



19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

12 Übersetzung der
europäischen Patentschrift

97 EP 0 608 261 B 1

10 DE 692 32 859 T 2

51 Int. Cl. 7:
C 12 N 15/51
A 61 K 39/29
C 12 Q 1/70
C 07 K 14/08

DE 692 32 859 T 2

- 21 Deutsches Aktenzeichen: 692 32 859.9
- 86 PCT-Aktenzeichen: PCT/US92/07683
- 96 Europäisches Aktenzeichen: 92 919 917.2
- 87 PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 93/006126
- 86 PCT-Anmeldetag: 11. 9. 1992
- 87 Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: 1. 4. 1993
- 97 Erstveröffentlichung durch das EPA: 3. 8. 1994
- 97 Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: 27. 11. 2002
- 47 Veröffentlichungstag im Patentblatt: 10. 4. 2003

30 Unionspriorität:
759575 13. 09. 1991 US

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

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

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

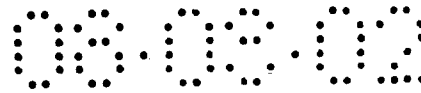
72 Erfinder:
WEINER, J., Amy, Benicia, US; HOUGHTON,
Michael, Danville, US

54 ZUSAMMENSETZUNG AUS MEHREREN IMMUNREAKTIVEN HEPATITIS-C-VIRUS-POLYPEPTIDEN

DE 692 32 859 T 2

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

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



Technisches Gebiet

5 Die Erfindung betrifft ganz im Allgemeinen immunreaktive Polypeptid-Zusammensetzungen, Verfahren zur Verwendung der Zusammensetzungen in immunologischen Anwendungen sowie Materialien und Verfahren um diese Zusammensetzungen herzustellen.

Hintergrund

10 Das Hepatitis-C-Virus wurde jüngst als das hauptsächlich kausale Agens für Nicht-A-, Nicht-B-Transfusionshepatitis (NANHB) identifiziert, wie auch als signifikante Ursache von erworbener NANBH. Materialien und Verfahren um die viralen genomischen Sequenzen zu erhalten, sind bekannt. Siehe dazu beispielsweise PCT-Veröffentlichungen Nrn. WO89/04669, WO90/11089 und WO90/14436.

15 Die molekulare Charakterisierung des HCV-Genoms zeigt, dass es sich dabei um ein RNA-Molekül mit positiver Polarität handelt, das ungefähr 10000 Nucleotide enthält, das für ein Polyprotein von ungefähr 3011 Aminosäuren codiert. Verschiedene Linien der Evidenz legen nahe, dass HCV eine ähnliche genetische Organisation aufweist wie die Viren der Familie Flaviviridae, welche das Flavi- und das Pesti-Virus beinhaltet. Wie seine pesti- und flaviviralen Verwandten scheint das HCV für einen großen Polyprotein-Vorläufer zu codieren, von dem
20 verschiedene virale Proteine (sowohl strukturelle als auch nicht-strukturelle) durch sogenanntes "Processing" erhalten werden.

RNA-haltige Viren weisen relativ hohe Raten an spontaner Mutation auf, d.h. es wurde über eine in der Größenordnung von 10^{-3} bis 10^{-4} je eingebautes Nucleotid berichtet. Da Heterogenität und Fluidität des Genotyps bei RNA-Viren allgemein verbreitet sind, kann es sich um
25 multiple virale Isolate, die virulent oder auch nicht-virulent sein können, innerhalb der HCV-Spezies handeln.

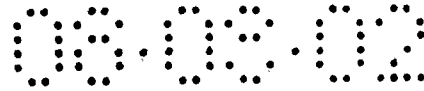
Eine Reihe verschiedener HCV-Isolate wurde mittlerweile identifiziert. Die Sequenzen dieser Isolate zeigen das Charakteristikum von beschränkter Heterogenität der RNA-Viren.

30 Das Isolat HCV J1.1 wird in Kubo, Y. et al. (1989), Japan. Nucl. Acids Res. 17:10367-10372; Takeuchi, K. et al. (1990), Gene 91:287-291; Takeuchi et al. (1990), J. Gen. Virol. 71:3027-3033; Takeuchi et al. (1990), Nucl. Acids Res. 18:4626 beschrieben.

Die vollständige codierende Sequenz zuzüglich der 5'- und 3'-Endsequenzen von zwei unabhängigen Isolaten, "HCV-J" und "BK", sind durch Kato et al. bzw. Takamizawa et al. beschrieben (Kato et al. (1990), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:9524-9528; Takamizawa et al.
35 (1991), J. Virol. 65:1105-1113).

Andere Veröffentlichungen, die Isolate von HCV beschreiben, sind die Folgenden:

"HCV-1": Choo et al. (1990), Brit. Med. Bull. 46:423-441; Choo et al. (1991), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2451-2455; Han et al. (1991), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1711-1715; Europäische Patent-Publikation Nr. 318,216.



"HC-J1" und "HC-J4": Okamoto et al. (1991), Japan J. Exp. Med. 60:167-177:

"HCT 18", "HCT 23", "Th", "HCT 27", "EC1" und "EC10": Weiner et al. (1991), Virology 180:842-848.

5 "Pt-1", "HCV-K1" und "HCV-K2": Enomoto et al., There are two major types of hepatitis C virus in Japan. Division of Gastroenterology, Department of Internal Medicine, Kanazawa Medical University, Japan.

Clones "A", "C", "D" und "E": Tsukiyama-Kohara et al., A second group of hepatitis virus in Virus Genes.

10 Eine typische Herangehensweise für die diagnostische und Impf-Strategie konzentriert sich auf die konservierten viralen Domänen. Jedoch leidet diese Herangehensweise darunter, dass Epitope, die in den variablen Domänen liegen können, ignoriert werden.

Aufgabe der Erfindung ist es, Polypeptid-Zusammensetzungen bereitzustellen, die immunologisch mit multiplen HCV-Isolaten kreuzreagieren können, insbesondere in Bezug auf die heterogenen Domänen des Virus.

15 Zusammenfassung der Erfindung

Es wurde gefunden, dass eine Anzahl von wichtigen HCV-Epitopen zwischen verschiedenen viralen Isolaten variiert und dass diese Epitope als bestimmten Domänen zugehörig charakterisiert werden konnten. Diese Entdeckung ermöglicht eine Strategie zum Herstellen von immunologisch kreuz-reaktiven Polypeptid-Zusammensetzungen, welche sich auf variable (an-

20 stelle von konservierten) Domänen konzentriert.

Dementsprechend ist eine Ausführungsform der Erfindung eine immunogene Polypeptid-Zusammensetzung, die wenigstens zwei HCV-Aminosäuresequenzen umfasst, wobei jede HCV-Sequenz wenigstens ein Epitop innerhalb einer variablen Domäne eines HCV-Polypeptids umfasst, wobei die variablen Domänenregionen der Aminosäuresequenzen zueinander hetero-

25 gen sind und von verschiedenen HCV-Isolaten stammen.

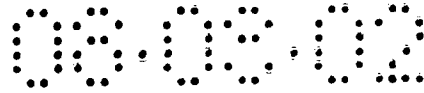
Eine andere Ausführungsform der Erfindung ist eine immunogene Zusammensetzung, die eine Vielzahl von Antigen-Sätzen umfasst, wobei (a) jeder Antigen-Satz aus einer Vielzahl von im Wesentlichen identischen Polypeptiden besteht, die wenigstens ein Epitop innerhalb der ersten variablen Domäne eines HCV-Polypeptids umfassen, und (b) die Aminosäuresequenz

30 eines Satzes heterogen ist in Bezug auf die Aminosäuresequenz des wenigstens einen anderen Satzes.

Vorzugsweise beinhalten die verschiedenen HCV-Isolate ein Isolat von HCV Gruppe I sowie ein Isolat von HCV Gruppe II. Vorzugsweise liegt die variable Domäne innerhalb des E2/NS1-Proteins des HCV-Polypeptids, stärker bevorzugt wird die variable Domäne von unge-

35 fähr der Aminosäure 384 bis ungefähr der Aminosäure 414 des HCV-Polypeptids codiert.

In einer anderen bevorzugten Ausführungsform liegt die variable Domäne innerhalb des E1/NS1-Proteins von dem HCV-Polypeptid, stärker bevorzugt codiert die variable Domäne von ungefähr Aminosäure 215 bis ungefähr Aminosäure 255 des HCV-Polypeptids.



Eine andere Ausführungsform der Erfindung ist eine immunogene Zusammensetzung, wie sie vorstehend beschrieben wurde, wobei jede Aminosäuresequenz des Weiteren ein Epitop innerhalb einer zweiten variablen Domäne des HCV-Polypeptids umfasst, wobei die Regionen der zweiten variablen Domäne der Aminosäuresequenz heterogen gegenüber einander sind und von verschiedenen HCV-Isolaten stammen. Vorzugsweise liegt die erste variable Domäne innerhalb des E2/NS1-Proteins und die zweite variable Domäne liegt innerhalb des E1-Proteins.

Bei noch einer anderen Ausführungsform der Erfindung handelt es sich um ein Verfahren zum Herstellen einer immunogenen pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von HCV, welche umfasst, dass die immunogene Zusammensetzung gemäß der Erfindung mit einem geeigneten Excipient vermisch wird.

Noch eine weitere Ausführungsform der Erfindung stellt das Verfahren zum Herstellen von Anti-HCV-Antikörpern dar, welches umfasst, dass die Antikörper aus einem Säugetier extrahiert werden, dem man zuvor eine immunogene Zusammensetzung, wie vorstehend beschrieben, verabreicht hat.

Bei einer anderen Ausführungsform der Erfindung handelt es sich um ein Verfahren zum Nachweis von Antikörpern gegen HCV innerhalb einer biologischen Probe, welches umfasst:

(a) Bereitstellen einer biologischen Probe, die man im Verdacht hat, Antikörper gegen HCV zu enthalten;

(b) Bereitstellen einer immunogenen Zusammensetzung, wie vorstehend beschrieben;

(c) Reagierenlassen der biologischen Probe von (a) mit der immunogenen Zusammensetzung von (b) unter Bedingungen, welche die Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen zulassen, und

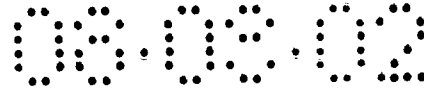
(d) Nachweisen der Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen, welche sich zwischen der immunogenen Zusammensetzung von (a) und den Antikörpern der biologischen Probe von (b), sofern es überhaupt zutrifft, bilden.

Eine andere Ausführungsform der Erfindung ist ein Kit zum Nachweis von Antikörpern gegen HCV innerhalb einer biologischen Probe, welcher eine immunogene Zusammensetzung, wie vorstehend beschrieben, abgepackt in einem geeigneten Behälter, umfasst.

Als weitere Ausführungsform der Erfindung handelt es sich um ein DNA-Molekül, das für ein DNA-Molekül codiert, das wiederum ein Polypeptid codiert, welches zwei heterogene Aminosäuresequenzen aus derselben variablen Domäne der verschiedenen HCV-Isolate umfasst.

Eine andere Ausführungsform der Erfindung ist eine Wirtszelle, die das vorstehend erwähnte DNA-Molekül umfasst, vorzugsweise das DNA-Molekül, welches die Kontrollsequenzen umfasst, die in der Lage sind, eine Expression des Polypeptids zu veranlassen.

Eine andere Ausführungsform der Erfindung ist ein Verfahren zum Herstellen eines rekombinanten Polypeptids, wie vorstehend definiert, welches umfasst, dass eine Population an



Wirtszellen, wie vorstehend beschrieben, unter Bedingungen wachsen gelassen wird, die für die Expression des Polypeptids sorgen.

Kurze Beschreibung der Figuren

Fig. 1 zeigt schematisch den genetischen Aufbau des HCV-Genoms.

5 Fig. 2 zeigt einen Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen des E1-Proteins, die durch die Isolate von HCV der Gruppe I und von HCV der Gruppe II codiert sind.

Fig. 3 zeigt einen Vergleich der Aminosäuresequenzen der mutmaßlichen E2/NS1-Region des isolierten HCV.

10 Fig. 4 stellt Diagramme dar, die Profile in Bezug auf die Antigenizitätsprofile der Amino-terminalen Region bzw. des Bereichs des mutmaßlichen HCV E2/NS1-Proteins (Aminosäuren 384-420) und die hypervariable Region gp 120 V3 von HIV-1 zeigt.

Fig. 5 zeigt eine Reihe von graphischen Darstellungen, die die Wahrscheinlichkeiten in Prozent dafür angeben, dass ein festgelegter Rest von dem Amino-terminalen Bereich des HCV E2/NS1-Proteins (Aminosäuren 384 bis 420) in Form von entweder der alpha-Helix, dem beta-Faltblatt oder der beta-Drehung eines sekundären strukturellen Motivs gefunden wird.

15 Fig. 6 zeigt graphische Darstellungen in Form von Balken bzw. Streifen, die die Reaktivität der Antikörper in dem Plasma von HCV 18 (Balkendarstellungen A-C) oder Th (Balkendarstellungen D-f) mit überlappenden biotinylierten 8mer-Peptiden, die von den Aminosäuren 384 bis 415 oder 416 der HCV-Isolate HCT 18 (A,D), Th (B,E) bzw. HCV J1 (C,F) abgeleitet sind.

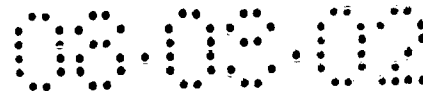
Fig. 7 zeigt die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der beiden Regionen des E2/NS1-Polypeptids, die Aminosäuren 384-414 und 547-647, wiedergegeben für die Q1- und Q3-Isolate.

25 Fig. 8A zeigt die abgeleiteten Aminosäuresequenzen von den Isolaten HCV J1.1 und J1.2 von den Aminosäuren 384 bis 647. Fig. 8B zeigt die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der Isolate HCT27 und HCVE1 der Aminosäuren 384 bis 651.

Fig. 9 zeigt die komplette Polyproteinsequenz des Isolats HCV-1.

Arten der Durchführung der Erfindung

30 Die Durchführung der vorliegenden Erfindung in der Praxis wird - sofern nicht anders angegeben - durch übliche konventionelle Techniken der Molekularbiologie, Mikrobiologie, rekombinanten DNA und der Immunologie verwenden, welche im Bereich des Fachkönnens liegen. Derartige Techniken sind vollständig in der Literatur erläutert. Siehe beispielsweise Maniatis, Fitch & Sambrook, MOLECULAR CLONING; A LABORATORY MANUAL (2. Ausg. 1989); DNA CLONING, VOLUMENS I AND II (D.N. Glover Hrsg. 1985);
35 OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS (M.J. Gait Hrsg. 1984); NUCLEIC ACID HYBRIDIZATION (B.D. Hames & S.J. Higgins Hrsg., 1984); TRANSCRIPTION AND TRANSLATION (B.D. Hames & S.J. Higgins Hrsg. 1984); ANIMAL CELL CULTURE (R.I. Freshney Hrsg. 1986); IMMOBILIZED CELLS AND ENZYMES (IRL Press, 1986); B. Perbal,



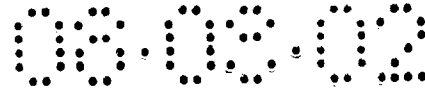
A PRACTICAL GUIDE TO MOLECULAR CLONING (1984); the series, METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.); GENE TRANSFER VECTORS FOR MAMMALIAN CELLS (J.H. Miller and M.P. Calos Hrsg. 1987, Cold Spring Harbor Laboratory), Methods in Enzymology Bd. 154 und Bd. 155 (Wu and Grossman bzw. Wu, Hrsg.),
5 Mayer and Walker, Hrsg. (1987), IMMUNOCHEMICAL METHODS IN CELL AND MOLECULAR BIOLOGY (Academic Press, London), Scopes, (1987), PROTEIN PURIFICATION: PRINCIPLES AND PRACTICE, Zweite Ausgabe (Springer-Verlag, N.Y.) und HANDBOOK OF EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY, BÄNDE I-IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell Hrsg. 1986); IMMUNOASSAY: A PRACTICAL GUIDE (D.W. Chan Hrsg.
10 1987).

Bei HCV handelt es sich um ein neues Mitglied der Familie der Flaviviridae, das die Pestiviren (Hog Cholera Virus und Bovine Viral Diarrhea Virus) und die Flaviviren, Beispiele für diese sind das Dengue- und Gelbfieber-Virus, beinhaltet. Ein Schema der genetischen Organisation von HCV ist in Fig. 1 gezeigt. Ähnlich wie die Flavi- und Pestiviren scheint HCV für
15 eine Grund-Polypeptid-Domäne ("C") am N-Terminus des viralen Polyproteins zu codieren, gefolgt von zwei Glykoprotein-Domänen ("E1", "E2/NS1"), stromaufwärts der Nicht-Strukturgene NS2 bis NS5. Die Aminosäuren-Koordinaten der mutmaßlichen Protein-Domänen sind in Tabelle 1 gezeigt.

Tabelle 1. Mutmaßliche Protein-Domänen von HCV

<u>a.a. Koordinaten (ungefähre Werte)</u>	<u>Protein</u>
1 - 191	C
192 - 383	E1
384 - 750	E2/NS1
751 - 1006	NS2
1007 - 1488	NS3
1489 - 1959	NS4
1960 - 3011	NS5

20 Wie vorstehend diskutiert wurde eine Vielzahl von HCV-Isolaten identifiziert. Vergleichende Sequenzanalyse der vollständigen und partiellen HCV-Sequenzen deutet an, dass, basierend auf der Homologie der Ebene der Nucleotide und der Ebene der Aminosäuren, HCV-Isolate grob in wenigstens drei Basisgruppen aufgeteilt werden können (Tabelle 2). Vergleiche Houghton et al., (1991) Hepatology 14:381-388. Jedoch sind lediglich partielle Sequenzen für
25 die Isolate in der Gruppe III verfügbar. Deshalb bedürfen, wenn die Sequenzen dieser Isolate enger definiert sind, ein oder mehrere dieser Isolate einer Auftrennung in verschiedene Gruppen, was die Möglichkeit einer vierten Gruppe einschließt. Tabelle 3 zeigt die Sequenz-Homologien zwischen individuellen viralen Proteinen verschiedener HCV-Isolate, wie sie von ihren Nucleotidsequenzen abgeleitet wurden. Man kann sehen, dass die Proteine derselben Virusgruppe untereinander eine größere Ähnlichkeit in Bezug auf die Sequenz haben als dieselben
30



Proteine, die durch verschiedene Virusgruppen codiert werden (Tabelle 3). Eine Ausnahme davon ist das Nucleocapsid-Protein, das hoch konserviert zwischen allen Gruppen I und II von Sequenzen der viralen Isolate bis zum heutigen Tag ist. (In Tabelle 3 bedeutet das Symbol N/A, dass diese Sequenzen für Vergleichszwecke nicht verfügbar waren.) Für den Zweck der vorliegenden Erfindung können deshalb Isolate der Gruppe I als diejenigen Isolate definiert werden, die in Bezug auf ihre viralen Proteine, insbesondere E1- und E2/NS1-Proteine auf der Ebene der Aminosäuren über 90% homolog zu den Isolaten, die nachfolgend als Gruppe I klassifiziert sind, sind. Gruppe II ist in einer analogen Art und Weise definiert. Zukünftige Gruppen können bezüglich der Homologie des viralen Proteins zu einem Prototyp-Isolat definiert werden. Untergruppen kann man auch durch Homologie in beschränkten Proteinen, wie etwa E1-, E2/NS1- oder NS2-Protein oder durch höhere Homologiegrade definieren.

Tabelle 2. Klassifikation von RNA-Sequenzen des viralen Genoms des Hepatitis-C-Virus in drei Basisgruppen.

	<u>HCV I</u>	<u>HCVII</u>	<u>HCVIII</u>
15	HCV-1	HCV-J1.1	Clone A, C, D & E
	HC-J1	HC-J4	HCV-K2 (a&b)
	HCT 18	HCV-J	
	HCT 23	BK	
	Th	HCV-K1	
20	HCT 27		
	EC1		
	Pt-1		

Tabelle 3. Aminosäuren-Homologien (Prozentsatz) zwischen viralen Proteinen, die durch verschiedene HCV-Isolate codiert sind.

<u>HCV-Gruppe</u>	<u>C</u>	<u>E1</u>	<u>E2/NS1</u>	<u>NS2</u>	<u>NS3</u>	<u>NS4</u>	<u>NS5</u>
<u>I, verglichen mit</u>							
I	98-100	94-100	N/A	N/A	N/A	N/A	99-100
II	97-98	77-79	78-81	75-77	91-92	90-93	84-88
30 III	N/A	N/A	N/A	N/A	86	76-80	71-74
<u>II, verglichen mit</u>							
II	98-100	92-100	89-100	93-100	94-100	97-100	95-100
III	N/A	N/A	N/A	N/A	84	76	74-75
<u>III, verglichen mit</u>							
35 III	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	91-100	89-100

Es bleibt festzuhalten, dass die mutmaßlichen viralen Hüllproteine, die durch die E1- und E2/NS1-Gene codiert sind, eine substantielle Variantenbildung in Bezug auf die Aminosäuresequenz zwischen den Gruppen I und II aufweisen. Lediglich NS2 zeigt einen größeren Grad



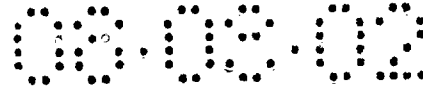
an Heterogenität, wohingegen die Proteine C, NS3, NS4 und NS5 alle ein größeres Ausmaß an Sequenzkonservierung zwischen den Gruppen zeigen. Die Sequenz-Variation bzw. -Variantenbildung, die bei den mutmaßlichen Virion-Hüllproteinen zwischen den Gruppen I und II beobachtet wird, spiegelt eine charakteristische Aufteilung bzw. Abtrennung der Aminosäuren zwischen diesen beiden Gruppen wider. Ein Beispiel dafür ist in Fig. 2 gezeigt, wo die Sequenz des Produkts des E1-Gens zwischen den Virusgruppen I und II verglichen wird. Die Aminosäuresequenzen E1, die von den Nucleotidsequenz HCV-Gruppen I und II abgeleitet sind, sind gezeigt. In der Fig. bedeuten die horizontalen Balken bzw. Streifen eine Sequenzidentität mit HCV-1. Die Sternzeichen zeigen gruppenspezifische Auftrennung bzw. Aufteilung der Aminosäuren an; die gruppenspezifischen Reste können deutlich identifiziert werden. Die Sequenzen der Gruppe I von HCV-1, HCT18, HCT23, HCT27 und HC-J1. Gruppe-II-Sequenzen sind HC-J4, HCV-J, HCV J1.1 und BK. Solche gruppenspezifische Auftrennung bzw. Aufteilung der Aminosäuren ist auch in anderen Genprodukten zu erkennen, das das gp72, das durch das E2/NS1-Gen codiert wird, einschließt. Fig. 3 zeigt zum Vergleich die Aminosäuresequenz der mutmaßlichen E2/NS1-Region von HCV-Isolaten, die sich auf Gruppe I und Gruppe II aufteilen. Das letztere Protein enthält auch eine N-terminale hypervariable Region ("HV") von ungefähr 30 Aminosäuren, der einen großen Variantenreichtum zwischen nahezu allen Isolaten zeigt. Vgl. Weiner et al. (1991), supra. Dieser Bereich tritt zwischen den Aminosäuren 384 bis 414 auf, wobei das Aminosäuren-Zählsystem von HCV-1 verwendet wurde.

Das mutmaßliche HCV-Hüllglykoprotein E2/NS1 kann dem gp53 (BVDV)/gp55 (Hog Cholera Virus)-Hüllpolypeptid der Pestiviren und dem NS1 der Flaviviren entsprechen, von denen beide den Wirten, die mit diesen Polypeptiden geimpft wurden, eine schützende Immunität verleihen.

Ins Auge springende Ähnlichkeiten zwischen der hypervariablen Region ("HV") und den HIV-1 gp 120 V3-Domänen in Bezug auf den Grad der Sequenzvariation, dem voraussagbaren Effekt des Aminosäureaustauschs auf mutmaßliche Antikörperbindung zusätzlich zu dem Fehlen einer definierten Sekundärstruktur legen nahe, dass die HV-Domäne für neutralisierende Antikörper codiert.

Die Immunogenität der Domäne wird durch Antikörper-Epitop-Kartierungsexperimente, wie sie in den Beispielen beschrieben sind, gezeigt. Die Ergebnisse dieser Studien legen nahe, dass zusätzlich zu den drei Hauptgruppen von HCV, HV-spezifische Unter-Gruppen ebenfalls existieren.

Die Analyse biologischer Proben von Individuen mit durch HCV induzierter NANBH zeigt an, dass einzelne Individuen zwei oder mehr HCV-Varianten gleichzeitig tragen können. Zwei co-existierende HV-Varianten wurden in dem Plasma eines Individuums, J1, gefunden. Hinzu kam, dass das partielle Sequenzieren der Gene eines Individuums mit chronischer NANBH, das zwischendurch Hepatitis-Rückfälle hatte, zeigte, dass das Individuum, Q, mit zwei HCV-Varianten (Q1 oder Q3) infiziert war. Jede Variante war mit lediglich einer Episode

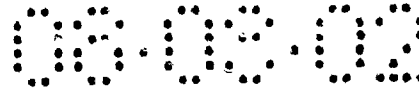


der Krankheit assoziiert. Ein ELISA unter Verwendung eines Q1- der Q3-spezifischen Peptids (Aminosäuren 396-407) zeigte, dass Q eine Antikörperantwort gegen das Q1-Peptid entwickelte, jedoch nicht das entsprechende Q3-Peptid, was nahelegt, dass Q's Rückfälle in Bezug auf die Krankheit dem Auftreten einer HV-Variante geschuldet waren. Die Gegenwart von Antikörpern gegen das Q1-Peptid, jedoch der Mangel an hormoneller Immun-Antwort gegen das Q3-Peptid während der zweiten Episode der Krankheit legt nahe, dass die Variantenbildung in der HV-Domäne von dem Druck einer Immunselektion ausgeht. Die Aminosäuren 396 bis 407 scheinen dem größten selektiven Druck in der HV-Domäne unterworfen zu sein. Diese Erkenntnisse unterstützen die These, dass hohe Grade an chronischem Zustand, die mit der Krankheit assoziiert sind, einer nicht-adäquaten immunologischen Antwort der Wirte der HCV-Infektion und/oder effektiven viralen Mechanismen der immunologischen Invasion geschuldet sind. Darüber hinaus deuten sie auf die E2/NS1-HV-Region als einer genetischen Region, die in einem viralen Entkommensmechanismus und/oder einem inadäquaten immunologischen Antwortmechanismus involviert sind.

Wie vorstehend diskutiert, gibt es mehrere Variantenbereiche innerhalb des HCV-Genoms. Einer oder mehrere dieser Bereiche sind am wahrscheinlichsten in einen viralen Entkommensmechanismus und/oder einem nicht-adäquaten immunologischen Antwortmechanismus involviert. Deshalb wäre es wünschenswert, in den Zusammensetzungen für die Behandlung von HCV-Polypeptiden einzubeziehen, was eine immunogene Antwort auf diese Varianten hin induzieren könnte.

Dadurch, dass die E1- und E2/NS1-Bereiche des Genoms für mutmaßliche Polypeptide vom Hülltyp codieren, können diese Bereiche von besonderem Interesse in Bezug auf die Entstehung von immunogenen Eigenschaften sein. Dadurch gehören diese Bereiche zu denjenigen, welche von besonderem Interesse sein könnten um eine Immun-Antwort zum Schutze eines Individuums gegen HCV-Infektion zu induzieren und/oder eine Immun-Antwort zu verstärken und bei der Verhinderung des chronischen Wiederauftretens der Krankheit in infizierten Individuen zu helfen. Dazu wäre es wünschenswert, dass die Bereiche zu denjenigen gehören, von denen ausgehend es wünschenswert wäre, HCV-Varianten nachzuweisen, welche im Verlaufe der Infektion auftreten, sowie auch Super- oder Co-Infektionen durch zwei oder mehrere Varianten.

Die Erfindung beschreibt Zusammensetzungen und Verfahren zum Behandeln von Individuen um HCV-Infektionen, insbesondere chronische HCV-Infektionen, zu verhindern. Darüber hinaus beschreibt sie Zusammensetzungen und Verfahren zum Nachweis des Vorhandenseins von Anti-HCT-Antikörpern in biologischen Proben. Das letztere Verfahren ist besonders nützlich beim Identifizieren von Anti-HCV-Antikörpern, die in Antwort auf immunologisch unterschiedliche HCV-Epitope erzeugt werden. Dieses Verfahren kann auch dazu verwendet werden, die Evolution verschiedener Varianten von HCV innerhalb eines infizierten Indivi-



duums zu untersuchen. Bei der Diskussion der Erfindung können die nachfolgenden Definitionen angewendet werden.

Der Ausdruck "Polypeptid" bezieht sich auf ein Polymer von Aminosäuren und er bezieht sich nicht auf eine spezielle Länge dieses Produkts; da sind Peptide, Oligopeptide und Proteine mit der Definition von Polypeptid mit eingeschlossen. Dieser Ausdruck bezieht sich auch nicht oder er schließt nicht Modifikationen des Polypeptids nach der Expression aus, beispielsweise Glykosylierung, Acetylierung, Phosphorylierung und Ähnliches. Durch die Definition mit eingeschlossen sind beispielsweise Polypeptide, die ein oder mehrere Analoge einer Aminosäure enthalten (beispielsweise nicht-natürliche Aminosäure usw. eingeschlossen), Polypeptid mit substituierten Bindungen, wie auch andere Modifikationen die der Fachwelt vertraut sind, wobei selbige natürlich oder nicht-natürlich vorkommen können.

Hierin wird der Ausdruck A "ist im Wesentlichen" von B "isoliert" verwendet, wenn das Gewicht von A wenigstens ungefähr 70%, stärker bevorzugt ungefähr wenigstens 80% und am meisten bevorzugt wenigstens mehr als 90% der kombinierten Gewichte von A und B ausmacht. Die Polypeptid-Zusammensetzungen der Erfindung sind vorzugsweise im Wesentlichen frei von humanem oder anderem Primatengewebe (was Blut, Serum, Zelllysat, Zellorganismen, celluläre Proteine usw. einschließt) und auch vom Zellkulturmedium.

Mit dem Ausdruck "rekombinantes Polynucleotid" ist ein Polynucleotid von genomischem, cDNA-, semisynthetischem oder synthetischem Ursprung gemeint, das aufgrund seiner Herkunft oder einer Manipulation wie nachfolgend bezeichnet werden kann: (1) ist nicht mit dem ganzen oder einem Bereich des Polynucleotids assoziiert, mit dem es in der Natur assoziiert ist, (2) ist mit einem anderen Polynucleotid als in der Natur verknüpft oder (3) tritt in der Natur nicht auf.

Ein „Polynucleotid“ ist eine polymere Form von Nucleotiden mit einer beliebigen Länge, entweder Ribonucleotide oder Desoxyribonucleotide. Dieser Ausdruck bezieht sich nur auf die Primärstruktur des Moleküls. Somit umfasst dieser Ausdruck Doppelstrang- und Einzelstrang-DNA und -RNA. Er umfasst auch bekannte Modifikationstypen, z.B. Markierungen, die auf dem Fachgebiet bekannt sind, eine Metylierung, „Caps“, Substitution einer oder mehrerer der natürlich auftretenden Nucleotide mit einem Analogon, Internucleotidmodifikationen, wie z.B. die mit ungeladenen Bindungen (z.B. Phosphorthioate, Phosphordithioate, usw.), die, die anhängende Gruppierungen enthalten, z.B. Proteine (einschließlich z.B. Nucleasen, Toxine, Antikörper, Signalpeptide, Poly-L-Lysin, usw.), die mit interkalierenden Substanzen (z.B. Acridin, Psoralin, usw.), die, die Gelatbildner enthalten (z.B. Metalle, radioaktive Metalle, usw.), die, die Alkylatoren enthalten, die mit modifizierten Bindungen (z.B. α -anomere Nucleinsäuren, usw.) wie auch unmodifizierte Formen des Polynucleotids.



„Rekombinate Wirtszellen“, „Wirtszellen“, „Zellen“, „Zelllinien“, „Zellkulturen“ und andere derartige Ausdrücke, die Mikroorganismen oder höhere eukaryontische Zelllinien bezeichnen, die als unizelluläre Entitäten kultiviert werden, betreffend Zellen, die als Empfänger für einen rekombinanten Vektor oder ein anderes Transferpolynucleotid verwendet werden können oder verwendet wurden und umfassend die Nachkommenschaft der ursprünglichen Zelle, die transfiziert wurde. Es ist zu erkennen, dass die Nachkommenschaft einer einzelnen Elterzelle in der Morphologie oder im genomischen oder gesamten DNA-Komplement in Folge einer natürlichen, zufälligen oder bewussten Mutation mit dem ursprünglichen Elter identisch sein muss.

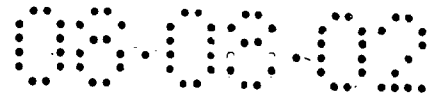
Ein „Replicon“ ist ein genetisches Element, z.B. ein Plasmid, ein Chromosom, ein Virus, ein Cosmid, usw., das sich als autonome Einheit der Polynucleotidreplikation in einer Zelle verhält, d.h. es ist zu einer Replikation unter seiner eigenen Kontrolle fähig.

Ein "Vektor" ist eine Einheit der Replikation, die des Weiteren Sequenzen umfasst, die Replikation und/oder die Expression eines offenen Leserasters bereitstellen.

Der Ausdruck "Steuerungssequenz" bezieht sich auf Polynucleotidsequenzen, die notwendig sind, um die Expression einer codierenden Sequenz zu bewirken, die mit ihnen verknüpft sind. Die Natur derartiger Steuerungssequenzen bzw. Kontrollsequenzen differiert in Abhängigkeit von dem Wirtsorganismus; in Prokaryonten beinhalten derartige Steuerungssequenzen im Allgemeinen Promotor, ribosomale Bindungsstelle und Terminatoren; in Eukaryonten beinhalten derartige Steuerungssequenzen im Allgemeinen Promotoren, Terminatoren und in einigen Fällen sogenannte Enhancer. Der Ausdruck "Steuerungssequenzen" wird dahingehend benutzt, dass er als Minimum alle Komponenten bzw. Bestandteile, deren Gegenwart notwendig für die Expression ist, beinhaltet und er kann auch zusätzliche Bestandteile beinhalten, deren Gegenwart vorteilhaft ist, wie beispielsweise sogenannte "Leader"-Sequenzen, die die Sekretion steuern.

Ein "Promotor" ist eine Nucleotidsequenz, die von sogenannten Konsensus-Sequenzen umfasst ist, welche das Binden der RNA-Polymerase an das DNA-Template bzw. die DNA-Vorlage in einer Weise zulassen, dass die Produktion an mRNA an dem normalen Initiationsort für die Transkription der benachbarten Strukturgene anfängt.

Der Ausdruck "funktionell gebunden" ("operably linked") bezieht sich auf eine Nebeneinanderstellung, worin die Komponenten bzw. Bestandteile, die so beschrieben werden, in einer Beziehung zueinander sind, die ihnen erlaubt, in ihrer beabsichtigten Art und Weise zu funktionieren. Eine Steuerungssequenz, die mit einer codierenden Sequenz "funktionell gebunden" vorliegt, ist in einer derartigen Weise ligiert bzw. verbunden, dass die Expression der codierenden Sequenz unter Bedingungen erreicht wird, die mit den Steuerungssequenzen kompatibel sind.



Ein "offenes Leseraster" (ORF) ist ein Bereich einer Polynucleotidsequenz, die ein Polypeptid codiert; dieser Bereich kann einen Teil der codierenden Sequenz oder auch die gesamte codierende Sequenz repräsentieren.

Eine "codierende Sequenz" ist eine Polynucleotidsequenz, die in mRNA transkribiert wird und/oder in ein Polypeptid translatiert wird, wenn sie unter die Kontrolle von geeigneten regulatorischen Sequenzen gestellt wird. Die Grenzen der codierenden Sequenz werden durch ein Startcodon für die Translation am 5'-Ende und ein Stoppcodon für die Translation am 3'-Ende festgelegt. Eine codierende Sequenz kann auch eine mRNA, DNA (eine cDNA eingeschlossen) und eine rekombinante Polynucleotidsequenz beinhalten.

Der Begriff "Epitop" oder "antigene Determinante", wie er hier verwendet wird, bedeutet eine Aminosäuresequenz, die immunreaktiv ist. Im Allgemeinen besteht ein Epitop aus wenigstens 3 bis 5 Aminosäuren, üblicherweise besteht es aus wenigstens etwa 8 oder wenigstens etwa 10 Aminosäuren. Hier wird der Ausdruck so verwendet, dass ein Epitop eines bestimmten Polypeptids Epitope mit derselben Aminosäuresequenz wie das Epitop in der bestimmten Polypeptidsequenz sowie immunologische Äquivalente desselben bezeichnet.

Bei einem "Antigen" handelt es sich um ein Polypeptid, das eine oder mehrere Epitope enthält.

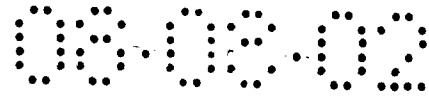
"Immunogen" bezeichnet die Fähigkeit, eine celluläre und/oder humorale Immunantwort hervorzurufen. Eine immunogene Antwort kann durch immunreaktive Polypeptide alleine hervorgerufen werden oder sie kann auch der Gegenwart eines Trägermittels bzw. Trägers in der Gegenwart oder Abwesenheit eines Adjuvans bedürfen.

"Immunreaktiv" bezieht sich (1) auf die Fähigkeit, immunologisch an einen Antikörper und/oder an einen Lymphozyt-Antigen-Rezeptor zu binden, oder (2) die Fähigkeit, immunogen zu sein.

Ein "Antikörper" ist irgendein Immunoglobulin, das Antikörper und Fragmente desselben einschließt, welche an ein spezifisches Epitop binden. Der Ausdruck umfasst, unter anderem polyclonale, monoclonale und chimäre Antikörper. Beispiele für chimäre Antikörper sind in den U.S. Patenten Nrn. 4,816,397 und 4,816,567 diskutiert.

Ein "Antigen-Satz" bzw. "Satz an Antigenen" ist als eine Zusammensetzung definiert, die aus einer Vielzahl von im Wesentlichen identischen Polypeptiden besteht, wobei die Polypeptide von einer Aminosäuresequenz eines definierten Epitops umfasst werden.

"Im Wesentlichen identische Polypeptide" meint Polypeptide, die mit der Ausnahme identisch sind, dass eine Variation auftritt, die auf den typischen Bereich einer Sequenz beschränkt ist oder auf eine Größenvariation, die dem Verfahren zur Herstellung des Polypeptids zugeschrieben werden kann; beispielsweise Expression von Rekombinanten, chemische Synthese, Gewebekultur usw. Diese Variation ändert nicht die gewünschte funktionale Eigenschaft einer Zusammensetzung von im Wesentlichen identischen Polypeptiden. Beispielsweise verhält sich die Zusammensetzung immunologisch als eine Zusammensetzung von identischen Poly-

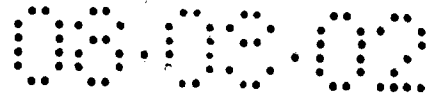


peptiden. Diese Variationen können beispielsweise Änderungen zugeschrieben werden, die aus dem sekretorischen Prozess während des Transports des Polypeptids resultieren, aus einer weniger als 100% betragenden Effizienz bei der chemischen Synthese usw.

Der Ausdruck "variable Domäne" oder "VD" eines viralen Proteins bezeichnet hierin eine Domäne, die ein konsistentes Muster der Aminosäurevariation zwischen wenigstens zwei HCV-Isolaten oder -Subpopulationen bezeichnet. Vorzugsweise enthält die Domäne wenigstens ein Epitop. Variable Domänen können von Isolat zu Isolat um so wenig wie einen Aminosäureaustausch variieren. Derartige Isolate können von denselben oder verschiedenen HCV-Gruppe(n) oder -Untergruppe(n) stammen. Variable Domänen können sofort durch die Sequenzzusammensetzung zwischen Isolaten identifiziert werden, Beispiele für diese Techniken sind nachfolgend beschrieben. Zum Zwecke der Beschreibung der vorliegenden Erfindung werden variable Domänen in Bezug auf die Aminosäurezahl des Polyproteins wie in Fig. 9 gezeigt, mit dem Initiator-Methionin als Position 1 definiert, das durch das Genom von HCV-1 codiert wird. Die entsprechende variable Domäne in einem anderen HCV-Isolat wird durch Anordnen der zwei Isolatsequenzen in einer Weise bestimmt, welche die konservierten Domänen außerhalb einer variablen Domäne in maximale Anordnung bringt. Dieses kann durchgeführt werden, indem man irgendeines einer Anzahl von Computer-Software-Programmen verwendet, wie etwa ALIGN 1.0, erhältlich von der University of Virginia, Department of Biochemistry (Attn: Dr. William R. Pearson). Vergleiche Pearson et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444-2448. Es ist selbstverständlich, dass die Aminosäurezahlen, die für eine bestimmte variable Domäne angegeben werden, in einem gewissen Umfange subjektiv und eine Frage der Wahl sind. Daher sollte bei den variablen Domänen der Anfang und das Ende als ungefähre Angabe verstanden werden, überlappende Domänen oder Sub-Domänen mit eingeschlossen, soweit nicht anderweitig angegeben.

Epitope werden typischerweise so kartiert, dass sie wenigstens fünf Aminosäuren, manchmal wenigstens etwa 8 Aminosäuren und sogar ungefähr 10 oder mehr Aminosäuren umfassen.

Die Aminosäuresequenz, die das HCV-Epitop umfasst, kann an ein anderes Polypeptid (beispielsweise ein Trägerprotein) geknüpft sein, entweder durch covalentes Anheften oder durch Expression eines Fusions-Polynucleotids um so ein Fusionsprotein zu bilden. Falls es gewünscht wird, kann man mehrere sich wiederholende Sequenzen (repeats) des Epitops einfügen oder anhaften lassen und/oder man kann eine Vielzahl von Epitopen einbauen. Das Trägerprotein kann aus irgendeiner Quelle stammen, jedoch wird es sich im Allgemeinen um ein relativ großes, immunogenes Protein wie etwa BSA, KLH oder Ähnliches handeln. Falls es gewünscht wird, kann man im Wesentlichen ein Gesamtlängen-HCV-Protein als Trägermittel nehmen, womit man die Zahl der immunogenen Epitope multipliziert. Alternativ dazu kann die Aminosäuresequenz des HCV-Epitops an ihrem Aminoende und/oder Carboxyende an eine Nicht-HCV-Aminosäuresequenz geknüpft sein, wodurch es sich bei dem Polypeptid um ein



Fusions-Polypeptid handelt. Analoge Typen von Polypeptiden können unter Verwendung von Epitopen konstruiert werden, welche von einem anderen als dem bestimmten viralen Protein stammen.

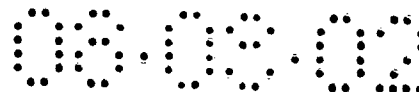
5 Eine "Variante" eines bestimmten Polypeptids bezieht sich auf ein Polypeptid, bei dem die Aminosäuresequenz des bestimmten Polypeptids durch Deletion, Substitution, Addition oder Umbau von einer oder mehreren Aminosäuren in der Sequenz geändert wurde. Methoden, bei denen Varianten auftreten (beispielsweise durch Rekombination) oder die (beispielsweise durch ortsspezifische Mutagenese (site directed mutagenesis)) hergestellt werden, sind in der Fachwelt bekannt.

10 Der Begriff "Transformation" bezieht sich auf die Insertion eines exogenen Polynucleotids in eine Wirtszelle, und zwar unabhängig von der für die Insertion verwendete Methode, beispielsweise durch direkte Aufnahme, Transduktion (was die virale Infektion mit einschließt), f-Paarung oder Elektroporation. Das exogenen Polynucleotid kann als ein nicht-integrierter Vektor erhalten bleiben, beispielsweise ein Plasmid- oder Viren-Genom, oder alternativ dazu
15 kann es in das Wirts-Genom integriert werden.

Der Begriff "Individuum" bezieht sich auf ein Vertebrat, insbesondere auf ein Mitglied der Säugetierspezies und beinhaltet, ist jedoch nicht beschränkt auf, Nagetiere (beispielsweise Mäuse, Ratten, Hamster, Meerschweinchen), Kaninchen, Ziegen, Schweine, Rinder, Schafe sowie Primaten (beispielsweise Schimpansen, afrikanische grüne Meerkatzen, Paviane, Orang-
20 Utane sowie Menschen).

Der Ausdruck "Behandlung", wie er hier verwendet wird, bezieht sich auf irgendetwas von (i) die Verhinderung einer Infektion oder erneuten Infektion, beispielsweise in einem traditionellen Impfstoff, (ii) die Reduktion oder Eliminierung von Symptomen und (iii) die wesentliche oder komplette Eliminierung des Virus. Die Behandlung kann prophylaktisch (vor der In-
25 fektion) oder therapeutisch (nach der Infektion) erfolgen.

Der Ausdruck "effektive Menge" bezieht sich auf eine Menge des ein Epitop tragenden Polypeptids, welche ausreichend ist um eine immunogene Antwort in dem Individuum hervorzurufen, dem es verabreicht wurde, oder um es auf andere Weise nachweisbar in seinem vorgesehenen System (beispielsweise dem Immunoassay) als Immunoagens reagieren zu lassen. Vor-
30 zugsweise ist die effektive Menge eine Menge, die ausreicht, eine Behandlung zu bewirken, wie vorstehend erwähnt. Die exakte Menge, die dafür notwendig ist, wird von Behandlung zu Behandlung variieren. Für Impfanwendungen oder bei dem Erzeugen von polyclonalem Antiserum/Antikörpern kann die effektive Menge von der Spezies, dem Alter und den allgemeinen Bedingungen des Individuums abhängig variieren und auch von der Schwere des Krankheits-
35 bildes, das behandelt werden muss, dem speziellen ausgewählten Polypeptid und seiner Art der Verabreichung usw. Es wird auch angenommen, dass effektive Mengen in einem relativ großen, nicht-kritischen Bereich gefunden werden. Eine geeignete effektive Menge kann schnell bestimmt werden, indem man lediglich Routine-Versuche verwendet.



Der Begriff "biologische Probe", wie er hier verwendet wird, bezieht sich auf eine Probe eines Gewebes oder eines Fluids, das aus einem Individuum isoliert wurde, was auch beispielsweise Plasma, Serum, Rückenmarksflüssigkeit, Lympheflüssigkeit, nach außen weisende Bereiche der Haut, das Atmungssystem, Verdauungssystem und das Ausscheidungssystem, Tränen, Speichel, Milch, Blutzellen, Tumore, Organe, Biopsin und auch Proben von in vitro Zellkultur-Bestandteilen (mit einschließend, jedoch nicht darauf beschränkt, auch etwas wie durch das Wachsen von Zellen im Zellkulturmedium erhaltenes konditioniertes Medium, beispielsweise aus Mab-produzierende Myelomzellen, rekombinante Zellen und Zellbestandteile) beinhaltet, jedoch nicht beschränkt ist.

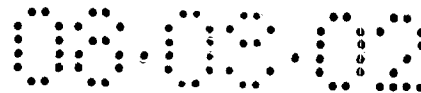
Die immunreaktiven Polypeptid-Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung umfassen eine Mischung von Isolat- oder Gruppen-spezifischen Epitopen, von denen wenigstens eines HCV-VD ist. Deshalb werden wenigstens zwei heterogene Aminosäuresequenzen vorhanden sein, welche ein Epitop definieren, das in bestimmten HCV-Isolaten gefunden wurde, und zwar in bestimmten HCV-Isolaten, die an demselben oder im Wesentlichen demselben physikalischen Ort an einem HCV-Protein gefunden wurden, d.h. jede Sequenz kann demselben Ort innerhalb des HCV-Genoms/Polypeptids zugeschrieben bzw. kartiert werden. Da die Sequenzen heterogen sind, wird als Ort eine variable Domäne (VD) unterstellt.

Die Zusammensetzung der erfindungsgemäß bereitgestellten Polypeptide ist gekennzeichnet durch die Gegenwart (in einer für die Immunreaktivität effektiven Menge) von wenigstens zwei Aminosäuresequenzen.

Es sollte klar sein, dass die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen mehr als lediglich zwei bestimmte Aminosäuresequenzen gemäß der Formel I umfassen können und dass die Z-Sequenzen in Gruppen aufgeteilt werden können, die verschiedene variable Domänen umfassen. Beispielsweise könnte eine erfindungsgemäße Zusammensetzung eine Gruppe von HCV-Sequenzen umfassen (mit Aminosäuresequenzen gemäß der Formel I), die die hypervariable Domäne der Aminosäuren 384-411 aus Isolaten von HCV-1, HCV-J1.1, HC-J1, HC-J4 usw. umfassen. Die Zusammensetzung kann auch eine zusätzliche Gruppe von HCV-Sequenzen (mit Aminosäuresequenzen gemäß der Formel I) umfassen, die die variable Domäne bei den Aminosäuren 215-255 umfassen, und zwar auch von den Isolaten HCV-1, HCV-J1.1, HC-J1, HC-J4 usw. Innerhalb des Zusammenhangs der Zusammensetzungen gemäß der Erfindung kann die Sequenz der Formel I des Weiteren wie nachfolgend wiedergegeben definiert werden:

$$SV_n \quad (IV),$$

wobei V eine Aminosäuresequenz repräsentiert, die die Sequenz einer HCV-variablen Domäne umfasst, wobei die variable Domäne wenigstens ein Epitop umfasst, d.h. Formel I. S und n sind ganze Zahlen von 1 oder größer. S repräsentiert eine bestimmte variable Domäne und n repräsentiert ein bestimmtes Isolat. Beispielsweise kann S=1 die variable Domäne bei den Aminosäuren 384-411 repräsentieren; S=2 kann bzw. könnte die variable Domäne bei den Aminosäuren 215-255 repräsentieren; und n=1, 2, 3 und 4 könnte die Isolate HCV-1, HCV-J1.1, HC-J1



bzw. HC-J4 repräsentieren. Deshalb können die beiden Gruppen von Sequenzen, die vorstehend diskutiert wurden, repräsentiert werden durch:

Gruppe 1: $1V_1, 1V_2, 1V_3$ & $1V_4$

Gruppe 2: $2V_1, 2V_2, 2V_3$ & $2V_4$.

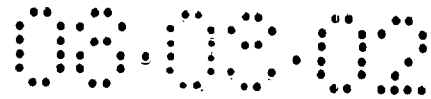
5 Es gibt wenigstens zwei unterschiedliche Sequenzen der Formel IV in den erfindungsgemäßen Zusammensetzungen, d.h. die Zusammensetzung enthält zwei verschiedene Sequenzen gemäß der Formel IV, wobei die Werte für S und oder n verschieden sind. Beispielsweise sind wenigstens $1V_1$ und $1V_2$ vorhanden oder zumindest $1V_1$ und $2V_2$ oder wenigstens $1V_1$ und $2V_1$.

10 Die unterschiedlichen Sequenzen, die unter die Formel IV fallen, sind in der Zusammensetzung entweder in denselben oder verschiedenen Polypeptidmolekülen vorhanden. Unter Verwendung der Minimalkombination von $1V_1$ und $1V_2$ zur Erläuterung könnten diese zwei Sequenzen in demselben Polypeptidmolekül (z.B. $1V_1-1V_2$) oder in getrennten Molekülen vorliegen. Dieses Merkmal der erfindungsgemäßen Zusammensetzungen kann als Zusammensetzungen von Polypeptiden, wie nachfolgend wiedergegeben, beschrieben werden:



wobei S, V und n wie vorstehend definiert sind; R und R' sind Aminosäuresequenzen von etwa 1-2000 Aminosäuren und es handelt sich dabei um dieselben oder verschiedene; r und r' sind 0 oder 1 und es handelt sich um dieselben oder verschiedene; x ist eine ganze Zahl ≥ 1 ; n ist unabhängig ausgewählt für jedes x; unter der Voraussetzung, dass die Aminosäuresequenzen in der Zusammensetzung vorhanden sind, die eine Kombination repräsentieren, die ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus (i) $1V_1$ und $1V_2$, (ii) $1V_1$ und $2V_2$ und (iii) $1V_1$ und $2V_1$. Bei den Ausführungsformen, bei denen die unterschiedlichen Sequenzen der Formel IV in verschiedenen Polypeptiden vorhanden sind, kann x 1 sein, obwohl es nach wie vor >1 sein kann, wenn gewünscht; beispielsweise eine Mischung von Polypeptiden $1V_1-1V_2$ und $1V_1-2V_2$. Wenn x 1 beträgt, sind r und r' vorzugsweise beide 0 um eine Redundanz mit L_y und L'_y sein, da V in einer bevorzugten Ausführungsform durch Formel I beschrieben werden kann. Wenn x >1 ist, können die kombinierten Längen von R und den benachbarten L sowie von R' und den benachbarten L' vorzugsweise nicht mehr sein als die typischen maximalen Längen, die für L und L' beschrieben wurden.

30 Die Auswahl der HCV-Aminosäuresequenzen, die innerhalb der unterschiedlichen V-Sequenzen der Zusammensetzungen eingeschlossen sein sollen, wird von der ins Auge gefassten Anwendung dieser Sequenzen abhängen und liegt angesichts der vorliegenden Offenbarung im fachmännischen Können. Zunächst sollte erkannt werden, dass die HCV-Epitope, die für die vorliegende Erfindung relevant sind, auf zwei Typen reduziert werden können. Der erste Typ dieser Epitope ist derjenige, der "Gruppen-spezifisch" ist, d.h. die entsprechenden Epitope in allen oder im Wesentlichen in allen Isolaten innerhalb einer HCV-Isolatgruppe sind gegeneinander bzw. miteinander immunologisch kreuzreaktiv, jedoch nicht mit den entsprechenden Epi-



topen von im Wesentlichen allen Isolaten der anderen Gruppe. Vorzugsweise sind die Epitope in einer Gruppen-spezifischen Klasse im Wesentlichen konserviert innerhalb der Gruppe, jedoch nicht zwischen oder unter den Gruppen. Der zweite Typ an Epitopen ist derjenige, der "Isolat-spezifisch" ist, d.h. das bzw. die Epitope ist immunologisch mit im Wesentlichen identischen Isolaten kreuzreaktiv, es ist jedoch nicht-kreuzreaktiv mit allen oder im Wesentlichen allen verschiedenen Isolaten.

Diese Gruppen- und Isolat-spezifischen Epitope können relativ leicht in Anbetracht der vorliegenden Offenbarung identifiziert werden. Als Erstes werden, wie hier beschrieben, die Sequenzen von mehreren HCV-Isolaten verglichen und Bereiche mit Sequenzheterogenität identifiziert. Das Muster der Heterogenität zeigt im Allgemeinen eine Gruppen- oder Isolat-Spezifität. Wenn ein identifizierter Bereich dafür bekannt ist, dass er ein oder mehrere Epitope umfasst, dann wird eine Sequenz von ausreichender Größe, so dass sie die gewünschten Epitope beinhaltet, als eine variable Domäne, die in den Zusammensetzungen gemäß der Erfindung mit eingeschlossen werden kann, ausgewählt. Wenn die Immunreaktivität eines gegebenen heterogenen Bereichs nicht bekannt ist, dann können Peptide, die die Sequenzen, die in dem Bereich der verschiedenen HCV-Isolate gefunden werden, repräsentieren, hergestellt werden und gescreent werden. Das Screening kann, ist jedoch nicht darauf beschränkt, Immunanalysen mit verschiedenen Quellen von Anti-HCV-Antikörpern (beispielsweise etwa Serum von Patienten, neutralisierende Mabs usw.) oder das Erzeugen von Antikörpern und Untersuchen der Fähigkeit solcher Antikörper, den Virus in vitro zu neutralisieren, beinhalten. Alternativ dazu kann der Ort der Epitope in einem Screening-Protokoll identifiziert werden, etwa einen solchen, wie es nachstehend beschrieben wird, er kann auf seine Heterogenität zwischen verschiedenen Isolaten untersucht und auf die immunologischen Eigenschaften der entsprechenden heterogenen Sequenzen gescreent werden.

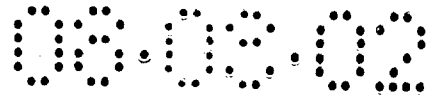
Für Impfstoff-Anwendungen wird angenommen, dass variable Domänen von den E1- und/oder E2/NS1-Domänen von besonderem Interesse sein werden. Insbesondere eine variable Domäne von E1 innerhalb der Aminosäuren 215-255 (vergleiche Fig. 2) sowie eine variable Domäne von E2/NS1 innerhalb der Aminosäuren 384-414 (siehe Fig. 3) sind als bedeutende immunreaktive Domänen identifiziert worden. Die vorläufige Evidenz legt nahe, dass es sich bei einer oder beiden dieser Domänen um Orte von Heterogenität handelt, die für Mutanten verantwortlich sind, die entwischen, was zu chronischen HCV-Infektionen führt. Daher sind Polypeptid-Zusammensetzungen, wie die vorstehend beschriebenen, bei denen die variablen Domänen in V eine oder beide dieser variablen Domänen sind, besonders bevorzugt. Des Weiteren können die Polypeptid-Zusammensetzungen gemäß der Erfindung auch Konformations-Epitope beinhalten, wohingegen sie sich insbesondere mit den im Allgemeinen linearen Epitopen in den variablen Domänen beschäftigt. Beispielsweise kann die Zusammensetzung von einer Mischung von rekombinanten E1- und/oder E2/NS1-Proteinen (welche die variablen Domänen von verschiedenen Isolaten darstellen) umfasst werden, die in einem rekombinanten Sys-

tem (beispielsweise Insekten- oder Säugetier-Zellen) exprimiert werden, welches Konformations-Epitope entweder innerhalb oder außerhalb der variablen Domänen beibehält. Alternativ dazu kann ein E1- und/oder E2/NS1-Untereinheits-Antigen von einem einzelnen Isolat, welches die Konformations-Epitope beibehält, mit einer Polypeptid-Zusammensetzung gemäß der Erfindung (beispielsweise einer Mischung von synthetischen Polypeptiden oder denaturierten rekombinanten Polypeptiden) kombiniert werden.

Für die diagnostische Anwendung kann es nützlich sein, die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen als Antigene einzusetzen, wodurch die Fähigkeit verbessert wird, Antikörper gegen bestimmte HCV-Isolate zu finden. Typischerweise können die Polypeptidmischungen direkt in einem homogenen oder heterogenen Immunoassay-Format verwendet werden, wobei das Letztere umfasst, dass die Polypeptide auf einem Festsubstrat (beispielsweise Mikrotiterplatten-Vertiefungen, Plastikperlen, Nitrocellulose usw.) immobilisiert werden. Vergleiche beispielsweise PCT Pub. No. WO90/11089; EPO Pub. No. 360,088; IMMUNOASSAY: A PRACTICAL GUIDE, supra. Alternativ dazu kann jedes im Wesentlichen identische Polypeptid, das die Polypeptidzusammensetzung gemäß der Erfindung ausmacht, auf dem gleichen Träger an diskreten Loci (d.h. Orten) immobilisiert werden, wodurch die Information bereitgestellt wird, inwieweit ein Isolat oder eine Gruppe den Antikörper erzeugt hat. Dies kann insbesondere in der Diagnostik bedeutend sein, wenn verschiedene Isolate Hepatitis, Krebs oder andere Krankheiten mit unterschiedlichen klinischen Prognosen verursachen.

Polypeptide, die bei der Herstellung der Zusammensetzung gemäß der Erfindung nützlich sind, können mittels Rekombination, synthetisch oder in Gewebeskultur hergestellt werden. Rekombinante Polypeptide, die von verstümmelten HCV-Sequenzen oder Gesamtlängen-HCV-Proteinen umfasst werden, können völlig aus HCV-Sequenzen (ein oder mehrere Epitope, entweder nebeneinanderliegend oder nicht-nebeneinanderliegend) oder Sequenzen in einem Fusionsprotein aufgebaut sein. Bei Fusionsproteinen beinhalten nützliche heterologe Sequenzen Sequenzen, die für die Sekretion von einem rekombinanten Wirt sorgen, die immunologische Reaktivität der HCV-Epitope bzw. des -Epitops verstärken oder die Kopplung des Polypeptids an ein Trägermaterial oder einen Träger für Impfstoff erleichtern. Vergleiche beispielsweise EPO Pub. No. 116,201; U.S. Pat. No. 4,722,840; EPO Pub No. 259,149; U.S. Pat No. 4,629,783, deren Offenbarungen hier durch Bezugnahme eingebaut werden.

Gesamtlängen- wie auch andere Polypeptide, die von verkürzten HCV-Sequenzen umfasst werden, sowie Mutanten davon können mittels chemischer Synthese hergestellt werden. Verfahren zum Herstellen von Polypeptiden durch chemische Synthese sind im Stand der Technik bekannt. Sie können auch mittels Rekombinationstechnik hergestellt werden. Eine DNA-Sequenz, die HCV-1 codiert, wie auch DNA-Sequenzen von variablen Bereichen anderer HCV-Isolate wurden beschrieben und/oder auf sie wird hier Bezug genommen. Die Verfügbarkeit dieser Sequenzen erlaubt die Konstruktion von Polynucleotiden, die immunreaktive Bereiche des HCV-Polypeptids codieren.

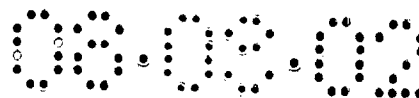


Polynucleotide, die das gewünschte Polypeptid codieren, welches von einem oder mehreren der immunoreaktiven HCV-Epitope aus einer variablen Domäne von HCV umfasst werden, können chemisch synthetisiert oder isoliert werden sowie in einen Expressionsvektor eingesetzt werden. Die Vektoren können oder können auch nicht Teile von Fusionssequenzen, wie etwa β -Galactosidase oder Superoxid-Dismutase (SOD), enthalten. Verfahren und Vektoren, welche für die Herstellung der Polypeptide, welche Fusionssequenzen von SOD enthalten, nützlich sind, sind in der europäischen Patentschrift Nr. 0196056, veröffentlicht am 1. Oktober 1986, beschrieben.

Die DNA, die für das gewünschte Polypeptid codiert, ob in fusionierter oder in reifer Form und ob oder ob nicht eine Signalsequenz, die Sekretion zulässt, kann in einen Expressionsvektor ligiert werden, der für irgendeinen passenden Wirt geeignet ist. Die Wirte werden dann mit dem Expressionsvektor transformiert. Sowohl eukaryontische als auch prokaryontische Wirtssysteme werden gegenwärtig dabei verwendet, um rekombinante Polypeptide zu bilden, und eine Zusammenfassung einiger der gängigeren Steuerungssysteme und Wirtszelllinien wird nachfolgend dargestellt. Die Wirtszellen werden unter Bedingungen inkubiert, die die Expression des gewünschten Polypeptids zulassen. Das Polypeptid wird dann aus lysierten Zellen isoliert und in dem Umfang gereinigt, wie es für den beabsichtigten Zweck notwendig ist.

Die allgemeinen Techniken, die dazu verwendet werden, das HCV-Genom aus einem Virus zu extrahieren, DNA-Bibliotheken herzustellen und zu sondieren, Clone zu sequenzieren, Expressionsvektoren zu konstruieren, Zellen zu transformieren, immunologische Testverfahren, wie etwa Radioimmunoassays und ELISA-Assays, durchzuführen, Zellen in Kultur wachsen zu lassen und ähnliches, sind im Stand der Technik bekannt. (Vergleiche beispielsweise die Referenzen, die in dem Abschnitt, der "Hintergrund" genannt wird, vorstehend zitiert werden, wie auch die Referenzen, die am Beginn des Abschnittes "Wege, die Erfindung auszuführen".)

Die Transformation des Vektors, der die gewünschte Sequenz enthält, in einen geeigneten Wirt kann mittels irgendeiner der bekannten Methoden zum Einführen von Polynucleotiden in eine Wirtszelle durchgeführt werden, wobei beispielsweise das Verpacken des Polynucleotids in einen Virus und das Durchführen einer Transduktion der Wirtszelle mit dem Virus oder direkte Aufnahme des Polynucleotids beinhaltet sind. Die Transformations-Verfahrensweise, die verwendet wird, hängt von dem Wirt, der transformiert werden soll, ab. Bakterielle Transformation durch direkte Aufnahme beinhaltet im Allgemeinen die Behandlung mit Calcium- oder Rubidiumchlorid (Cohen (1972), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69:2110. Die Transformation von Hefezellen durch direkte Aufnahme kann durchgeführt werden, indem die Methode von Hinnen et al. (1978), J. Adv. Enzyme Reg. 7:1929 durchgeführt wird. Die Transformation bei Säugern durch direkte Aufnahme kann durchgeführt werden, indem die Calciumphosphat-Präzipitationsverfahrensweise von Graham und Van der Eb (1978), Virology 52:546 oder verschiedene bekannte Modifikationen davon verwendet werden. Andere Methoden für das Einführen von rekombinanten Polynucleotiden in Zellen, insbesondere in Säugetierzellen, welche im Stand der



Technik bekannt sind, beinhalten die mittels Dextran vermittelte Transfektion, die Transfektion, die durch Calciumphosphat vermittelt wird, Transfektion durch Vermittlung von Polybren, Protoplastenfusion, Elektroporation, Verkapseln des Polynucleotids in Liposomen sowie direkte Mikroinjektion der Polynucleotide in Kerne.

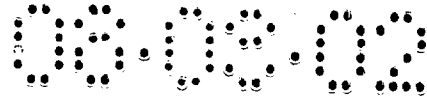
5 Um die Expression der gewünschten codierenden Sequenzen zu erhalten, werden die Wirtszellen mit Polynucleotiden transformiert (bei denen es sich um Expressionsvektoren handeln kann), welche von den vorstehend genannten Steuerungssequenzen, die funktionell an die gewünschten codierenden Sequenzen angeknüpft sind, umfasst werden. Die Steuerungssequenzen sind mit dem benannten Wirt kompatibel. Unter prokaryontischen Wirten wird E. coli am häufigsten verwendet. Die Expression von Steuerungssequenzen für Prokaryonten beinhaltet 10 Promotoren, die wahlweise Operatorbereiche und ribosomale Bindungsstellen enthalten. Transfer- bzw. Übertragungsvektoren, die kompatibel mit prokaryontischen Wirten sind, werden im Allgemeinen von beispielsweise pBR322 abgeleitet, einem Plasmid, das Operons enthält, die die Resistenz gegen Ampicillin und Tetracyclin verleihen, und verschiedene pUC-Vektoren, die 15 auch Sequenzen enthalten, die Marker für Resistenz gegen Antibiotika mit sich tragen. Promotorsequenzen können natürlicherweise vorkommen, beispielsweise die β -Lactamase (Penicillinase) (Weissman (1981), "The cloning of interferon and other mistakes" in Interferon 3 (ed. I. Gresser), Lactose (*lac*) (Chang et al. (1977); Nature 198:1056) und Tryptophan (*trp*) (Goedell et al. (1980), Nucl. Acids Res. 8:4057) sowie das P_L -Promotorsystem, das vom lambda-Phagen 20 abgeleitet ist, und N-Gen-ribosomale Bindungsstellen (Shimatake et al. (1981), Nature 292:128). Zusätzlich können synthetische Promotoren, die in der Natur nicht vorkommen, auch als bakterielle Promotoren fungieren. Beispielsweise kann die Transkriptions-Aktivierungssequenz des einen Promotors mit der Operon-Sequenz des anderen Promotors verknüpft werden, was einen synthetischen hybriden Promotor schafft (z.B. der *tac*-Promotor, der von den 25 Sequenzen der Promotoren für *trp* und *lac* abgeleitet ist (De Boer et al. (1983), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:21). Die vorstehend genannten Systeme sind insbesondere mit E. coli kompatibel; wenn es gewünscht wird, können auch andere prokaryontische Wirte, wie etwa Stämme von Bacillus oder Pseudomonas verwendet werden, und zwar mit ihren entsprechenden Steuerungssequenzen.

30 Eukaryontische Wirte beinhalten Hefe- und Säugetierzellen in Kultursystemen. Saccharomyces cerevisiae und Saccharomyces carlsbergensis sind die am stärksten allgemein verwendeten Hefewirte und es handelt sich dabei um leicht zu handhabende Pilzwirte. Mit Hefe kompatible Vektoren tragen im Allgemeinen Marker, die es zulassen, dass erfolgreiche Transformanten dadurch ausgewählt werden, dass auxotrophe Mutanten prototop werden oder dass eine 35 Resistenz gegen Schwermetalle auf Wildtyp-Stämmen verliehen wird. Mit Hefe kompatible Vektoren können den 2 μ -Replikationsursprung (Broach et al. (1983), Meth. Enz. 101:307) verwenden, die Kombination von CEN3 und ARS1 oder andere Mittel zur Sicherstellung der Replikation einsetzen, wie etwa Sequenzen, die dazu führen, dass ein geeignetes Fragment in



das Wirtszellgenom inkorporiert wird. Steuerungssequenzen für Hefe-Vektoren sind dem Fachpublikum bekannt und sie beinhalten Promotoren für die Synthese glykolytischer Enzyme (Hess et al. (1968), J. Adv. Enzyme Reg. 7:149), beispielsweise Alkohol-Dehydrogenase (ADH), (E.P.O. Veröffentlichungs-Nr. 284044), Enolase, Glucokinase, Glucose-6-phosphat-Isomerase, Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAP oder GAPDH), Hexokinase, Phosphofruktokinase, 3-Glycerophosphat-Mutase und Pyruvat-Kinase (PyK) (E.P.O. Veröffentlichungs Nr. 329203). Das PH05-Gen aus der Hefe, das für saure Phosphatase codiert, stellt auch brauchbare Promotorsequenzen bereit. Zusätzlich fungieren synthetische Promotoren, die in der natürlichen Umgebung nicht vorkommen, auch als Hefe-Promotoren. Beispielsweise kann eine stromaufwärts gelegene Aktivierungssequenz (UAS) eines Hefe-Promotors mit dem Transkriptions-Aktivations-Bereich eines anderen Promotors aus Hefe verknüpft werden, was einen synthetischen Hybrid-Promotor schafft. Beispiele für derartige Hybrid-Promotoren beinhalten die regulatorischen Sequenzen von ADH, die an die GAP-Transkriptions-Aktivations-Region bzw. den -Bereich gebunden sind (U.S. Patent Nrn. 4,876,197 und 4,880,734). Andere Beispiel für Hybrid-Promotoren beinhalten Promotoren, die aus den regulatorischen Sequenzen von entweder den ADH2-, GAL4-, GAL10- oder PH05-Genen bestehen, die mit dem Transkriptions-Aktivations-Bereich eines glykolytischen Enzyms, wie etwa der GAP oder PyK kombiniert sind (E.P.O. Veröffentlichungs Nr. 164556). Weiterhin kann ein Hefe-Promotor auch natürlich vorkommende Promotoren eines Nicht-Hefe-Ursprungs beinhalten, die es vermögen, RNA-Polymerase aus Hefe für die geeignete Initiation der Transkription zu binden.

Andere Steuerungselemente, die in den Expressionsvektor aus Hefe eingeschlossen sein können, sind Terminatoren (beispielsweise von GAPDH und von dem Enolase-Gen (Holland (1981), J. Biol. Chem. 256:1385) und sogenannte "Leader"-Sequenzen. Das Leader-Sequenzfragment codiert typischerweise für ein Signalpeptid, das von hydrophoben Aminosäuren umfasst ist, die die Sekretion des Proteins aus der Zelle steuern. DNA, die für geeignete Signalsequenzen codiert, kann von Genen für die sekretierten Hefeproteine, wie etwa das Gen für Invertase aus Hefe (E.P.O. Veröffentlichungs Nr. 12,873) und dem Gen für den α -Faktor (U.S. Patent Nr. 4,588,684) abgeleitet werden. Alternativ dazu können Leader eines Nicht-Hefe-Ursprungs, wie etwa ein Interferon-Leader, auch für die Sekretion in Hefe sorgen (E.P.O. Veröffentlichungs Nr. 60057). Eine bevorzugte Klasse von sogenannten Leadern für die Sekretion sind diejenigen, die ein Fragment des Gens für den α -Faktor aus der Hefe einsetzen, die Beides, nämlich eine "Prä"-Signalsequenz und einen "Pro"-Bereich enthalten. Die Arten von α -Faktor-Fragmenten, die verwendet werden können, beinhalten den Leader für den Gesamtlängen-Prä-Pro- α -Faktor, wie auch die gestutzten Leader für den α -Faktor (U.S. Patent Nrn. 4,546,083 und 4,870,008; E.P.O. Veröffentlichungs Nr. 324274). Zusätzliche "Leader" setzen ein Leader-Fragment des α -Faktors ein, das die Sekretion bereitstellt, und sie beinhalten einen Leader mit einem hybriden α -Faktor, der mit einer Prä-Sequenz einer ersten Hefe hergestellt ist,



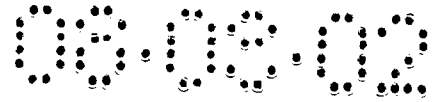
jedoch eine Pro-Region bzw. einen Pro-Bereich von einem zweiten α -Faktor aus Hefe. (Vergleiche beispielsweise P.C.T. WO 89/024863).

Expressionsvektoren, entweder extrachromosomale Replikons oder integrierende Vektoren wurden für die Transformation in viele Hefen entwickelt. Beispielsweise wurden Expressionsvektoren entwickelt für Candida albicans (Kurtz et al. (1986), Mol. Cell. Biol. 6:142), Candida maltosa (Kunze et al. (1985) J. Basic Microbiol. 25:141), Hansenula polymorpha (Gleeson et al. (1986), J. Gen. Microbiol. 132:3459), Kluyveromyces fragilis (Das et al. (1984), J. Bacteriol. 158:1165), Kluyveromyces lactis (De Louvencourt et al. (1983), J. Bacteriol. 154:737), Pichia guillermondii, (Kunze et al. (1985), supra), Pichia pastoris (Cregg et al. (1985), Mol. Cell. Biol. 5:3376; U.S. Patent Nrn. 4,837,148 und 4,929,555)), Schizosaccharomyces pombe (Beach and Nurse (1981), Nature 300:706) und Yarrowia lipolytica (Davidow et al. (1985), Curr. Genet. 10:39).

Säugetier-Zelllinien, die als Wirte für die Expression verfügbar sind, sind im Stand der Technik bekannt und beinhalten viele immortalisierte Zelllinien, die bei der American Type Culture Collection (ATCC) verfügbar sind und umfassen beispielsweise die HeLa-Zellen, Eierstock-Zellen des chinesischen Hamsters (CHO-Zellen), Babyhamster(BKH)-Zellen, COS-Affen-Zellen und eine Vielzahl von anderen Zelllinien. Geeignete Promotoren für Säugetiere sind auch im Stand der Technik bekannt und beinhalten virale Promotoren, wie etwa denjenigen des Simian Virus 40 (SV40), Rous sarcoma virus (RSV), Adenovirus (ADV) und Rinder-Papilloma-Virus (BPV). (Vergleiche beispielsweise Sambrook (1989) für Beispiele von geeigneten Promotoren). Zellen aus Säugetieren können auch Terminator-Sequenzen und Poly-A-Additions-Sequenzen erfordern; Enhancer-Sequenzen, die die Expression verstärken, können auch beinhaltet sein, sowie Sequenzen, welche die Amplifikation des Gens verursachen. Diese Sequenzen sind dem Fachmann bekannt.

Vektoren, die für die Replikation in Säugetier-Zellen geeignet sind, sind im Stand der Technik bekannt und sie beinhalten virale Replikon oder Sequenzen, die sicherstellen, dass die Integration geeigneter Sequenzen, die für die gewünschten Polypeptide codieren, in das Wirtsgenom stattfindet.

Ein Vektor, der verwendet wird um fremde DNA zu exprimieren, und der bei der Herstellung eines Vaccins verwendet werden kann, ist Vaccinia Virus. In diesem Falle wird die heterologe DNA in das Vaccinia-Genom eingefügt. Techniken zur Insertion der fremden DNA in das Vaccinia-Virus-Genom sind dem Fachmann bekannt und man verwendet dafür beispielsweise homologe Rekombination. Die Insertion der heterologen DNA erfolgt im Allgemeinen in ein Gen, das von der Natur her nicht essentiell bzw. wesentlich ist, beispielsweise das Thymidinkinasegen (tk), das auch einen selektierbaren Marker damit zur Verfügung stellt. Plasmidvektoren, die in starkem Umfang die Konstruktion von rekombinanten Viren erleichtert haben, wurden beschrieben (vergleiche beispielsweise Mackett et al. (1984) in "DNA Cloning", Bd. II. IRL Press, S. 191; Chakrabarti et al. (1985), Mol. Cell Biol. 5:3403; Moss (1987) in

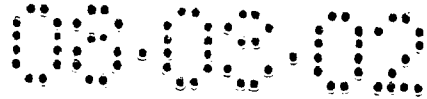


"Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (Miller und Calos, Hrsg., S. 10). Die Expression der gewünschten Polypeptide, die von immunreaktiven Bereichen umfasst sind, erfolgt dann in den Zellen oder Individuen, die mit dem lebenden rekombinanten Vacciniu-Virus infiziert und/oder immunisiert worden sind.

5 Andere Systeme für die Expression von Polypeptiden beinhalten Insektzellen und Vektoren, die für die Verwendung in diesen Zellen geeignet sind. Derartige Systeme sind dem Fachpublikum bekannt und beinhalten beispielsweise Insekten-Expressionsübertragungsvektoren, die abgeleitet sind von dem Baculovirus Autographa californica nuclear polyhedrosis-Virus (AcNPV), bei dem es sich um einen helferunabhängigen viralen Expressionsvektor
10 handelt. Expressionsvektoren, die von diesem System abgeleitet sind, verwenden üblicherweise den starken viralen Polyhedron-Genpromotor um die Expression der heterologen Gene zu steuern. Der gegenwärtig am allgemeinsten verwendete Transfervektor für das Einfügen von fremden Genen in AcNPV ist pAc373. Viele andere Vektoren, die den Fachleuten bekannt sind, wurden auch entworfen um die Expression zu verbessern. Diese beinhalten beispielsweise
15 pVL985 (der das Polyhedron-Startcodon von ATG in ATT ändert und der eine BamHI-Clonierungsstelle 32 Basenpaare stromabwärts von dem ATT einfügt; vergleiche Luckow und Summers (1989), *Virology* 17:31. Gute Expression von nicht-fusionierten fremden Proteinen erfordert normalerweise fremde Gene, die im Idealfall eine kurze Leader-Sequenz aufweisen, die geeignete Translations-Initiations-Signale, einem ATG-Startsignal vorausgehend, enthält.
20 Die Plasmide enthalten auch das Polyhedron-Polyadenylierungssignal und das Gen für Ampicillin-Resistenz (amp) sowie einen Replikationsursprung bzw. -origin zur Selektionierung und Weiterverbreitung in E. coli.

Verfahren für das Einführen von heterologer DNA an der gewünschten Stelle an dem Baculovirus sind der Fachwelt bekannt. (Vergleiche Summers und Smith, Texas Agricultural
25 Experiment Station Bulletin Nr. 1555; Ju et al. (1987), in "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (Miller und Calos, Hrsg.); Smith et al. (1983), *Mol. & Cell. Biol.* 3:2156; sowie Luckow und Summers (1989), siehe vorstehend). Beispielsweise kann die Insertion in ein Gen, wie etwa das Polyhedron-Gen, mittels homologer Rekombination erfolgen; die Insertion kann auch in eine Stelle für das Restriktionsenzym erfolgen, wie es in dem gewünschten Baculovirus-
30 Gen vorliegt. Bei den insertierten Sequenzen kann es sich um jene handeln, die für Alles oder variierende Segmente der HCV-Polypeptide codieren, einschließlich wenigstens eines Epitops von einer variablen Domäne.

Die Signale für die posttranslationalen Modifikationen, wie etwa die Spaltung des Signalpeptids, proteolytische Spaltung und Phosphorylierung scheinen von Insektzellen erkannt
35 zu werden. Die Signale, die zur Sekretion und Kernakkumulation erforderlich sind, scheinen zwischen den Invertebrat- und den Vertebrat-Zellen konserviert worden zu sein. Beispiele für die Signalsequenzen von Vertebratzellen, welche in Invertebrat-Zellen effektiv sind, sind der Fachwelt bekannt, beispielsweise kann es sich dabei um das humane Interleukin-2-Signal (IL2)

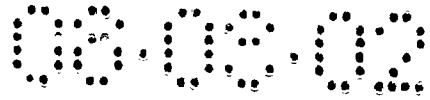


handeln, bei dem es sich um ein Signal zum Transport nach Draußen handelt, wenn die Zelle wiedererkannt wird und in geeigneter Weise in den Insektenzellen entfernt wird.

Es ist oft wünschenswert, dass die unter Verwendung der vorstehend genannten Wirtszellen und Vektoren hergestellten Polypeptide Fusions-Polypeptide sind. Wie bei Nicht-
5 Fusions-Polypeptiden können Fusions-Polypeptide auch nach der Expression intracellulär verbleiben. Alternativ dazu können Fusionsproteine auch aus der Zelle in das Wachstumsmedium sekretiert werden, wenn sie von einem Leader-Sequenzfragment umfasst werden. Vorzugsweise gibt es zwischen dem Leader-Fragment und dem Rest der fremden Gene Prozessierungsstellen, die entweder in vivo oder in vitro gespalten werden.

10 In den Fällen, bei denen die Zusammensetzung für die Behandlung von HCV verwendet werden wird, ist es wünschenswert, dass die Zusammensetzung immunogen ist. In solchen Fällen, in denen das synthetisierte Polypeptid korrekt konfiguriert ist, so dass es das korrekte Epitop bereitstellt, jedoch zu klein dafür ist, dass es immunogen ist, kann das Polypeptid an ein geeignetes Trägermittel angehängt werden. Eine Vielzahl von Techniken zum Erhalten einer
15 derartigen Verknüpfung sind im Stand der Technik bekannt, wobei auch die Bildung von Disulfid-Brücken unter Verwendung von N-Succinimidyl-3-(2-pyridylthio)propionat (SPDP) und Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexan-1-carboxylat (SMCC) (wenn das Peptid keine Sulfhydryl-Gruppe aufweist, so kann dies durch die Addition eines Cysteinrestes bereitgestellt werden) eingeschlossen ist. Diese Reagentien bilden eine Disulfid-Brücke zwischen ihnen
20 selbst und Peptid-cysteinresten an einem Protein sowie eine Amid-Verknüpfung zwischen dem ϵ -Amino-Rest an einem Lysin oder einer anderen freien Aminogruppe bei anderen Aminosäuren. Eine Vielzahl derartiger Disulfid/Amid-bildenden Agentien ist bekannt. Vergleiche beispielsweise Immun. Rev. (1982) 62:185. Andere bifunktionelle Kopplungsagentien für einen Thioether eher als eine Disulfid-Verknüpfung. Viele dieser Thio-Ether-bildenden Agentien sind
25 kommerziell erhältlich und beinhalten reaktive Ester von 6-Maleimidocapronsäure, 2-Bromessigsäure, 2-Iodessigsäure, 4-(N-Maleimidomethyl)cyclohexan-1-carbonsäure und Ähnliche. Die Carboxylgruppen können dadurch aktiviert sein, dass sie mit Succinimid oder 1-Hydroxyl-2-nitro-4-sulfonsäure in der Form des Natriumsalzes kombiniert werden. Zusätzliche Verfahren, Antigene zu koppeln, verwenden das Rotavirus/Bindungspeptid-System, wie es in
30 EP-B-259,149 beschrieben ist. Die vorstehende Liste ist nicht so gemeint, dass sie erschöpft ist, und Modifikationen der benannten Verbindungen können natürlicherweise verwendet werden.

Es kann ein beliebiges Trägermittel verwendet werden, das nicht selbst die Produktion von Antikörpern induziert, die schädigend für den Wirt wirken. Geeignete Trägermittel sind
35 typischerweise große, langsam metabolisierte Makromoleküle, wie etwa Proteine; Polysaccharide, wie etwa Latex, funktionalisierte Sepharose, Agarose, Cellulose, Cellulose-Kügelchen und Ähnliche sowie auch polymere Aminosäuren, wie etwa Polyglutaminsäure, Polylysin und Ähnliches; Aminosäure-Copolymere und inaktivierte Virusteilchen (siehe nachfolgend). Besonders



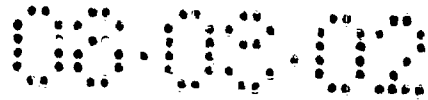
nützliche Proteinsubstrate sind Serumalbumine, "keyhole limpet"-Hämocyanin, Immunoglobulin-Moleküle, Tetanus-Toxin und andere Proteine, die den Fachleuten gut bekannt sind.

Die Immunogenität der Epitope der variablen Domänen von HCV, insbesondere von E1 und E2/NS1, können auch verstärkt werden, indem man sie in Eukaryonten-Systemen herstellt, die mit teilchenbildenden Proteinen, wie etwa beispielsweise denjenigen, die mit dem Oberflächenantigen von Hepatitis B assoziiert sind. Vergleiche beispielsweise US-A 4,722,840. Konstrukte, wobei das Polypeptid, das das HCV-Epitop einer variablen Domäne enthält, direkt mit den codierenden Sequenzen für das teilchenbildende Protein verknüpft ist, produziert Hybride, die in Bezug auf das HCV-Epitop immunogen sind. Zusätzlich beinhalten alle diese Vektoren, die hergestellt wurden, Epitope, die spezifisch für HBV sind, wobei sie verschiedene Grade an Immunogenität aufweisen, wie etwa beispielsweise das Prä-S-Peptid. Daher sind Teilchen, die aus einem teilchenbildenden Protein, das HCV-Sequenzen einschließt, konstruiert sind, immunogen in Bezug auf HCV und HBV.

Vom Hepatitis-Oberflächen-Antigen (HBSAg) wurde gezeigt, dass es zu Teilchen in *S. cerevisiae* (Valenzuela et al. (1982), Nature 298:344) gebildet und zu Teilchen zusammengesetzt wird, wie auch in beispielsweise Säugetier-Zellen (Valenzuela et al. (1984), in "Hepatitis B", Millman I. et al., Hrsg.). Von der Bildung derartiger Teilchen wurde gezeigt, dass sie die Immunogenität von Monomer-Untereinheiten verstärken. Die Konstrukte können auch das immundominante Epitop von HBSAg beinhalten, das die 55 Aminosäuren des Bereichs der Prä-Oberfläche (pre-S) umfasst. Neurath et al. (1984). Konstrukte von Prä-S-HBSAg-Teilchen, die in Hefe exprimierbar sind, sind in EP-B 174,444 offenbart; Hybride, die heterologe virale Sequenzen für die Expression in Hefe beinhalten, sind in EP-B 175,261 offenbart. Diese Konstrukte können auch in Säugetier-Zellen, wie etwa CHO-Zellen exprimiert werden, wobei man einen SV40-Dihydrofolat-Reduktasevektor (Michelle et al. (1984)) verwendet.

Zusätzlich können Teile der das Protein, das Teilchen bildet, codierenden Sequenz durch Codons ersetzt werden, die ein Epitop für eine HCV-variable Domäne codieren. Bei diesem Austausch können Bereiche, die nicht benötigt werden um die Aggregation von Einheiten zu vermitteln um immunogene Teilchen in Hefe oder Säugetieren zu aggregieren, ausgelassen werden, wodurch verhindert wird, dass zusätzliche HBV-antigene Bindungsstellen mit dem (den) HCV-Epitop(en) in Wettbewerb treten.

Die Präparation der Vaccine, die ein immunogenes Polypeptid bzw. Polypeptide als einen aktiven Bestandteil bzw. Bestandteile enthalten, sind dem Fachpublikum bekannt. Typischerweise werden derartige Vaccine bzw. Impfstoffe in injizierbarer Form hergestellt, entweder als flüssige Lösung oder als Suspensionen; man kann aber auch feste Formen, die für die Lösung oder die Suspension in Flüssigkeit vor der Injektion geeignet sind, auch herstellen. Die Präparation bzw. das Präparat kann emulgiert werden oder die Polypeptide können in Liposomen eingekapselt werden. Die aktiven immunogenen Bestandteile werden oft mit Excipienten vermischt, die pharmazeutisch akzeptabel sind und mit dem aktiven Bestandteil kompatibel



sind. Geeignete Excipienzien sind beispielsweise Wasser, Salzlösung, Dextrose, Glycerin, Ethanol oder Ähnliche und Kombinationen derselben. Zusätzlich kann, falls gewünscht, das Vaccin bzw. der Impfstoff kleinere Mengen an Hilfssubstanzen, wie etwa benetzende oder emulgierende Agentien, Agentien zur Pufferung des pH und/oder Adjuvantien, die die Wirksamkeit des Vaccins verstärken, enthalten. Beispiele für Adjuvantien können die nachfolgenden effektiven beinhalten, sind jedoch nicht darauf beschränkt: Aluminiumhydroxid, N-Acetyl-muramyl-L-threonyl-D-isoglutamin (thr-MDP), N-Acetyl-nor-muramyl-L-alanyl-D-isoglutamin (CGP 11637), allgemein als nor-MDP bezeichnet), N-Acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-L-alanin-2-(1'-2'-dipalmitoyl-sn-glycero-3-hydroxyphosphoryloxy)-ethylamin (CGP 19835A, allgemein als MTP-PE bezeichnet) sowie RIBI, das drei Bestandteile enthält, die von Bakterien extrahiert sind, Monophosphoryllipid A, Trehalosedimycolat und Zellwand-Gerüst (MPL+TDM+CWS) in 2% Squalen/Tween 80-Emulsion. Die Effektivität eines Adjuvans kann bestimmt werden, indem man die Menge an Antikörpern misst, die gegen ein immunogenes Polypeptid gerichtet sind, das ein HCV-Epitop mit einer variablen Domäne beinhaltet, wobei die Antikörper, die aus der Verabreichung dieses Polypeptids in Vaccinen resultieren, die auch verschiedene Adjuvantien umfassen.

Die Proteine können in neutraler Form oder als Salze zu Impfstoff formuliert werden. Pharmazeutisch akzeptierbare Salze beinhalten die durch Addition einer Säure erzielten Salze (gebildet mit den freien Aminogruppen des Peptids) und solche, die mit anorganischen Säuren gebildet werden, wie beispielsweise Salzsäure oder Phosphorsäure, oder mit organischen Säuren, wie etwa Essigsäure, Oxalsäure, Weinsäure, Maleinsäure und Ähnliche. Die Salze, die mit freien Carboxylgruppen gebildet werden, können auch von anorganischen Basen, wie etwa Natrium-, Kalium-, Ammonium-, Calcium- oder Eisen(III)-hydroxiden und solchen organischen Basen, wie Isopropylamin, Trimethylamin, 2-Ethylamino-ethanol, Histidin, Procain und Ähnlichen abgeleitet werden.

Die Vaccine werden üblicherweise parenteral, durch Injektion, wie beispielsweise subkutan oder intramuskulär, verabreicht. Weitere Formulierungen, die für andere Arten der Verabreichung geeignet sind, beinhalten Suppositorien und in einigen Fällen orale Formulierungen. Für Suppositorien können traditionelle Bindemittel und Trägermittel, wie beispielsweise Polyalkylen-glykole oder Triglyceride, mit eingeschlossen sein; derartige Suppositorien können aus Mischungen gebildet werden, die den aktiven Bestandteil im Bereich von 0,5% bis 10%, bevorzugt 1% bis 2%, enthalten. Orale Formulierungen beinhalten normalerweise verwendete Excipienzien, wie beispielsweise Mannitol, Lactose, Stärke, Magnesium-Stearat, Natrium-Saccharin, Cellulose, Magnesiumcarbonat und Ähnliche in pharmazeutischer Qualität. Diese Zusammensetzungen nehmen die Form von Lösungen, Suspensionen, Tabletten, Pillen, Kapseln, Formulierungen zur langen kontinuierlichen Abgabe oder Pulver an und enthalten 10% bis 95% des aktiven Bestandteils, vorzugsweise 25% bis 70%.



Zusätzlich zu dem vorstehend Erwähnten ist es auch möglich, Lebend-Vaccine mit abgeschwächten Mikroorganismen herzustellen, welche für rekombinante Polypeptide des HCV-Antigensatzes exprimieren. Geeignete abgeschwächte Mikroorganismen sind in der Fachwelt bekannt und beinhalten beispielsweise Viren (z.B. Vaccinia-Virus), wie auch Bakterien.

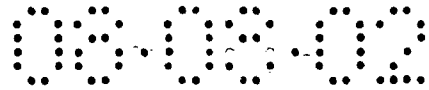
5 Die Vaccine werden in einer Weise verabreicht, die mit der Dosisformulierung kompatibel ist, und in einer derartigen Menge, die prophylaktisch und/oder therapeutisch wirksam sein wird. Die zu verabreichende Menge bzw. Quantität liegt generell im Bereich von 5 μg bis 250 μg des Antigens je Dosis, hängt jedoch auch vom zu behandelnden Subjekt ab, der Kapazität des Immunsystems des Subjekts um Antikörper zu synthetisieren und dem Grad an gewünschtem Schutz. Genaue Mengen des aktiven Bestandteils, die erforderlicherweise zu verabreichen
10 sind, können von dem Urteil des Arztes abhängen und insbesondere können sie auf jedes Individuum einzeln abgestimmt sein.

Das Vaccin kann gemäß einem Schema für eine Einzeldosis gegeben werden oder vorzugsweise gemäß einem Schema für multiple Dosis. Ein Schema mit multipler Dosis ist eines,
15 bei dem der erste Lauf des Impfens mit 1 bis 10 getrennten Dosen erfolgt, gefolgt von anderen Dosen, die in nachfolgenden Zeitintervallen gegeben werden, die erforderlich sind um die Immunantwort aufrechtzuerhalten und/oder die Immunantwort nochmals zu verstärken, beispielsweise mit 1 bis 4 Monaten für eine zweite Dosis, und, falls gewünscht oder erforderlich, eine nachfolgende Dosis bzw. Dosen nach mehreren Monaten. Das Dosierungsschema wird auch,
20 zumindest teilweise, durch den Bedarf des Individuums festgelegt sein und kann auch von der Beurteilung des Arztes abhängen.

Zusätzlich kann das Vaccin bzw. der Impfstoff, der bzw. das den Antigensatz enthält, der die vorstehend beschriebenen HCV-Polypeptide umfasst, in Verbindung mit anderen immunoregulatorischen Agentien, beispielsweise Immunglobulinen, verabreicht werden.

25 Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen können dem Einzelnen bzw. dem Individuum verabreicht werden um polyclonale Antikörper (gereinigt oder isoliert von Serum unter Verwendung der üblichen Techniken) zu erzeugen, welche dann bei einer Vielzahl von Anwendungen verwendet werden können. Beispielsweise können die polyclonalen Antikörper verwendet werden um ein Individuum passiv zu immunisieren oder als immunchemische Reagentien
30 eingesetzt werden.

Bei einer anderen Ausführungsform der Erfindung werden die vorstehend erwähnten immunreaktiven Zusammensetzungen, die eine Vielzahl von HCV-Antigensätzen umfassen, dazu verwendet, Anti-HCV-Antikörper innerhalb biologischer Proben, Blut- oder Serumproben beispielsweise eingeschlossen, nachzuweisen. Die Ausführung der Immunoassays bzw. der
35 Immunanalyse ist in großem Umfang der Variation unterworfen, eine Vielzahl an Verschiedenartigkeit ist im Stand der Technik bekannt. Jedoch werden die Immunoassay bzw. Immunanalysen Antigensätze verwenden, wobei jeder Antigensatz aus einer Vielzahl von im Wesentlichen identischen Polypeptiden besteht, die die Aminosäuresequenz eines Epitops innerhalb einer



ersten variablen Domäne eines HCV-Isolats verwenden, und die Aminosäuresequenz des einen Satzes in Bezug auf die Aminosäuresequenz von wenigstens einem anderen Satz heterogen ist. Protokolle für den Immunassay können beispielsweise auf Konkurrenz beruhen oder einer direkten Reaktion oder eines Assays vom Sandwich-Typ beruhen. Die Protokolle können auch
5 beispielsweise feste Träger verwenden oder auch mittels Immunpräzipitation vor sich gehen. Die meisten Assays bzw. Analysen beinhalten die Verwendung eines markierten Antikörpers oder Polypeptids; bei den Markern kann es sich beispielsweise um fluoreszierende, chemilumineszierende, radioaktive oder Farbstoff-Moleküle handeln. Assays, die das Signal der Probe verstärken bzw. amplifizieren, sind jedenfalls bekannt; Beispiele derartiger Tests bzw. Analysen
10 oder Assays sind solche Assays, die Biotin und Avidin verwenden, und Enzym-markierte und -vermittelte Immunoassays, wie etwa ELISA-Assays.

Kits, die für die Immundiagnose geeignet sind und die die entsprechend markierten Reagentien enthalten, werden durch Verpackung der geeigneten Materialien, die auch die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen, die HCV-Epitope von variablen Domänen enthalten, umfassen,
15 in geeigneten Behältern, gemeinsam mit den verbliebenden Reagentien und Materialien (beispielsweise geeigneten Puffern, Salzlösungen usw.), die zur Durchführung des Assays erforderlich sind, wie auch ein geeigneter Satz an Gebrauchsanweisungen hergestellt.

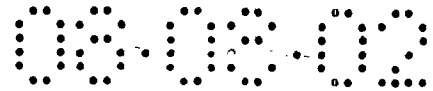
Nachfolgend werden erfindungsgemäße Beispiele beschrieben, die lediglich illustrativen Zwecken dienen, und nicht so gemeint sind, dass sie den Umfang der vorliegenden Erfindung beschränken sollen. Im Lichte der vorliegenden Offenbarung liegen zahlreiche Ausführungsformen innerhalb des Schutzzumfangs der Ansprüche und werden dem Fachpublikum schnell klar werden.
20

Beispiele

In den Beispielen werden die nachfolgend angegebenen Materialien und Methoden verwendet.
25

Patienten-Proben und RNA-Extraktion

Asymptomatische HCV-Träger HCT 18 und HCV J1 und chronisch infizierte HCV-Patienten-Th wurden zuvor in Weiner et al. (1991) Virology 180:842-848 beschrieben. Bei Patient Q wurde ein chronisch aktiver Hepatitis-Fall aufgrund einer Leber-Biopsie diagnostiziert und er wurde über sechs Monate auf eine alfa-2b-Interferontherapie (3 Millionen Einheiten, dreimal
30 die Woche) gesetzt. RNA aus 0,2 ml Plasma wurde gemäß den Methoden von Chomczynski und Sacchi, (1987) Anal. Biochem. 162:156-159 extrahiert, wobei RNAzolTM-B-Reagens (Cinna/Biotech Laboratories), das 10 µg/ml MS2-Carrier RNA (Boehringer Mannheim, 165-948) enthielt, wie von dem Hersteller vorgeschlagen verwendet wurde. Die RNA wurde in 200 µl
35 Diethyl-pyrocyanat resuspendiert, mit destilliertem Wasser behandelt und erneut in einer Endkonzentration von 0,2M Natriumacetat und zwei und einem Halben Volumen an 100% Ethanol (-20°C) präzipitiert.



cDNA und Polymerase-Kettenreaktionen

Alle Reaktionen wurden gemäß Weiner et al. (1990) Lancet 335:1-5 durchgeführt. M13-Sequenzierung wurde gemäß Messing et al. (1983), Methods in Enzymology 101:20-37 durchgeführt. Die Consensus-Sequenz von wenigstens vier clonierten Inserts bzw. eingeschobenen DNA-Sequenzen sind dargestellt, mit der Ausnahme, dass die HCV J1.2 E2/NS1-Sequenz von zwei Clonen stammte.

Clonieren und Sequenzierung von HCT 18 und Th wurde von Weiner et al. (1991), siehe oben, beschrieben. Nested-PCR-Primer, die dazu verwendet wurden, das Amino-End- und Carboxy-End-Segment von E2/NS1 in Patient Q zu clonieren waren:

10 PCR I

X(E2)14 GGTGCTCACTGGGGAGTCCT (1367-1386)S

X(E2)18J CATTGCAGTTCAGGGCCGTGCTA (1608-1588)A,

PCR II

X(E2)4 TCCATGGTGGGGAAGTGGGC (1406-1425)S

15

X(E2)19J TGCCAAGTCCATTGGTGT (1582-1562)A;

PCR I

X(E2)14 (oben)S

J1rc12 TAACGGGCTGAGCCTCGGA (2313-2296)A

PCR II

20

US(E2)5 CAATTGGTTCGGTTGTACC (1960-1978)S

J1rc13 CGTCCAGTTGCAGGCAGCTTC (2260-2240)A.

Die PCR-Primer, die verwendet wurden um das HCV J1 E2/NS1-Gen zu clonieren, waren:

PCR I

25

J1(E2)14 (oben)S

J1(E2)rc30** CAGGGCAGTATCTGCCACTC (2349-2330)A

J1IZ-2* TGAGACGGACGTGCTGCTCCT (1960-1978)S

J1(E2)rc32** TTTGATGTACCAGGCGGCGCA (2658-2636)A

PCRII-E2384.5*

30

GGATCCGCTAGCCATACCCGCGTGACGGGGGGGGTGCAA (1469-1495)S

DSCON1JBX*

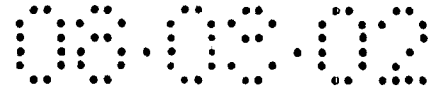
GGATCCTCTAGATTACTCTTCTGACCTATCCCTGTCCTCCAAGTCACA (2272-2301)A

35

J1IZ-1* CAACTGGTTCGGCTGTACA (1915-1935)S

J1(E2)rc31** (2566-2546)A.

*, nt-Sequenz von Takeuchi et al., (1990) Nucl. Acids Res. 18:4626; **, nt-Sequenz von Kato et al., (1989) Proc. Jpn. Acad. 65B:219-223. Sense (S) oder Antisense (A)-PCR-Primer



sind in der Richtung 5' zu 3' entsprechend den Nucleotidzahlen, auf die Bezug genommen wird, dargestellt.

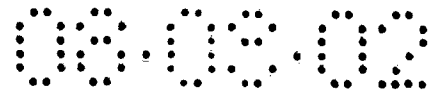
Synthese der biotinylierten Peptide

Die überlappenden Octapeptide für die hypervariablen Regionen von drei Stämmen von
5 HCV wurden mittels eines spaltbaren-Linkers synthetisiert, derivatisiert, Polyethylen-Pins, wie
im Wesentlichen beschrieben von (Maeji et al., (1990) J. Immunol. Methods 134:23-33, wurden
an das N-Endstück eines jeden Peptids gekoppelt. Am Schluss wurde Biotin an das N-terminale
Ende unter Verwendung von 150 μ l einer Dimethylformamid-Lösung, die 40 mM Biotin, 40
mM 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt), 40 mM Benzotriazol-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phospho-
10 niumhexafluorophosphat (PyBOP, NOVABIOCHEM) und 60 mM N-Methylmorpholin (NMM)
enthielt, gekoppelt und über Nacht bei 20°C reagieren gelassen.

Nach der Biotinylierung wurden die Peptide an der Seitenkette entschützt, gewaschen
und das Peptid wurde in 200 μ l eines 0,1M Phosphatpuffers (pH 7,2) von jedem Pin gespalten.
Mikrotiterplatten, die das gespaltene Peptid in Lösung enthielten, wurden bis zum Gebrauch bei
15 -20°C gelagert.

ELISA-Testing der biotinylierten Peptide

Polystyrol-Platten (Nunc immuno-Platte maxisorb F96) wurden mit Streptavidin be-
schichtet, indem man über Nacht bei 4°C mit 0,1 ml/Vertiefung einer 5 μ g/ml-Lösung von
Streptavidin (Sigma Cat. Nr. S4762) in 0,1 M Carbonatpuffer bei pH 9,6 inkubierte. Nach dem
20 Entfernen der Streptavidin-Lösung wurden die Vertiefungen der Mikrotiterplatten viermal mit
0,1% Tween-20-Lösung in PBS gewaschen. Nicht-spezifische Bindung wurde durch Inkubation
jedes Lochs mit 0,2 ml einer 2% BSA in PBS über 1 h bei 20°C blockiert. Die Vertiefungen
wurden viermal mit PBS/Tween 20 gewaschen. Die Platten wurden luftgetrocknet und bei 4°C
bis zum Bedarf gelagert. Das Streptavidin in jeder Vertiefung wurde an die gespaltenen Peptide
25 durch Inkubation mit 100 μ l einer 1:100-Verdünnung mit 0,1% BSA in PBS, das 0,1% Natri-
um-azid enthielt, für 1 h bei 20°C gekoppelt. Nach Inkubation wurde die Platte viermal mit
PBS/Tween 20 gewaschen. Jede Vertiefung wurde mit 100 μ l einer geeigneten Verdünnung von
Serum (verdünnt mit 2% BSA in PBS, enthaltend 0,1% Natriumazid) für 1 h bei 20°C oder über
Nacht bei 4°C inkubiert, gefolgt von viermaligem Waschen mit PBS/Tween 20. Gebundener
30 Antikörper wurde durch 1-stündige Reaktion bei 20°C in 0,1 ml Konjugat nachgewiesen. Dieser
bestand aus 0,25 ml/l (ein Sättigungsniveau) Meerrettich-Peroxidase-markiertem Ziege-anti-
Kaninchen-IgG (H+L) (Kirkegaard und Perry, Labs, Gaithersburg, MD) in CASS (0,1% Schaf-
serum, 0,1% Tween 20, 0,1% Natrium-caseinat, verdünnt in 0,1M PBS, pH 7,2). Die Vertiefun-
gen wurden zweimal mit PBS/Tween 20 gewaschen, woran sich zwei Waschschrte mit PBS
35 alleine anschlossen. Die Gegenwart von Enzym wurde durch eine Reaktion über eine Zeitdauer
von 45 min bei 20°C mit 0,1 ml einer frisch-hergestellten Lösung aus 50 ml an Ammonium-
2,2'-azino-bis[3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonat (ABTS, Boehringer Mannheim Cat. Nr.
122661) und 0,03 ml 35% (Gew./Gew.) Wasserstoffperoxidlösung in 100 ml eines 0,1 M Phos-



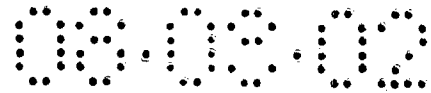
phat/0,08 M Citratpuffer, pH 4,0, nachgewiesen. Die Farbentwicklung wurde in einer Plattenlesevorrichtung [Titertek Multiscan MC] im zwei Wellenlängen-Modus bei 405 nm gegen eine Bezugswellenlänge von 492 nm gemessen.

Computererzeugtes Antigenitätsprofil

5 Antigenitätsprofile für HCV E2/NS1-Protein und HIV-1 gp120 hypervariable Region V3 (aa 303-338) wurden mittels eines Computerprogramms, das auf dem Grad der Sequenzvariabilität, wie es ursprünglich von Kabat [Sequences of proteins of immunological interest. U.S. Department von Health and Human Services Public Health Service, National Institutes of Health (1983)] für die Identifizierung von hypervariablen Schleifen der Immunglobuline, multipliziert mit dem Durchschnitt der individuellen Wahrscheinlichkeit, dass die Bindung eines Antikörpers für jede mögliche paarweise Aminosäure beibehalten wird, vorgeschlagen wurde, abgeleitet. Die Wahrscheinlichkeiten für die Beibehaltung der Antikörper-Bindung, wie sie mit einem gegebenen Aminosäureaustausch assoziiert ist, bildeten die Werte, die experimentell dadurch bestimmt wurden, dass der Effekt auf die Antikörper-Bindung aller möglicher Aminosäureaustausche für 130 charakterisierte lineare Epitope bestimmt wurde. Geysen et al., (1988) J. Mol. Rec. 1:32-41. Dieser Algorithmus gewichtet die Variabilität des Indexes um Aminosäureaustausche, die wahrscheinlich einen signifikanten Effekt auf die Bindung des Antikörpers haben, d.h. kompensierte Werte für konservative Aminosäureaustausche, größere Signifikanz zu geben. Fünfzehn HCV-Sequenzen [HCV-1, Q3.2, HCT 23, EC10, HC-J1, HCVE1, TH, HCT 20 27, Q1.2, HCT18, HC-J4, HCV J1.2/HCV J1.1, HCV J, HCV BK] wurden verwendet um das Antigenitätsprofil für HCV zu bestimmen. Das HIV-1 V3-Profil wurde erhalten, indem man 242 individuelle Profile von 15 Sequenzen, die statistisch zufällig aus der numerisch größeren Datenbasis von einzigen HIV-1-Sequenzen ausgewählt wurden, mittelte [LaRosa et al., (1990) Science 249:932-935 & die Korrektur in Science (1991), S. 811]. Die Aminosäuresequenz von 25 einigen dieser Isolate zwischen Aminosäure 384 und 420 sind in Fig. 3 gezeigt.

Computererzeugte Sekundärstruktur-Voraussagen

Die α -Helix-, β -Faltblatt- und β -Wende-Sekundärstruktur-Wahrscheinlichkeiten für den Amino-terminalen Bereich (384-420) wurden unter Verwendung eines Algorithmus bestimmt, der die Wahrscheinlichkeiten für jedes der drei vorstehend erwähnten Sekundärstruktur-Motive 30 für jeden Rest bestimmte. Die Koeffizienten, die in dem Algorithmus verwendet wurden, wurden für alle paarweisen Kombinationen von Resten der Strukturdatenbasis erhalten. Levitt and Greer, (1977), J. Mol. Biol. 114:181-293. Die Vorhersageparameter, die aus diesen Koeffizienten erhalten wurden, wurden an die beobachteten Resultate angepasst, wenn der Algorithmus rückwärts gehend auf die Datenbasis angewandt wurde um die Wahrscheinlichkeiten zu erhalten, dass ein gegebener Rest in einem der drei definierten Struktur motive gefunden würde. 35

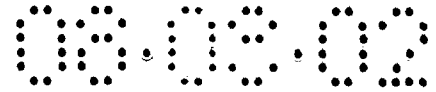


Beispiel 1

Vergleich der Sekundärstruktur und der Variation der Aminosäuresequenz in den HCV E2/NS1 HV- und HIV-1 gp120-Domänen

Die Aminosäuresequenzen von fünfzehn HCV- und HIV-1-Isolaten wurden in Bezug
5 auf die Anzahl der Positionen, an denen Heterogenitäten in der Aminosäuresequenz in den
HCV E2 HV- oder HIV-1 gp120 V3-Domänen beobachtet wurden (vergleiche Fig. 4 A bzw. B),
verglichen. Aminosäure-Heterogenitäten traten in 25 von 30 Aminosäurepositionen in der E2
HV-Region in 23 von 35 Aminosäurepositionen in der HIV-1 gp120 V3-Domäne auf. Das ge-
strichelt Gezeichnete auf den x-Achsen von Fig. 4A und 4B repräsentiert die Aminosäurepositi-
10 onen, wo Variation in den Aminosäureresten auftreten und die invarianten Aminosäuren sind in
dem Ein-Buchstaben-Code für die Aminosäure gegeben. Die Profile für die Antigenität, die in
Fig. 4 gezeigt sind, deuten an, dass ähnlich zu der V3-Schleife des HIV-1 gp120-Proteins (Fig.
4B) ein Block von Aminosäureresten in HCV E2 (Aminosäure 384-414 in Fig. 4A) identifiziert
wurde, dessen Variation dem vorausgesagten umgekehrten Einfluss auf die Antikörper-Bindung
15 hat. Die Daten in Fig. 4 deuten an, dass die HCV E2-Domäne der HIV-1 gp120 V3-Domäne
ähnelt, von der man weiß, dass sie für den Virus neutralisierende Epitope sowohl in Hinsicht
auf den Grad als auch auf die vorhergesagte Signifikanz der Variation der beobachteten Amino-
säuren codiert und vorschlägt, dass die E2 HV-Domäne eine ähnliche Funktion wie die gp120
V3-Domäne haben könnte.

20 Lineare Epitope sind wahrscheinlich mit weniger strukturierten Bereichen der Proteine
assoziiert, insbesondere den Enden der Proteine oder mit ausgedehnten Schleifen an der Ober-
fläche. Eine Computeranalyse wurde gebraucht um die Wahrscheinlichkeit vorherzusagen, dass
ein individueller Rest mit einem definierten sekundären Strukturmotiv für 15 E2 H-
Aminosäuresequenzen zwischen den Resten 384 bis 420 assoziiert ist. Fig. 4 zeigt, dass die
25 Region bzw. der Bereich zwischen dem E2 Amino-terminalen Rest 384 und der stark vorherge-
sagten, hochgradig konservierten beta-Wende (Reste 415-418) relativ unstrukturiert ist, wie es
durch weniger als 50 Prozent Wahrscheinlichkeit an alpha-Helix, beta-Faltblatt oder beta-
Wendelung angezeigt ist. Den Mangel an dieser stark vorhergesagten Struktur in der E2 HV-
Domäne ist konsistent mit der Toleranz für extensive Sequenzvariation, wie sie zwischen den
30 Isolaten gefunden wurde, und steht in Kontrat zu den hochstrukturierten Bereichen, die zur Ter-
tiärfaltung des Proteins beitragen. Die HCV E2 HV-Domäne erscheint sogar weniger struktu-
riert als die V3-Domäne, die prinzipiell die Domäne HIV-1 gp120 neutralisiert, was zu Berich-
ten geführt hat, dass sie einen beta-Strang von Typ II-beta-Wendel-beta-Strang-alpha-Helix-
Motiv enthält und in Bezug auf die Aminosäurevariabilität größere Einschränkungen liefert als
35 die HCV E2 HV-Domäne. Zusammengefasst sagt diese Evidenz, dass die E2 HV-Domäne
Merkmale zu zeigen scheint, die charakteristisch für Proteindomänen sind, wie wahrscheinlich
Stellen an neutralisierenden Epitopen enthalten.



Beispiel 2

Epitop-Kartierung der HCV E2/NS1 HV-Domäne

Sich überlappende biotinylierte 8-mer Peptide, die der E2/NS1 HV-Domäne (Aminosäuren 384 bis 416) von HCT 18 (A,D), Th (B,E) und HCV J1 (C,F) entsprachen und darüber hinausragten, wurden an Platten gebunden, die mit Streptavidin beschichtet waren und mit Plasma von entweder HCT 18 (A-C) oder Th (D-F) reagieren gelassen wurden. Die Ergebnisse sind in Fig. 6 für HCV-Isolate HCV 18 (Fig. 6A und 6D), Th (Fig. 6B und 6E) und HCV J1 (Fig. 6C und 6F) gezeigt. HCT 18-Plasma wurde 1:200 verdünnt und Th-Plasma wurde 1:500 verdünnt. HVE-1, -2, -3, -4 und -5 repräsentierten die spezifischen Epitope des Isolats.

Wie man anhand von Fig. 6 sehen kann, identifiziert HCT 18-Plasma ein lineares Epitop (⁴⁰⁷PKQNV⁴¹¹), wenn es mit Peptiden getestet wurde, die aus der HCT18-Sequenz (HVE-I in Fig. 6A) stammten, reagierte jedoch nicht mit Peptiden, die der HV-Domäne von zwei verschiedenen Stämmen Th und HCV J1 (Fig. 6B und 6C) entsprachen. Im Unterschied dazu identifizierte Th-Plasma die linearen Epitope HVE-IV in der HV-Domäne von Th (⁴⁰⁹QNIQLI⁴¹⁴, Fig. 6E) und ebenso auch Epitope im Stamm HCT 18 (³⁹⁹IVRFFAP⁴⁰⁵, Fig. 6D) und HCV J1. Th, ein IV-Drogen-nehmendes Individuum könnte mehreren Stämmen von HCV ausgesetzt gewesen sein.

Sowohl Th- als auch HCT-18-Plasma reagierte mit einem Epitop (Aminosäuren 413-419), das allen drei Isolaten (Daten nicht gezeigt) gemeinsam war, wenn es in einem ELISA mit Pin-synthetisierten, sich überlappenden 8-mer Peptiden jedes Isolats verwendet wurde.

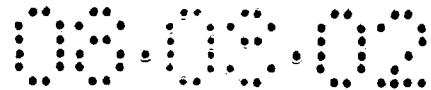
Um die Spezifität der Antikörper-Bindung zu validieren, wurden Antikörper, die an biotinylierte Peptide mit den Aminosäuren 403-407 gebunden hatten, eluiert und sie wurden dazu verwendet, die Reaktivität des HCT 18-Plasmas mit Pins zu blockieren, welche sich überlappende 8-mer für die HCT 18 HV-Domäne enthielten. Diese Daten zeigen an, dass 1) die E2/NS1 HV-Domäne immunogen ist, 2) dass es mehrere Epitope gibt, die als diesem Bereich zugehörig kartiert werden könnten und 3) ein Sub-Satz an Epitopen (HVE-1, -2, -3, -4 oder -5 in Fig. 6) in der HV-Domäne Isolat-spezifisch ist.

Beispiel 3

Bestimmung der Varianten E2/NS1 HV-Domänen, die mit Hepatitis-Schüben zusammenhängen

Um die Möglichkeit zu untersuchen, HCV-Varianten zu finden, die mit den intermittierenden Schüben an Hepatitis zusammenhängen, welche oft bei chronischen HCV-Infektionen gefunden werden, wurde das E2/NS1-Gen aus einem Patienten Q mit chronischer Hepatitis während unterschiedlicher Episoden der Hepatitis ungefähr zwei Jahre auseinander (Q1 bzw. Q3) sequenziert. Der zweite Rückfall in Bezug auf die Hepatitis trat 1,5 Jahre nach der Beendigung der Interferon-Behandlung auf.

Die Unterschiede in der abgeleiteten Aminosäuresequenz des Q1- und Q3-E2/NS1 HV-Bereiches wiesen einen aussagekräftigen Unterschied lediglich zwischen den Aminosäuren 391-408 mit sieben von acht Austauschungen, die zwischen den Aminosäuren 398 und 407 (Fig. 7) auf-



traten, auf. Fig. 7 zeigt die abgeleitete Aminosäuresequenz von zwei Bereichen des E2/NS1-Polypeptids, die Aminosäuren 384-414 und 547-647, jeweils für die Q1- und Q3-Isolate. Die Aminosäure (E) über der Q1-Sequenz wurde lediglich in einem von vier Q1-Clonen gefunden. Die Aminosäuren im Kästchen repräsentieren die Lage eines 12-mer Peptids von Q1- oder Q3-HVE. Unterschiede in der Aminosäuresequenz, wenn sie zwischen Q1 und Q3 gefunden wurden, sind fettgedruckt.

Lediglich eine Heterogenität in Bezug auf die Aminosäuren wurde zwischen den Aminosäuren 547 und 647 des Q1- und Q3-E2/NSA-Polypeptids (Fig. 7) gefunden.

Um den Effekt der Aminosäuren-Austausche, der in den Q1- und Q3-E2/HV-Domänen auf das Antikörper-Binden beobachtet wurde, zu untersuchen, wurde ein für Q1 und Q3 spezifisches 12mer Peptid von Aminosäuren 396 bis 407 (HVE Q1 oder HVE Q3 in Fig. 7B) synthetisiert und getrennt voneinander wurde das Q1- bzw. das Q3-Plasma mit jedem Peptid in einem ELISA reagieren gelassen. Tabelle 4 zeigt, dass sowohl die Antikörper in Q1- als auch Q3-Plasma mit dem Q1-Peptid reagierten, jedoch nicht mit dem Q3-Peptid. Die statistische Analyse (Students Test) zeigt an, dass die Bindung des Q1/Q3-Plasma an das Q1-Peptid signifikant oberhalb der Hintergrundbindung dieser Plasmen an ein Panel von 12 statistisch ausgewählten Kontroll-Peptiden ($P < 0,001$) war, während die Bindung an entweder das Q1- oder Q3-Plasma an das Q3-Peptid statistisch nicht signifikant war. Die Daten zeigen an, dass, obwohl Patient Q Antikörper gegen die HCV-Q1-HV-Domäne entwickelte, welche dann noch nach zwei Jahren zum Q3-Zeitpunkt nachweisbar war, sich jedoch keine nachweisbare humorale Antwort gegen die Q3-E2/HV-Variante, welche während des zweiten Aufflackerns der Hepatitis vorherrschend dominant war, entwickelte.

Tabelle 4

Elisa-Ergebnisse bei 12-mer Peptiden

25

Plasma	TARFAGFFQSGA Q1-Seq.		TAGFVRLFETGP Q3-Seq.	
	Mittelwert	sd	Mittelwert	sd
Q1	1,158	0,134	0,691	0,123
Q3	1,022	0,123	0,693	0,036

Beispiel 4

Nachweis von coexistierenden E2/NS1-Genen mit verschiedenen E2/NS1 HV-Domänen in HCV-infizierten Individuen

30

Fig. 8A zeigt die Aminosäuresequenzen, die von den beiden Isolaten von HCV J1 (J1.1 & J1.2) abgeleitet wurden, die aus einer einzigen Plasmaprobe des jap. freiwilligen Blutspenders HCV J1 cloniert wurden (Kubo et al., (1989) Nucl. Acids Res. 17:10367-10372). Von den gesamten 23 Aminosäureänderungen zwischen HCV J1.1 und HCV J1.2 sind die 9 Unterschie-

de, die durch Fettdruck angezeigt werden, in der 3 Aminosäuren-E2/NS1-HV-Domäne gelustert. Fünf der 9 Aminosäuresubstitutionen in der E2/NS1 HV-Domäne repräsentieren nicht-konservative Aminosäuren-Austausche. Da HCV J1 die einzige Gruppe ist mit einem Gruppe II HCV-Genom, das in unserem Labor cloniert wurde, ist es unwahrscheinlich, dass diese Unterschiede dadurch bedingt sind, dass eine Kreuz-Kontamination durch HCV J1-Plasma stattfand. Die HCV J1.2-Sequenz repräsentiert eine Minderheiten-Sequenz in HCV J1's-Blut, da lediglich zwei E2/NS1 HV-Varianten dieser Sequenzen von 7 clonierten Sequenzen, die von zwei unabhängigen PCR-Reaktionen stammten, identifiziert werden konnten.

Interessanterweise zeigt ein Vergleich von HCT27 und HCV E1-Isolaten (Fig. 8B), die in verschiedenen Labors sequenziert wurden und die wahrscheinlich von nicht miteinander verwandten Individuen stammen, dass die Zahl der Aminosäure-Unterschiede in der E2/NS1 HV-Domäne dieser Isolate weniger waren als die Zahl der Unterschiede, die zwischen Isolaten zwischen demselben Individuum beobachtet werden konnten.

Die vorstehend beschriebenen Ergebnisse legen den Verdacht nahe, dass sich das HCV-Genom in den Individuen und der Population schnell entwickelt.

Beispiel 5

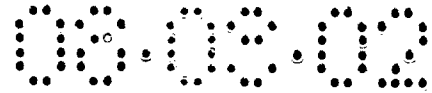
Formulierung und Herstellung eines Impfstoffs

Kopplung des toxoiden Diphtherie-Trägerproteins an MCS

Erforderliche Materialien

- Ethylen-diamintetraessigsäure (EDTA Na₂ · 2H₂O) (MW 372)
- 6-Maleimido-capronsäure-N-hydroxysuccinimidester (MCS) (Sigma) - 95%ig rein
- Natrium-dihydrogenorthophosphat (NaH₂PO₄)
- Stickstoff
- Dimethylformamid (DMF)
- Milli Q-Wasser
- 0,1 M Phosphatpuffer mit 5 mM EDTA, pH 6,66
- 0,1 M Phosphatpuffer, pH 8,0
- 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,0
- Natrium-succinat [(CH₂COONa)₂ · 6H₂O]
- Cystein
- Salzsäure (2%ige Lösung)
- 0,1 M Natrium-succinat/0,1 EDTA, pH 5,6

Gereinigtes Diphtherie-Toxoid (Commonwealth Serum Laboratories, Victoria, Australia) wurde an MCS gemäß dem von Lee et al., (1980) Mol. Immunol. 17:749; Partis et al., (1983) Prot. Chem. 2:263; Peeters et al., (1989) J. Immunol. Methods 120:133; Jones et al., (1989) J. Immunol. Methods 123:211 beschriebenen Verfahrens gekoppelt. 100 ml des Diphtherie-Toxoids wurden durch eine Sephadex-Kolonnen G25 (17 cm X 4 cm) geleitet, um Thiomer-sal zu entfernen. Das Toxoid wurde mit 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,0 eluiert und der Proteinge-



halt des Eluats wurde getestet, wobei die Proteinbestimmung mittels BCA (Pierce) erfolgte. Die erhaltene Lösung wurde konzentriert, indem eine Amicon-Ultrafiltrations-Einheit verwendet wurde, und zwar konzentriert auf eine Endkonzentration von 10 mg/ml.

5 Ein Milliliter der Lösung des Toxoids wurde gegen 0,1 M Phosphatpuffer, pH 8,0, dialysiert und dann mit einer Lösung von 1,5 mg MCS in 200 μ l DMF gemischt. Die erhaltene Lösung wurde bei Raumtemperatur in Dunkeln 1 Stunde inkubiert, wobei gelegentlich gemischt wurde. Um das nicht-gekoppelte MCS von dem MCS-Toxoid zu trennen, wurde die Lösung durch eine Sephadex-PD10-Kolonnen laufengelassen, die man mit 0,1 M Phosphatpuffer, pH 6,66, kalibriert hatte und die Proteinfractionen wurden gesammelt.

10 Die Zahl der Maleimido-Gruppen, die je Trägermolekül gekoppelt waren, wurde bestimmt, bevor das Koppeln der HCV-Peptide daran stattgefunden hatte. Dreißig Milliliter eines Succinat/EDTA-Puffers wurden 2 Minuten lang mit Stickstoff gespült. Fünf Milligramm an Cystein wurden in eine 25 ml-Volumetrieflasche übertragen und in einem Endvolumen von 25 ml des gespülten Puffers gelöst. Aliquots der Lösungen, in Tabelle 5 gezeigt, wurden in Doppelwerten auf 25 ml Flaschen mit Schraubverschluss übertragen. Unter Verwendung von unterschiedlichen Pipetten wurde Stickstoff in jedes Aliquot durchblubbern gelassen. Jede Flasche wurde dann verschlossen und bei Raumtemperatur im Dunkeln für 40 Minuten unter gelegentlichem Rühren inkubiert.

Tabelle 5

<u>Lösung</u>	<u>Probe (ml)</u>	<u>Standard (ml)</u>	<u>Blindwert (ml)</u>
aktivierter Träger	0,3	-	-
Phosphatpuffer	-	0,3	0,3
Cystein-Lösung	1,0	1,0	-
Succinat-Puffer	-	-	1,0

20 * Ein 0,1 ml-Aliquot jeder der 3 Lösungen wurde für eine Bestimmung gemäß Ellman hergenommen.

Ellmans-Test für die quantitative Bestimmung von Sulfhydryl

Erforderliche Materialien

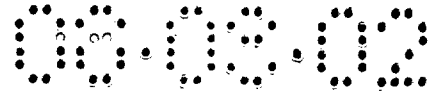
25 Phosphatpuffer, pH 8,0

Man löse 15,6 g NaH_2PO_4 oder 12,0 g NaH_2PO_4 , wasserfrei, in ungefähr 700 ml Milli Q-Wasser. Man stelle den pH auf 8,0 ein, wobei man 50% NaOH verwendet. Man füge Milli Q-Wasser bis zu einem End-Volumen von 1000 ml hinzu und stelle dann den pH ein, falls notwendig.

30 Ellmans-Reagens

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

0,1 ml an Ellmans-Reagens wurde in jeweils 0,1 ml Aliquot-Proben der vorstehend erwähnten Lösungen, nämlich der Probe-, der Standards- und der Leerwert-Lösungen, zugegeben.



Fünf Milliliter Phosphatpuffer, pH 8,0, wurde dann jedem Aliquot zugegeben, es wurde gut gemischt und für etwa 15 Minuten stehengelassen. Die Absorption jedes Aliquots wurde bei 412 nm in einer 1 cm Lichtpfadlänge einer Zelle gemessen.

Die Zahl der Maleimidogruppen, die sich auf dem Trägerprotein befanden, wurde gemäß
5 der folgenden Methode bestimmt. 0,01 μmol je Lösung -SH produziert eine Absorption von 0,136 bei 412 nm und einer Lichtpfadlänge von 1 cm. Die Absorption des Standards oder der Probe (A) ist gleich der Menge an Cystein, das mit den gekoppelten Maleimido-Gruppen auf dem aktivierten Trägerprotein reagiert hat. Da 1 mol an verfügbaren -SH mit 1 mol an Maleimido-
10 dogruppen reagiert, ist die Konzentration an μmol der Maleimidogruppen, die in dem untersuchten Aliquot vorhanden sind, gleich $A(0,01)/0,136 \mu\text{mol/ml}$. Das Gesamtvolumen der Lösung war 5,2 ml. Deshalb war die Gesamtmenge an μmol $A(0,01)(5,2)/0,136$. Die Probenlösung hatte ein Gesamtvolumen von 1,3 ml, von denen 0,3 ml aus dem aktivierten Trägerprotein bestanden. Die Menge an Maleimido-Gruppen, die in der Probenlösung vorhanden war, wurde als $A(0,01)(5,2)/(0,136)(0,1)(0,3) = A(16,57) \mu\text{mol/ml}$ berechnet. Das MCS-aktivierte Trägerprotein wurde bei -20°C gelagert.
15

Reduktion der HCV-Peptide

Vor dem Koppeln der HCV-Peptide an das MCS-aktivierte Trägerprotein wurden die Peptide reduziert um sicherzustellen, dass die Thiol-Gruppen, die auf den Peptid-Gruppen vorhanden waren, vollständig in der reduzierten -SH-Form vorlagen.

Erforderliche Materialien

20

Dithiothreitol (DTT)

Ammoniumhydrogencarbonat (NH_4HCO_3)

Methanol

SEP-PAKs (C18-Patrone, Waters), 1 Kartusche bzw. Patrone für jeweils 8 mg Peptide

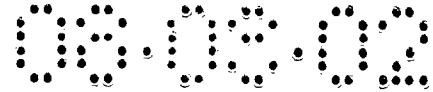
25 0,1 M Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer

Man löse 7,9 g NH_4HCO_3 in 1 l Milli Q Wasser

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

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

15 mg jedes der beiden Peptide, welche den Aminosäuren 384 bis 411 bzw. 225 bis 260
30 entsprachen, des HCV-Polyproteins wurden zu 2,5 ml 0,1 M Ammoniumhydrogencarbonat gegeben, das einen 10-fachen molaren Überschuss an DTT enthielt. Die erhaltenen Lösungen wurden gemischt, bis das Peptid sich gelöst hatte, und ihnen wurde danach gestattet, für 1 Stunde bei Raumtemperatur zu stehen. Zwei Paare an SEP-PAKs wurden in Serie miteinander verbunden und aktiviert, indem man ungefähr 20 ml Methanol und dann 20 ml Puffer A durch jedes Paar von SEP-PAKs hindurchlaufen ließ. Jede Peptid/DTT-Probe wurde langsam durch ein
35 Paar an SEP-PAKs hindurchlaufen gelassen. Das DTT wurde mit 20 ml Puffer A eluiert. Das reduzierte Peptide wurde mit 7 ml Puffer B in eine zuvor gewogene Flasche eluiert und dann über Nacht gefriergetrocknet. Die Flaschen wurden dann gewogen um die Menge an wiederge-



wonnenem Peptid zu bestimmen. Die reduzierten Peptide wurden dann sofort an das MCS-aktivierte Trägerprotein gekoppelt.

Koppeln der HCV-Peptide an MCS-aktiviertes Trägerprotein

5 Umgefahr 100 ml 0,1 M Phosphatpuffer mit 5 mM EDTA, pH 6,66, wurden unter Vakuum entgast und dann mit Stickstoff 10 Minuten lang gespült bzw. gewaschen. Zwanzig Milliliter an 10 mg/ml-Lösung des MCS-aktivierten Trägerproteins wurden sorgfältig mit Stickstoff gespült um exzessive Schaumbildung zu verhindern. 5 mg jedes der reduzierten Peptide wurden in ungefähr 0,2 ml des entgasten und gespülten Phosphat/EDTA-Puffers, pH 6,66, gelöst und dann mit der Lösung mit dem MCS-aktivierten Trägerprotein gemischt. Die erhaltene Mischung
10 wurde dann in eine mit einem Schraubverschluss ausgerüstete Flasche übertragen, die dann mit Stickstoff gefüllt und versiegelt wurde. Die Lösung wurde weiterhin entgast, indem die Flasche in ein Ultraschallbad Marke Branson 2000[®] 2 Minuten lang gehalten wurde. Die Flasche wurde dann mit Aluminiumfolie bedeckt und über Nacht bei Raumtemperatur unter langsamem Rühren auf einem Schütteltisch inkubiert.

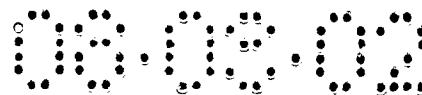
15 Das erhaltene Konjugat war löslich und das nicht-gekoppelte Peptid wurde dadurch entfernt, dass man die Mischung über eine Sephadex-PD-10-Kolonnen, die mit dem Phosphat/EDTA-Puffer, pH 6,66, äquilibriert war, laufen ließ. Die Proteinfraction wurde gesammelt. Die Menge des mit dem Trägerprotein konjugierten Peptids wurde durch Aminosäureanalyse bestimmt.

20 Eine Aminosäureanalyse mit 150 µl Aliquots des Konjugats und des Trägerproteins wurde durchgeführt. Das durchschnittliche Verhältnis des Gehalts an Aminosäuren, die allein durch das Trägerprotein beigesteuert wurde, wurde bestimmt, um die Menge an konjugiertem Peptid, das produziert worden war, zu bestimmen. Der Gehalt an Serin, Threonin, Tryptophan, Methionin, Tyrosin und Cystein wurde nicht bestimmt, da diese Aminosäuren unter den Bedingungen einer Standardhydrolyse modifiziert werden. Typische Ergebnisse dieser Berechnungen
25 sind in Tabelle 6 gezeigt.

Tabelle 6

AMINOSÄURE	TRÄGERPROTEIN ALLEIN	KONJUGAT
D	212	193
30 E	194	170
G	153	108
R	60	56
A	150	384
P	79	163

35 Für das Konjugat geben die in Fettdruck gezeigten Werte diejenigen Aminosäure an, die auch in den Peptiden vorhanden sind. Für Konjugate, die Alanin und Prolin enthielten, wurde der Faktor $(193+179+180+56)/(212+194+153+60) = 0,8659$ mit der Menge des Aminosäuregehalts multipliziert um das Ergebnis zu normalisieren.



Herstellung der Impfstoffzusammensetzung

Injizierbare Zusammensetzungen bestanden aus HCV-Peptiden, die an MCS-aktiviertes Diphtherie-Toxoid-Trägerprotein, das wie vorstehend erwähnt hergestellt worden war, konjugiert waren und einem Submikron-Öl-in-Wasser-Emulsion-Adjuvans, wie in der PCT Internationale Veröffentlichungs Nr. WO9014837, veröffentlicht am 13. Dezember 1990, was hiermit durch Inbezugnahme mit inkorporiert wird. Zusätzlich wurden injizierbare Zusammensetzungen hergestellt, die ein Immunstimulans, nämlich lipophiles Muramylpeptid (MTP-PE, CIBA-GEIGY, Basel, Schweiz) zusätzlich zu den mit HCV konjugierten Peptiden und dem Adjuvans enthielten. Die Zusammensetzungen des Impfstoffs umfassten im Allgemeinen 50% Protein und 50% Adjuvans.

Formeln der Impfstoff-Zusammensetzung mit MTP-PE

Um 10 ml einer injizierbaren Impfstoff-Zusammensetzung herzustellen, wurden gemischt:

2,5 ml Squalen (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.)

0,25 ml Tween 80 (Sigma Chemical Co.)

0,25 ml SPAN 85 (Sigma Chemical Co.)

1000 µg MTP-PE

1000 µg HCV-Peptid, konjugiert an das MCS-aktivierte Diphtherie-Toxoid-Trägerprotein

Formel für die Impfstoff-Zusammensetzung ohne MTP-PE

Um 10 ml einer injizierbaren Impfstoff-Zusammensetzung zu erhalten, wurden gemischt:

2,5 ml Squalen (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.)

0,25 ml Tween 80 (Sigma Chemical Co.)

0,25 ml SPAN 85 (Sigma Chemical Co.)

1000 µg HCV-Peptid, konjugiert an das MCS-aktivierte Diphtherie-Toxoid-Trägerprotein

Beispiel 6

Verfahren zum Testen der Impfstoff-Zusammensetzung auf Toxizität

Das Vaccin, das gemäß dem Verfahren von Beispiel 5 hergestellt worden war, wurde auf die Toxizität in kleinen Lebewesen getestet. Fünfzig Mikrogramm je Kilogramm an Vaccin wurden Meerschweinchen, Mäusen und Kaninchen mittels intraperitonealer Injektion verabreicht. Das Vaccin wurde auch durch intraperitoneale Injektion an Rhesusaffen und Primaten verabreicht. Die Hälfte der Testpopulation an Rhesusaffen und Primaten erhielten 5 µg/kg an Dosis des Vaccins, während die andere Hälfte 50 µg/kg an Dosis erhielt. Kontrolltiere, die bei jeder dieser Studien mitbehandelt wurden, wurden mit einer vergleichbaren Menge einer Zusammensetzung behandelt, die aus den Bestandteilen der Impfstoff-Zusammensetzung bestanden, mit Ausnahme der viralen Peptide.

Jedes dieser Tiere wurde daraufhin überwacht, ob sich Symptome zeigten, die als Indikator für eine Antwort auf toxisches Material bedeuten könnten. Genauer gesagt wurde jedes Tier in der Studie alle 14 Tage auf Symptome hin untersucht einschließlich Fieber, Lethargie, Gewichtsverlust, Änderungen im Essverhalten und auf Läsionen, Anschwellen oder Irritationen, die am Ort der Injektion auftraten. Die Lymphknoten in proximaler Richtung zu der Injektionsstelle wurden auch auf Schwellung und/oder Drainage hin untersucht. Die Tiere wurden alle 14 Tage über eine Zeitdauer von mehreren Monaten hinweg überwacht.

Beispiel 7

Nachweis der Produktion von neutralisierenden Antikörpern in geimpften Tieren

Der gemäß der Methodologie von Beispiel 5 hergestellte Impfstoff wurde in Schimpansen getestet um die Effektivität des Impfstoffs dahin zu bestimmen, nämlich dass er die Produktion von virusneutralisierendem Antikörper in den geimpften Subjekten hervorruft. Die Schimpansen wurde mit einer Dosis von 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ des Impfstoffs gemäß der Vorgehensweise von Beispiel 5 über eine Zeitdauer von sechs Monaten hinweg bei 0, 1, 3 und 6 Monaten geimpft. Kontroll-Schimpansen wurden mit vergleichbaren Mengen einer Zusammensetzung injiziert, die aus Bestandteilen des Impfstoffs mit Ausnahme der viralen Peptide bestand. Zwei Wochen, nachdem die letzte Dosis an Impfstoff verabreicht worden war, wurden die Test- und auch die Kontroll-Schimpansen mittels einer Dosis von 10 CIU₅₀ (Chimpanzee Infectious Unit) mit CDC/910-Plasma-Inokulum auf eine Reaktion hin gereizt. Beginnend eine Woche nach der Reizung mit dem Virus wurde jeder Schimpanse in einem Wochenrhythmus auf eine Virämie hin untersucht.

Um die Virämie nachzuweisen, wurden Blutproben und Proben an Leber-Biopsie von Kontrollen und Testtieren auf Wochenbasis mehrer Monate lang gesammelt. Das Gewebe, das aus der Leber-Biopsie gesammelt wurde, wurde histologisch auf Anzeigen von Nekrose und/oder Entzündung untersucht. Zusätzlich wurden die Hepatozyten aus dem Biopsie-Material mittels Elektronenmikroskop auf die Anwesenheit von sogenannten Tubuli hin untersucht, die ein Charakteristikum einer HCV-Infektion darstellen. Blutproben wurden auch mittels des vorstehend beschriebenen ELISA-Assays auf die Gegenwart von Antikörpern gegen Bereiche bzw. Segmente der viralen Polypeptide hin untersucht, welche nicht bei der Herstellung des Aktiv- bzw. Impfstoffs verwendet worden waren. Insbesondere wurde jede der Blutproben mittels ELISA auf die Gegenwart von Antikörpern gegen NS₃-, NS₄- und NS₅-Peptiden hin gescreent. Die Gegenwart der Antikörper gegen diese Peptide im Serum eines Schimpansen wurde als Anzeichen für HCV-Infektion gewertet.

Das folgende Verfahren wurde verwendet um virale RNA, die in Plasma zirkulierte oder im Leber-Biopsiegewebe, das von den Schimpansen gesammelt wurde, vorhanden war, untersucht.

cPCR-Verfahren zum Nachweis von HCV-RNA in Leber und im Serum

In dem cPCR-Assay wurde mutmaßliche virale RNA in der Probe mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben; ein Bereich bzw. ein Segment der resultierenden cDNA wurde dann unter Verwendung einer modifizierten Version der PCR-Technik, beschrieben durch Saiki et al. (1986), amplifiziert. Die Primer für die cPCR-Technik leiteten sich von HCV-RNA ab, die mittels der Familie von hier bereitgestellten HCV-cDNAs identifiziert werden kann, abgeleitet. Das amplifizierte Produkt, das der HCV-RNA entsprach, wurde unter Verwendung einer Sonde, die sich von der Familie der hier bereitgestellten HCV-cDNAs ableitete, nachgewiesen.

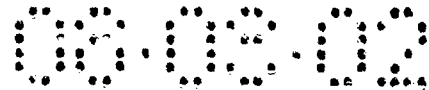
Der cPCR/HCV-Assay, der in diesen Studien verwendet wurde, wurde durchgeführt, wobei die nachfolgend beschriebenen Methodenschritte für die Herstellung der RNA, der reversen Transkription der RNA in cDNA, die Amplifikation des spezifischen Segments der cDNA mittels PCR und der Analyse der PCR-Produkte verwendet wurden.

Die RNA wurde aus der Leber extrahiert, wobei die Guanidium-isothiocyanat-Methode zum Herstellen von Gesamt-RNA verwendet wurde, die in Maniatis et al. (1982) beschrieben ist.

Um Gesamt-RNA aus Plasma zu isolieren, wurde das Plasma 5- bis 10-fach mit TENB (0,1 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA) verdünnt und in einer Proteinase K/SDS-Lösung (0,5% SDS, 1 mg/ml Proteinase K, 20 Mikrogramm/ml Poly A-Träger) 60 bis 90 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Proben wurden einmal mit Phenol (pH 6,5) extrahiert, die so erhaltene organische Phase wurde einmal mit TENB, das 0,1% SDS enthielt, reextrahiert und die wässrigen Phasen beider Extraktionen wurden vereinigt und zweimal mit einem gleichen Volumen Phenol/CHCl₃/Isoamylalkohol [1:1(99:1)] extrahiert. Die so erhaltenen wässrigen Phasen wurden mit einem gleichen Volumen an CHCl₃/Isoamylalkohol (99:1) zweimal extrahiert und mit Ethanol unter Verwendung von 0,2 M Natriumacetat, pH 6,5 und 2,5 Volumina 100% Ethanol gefällt; die Fällung erfolgte über Nacht bei -20°C.

Die als Matrize für die PCR-Reaktion verwendete cDNA wurde unter Verwendung der bezeichneten Proben zur Herstellung der entsprechenden cDNAs hergestellt. Jede RNA-Probe (die entweder 2 Mikrogramm hitzedenaturierte Gesamtschimpanseenleber RNA oder RNA aus 2 Mikrolitern Plasma enthielt, wurde in einem 25 Mikroliter-Reaktionsansatz, der 1 Mikromol jedes Primers, 1 Millimol jedes Desoxyribonukleotidtriphosphats (dNTP), 50 Millimol Tris-HCl, pH 8,3, 5 Millimol MgCl₂, 5 Millimol Dithiothreitol (DTT), 73 Millimol KCl, 40 Einheiten RNase Inhibitor (RNASIN) und 5 Einheiten Reverse AMV-Transkriptase enthielt, inkubiert. Die Inkubation erfolgte 60 Minuten bei 37°C. Nach der cDNA-Synthese wurden die Reaktionsansätze mit 50 Mikroliter entionisiertem Wasser (DIW) verdünnt, 10 Minuten gekocht und auf Eis abgekühlt.

Die Amplifikation eines Segments der HCV-cDNA wurde unter Verwendung von zwei synthetischen Oligomeren 16-mer Primern durchgeführt, deren Sequenzen von den HCV-



cDNA-Klonen 36 (Anti-Sense) und 37b (Sense) abgeleitet waren. Die Sequenz des Primers von Klon 36 betrug:

5' GCA TGT CAT GAT GTA T 3'.

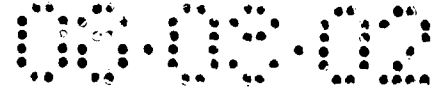
Die Sequenz des Primers von Klon 37 b betrug:

5 5' ACA ATA CGT GTG TCA C 3'.

Die Primer wurden in einer Endkonzentration von jeweils 1 Mikromol verwendet. Um das Segment der HCV-cDNA zu amplifizieren, das von den Primern flankiert ist, wurden die cDNA-Proben mit 0,1 Mikrogramm RNase A und den PCR-Reaktanten des Perkin Elmer Cetus PCR-Kit (N801-0043 oder N801-0055) nach den Angaben des Herstellers inkubiert. Die PCR-Reaktion wurde für entweder 30 Zyklen oder 60 Zyklen in einem Perkin Elmer Cetus DNA-Thermostyler durchgeführt. Jeder Zyklus bestand aus einer 1-minütigen Denaturierungsstufe bei 94°C, einer 2-minütigen Assoziierungsstufe bei 37°C und einer 3-minütigen Extensi-
10 onsstufe bei 72°C. Jedoch betrug die Extensiionsstufe in dem Endzyklus (30 oder 60) 7 Minuten statt 3 Minuten. Nach Amplifikation wurden die Proben mit einem gleichen Volumen an Phenol:Chloroform (1:1), gefolgt von der Extraktion mit einem gleichen Volumen Chloroform extrahiert und dann wurden die Proben mit Ethanol, das 0,2 M Natriumacetat enthielt, gefällt.
15

Die cPCR-Produkte wurden wie folgt analysiert. Die Produkte wurden einer Elektrophorese auf 1,8%igen alkalischen Agarosegelen gemäß Murakawa et al. (1988) unterworfen und auf ZETA[®]-Sondenpapier (BioRad Corp.) durch Blotten der Gele über Nacht in 0,4 M NaOH überführt. Die Blots wurden in 2 X SSC (1 X SSC enthält 0,15 M NaCl, 0,015 M Natriumcitrat) neutralisiert, in 0,3 M NaCl, 15 mM Natriumphosphatpuffer, pH 6,8, 15 mM EDTA, 1,0% SDS, 0,5% fettfreie Milch (Carnation Co.) und 0,5 mg/ml beschaltete denaturierte Lachssperma-DNA neutralisiert. Die auf HCV cDNA-Fragmente zu analysierenden Blots wurden an eine mit 32p markierte Sonde hybridisiert, die durch Nicktranslation der HCV cDNA Insertionssequenz in Klon 35 erzeugt worden war, wie in U.S.S.N. 07/456,637 beschrieben, hybridisiert. Nach der Hybridisierung wurden die Blots in 0,1 X SSC (1 X SSC enthält 0,15 M NaCl, 0,01 M Na-
20 citrat) bei 65°C gewaschen, getrocknet und autoradiographisch untersucht. Die erwartete Produktgröße beträgt 586 Nukleotide in der Länge. Produkte, die mit der Sonde hybridisierten und in den Gelen in diesem Größenbereich gewandert waren, wurden als positiv für die virale RNA
25 bewertet.
30

Als Kontrolle wurde cPCR-Primer, die Alpha-1-antitrypsin-mRNA amplifizieren sollten, entwickelt, um die Anwesenheit von RNA in jeder analysierten Probe zu bestätigen. Die codierende Region des Alpha-1-anti-Trypsingens ist in Rosenberg et al. (1984) beschrieben. Synthetische Oligomer 16-mer Primer zur Amplifikation eines 365 Nukleotide langen Fragments der codierenden Region des Alpha-1-antitrypsingens wurden von den Nukleotiden 22-37
35 (Sense) und den Nukleotiden 372-387 (Antisense) abgeleitet. Die PCR-Produkte wurden unter Verwendung einer 32p-nicktranslatierten Sonde, die zwischen den cDNA/PCR-Primersequenzen liegt, aber diesen nicht einschließt, detektiert.



Infolge der extremen Sensitivität der PCR-Reaktion wurden alle Proben mindestens dreimal laufen gelassen. Alle falsch positiven Signale wurden entfernt, wenn die folgenden Vorsichtsmaßnahmen getroffen wurden: 1) Entfernung der Aerosole unter Verwendung von Schraubkappenröhrchen mit O-Ring-Siegeln aus Gummi; 2) Pipettieren mit Ranin MICROMAN[®] positiven Verdrängungspipettiervorrichtungen mit Einwegaufsätzen/Kapillaren; und 3) Wählen der Oligonukleotidsequenzen für die cDNA und die PCR-Primer aus zwei nicht benachbarten cDNA-Klonen.

Gewerbliche Anwendbarkeit

Die erfindungsgemäßen immunreaktiven Zusammensetzungen sind zur Herstellung von Materialien, beispielsweise Impfstoffen, nützlich, die ihrerseits zur Behandlung von Individuen gegen HCV-Infektionen, insbesondere chronischen HCV-Infektionen, verwendet werden können. Zusätzlich können die Zusammensetzungen verwendet werden, um Materialien zum Nachweis von multiplen Varianten von HCV in biologischen Proben nachzuweisen. Beispielsweise können die erfindungsgemäßen immunreaktiven Zusammensetzungen verwendet werden um polyklonale Antikörperzusammensetzungen zu erzeugen, die mehr als ein HCV-Isolat erkennen oder als Antigen in einem Anti-HCV-Antikörper-Immunoassay verwendet werden. Das zuletzt genannte Verfahren kann zum Screening von Blutprodukten auf mögliche HCV-Verunreinigung verwendet werden. Polyklonale Antisera oder Antikörper können zur passiven Immunisierung eines Individuums verwendet werden.

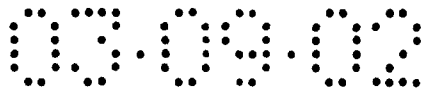


92 91 9917.2

12421 UK

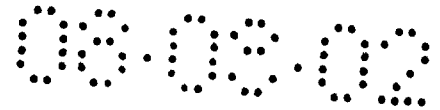
Patentansprüche

1. DNA-Polynucleotidmolekül, umfassend Sequenzen, die wenigstens für zwei heterogene immunreaktive HCV-Aminosäuresequenzen codieren, die von derselben variablen Domäne von verschiedenen HCV-Isolaten stammen.
5
2. DNA-Molekül nach Anspruch 1, wobei die heterogenen immunreaktiven HCV-Aminosäuresequenzen zusammenhängend sind.
10
3. DNA-Molekül nach Anspruch 1, wobei die heterogenen immunreaktiven HCV-Aminosäuresequenzen nicht zusammenhängend sind.
4. DNA-Molekül nach Anspruch 1, wobei die heterogenen immunreaktiven HCV-Aminosäuresequenzen ein Fusionsprotein bilden.
15
5. DNA-Molekül nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die verschiedenen HCV-Isolate ein HCV-Gruppe-I-Isolat sowie ein HCV-Gruppe-II-Isolat beinhalten.
- 20 6. DNA-Molekül nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die variable Domäne innerhalb des E2/NS1-Proteins liegt.
7. DNA-Molekül nach Anspruch 6, wobei die variable Domäne von etwa der Aminosäure 384 bis etwa zu der Aminosäure 414 des HCV-Polyproteins codiert wird.
25
8. DNA-Molekül nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die variable Domäne innerhalb des E1-Proteins liegt.



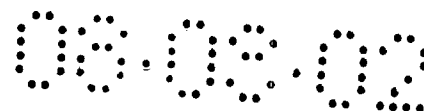
- 2 -

9. DNA-Molekül nach Anspruch 8, wobei die variable Domäne von etwa Aminosäure 215 bis etwa Aminosäure 255 des HCV-Polyproteins codiert wird.
10. Wirtszelle, umfassend ein DNA-Molekül nach einem der Ansprüche 1 bis 9.
11. Wirtszelle nach Anspruch 10, wobei das DNA-Molekül Steuerungssequenzen umfasst, die in der Lage sind, die Expression der heterogenen immunreaktiven HCV-Aminosäuresequenzen zu veranlassen.
12. Verfahren zum Herstellen eines rekombinanten Proteins, wobei das Verfahren umfasst, dass eine Population von Wirtszellen nach Anspruch 10 oder 11 unter Bedingungen wachsen gelassen wird, die für die Expression des Polypeptids sorgen, und dass das Protein isoliert wird.
13. Verfahren nach Anspruch 12, wobei das Protein von lysierten Zellen isoliert und gereinigt wird.
14. Verfahren nach Anspruch 12, wobei das Protein aus dem Kulturmedium isoliert und gereinigt wird.
15. Protein, codiert durch die DNA nach einem der Ansprüche 1 bis 9.
16. Immunreaktive Polypeptidzusammensetzung, umfassend wenigstens zwei heterogene HCV-Aminosäuresequenzen, von denen jede ein Epitop definiert, das innerhalb einer variablen Domäne lokalisiert ist und bei dem es sich um ein Fragment eines HCV-Polypeptids handelt, und das aus 5 Aminosäuren bis 400 Aminosäuren besteht und wobei die heterogenen Epitope innerhalb der selben variablen Domäne lokalisiert sind, die von



verschiedenen HCV-Isolaten stammt, wobei die wenigstens zwei Sequenzen entweder durch rekombinante Expression oder chemische Synthese hergestellt sind.

- 5 17. Immunreaktive Polypeptidzusammensetzung nach Anspruch 16, wobei jede HCV-Aminosäuresequenz aus 5 bis 200 Aminosäuren besteht.
- 10 18. Immunogene Zusammensetzung nach Anspruch 16 oder 17, die eine Vielzahl von Antigenen umfasst, wobei (a) jeder Antigen aus einer Vielzahl von Sequenzen besteht, die wenigstens ein Epitop innerhalb einer variablen Domäne eines HCV-Polypeptids, das von verschiedenen HCV-Isolaten stammt, umfassen, und (b) die Aminosäuresequenz des Epitops des einen Satzes in Bezug auf die Aminosäuresequenz wenigstens eines
15 anderen Satzes heterogen ist, wobei der andere Satz von einer zweiten variablen Domäne stammt.
- 20 19. Immunogene Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 16 bis 18, wobei die verschiedenen HCV-Isolate ein HCV-Gruppe-I-Isolat und ein HCV-Gruppe-II-Isolat beinhalten.
- 25 20. Immunogene Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 16 bis 19, wobei die variable Domäne innerhalb des E2/NS1-Proteins liegt.
21. Immunogene Zusammensetzung nach Anspruch 20, wobei die
25 variable Domäne von etwa Aminosäure 384 bis etwa Aminosäure 414 des HCV-Polypeptids codiert ist.
22. Immunogene Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 16 bis 19, wobei die variable Domäne innerhalb des E1-Proteins liegt.



23. Immunogene Zusammensetzung nach Anspruch 22, wobei die variable Domäne von etwa Aminosäure 215 bis etwa Aminosäure 255 des HCV-Polyproteins codiert ist.
- 5 24. Immunogene Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 16 bis 19, wobei jede Aminosäuresequenz des Weiteren ein Epitop innerhalb einer zweiten variablen Domäne eines HCV-Polypeptids umfasst, wobei die zweiten variablen Domänenbereiche der Aminosäuresequenzen zueinander heterogen sind und von verschiedenen HCV-Isolaten stammen.
- 10 25. Immunogene Zusammensetzung nach Anspruch 24, wobei die erste variable Domäne innerhalb des E2/NS1-Proteins liegt und die zweite variable Domäne innerhalb des E1-Proteins liegt
- 15 26. Verfahren zum Herstellen einer immunogenen Zusammensetzung für die Behandlung von HCV, welches das Mischen einer immunogenen Zusammensetzung mit einer geeigneten Arzneimittelträgersubstanz umfasst, dadurch gekennzeichnet, dass die immunogene Zusammensetzung diejenige ist, wie in einem der Ansprüche 16 bis 25 definiert.
- 20 27. Verfahren zum Herstellen von anti-HCV-Antikörpern, umfassend das Extrahieren der Antikörper aus einem Säuger, dem eine immunogene Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 16 bis 25 verabreicht wurde.
- 25 28. Verfahren zum Nachweis von Antikörpern gegen HCV innerhalb einer biologischen Probe, umfassend



- (a) Bereitstellen einer biologischen Probe, die man im Verdacht hat, Antikörper gegen mehrere Stämme von HCV zu enthalten,
- 5 (b) Bereitstellen einer immunogenen Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 16 bis 25,
-
- (c) Reagieren lassen der biologischen Probe von (a) mit der immunogenen Zusammensetzung von (b) unter Bedingungen, die die Bildung eines Antigen-Antikörperkomplexes zulassen, und
- 10 (d) Nachweisen der Bildung von Komplexen, die sich wenn überhaupt zwischen dem Antigen von (a) und den Antikörpern der biologischen Probe von (b) gebildet haben.
- 15 29. Kit zum Nachweis von Antikörpern gegen mehrere Stämme von HCV innerhalb einer biologischen Probe, welcher eine immunogene Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 16 bis 25 in einem geeigneten Behälter umfasst.

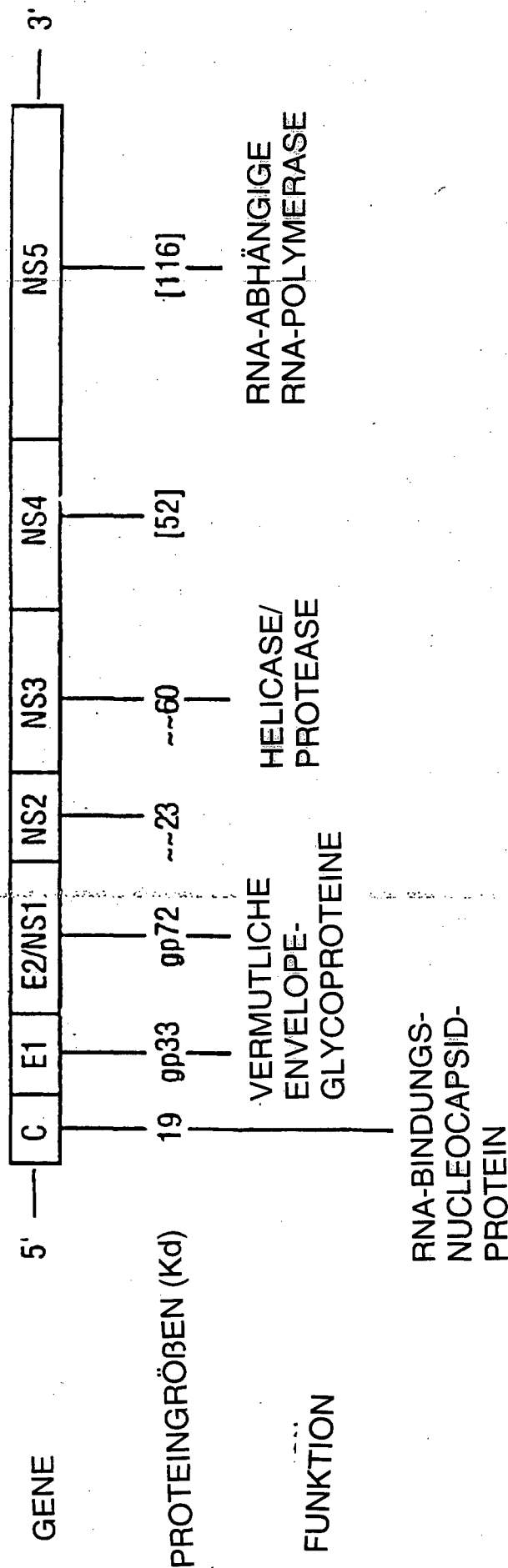


FIG. 1

HCV-1 192 YQVRNSTGLYHVTNDCPNSSIVYEADAAILHTPGCVPC
 HCT18 H-----
 Th-----A-----
 HCT23-----A-----
 HCT27-----T-T-S-----
 HC-J1-----H-----
 * * * * *
 HC-J4 -E-VS-I-----S-----M-M-----
 HCV-J -E-VS-I-----S-----M-M-----
 HCV J1 -E-VS-I-----S-----V-M-A-----
 BK -E-H-VS-I-----S-A-----L-M-----

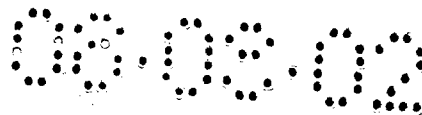
HCV-1 230 VREGNASRCWAMTPTVATRDGKLPATQLRRHIDLVLGSAATLCSALYVGDLCGSVFLVGQ
 HCT18 -H-V-----T-----
 Th-----A-R-T-----I-----
 HCT23 -D-V-----K-----I-----
 HCT27 -K-PVA-----N-----I-----
 HC-J1 -V-----I-----
 * * * * *
 HC-J4 -D-S-----L-A-NASV-T-TI--V--A-AF--M-----S-----
 HCV-J -S-F-----L-A-NSSI-T-TI--V--A-A--M-----S-----
 HCV J1 -N-S-----L-A-NASV-T-T--V--T-AF--M-----IS-----
 BK -S-----L-A-NVTI-T-TI--V--A-AF--M-----S-----

HCV-1 290 LFTFSRRHWTQGCNCSIYPGHI T GHRMAWDMMNWSPPTALVMAQLLRIPQAILDMIA
 HCT18-----A-----M-----
 Th-----V-----
 HCT23 -D-----A-V-----
 HCT27 -D-----A-----
 HC-J1-----A-----
 * * * * *
 HC-J4 -E-V-D-----LS-----VS-----VV-V-----
 HCV-J -YE-V-D-----VS-----VS-----VV-V-----
 HCV J1 -E-V-D-----VS-----A-VS-----VM-V-----
 BK -V-L-D-----VS-----VS-----VV-V-----



Vergleichs-Aminosäuresequenz der vermeintlichen E2/NS1-Region von HCV-Isolaten

HCV-1	370	KVLVLLLFAGVDAETHVTGGAGHTVSGFVSLAPGAKQNVQLINTNGSWHLN	STALNC
HCT27		T-YT--N-AR-TQALT-FFS--DI-	I-R--
HCVE1		Y-T--TAR-TQ-L--FSR--DI-	I-R--
H77		--R-TA-L-G-T--I-	I--
H90		--RS-L-IA-F-TR-P--I-K-	I--
Th		--T--A-GAL-IA-FNQ-R--I-	I--
HC-J1		--I-S-Q-ARAM-L--FT--I-	I--
HC-J4		--G-YTS-A-S-T-TLA-FS--S-RI-V-	I-R--
HCV-J		--GH--RVASSTQSL--W-SQ-PS-KI-V-	I-R--
JH-1		--GH-R--VQ--VT-TLT--FR--S-KI-V-	I-R--
BK		--I-M--GD--AQAK-TNRL--MF-S-PS-KI-	I-R--
HCV-1	430	NDSLNTGWLGLFYHHKFNSSGCPERLASCRPLTDFDQGWGPISYANGSGPDQRPYCWHY	
HCT27		-G-D--V--Y--M--A-Q--	EH--
HCVE1		-E-D--V--Y--M--A--	T-EH--
H77		--A-I--G--R--A--	L-E--
H90		--h-I--Y--R--	E--
Th	***	--E--I-Q--R--	H--
HC-J1		--H-F-A--T-R--M-IDW-A--	T-TEPDS--
HC-J4		--Q-FI-A--A-R-A--M-IDE-A--	THDMPES--
HCV-J		--Q-F-A--T--A--M-SIDK--	T-QPDNS--
JH-1		--Q-F-A--T-S--M-Q-TIDK--	T-ES-RS--
BK			
HCV-1	490	PPKPCGIVPAKSVCGPVYCFTPSPVVVGTDRSGAPTYSWGENDTDVFLNNTRPPLGNW	
HCT27		--QN--NKL--NKL--N-S-E-	
HCVE1		--QT--NKL--N-C-	
H77		--R--A--	
H90		--R--N--LI-	
Th		--N--N-A-	
HC-J1			
HC-J4		A-R--SQ--	
HCV-J		A-R--SQ--F--E--LL-S--Q--	
JH-1		A-RQ--SQ--F--N-D-E--LL--H--	
BK		--PQ-T--SE--F-V-R--E--LL--Q--	





HCV-1	550	FGCTWMNSTGFTKVCGAPPVIGGAGNNTLHCPTDCFRKHPDATYSRCGSGPWITPRCLV	
HCT27		-----V-----Q-----AA-----	
HCVE1		-----V-----Y-----E-----	
H77		-----V-----L-----E-----M-----	
H90		-----V-----R-----E-----M-----	
Th		-----V-----	
HC-J1			
HC-J4		-----T-G-----N-----V-----E-----TK-----L-----M-----	
HCV-J		-----T-G-----N-----V-----T-----E-----TK-----L-----	
JH-1		-----T-G-----N-----V-----T-----E-----TK-----L-----M-----	
BK			
HCV-1	610	DYPYRLWHYPCTINVTIFKIRMYGGVEHRLEAACNWRGERCDLEDRDRSELSPLLLTT	
HCT27		-----V-----VQ-----D-----V-----D-----RL-----S-----	
HCVE1		-----V-----L-----V-----QV-----N-D-----S-----	
H77		-----V-----	
H90		-----V-----I-----S-----	
Th		-----V-----	
HC-J1			
HC-J4		-----V-F-V-----V-----N-----S-----	
HCV-J		-----V-F-----V-----	
JH-1		-----V-F-----V-----N-----P-----S-----	
BK			

Figur 3-2

HCV-1 TQWQVLPCTTLPALSTGLIHQHONIVDQVLYGVGSSIASWAIKWEYVVLLELLADA
 HCT27 -----T-----V-----I-----N-----
 HCVE1 -----T-----V-----I-----
 H77 -----
 H90 -----T-----
 Th -----
 HC-J1 -----
 HC-J4 -----
 HCV-J -----
 JH-1 -----
 BK -----

670

-E-I-----R-----I--AVV-F-----IL-----
 -E-----I--AVV-F-----L-----

HCV-1 RVCCLWMMLLISQAEAALENLVILNAASLAGTHGLVSELVFFCFAWYKKGKWPVPGAVYT
 HCT27 -----L-----A-AVA-----R-----A-A-----
 HCVE1 -----
 H77 -----
 H90 -----A-----
 Th -----
 HC-J1 -----
 HC-J4 -----
 HCV-J -----
 HCV-J -----
 JH-1 -----
 BK -----

730

---A-----T---V---A---L---A---I---RL---A-A
 ---A-----A-----V-S-V-A-IL-----A---I---RL---T-A

FYGMWPLLLLLALPQRAYALDTEVAASC GGVLVGLMALTLSPTYKRYISWCLWNLQYF
 -----M-----

790

L-V-----P---M-R-M-----A-F---VL-----VFLARLI-----
 L-V-----P---M-R-M-----A-F---VL-----VFLARLI-----

HCV-1
 HCT27
 HCVE1
 H77
 H90
 Th
 HC-J1
 HC-J4
 HCV-J
 JH-1
 BK

HCV-1
 HCT27
 HCVE1
 H77
 H90
 Th
 HC-J1
 HC-J4
 HCV-J
 HCV-J
 JH-1
 BK

HCV-1
 HCT27
 Th
 HC-J1
 HC-J4
 HCV-J
 HCV-J
 JH-1
 BK



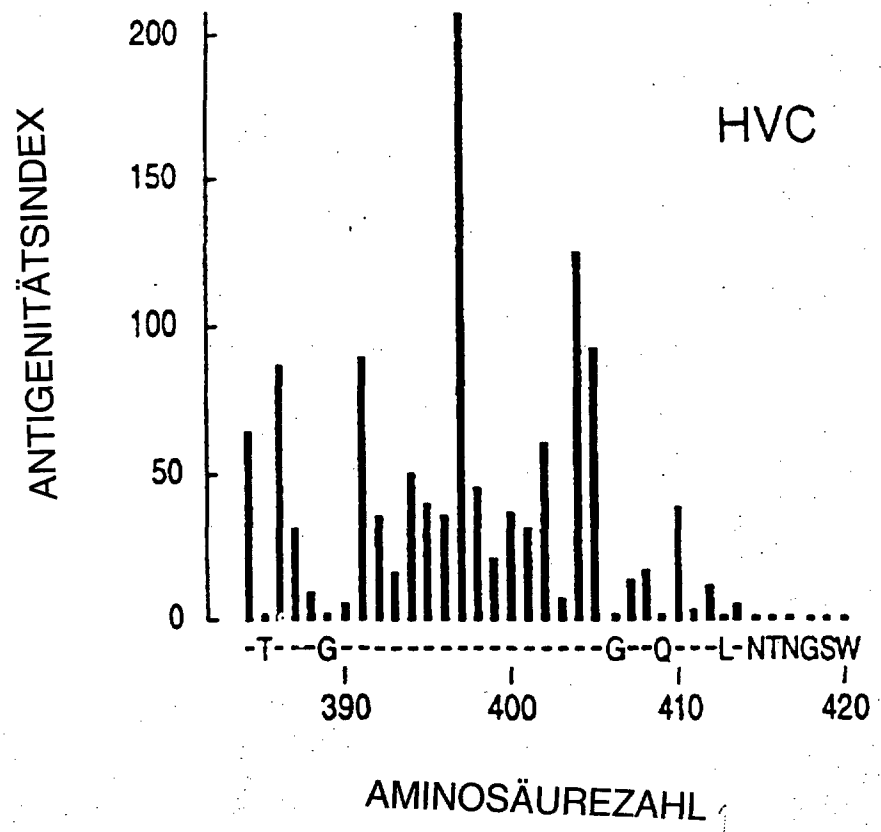
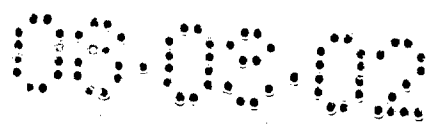


FIG. 4A

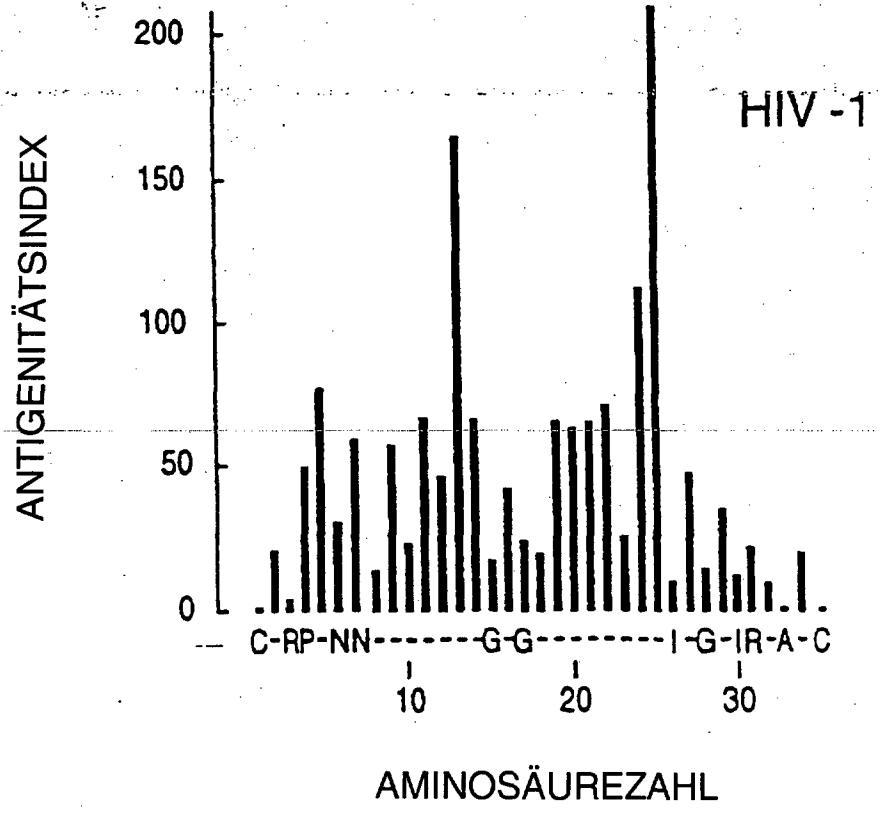


FIG. 4B

00.09.00

8/32

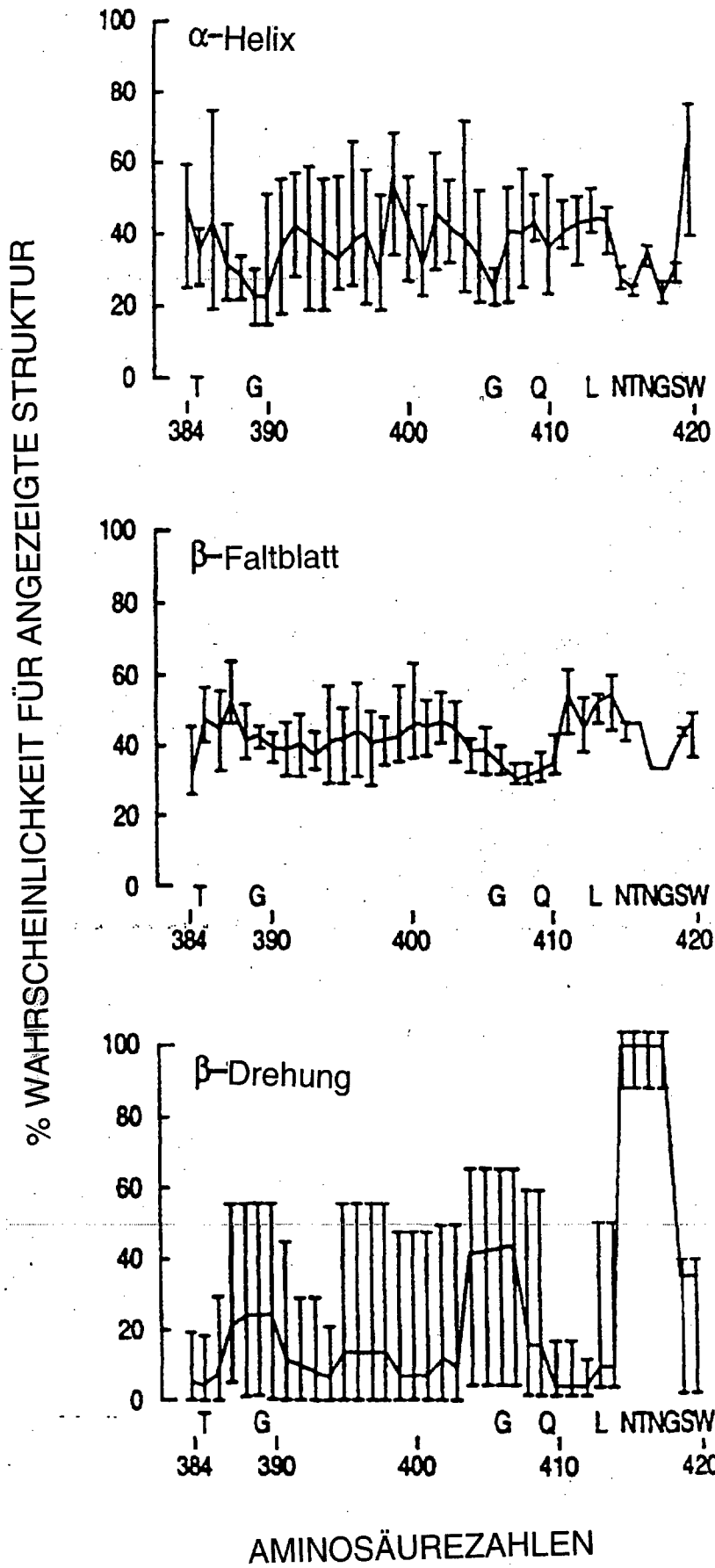


FIG. 5

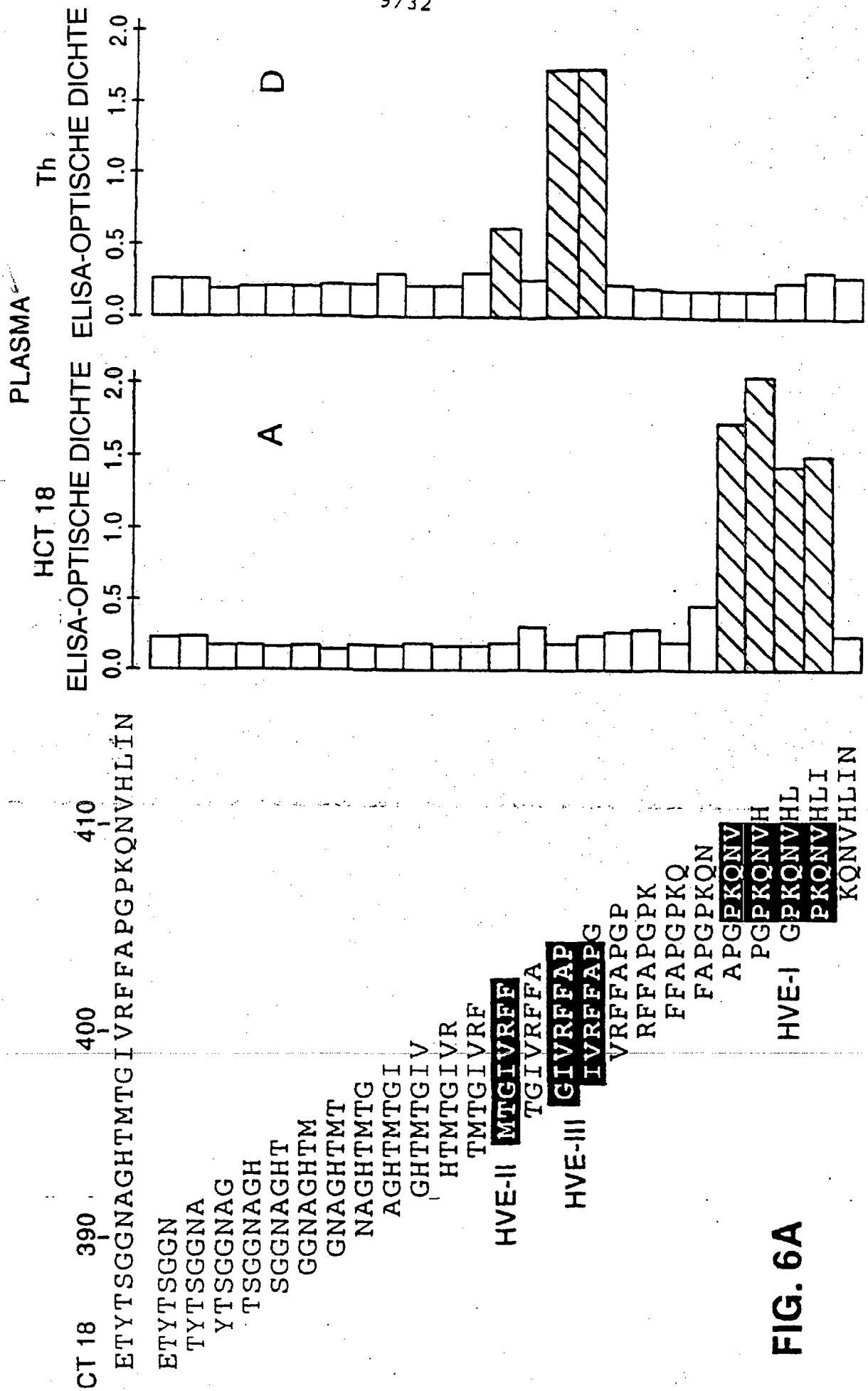


FIG. 6A

00000

10/32

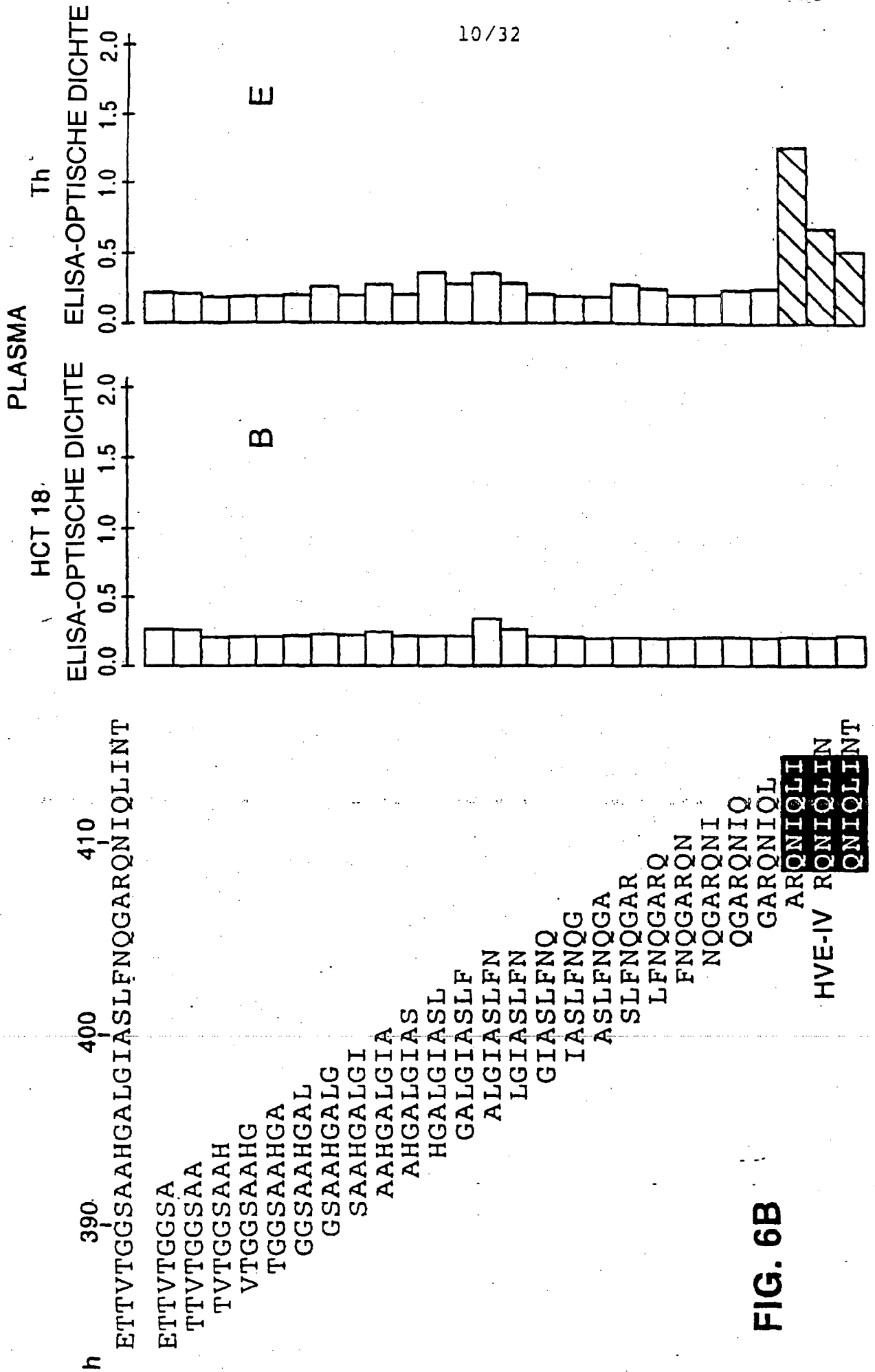
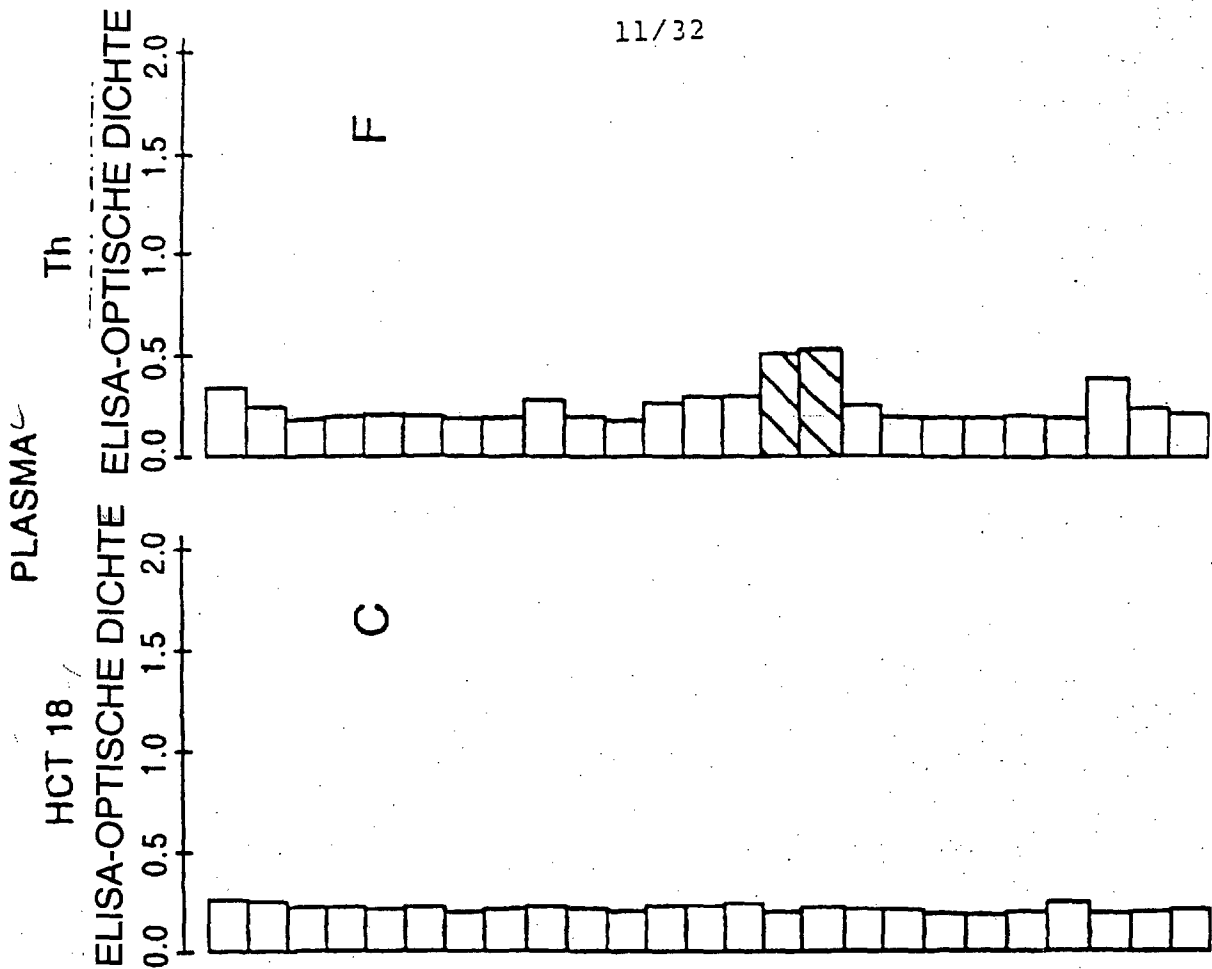


FIG. 6B



11/32

00000

10

ICV J1 390 | 400 | 410

HTRVTGGVQGHVTSLTLSLFRPGASQKIQLVN

HTRVTGGV |

TRVTGGVQ

RVTGGVQG

VTGGVQGH

TGGVQGHV

GGVQGHVT

GVQGHVTS

VQGHVTST

QGHVTSTL

GHVTSTLT

HVTSTLTS

VTSTLTSL

TSTLTSLF

STLTSLFR

HVE-V **TLSLFRP**

LTSLFRPG

TSLFRPGA

SLFRPGAS

LFRRPGASQ

FRPGASQK

RPGASQKI

PGASQKIQ

GASQKIQL

ASQKIQLV

SQKIQLVN

FIG. 6C

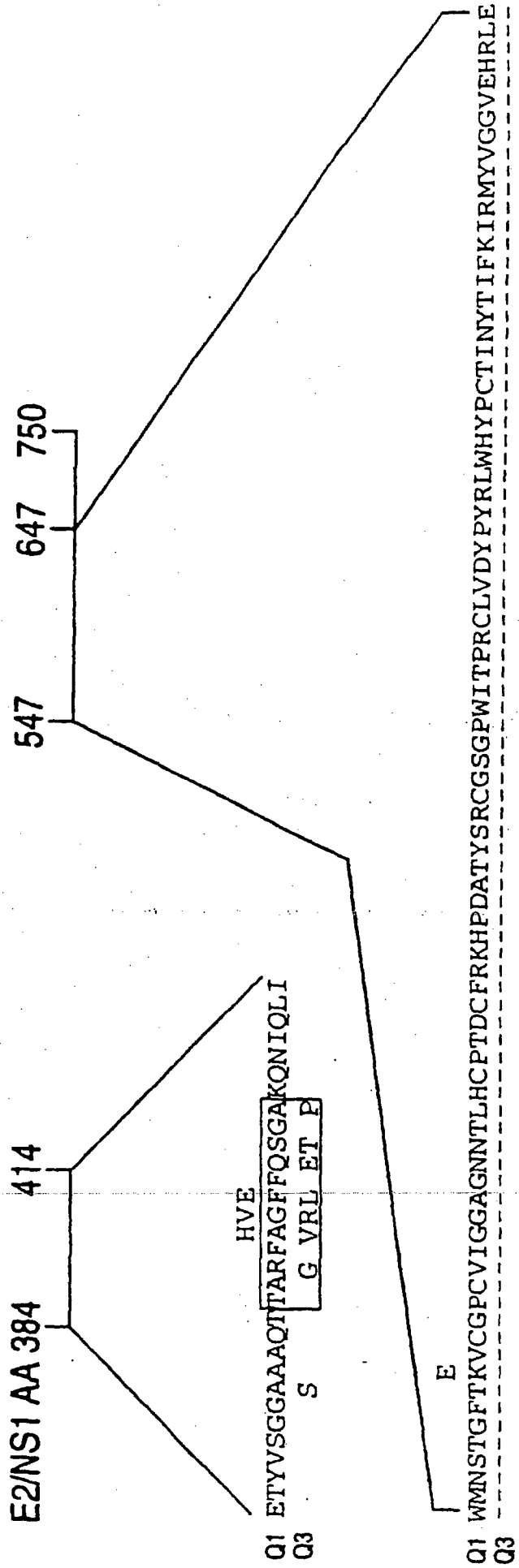
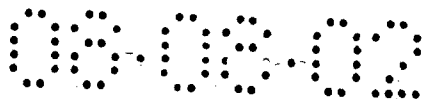


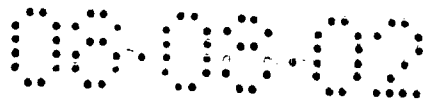
FIG. 7



E2 HV

		M		
HCV J1.1	384	HTRVTGGVQGHVSTLTSLEFRPGASQKIQLVNTNGSWHINRTALNCNDSLQTGFLLAALFY		
HCV J1.2		N-H-----GAFG---Q-----K-----		
		R	A	
HCV J1.1	444	THKFNASGCPERMASCRSIDKFDQGWPITYAQPDNSDQRPYCWHYAPRQCQGIVPASQVC	VG	R*
HCV J1.2		--R-----T-----		
HCV J1.1	504	GPVYCFTPSPVVVGTDRSGAPTYNWGDNETDVLNNTTRPPHGNWFGCTWMNSTGETKT	F V	
HCV J1.2		-----		
HCV J1.1	564	CGGPPCNIGGVGNNLTTCPTDCFRKHDPDATYKCGSGPWLTPRCLVDYPYRLWHYPCTVN	A	I
HCV J1.2		-----		R
HCV J1.1	624	FTIFKVRMYVGGVEHRLDAACNWRGER	K	E
HCV J1.2		-----		651

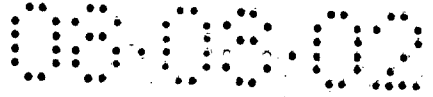
Figur 8-1



E2 HV

HCT27	384	TTYTGGNAARTTQALTSFFSPGAKQDIQLINTNGSWHINRTALNCNGSLDTGWVAGLFY
HCVE1		E-----ST-----G-V-L-R-----E-----
HCT27	444	YHKFNSSGCPERMASCRPLADFQQGWGPISYANGSGPEHRPYCWHYPPKPCGI VPAQNVC
HCVE1		-----D-----T-----T-----
HCT27	504	GPVYCFTPSPVVVGTINKLGAPTYNWGSNETDV FVLNNTRPPLGNWFGCTWMNSSGFTKV
HCVE1		-----C-D-----V-----
HCT27	564	CGAPPCVIGGVGNNTLQPTDCFRKHPDATYSRCAAGPWITPRCLVHYPYRLWHYPCTVN
HCVE1		-----A-----Y-----E-----GS-----G-----
HCT27	624	YTIQIRMYVGGVDHRLEVACNWTGRERCDDLDRDRSELRLLLSTTQWQVLPSCFTTLP
HCVE1		--LFKV-----E--Q-----N-----SP-----
HCT27	684	ALTTGLIHLHQNIVDVQYLYGVGSSIVSWAIKWEYVILFLLLANARICSLW
HCVE1		-----D--V-----

Figur 8-2



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

FIGUR 9-1



Phe Leu Leu Ala Leu Ser Cys Leu Thr Val Pro Ala Ser Ala Tyr
180 185
Gln Val Arg Asn Ser Thr Gly Leu Tyr His Val Thr Asn Asp Cys Pro
195 200 205
Asn Ser Ser Ile Val Tyr Glu Ala Ala Asp Ala Ile Leu His Thr Pro
210 215 220
Gly Cys Val Pro Cys Val Arg Glu Gly Asn Ala Ser Arg Cys Trp Val
225 230 235 240
Ala Met Thr Pro Thr Val Ala Thr Arg Asp Gly Lys Leu Pro Ala Thr
245 250 255
Gln Leu Arg Arg His Ile Asp Leu Leu Val Gly Ser Ala Thr Leu Cys
260 265 270
Ser Ala Leu Tyr Val Gly Asp Leu Cys Gly Ser Val Phe Leu Val Gly
275 280 285
Gln Leu Phe Thr Phe Ser Pro Arg Arg His Trp Thr Thr Gln Gly Cys
290 295 300
Asn Cys Ser Ile Tyr Pro Gly His Ile Thr Gly His Arg Met Ala Trp
305 310 315 320
Asp Met Met Met Asn Trp Ser Pro Thr Thr Ala Leu Val Met Ala Gln
325 330 335
Leu Leu Arg Ile Pro Gln Ala Ile Leu Asp Met Ile Ala Gly Ala His
340 345 350

FIGUR 9-2

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

000000

Trp Gly Glu Asn Asp Thr Asp Val Phe Val Leu Asn Asn Thr Arg Pro
530
Pro Leu Gly Asn Trp Phe Gly Cys Thr Trp Met Asn Ser Thr Gly Phe
545 550 555
Thr Lys Val Cys Gly Ala Pro Pro Cys Val Ile Gly Gly Ala Gly Asn
560 565 570 575
Asn Thr Leu His Cys Pro Thr Asp Cys Phe Arg Lys His Pro Asp Ala
580 585 590
Thr Tyr Ser Arg Cys Gly Ser Gly Pro Trp Ile Thr Pro Arg Cys Leu
595 600 605
Val Asp Tyr Pro Tyr Arg Leu Trp His Tyr Pro Cys Thr Ile Asn Tyr
610 615 620
Thr Ile Phe Lys Ile Arg Met Tyr Val Gly Val Glu His Arg Leu
625 630 635
Glu Ala Ala Cys Asn Trp Thr Arg Gly Glu Arg Cys Asp Leu Glu Asp
640 645 650 655
Arg Asp Arg Ser Glu Leu Ser Pro Leu Leu Thr Thr Thr Gln Trp
660 665 670
Gln Val Leu Pro Cys Ser Phe Thr Thr Leu Pro Ala Leu Ser Thr Gly
675 680 685
Leu Ile His Leu His Gln Asn Ile Val Asp Val Gln Tyr Leu Tyr Gly
690 695 700

FIGUR 9-4

19/32

Val Gly Ser Ser Ile Ala Ser Trp Ala Ile Lys Trp Glu Tyr Val Val 720
705
Leu Leu Phe Leu Leu Ala Asp Ala Arg Val Cys Ser Cys Leu Trp 735
725
Met Met Leu Leu Ile Ser Gln Ala Glu Ala Ala Leu Glu Asn Leu Val 750
740
Ile Leu Asn Ala Ala Ser Leu Ala Gly Thr His Gly Leu Val Ser Phe 765
755
Leu Val Phe Phe Cys Phe Ala Trp Tyr Leu Lys Gly Lys Trp Val Pro 780
770
Gly Ala Val Tyr Thr Phe Tyr Gly Met Trp Pro Leu Leu Leu Leu 800
785
Leu Ala Leu Pro Gln Arg Ala Tyr Ala Leu Asp Thr Glu Val Ala Ala 815
ser Cys Gly Gly Val Val Leu Val Gly Leu Met Ala Leu Thr Leu Ser 830
825
Pro Tyr Tyr Lys Arg Tyr Ile Ser Trp Cys Leu Trp Trp Leu Gln Tyr 845
835
Phe Leu Thr Arg Val Glu Ala Gln Leu His Val Trp Ile Pro Pro Leu 860
855
Asn Val Arg Gly Gly Arg Asp Ala Val Ile Leu Leu Met Cys Ala Val 880
865

FIGURE 9-5

000000

000000

20/32

His Pro Thr Leu Val Phe Asp Ile Thr Lys Leu Leu Ala Val Phe
885 890 910
Gly Pro Leu Trp Ile Leu Gln Ala Ser Leu Leu Lys Val Pro Tyr Phe
900 905
Val Arg Val Gln Gly Leu Leu Arg Phe Cys Ala Leu Ala Arg Lys Met
915 920 925
Ile Gly Gly His Tyr Val Gln Met Val Ile Ile Lys Leu Gly Ala Leu
930 935 940
Thr Gly Thr Tyr Val Tyr Asn His Leu Thr Pro Leu Arg Asp Trp Ala
945 950 955
His Asn Gly Leu Arg Asp Leu Ala Val Ala Val Glu Pro Val Val Phe
965 970 975
Ser Gln Met Glu Thr Lys Leu Ile Thr Trp Gly Ala Asp Thr Ala Ala
980 985 990
Cys Gly Asp Ile Ile Asn Gly Leu Pro Val Ser Ala Arg Arg Gly Arg
995 1000 1005
Glu Ile Leu Leu Gly Pro Ala Asp Gly Met Val Ser Lys Gly Trp Arg
1010 1015 1020
Leu Leu Ala Pro Ile Thr Ala Tyr Ala Gln Gln Thr Arg Gly Leu Leu
1025 1030 1035 1040
Gly Cys Ile Ile Thr Ser Leu Thr Gly Arg Asp Lys Asn Gln Val Glu
1045 1050 1055

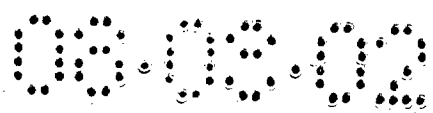
FIGUR 9-6

000000

Gly Glu Val Gln Ile Val Ser Thr Ala Ala Gln Thr Phe Leu Ala Thr 1070
1060
1065
Cys Ile Asn Gly Val Cys Trp Thr Val Tyr His Gly Ala Gly Thr Arg 1085
1075
1080
Thr Ile Ala Ser Pro Lys Gly Pro Val Ile Gln Met Tyr Thr Asn Val 1100
1090
1095
Asp Gln Asp Leu Val Gly Trp Pro Ala Pro Gln Gly Ser Arg Ser Leu 1120
1105
1110
1115
Thr Pro Cys Thr Cys Gly Ser Ser Asp Leu Tyr Leu Val Thr Arg His 1135
1125
1130
Ala Asp Val Ile Pro Val Arg Arg Gly Asp Ser Arg Gly Ser Leu 1150
1140
1145
Leu Ser Pro Arg Pro Ile Ser Tyr Leu Lys Gly Ser Ser Gly Gly Pro 1165
1155
1160
Leu Leu Cys Pro Ala Gly His Ala Val Gly Ile Phe Arg Ala Ala Val 1180
1170
1175
Cys Thr Arg Gly Val Ala Lys Ala Val Asp Phe Ile Pro Val Glu Asn 1200
1185
1190
Leu Glu Thr Thr Met Arg Ser Pro Val Phe Thr Asp Asn Ser Ser Pro 1215
1205
1210
Pro Val Val Pro Gln Ser Phe Gln Val Ala His Leu His Ala Pro Thr 1230
1220
1225

FIGUR 9-7

Gly Ser Gly Lys Ser Thr Lys Val Pro Ala Ala Tyr Ala Ala Gln Gly 1235 1240 1245
 Tyr Lys Val Leu Val Leu Asn Pro Ser Val Ala Ala Thr Leu Gly Phe 1250 1255 1260
 Gly Ala Tyr Met Ser Lys Ala His Gly Ile Asp Pro Asn Ile Arg Thr 1265 1270 1275 1280
 Gly Val Arg Thr Ile Thr Thr Gly Ser Pro Ile Thr Tyr Ser Thr Tyr 1285 1290 1295
 Gly Lys Phe Leu Ala Asp Gly Gly Cys Ser Gly Ala Tyr Asp Ile 1300 1305 1310
 Ile Ile Cys Asp Glu Cys His Ser Thr Asp Ala Thr Ser Ile Leu Gly 1315 1320 1325
 Ile Gly Thr Val Leu Asp Gln Ala Glu Thr Ala Gly Ala Arg Leu Val 1330 1335 1340
 Val Leu Ala Thr Ala Thr Pro Pro Gly Ser Val Thr Val Pro His Pro 1345 1350 1355 1360
 Asn Ile Glu Glu Val Ala Leu Ser Thr Thr Gly Glu Ile Pro Phe Tyr 1365 1370 1375
 Gly Lys Ala Ile Pro Leu Glu Val Ile Lys Gly Gly Arg His Leu Ile 1380 1385 1390
 Phe Cys His Ser Lys Lys Cys Asp Glu Leu Ala Ala Lys Leu Val 1395 1400 1405

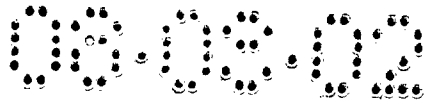


FIGUR 9-8

9000

Ala Leu Gly Ile Asn Ala Val Ala Tyr Tyr Arg Gly Leu Asp Val Ser
1410 1415 1420
Val Ile Pro Thr Ser Gly Asp Val Val Val Ala Thr Asp Ala Leu
1425 1430 1435
Met Thr Gly Tyr Thr Gly Asp Phe Asp Ser Val Ile Asp Cys Asn Thr
1440 1445 1450 1455
Cys Val Thr Gln Thr Val Asp Phe Ser Leu Asp Pro Thr Phe Thr Ile
1460 1465 1470
Glu Thr Ile Thr Leu Pro Gln Asp Ala Val Ser Arg Thr Gln Arg Arg
1475 1480 1485
Gly Arg Thr Gly Arg Gly Lys Pro Gly Ile Tyr Arg Phe Val Ala Pro
1490 1495 1500
Gly Glu Arg Pro Ser Gly Met Phe Asp Ser Ser Val Leu Cys Glu Cys
1505 1510 1515
Tyr Asp Ala Gly Cys Ala Trp Tyr Glu Leu Thr Pro Ala Glu Thr Thr
1520 1525 1530 1535
Val Arg Leu Arg Ala Tyr Met Asn Thr Pro Gly Leu Pro Val Cys Gln
1540 1545 1550
Asp His Leu Glu Phe Trp Glu Gly Val Phe Thr Gly Leu Thr His Ile
1555 1560 1565
Asp Ala His Phe Leu Ser Gln Thr Lys Gln Ser Gly Glu Asn Leu Pro
1570 1575 1580

FIGUR 9-9



Tyr Leu Val Ala Tyr Gln Ala Thr Val Cys Ala Arg Ala Gln Ala Pro 1600
1585 1590 1595
Pro Pro Ser Trp Asp Gln Met Trp Lys Cys Leu Ile Arg Leu Lys Pro 1615
1605 1610
Thr Leu His Gly Pro Thr Pro Leu Leu Tyr Arg Leu Gly Ala Val Gln 1630
1620 1625
Asn Glu Ile Thr Leu Thr His Pro Val Thr Lys Tyr Ile Met Thr Cys 1645
1635 1640
Met Ser Ala Asp Leu Glu Val Val Thr Ser Thr Trp Val Leu Val Gly 1660
1650 1655
Gly Val Leu Ala Ala Leu Ala Ala Tyr Cys Leu Ser Thr Gly Cys Val 1680
1665 1670 1675
Val Ile Val Gly Arg Val Val Leu Ser Gly Lys Pro Ala Ile Ile Pro 1695
1685 1690
Asp Arg Glu Val Leu Tyr Arg Glu Phe Asp Glu Met Glu Glu Cys Ser 1710
1700 1705
Gln His Leu Pro Tyr Ile Glu Gln Gly Met Met Leu Ala Glu Gln Phe 1725
1715 1720
Lys Gln Lys Ala Leu Gly Leu Leu Gln Thr Ala Ser Arg Gln Ala Glu 1740
1730 1735
Val Ile Ala Pro Ala Val Gln Thr Asn Trp Gln Lys Leu Glu Thr Phe 1760
1745 1750 1755

FIGUR 9-10

Trp Ala Lys His Met Trp Asn Phe Ile Ser Gly Ile Gln Tyr Leu Ala
 1765 1770 1775
 Gly Leu Ser Thr Leu Pro Gly Asn Pro Ala Ile Ala Ser Leu Met Ala
 1780 1785 1790
 Phe Thr Ala Ala Val Thr Ser Pro Leu Thr Thr Ser Gln Thr Leu Leu
 1795 1800 1805
 Phe Asn Ile Leu Gly Gly Trp Val Ala Ala Gln Leu Ala Ala Pro Gly
 1810 1815 1820
 Ala Ala Thr Ala Phe Val Gly Ala Gly Leu Ala Gly Ala Ala Ile Gly
 1825 1830 1835 1840
 Ser Val Gly Leu Gly Lys Val Leu Ile Asp Ile Leu Ala Gly Tyr Gly
 1845 1850 1855
 Ala Gly Val Ala Gly Ala Leu Val Ala Phe Lys Ile Met Ser Gly Glu
 1860 1865 1870
 Val Pro Ser Thr Glu Asp Leu Val Asn Leu Leu Pro Ala Ile Leu Ser
 1875 1880 1885
 Pro Gly Ala Leu Val Val Gly Val Val Cys Ala Ala Ile Leu Arg Arg
 1890 1895 1900
 His Val Gly Pro Gly Glu Gly Ala Val Gln Trp Met Asn Arg Leu Ile
 1905 1910 1915 1920
 Ala Phe Ala Ser Arg Gly Asn His Val Ser Pro Thr His Tyr Val Pro
 1925 1930 1935

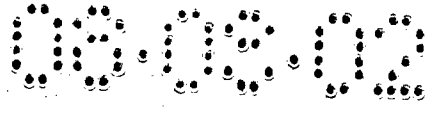


FIGURE 9-11

Glu Ser Asp Ala Ala Arg Val Thr Ala Ile Leu Ser Ser Leu Thr
 1940 1945 1950
 Val Thr Gln Leu Leu Arg Arg Leu His Gln Trp Ile Ser Ser Glu Cys
 1955 1960 1965
 Thr Thr Pro Cys Ser Gly Ser Trp Leu Arg Asp Ile Trp Asp Trp Ile
 1970 1975 1980
 Cys Glu Val Leu Ser Asp Phe Lys Thr Trp Leu Lys Ala Lys Leu Met
 1985 1990 2000
 Pro Gln Leu Pro Gly Ile Pro Phe Val Ser Cys Gln Arg Gly Tyr Lys
 2005 2010 2015
 Gly Val Trp Arg Val Asp Gly Ile Met His Thr Arg Cys His Cys Gly
 2020 2025 2030
 Ala Glu Ile Thr Gly His Val Lys Asn Gly Thr Met Arg Ile Val Gly
 2035 2040 2045
 Pro Arg Thr Cys Arg Asn Met Trp Ser Gly Thr Phe Pro Ile Asn Ala
 2050 2055 2060
 Tyr Thr Thr Gly Pro Cys Thr Pro Leu Pro Ala Pro Asn Tyr Thr Phe
 2065 2070 2075 2080
 Ala Leu Trp Arg Val Ser Ala Glu Glu Tyr Val Glu Ile Arg Gln Val
 2085 2090 2095
 Gly Asp Phe His Tyr Val Thr Gly Met Thr Thr Asp Asn Leu Lys Cys
 2100 2105 2110

26/32



FIGURE 9-12

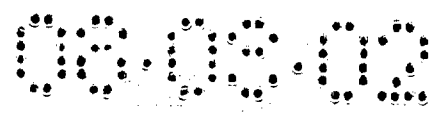
Pro Cys Gln Val Pro Ser Pro Glu Phe Thr Glu Leu Asp Gly Val
 2115 2120 2125
 Arg Leu His Arg Phe Ala Pro Pro Cys Lys Pro Leu Leu Arg Glu Glu
 2130 2135 2140
 Val Ser Phe Arg Val Gly Leu His Glu Tyr Pro Val Gly Ser Gln Leu
 2145 2150 2155 2160
 Pro Cys Glu Pro Glu Pro Asp Val Ala Val Leu Thr Ser Met Leu Thr
 2165 2170 2175
 Asp Pro Ser His Ile Thr Ala Glu Ala Ala Gly Arg Arg Leu Ala Arg
 2180 2185 2190
 Gly Ser Pro Pro Ser Val Ala Ser Ser Ser Ala Ser Gln Leu Ser Ala
 2195 2200 2205
 Pro Ser Leu Lys Ala Thr Cys Thr Ala Asn His Asp Ser Pro Asp Ala
 2210 2215 2220
 Glu Leu Ile Glu Ala Asn Leu Leu Trp Arg Gln Glu Met Gly Gly Asn
 2225 2230 2235 2240
 Ile Thr Arg Val Glu Ser Glu Asn Lys Val Val Ile Leu Asp Ser Phe
 2245 2250 2255
 Asp Pro Leu Val Ala Glu Glu Asp Glu Arg Glu Ile Ser Val Pro Ala
 2260 2265 2270
 Glu Ile Leu Arg Lys Ser Arg Arg Phe Ala Gln Ala Leu Pro Val Trp
 2275 2280 2285

27/32

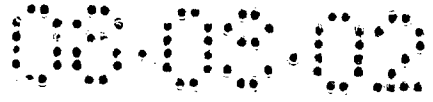


FIGUR 9-13

Ala Arg Pro Asp Tyr Asn Pro Pro Leu Val Glu Thr Trp Lys Lys Pro
 2290 2295 2300
 Asp Tyr Glu Pro Pro Val Val His Gly Cys Pro Leu Pro Pro Lys
 2305 2310 2315 2320
 Ser Pro Pro Val Pro Pro Arg Lys Lys Arg Thr Val Val Leu Thr
 2325 2330 2335
 Glu Ser Thr Leu Ser Thr Ala Leu Ala Glu Leu Ala Thr Arg Ser Phe
 2340 2345 2350
 Gly Ser Ser Thr Ser Gly Ile Thr Gly Asp Asn Thr Thr Thr Ser
 2355 2360 2365
 Ser Glu Pro Ala Pro Ser Gly Cys Pro Pro Asp Ser Asp Ala Glu Ser
 2370 2375 2380
 Tyr Ser Ser Met Pro Pro Leu Glu Gly Glu Pro Gly Asp Pro Asp Leu
 2385 2390 2395 2400
 Ser Asp Gly Ser Trp Ser Thr Val Ser Ser Glu Ala Asn Ala Glu Asp
 2405 2410 2415
 Val Val Cys Cys Ser Met Ser Tyr Ser Trp Thr Gly Ala Leu Val Thr
 2420 2425 2430
 Pro Cys Ala Ala Glu Glu Gln Lys Leu Pro Ile Asn Ala Leu Ser Asn
 2435 2440 2445
 Ser Leu Leu Arg His Asn Leu Val Tyr Ser Thr Thr Ser Arg Ser
 2450 2455 2460

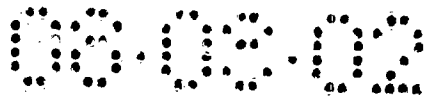


FIGUR 9-14



Ala Cys Gln Arg Gln Lys Lys Val Thr Phe Asp Arg Leu Gln Val Leu 2480
2465 2470 2475
Asp Ser His Tyr Gln Asp Val Leu Lys Glu Val Lys Ala Ala Ser 2495
2485 2490
Lys Val Lys Ala Asn Leu Ser Val Glu Glu Ala Cys Ser Leu Thr 2510
2500 2505
Pro Pro His Ser Ala Lys Ser Lys Phe Gly Tyr Gly Ala Lys Asp Val 2525
2515 2520
Arg Cys His Ala Arg Lys Ala Val Thr His Ile Asn Ser Val Trp Lys 2540
2530 2535
Asp Leu Leu Glu Asp Asn Val Thr Pro Ile Asp Thr Thr Ile Met Ala 2560
2545 2550 2555
Lys Asn Glu Val Phe Cys Val Gln Pro Glu Lys Gly Arg Lys Pro 2575
2565 2570
Ala Arg Leu Ile Val Phe Pro Asp Leu Gly Val Arg Val Cys Glu Lys 2590
2580 2585
Met Ala Leu Tyr Asp Val Val Thr Lys Leu Pro Leu Ala Val Met Gly 2605
2595 2600
Ser Ser Tyr Gly Phe Gln Tyr Ser Pro Gly Gln Arg Val Glu Phe Leu 2620
2610 2615
Val Gln Ala Trp Lys Ser Lys Lys Thr Pro Met Gly Phe Ser Tyr Asp 2640
2625 2630 2635

Thr Arg Cys Phe Asp Ser Thr Val Thr Glu Ser Asp Ile Arg Thr Glu 2645
 2650
 Glu Ala Ile Tyr Gln-Cys Cys Asp Leu Asp Pro Gln Ala Arg Val Ala 2660
 2665
 Ile Lys Ser Leu Thr Glu Arg Leu Tyr Val Gly Gly Pro Leu Thr Asn 2670
 2680
 Ser Arg Gly Glu Asn Cys Gly Tyr Arg Arg Cys Arg Ala Ser Gly Val 2685
 2690
 Leu Thr Thr Ser Cys Gly Asn Thr Leu Thr Cys Tyr Ile Lys Ala Arg 2700
 2705
 Ala Ala Cys Arg Ala Ala Gly Leu Gln Asp Cys Thr Met Leu Val Cys 2710
 2715
 Gly Asp Asp Leu Val Val Ile Cys Glu Ser Ala Gly Val Gln Glu Asp 2720
 2725
 Ala Ala Ser Leu Arg Ala Phe Thr Glu Ala Met Thr Arg Tyr Ser Ala 2730
 2735
 Pro Pro Gly Asp Pro Pro Gln Pro Glu Tyr Asp Leu Glu Leu Ile Thr 2740
 2745
 Ser Cys Ser Ser Asn Val Ser Val Ala His Asp Gly Ala Gly Lys Arg 2750
 2755
 Val Tyr Tyr Leu Thr Arg Asp Pro Thr Thr Pro Leu Ala Arg Ala Ala 2760
 2765
 2770
 2775
 2780
 2785
 2790
 2795
 2800
 2805
 2810
 2815



Trp Glu Thr Ala Arg His Thr Pro Val Asn Ser Trp Leu Gly Asn Ile 2820 2825 2830
Ile Met Phe Ala Pro Thr Leu Trp Ala Arg Met Ile Leu Met Thr His 2835 2840 2845
Phe Phe Ser Val Leu Ile Ala Arg Asp Gln Leu Glu Gln Ala Leu Asp 2850 2855 2860
Cys Glu Ile Tyr Gly Ala Cys Tyr Ser Ile Glu Pro Leu Asp Leu Pro 2865 2870 2875 2880
Pro Ile Ile Gln Arg Leu His Gly Leu Ser Ala Phe Ser Leu His Ser 2885 2890 2895
Tyr Ser Pro Gly Glu Ile Asn Arg Val Ala Ala Cys Leu Arg Lys Leu 2900 2905 2910
Gly Val Pro Pro Leu Arg Ala Trp Arg His Arg Ala Arg Ser Val Arg 2915 2920 2925
Ala Arg Leu Leu Ala Arg Gly Gly Arg Ala Ala Ile Cys Gly Lys Tyr 2930 2935 2940
Leu Phe Asn Trp Ala Val Arg Thr Lys Leu Lys Leu Thr Pro Ile Ala 2945 2950 2955 2960
Ala Ala Gly Gln Leu Asp Leu Ser Gly Trp Phe Thr Ala Gly Tyr Ser 2965 2970 2975
Gly Gly Asp Ile Tyr His Ser Val Ser His Ala Arg Pro Arg Trp Ile 2980 2985 2990

FIGUR 9-17

000000

32/32

Trp Phe Cys Leu Leu Leu Ala Ala Gly Val Gly Ile Tyr Leu Leu
2995 3000

Pro Asn Arg
3010

FIGUR 9-18