



(12) **PATENT**

(19) **NO**

(11) **329149**

(13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.

C07K 14/16 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19994929	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1998.04.06 PCT/FR98/00691
(22)	Inng.dag	1999.10.08	(85)	Videreføringsdag	1999.10.08
(24)	Løpedag	1998.04.06	(30)	Prioritet	1997.04.09, FR, 9704356 1998.02.24, FR, 9802212
(41)	Alm.tilgj	1999.12.08			
(45)	Meddelt	2010.08.30			
(73)	Innehaver	Bio-Rad Pasteur, 3, boulevard Raymond Poincaré, F-92430 Marnes la Coquette, FR-, Frankrike			
(72)	Oppfinner	Denis Marie Bernard Chenebaux, Versailles, FR-, Frankrike Jean-François Hubert Delagneau, La Celle Saint Cloud, FR-, Frankrike Stéphane Jean Xavier Gadelle, Bièvres, FR-, Frankrike François Yves Unier, Fontenay le Fleury, FR-, Frankrike			
(74)	Fullmektig	Bryn Aarflot AS, Postboks 449 Sentrum, 0104 OSLO, Norge			
(54)	Benevnelse	Syntetiske peptider, blandinger, immunoassaymetode og diagnostiseringssett			
(56)	Anførte publikasjoner	WO 9612809 A2, WO 9627013 A1, WO 9532293 A1, EP 0673948 A1, EP 0591914 A2			
(57)	Sammendrag				

Det beskrives syntetiske peptider som finner anvendelse i biologiske tester for påvisning av infeksjoner som følge av gruppe O HIV-1 virus, fremgangsmåte for fremstilling av peptidene, blandinger og sett som inneholder slike peptider og biologiske tester hvor slike peptider benyttes.

Foreliggende oppfinnelse vedrører syntetiske peptider, blandinger, immunoassaymetode og diagnostiseringssett.

Oppfinnelsen vedrører følgende syntetiske peptider som kan benyttes i biologiske tester til påvisning av infeksjoner som følge av gruppe 0 HIV-1 virus, blandinger og sett som inneholder slike peptider.

Gruppe 0 HIV-1 retrovirus er tidligere kjent. Tidligere patent EP 0.345.375 og patentsøknad EP 0.657.532 beskriver ANT 70 og ANT 70 NA-isolater isolert fra pasienter fra Kamerun. Disse dokumentene beskriver mer nøyaktig antigener og antigenblandinger som inneholder lysater eller proteiner av disse isolatene, nukleinsyrene som tilsvarer det genomiske RNA, hybridiseringsmetoder hvor disse nukleinsyrene benyttes, metoder for de ovenfor angitte isolater, så vel som fremgangsmåter for fremstilling av p12-, p16-, p25-, gp41- og gp121-proteiner av disse retrovirus.

Søknad EP 0.591.914 beskriver MVP 5180/91-isolatet. Dette isolat, karakterisert ved western-blotting, oppviser i likhet med det tidligere isolat, forskjeller med hensyn til HIV-1 retrovirusisolatene som lenge har vært kjent. Søknad EP 0.591.914 beskriver nøyaktig DNA-sekvensene av MVP 5180/91-isolatet og angir nøyaktig lokaliseringen av gag-, pol- og env-genene. Søknad EP 0.591.914 beskriver dessuten syntetiske peptider av V3-sløyfen, så vel som den immundominante region (gp41). De er egnet for biologiske tester, særlig for *in vitro* påvisning av gruppe 0 HIV-1 antistoff.

Søknad EP 0.673.948 beskriver syntetiske eller rekombinante peptider bestående av 15 til 50 aminosyrer (AA) og som omfatter sekvensen -VWGIRQLRLARLQALETLIQNQQRLNLWGXXKGKLIXYTSVKWNTSWSGR- hvor X utgjør enten en cysteinrest eller en serinrest. Disse peptidene er egnet innen det diagnostiske felt til påvisning av infeksjoner som skyldes visse gruppe 0 HIV-1 retrovirusisolater.

Søknad EP 0.727.483, som også er kjent, beskriver MVP 2901/94-isolatet som også utgjør del av de retrovirus som tilhører gruppen 0 HIV-1-familien. Denne søknaden beskriver visse antigener som har veldefinerte peptidsekvenser. Disse peptidsekvensene tilsvarer deler av sekvensen av gp120 og deler av gp41 (immundominant region) av MVP2901/94-isolatet.

Søknad WO 96/12809 beskriver to nye isolater som tilhører gruppen 0 HIV-1-familien. De er VAU- og DUR-isolatene. Denne søknaden beskriver visse

peptidsekvenser avledet fra de to ovenfor nevnte virus som er anvendelige for påvisning av antistoffer som gjenkjenner HIV-1 VAU- eller DUR-peptidsekvensene.

Søknad WO 96/32293 beskriver to antigener avledet fra sekvensen av ANT 70-isolatet. De er antigenet betegnet MDL061 og antigenet MDL056 av den immundominante region av gp41. I henhold til denne oppfinnelse er det for å påvise 100% av prøvene av et begrenset utvalg sera fra pasienter infisert med gruppe O HIV-1 virus, nødvendig å benytte blandinger som inneholder disse to peptidene, siden hvert isolert peptid ikke alene gjør det mulig å oppnå tilfredsstillende resultater.

WO 96/27013 beskriver gruppe O HIV-1, fragmenter av slike virus og anvendelse derav. WO 95/32293 beskriver analyse for HIV-1 gruppe O ved anvendelse av minst et GP41 peptid.

Det er faktisk umulig ut fra den genetiske variabilitet som isolatene av gruppe O virus viser, å garantere serologisk screening av infiserte individer ved å benytte antigener avledet fra ett og samme isolat. Dette betyr at det ikke er mulig å oppnå reagenser som garanterer 100% følsomhet. O-gruppen skaper dermed for første gang, et vesentlig problem, idet det ikke er mulig for enkelte serologiske reagenser å gjenkjenne individer infisert med særlig avvikende grupper eller subtyper. Dette er akkurat tilfellet for gruppe O HIV-1 virus.

Søknad WO 96/40763 understreker også den store divergens i O-gruppen. Søknaden beskriver peptider som i en naturlig HIV-1 type B-sekvens inkorporerer noen få mindre modifikasjoner (erstatning av én eller to aminosyrer). Ifølge denne søknaden er disse hybridpeptidene i stand til å reagere med antigruppe O-antistoffer.

Søknad WO 96/27013 beskriver en rekke nye gruppe O HIV-1 virus betegnet BCF 01, BCF 02, BCF 03, BCF 06, BCF 07, BCF 08, BCF 09, BCF11, BCF12, BCF13 og BCF14, så vel som en rekke peptider av den tilsvarende gp41 dominante region som betegnes ESS/BCF02, FAN/BCF01, LOB/BCF06, MAN/BCF07, NKO/BCF08, POC/BCF03, NAN/BCF11, BCF09, BCF12, BCF13 og BCF14. Flere av disse peptidene er vanskelige å håndtere diagnostisk på grunn av deres lave løselighet, spesielt peptidet BCF13.

Det har nå uventet vist seg at enkelte syntetiske peptider er diagnostiske reagenser av overlegen kvalitet som gjør det mulig å tilfredsstillende foreta screening av pasienter infisert med gruppe O HIV-1 retrovirus. Disse peptidene er sammensatt av variable sekvenser koordinert omkring høyt konserverte korte sekvenser som

forekommer i isolater av gruppe 0 HIV-1 retrovirus. Peptidene ifølge oppfinnelsen gjør det mulig å oppnå resultater som er ganske overlegne i forhold til de oppnådd med syntetiske peptider som bærer immundominante epitoper av gp41 (env) av visse gruppe 0 HIV-1 isolater.

5 For i det følgende å navngi aminosyrene, vil tre-bokstavsnomenklaturen bli benyttet.

Det syntetiske peptidet ifølge oppfinnelsen er kjennetegnet ved at det inkluderer eller består av én av sekvensene SEKV ID NR: 2, 3, 10, 11, 12, 14, 15, 16.

10 Det syntetiske peptidet er videre kjennetegnet ved at det består av en av sekvensene SEKV ID NR: 2, 3, 10, 11, 12, 14, 15 og 16.

Peptidene med de følgende sekvensene er angitt i henhold til én- og tre-bokstavsnomenklaturen:

15 **Sekvens Nr. 1:**

-LLSLWGCRGKAVCYTSVQWNET-

eller

-Leu Leu Ser Leu Trp Gly Cys Arg Gly Lys Ala Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn

1

5

10

15

20

20 Glu Thr-

22

Sekvens Nr. 2:

-LLSLWGCRGRLVCYTSVQWNET-

25 eller

-Leu Leu Ser Leu Trp Gly Cys Arg Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn

1

5

10

15

20

Glu Thr-

22

30

Sekvens Nr. 3:

-LLSSWGCKGRLVCYTSVQWNET-

eller

-Leu Leu Ser Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn

4

1 5 10 15 20
Glu Thr-
22

5 **Sekvens Nr. 4:**

-LLSSWGCKGRLVCYTSVQWNST-

eller

-Leu Leu Ser Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn

1 5 10 15 20

10 Ser Thr-

22

Sekvens Nr. 5:

-LLQSWGCKGRLVCYTSVQWNST-

15 eller

-Leu Leu Gln Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn

1 5 10 15 20

Ser Thr-

22

20

Sekvens Nr. 6:

-LLNSWGCRGKAVCYTSVQWNET-

eller

-Leu Leu Asn Ser Trp Gly Cys Arg Gly Lys Ala Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn

25 1 5 10 15 20

Glu Thr-

22

Sekvens Nr. 7:

30 -LLSLWGCRGRAVCYTSVQWNET-

eller

-Leu Leu Ser Leu Trp Gly Cys Arg Gly Arg Ala Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn

1 5 10 15 20

Glu Thr-

22

Sekvens Nr. 8:

-LLSSWGCRGRLVCYTSVQWNET-

5 eller

-Leu Leu Ser Ser Trp Gly Cys Arg Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn

1

5

10

15

20

Glu Thr-

22

10

Sekvens Nr. 9:

-LLSSWGCKGRLVCYTS-

eller

-Leu Leu Ser Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser

15

1

5

10

15

Sekvens Nr. 10:

-LLNSWGCKGRLVCYTS-

eller

20 -Leu Leu Asn Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser

1

5

10

15

Sekvens Nr. 11:

-ALETLLQNQQLLSWGCRGRLVCYTSVRWNET-

25 eller

-Ala Leu Glu Thr Leu Leu Gln Asn Gln Gln Leu Leu Asn Ser Trp Gly Cys Arg Gly

1

5

10

15

Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Arg Trp Asn Glu Thr-

20

25

30

30

Sekvens Nr. 12:

-ALETLLQNQQLLNWGCGRGRLVCYTSVRWNET-

eller

-Ala Leu Glu Thr Leu Leu Gln Asn Gln Gln Leu Leu Asn Ile Trp Gly Cys Arg Gly

1 5 10 15

Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Arg Trp Asn Glu Thr-

20 25 30

5

Sekvens Nr. 13:

-ALETLLQNQQLLDLWGCRGRLVCYTSVRWNET-

eller

-Ala Leu Glu Thr Leu Leu Gln Asn Gln Gln Leu Leu Asp Leu Trp Gly Cys Arg Gly

10 1 5 10 15

Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Arg Trp Asn Glu Thr-

20 25 30

Sekvens Nr. 14:

15 -LNQQRLLNSWGCKGRLVCYTSV-

eller

-Leu Asn Gln Gln Arg Leu Leu Asn Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr

1 5 10 15

Thr Ser Val-

20 20

Sekvens Nr. 15:

-RALETLLNQQRLLNSWGCKGRLVCYTSV-

eller

25 -Arg Ala Leu Glu Thr Leu Leu Asn Gln Gln Arg Leu Leu Asn Ser Trp Gly Cys Lys

1 5 10 15

Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val-

20 25

30 **Sekvens Nr. 16:**

-RLNSWGCKGRLVCYTSV-

eller

-Arg Leu Asn Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val-

1 5 10 15

De syntetiske peptidene nedenfor er særlig foretrukne peptider:

5

Peptid Nr. 2 (3B): SEKV. ID. NR:2

LLSLWGCRGRLVCYTSVQWNET

eller

Leu Leu Ser Leu Trp Gly Cys Arg Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn

10 1 5 10 15 20

Glu Thr

22

Peptid Nr. 3 (4B): SEKV. ID. NR:3

15 LLSSWGCKGRLVCYTSVQWNET

eller

Leu Leu Ser Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln

1 5 10 15

Trp Asn Glu Thr

20 20 22

Peptid Nr. 6: SEKV. ID. NR:6

LLNSWGCRGKAVCYTSVQWNET

25 eller

Leu Leu Asn Ser Trp Gly Cys Arg Gly Lys Ala Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn

1 5 10 15 20

Glu Thr

22

30

Peptid Nr. 7: SEKV. ID. NR:7

LLSLWGCRGRAVCYTSVQWNET

eller

Leu Leu Ser Leu Trp Gly Cys Arg Gly Arg Ala Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn
 1 5 10 15 20
 Glu Thr
 22

5

Peptid Nr. 10 (14B): SEKV. ID. NR:10

LLNSWGCKGRLVCYTS

eller

Leu Leu Asn Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser

10 1 5 10 15

Peptid Nr. 11 (18B): SEKV. ID. NR:11

ALETLLQNQQLNSWGCRGRLVCYTSSVRWNET

eller

15 Ala Leu Glu Thr Leu Leu Gln Asn Gln Gln Leu Leu Asn Ser Trp Gly Cys Arg Gly

1 5 10 15

Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Arg Trp Asn Glu Thr

20 25 30

Peptid Nr. 12 (19B): SEKV. ID. NR:12

ALETLLQNQQLLNIWGCRGRLVCYTSSVRWNET

eller

Ala Leu Glu Thr Leu Leu Gln Asn Gln Gln Leu Leu Asn Ile Trp Gly Cys Arg Gly

1 5 10 15

25 Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Arg Trp Asn Glu Thr

20 25 30

Peptid Nr. 14 (21B): SEKV. ID. NR:14

LNQQRLNSWGCKGRLVCYTSTV

30 eller

Leu Asn Gln Gln Arg Leu Leu Asn Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr

1 5 10 15 20

Ser Val

Peptid Nr. 15 (22B): SEKV. ID. NR:15

RALETLLNQQRLLNSWGCKGRLVCYTSV

eller

5 Arg Ala Leu Glu Thr Leu Leu Asn Gln Gln Arg Leu Leu Asn Ser Trp Gly Cys Lys

1

5

10

15

Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val

20

25

10 **Peptid Nr. 16 (23B): SEKV. ID. NR:16**

RLNSWGCKGRLVCYTSV

eller

Arg Leu Asn Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val

1

5

10

15

15

Foreliggende oppfinnelse vedrører videre blanding kjennetegnet ved at den inneholder én eller flere syntetiske peptider ifølge krav 1 eller 2. Det er videre beskrevet blanding kjennetegnet ved at den inneholder én eller flere syntetiske peptider ifølge krav 1 eller 2 og én eller flere gruppe O HIV-1-rekombinante peptider.

- 5 Foreliggende oppfinnelse vedrører også blanding som inneholder én eller flere syntetiske peptider ifølge krav 1 eller 2 og én eller flere HIV-1 og HIV-2-rekombinante peptider eller syntetiske peptider. Oppfinnelsen beskriver videre immunoassaymetode som gjør bruk av ett eller flere syntetiske peptider ifølge et hvilket som helst av kravene 1 eller 2. Immunoassaymetoden ifølge foreliggende
- 10 oppfinnelse gjør bruk av en blanding ifølge et hvilket som helst av kravene 3 til 5. Foreliggende oppfinnelse vedrører også et diagnostiseringssett kjennetegnet ved at det inkluderer minst ett syntetisk peptid, ifølge krav 1 eller 2, eller en blanding ifølge et hvilket som helst av kravene 3 til 5.

- De syntetiske peptidene som er gjenstand for foreliggende oppfinnelse, kan
- 15 oppnås ved fastfast-syntese i henhold til konvensjonelle metoder: R.B. Merrifield, **J. Amer. Chem. Soc.** (1963), **85**, s. 2149-2154; R.C. Sheppard, i «Peptides 1971», Nesvadba, H. (red.) North Holland, Amsterdam, s. 111; E. Atherton & R.L. Sheppard, i «Solid phase peptide synthesis, a practical approach», IRL PRESS, (1989), Oxford University Press, s. 25-34. Som automatisk syntesemaskin er det mulig å benytte
- 20 syntesemaskinen «9050 Plus Pep Synthesizer» fra Millipore eller en tilsvarende syntesemaskin.

- Den faste bæreren som benyttes for syntesen bør være forenelig med den anvendte teknikk og kjemi. For en syntese på syntesemaskinen «9050 Plus Pep. Synthesizer» er det for eksempel anbefalt å benytte en harpiks egnet for den såkalte
- 25 «continuous flow»-teknikk. Disse kriterier oppfylles av PEG PS harpiksene. Disse bærerne består av en arm («spacer») basert på polyetylenglykol (PEG) anbragt mellom polystyrenkulenes funksjonelle gruppe og tilkoblingspunktet for den første aminosyre. Naturen av dette forankringspunkt kan variere med hvilken C-terminal funksjonell gruppe som velges. I foreliggende tilfelle ble det benyttet forskjellige
- 30 PEG-PS harpikser.

Utgangsharpikset og aminosyrene benyttet som råmaterialer, er produkter som er kommersielt tilgjengelige (PerSeptive-Biosystem eller Neosystem).

For peptidsyntesen kan følgende beskyttelsesgrupper for sidekjedene benyttes:

Aminosyrer	Beskyttelsesgruppe
Arginin	Pentametyl-2,2,4,6,7-dihydrobenzofuran-5-sulfonyl (Pbf)
5 Asparagin, glutamin	Trityl (Trt)
Cystein	Trityl (Trt) eller Acetamidometyl (Acm)
Serin, treonin, tyrosin	tert-butyl-eter (tBu)
Lysin, tryptofan	tert-butylloksykarbonyl (Boc)

10 Den temporære beskyttelse av den primære funksjonelle aminogruppe i aminosyrenes α -stilling som benyttes, er 9-fluorenylmetyloksykarbonyl (Fmoc) gruppen. Avbeskyttelsen foretas med en 20% løsning av piperidin i dimetylformamid.

For koblingen benyttes fortrinnsvis et overskudd av diisopropylkarbodiimid (DIPCDI) og 1-hydroksybenzotriazol (HOBt).

15 Etter syntese vaskes harpiksen med organiske løsningsmidler (dimetylformamid og deretter med diklormetan), tørkes under vakuum og behandles deretter med en løsning på trifluoreddiksyrebasis (TFA) avkjølt til 0°C og som inneholder passende «oppfangere». For eksempel kan K-reagenset som inneholder 82% trifluoreddiksyre, 5% fenol, 5% vann, 5% tioanisol og 3% etanditol, benyttes.

20 Etter frafiltrering av harpiksen utfelles de syntetiske peptidene og renses med eter.

De syntetiske peptidene renses deretter ved omvendt-fase væskekromatografi og renheten bestemmes ved massespektrometri. Som fastfase er det for eksempel mulig å benytte Bondapak C-18 fasen. Peptidene elueres ved å etablere en lineær gradient mellom to bufferløsninger, hvorav den første i det vesentlige er vandig (for 25 eksempel vann-TFA 0,1%) og den andre er mer organisk (for eksempel en blanding inneholdende 60% acetonitril, 39,92% vann og 0,08% TFA). De oppsamlede fraksjoner kombineres, konsentreres under vakuum og frysetørkes.

For cycliseringen løses de rensede syntetiske peptidene i en ammonium-acetatløsning (10 mM). pH justeres til 8,5 ved tilsetning av 1M ammoniumhydroksyd. 30 Løsningen omrøres kraftig. Cycliseringen er fullført etter 18 timer. Deretter reduseres pH til 6 ved tilsetning av eddiksyre. De cycliserte peptidene frysetørkes og renses deretter ved omvendt-fase væskekromatografi som beskrevet ovenfor.

Immunreaktiviteten av peptidene ifølge oppfinnelsen ble evaluert ved hjelp av sera fra pasienter hovedsakelig av Kamerunsk opprinnelse, infisert med gruppe 0 HIV-1 retrovirus. De forskjellige foretatte tester viste at peptidene ifølge oppfinnelsen, alene eller i kombinasjon (blanding av peptider) gjør det mulig å påvise 100% av sera infisert med gruppe 0 HIV-1 retrovirus.

De syntetiske peptidene ifølge oppfinnelsen finner derfor anvendelse i immunologiske tester for screening av infeksjoner som følge av gruppe 0 HIV-1 retrovirus. Det er også mulig å benytte kombinasjoner av flere syntetiske peptider.

De syntetiske peptidene ifølge oppfinnelsen kan også benyttes i kombinasjon med andre HIV-2 og/eller HIV-1 rekombinante (rekombinante proteiner) eller syntetiske peptider, så som de peptidene som er beskrevet i patentsøknader eller patenter EP 0.387.914, EP 0.239.425, EP 0.220.273 eller EP 0.267.802.

De følgende eksempler illustrerer oppfinnelsen.

EKSEMPEL 1:

Fremstilling av en forbindelse ifølge oppfinnelsen: PEPTID Nr. 2 (3B)

LLSLWGCRGRLVCYTSVQWNET

eller

Leu Leu Ser Leu Trp Gly Cys Arg Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn

1 5 10 15 20

Glu Thr

22

Dette peptidet ble syntetisert på en fast fase. Teknikken utviklet i 1963 av Merrifield (J. Am. Chem. Soc. (1963) **85**, s. 2149-2154) består i å feste den første aminosyre til en polymer fast bærer (harpiks) ved hjelp av dens funksjonelle syregruppe og forlenge peptidsekvensen fra denne første aminosyre, idet peptidet som syntetiseres forblir forankret til harpiksen.

For syntesen av peptid Nr. 2 ble det som syntesemaskin benyttet «9050 Plus Pep Synthesizer» og som harpiks, harpikset Fmoc Thr (OtBu) PEG PS.

De forskjellige syntesetrinn er sammenfattet i Tabell I nedenfor:

Tabell I

	Amino- syre- rest	NH ₂ - beskyttelse	Sidekjede- beskyttelse	Koblings- metode	Antall ekv. - koblings- varighet
5	Glu	Fmoc	OtBu	DIPCDI/HOBt	5 ekv. - 30 min.
	Asn	Fmoc	Trt	DIPCDI/HOBt	5 ekv. - 30 min.
	Trp	Fmoc	Boc	DIPCDI/HOBt	5 ekv. - 30 min.
	Gln	Fmoc	Trt	DIPCDI/HOBt	5 ekv. - 30 min.
10	Val	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 ekv. - 30 min.
	Ser	Fmoc	tBu	DIPCDI/HOBt	5 ekv. - 30 min.
	Thr	Fmoc	tBu	DIPCDI/HOBt	5 ekv. - 30 min.
	Tyr	Fmoc	tBu	DIPCDI/HOBt	5 ekv. - 30 min.
	Cys	Fmoc	Trt	DIPCDI/HOBt	5 ekv. - 30 min.
15	Val	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 ekv. - 30 min.
	Leu	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 ekv. - 30 min.
	Arg	Fmoc	Pbf	DIPCDI/HOBt	5 ekv. - 30 min.
	Gly	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 ekv. - 30 min.
	Arg	Fmoc	Pbf	DIPCDI/HOBt	5 ekv. - 30 min.
20	Cys	Fmoc	Trt	DIPCDI/HOBt	5 ekv. - 30 min.
	Gly	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 ekv. - 30 min.
	Trp	Fmoc	Boc	DIPCDI/HOBt	5 ekv. - 30 min.
	Leu	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 ekv. - 30 min.
	Ser	Fmoc	tBu	DIPCDI/HOBt	5 ekv. - 30 min.
25	Leu	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 ekv. - 30 min.
	Leu	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 ekv. - 30 min.

Etter avsluttet syntese ble harpiksen vasket med dimetylformamid og deretter med diklormetan og tørket under vakuum.

Deretter ble harpiksen behandlet med K-reagenset (82% trifluoreddiksyre; 5% fenol; 5% vann; 5% tioanisol; 3% etandiol). Peptid Nr. 2 (3B), isolert ved utfelling

med dietyleter, ble deretter renset med det samme løsningsmiddel. 140 mg av peptid Nr. 2 (3B) ble derved oppnådd.

Peptid Nr. 2 (3B) ble deretter renset ved omvendt-fase væskekromatografi. Bondapak C-18 fasen ble benyttet som fastfase. Peptidene elueres ved å etablere en lineær gradient mellom to bufferløsninger, hvorav den første i det vesentlige er vandig (for eksempel vann-TFA 0,1%) og den andre er mer organisk (for eksempel en blanding inneholdende 60% acetonitril, 39,92% vann og 0,08% TFA). De oppsamlede fraksjoner ble kombinert, konsentrert under vakuum og frysetørket.

For cycliseringen ble de således oppnådde rensede syntetiske peptidene løst i en ammoniumacetatløsning (10 mM). pH ble justert til 8,5 ved tilsetning av 1M ammoniumhydroksyd. Løsningen ble omrørt kraftig. Cycliseringen var fullført etter 18 timer. Deretter ble pH redusert til 6 ved tilsetning av eddiksyre. De cycliserte peptidene ble frysetørket og deretter renset ved omvendt-fase væskekromatografi som beskrevet ovenfor.

Fremstilling av en forbindelse ifølge oppfinnelsen: PEPTID Nr. 15 (22B)

Dette peptid ble syntetisert som peptid Nr. 2 (3B), men med FmocPAL PEG-PS som harpiks.

De forskjellige syntesetrinn er sammenfattet nedenfor i Tabell II.

Tabell II

	Amino- syre- rest	NH ₂ - beskyttelse	Sidekjede- beskyttelse	Koblings- metode	Antall ekv. - koblings- varighet
5	Val	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 ekv. - 45 min.
	Ser	Fmoc	tBu	DIPCDI/HOBt	5 ekv. - 45 min.
	Thr	Fmoc	tBu	DIPCDI/HOBt	5 ekv. - 45 min.
	Tyr	Fmoc	tBu	DIPCDI/HOBt	5 ekv. - 45 min.
	Cys	Fmoc	Trt	DIPCDI/HOBt	5 ekv. - 45 min.
10	Val	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 ekv. - 45 min.
	Leu	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 ekv. - 45 min.
	Arg	Fmoc	Pbf	DIPCDI/HOBt	5 ekv. - 45 min.
	Gly	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 ekv. - 45 min.
	Lys	Fmoc	Boc	DIPCDI/HOBt	5 ekv. - 45 min.
15	Cys	Fmoc	Trt	DIPCDI/HOBt	5 ekv. - 45 min.
	Gly	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 ekv. - 45 min.
	Trp	Fmoc	Boc	DIPCDI/HOBt	5 ekv. - 45 min.
	Ser	Fmoc	tBu	DIPCDI/HOBt	5 ekv. - 45 min.
	Asn	Fmoc	Trt	DIPCDI/HOBt	5 ekv. - 45 min.
20	Leu	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 ekv. - 45 min.
	Leu	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 ekv. - 45 min.
	Arg	Fmoc	Pbf	DIPCDI/HOBt	5 ekv. - 45 min.
	Gln	Fmoc	Trt	DIPCDI/HOBt	5 ekv. - 45 min.
	Gln	Fmoc	Trt	DIPCDI/HOBt	5 ekv. - 45 min.
25	Asn	Fmoc	Trt	DIPCDI/HOBt	5 ekv. - 45 min.
	Leu	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 ekv. - 45 min.
	Leu	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 ekv. - 45 min.
	Thr	Fmoc	tBu	DIPCDI/HOBt	5 ekv. - 45 min.
	Glu	Fmoc	OtBu	DIPCDI/HOBt	5 ekv. - 45 min.
30	Leu	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 ekv. - 45 min.
	Ala	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 ekv. - 45 min.
	Arg	Fmoc	Pbf	DIPCDI/HOBt	5 ekv. - 45 min.

Etter avsluttet syntese ble harpiksen vasket med dimetylformamid og deretter med diklormetan og tørket under vakuum.

Deretter ble harpiksen behandlet med K-reagenset (82% trifluoreddiksyre; 5% fenol; 5% vann; 5% tioanisol; 3% etandiol). Peptid Nr. 7 (22B), isolert ved utfelling med dietyleter, ble deretter renset med det samme løsningsmiddel. 140 mg av peptid Nr. 15 (22B) ble derved oppnådd.

Peptid Nr. 15 (22B) ble deretter renset ved omvendt-fase væskekromatografi og deretter cyclisert, frysetrøket og renset som beskrevet ovenfor for peptid Nr. 2 (3B).

På samme måte og ved bruk av passende harpikser og aminosyrer, ble de øvrige forbindelsene ifølge oppfinnelsen syntetisert.

Tabell III angir molekylvekten av enkelte peptider med formel (I) i ikke-cyklisert form, fastslått ved massespektrometri.

Tabell III

	Peptid Nr.	Molekylvekt (Dalton)
20	1 (2B)	2512
	2 (3B)	2583
	3 (4B)	2528
	4 (5B)	2586
	5 (6B)	2527
25	9 (12B)	1772
	10 (14B)	1799
	11 (18B)	3752
	12 (19B)	3778
	13 (20B)	3780
30	14 (21B)	2538
	15 (22B)	3222
	16 (23B)	1941

EKSEMPEL 2:**Evaluering av immunreaktiviteten av peptidene ifølge oppfinnelsen ved hjelp av den immunenzymatiske test: Test Nr. 1**

5 De anvendte sera ESS, DUR, VAU og HAD er sera fra franske pasienter infisert med gruppe 0 HIV-1 retrovirus. De andre serumprøvene fra pasienter infisert med gruppe 0 HIV-1 retrovirus ble anskaffet fra Yaoundé Pasteur Centre i Kamerun og ble tilordnet serotypegruppe 0 ifølge den serologiske algoritmen beskrevet i **AIDS (1977), 11, s. 445-453.**

10 De HIV-negative sera (n=48) ble tatt fra friske forsøkspersoner.

De anvendte syntetiske peptidene ble løst i vann i en konsentrasjon på 1 mg/mL (stamløsning). For sensibiliseringstrinnet av den faste fase (belegging), ble 110 µL av en løsning på 2 µg/mL av hvert peptid (oppnådd ved å fortynne stamløsningen med 0,1M karbonat-bufferløsning) tilsatt til hver brønn i mikrotiterplatene Microtiter™ (NUNC). Etter inkubering ved romtemperatur over natten ble mikroplatene først vasket med en Tris-NaCl-bufferløsning, pH 7,4, inneholdende 0,1% Tween® 20 og 0,001% natrium-mertiolat og deretter mettet med en PBS-løsning inneholdende 0,5% Régilait™ (tørket skummet melk). Etter avsugning av metningsløsningen ble platene oppvarmet til 50°C i 10 minutter.

20 Serumprøvene ble fortynnet 1/5 med en skummetmelk-løsning (citrattbuffer supplert med 0,01% fenolrødt, 0,25% kloroform og 0,25% Kathon®), avsatt i brønnene i platen og inkubert ved 40°C i 30 minutter.

Etter vasking med en Tris-NaCl-bufferløsning, pH 7,4, inneholdende 0,1% Tween® 20 og 0,001% natrium-mertiolat, ble 100 µL av en løsning av konjugat bestående av pepperrot-peroksydase-merket anti-human-IgG og IgM-geit-antistoffer, som inneholdt som konserveringsmiddel 0,01% natrium-mertiolat, løst i en citrattbufferløsning supplert med 30% glycerol og 25% normalt føtalt kalveserum, tilsatt til hver brønn, hvorefter platene ble inkubert i 30 minutter ved 40°C.

30 Etter vasking med en Tris-NaCl-bufferløsning, pH 7,4, inneholdende 0,1% Tween® 20 og 0,001% natrium-mertiolat, ble farven fremkalt ved til hver brønn å tilsette 100 µL o-fenylendiamin løst i hydrogen-peroksyd. Mikroplatene ble deretter inkubert i 30 minutter ved romtemperatur og i mørke. Farvereaksjonen ble deretter

stanset ved tilsetning av 100 µL 4N svovelsyre. Absorbansen (A) ble bestemt ved 490 og 620 nm.

Den relative absorbans-avlesning (A₄₉₀-A₆₂₀) i hver brønn er proporsjonal med immunreaktiviteten av hvert peptid. Den indikerer hvert peptids evne til å reagere med den biologiske prøve som testen foretas med. Grenseverdien (cut-off) ble bestemt til en absorbansverdi på 0,15. Den tilsvarer gjennomsnittet av de negative verdiene (n=48) pluss 12 standardavvik.

Reaktiviteten av peptidene ifølge oppfinnelsen (peptid Nr. 3 (4B), peptid Nr. 2 (3B) og peptid Nr. 1 (2B), alle i cyclisert form), ble sammenlignet med reaktiviteten av to syntetiske peptider hvis sekvens hadde en del av den naturlige sekvens av envelope (env) av VAU-isolatet (gruppe 0 HIV-1 retrovirus) og som omfattet en immundominant epitop av gp41.

Disse to peptidene hadde følgende sekvens:

VAU 22 AA

Leu Leu Asn Leu Trp Gly Cys Lys Asn Arg Ala Ile Cys Tyr Thr Ser Val Lys Trp Asn
 1 5 10 15 20
 Lys Thr
 22

VAU 35 AA

Arg Leu Leu Ala Leu Glu Thr Phe Ile Glu Glu Asn Glu Leu Leu Asn Leu Trp Gly Cys
 1 5 10 15 20
 Lys Asn Arg Ala Ile Cys Tyr Thr Ser Val Lys Trp Asn Lys Thr
 25 30 35

For denne undersøkelsen ble disse peptidene benyttet i cyclisert form. Resultatene av undersøkelsen er angitt i Tabell IV.

Tabell IV

SERUM		ABSORBANS			
		Peptid	Peptid	Peptid	
		Nr. 3(4B)	Nr. 2(3B)	Nr. 1(2B)	
5	ESS*	>**	>	2,494	>
	DUR*	>	>	>	0,118
	HAD	>	0,518	0,041	0,789
	VAU*	1,342	>	>	>
	3935	>	0,893	0,307	0,138
10	6891	>	0,614	0,062	0,359
	6512*	0,746	0,785	>	0,120
	1105*	1,421	1,031	>	0,099
	4021*	0,430	0,119	>	0,050
	5969*	>	0,282	>	2,491
15	2700	>	0,274	>	>
	5453	0,555	0,081	>	1,267
	5931	>	>	>	0,202
	3136	>	0,992	0,302	>
	3653	1,352	>	0,044	1,441
20	2352	>	>	0,205	>
	3016	>	>	0,243	>
	3302	>	>	0,386	>
	2294	>	>	0,447	>
	3771	>	>	0,544	>
25	1581	>	>	>	1,112
	5373	>	>	>	1,359
	7443	>	>	>	0,920
	3637	>	>	>	0,779
	6295*	1,718	1,063	>	0,972
30	6689*	0,710	>	>	>
	1754	>	>	>	1,263
	4489*	>	>	>	1,318
	4364	>	>	1,382	>
	3884*	>	>	1,839	>
35	3529	>	>	1,803	>
	3482	2,402	>	1,473	>
	1702	>	>	1,162	>
	6487	>	1,017	2,687	2,889
	5164	>	>	>	>
40	5766*	>	>	>	>
	3945	>	>	>	>

* serotyper/genotyper

** > = signal høyere enn avlesningsmuligheten for spektrofotometeret.

Tabell IV (fortsatt)

SERUM		ABSORBANS			
		Peptid	Peptid	Peptid	
		Nr. 3(4B)	Nr. 2(3B9)	Nr. 1(2B)	
5	4434	>	>	>	2,273
	4288*	>	>	2,802	2,337
	6782	>	2,091	2,462	2,190
	2313	>	>	>	>
	2312	>	>	>	>
10	1062	>	>	>	>
	402	>	>	>	>
	134	>	>	>	>
	7120	>	>	>	>
	7212	>	>	>	>
15	6976*	>	>	>	>
	3600*	>	>	2,743	>
	3236	>	>	>	>
	3235	>	>	>	>
	2551	>	>	>	>
20	5270*	>	>	>	>
	5210	>	>	>	>
	5149*	>	>	>	>
	4477	>	>	>	2,511
	3891	>	>	2,780	>
25	3627*	>	>	2,910	>
	7258*	>	>	2,477	>
	7007	2,136	2,334	>	>
	6697	>	>	>	>
	6998	>	>	>	>
30	6627	>	>	>	>
	6198*	>	>	>	>
	6165	>	>	2,714	>
	7439	>	>	>	>
	7297*	>	>	>	>
35	6111	>	>	>	>
	625	>	>	>	2,885

* serotyper/genotyper

40 ** > = signal høyere enn avlesningsmuligheten for spektrofotometeret.

*** = Ikke testet

Resultatene i Tabell IV viser at peptid Nr. 3(4B) gir best resultat med hensyn til det som er angitt for de andre peptidene. Dette peptid skiller best mellom sera

fra pasienter infisert med gruppe 0 HIV-1 retrovirus sammenlignet med de to peptidene som har en del av sekvensen av det VAU-isolat som tilsvarer den immundominante epitop av gp41. Peptid Nr. 2 (3B) og Nr. 1 (2B) er dessuten mer immunreaktive enn VAU 22AA peptidet som omfatter det samme antall aminosyrer.

5

EKSEMPEL 3:

Evaluerings av immunreaktiviteten av peptidene ifølge oppfinnelsen ved hjelp av en immunenzyrisk test, Test Nr. 2.

Serumprøver fra pasienter infisert med gruppe 0 HIV-1 retrovirus ble anskaffet fra Yaoundé Pasteur Centre i Kamerun og ble tilordnet serotype gruppe 0 ifølge den serologiske algoritme beskrevet i **AIDS** (1977), 11, s. 445-453. En genotypet prøve (Maryland) ble anskaffet fra USA. Disse prøver ble på forhånd fortynnet i negativt humant serum i de fortynninger som er angitt i Tabell V for å oppnå et tilstrekkelig volum for de ulike immunreaktivitetstestene.

De anvendte syntetiske peptidene ble løst i vann i en konsentrasjon på 1 mg/mL (stamløsning). For sensibiliseringstrinnet av den faste fase (belegging), ble fremgangsmåten beskrevet i Eksempel 2 benyttet.

Serumprøvene ble fortynnet 1/5 med en skummetmelk-løsning (citratbuffer supplert med 0,01% fenolrødt, 0,25% kloroform og 0,25% Kathon®), avsatt i platebrønnene og inkubert i 30 minutter ved 40°C.

Etter vasking med en Tris-NaCl-bufferløsning, pH 7,4, inneholdende 0,1% Tween® 20 og 0,001% natrium-mertiolat, ble 100 µL av en løsning av konjugat bestående av pepperrot-peroksydase-merket anti-human-IgG og IgM-geit-antistoffer, som inneholdt som konserveringsmiddel 0,01% natrium-mertiolat, løst i en citratbufferløsning supplert med 30% glycerol og 25% normalt føtalt kalveserum, tilsatt til hver platebrønn, hvoretter platene ble inkubert i 30 minutter ved 40°C.

Etter vasking med en Tris-NaCl-bufferløsning, pH 7,4, inneholdende 0,1% Tween® 20 og 0,001% natrium-mertiolat, ble farven fremkalt som beskrevet i Eksempel 2.

Den relative absorbans-avlesning (OD) (A490-A620) i hver brønn er proporsjonal med immunreaktiviteten av hvert peptid. Den indikerer hvert peptids evne til å reagere med den biologiske prøve som testen foretas med.

Reaktiviteten av peptidene ifølge oppfinnelsen, peptidene Nr. 10 (14B), Nr. 11 (18B), Nr. 12 (19B), Nr. 14 (21B), Nr. 15 (22B), Nr. 16 (23B), alle i cyclisert form, ble sammenlignet med reaktiviteten av tre homologe syntetiske peptider hvis sekvens hadde en del av den naturlige sekvens av envelope (env) av et gruppe O HIV-1 retrovirus. Disse peptidene er to peptider avledet fra VAU-isolatet - peptidet VAU 22 AA og peptidet VAU 35 AA - og peptidet MVP 5180 (betegnet «MVP 5180» i Tabell V). Peptidene VAU 22AA og VAU 35 AA (hvis struktur er angitt i Eksempel 2) og peptidet MVP 5180 omfatter en immundominant epitop av gp41.

Alle disse peptidene ble benyttet i cyclisert form. Sekvensen av MVP 5180 peptidet er følgende:

MVP 5180

Arg Leu Gln Ala Leu Glu Thr Leu Ile Gln Asn Gln Gln Arg Leu Asn Leu Trp Gly Cys

1 5 10 15 20

Lys Gly Lys Leu Ile Cys Tyr Thr Ser Val Lys Trp Asn Thr Ser

25 30 35

Resultatene av denne undersøkelse er angitt i Tabell V

Tabell V
PEPTIDER*

	Nr. 10	Nr. 11	Nr. 12	Nr. 14	Nr. 15	Nr. 16	MVP	VAU	VAU
							5180	35 AA	22 AA
5 SERUM	ABSORBANS (OD)								
	4280	0,022	0,686	0,201	0,286	0,689	0,033	0,382	0,013 0,021
	ved 1/50								
	NGO	0,067	0,335	0,193	0,157	0,315	0,110	0,184	0,055 0,040
10	ved 1/50								
	NJEM	0,032	0,811	0,391	0,277	0,939	0,025	0,146	0,159 0,024
	ved 1/100								
	MBASSI	1,217	1,150	0,747	2,134	2,010	2,683	0,248	0,120 0,257
	ved 1/100								
15	WANG	0,698	0,234	0,124	2,397	2,680	1,290	0,075	0,025 0,041
	ved 1/50								
	258 OUDI	0,587	0,373	0,226	0,764	1,184	1,692	0,116	0,058 0,100
	ved 1/100								
	DO15	1,613	0,859	1,286	3,357	3,693	3,038	0,673	0,036 0,075
20	ved 1/100								
	DJOU	1,268	0,482	0,419	1,998	2,088	2,166	0,203	0,022 0,042
	ved 1/100								
	3600	0,482	0,360	0,249	0,716	0,801	0,933	0,206	0,025 0,058
	ved 1/100								
25	3613	1,108	0,837	0,773	1,508	1,627	1,679	0,478	0,250 0,396
	ved 1/400								
	6111	0,596	0,348	0,202	0,850	1,207	1,009	0,226	0,087 0,180
	ved 1/100								
	625	0,838	0,338	0,264	2,045	2,122	1,791	0,202	0,069 0,165
30	ved 1/50								
	Maryland	0,524	0,370	0,285	0,734	0,844	1,229	0,241	0,054 0,168
	ved 1/400								
	3653	0,347	0,337	0,247	0,072	0,380	0,406	0,401	0,021 0,310
	ved 1/10								

35

FASTFASE*: PEPTID 2 µg/mL

For hvert undersøkt peptid ble prøvene ordnet i fire klasser (a, b, c og d) tilsvarende ulike nivåer av relativ absorbans avlest ved bølgelengdene A492-A620:

- for a: $OD < 0,100$,
- for b: $0,100 < OD < 0,500$,
- for c: $0,500 < OD < 1,000$,
- for d: $OD > 1,000$

som gjør det mulig å vurdere peptidenes immunreaktivitetsgrad. De mest immunreaktive peptidene er de som har det høyeste antall prøver i de klasser som tilsvarer de høyeste absorbansverdier.

Resultatene er angitt i Tabell VI.

Tabell VI
PEPTIDER*

	Nr. 10	Nr. 11	Nr. 12	Nr. 14	Nr. 15	Nr. 16	MVP	VAU	VAU
							5180	35 AA	22 AA
KLASSE									
	ANTALL PRØVER								
A	3	0	0	1	0	2	1	11	7
B	2	9	11	3	2	2	12	3	7
C	5	4	2	4	4	1	1	0	0
D	4	1	1	6	8	9	0	0	0

Fastfase*: PEPTID 2 µg/mL

Det fremgår av resultatene at alle undersøkte peptider ifølge oppfinnelsen gir en bedre immunreaktivitet enn de tidligere kjente referansepeptider, som skriver seg fra naturlige isolater (MVP 5180, VAU). Peptidene Nr. 15 (22B), Nr. 14 (21B) og Nr. 16 (23B) ifølge oppfinnelsen viser seg å være de mest immunreaktive.

EKSEMPEL 4:**Evaluerings av immunreaktiviteten av blandinger inneholdende peptider ifølge oppfinnelsen ved hjelp av en immunenzymatisk test**

Denne test ble foretatt i henhold til fremgangsmåten beskrevet i Eksempel 2,
5 og de samme sera ble benyttet. De anvendte mikropelatene ble sensibilisert enten med peptid Nr. 1 (2B) cyclisert, eller med peptid Nr. 3 (4B) cyclisert, eller med en blanding inneholdende disse to peptidene (1:1 vektdeler). I hver brønn ble det avsatt enten 100 µL av en løsning inneholdende 2 µg/mL av peptid Nr. 1 (2B), eller 100 µL av en løsning inneholdende 2 µg/mL av peptid Nr. 3 (4B) eller 100 µL av en løsning
10 inneholdende 1 µg/mL av peptid Nr. 1 (2B) og 1 µg/mL av peptid Nr. 3 (4B). Resultatene av denne test er angitt i Tabell VII.

Tabell VII
ABSORBANS

SERUM			
	Peptid Nr. 1(2B) (2 µg/mL)	Peptid Nr. 3 (4B) (2 µg/mL)	Peptid Nr. 1 (2B) (1 µg/mL) + Peptid Nr. 3 (4B) (1 µg/mL)
5			
	3529	1,803	>*
	1105	>	1,421
	3891	2,780	>
10	3235	>	>
	2700	>	>
	5931	>	>
	3935	0,307	>
	7443	>	>
15	1062	>	>
	1754	>	>
	3136	0,302	>
	6891	0,062	>
	5149	>	>
20	5270	>	>
	2551	>	>
	3600	2,743	>
	6976	>	>
	4489	>	>
25	6165	2,714	>
	6198	>	>
	6627	>	>
	6998	>	>
	6697	>	>
30	7258	2,477	>
	3627	2,910	>
	4477	>	>
	3771	0,544	>
	1702	1,016	>
35	2294	0,447	>
	2352	0,205	>
	3016	0,243	>
	3302	0,386	>
	3482	1,473	>
40	3653	0,044	1,322
	4364	1,382	>
	3637	>	>
	4288	2,802	>
	5969	>	>
45	258	>	>

* > = signal større enn avlesningsmuligheten av spektrofotometeret

Tabell VII (fortsatt)

SERUM	ABSORBANS		
	Peptid Nr. 1(2B) (2 µg/mL)	Peptid Nr. 3 (4B) (2 µg/mL)	Peptid Nr. 1 (2B) (1 µg/mL) + Peptid Nr. 3 (4B) (1 µg/mL)
5	6111	>	>
	625	>	>
10	6853	2,769	>
	3136	0,302	>
	6689	0,710	>
	6295	1,718	>
	4021	0,430	2,381
15	3884	1,839	>
	6512	0,746	>
	6487	2,687	>
	ESS	2,494	>
	HAD	0,041	>
20	DUR	>	>

* > = signal større enn avlesningsmuligheten av spektrofotometeret.

Tabell VII viser at blandningene av peptidene ifølge oppfinnelsen, når de benyttes diagnostisk, tillater påvisning av alle sera fra pasienter infisert med gruppe 0 HIV-1 retrovirus.

Patentkrav

1. Syntetisk peptid, k a r a k t e r i s e r t v e d at det inkluderer eller består av én av sekvensene SEKV ID NR: 2, 3, 10,11,12, 14, 15, 16.

5

2. Syntetisk peptid ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at det består av en av sekvensene SEKV ID NR: 2, 3, 10, 11, 12, 14, 15 og 16.

10

3. Blanding, k a r a k t e r i s e r t v e d at den inneholder én eller flere syntetiske peptider ifølge krav 1 eller 2.

15

4. Blanding, k a r a k t e r i s e r t v e d at den inneholder én eller flere syntetiske peptider ifølge krav 1 eller 2 og én eller flere gruppe O HIV-1-rekombinante peptider.

20

5. Blanding, k a r a k t e r i s e r t v e d at den inneholder én eller flere syntetiske peptider ifølge krav 1 eller 2 og én eller flere HIV-1 og HIV-2-rekombinante peptider eller syntetiske peptider.

6. Immunoassaymetode, k a r a k t e r i s e r t v e d at den gjør bruk av ett eller flere syntetiske peptider ifølge et hvilket som helst av kravene 1 eller 2.

25

7. Immunoassaymetode, k a r a k t e r i s e r t v e d at den gjør bruk av en blanding ifølge et hvilket som helst av kravene 3 til 5.

8. Diagnostiseringssett, k a r a k t e r i s e r t v e d at det inkluderer minst ett syntetiske peptid, ifølge krav 1 eller 2, eller en blanding ifølge et hvilket som helst av kravene 3 til 5.