope ihre native lokale Konformation zur Bindung von Antikörper bewahren, wie durch die Antigenität des Polyproteins bewiesen wird.

**[0062]** Das aus der Mehr-Epitop-Kassette exprimierte Polyprotein wird vorliegend als Mehr-Epitop-Fusionsantigen (MEFA) bezeichnet.

**[0063]** Wenn ein Epitop wiederholt wird, ist/sind die Extra-Kopie(n) vorzugsweise als Tandem in gleichen Orientierung arrangiert. Es wird verstanden, dass die Region einer viralen kodierenden Sequenz, die als Epitop verwendet wird, geringfügig variiert werden kann und antigene Aktivität noch bewahren kann, und dass die Bezeichnung der Aminosäure-Nummerierung sich von Stamm zu Stamm unterscheiden kann. Damit können sich die wiederholten Epitope aufgrund von Stamm-Sequenz-Variationen voneinander in der Aminosäuresequenz und/oder Bezeichnung der Nummerierung unterscheiden.

**[0064]** Einzigartige Restriktionsenzym-Schnittstellen wurden eingeführt, um die Epitope in der vorgeschriebenen Reihenfolge zu verbinden und die Nützlichkeit der Erfindung zu verbessern, indem Modifikationen beim Entwerfen eines chimären Antigens erleichtert werden. Die Wahl von Restriktionsenzym-Schnittstellen und Klonierungsverfahren wird leicht von einem Fachmann der Gentechnik nachzuvollziehen sein. Bevorzugt führen die Epitop-Verbindungen (Aminosäuresequenzen, die im Zuge der Klonierung zwischen Epitopen entstanden sind) nicht zur Herstellung nicht-spezifischer Epitope. Nicht-spezifische Epitope sind z.B. Nicht-HCV-Sequenzen, die in der Natur nicht benachbart zu den HCV-Epitopen vorliegen. Nicht-spezifische Epitope können in einer Testprobe Antikörper binden, was zu falsch positiven Ergebnissen führt. Bevorzugt wird das Mehr-Epitop-Fusionsprotein auf falsch positive Ergebnisse wegen solcher an den Epitop-Verbindungen entstandenen Sequenzen getestet. Um nicht-spezifische Interaktionen mit dem MEFA wegen Verbindungssequenzen zu vermeiden, kann die für die Verbindung kodierende DNA-Sequenz z.B. so mutiert werden, dass nichtspezifische Interaktionen mit der mutierten Aminosäuresequenz reduziert werden und Klonierung der Epitopfragmente möglich ist.

#### Konstruktion einer MEFA-Expressionskassette von HCV-Epitopen

**[0065]** Die HCV-MEFA-3-Expressionskassette wurde durch Klonierung der kodierenden Nukleotidsequenzen, welche die Hauptepitope in einem Tandem-Arrangement, wie in [Fig. 1](#) gezeigt, enthielten, konstruiert. Ein Hauptepitop wurde basierend auf der Antikörper-Reaktionshäufigkeit und Reaktionsintensität (Titer) gegenüber dem Epitop ausgewählt (Chien, D.Y. et al. (1994) Viral Hepatitis and Liver Disease, S. 320–324). Die verschiedenen DNA-Segmente, die für die HCV-Epitope kodierten, wurden mit PCR-Amplifizierung oder mit synthetischen Oligonukleotiden konstruiert. Die in jedem Segment kodierten Aminosäurekodons sind unter jedem Segment gezeigt. Die vollständige HCV-1-Aminosäuresequenz (3011 Aminosäuren) wurden von Choo et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 2451–2455 bestimmt. Oligonukleotide, die in der Lage sind, an HCV zu binden, werden in US-Patent Nr. 5,350,671 beschrieben. Die Nummerierung der Aminosäuren in erfindungsgemäßen Epitopen folgt der Nummerierungs-Bezeichnung, die von Choo et al., supra, zur Verfügung gestellt wird, wobei Aminosäure #1 das erste von der kodierenden Sequenz der Core-Region kodierte Methionin ist. Zum Beispiel wird ein Epitopsegment aus der Core-Region von Aminosäurekodons 10 bis 53 des HCV-Core-Proteins kodiert. Ein Epitop aus der c33c-Region wird von Aminosäurekodons 1192 bis 1457 kodiert.

**[0066]** Das MEFA-3-Konstrukt enthält in der Expressionskassette zwei Kopien der Core-Segment-Epitop-Aminosäuren 10–35; eine Kopie des c33c-Epitop-Segments von Aminosäuren 1192–1457; drei Kopien äquivalenter Antigen-Determinanten aus der HCV NS4-Region, spezifisch der 5-1-1-Region, wobei zwei der Epitope ein Segment (Aminosäuren 1694–1735) aus der NS4 5-1-1-Region von HCV Typ 1 sind, während eine Kopie ein Segment aus der NS4 5-1-1-Region von HCV Typ 2 (Nomoto) von Aminosäure 1694–1735 ist; zwei Kopien der Hauptepitope der NS4 (C100) C-terminalen Region von Aminosäure 1901–1940 und zwei Kopien

von Hauptepitopen von Aminosäure 2279–2310 aus der NS5-Region. Die MEFA-3-Expressionskassette weist die allgemeine Strukturformel 2-1-2-1-2-2 für Ax-By-Cz auf, wobei A = Core-Core-c33c, x = 1; B = (5-1-1), y = 3; und C = (c100)-(c100)-(NS5)-(NS5), z = 1.

**[0067]** Andere HCV-MEFAs schließen MEFA-5 und MEFA-6 ein, für die Expressionskassetten durch Klonierung der kodierenden Nukleotidsequenzen konstruiert wurden, die in einem Tandem-Arrangement Hauptepitope, wie jeweils in [Fig. 2](#) und Tabelle 1 und [Fig. 3](#) und Tabelle 2 gezeigt, enthielten. Es wird bemerkt, dass alle Epitope in MEFA-5 und MEFA-6 aus HCV Typ 1 sind, außer zwei der drei äquivalenten Antigen-Determinanten des 5-1-1-Epitops. Es wurde gefunden, dass Epitope aus der 5-1-1-Region sich zwischen Serotypen von HCV unterscheiden. Eine Kopie von jedem der in den vorliegend beschriebenen MEFAs vorliegenden HCV Typ-spezifischen 5-1-1-Epitope erlaubt eine Bindung von jedem der HCV-Typen, die in einer biologischen Testprobe vorliegen können. Es ist ein Merkmal der Erfindung dass ein bei der Unterscheidung von Serotypen eines Virus wie HCV nützliches Epitop als wiederholte äquivalente Antigen-Determinante zur Verfügung gestellt wird, um mehrere Typen eines Virus oder Pathogens in einem einzigen Test nachzuweisen. Verfahren des Nachweises von HCV-Serotypen sind in WO 96/27153 zu finden.

Tabelle 1

## MEFA-5-Antigen-Epitope und ihre Lokalisierung in dem HCV-Genom

MEFA AS#	Stelle am 5'-Ende	Epitop	HCV AS#	Stamm
1-154	<i>Nco</i> I	hSOD		
159-202	<i>Eco</i> RI	Core	10-53	1
205-246	<i>Sac</i> I	Core	10-53	1
251-268	<i>Pst</i> I	E1	303-320	1
271-309	<i>Hind</i> III	E2	405-444	1
310-576	<i>Dra</i> III	c33c	1192-1457	1
579-625	<i>Sph</i> I	5-1-1	1689-1735	1
628-674	<i>Nru</i> I	5-1-1	1689-1735	3
677-723	<i>Clal</i>	5-1-1	1689-1735	2
726-765	<i>Ava</i> I	c100	1901-1940	1
768-803	<i>Xba</i> I	NS5	2278-2313	1
806-841	<i>Bgl</i> III	NS5	2278-2313	1

Tabelle 2

## MEFA-6-Antigen-Epitope und ihre Lokalisierung in dem HCV-Genom

MEFA AS#	Stelle am 5'-Ende	Epitop	HCV AS#	Stamm
1-154	<i>Nco</i> I	hSOD		
156-176	<i>Eco</i> RI	E1	303-320	1
179-217	<i>Hind</i> III	E2	405-444	1
218-484	<i>Dra</i> III	c33c	1192-1457	1
487-533	<i>Sph</i> I	5-1-1	1689-1735	1
536-582	<i>Nru</i> I	5-1-1	1689-1735	3
585-631	<i>Cla</i> I	5-1-1	1689-1735	2
634-673	<i>Ava</i> I	c100	1901-1940	1
676-711	<i>Xba</i> I	NS5	2278-2313	1
714-749	<i>Bgl</i> II	NS5	2278-2313	1
750-793	<i>Nco</i> I	Core	10-53	1
796-839	<i>Sac</i> I	Core	10-53	1

**[0068]** Die Klonierungsverfahren zur Herstellung von MEFA-5 und MEFA-6 waren ähnlich zu den zur Herstellung von MEFA-3, oben, verwendeten. MEFA-5 und MEFA-6 enthielten Epitope von den Core-, Hüll-, NS3-, NS4- und NS5-Regionen des Hepatitis C Polyproteins einschließlich äquivalenter Antigen-Determinanten aus HCV-Stämmen 1, 2 und 3. Die verschiedenen für die HCV-Epitope kodierenden DNA-Segmente wurden mit PCR-Amplifizierung oder mit synthetischen Oligonukleotiden konstruiert. [Fig. 2](#) und [Fig. 3](#) sind diagrammatische Darstellungen, welche die Lokalisierung von Epitopen, die in MEFA-5 und -6 verwendet wurden, in dem HCV-Genom zeigen, genau wie die Konstruktion des MEFA-Vektors. Tabellen 1 und 2 beschreiben jeweils die Aminosäuresegmente von jedem Epitop, die lineare Anordnung der verschiedenen Epitope und die Anzahl von Kopien in den MEFA-5- und MEFA-6-Kassetten. Die Aminosäuren zwischen den jeweiligen Epitopen (Verbindungs-Aminosäuren) sind von den zur Klonierung verwendeten Restriktionsstellen abgeleitet. Bevorzugt wird ein MEFA in einem Immunassay auf falsch positive Ergebnisse wegen der nicht-Pathogenen (HCV zum Beispiel) Verbindungs-Aminosäuren getestet. MEFA-5 unterscheidet sich von MEFA-6 in der linearen Anordnung darin, dass die Core-Segmente in MEFA-5 nahe dem N-Terminus sind, in MEFA-6 jedoch am C-Terminus. Da das Core-Epitop mit Aminosäure 10–53 stark antigen ist, steigert seine Positionierung am C-Terminus die Antigenität des MEFA, möglicherweise durch verbesserte Interaktion von Epitopen aus Core-Proteinen und Antigenen aus E1- und E2-Regionen mit den anti-HCV-Antikörpern der Probe.

**[0069]** Die Epitope wurden in einen Hefe-Expressionsvektor subkloniert und die Sequenzen überprüft, bevor das gesamte Fusionsantigen als ein EcoRI-Sall-Fragment von 2060 bp (bei MEFA-5 und MEFA-6) und als ein EcoRI-Sall-Fragment von etwa 1927 bp (bei MEFA-3) zusammengesetzt wurde. MEFA-5 und MEFA-6 wurden als Fusionsproteine mit humaner Superoxiddismutase (hSOD) (157 Aminosäuren von hSOD) unter der Regulation des Hybrid ADH<sub>2</sub>-GAPDH-Promoters kloniert. Die MEFA-5- und MEFA-6-Expressionskassetten wurden mit dem Hefe-Shuttlevektor pAB24 (Chiron Corporation) ligiert, um pMEFA-5 und pMEFA-6 herzustellen, wie jeweils in [Fig. 2](#) und [Fig. 3](#) gezeigt.

**[0070]** Wie in [Fig. 3](#) gezeigt, schließt das MEFA-6-Antigen mehrere Kopien von HCV-Epitopen aus den Core- und NS5-Regionen ein, unterschiedliche Serotyp-Epitope aus der NS4 5-1-1-Region, eine einzelne Kopie von hauptsächlichen linearen Epitopen aus den c100 C-terminalen Regionen, E1- und E2-Regionen, genau wie der HCV-NS3 (c33c)-Region. Die allgemeine Strukturformel für MEFA-6 ist hSOD–E1–E2–c33c–5-1-1 (Typ 1)–5-1-1 (Typ 3)–5-1-1 (Typ 2)–c100–NS5 (2 Kopien)–Core (2 Kopien). Dieses Antigen weist in Hefe ein sehr hohes Expressionsniveau auf, lässt sich zu einem hohen Grad an Homogenität auf reinigen und zeigt in den unten beschriebenen Immunassays hohe Sensitivität und hohe Selektivität.

## Expression eines MEFAs in Hefe

**[0071]** Das folgende Beispiel der Expression eines MEFA in Hefe kann auf die Expression eines jeglichen erfundungsgemäßen MEFAs angewendet werden. Es liegt im Rahmen der vorliegenden Erfindung, soweit nötig, die Bedingungen zu variieren, um ein bestimmtes MEFA-Konstrukt zu exprimieren. Für die Expression eines erfundungsgemäßen MEFAs bevorzugte Zellen schließen Bakterien-, Hefe- und Insekten-Zellen ein. Die Expression von MEFA-6 in Hefe wird als nicht-begrenzendes Beispiel der vorliegenden Erfindung zur Verfügung gestellt.

**[0072]** Hefestämme AB122, JSC310 und AD2 (Chiron Corporation) wurden mit den geeigneten MEFA-Expressionsplasmiden (wie pMEFA-6) unter Verwendung eines Lithiumacetat-Protokolls transformiert. Ura<sup>-</sup>-Transformanten wurden im Hinblick auf einzelne Kolonien ausgestrichen und auf Leu<sup>-</sup>/8 % Glukoseplatten übertragen, um die Zahl der Plasmidkopien zu steigern. Leu<sup>-</sup>-Starterkulturen wurden 24 Stunden bei 30 °C kultiviert und dann 1 : 20 in YEPD (yeast extract bactopeptone glucose) – Medium verdünnt. Die Zellen wurden 48 Stunden bei 30 °C kultiviert und geerntet. Um die Expression des MEFA-6 rekombinannten Antigens zu untersuchen, wurde ein Aliquot der Zellen (0,5 OD Einheitsäquivalent) in SDS (Natriumdodecylsulfat) Gelelektrophorese-Probenpuffer (z.B. Laemmli-Puffer), welcher 50 mM DTT enthielt, aufgekocht, und die Proteinanteile der Zellmischung wurden durch Gelelektrophorese auf einem Tris-Glycin-Polyacrylamidgel aufgetrennt. MEFA-6 war in der unlöslichen Pelletfraktion stark angereichert.

## Aufreinigung eines MEFA-Proteins in Hefe

**[0073]** Das folgende Verfahren beschreibt die Aufreinigung eines spezifischen MEFAs, MEFA-6. Es ist nicht beabsichtigt, dass die Techniken und Bedingungen die Erfindung begrenzen, da ein Fachmann es für notwendig befinden mag, die Bedingungen zur Aufreinigung eines anderen erfundungsgemäßen MEFAs anzupassen. Wenn nicht anderweitig angegeben, wird Aufreinigung eines MEFAs bei etwa 0 °C durchgeführt.

**[0074]** MEFA-6 wurde in *S. cerevisiae* exprimiert und Zellen wurden wie oben beschrieben geerntet. Die Zellen wurden in Lysispuffer (50 mM Tris, 0,15 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, pH 8,0) suspendiert und in einer Dyno-Mühle (Wab Willy A. Bachofon, Basel, Schweiz) oder einer äquivalenten Vorrichtung unter Verwendung von Glaskügelchen lysiert. Das Lysat wurde unter Bedingungen geringer Geschwindigkeit (3.000 bis 5.000 UpM, 15 min) zentrifugiert und das die unlösliche Proteinfraktion enthaltende Pellet wurde mit zunehmenden Konzentrationen an Harnstoff (1 M, 2 M, 3 M) in Lysispuffer gewaschen. Protein wurde aus dem Zentrifugationspellet mit 0,1 N NaOH, 4 M Harnstoff in Lysispuffer gelöst. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei niedriger Geschwindigkeit bei 3.000 bis 5.000 UpM, 15 min, entfernt. Der Überstand wurde mit 6 N HCl auf pH 8,0 gebracht, um unter diesen Bedingungen unlösliche Proteine auszufällen.

**[0075]** Der Niederschlag wurde durch Zentrifugation entfernt und der Überstand wurde auf 2,3 % SDS, 50 mM DTT, pH 8,0 angepasst und 3 min gekocht. Proteine in der Mischung wurden mit Gelfiltration auf Pharmacia Sephadryl S-400 in Phosphatgepufferter Salzlösung, welche 0,1 % SDS, 1 mM EDTA enthielt und auf pH 7,4 angepasst war, fraktioniert. Die MEFA-6 enthaltenden Fraktionen des Eluats der Säule wurden gesammelt, vereinigt und auf einer Amicon YM-30-Membran konzentriert. Die Gelfiltration wurde unter Verwendung der gleichen Säule und Bedingungen mit den vereinigten Fraktionen wiederholt.

## Beurteilung der Antigenität eines MEFA

**[0076]** Um die Antigenität eines chimären erfundungsgemäßen Antigens einzuschätzen, wurden die MEFA-3-Epitope polyklonalen oder monokonalen, mit spezifischen individuellen Epitopen hergestellten Antikörpern ausgesetzt. Auf gereinigte rekombinante Mehr-Epitop-Fusionsantigene (MEFA) wurden in Phosphatgepufferter Salzlösung (pH 7,4) auf optimale Konzentrationen zur Beschichtung verdünnt und Immulon I-Platten (Dynatech) beschichtet. Monoklonale Antikörper gegen Core, NS3 (c33c), NS4 (c100 und 5-1-1), NS5 und polyklonale Antiseren von anti-E1 und E2 aus Kaninchen wurden mit Standardverfahren hergestellt (BIOS-Chile, Maraton 1943, Santiago, Chile), und wurden 200-fach in Proben-Verdünnungspuffer in der Platte verdünnt und 1 Stunde bei 37 °C inkubiert, und mit Plattenwaschpuffer (PBS, 0,075 % Tween-20, pH 7,2) gewaschen. Entweder Ziege-anti-Maus F(ab')<sub>2</sub> oder affinitätsgereinigter Ziege-anti-Kaninchen IgG Antikörper, spezifisch für schwere und leichte Kette, konjugiert mit Meerrettichperoxidase (1 : 5.000 verdünnt bei dem anti-Maus-Konjugat, 1 : 10.000 verdünnt bei dem anti-Kaninchen-Konjugat) wurden zu jeder Vertiefung des Assays hinzugefügt. Die Platten wurden 1 Stunde bei 37 °C inkubiert und gewaschen. O-Phenylendiamindihydrochlorid (OPD) und Hydrogenperoxid wurden zur Entwicklung der Farbreaktion der Meerrettichperoxidase (HRPO) hinzugefügt. Die Messungen der optischen Dichte wurden unter Verwendung eines Plattenlesegeräts bei 492/620 nm

bestimmt.

**[0077]** Die Ergebnisse wiesen darauf hin, dass bei allen erfindungsgemäßen MEFAs alle Antigen-Epitope in dem entworfenen MEFA leicht von den spezifischen HCV-Antikörpern nachgewiesen wurden. Zum Beispiel stellt Tabelle 3 Daten zur Immunreaktivität der individuellen Epitope, sowie des chimären Antigens MEFA-3 gegenüber monoklonalen Antikörpern gegen HCV-spezifische Epitope zur Verfügung. Wie in Tabelle 3 gezeigt, waren Core-, c33c-, c100-, 5-1-1- und NS5-Epitope von MEFA-3 immunreakтив gegenüber HCV-spezifischen Antikörpern. Tabelle 4 zeigt, dass die Epitope c33c, c22, 5-1-1, c100, NS5, E1 und E2 von MEFA-5 und MEFA-6 immunreaktiv gegenüber HCV-spezifischen Antikörpern waren.

Tabelle 3

## HCV-spezifische Epitope von MEFA-3-Antigen:

## Beurteilung mit anti-HCV-monoklonalen Antikörpern

HCV mAK ID#	3G1-1	4D1-1	22AFG3	20AGF3	5A1/F5	Kommentar Ergebnisse
Spezifität der mAk	anti-Core	anti-c33c	anti-5-1-1	anti-c100	anti-ns-5	
Rekombinante Testantigene	OD	OD	OD	OD	OD	
SOD (nicht rekombinant)	0,001	0,001	0,002	0,002	0,003	Keine Reaktion mit SOD
C25	2,755(+)	2,813(+)	2,726(+)	0,028(-)	0,023(-)	Reaktion mit Epitopen aus Core, c33c & 5-1-1
c22 (Core)	2,700(+)	0,043(-)	0,035(-)	0,036(-)	0,038(-)	Reaktion mit Epitop aus Core
c33c (NS4)	0,029(-)	2,646(+)	0,018(-)	0,020(-)	0,014(-)	Reaktion mit Epitop aus c33c
c100 (NS4)	0,020(-)	0,022(-)	2,907(+)	3,021(+)	0,016(-)	Reaktion mit Epitopen aus 5-1-1 und dem C-terminalem Epitop von c100
NS5	0,012(-)	0,029(-)	0,009(-)	0,009(-)	2,513(+)	Reaktion mit Epitop aus NS5
Testantigen MEFA-3	3,236(+)	3,236(+)	3,467(+)	0,713(+)	0,024(-)	Reaktion mit Epitopen aus Core, c33c, 5-1-1 und c100

Tabelle 4

## Exposition von HCV-Epitopen in MEFA-5 und MEFA-6

Antikörpe ID	Antikörperspezifität	Antigen gegenüber HCV-Sequenzregion	MEFA-6-Epitop Exposition OD	MEFA-5-Epitop Exposition OD
MAK 3G1-1	anti-Core	(AS# 10-50)	3,018 (R)	2,702 (R)
MAK 4D1-1	anti-NS3 (c33c)	lineares Epitop aus c33c	3,119 (R)	2,952 (R)
MAK 6C10/D1	anti-NS4 (c100)	(AS# 1901-1940)	3,853 (R)	2,998 (R)
MAK 22A5/C12	anti-NS4 (5-1-1)	(AS#1689-1735)	3,006 (R)	3,192 (R)
MAK 3E1/F1	anti-NS5	(AS# 2297-2313)	2,808 (R)	2,863 (R)
MAK 1E5/F10	anti-NS5	(AS# 2297-2313)	2,892 (R)	2,784 (R)
Polyklonal R667	anti-E1	(AS# 192-380)	4,375 (R)	1,908 (R)
Polyklonal R669	anti-E2	(AS# 404-662)	1,76 (R)	0,963 (R)
Schwellenwert			0,45 OD	0,45 OD

R = Reaktion

NR = keine Reaktion

## Inhibitionsassays:

**[0078]** Peptidinhibitionsassays wurden durchgeführt, um zu testen, ob Serotyp-spezifische Epitope in einem MEFA-Antigen HCV-Typ-spezifische Antikörper in Serum nachweisen. Der Assay schätzte den Grad ein, zu dem ein MEFA in Lösung an Serum-HCV-Typ-spezifische Antikörpern binden würde und damit die folgende ELISA-Reaktion inhibieren würde, in der die Serotyp-spezifischen Peptide die antigenen Spezies auf einem festen Träger sind. [Fig. 4](#) ist eine schematische Zeichnung eines Standard-ELISA-Verfahrens, in dem Bindung an Antigen, das an den festen Träger gebunden ist, durch von einem Enzym katalysierte Hydrolyse nachgewiesen wird.

**[0079]** Inhibitionsassays wurden mit Mehr-Antigen-ELISA durchgeführt. Rekombinante HCV-Antigene wurden, wie in Chien et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. 89: 10011–10015 beschrieben, hergestellt. Die Antigene c22 (119 Aminosäuren), E1 (130 AS), NS5 (942 AS) und chimäres C25 (858 AS) wurden als interne Antigene in der Hefe *S. cerevisiae* als C-terminale Fusionsproteine mit menschlicher Superoxiddismutase (SOD) unter Verwendung von bereits zur Herstellung des c100-3-(363 AS) Antigens (Kuo, G. et al. (1989) Science 244: 362–364; und Cousens, L.S. et al. (1987) Gene 61: 265–275) beschriebenen Verfahren exprimiert. Das c33c-Antigen (363 Aminosäuren) wurde als internes SOD-Fusionspolypeptid in *E. coli* mit zur Synthese des 5-1-1-Antigens (Choo, O.-L. et al (1989) Science 244: 359–362 beschriebenen Verfahren exprimiert. Die rekombinanten HCV-Antigene wurden, wie in Chien, D.Y. et al. ((1989) Proc. Natl. Acad. Sci 89: 10011–10015, supra)) beschrieben, auf gereinigt.

**[0080]** Vor der Durchführung der Inhibitionsassays wurden die Verdünnungs-Schwellenwerte der Patientenproben bestimmt (Tabelle 5). Die Patientenproben wurden seriell verdünnt und auf Reaktion gegenüber rekombinanten c22-, c33c-, c100- und NS5-Antigenen getestet, die getrennt auf einem festen Träger immobilisiert waren (siehe z.B. Van der Poel, C.L. et al. (1991) Lancet 337: 317–319). Der Verdünnungs-Schwellenwert war die größte Verdünnung, bei der eine Bindung immer noch nachweisbar war. Zur optimalen Detektion in folgenden Inhibitionsassays waren die Patientenproben weniger verdünnt als die Verdünnung beim Verdünnungs-Schwellenwert, wie in Tabelle 6 angegeben.

Tabelle 5

Bestimmung der Detektionsschwelle für Patientenproben mit MEFA-3-Antigen-Epitopen

HCV-Patientenprobe ID	Verdünnungsschwellenwerte der Proben			
	Rekombinante Antigene			
	c22	c33c	c100	NS5
PAA LL57366	1:8	1:128	unverdünnt	unverdünnt
PAA LL57454	1:32	1:128	1:8	unverdünnt
PAA FF25946	1:32	1:256	1:32	NR
PAA FF25912	ND	ND	ND	unverdünnt

NR = keine Reaktion (no reaction)

ND = nicht durchgeführt (not done)

**[0081]** Im Allgemeinen wurden die Inhibitionssassays nach dem folgenden Verfahren durchgeführt. Rekombinante HCV-Antigene und denaturierte SOD (Kontrolle) wurden in Phosphatgepufferter Salzlösung (pH 7,4) auf die optimale Konzentration verdünnt und Immulon I-Platten (Dynatech) beschichtet. Ein 200 µl Aliquot entweder von 30 % fetalem Kälberserum (FCS) oder MEFA-3-Peptid (5 oder 10 µg pro Assay, wie angegeben), gelöst in 30 % FCS, wurde in der Platte mit 5 µl verdünnter Serum- oder Plasmaprobe gemischt. Die Proben wurden 1 Stunde bei 37 °C inkubiert und mit Plattenwaschpuffer gewaschen. Polyclonale, mit entweder <sup>125</sup>I oder Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase, HRP) konjugierte Ziege-anti-Human-IgG- (spezifisch für schwere und leichte Kette) Antikörper wurden zu jeder Vertiefung hinzugefügt. Die Platten wurden 1 Stunde bei 37 °C inkubiert und dann gewaschen. O-Phenyldiamindihydrochlorid und Hydrogenperoxid wurden zur Entwicklung der Farbe der HRP hinzugefügt. Die Ergebnisse wurden unter Verwendung eines Plattenlesers bei 492 nm/620 nm (ELISA) gelesen. Die ELISA-Schwellenwerte der OD bei Antigenen aus den Regionen SOD, C25, c22, E1, E2, c33c und NS5 waren 0,40 plus die durchschnittliche OD von drei negativen Kontrollseren, die in jedem Test eingeschlossen waren. Wenn das Kontroll-SOD-Antigen reaktiv war, wurde diese Probe als nicht-reaktiv oder nicht-bestimmbar betrachtet. Der Prozentsatz der Inhibition der Bindung wurde mit der folgenden Formel errechnet:  $100 \times (A492 \text{ nm der Patientenprobe ohne hinzugefügtes MEFA-Antigen}) - (A492 \text{ nm der Patientenprobe mit hinzugefügtem MEFA-Antigen}) / (A492 \text{ nm der Patientenprobe ohne hinzugefügtes MEFA-Antigen})$ . Der Prozentsatz der Inhibition der Bindung an Typ-spezifische Peptide, der durch hinzugefügtes MEFA-3 bewirkt wurde, weist auf die Fähigkeit der Epitope in MEFA-3 hin, die anti-HCV-Antikörper in den Patientenproben zu binden (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6

## Inhibition der Bindung durch spezifische Epitope von MEFA-3

Patientenprobe		Koontrolle OD	MEFA-3 hinzugefügt OD	% Inhibition
ID	Verdünnung			
c22 Antigen				
LL57366	1:4	1,614	0,163	90 %
LL57454	1:16	1,370	0,212	84,5 %
FF25946	1:16	2,013	0,205	90 %
c33c Antigen				
LL57366	1:64	2,525	0,07	99 %
LL57454	1:64	1,839	0,075	96 %
FF25946	1:128	0,842	0,061	93 %
C100 Antigen				
LL57454	1:4	1,666	0,484	71 %
FF25946	1:16	2,364	0,092	96 %
NS-5 Antigen				
LL57454	unverdünnt	2,319	1,820	20 %
FF25912	unverdünnt	1,490	0,873	41 %

**[0082]** Die Fähigkeit von MEFA-3, mit anti-HCV-Typ 1- und anti-HCV Typ 2-Antikörpern zu interagieren, wurde durch Inhibitionsstudien unter Verwendung eines MEFA ELISA-Protokolls gezeigt. Individuelle synthetische Peptide aus HCV Typ 1a, 1b, 2a und 2b 5-1-1-Regionen wurden auf getrennten festen Trägern immobilisiert. Die Fähigkeit der synthetischen Peptide aus der 5-1-1-Region, die Typ-spezifischen Patienten-Antikörper zu binden, wurde durch Kompetition mit hinzugefügtem MEFA-3 bestimmt. Die Ergebnisse in Tabelle 7 zeigen, dass MEFA-3 die Bindung von HCV 1a, 1b, 2a und 2b an die individuellen Typ-spezifischen Epitope (Aminosäuren 1689–1718 aus der 5-1-1-Region) inhibiert. Die Fähigkeit eines MEFA, Antikörper gegen zwei verschiedene Stämme von HCV zu binden, war für MEFA-3, MEFA-5 und MEFA-6 gleich.

Tabelle 7

HCV Typ-Spezifität: MEFA-3 5-1-1 Epitope interagieren mit Antikörpern gegen HCV Typen 1 und 2

Kontrolle				<u>Inhibition, %</u>				
HCV Typ-spezifische Peptide				HCV Typ-spezifisches Peptid + MEFA-3				
Probe	HCV 1a (1689- 1718)	HCV 1b (1689- 1718)	HCV 2a (1689- 1718)	HCV 2b (1689- 1718)	HCV1a ELISA OD	HCV1b ELISA OD	HCV2a ELISA OD	HCV2b ELISA OD
	Epitop- spezifische ELISA OD	Epitop- spezifische ELISA OD	Epitop- spezifische ELISA OD	Epitop- spezifische ELISA OD				
(A) HCV Typ 1 Probe								
#4(1:10d)	1,093	0,073	0,002	0,004	0,165	0,136	0,044	0,014
% Inhibition					85%	0%	0%	0%
(B) HCV Typ 1b Probe								
#358	0,964	1,543	0,424	0,235	0,438	0,261	0,284	0,234
% Inhibition					55%	83%	33%	0%
(C) HCV Typ 2 Probe								
#32(1:10d)	0,001	0,001	0,839	0,460	0,007	0,018	0,034	0,055
% Inhibition					0%	0%	96%	88%

Beispiel 2: Sensitivität eines ELISA unter Verwendung von MEFA als Antigen

**[0083]** Ein Vergleich der Sensitivität bei Verdünnung wurde zwischen MEFA ELISA (MEFA-3) und C25 ELISA durchgeführt. HCV-Polyprotein C-25(c33c-c100-3-c22) und Assayverfahren waren wie von Chien, D.Y. et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10011–10015, supra) beschrieben, unter Verwendung des Beschichtungspuffers von 1× Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS), pH 7,0 bis 7,2. Die Oberfläche von Mikroliter-Vertiefungen von Immulon I-Platten wurden mit Antigenen in einer Dichte von 100 ng Antigen pro Vertiefung plus 5 µg/ml BSA beschichtet. Die Probengröße war 5 µl/Assay. Der Ziege-anti-Human-IgG (spezifisch für schwere und leichte Ketten) – Antikörper, konjugiert mit Meerrettichperoxidase, wurde bei dem MEFA-3-Assay 1 : 60.000 verdünnt und bei dem C25-Assay 1 : 40.000. Die Ergebnisse in Tabelle 8 zeigen, dass Serumantikörper unter Verwendung von einem MEFA-3-ELISA bei Verdünnungen nachweisbar sind, bei denen der C25-ELISA keine Reaktion zeigt. Die Sensitivität von MEFA-3, -5 und -6 CLIA wurde miteinander und mit einem C25-ELISA verglichen. Die Ergebnisse in Tabelle 9 zeigen, dass MEFA-5 und MEFA-6 CLIA gegenüber MEFA-3 CLIA eine überlegene Sensitivität zur Verfügung stellten, während MEFA-3 CLIA sensitiver war als C25-ELISA.

Tabelle 8

## Verdünnungs-Sensitivität:

Vergleichsuntersuchung zwischen MEFA ELISA und C-25 ELISA

		MEFA-3 ELISA	C-25 ELISA
Probenserie ID	Immulon I Platte	Immulon I Platte	
	100 ng/Well + 5 µg/ml BSA	100 ng/Well + 5 µg/ml BSA	
	Konjugat: 1:60000	Konjugat: 1:40000	
	Probengröße 5 µl/Assay	Probengröße 5 µl/Assay	
		OD	OD
Probe	Verdünnung		
LL57454	1:512	0,983	0,734
	1:1024	0,652	NR
	1:2048	0,463	NR
LL57366	1:512	0,609	0,425(+/-)
	1:1024	0,522(+/-)	NR
	1:2048	0,203	NR
FF25946	1:100	1,818	1,736
	1:1000	0,763	0,525
	1: 2000	0,718	NR
	1:4000	0,455	NR
Serokonversion Serie C Datum der Blutentnahme			
C7 (8/29/88) Tag 1		0,562	NR
C8 (9/01/88) Tag 4		1,035	0,667
C9 (9/28/88) Tag 32		2,762	2,145
Durchschnitt der OD von negativer Probe		0,124	0,086
Schwellen OD		0,55	0,45

(+-) = OD nahe Schwellenwert

NR = Nicht-reaktiv (non-reactive)

C-25 ELISA ist äquivalent zu dem 2G (Zweite Generation) HCV ELISA

Tabelle 9

Verdünnungs-Sensitivität von MEFA-3 ggü.-5 ggü.-6 ggü. C25

SENSITIVITÄTSSERIE		MEFA-3 CLIA S/C.O.	MEFA-5 CLIA S/C.O.	MEFA-6 CLIA S/C.O.	C25 ELISA S/C.O.
FF25946	1:16	1,71	2,72	2,67	1,32
	1:32	1,64	2,59	2,48	1,35
	1:64	1,50	1,89	2,11	1,20
	1:128	1,34	1,92	1,68	0,92
	1:256	1,11	1,48	1,68	0,91
	1:512	0,84	1,14	1,28	0,69
	1:1024	0,58	0,82	1,11	0,63
LL57385	1:16	1,73	2,74	2,68	1,49
	1:32	1,56	2,41	2,18	1,04
	1:64	1,20	1,76	1,79	1,00
	1:128	0,87	1,10	1,03	0,61
	1:256	0,76	0,93	0,90	0,57
	1:512	0,51	0,68	0,64	0,48
	1:1024	0,38	0,47	0,45	0,39
	1:2048	0,23	0,33	0,29	0,20
FF25879	1:16	1,70	2,79	2,54	1,46
	1:32	1,66	2,73	2,38	1,03
	1:64	1,30	1,82	1,88	0,86
	1:128	1,21	1,35	1,17	0,73
	1:256	0,96	1,20	1,14	0,66
	1:512	0,60	0,88	0,73	0,52
	1:1024	0,48	0,76	0,36	0,50
	1:2048	0,42	0,65	0,44	0,40
LL57366	1:16	1,67	2,71	2,59	1,59
	1:32	1,32	2,30	1,92	1,15
	1:64	1,11	1,65	1,57	0,96
	1:128	1,19	1,35	1,09	0,77
	1:256	0,84	1,02	1,11	0,63
	1:512	0,55	0,83	0,88	0,50
	1:1024	0,55	0,60	0,54	0,47
	1:2048	0,38	0,49	0,58	0,37
LL57454	1:16	1,87	3,10	2,59	1,80
	1:32	1,57	2,82	2,16	1,33
	1:64	1,30	2,17	1,38	1,14
	1:128	1,11	1,66	1,38	0,79
	1:512	0,63	1,07	1,04	0,60
	1:256	0,51	0,76	0,74	0,43
	1:1024	0,41	0,52	0,54	0,34
	1:2048	0,22	0,45	0,56	0,30

S/CO = Sensitivität (OD)/Schwellenwert (Cutoff) (OD)

**[0084]** Ein Sensitivitätsassay für die Serokonversion misst die Sensitivität des Verfahrens, Pathogen-spezifische Antikörper nachzuweisen, sobald die Titer als Antwort auf eine Infektion ansteigen. Die Sensitivität des MEFA-3 ELISA im Vergleich zum C25 ELISA für Blutproben von einem einzigen HCV-infizierten Patienten über die Zeit wird in Tabelle 8 zur Verfügung gestellt. MEFA-3 detektierte Antikörper mit größerer Sensitivität zu einem früheren Zeitpunkt nach der Infektion als der C25 ELISA.

Sensitivität und Bequemlichkeit eines Chemolumineszenz-Immunassays unter Verwendung von MEFA im Vergleich zu einem bestehenden kommerziellen Assay

#### MEFA als Tracer

**[0085]** Das rekombinante Antigen MEFA-6 wurde verwendet, um einen manuellen Chemolumineszenz-Immunassay (CLIA) sowie einen automatisierten CLIA mit dem Ciba Corning ACS-NG System (F-Modell) zu entwerfen.

**[0086]** Es wurde ein CLIA entwickelt, der als HCV r-Ag-DMAE CLIA (HCV rekombinantes Antigen – Dimethylacridiniumester – Chemolumineszenz-Immunassay) bezeichnet wurde ([Fig. 5](#)). Ein Polypeptid oder synthetisches Peptidantigen wurde durch Reaktion von Aminosäureseitenketten (z.B. Lysinseitenketten oder Cystein-thiol) mit einer reaktiven, kovalent mit DMAE verbundenen reaktiven Einheit (siehe WO 95/27702, veröffentlicht am 19. Oktober 1995, Ciba Corning Diagnostics Corp.) mit DMAE markiert. Die vorliegend beschriebenen HCV-MEFAs wurden durch Reaktion mit den Aminogruppen von Lysin-Seitenketten mit NSP-DMAE-NHS (2',6'-Dimethyl-4'-(N-Succinimidylloxycarbonyl)-phenyl 10-(3'-Sulfopropyl)-acridinium-9-carboxylat), erhalten von Ciba Corning, markiert. Thiole von Aminosäureseitenketten können unter Verwendung von DMAE-ED-MCC oder NSP-DMAE-PEG-BrAC (Ciba Corning) markiert werden. Markierungsverfahren waren im Allgemeinen wie in WO 95/27702 (supra) beschrieben, mit Variationen in den Bedingungen, soweit für jedes Antigen notwendig, um für eine optimale Detektion und Antigenität zu sorgen. Es wird verstanden, dass andere detektierbare Marker in der Erfindung nützlich sind, wie fluoreszierende Verbindungen, Rhodamin-Verbindungen, Antikörper, Antigene, Enzyme und Ähnliches. Markierung mit jeglichem Marker wird unter Bedingungen ausgeführt, um eine optimale Detektion und Antigenität des MEFA oder eines anderen Epitops zu erhalten.

**[0087]** Wenn DMAE in einem Assay der detektierbare Marker ist, ist das entstehende HCV r-Ag-DMAE-Konjugat der Tracer, wobei DMAE durch Lichtemission detektierbar ist, wenn es mit NaOH/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zur Reaktion gebracht wird. Wenn ein bestimmtes MEFA, wie MEFA-6, in dem Assay verwendet wurde, wurde es als MEFA-6-DMAE CLIA bezeichnet.

#### Manueller Assay.

**[0088]** Ein manuelles HCV r-Ag-DMAE CLIA Protokoll, welches für die vorliegend offenbarten Untersuchungen verwendet wurde, wird zuerst beschrieben. Ein Magic Lite Analyzer System II (MLA II) wurde für den manuellen Assay verwendet. Parameter wie Volumen, Konzentration, Zeit und Temperatur werden als Richtlinie zur Verfügung gestellt. Variation dieser Parameter, um einen Nachweis von Antikörpern zu erhalten, ist im Rahmen der Erfindung. Ein 2 bis 10 µl Aliquot der Testprobe wurde zu den entsprechenden Röhrchen hinzugefügt. Die Testprobe war bevorzugt eine biologische Flüssigkeit (zum Beispiel Plasma oder Serum), die anti-HCV-Antikörper enthielt. Zu jedem Röhrchen wurden 50 µl Wasser, gefolgt von 100 µl biotinylierten rekombinanten Antigenen, synthetischen Peptiden oder direkt konjugiertem DMAE zu den Polypeptiden (zum Beispiel MEFA-6-DMAE, C33c-DMAE, c200-DMAE und c22-DMAE) hinzugefügt. Die Antigene wurden in Ligandenreagenz (LR)-Verdünnungsmittel auf Konzentration von etwa 0,1 µg/Assay bis 1 µg/Assay verdünnt. Bevorzugt wurde eine solche Menge an Ligandenreagenz zu jeder Probe hinzugefügt, dass etwa  $25 \times 10^6$  Lichteinheiten-äquivalente (relative Lichteinheiten, relative light units, RLU) pro Assay vorlagen. Diese ungefähre Menge von Lichteinheitenäquivalenten wurde bei dem Hinzufügen eines einzelnen Liganden oder bei mehreren Liganden bevorzugt. LR-Verdünnungsmittel enthielt Tris-Puffer, pH 8,0, 150 mM NaCl, 1,0 % BSA, 0,1 % Tween-20, 0,09 % NaN<sub>3</sub>, 1 mM EDTA. Ein 100 bis 150 µl-Aliquot PMP (paramagnetische Partikel), verbunden mit anti-humanem IgG Fc, wurde bis zu einer Endkonzentration von etwa 60 µg/Assay zu jedem Röhrchen hinzugefügt. Bevorzugt hatten die paramagnetischen Teilchen einen Durchmesser von weniger als etwa 10 µm. Die anti-IgGFc-PMP-Teilchen wurden in einem Verdünnungsmittel verdünnt, welches Tris-Puffer, pH 8,0, 150 mM NaCl, 2,75 % BSA, 0,1 Casein, 0,1 % Tween-20, 0,1 % Hefeextrakt, 0,25 % E. coli-Extrakt, 0,005 % SOD, 0,09 % NaN<sub>3</sub>, 1 mM EDTA enthielt. Um für vollständige Mischung zu sorgen, wurden die Röhrchen auf einem Vortex-Mischer sechsmal, jedes Mal 5 bis 10 Sekunden lang, geschüttelt. Die Probenröhrchen wurden 18 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Probenröhrchen wurden 3 Minuten auf einem Magneten platziert, eine ausreichende Zeit, um die PMP-Teilchen zu sedimentieren. Die Proben wurden unter Verwendung eines Magneten dekantert, um die PMP-Teilchen zurückzuhalten. Die PMP-Teilchen wurden zweimal unter Vortexen in 1 ml PBS gewaschen. Die Waschlösung war PBS, 0,1 % Tween-20, 0,09 NaN<sub>3</sub>, 1 mM EDTA. Die Schritte des Mischens, Inkubierens, Sedimentierens und Dekantierens können mindestens einmal wiederholt werden. Jedem Röhrchen wurden 100 µl Wasser hinzugefügt, um die PMP-Teilchen zu resuspendieren. Die Röhrchen wurden dann in einem MLA-II-Instrument platziert und die Lichtemission wurde 3 Sekunden lang gemessen.

**[0089]** Das manuelle MEFA-6-DMAE CLIA-Verfahren stellte im Vergleich zu dem MEFA-6 ELISA eine verbesserte Detektions-Sensitivität zur Verfügung. Nach der Untersuchung von acht Serien von Verdünnungs-Sensitivität wurde gefunden, dass der MEFA-6-DMAE CLIA bei 6 von 8 Serien eine bessere Verdünnungs-Sensitivität als der ELISA zeigte.

**[0090]** Wichtigerweise wies das MEFA-6-DMAE CLIA-Verfahren die Anwesenheit von HCV-Antikörpern in allen Proben von getesteten chronisch infizierten HCV-Patienten nach. Zum Beispiel wurden von 29 chronisch mit Hepatitis C infizierten Individuen 26 unter Verwendung eines C25 ELISAs als positiv getestet, während alle 29 unter Verwendung des erfindungsgemäßen MEFA-6-DMAE CLIA als positiv getestet wurden. Zusätzlich wurden bei dem Test von 200 zufälligen Proben mit einem MEFA-6-DMAE CLIA keine falsch positiven Ergebnisse gefunden. Andere Vorteile des CLIA-Verfahrens sind Präzision zwischen Assays und im Assay mit Abweichungen von weniger als 10 %. Zusätzlich wies der CLIA im Vergleich zum ELISA einen breiteren Antworts-Bereich und eine verbesserte Linearität auf.

#### Automatisierter Assay.

**[0091]** Ein automatisierter MEFA-DMAE-Assay mit dem folgenden Protokoll wurde ebenfalls verwendet. Ein F-Modell-automatisierter Analyseautomat wurde für den Assay verwendet. Eine 10 µl Probe (wie eine biologische Flüssigkeit, die humane anti-HCV-Antikörper enthielt) wurde zu jedem Probenröhrchen hinzugefügt. Der automatische Proben-Entnehmer gab dann gleichzeitig in jedes Probenröhrchen das Folgende: 100 µl des HCV r-Ag-DMAE-Konjugats (mit insgesamt etwa  $25 \times 10^6$ -Lichteinheitsäquivalenten pro Test) plus 150 µl anti-humane IgG Fc, verbunden mit paramagnetischen Partikeln, (60 µg IgG Fc pro Assay) plus einen Hintergrund von 40 µl Wasser. Das Ligandenverdünnungsmittel und das IgG-PMP-Verdünnungsmittel waren wie oben für den manuellen Assay beschrieben. Kein Mischen mit einem Vortex war nötig. Die Proben wurden 18 Minuten in einem Heizblock auf 37 °C erhitzt. Die anti-humanen IgG FC PMP-Teilchen, die an die in der Serumprobe vorliegenden HCV-Antikörper banden, wurden dreimal durch Resuspension in einem PBS-Waschpuffer, welcher 0,1 Tween-20, 0,09 % NaN<sub>3</sub>, 1 mM EDTA enthielt, gewaschen. Ein Magnet wurde verwendet, um die PMP-Partikel zurückzuhalten, während die Probenüberstände abgesaugt wurden. Die Teilchen wurden in 500 µl Waschpuffer resuspendiert. Unter Verwendung des automatisierten Verfahrens war es nicht notwendig, die Mischungs-, Inkubations-, Sedimentierungs- und Dekantierungs-Schritte zu wiederholen, wodurch der HCV r-Ag-DMAE CLIA-Assay im Vergleich zu bestehenden kommerziellen Assays sowohl effizient (20 Minuten gegenüber 40 Minuten), als auch sensitiv und genau wurde.

**[0092]** Der MEFA-6-DMAE CLIA und der MEFA-6-DMAE + c33c-DMRE CLIA wiesen im Vergleich zu den Mehr-Antigen-HCV 2.0G ELISA-Tests (Chiron Corp., Emeryville, CA), welche die getrennten rekombinanten Peptide c100-3, c22-3 und c200 (c33c verbunden mit c100-3) enthalten, bessere oder äquivalente Sensitivitäten und Spezifitäten auf (siehe [Fig. 7](#)). Weiterhin ist das erfindungsgemäße Assayverfahren leicht durchzuführen, da es ein gleichzeitiges Einschritt-Assay auf einem einzigen Instrument unter Verwendung eines bequemen rekombinanten Einfang-Antigens ist. Gemäß weiterer Ausführungsformen der Erfindung kann das zusätzliche Epitop ein anderes Epitop, des MEFA sein, wie die Konformations-Epitope CHO E1 oder CHO E2 (HCV-Epitope E1 oder E2, exprimiert in Chinesischen Hamster-Ovarzellen), markiert mit einem detektierbaren Marker, wie in dem obigen Beispiel für das zusätzliche Epitop c33c beschrieben. Solche Konformations-Epitope aus HCV und Immunassays, in denen diese eine Rolle spielen, sind in WO 96/04301, WO 94/01778, WO 95/33053, WO 92/08734, supra, beschrieben.

#### Sensitivität bei Serokonversion

**[0093]** Die Sensitivität bei Serokonversion mit dem MEFA-6 chimären Antigen wurde auch mit CLIA (DMAE als detektierbarer Marker) bestimmt und mit kommerziellen ELISA-Verfahren verglichen. Zusätzlich zur Verwendung des MEFA-6-DMAEs alleine als Antigen wurde eine Mischung von MEFA-6-DMRE + C33c-DMAE auf Sensitivität bei Serokonversion als andere Ausführungsformen der Erfindung getestet. Blutproben wurden von einem chronisch mit HCV infizierten Patienten über die Zeit erhalten, unter Verwendung des oben beschriebenen Verfahrens mit CLIA getestet und mit der Leistung von Ortho 3.0 EIA (ELISA) (Tabelle 10, allein) und Abbott 2.0 ELISA (siehe [Fig. 8](#) und Tabelle 10) verglichen. Die Sensitivität wurde als optische Dichte der Assay-Probe, geteilt durch die Assay-Detektionsschwelle in optischen Dichteeinheiten (S/CO) wiedergegeben.

**[0094]** Die Detektion von HCV-Antikörpern in diesen Proben wurde auch mit einem kommerziellen Streifen-Immunblot-Assay (RIBA® 3.0 Chiron Corporation) durchgeführt, wobei dieser Test klinisch als bestätigender Test für die Detektion von HCV-Antikörpern verwendet wird. Nach dem RIBA®-Verfahren werden rekombinante HCV-Antigene mit Gelelektrophorese aufgetrennt und mit Patientenserum in Kontakt gebracht. Die Reaktion

mit den aufgetrennten Antigenen wird im Immunblot-Assay unter Verwendung sekundärer markierter Antikörper durchgeführt (Eheling, F. et al. (1991) Lancet 337: 912–913).

**[0095]** Die Ergebnisse des Vergleichs in [Fig. 8](#) und Tabelle 10 weisen darauf hin, dass der MEFA-6-DMAE + c33c-DMAE-Assay in der Lage war, HCV-Antikörper bei einem früheren Datum der Blutentnahme mit größerer Sensitivität nachzuweisen. Die MEFA-6-DMAE- und MEFA-6-DMAE + c33c-DMAE-Assays waren bei früheren Zeiten der Blutentnahme sensitiver als sowohl die kommerziellen Assays oder auch der bestätigende RIBA®-Test.

**[0096]** Das erfindungsgemäße MEFA CLIA-Verfahren wurde mit ELISAs aus kommerziellen Quellen verglichen, um zu bestätigen, dass der MEFA CLIA zuverlässig wirklich positive und wirklich negative Proben nachweist. Die Ergebnisse in [Fig. 9](#) zeigen, dass die Detektion von HCV-Antikörpern unter Verwendung von erfindungsgemäßen MEFA CLIAs konsistent mit der Detektion von Antikörpern durch kommerziell verwendete HCV-ELISAs zweiter Generation (Abbott Laboratories) korreliert. In den Fällen, in denen eine Probe mit den kommerziellen Assays als positiv für HCV-Antikörper getestet wurde und mit dem MEFA CLIA als negativ, wurde mit dem bestätigenden RIBA®-Test gefunden, dass die Probe negativ war (nicht-reakтив), was weiter die Genauigkeit des erfindungsgemäßen MEFA CLIAs stützt.

Tabelle 10

## Sensitivität bei Serokonversion

Tag der Blutentnahme aus dem Patienten	MEFA-6 CLIA	MEFA-6 + c33c CLIA	Ortho 3.0 ELISA	Abbott 2.0 ELISA	RIBA® 3.0
1	0,63	0,93	0,02	0,2	0 (nicht reaktiv)
2	0,63	0,94	0,02	0,2	0 (nicht reaktiv)
7	0,63	1,17	1,45	0,4	1 (mittel)
9	0,74	1,27	2,74	0,8	1 (mittel)
14	1,99	3,54	4,11	3,9	1 (mittel)
16	3,64	6,38	4,11	5	1 (mittel)
20	6,84	10,9	4,11	5,3	4 (reaktiv)

Serokonversions-Serie ID: Boston Biomedical, Inc. anti-HCV-Serokonversions-Serie (PHV902)

**[0097]** Die Genauigkeit des Nachweises von HCV-Antikörpern wurde weiter unter Verwendung eines MEFA-6-DMAE CLIA gezeigt (siehe [Fig. 10](#)). Zweihundert zufällige negative Proben von Blutspendezentren und 42 bekannte HCV-positive Proben wurden unter Verwendung des oben beschriebenen MEFA-DMAE CLIA-Protokolls getestet. Wie [Fig. 10](#) angibt, wurden beim Testen der negativen Proben keine falsch Positiven gefunden, und beim Testen der bekannten positiven Proben wurden keine negativen Ergebnisse erhalten.

## Biotinylierte MEFA.

**[0098]** Ein Chemolumineszenz-Immunassay (CLIA) wurde entwickelt, in dem ein MEFA an Biotin als nachweisbarem Marker angehängt wurde und indirekt über eine Biotin-Streptavidin-DMAE-Verbindung mit DMAE verbunden wurde. Gemäß diesem Verfahren wurden anti-Human-IgG Fc-PMP-Teilchen, wie oben beschrieben, mit einer biologischen Flüssigkeit in Kontakt gebracht, die humane anti-HCV-Antikörper enthielt. Die menschlichen Antikörper wurden an die anti-Human-IgG Fc-PMP-Teilchen gebunden, und das MEFA-Biotin wurde an die humanen anti-HCV-Antikörper gebunden. Streptavidin-DMAE-Konjugat wurde dann an das MEFA-Biotin gebunden. Etwa  $25 \times 10^6$ -Lichteinheitsäquivalente des Streptavidin-DMAE wurden zu jeder Testprobe hinzugefügt. Ungebundenes Material wurde aus der Probe gewaschen, und das durch die Reaktion von dem an das PMP-Teilchen gebundene DMAE mit NaOH/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> emittierte Licht wurde 2 Sekunden lang gemessen.

**[0099]** Dieses MEFA CLIA-Verfahren unterscheidet sich von dem MEFA-DMAE CLIA, der auch vorliegend beschrieben wird, indem in dem letzteren das DMAE-Tracer-Molekül direkt mit dem MEFA verbunden ist, wobei bei dem biotinylierten MEFA-CLIA eine zusätzliche Biotin/Streptavidin-Verbindung eine Rolle spielt, um das DMAE-Tracer-Molekül mit dem anti-HCV/MEFA-Komplex zu verbinden. Eine diagrammartige Darstellung des Assay-Verfahrens wird in [Fig. 6](#) zur Verfügung gestellt.

**[0100]** Der CLIA, in dem ein MEFA mit Biotin verbunden ist, kann, wie für das oben beschriebene MEFA-DMAE CLIA beschrieben, automatisiert werden. Unter diesen Umständen würde Streptavidin-DMAE zur Bindung und Detektion zu der Probe hinzugefügt werden. Etwa  $25 \times 10^6$ -Lichteinheitsäquivalente des Streptavidin-DMAE-Konjugats werden bevorzugt zu der Testmischung hinzugefügt.

**[0101]** Die vorliegende Erfindung wurde vorliegend gezeigt und beschrieben und wurde so betrachtet, dass sie die am praktischsten und am meisten bevorzugten Ausführungsformen enthält.

### Patentansprüche

1. Mehr-Kopien-Epitop-Sequenz zur Verwendung in einem Immunassay, wobei die Mehr-Kopien-Epitop-Sequenz die allgemeine Strukturformel (I) aufweist:



wobei (I) eine lineare Aminosäuresequenz ist;

A, B und C Epitope eines Virus sind;

B eine Aminosäuresequenz ist, die mindestens fünf und nicht mehr als 1.000 Aminosäuren umfaßt, wobei die Aminosäuren einer natürlich vorkommenden Antigen-Determinante eines Virus entsprechen, und mindestens ein B eine äquivalente Antigen-Determinante von einem anderen Stamm des Virus ist;

A und C jeweils Aminosäuresequenzen sind, die sich von B und voneinander unterscheiden, und bei denen es sich jeweils unabhängig voneinander um eine Aminosäuresequenz handelt, die mindestens fünf und nicht mehr als 1.000 Aminosäuren umfaßt, wobei die Aminosäuren eine Antigen-Determinante oder ein Cluster von Antigen-Determinanten darstellen, die natürlicherweise nicht an B grenzt/grenzen;

y eine ganze Zahl von 2 oder mehr ist; und

x und z jeweils unabhängig voneinander ganze Zahlen sind, wobei  $x + z = 1$  oder mehr ist.

2. Mehr-Kopien-Epitop nach Anspruch 1, wobei A, B und C immundominante Epitope des Hepatitis C Virus sind.

3. Mehr-Kopien-Epitop nach Anspruch 2, wobei A, B und C Epitope aus Bereichen des HCV-Polyproteins sind, wobei die Bereiche ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus NS3, NS4, NS5, c100, C25, core, E1, E2, c33c, c100-3 und c22.

4. Verfahren zur Herstellung eines Immunassays, bei dem man:

Nukleotidsequenzen identifiziert, die für eine Vielzahl von verschiedenen Epitopen eines Virus kodieren; die Nukleotidsequenzen in eine Expressionskassette einbringt, wobei mindestens zwei Sequenzen, die für eine gegebene Antigen-Determinante eines Epitops eines Virus kodieren, in die Kassette eingebracht werden, und mindestens eine der Sequenzen eine äquivalente Antigen-Determinante von einem anderen Stamm des Virus ist;

einen geeigneten Wirt mit der Kassette transformiert, um Sequenzen, die für Epitope kodieren, als ein Mehr-Epitop-Polypeptid nach Formel (I) von Anspruch 1 zu exprimieren;

das exprimierte Mehr-Epitop-Polypeptid auf reinigt; und

das Mehr-Epitop-Polypeptid für den Immunassay modifiziert.

5. Verfahren nach Anspruch 4, bei dem die Epitope Epitope eines Virus sind, das ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus HIV und HCV.

6. Assay-Vorrichtung, umfassend:

eine Trägeroberfläche; und

Epitope, die an die Trägeroberfläche gebunden sind, wobei die Epitope die allgemeine Strukturformel (I) aufweisen:



wobei (I) eine lineare Aminosäuresequenz ist;

A, B und C Epitope eines Virus sind;

B eine Aminosäuresequenz ist, die mindestens fünf und nicht mehr als 1.000 Aminosäuren umfaßt, wobei die Aminosäuren einer natürlich vorkommenden Antigen-Determinante eines Virus entsprechen, und mindestens ein B eine äquivalente Antigen-Determinante von einem anderen Stamm des Virus ist;

A und C jeweils Aminosäuresequenzen sind, die sich von B und voneinander unterscheiden, und bei denen es sich jeweils unabhängig voneinander um eine Aminosäuresequenz handelt, die mindestens fünf und nicht mehr als 1.000 Aminosäuren umfaßt, wobei die Aminosäuren eine Antigen-Determinante oder ein Cluster von Antigen-Determinanten darstellen, die natürlicherweise nicht an B grenzt/grenzen;

y eine ganze Zahl von 2 oder mehr ist; und

x und z jeweils unabhängig voneinander ganze Zahlen sind, wobei  $x + z = 1$  oder mehr ist.

7. Assay-Vorrichtung nach Anspruch 6, wobei A, B und C Epitope des Hepatitis C Virus sind.

8. Assay-Vorrichtung nach Anspruch 6, wobei A, B und C Epitope von Bereichen des HCV-Polyproteins sind, wobei die Bereiche ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus NS3, NS4, NS5, c100, C25, core, E1, E2, c33c, c100-3 und c22.

9. Assay-Zusammensetzung, die ein Mehr-Kopien-Epitop nach Anspruch 1 umfasst, wobei das Mehr-Kopien-Epitop an einen detektierbaren Marker gebunden ist.

10. Einschritt-Immunassay, bei dem man:

eine Probe mit einem Mehr-Kopien-Epitop nach einem der Ansprüche 1 bis 3 inkubiert; und

das Vorhandensein eines Antigen/Antikörper-Komplexes durch Bindung eines detektierbaren Markers an ein Mitglied des Komplexes detektiert.

Es folgen 9 Blatt Zeichnungen

## Anhängende Zeichnungen

MEFA-3 ANTIGEN							
hSOD- (1-154)	CORE	c33c	5-1-1 type 1	5-1-1 type 3	5-1-1 type 2	C-100	NS5
10	10	1192	1694	1694	1694	1901	1901
AMINO- SÄUREN	53	53	1457	1735	1735	1940	2278
MEFA-5 ANTIGEN							
hSOD- (1-154)	CORE	E1	E2	c33c	5-1-1 type 1	5-1-1 type 3	5-1-1 type 2
10 -	10 -	303 -	405 -	405 -	1192 -	1689 -	1689 -
AMINO- SÄUREN	53	53	320	444	1457	1735	1735
MEFA-6 ANTIGEN							
hSOD- (1-154)	E1	E2	c33c	5-1-1 type 1	5-1-1 type 3	5-1-1 type 2	C-100
303 -	405 -	405 -	320	1192 -	1689 -	1689 -	1901 -
AMINO- SÄUREN	444	444	444	1457	1735	1735	1940

FIG. 1

## MEFA-5 ANTIGEN-EPITOPE UND IHRE LOKALISIERUNG IM HCV-GENOM

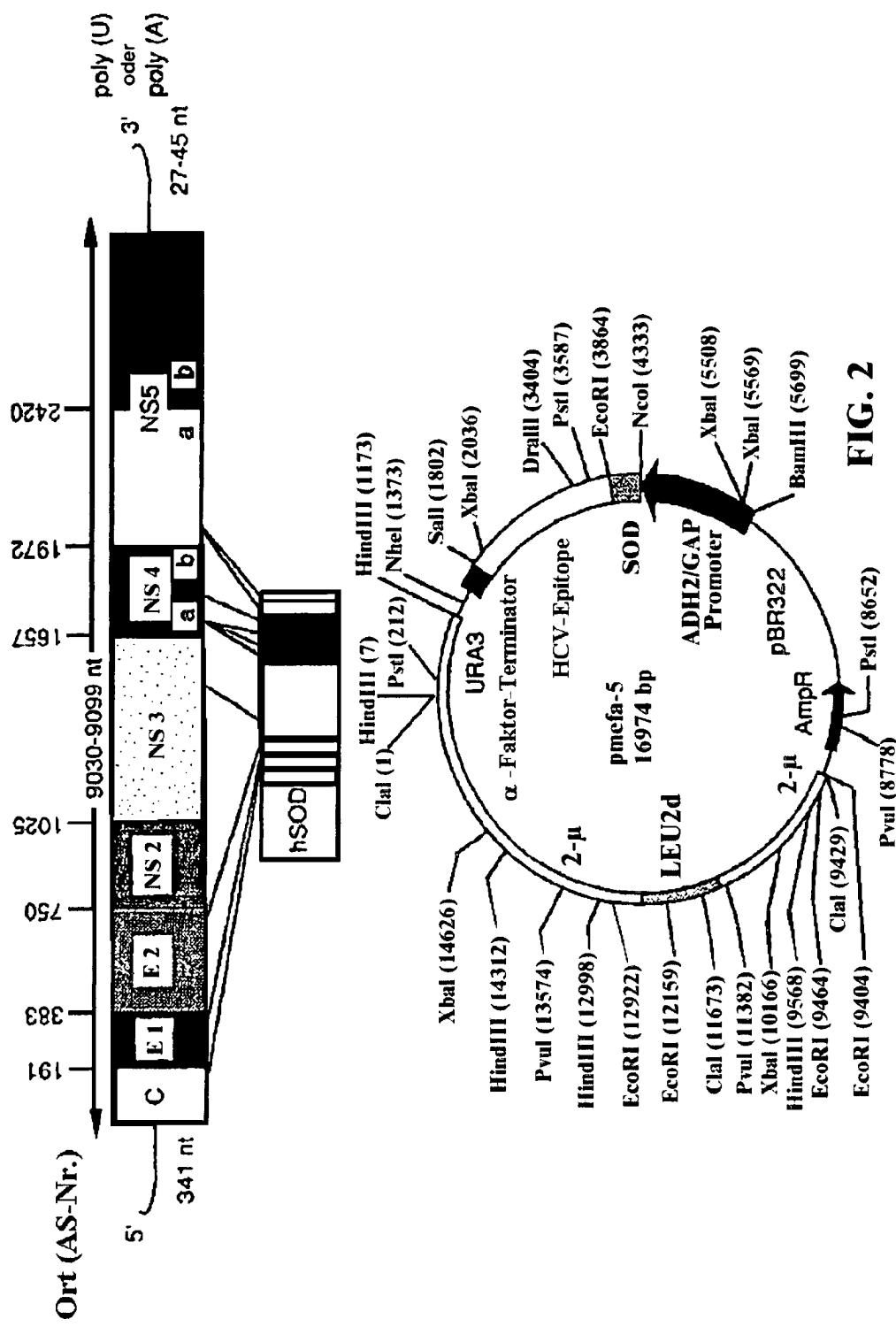


FIG. 2

## mefa-6 Antigen Epitope und ihre Lokalisierung im HCV-Genom

mefa AS #	5' End-Stelle	Epitop	HCVAS #	Stamm
1-154	NcoI	hSOD		
159-176	EcoR1	E1	303-320	1
179-217	HindIII	E2	405-444	1
218-484	*DraIII	C33C	1192-1457	1
487-533	SphI	5-1-1	1689-1735	1
536-582	NruI	5-1-1	1689-1735	3
585-631	Clal	5-1-1	1689-1735	2
634-673	AvaI	C100	1901-1940	1
676-711	XbaI	NSS	2278-2313	1
714-749	BglII	NSS	2278-2313	1
750-793	*NcoI	core	10-53	1
796-839	SacI	core	10-53	1

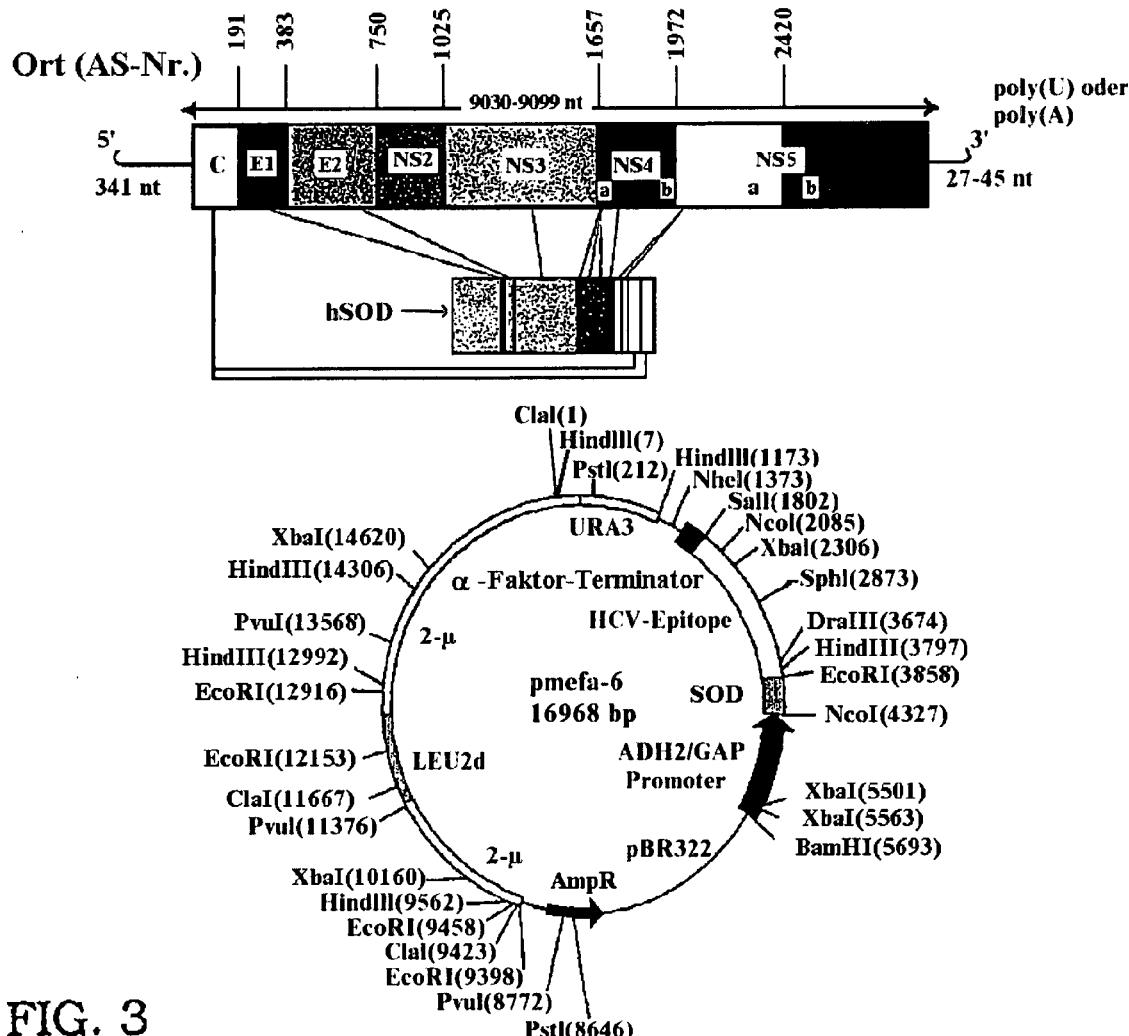


FIG. 3

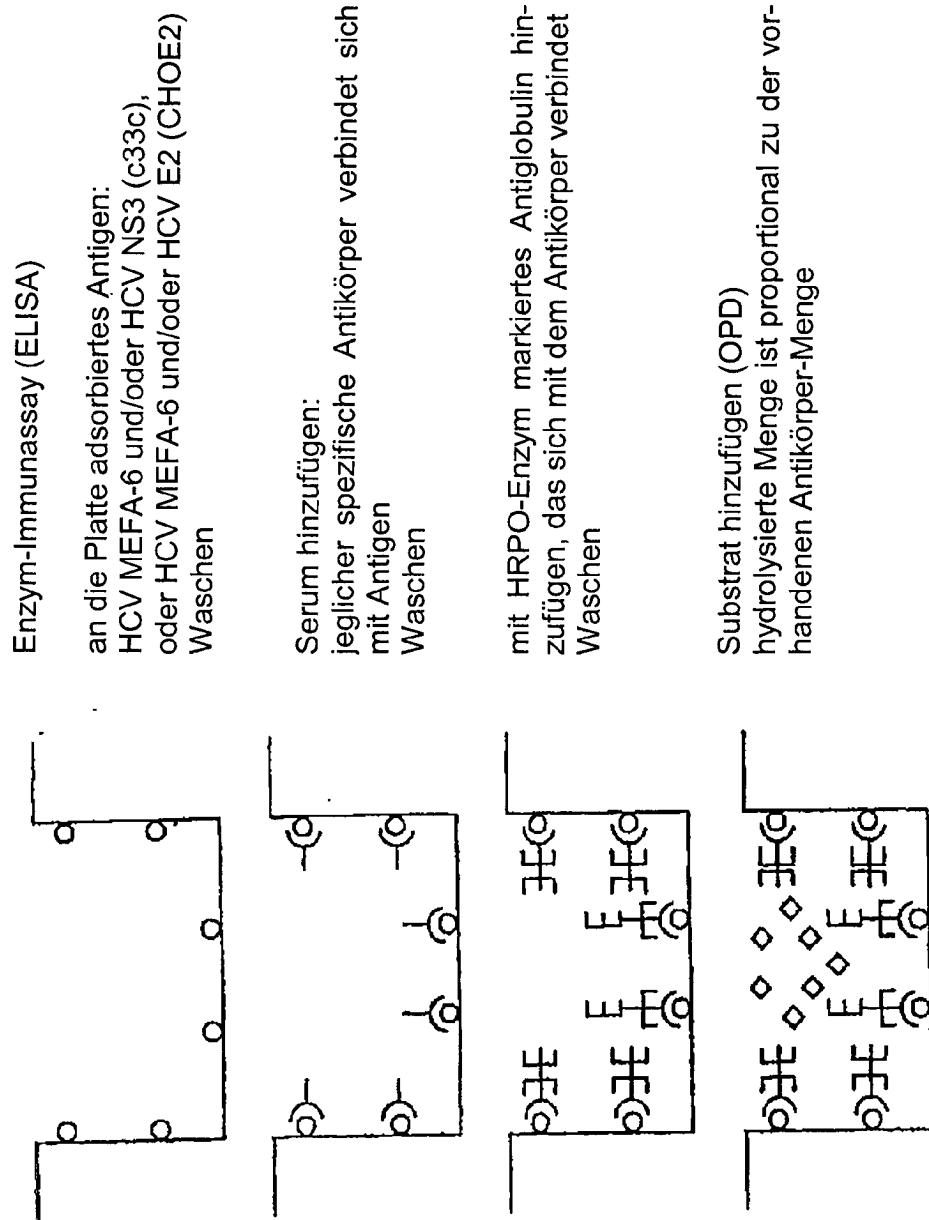


FIG. 4

## IgG Antikörper-Einfang-Format zur Detektion von Anti-HCV-Antikörpern

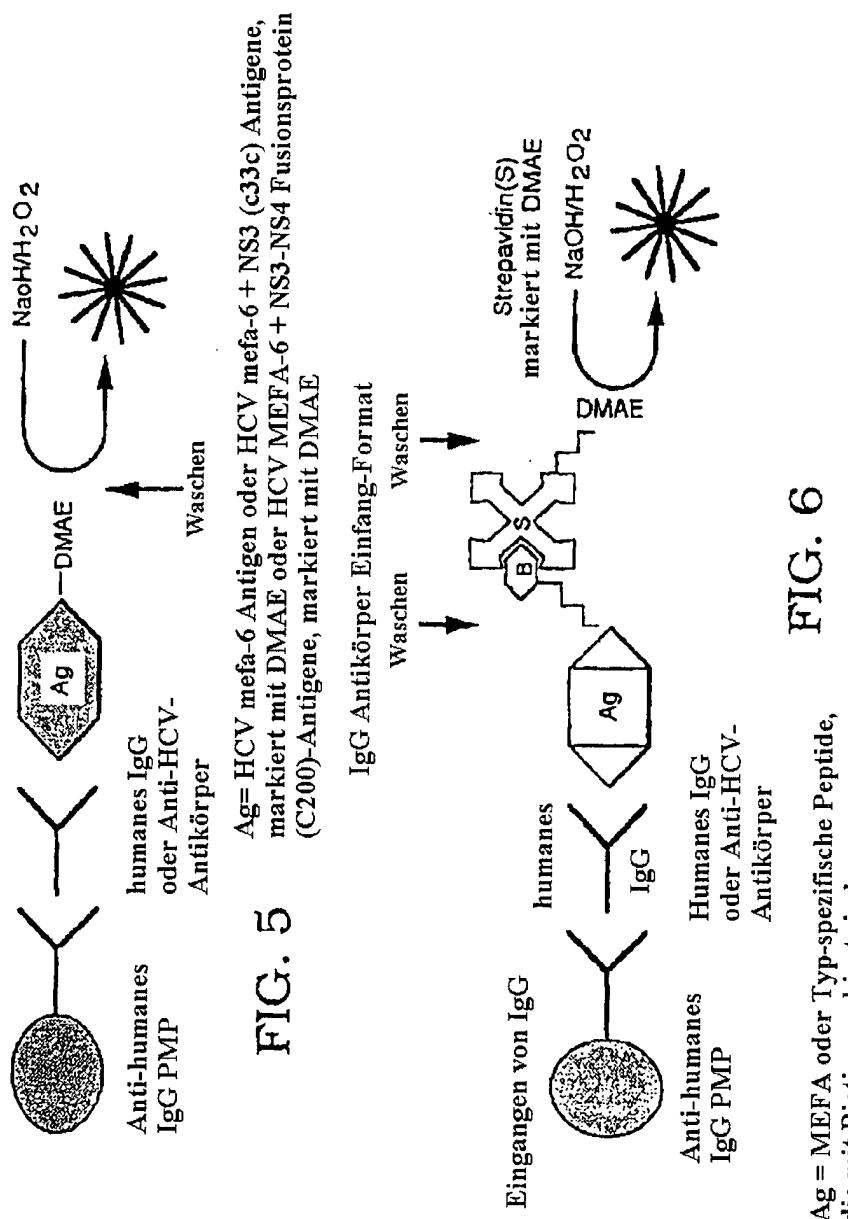


FIG. 5

Ag= HCV mfa-6 Antigen oder HCV mfa-6 + NS3 (c33c) Antigene, markiert mit DMAE oder HCV MEFA-6 + NS3-NS4 Fusionsprotein (C200)-Antigene, markiert mit DMAE

FIG. 6

$\text{Ag} = \text{MEFA}$  oder Typ-spezifische Peptide,  
die mit Biotin markiert sind

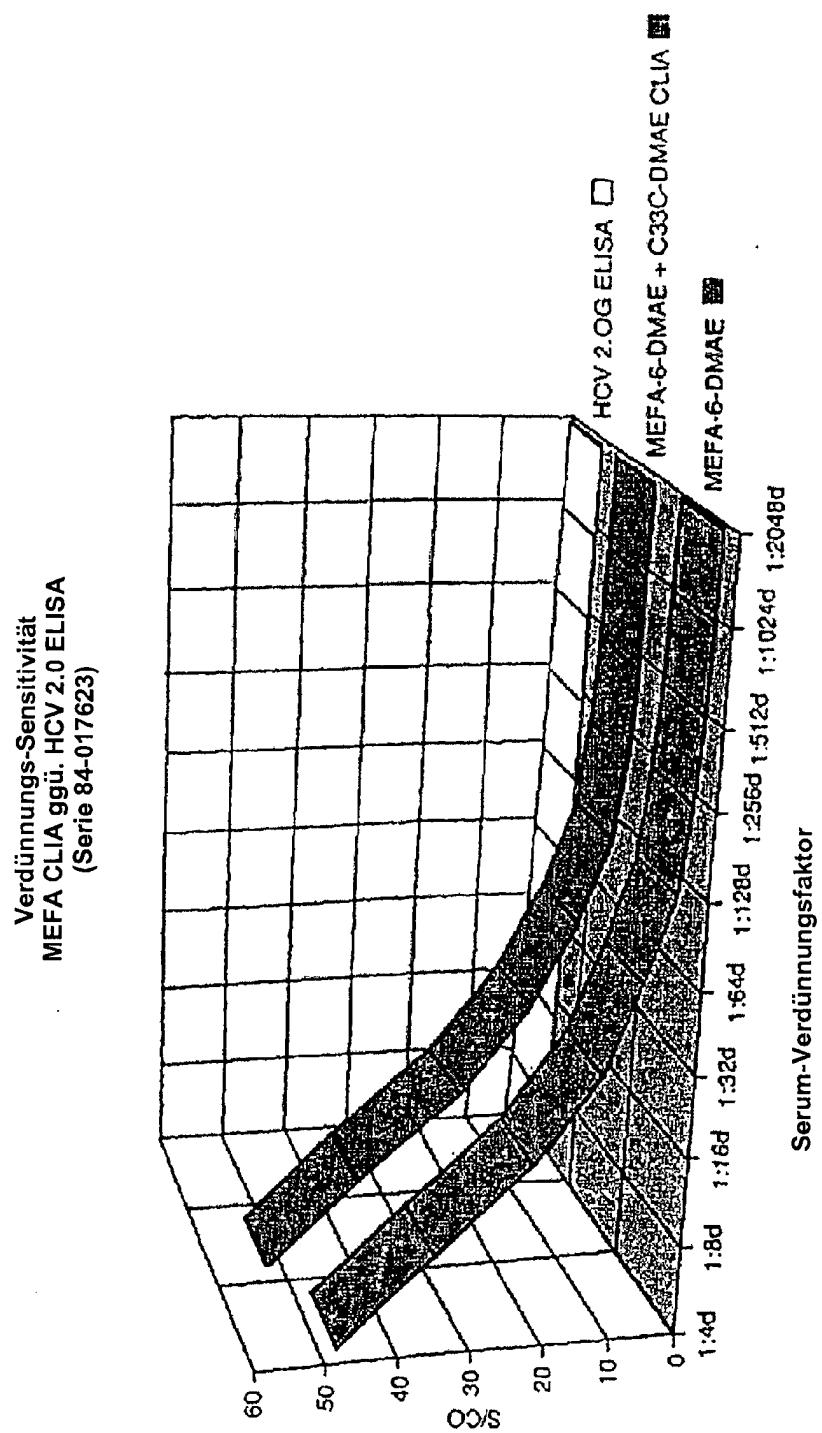


FIG. 7

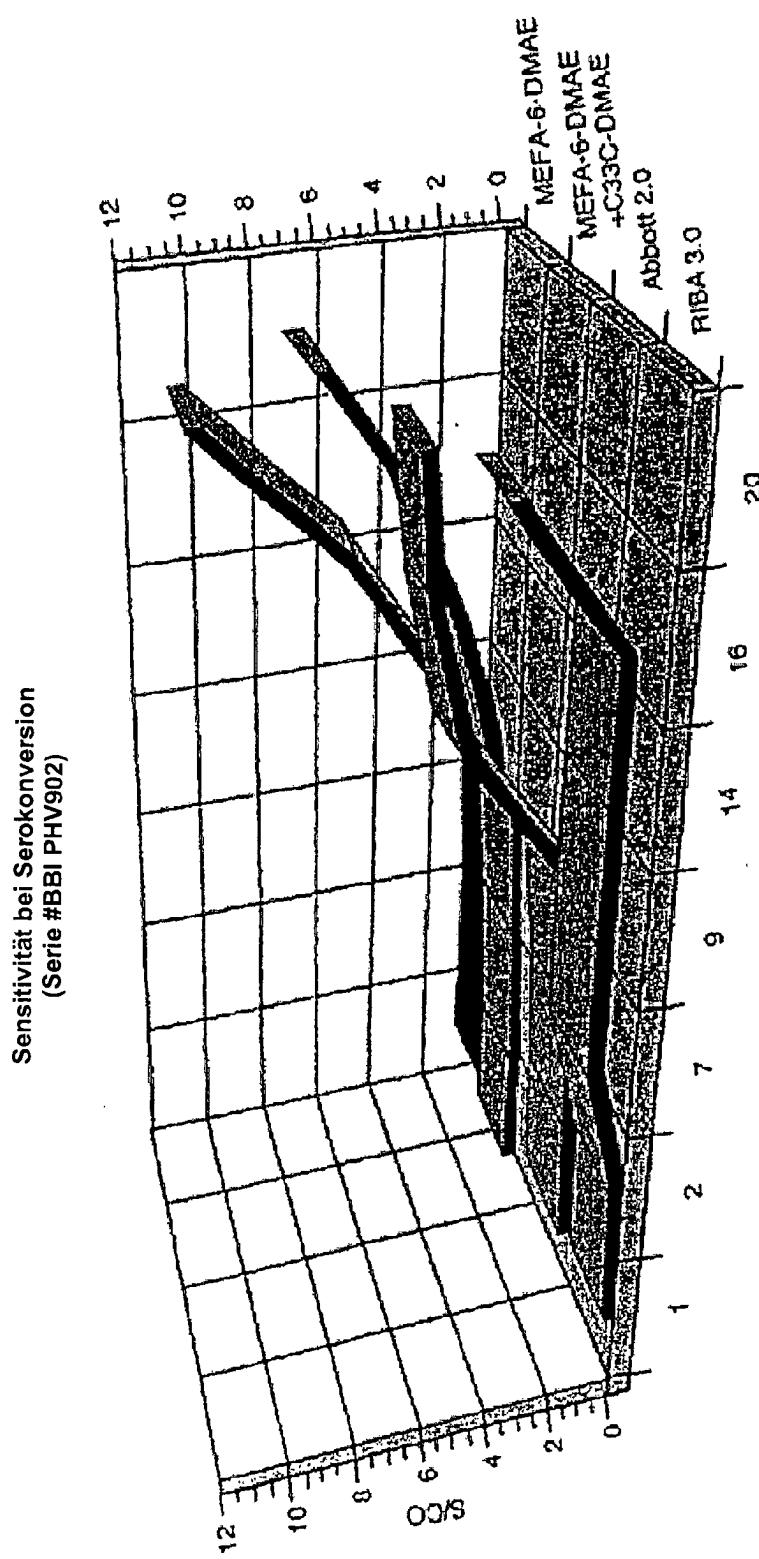


FIG. 8

HCV Antikörper-Nachweis Untersuchung der Korrelation  
MEFA (CLIA) ggü. kommerziellem ELISA

HCV ELISA zweiter Generation  
(Abbott ELISA zweiter Generation)

HCV IgG Einfang-CLIA  
MEFA-6-DMAE

		+	-
+	+	65	0
	-	1 *	600
-	-		

Klinische Proben N=666

\* mit RIBA zweiter Generation bestätigt, dass Probe nicht-reaktiv ist.

HCV ELISA zweiter Generation  
(Abbott ELISA zweiter Generation)

HCV IgG Einfang-CLIA  
MEFA-6-DMAE + C33C-DMAE

		+	-
+	+	65	0
	-	1 *	200
-	-		

Klinische Proben N=266

\* mit RIBA zweiter Generation bestätigt, dass Probe nicht-reaktiv ist.

FIG. 9

Proben-Nr. ggü. RLU unter Verwendung von MEFA-6-DMAE  
(200 zufällige Negative und 42 HCV-Positive)

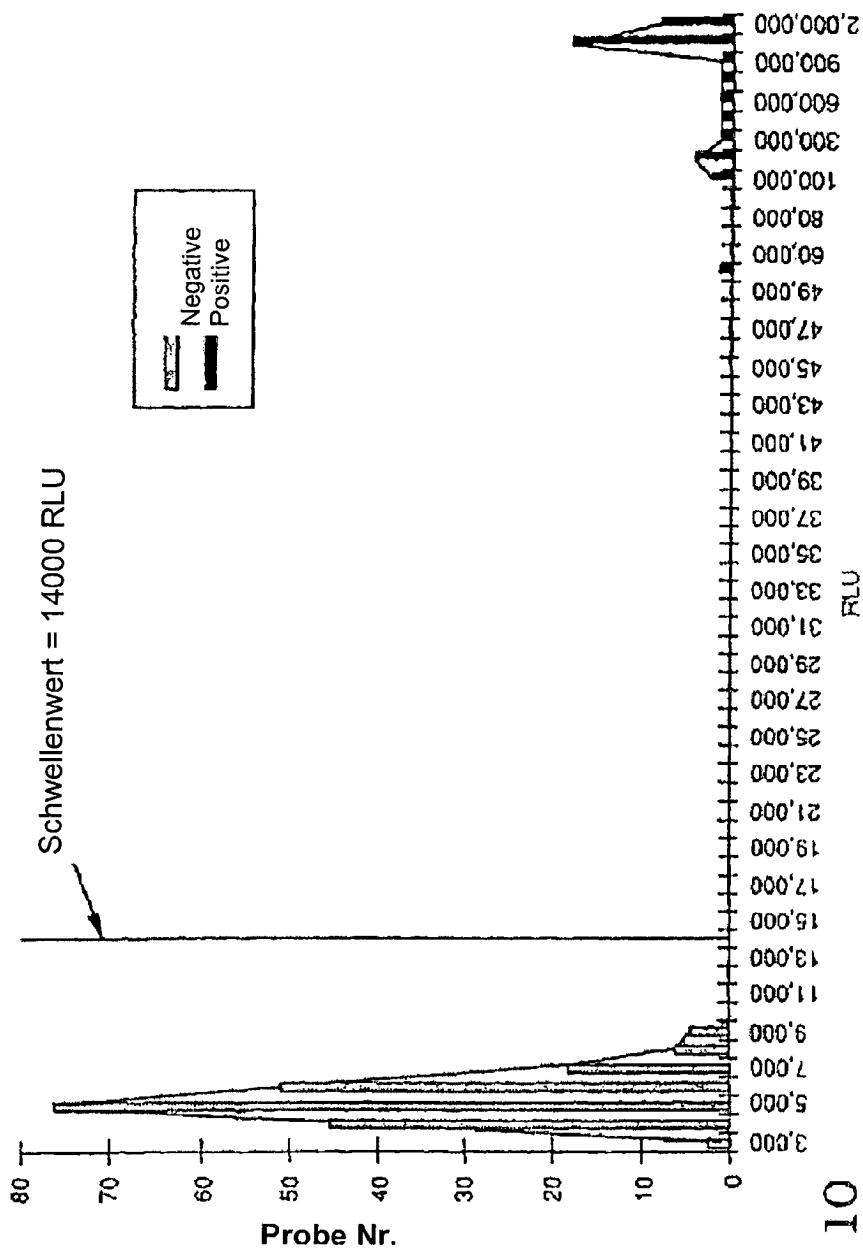


FIG. 10