

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 970301 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **970301**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/92 (2006.01)

C07K 14/16 (2006.01)

C07K 14/18 (2006.01)

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **24.07.1995**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **24.01.1997**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **24.03.1997**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - **24.07.1995** **PCT/EP1995/002919**
Internationell ansökan - International
application

(32) (33) (31) Etuokeus - Prioritet - Priority

25.07.1994 DE 4426276

31.08.1994 DE 4430972

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •Roche Diagnostics GmbH, Sandhofer Strasse 116, 68298 Mannheim, SAKSA, (DE)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Wienhues, Ursula-Henrike, Germany, SAKSA, (DE)

2 •Kruse-Müller, Cornelia, Germany, SAKSA, (DE)

3 •Höss, Eva, Germany, SAKSA, (DE)

4 •Faatz, Elke, Germany, SAKSA, (DE)

5 •Ofenloch-Hähle, Beatus, Germany, SAKSA, (DE)

6 •Seidel, Christoph, Germany, SAKSA, (DE)

7 •Wiedmann, Michael, Penzberg, SAKSA, (DE)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Berggren Oy Ab, Antinkatu 3 C, 00100 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Spesifisen immunoglobuliinin määrittäminen käyttäen useampaa antigeeni a

Bestämning av en specifik immunoglobulin genom användning av flera ant igener

Spesifisen immunoglobuliinin määrittäminen moninkertaisia antigeenejä käyttäen - Bestämning av en specifik immunglobulin under användning av multipla antigener

5

Kuvaus

Keksintö koskee menetelmää spesifisen immunoglobuliinin määrittämiseksi käyttäen antigeenejä, jotka käsittävät useampia epitooppialueita.

10

Immunoglobuliinien osoitusta kehonesteistä, erityisesti ihmisseerumeista, käytetään mikro-organismeilla, erityisesti viruksilla, kuten mahdollisesti HIV:llä, hepatiittiviruksilla ja vastaavilla tapahtuneiden infektioiden diagnostiikkaan. Spesifisten immunoglobuliinien esiintyminen tutkittavassa näytteessä osoitetaan tavallisesti reaktiolla yhdellä tai usealla antigeenillä, jotka reagoivat spesifisten immunoglobuliinien kanssa. Menetelmien spesifisten immunoglobuliinien määrittämiseen näytteenäytteessä on oltava herkkiä, luotettavia, yksinkertaisia ja nopeita.

20

Viime vuosina on kasvavassa määrin kehitetty ei-radioaktiivisiin merkkiryhmiin perustuvia osoitusjärjestelmiä, joissa on voitu osoittaa analyysin, esimerkiksi spesifisen vasta-

25

aineen läsnäolo tutkitussa näytteessä optisten (esimerkiksi luminenssi- tai fluoresenssi-), NMR-aktiivisten tai metallisaostavien detektiojärjestelmien avulla.

30

Julkaisussa EP-A-0 307 149 paljastetaan vasta-aineelle tarkoitettu immuunitesti, jossa käytetään kahta yhdistelmä-DNA-polypeptidiä antigeeneinä, joista toinen on immobilisoitu kiinteälle faasille, ja toisessa on merkkiryhmä, jolloin molemmat yhdistelmä-DNA-antigeenit ekspressoidaan eri organismeissa osoituksen spesifisyyden kohottamiseksi.

35

Julkaisussa EP-A-0 366 673 paljastetaan menetelmä vasta-aineiden osoittamiseksi näytteestä, jossa vasta-aine osoite-

taan reaktiolla puhdistetun, merkityn antigeenin ja saman, kiintofaasiin sidotussa muodossa olevan puhdistetun antigeenin kanssa. Antigeeninä paljastetaan esimerkiksi ihmis-IgG.

5 Julkaisussa EP-A-0 386 713 paljastetaan menetelmä HIV:n vastaisten vasta-aineiden osoittamiseksi käyttämällä kahta kiinteää kantajaa, jolloin molemmille kiinteille kantajille immobilisoidaan eri HIV-antigeneja, jotka saatetaan kulloinkin kontaktiin erän kanssa näytettä ja merkittyä HIV-
10 antigeeniä, jolloin vasta-aineiden läsnäolo osoitetaan positiivisella reaktiolla ainakin toisessa testeistä. HIV-antigeneina paljastetaan yhdistelmä-DNA-tekniikalla valmistetuja polypeptidejä.

15 Julkaisussa EP-A-0 507 586 kuvataan menetelmä immunologisen testin suorittamiseksi spesifiselle immunoglobuliinille, jossa näyte saatetaan kontaktiin kahden antigeenin kanssa, jotka pystyvät sitomaan immunoglobuliinin, jolloin ensimmäisessä antigeenissä on kiinteälle kantajalle kiinnittämiseen
20 sopiva ryhmä, ja toisessa antigeenissä on merkkiryhmä. Merkkiryhmä voi olla suora merkkiryhmä, esimerkiksi entsyymi, kromogeeni, metallihiukkanen, tai myös epäsuora merkkiryhmä, ts. antigeeniin kiinnitetty merkkiryhmä voi reagoida merkkiryhmän reseptorin kanssa, jossa puolestaan on signaalin muodostava ryhmä. Esimerkkinä sellaisesta epäsuorasta merkkiryhmästä mainitaan fluoreseiini johdannainen, jonka reseptori on vasta-aine, joka puolestaan on kytketty entsyymiin kanssa. Antigeneina paljastetaan polypeptidejä, kuten mahdollisesti hepatiitti B-pinta-antigeeni. Tähän antigeeniin lisätään
30 derivatisoimalla SH-ryhmiä, joilla fluoreseiini kytketään.

Julkaisussa EP-A-0 507 587 paljastetaan spesifisesti IgM-vasta-aineiden osoittamiseen sopiva menetelmä, jossa näytettä inkuboidaan merkityn antigeenin kanssa, joka on suunnattu osoitettavaa vasta-ainetta vastaan, ja toisen vasta-aineen kanssa, joka samoin on suunnattu osoitettavaa vasta-ainetta vastaan ja pystyy kiinnittymään kiinteälle faasille.

Tekniikan tasolla tunnetuilla siltatestikonseptin mukaisilla immunologisilla osoitusmenetelmillä, joissa käytetään merkittyä antigeeniä ja kiintofaasille sitoutumaan pystyvää antigeeniä, on kuitenkin huomattavia heikkouksia. Erityisesti havaitaan vähäinen herkkyys, kun määritettävän vasta-ai-
 5 neen ja antigeenin välillä on suhteellisen vähäinen affiniteetti. Tämä on tapaus erityisesti infektoivan mikro-organismin vasta hiljattain onnistuneen serokonversion ja/tai uusien alatyyppejen ilmaantuesssa. Edelleen eräs tähän asti
 10 tunnettujen siltatestikonseptien haitta on korkeatiitteristen näytteiden väärän negatiivisen arvioinnin vaara Hook-efektin vuoksi.

Täten keksinnön perustana oleva ongelma oli aikaansaada
 15 menetelmä spesifisten vasta-aineiden osoitukseen, jolla menetelmällä voitetaan tekniikan tason haitat ainakin osaksi, ja jolla on erityisesti vasta äskettäin tapahtuneiden serokonversioiden ja uusien mikro-organismialatyyppejen kohdalla riittävä herkkyys. Lisäksi keksinnön mukaisella mene-
 20 telmällä on saavutettava Hook-efektin pieneminen.

Tämä ongelma ratkaistaan menetelmällä spesifisen vasta-ai-
 neen immunologiseen määrittelykseen näytenesteessä, jolloin
 näytenestettä inkuboidaan kiintofaasin läsnä ollessa kahden,
 25 määritettävää vasta-ainetta vastaan suunnatun vasta-aineen kanssa, jolloin ensimmäisessä antigeenissä on vähintään yksi merkitsemisryhmä ja toinen antigeeni (a) on sidottu kiintofaasille tai (b) on kiintofaasille sitoutumaan pystyvässä muodossa, ja osoitetaan määritettävä vasta-aine määrittämäl-
 30 lä merkkiryhmän kiintofaasissa tai/ja nestefaasissa, jolle menetelmälle on tunnusomaista, että vähintään toinen molemmista antigeeneistä käsittää useampia epitooppialueita, jotka reagoivat määritettävän vasta-aineen kanssa.

35 Yllättävällä tavalla keksittiin, että siltatesti-immunomäärityksissä käyttämällä vähintään yhtä multimeeristä antigeeniä, ts. antigeeniä, jossa on moninkertaiset epitooppi-

alueet, testin herkkyys paranee erityisesti seerumeja kohtaan, joissa on vasta-aineita, joilla on käytettyä antigeeniä kohtaan vähäinen affiniteetti. Edelleen keksinnön mukainen menetelmä johtaa korkeatiitteristen näytteiden

5 Hook-efektistä johtuvien väärrien negatiivisten arviointien vaaran selvään vähenemisen. Antigeenintarjonnan optimointi epitooppitiheyden kohotuksen kautta johtaa yleensä siltatestikonseptissa reaktiivisuuden paranemiseen spesifisten immunoglobuliinien kanssa polyklonaalisissa seerumeissa, kuten
10 näytenesteessä, kuten esimerkiksi seerumissa. Keksinnön mukaisen menetelmän edelleen eräs etu on, että moninkertaisilla antigeeneillä on monomeerisiin antigeeneihin verrattuna selvästi parantunut stabiilisuus.

15 Keksinnön mukaisessa menetelmässä spesifisen vasta-aineen immunologiseen määrittelyyn siltatestikonseptin mukaan käytetään kahta antigeeniä. Keksinnön mukaisen menetelmän eräässä ensimmäisessä edullisessa suoritusmuodossa käytetään merkittynä antigeeninä moninkertaista antigeeniä ja kiintofaasinpuoleisena antigeeninä monomeeristä antigeeniä.
20 Keksinnön mukaisen menetelmän eräässä toisessa suoritusmuodossa voidaan kiintofaasinpuoleisena antigeeninä käyttää moninkertaista antigeeniä ja merkittynä antigeeninä monomeeristä antigeeniä. Eräässä kolmannessa edullisessa suoritusmuodossa voidaan merkittynä antigeeninä ja kiintofaasinpuoleisena antigeeninä kulloinkin käyttää moninkertaisia antigeenejä.

Moninkertaiset antigeenit sisältävät moninkertaisia epitooppialueita, ts. määritettävän vasta-aineen kanssa immunologisesti reagoivia rakenteita, erikoisesti peptidi- tai polypeptidisekvenssejä. Epitooppialueet on kytketty keskenään erikoisesti immunologisesti ei-reaktiivisten alueiden kautta, esimerkiksi välikealueiden kautta. Erikoisesti käytetään moninkertaisia antigeenejä, jotka käsittävät useita samoja
35 epitooppialueita.

Keksinnön mukaiset moninkertaiset antigeenit sisältävät erikoisesti yli 1 - 80 immunologisesti reaktiivista epitooppi-
 aluetta, erityisen edullisesta yli 1 - 40 epitooppialuetta.
 Epitooppialueet voi olla kytketty suurimolekyylliseen kanta-
 5 jaan tai kytketty keskenään suoraan tai välikealueiden kaut-
 ta.

Epitooppialueet ovat erikoisesti immunologisesti reaktiivi-
 sia synteettisiä peptidisekvenssejä, joiden pituus on 6 - 50
 10 aminohappoa, tai yhdistelmä-DNA-polypeptidisekvenssejä, joi-
 den pituus on erikoisesti enintään 1 000 aminohappoa. Syn-
 teettiset peptidiepitootit sisältävät varsinaisen epitooppi-
 alueen ohella erikoisesti vielä yhden välikealueen, joka voi
 toimia esimerkiksi toisten epitooppien tai kantajan kanssa
 15 kytkemiseen tai/ja merkki- tai kiintofaasinsidosryhmien kyt-
 kemiseen.

Välikealue on erikoisesti immunologisesti inaktiivinen pep-
 tidisekvenssi, jonka pituus on 1 - 10 aminohappoa. Välike-
 20 alueen aminohapot ovat erikoisesti glysiiniä, β -alaniinia,
 γ -aminovoihappoa, ϵ -aminokapronihappoa, lyysiiniä ja rakenne-
 kaavan $\text{NH}_2 [(\text{CH}_2)_n\text{O}]_x\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$ mukaisia yhdisteitä, jossa
 n on 2 tai 3 ja x on 1 - 10.

Välikealue on erikoisesti jatkuva järjestys aminohappoja
 25 epitooppialueen aminoterminalisessa - tai/ja karboksiter-
 minaalisisessa päässä.

Siltatestikonseptin mukaisessa immunomäärityksessä käytetään
 ensimmäistä merkittyny antigeeniä. Keksinnön mukaiseen mene-
 30 telmään voidaan käyttää kaikkia tunnettuja merkkiryhmiä,
 esimerkiksi radioaktiivisia ja ei-radioaktiivisia merkkiryh-
 miä. Edulliset ei-radioaktiiviset merkkiryhmät voivat olla
 suoraan tai/ja epäösuorasti osoitettavia. Suoraan osoitetta-
 vassa merkissä on osoitettavan mittasignaalin tuottava ryhmä
 35 paikallistunut suoraan antigeeniin. Esimerkkejä sellaisista
 suoraan signaalin tuottavista ryhmistä ovat kromogeenit
 (fluoresoivat tai luminoivat ryhmät, väriaineet), entsyymit,

NMR-aktiiviset ryhmät tai metallipartikkelit, jotka on kyt-
 ketty die tunnetulla tavalla peptidi- tai polypeptidianti-
 geeniin. Suoraan osoitettava merkkiryhmä on erikoisesti
 fluoresenssillä tai elektrokemoluminenssilla osoitettava
 5 metallikelaatti, erityisen edullisesti rutenium-, renium-,
 iridium- tai osmiumkelaatti, erityisesti ruteniumkelaatti,
 esimerkiksi rutenium-(bis-pyridyyli)₃²⁺-kelaatti. Muita sopi-
 via metallikelaatti-merkkiryhmiä kuvataan esimerkiksi jul-
 kaisuissa EP-A-0 580 979, WO 90/05301, WO 90/11511 ja WO
 10 92/14138. Nämä julkaisut liitetään täten tähän viitteeksi.

Eräs toinen merkkityyppi, joka soveltuu keksinnön mukaisille
 antigeeneille, on epäsuorasti osoitettava merkki. Tässä
 merkkityypissä antigeeni on kytketty epäsuorasti osoitetta-
 15 van ryhmän, esimerkiksi biotiini- tai hapterinryhmän kanssa,
 joka puolestaan on osoitettavissa reaktiolla sopivan sidos-
 partnerin (streptavidinin, avidinin tai anti-hapteri-
 vasta-aineen) kanssa, jossa vuorostaan on signaalin muodos-
 tava ryhmä. Erikoisesti käytetään epäsuorana merkkiryhmänä
 20 hapterina orgaanista molekyylä, jonka molekyylimassa on
 100 - 2 000, erikoisesti 150 - 1 000.

Hapterit ovat kulloisellekin hapterille spesifisen resep-
 torin kanssa sitoutumiskykyisiä. Esimerkkejä reseptoreista
 25 ovat vasta-aineet, vasta-ainefragmentit, jotka on suunnattu
 hapteria vastaan, tai toinen spesifinen sidospartneri hap-
 teenia varten, esimerkiksi streptavidini tai avidini, kun
 hapteri on biotiini. Erikoisesti hapteri on steroleja,
 sappihappoja, sukupuolihormoneja, kortikoideja, kardenolide-
 30 ja, kardenolidiglykosideja, bufadienolideja, steroidisapo-
 geniinejä tai steroidialkaloideja. Erityisen edullisesti
 hapteri on kardenolideja ja kardenolidiglykosideja. Näiden
 aineluokkien edustajia ovat digoksigeniini, digitoksigeniini,
 gitoksigeniini, strofantidiini, digoksiini, digitoksiini,
 35 ni, ditoksiini ja strofantiini, jolloin digoksigeniini ja
 digoksiini ovat erityisen edullisia. Eräs toinen sopiva

hapteeni on esimerkiksi fluoreseiinia tai sopivaa fluoreseiinijohdannaista.

- Hapteenin reseptori on kytketty signaalin muodostavan ryhmän, erikoisesti entsyymin, kuten mahdollisesti peroksidasiin, alkalisen fosfataasin, β -galaktosidaasin, ureaasi tai Q- β -replikaasin kanssa. Signaalin muodostava ryhmä voi kuitenkin olla myös kromogeeninen, radioaktiivinen tai NMR-aktiivinen ryhmä tai metallipartikkeli (esimerkiksi kultaa).
- Hapteenin kutkenta antigeenin kanssa voi tapahtua esimerkiksi siten, että hapteeni kytketään aktiiviesteri johdannaisten muodossa peptidi- tai polypeptidiantigeenin aminoterminaaliseen päähän tai/ja vapaisiin aminosivuryhmiin.
- Käsite "aktiiviesteri" tämän keksinnön mielessä käsittää aktivoidut esteriryhmät, jotka voivat reagoida peptidien vapaiden aminoryhmien kanssa sellaisissa olosuhteissa, ettei peptidin muilla reaktiivisilla ryhmillä voi tapahtua mitään häiritseviä sivureaktioita. Erikoisesti aktiiviesteri johdannaistenä käytetään N-hydroksisukkinimidiesteriä. Esimerkkejä sopivista hapteeni-aktiiviesteri johdannaista ovat digoksiini-4'''-hemiglutaraatti-N-hydroksisukkinimidiesteri, digoksigeniini-3-karboksimetyylieetteri-N-hydroksisukkinimidiesteri, digoksigeniini-3-O-metyylkarbonyyli- ϵ -aminokapro-nihappo-N-hydroksisukkinimidiesteri, digoksigeniini-3-hemisukkinaatti-N-hydroksisukkinimidiesteri, digitoksiini-4'''-hemiglutaraatti-N-hydroksisukkinimidiesteri ja digitoksigeniini-3-hemisukkinaatti-N-hydroksisukkinimidiesteri. Näitä hapteenijohdannaista on saatavissa kaupallisesti yhtiöstä Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, SLT). N-hydroksisukkinimidiesterien ohella voidaan käyttää myös analogisia p-nitrofenyyli-, pentafluorifenyyli-, imidatsolyyli- tai N-hydroksibentsotriatsolyyliestereitä.
- Ensimmäisen merkityn antigeenin ohella keksinnön mukaisessa menetelmässä käytetään myös toista antigeeniä, joka on kiinnitetty kiintofaasille tai on kiintofaasille sitoutumaan ky-

kenevässä muodossa, ja voi samoin olla multimeerinen antigeeni. Kiintofaasinpuoleisen antigeenin ja kiintofaasin välinen sidos voi olla kovalenttinen tai adsorptiivinen ja tapahtua suoraan, kemiallisten linkkeriryhmien kautta tai

5 spesifisen vuorovaikutuksen kautta, esimerkiksi biotiini-streptavidiini/avidiini, antigeeni-vasta-aine, hiilihydraatti-lektiini. Kiintofaasinpuoleinen antigeeni on erikoisesti biotinyloitu antigeeni ja kiintofaasi vastaavasti streptavidiinilla tai avidiinilla päällystetty. Biotiiniryhmien kyt-

10 kentä antigeenin kanssa voi tapahtua tunnetulla tavalla, esimerkiksi tuomalla biotiini-aktiiviesterijohdannaisia. Sellaiset menetelmät ovat ammattimiehen tuntemia.

Merkki- tai kiintofaasinsidosryhmien lukumäärä multimeerisessä antigeenissä vaihtelee, ts. läsnä voi olla yksi tai

15 useita ryhmiä. Keksinnön mukaisen menetelmän monissa suoritussuodoissa on edullista, jos lähinnä on vähintään 3, ja erityisen edullisesti 3 - 20 merkki- tai kiintofaasinsidosryhmää. Tällä tavalla voidaan saavuttaa yllättävän korkea

20 herkkyyden paraneminen ja Hook-efektin (vahvasti positiivisten näytteiden väärän negatiivisen arvioinnin) merkittävä pieneneminen.

Keksintö perustuu myös tietoon, että immunologinen testi

25 spesifisen vasta-aineen määrittelyyn näytenesteessä on edullinen, kun vähintään toinen tähän testiin käytettävistä molemmista antigeeneistä on multimeerinen antigeeni, ts. käsittää useampia epitooppialueita, erikoisesti useampia samoja epitooppialueita. Käsite "epitooppialue" tämän keksinnön mielessä tarkoittaa rakennetta, erikoisesti peptidi-

30 tai polypeptidisekvenssiä, jolla on spesifinen reaktio määritettävän vasta-aineen kanssa. Useampien epitooppialueiden järjestämiseksi moninkertaiselle antigeenille on periaatteessa olemassa useampia mahdollisuuksia.

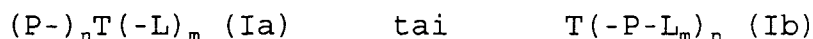
35 Eräässä ensimmäisessä suoritussuodossa käytetään multimeerisenä antigeeninä määritettävän vasta-aineen kanssa reagoi-

matonta kantajaa, jolle epitooppialueet on liitetty kovalenttisesti. Esimerkkejä sopivista kantajista ovat peptidit, polypeptidit tai synteettiset kantajat, esimerkiksi dekstraanit, kultapartikkelit, dendriitit ja vastaavat. Esimerkkejä sopivista polypeptideistä ovat albumiinit, esimerkiksi naudanseerumialbumiini, epäspesifiset immunoglobuliinit, immunoglobuliinifragmentit, β -galaktosidaasi, polylyysiini ja muut proteiinit, joilla on symmetrinen rakenne. Kantajaa käytettäessä on otettava huomioon, ettei sillä ole lainkaan ristireaktiivisuutta näytenesteessä olevien vasta-aineiden kanssa.

Epitooppialueet on liitetty erikoisesti bifunktionaalisen linkkerin kautta kantajan reaktiivisiin ryhmiin, esimerkiksi NH_2 -ryhmiin tai SH-ryhmiin. Erikoisesti liitos tapahtuu kantajan NH_2 -ryhmien kautta.

Keksinnön tässä suoritusmuodossa käytetään erikoisesti yleisen kaavan Ia tai Ib mukaista antigeeniä

20



jolloin T on kantaja, P on peptidi- tai polypeptidisekvenssejä, jotka sisältävät samoja tai erilaisia, immunologisesti reaktiivisia epitooppialueita ja on liitetty kantajalle kovalenttisesti, ja L on merkkiryhmä tai kiintofaasille kiinnittymään kykeneviä ryhmiä, jotka on liitetty kovalenttisesti kantajalle tai peptidi- tai polypeptidisekvensseihin, n on luku yli 1 - 40, ja m on luku 1 - 10. Symbolien n ja m ei tarvitse olla kokonaislukuja, koska Belegung kantajan päällystys epitooppiryhmillä tai merkki- tai kiintofaasinsidosryhmillä reaktioerässä voi tapahtua tilastollisesti. Erikoisesti n on 2 tai suurempi.

Kantajalle kytketyt peptidi- tai polypeptidisekvenssit käsittävät erikoisesti synteettisiä peptidisekvenssejä, joiden pituus on 6 - 50 aminohappoa, tai yhdistelmä-DNA-polypepti-

disekvenssejä, joiden pituus on erikoisesti enintään 1 000 aminohappoa.

- Varsinaisen epitooppialueen ohella synteettiset peptidisek-
- 5 venssit voivat mahdollisesti sisältää vielä edellä määritel-
- lyn laisen välikealueen, joka voi olla järjestetty esimer-
- kiksi epitoopin ja kantajan tai/ja epitoopin ja merkki- tai
- kiintofaasinsidosryhmän välille.
- 10 Peptidi- tai polypeptidiepitoopit voi olla liitetty kanta-
- jaan N-terminaalinen pää, C-terminaalisen pää, tai sivu-
- ketjussa olevien reaktiivisten ryhmien kautta. Eräs mahdol-
- lisuus liitokseen on aktivoita kantajamolekyylit reaktiolla
- 15 tunnettujen linkkeriaineiden (esimerkiksi maleinimidohek-
- saanihapon, maleinimidopropionihapon, maleinimidobentsoeha-
- pon) kanssa NH_2 -ryhmässä, ja liittää SH-aktivoitu peptidi-
- johdannainen kovalenttisesti kantajalle. Merkki- tai kiinto-
- faasinsidosryhmät liitetään tavallisesti aktiiviesterien
- muodossa kantajamolekyyliin tai/ja epitooppialueisiin. Mutta
- 20 myös muut liitosmahdollisuudet ovat ajateltavissa, esimer-
- kiksi bifunktionaalisen fotolinkkerin kautta.

- 25 Multimeeristen antigeenien syntetisoimiseksi, jotka sisältä-
- vät epitoopit inertille kantajalle liitettynä, valmistetaan
- vastaavia peptidejä, joissa on erikoisesti reaktiivinen
- merkaptofunktio, esimerkiksi lisäämällä lisäkysteiniitäh-
- teen. Peptidi voi tällöin olla joko N-terminaalisesti, C-
- terminaalisesti tai myös mielivaltaisesti sekvenssiin link-
- kerillä modifioitu. Multimeeriseksi antigeeniksi reagoimaan
- 30 saattamiseksi voidaan esimerkiksi kantajaa, joka sisältää
- primäärisiä aminoryhmiä, ladata ensin merkkiryhmän vastaa-
- valla aktiiviesterijohdannaisella ja seuraavaksi maleinimi-
- doalkyyli-ryhmillä. Tämän kautta merkitään osalta kantajassa
- olevien lysiini-ryhmien ϵ -aminosivuketjun aminoryhmät merk-
- 35 kiryhmällä (esimerkiksi digoksigeniinillä tai bipyridyyliiru-
- teniumilla) tai kiintofaasinsidosryhmällä (esimerkiksi bio-
- tiinilla) ja muutetaan toiselta osalta maleinimidiryhmiksi.

Edelleen eräässä vaiheessa liitetään sitten toivotut epitooppialueet sisältävä peptidi tai peptidiseos reaktiivisen merkaptofunktion kautta maleinimidimodifisoidulle kantajalle. Kun merkkiryhmä sijaitsee suoraan peptidillä, tapahtuu
 5 multimeerisen antigeenin synteesi analogisesti, nyt saatetaan vain vastaavasti merkitty, SH-aktivoitu peptidi reagoimaan kantajan kanssa.

Keksinnön edelleen eräässä suoritusmuodossa voidaan käyttää
 10 multimeeristä antigeeniä, joka käsittää useita suoraan tai välikealueiden kautta keskenään kovalenttisesti liitettyjä epitooppialueita. Erikoisesti epitooppien liittäminen tapahtuu ainakin osittain trifunktionaalisten linkkerimolekyylien kautta, niin että antigeeni käsittää vähintään yhden haaroittumiskohdan ja erikoisesti 1 - 7 haaroituskohtaa.
 15

Tässä suoritusmuodossa käytetään erikoisesti yleisen kaavan II mukaista antigeeniä:

$$20 \quad P^1 \{ P^2 [P^3 (P^4)_t]_s \}_r \quad \text{II}$$

jolloin P^1 , P^2 , P^3 ja P^4 ovat peptidisekvenssejä, joiden pituus on enintään 50 aminohappoa, jolloin vähintään 2 peptidisekvenssiä sisältää samoja tai erilaisia immunologisesti
 25 reaktiivisia epitooppialueita, r on 1 tai 2, s on kokonaisluku 0 - 4, ja t on kokonaisluku 0 - 8, jolloin antigeeni sisältää vähintään yhden haaroittumiskohdan ja vähintään yhden merkkiryhmän tai kiintofaasille sitoutumaan kykenevän ryhmän.

30

Kaavan II mukainen antigeeni muodostaa puumaisen rakenteen, jossa on enintään 7 haaroittumiskohtaa, kun P^1 , P^2 , P^3 ja P^4 ovat lineaarisia peptidisekvenssejä, ja sisältää erikoisesti 2 - 8 samaa tai erilaista, immunologisesti reaktiivista epitooppialuetta. Erikoisesti epitooppialueita ei ole liitetty
 35 keskenään suoraan yhteen, vaan välikealueiden kautta. Välikealueet ovat erikoisesti immunologisesti inaktiivisia pep-

tidisekvenssejä, joiden pituus on 1 - 10 aminohappoa, kuten edellä määriteltiin. Kaikkien peptidisekvenssien P^1 , P^2 , P^3 ja P^4 ei tarvitse sisältää epitooppialueita, vaan mahdollisia ovat myös rakenteet, joissa nämä sekvenssit koostuvat
 5 vain välikealueista. Rakenteeseen voidaan muodostaa haaroitumia käyttämällä trifunktionaalista aminohappoa, esimerkiksi lyysiiniä tai ornitiinia.

Edelleen yleisen kaavan II mukainen antigeeni sisältää vähintään yhden merkki- tai kiintofaasinsidosryhmän, joka määritellään edellä. Nämä ryhmät voidaan liittää esimerkiksi selektiivisesti peptidisekvenssien päihin tai/ja reaktiivisiin sivuketjuihin.

15 Multimeeristen antigeenien vielä eräs muu suoritusmuoto ovat nk. mosaiikkiproteiinit, ts. yhdistelmä-DNA-fuusiopolypeptidit, joiden aminohapposekvenssi sisältää useita immunologisesti reaktiivisia epitooppialueita, jotka on liitetty yhteen mahdollisesti immunologisesti inaktiivisten välikealuiden kautta. Yhdistelmä-DNA-mosaiikkiproteiineja voidaan
 20 saada siten, että valmistetaan toivottua proteiinia koodittava DNA-sekvenssi, ja saatetaan ekspressoitumaan yhdistelmä-DNA-isäntäsolussa. Sellaiset menetelmät ovat molekylibiologian alan ammattimiehelle tuttuja, ja kuvataan standardioppikirjoissa (esimerkiksi käsikirjassa Sambrook et al.,
 25 Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2. painos (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press). Merkki- tai kiintofaasinsidosryhmien lisääminen yhdistelmä-DNA-proteiiniin voi samoin tapahtua tunnetuilla menetelmillä.

30

Keksinnön eräässä edullisessa suoritusmuodossa epitooppialueet ovat synteettisiä peptidisekvenssejä, joiden pituus on 6 - enintään 50, erityisen edullisesti enintään 30 aminohappoa. Sellaisiin epitooppialueisiin voidaan lisätä merkkiryhmiä tai kiintofaasinsidosryhmiä selektiivisesti sekä niiden sijainnin että myös niiden lukumäärän suhteen. Synteettisessä valmistuksessa on nimittäin mahdollisuus määrättyjä suo-

35

jaryhmiä reaktiivisissa sivuryhmissä käyttämällä, esimerkiksi käytettyjen aminohappojohdannaisten primäärisissä aminoryhmissä, valita suunnatusti ne peptidin asemat, jotka ovat selektiivisen suojaryhmänlohkaisun jälkeen käytettävissä
 5 reaktioon liitetyn merkkiryhmän kanssa.

Tätä varten halutun aminohapposekvenssin omaava peptidi valmistetaan kiintofaasilla, erikoisesti kaupallisella peptidisynteesilaitteella (esimerkiksi laitteella A 431 tai A 433
 10 yhtiöstä Applied Biosystems) hergestelt. Synteesi tapahtuu tunnetuilla menetelmillä, erikoisesti lähtien peptidin karboksiterminaalista päästä käyttäen aminohappojohdannaisia. Erikoisesti käytetään aminohappojohdannaisia, joiden liittoksen tarvittava aminopääter ryhmä on derivatisoitu fluorenyylimetyylioksikarbonyyli (Fmoc) -tähteellä. Käytettyjen amino-
 15 happojen reaktiiviset sivuryhmät sisältävät suojaryhmiä, jotka ovat peptidisynteesin päättymisen jälkeen muutta mutkitta lohkaistavissa. Edullisia esimerkkejä näistä ovat suojaryhmät, kuten mahdollisesti trifenyylimetyyli (Trt), t-butyylietteri (tBu), t-butyyliesteri (OtBu), tert-butoksi-
 20 karbonyyli (Boc) tai 2,2,5,7,8-pentametyylikromaani-6-sulfonyyli (Pmc).

Lysiinitähteiden tai muiden primäärisiä aminosivuketjuja
 25 sisältävien aminohappojohdannaisten aminosivuketjut, jotka sijaitsevat peptidin asemassa, jotka on myöhemmin määrä derivatisoida hapteenilla, esimerkiksi digoksiinilla tai digoksigeniinillä, on varustettu ensimmäisellä aminosuojaryhmällä, joka valitaan niin, että se lohkeaa kvantitatiivisesti määrättyissä reaktio-oloissa, esimerkiksi hapon läsnä
 30 ollessa. Eräs esimerkki sopivasta happolabiilista suojaryhmästä on Boc. Lysiinitähteiden tai muiden primäärisiä aminosivuryhmiä sisältävien aminohappotähteiden sivuryhmät, joissa ei toivota lainkaan hapteenin liittymistä, on varustettu
 35 toisella aminosuojaryhmällä, joka valitaan niin, ettei se itse lohkea olosuhteissa, joissa ensimmäinen suojaryhmä on lohkaistavissa. Toinen suojaryhmä on stabiili erikoisesti

myös niissä olosuhteissa, joissa peptidin lohkaistu kiinto-
 faasilta ja kaikkien sen suojaryhmien lohkaistu tapahtuu.
 Esimerkkejä sellaisista toisista suojaryhmistä ovat happo-
 stabiilit suojaryhmät, kuten mahdollisesti fenyyliasetyyli.
 5 20:n luonnollisen aminohapon ohella peptidi voi sisältää
 myös keinotekoisia aminohappoja, kuten mahdollisesti β -ala-
 niinia, γ -aminovoihappoa, ϵ -aminokapronihappoa tai norleu-
 siinia. Näitä keinotekoisia aminohappoja käytetään synte-
 siin luonnollisille aminohapoille analogisesti suojatussa
 10 muodossa.

Synteesin päätyttyä tapahtuu mahdollisesti peptidin kiinto-
 faasilta vapautuksen jälkeen suojaryhmien lohkaistu, mukaan
 lukien ensimmäisten aminosuojaryhmien, jotka ovat asemassa,
 15 joissa on määrä tapahtua hapterin liittämisen. Sitten tällä
 tavalla saatu tuote puhdistetaan, erikoisesti HPLC:llä.
 Seuraavaksi tapahtuu hapterimerkin lisääminen saattamalla
 peptidin reagoimaan kulloinkin toivotun hapteriaktiivieste-
 rijohdannaisen kanssa, joka reagoi vapaiden primääristen
 20 aminoryhmien kanssa, ts. peptidin aminopääterymän tai/ja
 aminosivuryhmien kanssa. Vapaata primääristä aminoryhmää
 kohden käytetään erikoisesti 1,5 - 2,5 ekvivalenttia aktii-
 viesteriä. Seuraavaksi reaktiotuote puhdistetaan, erikoises-
 ti HPLC:llä.

25 Jos peptidi sisältää vielä aminoryhmiä, jotka on derivati-
 soitu toisella suojaryhmällä, kuten mahdollisesti fenyyli-
 asetyylillä, niin nämä suojaryhmät poistetaan viimeisessä
 vaiheessa. Fenyyliasetyylisuojaryhmien poisto voi tapahtua
 30 esimerkiksi entsymaattisesti immobilisoidulla tai liukoisel-
 la penisilliini-G-amidaasilla huoneenlämpötilassa vesiliuok-
 sessa, jossa on orgaanisen liuottimen osuus.

Jos keksinnön mukaisella menetelmällä valmistetut peptidit
 35 sisältävät molekyyllinsisäisen disulfidisillan, niin pepti-
 disekvenssin voidaan synteesin päätyttyä, mutta ennen vii-
 meisen aminohapon N-terminaalisen Fmoc-suojaryhmän lohkaistua

hapettaa esimerkiksi jodilla heksafluori-isopropanoli/di-kloorimetaanissa (Cober et al., The Peptide Academic Press, New York, 1981, s. 145 - 147) kiintofaasilla, ja lohkaista seuraavaksi N-terminaalisen Fmoc-suojaryhmän.

5

Reaktiivisen SH-ryhmän lisääminen voi tapahtua esimerkiksi liittämällä peptidin aminoterminaliseen päähän kysteiinitähteen.

- 10 Metallikelaattimerkkiryhmien lisääminen synteettisiin peptideihin tapahtuu (a) toivotun peptidisekvenssin synteetin jälkeen ja erikoisesti ennen peptidin lohkaista kiintofaasilta ja ennen peptidisynteesiin käytettyjen aminohappojohdannaisten reaktiivisissa sivuryhmissä olevien suojaryhmien
- 15 lohkaista liittämällä peptidin N-terminaaliseen primääriseen aminoryhmään aktivoituneen luminoivan metallikelaatin, esimerkiksi aktiiviesteri johdannaisten, tai/ja (b) peptidin synteesin aikana lisäämällä aminohappojohdannaista, jotka on liitetty kovalenttisesti luminoivan metallikelaattimerkkiryhmän
- 20 kanssa, esimerkiksi ϵ -derivatisoidun lyysiinin kautta.

Haaroittuneiden multimeeristen antigeenien synteesi voi tapahtua siten, että käytetään kahdella Fmoc-ryhmällä suojattua diaminokarboksyylihappoa, kuten mahdollisesti lyysiiniä.

25 Peptidien biotinylointi voi tapahtua esimerkiksi lisäämällä biotiini johdannaisten N-terminaaliseen päähän peptidin ollessa vielä kiintofaasille liitettynä.

- Keksinnön mukaiseen menetelmään käytetään erikoisesti peptidi- tai polypeptidiepitoppeja patogeenisistä organismeista, esimerkiksi bakteereista, viruksista ja alkueläimistä tai autoimmuuniantigeeneistä. Immunologisesti reaktiivinen epitopialue on peräisin erikoisesti virusantigeeneistä, esimerkiksi HIV I:n, HIV II:n, HIV-alytyyppi O:n tai hepatiitti
- 30 C-viruksen (HCV) aminohapposekvensseistä.
- 35

Erikoisesti valitaan HIV I-, HIV II- tai HIV-alatyypin O-epitoppeja alueilta gp32, gp41, gp120 ja gp24. HCV-epitoppeja valitaan erikoisesti ydin/kuori-alueelta tai ei-rakenneproteiinialueilta NS3, NS4 tai NS5.

5

Erityisen edullisesti epitoppialue on HIV I-, HIV II- tai HIV-alatyypin O-aminohapposekvenssejä, joilla on aminohapposekvenssit:

10	NNTRKSISIG	PGRAFYT	(I)
	NTTRSISIGP	GRAFYT	(II)
	IDIQEERRMR	IGPGMAWYS	(III)
	QARILAVERY	LKDQQLLGIW	GASG (IV)
	LGIWGCSGKL	ICTTAVPWNA	SWS (V)
15	KDQQLLGIWG	SSGKL	(VI)
	ALETLLQNQQ	LLSLW	(VII)
	LSLWGCKGKL	VCYTS	(VIII)
	WGIRQLRARL	LALETLLQN	(IX) ja
	QAQLNSWGCA	FRQVCHTTVP	WPNDSLT (X)

20

tai niiden osasekvenssejä, joiden pituus on vähintään 6 ja erikoisesti vähintään 8 aminohappoa.

Aminohapposekvenssit I - III ovat peräisin HIV I:n gp120-alueelta, aminohapposekvenssit IV - IX ovat peräisin HIV I:n gp41-alueelta, ja aminohapposekvenssi X on peräisin HIV II:n gp32-alueelta. Aminohapposekvenssit I - X esitetään edelleen sekvenssiluettelossa SEKVENSSINTUNNISTUSNUMEROILLA 1 - 10. Sekvenssit V, VIII ja X sisältävät kulloinkin 2 kysteiinitähdettä, jotka ovat erikoisesti disulfidisillan muodossa.

HCV-aminohapposekvenssien epitoppialueella on erikoisesti aminohapposekvenssejä:

35	SRRFAQALPV	WARPD	(XI)
	PQDVKFPGGG	QIVGGV	(XII)
	EEASQHLPYI	EQ	(XIII)

	QKALGLLQT		(XIV)
	SRGNHVSPTH	YVPESDAA	(XV)
	PQRKNKRNTN	RRPQDVKFPG	
	GGQIVGVV		(XVI) ja
5	AWYELTPAE	TTVRLRAYMNT PGLPV	(XVII)

10 tai niiden osasekvenssejä, joiden pituus on vähintään 6 ja erikoisesti vähintään 8 aminohappoa. Sekvenssi XI on peräisin HCV:n NS5-alueelta, sekvenssit XII ja XVI ydinalueelta, sekvenssit XIII, XIV ja XV NS4-alueelta, ja sekvenssi XVII NS3-alueelta. Aminohapposekvenssit XI - XVII esitetään edelleen sekvenssiluettelossa SEKVENSSINTUNNISTUSNUMEROILLA 11 - 17.

15 Keksinnön edelleen eräänä kohteena on reagenssi spesifisen vasta-aineen immunologiseen määrittämiseen näytenesteessä, joka reagenssi käsittää reaktiivista kiintofaasia, kahta, määritettävää vasta-ainetta vastaan suunnattua antigeeniä, jolloin ensimmäisessä antigeenissä on merkkiryhmä, ja toinen
20 antigeeni (a) on sidottu kiintofaasille tai (b) on kiintofaasille sitoutumaan pystyvässä muodossa, jolle reagenssille on tunnusomaista, että vähintään toinen molemmista antigeeneistä käsittää useampia epitooppialueita, jotka reagoivat määritettävän vasta-aineen kanssa.

25 Keksinnön eräässä suoritussuodossa reagenssi sisältää ensimmäistä merkittävää antigeeniä, jossa on useampia epitooppialueita, ja joka sisältää vähintään yhden hapterimerkkiryhmän, ja hapterien varten reseptorin, joka puolestaan sisältää
30 signaalia muodostavan ryhmän. Edelleen edullinen reagenssi, joka käsittää toista kiintofaasinpuoleista antigeeniä, jossa on useampia epitooppialueita, ja joka sisältää vähintään yhden biotiiniryhmän, ja streptavidiinilla tai avidiinilla päällystettyä reaktiivista kiintofaasia.

35 Keksinnön edelleen eräänä kohteena on multimeeristen antigeenien käyttö, jotka käsittävät useampia immunologisesti

reaktiivisia epitooppialueita, immunologisessa testausmenetelmässä spesifisten vasta-aineiden määrittämiseen näytteenesteessä.

5 Erikoisesti määritetään sellaisia vasta-aineita, jotka viittaavat infektiin mikro-organismeilla, kuten mahdollisesti bakteereilla, viruksilla tai alkueläimillä. Erityisen edullisesti määritetään viruksia vastaan suunnattuja vasta-aineita, esimerkiksi HIV- tai hepatiitti-viruksia vastaan
10 suunnattuja vasta-aineita. Näytteeneste on erikoisesti seerumia tai plasmaa, erityisen edullisesti ihmis-seerumia tai -plasmaa. Edelleen on edullista, että keksinnön mukaisia multimeerisiä antigeenejä käytetään immunologisessa menetelmässä siltatestiformaatissa.

15

Testin suoritus merkitsee erikoisesti näytteenesteen sekoittamista ensimmäisen antigeenin ja kiintofaasinpuoleisen toisen antigeenin kanssa, jotta saataisiin merkitty, immobilisoitu kompleksi ensimmäisestä antigeenistä, vasta-aineista ja
20 kiintofaasiin sidotusta toisesta antigeenistä. Verrattuna muihin testiformaatteihin vasta-aineiden osoittamiseksi johtaa siltatestiformaatti sekä herkkyyden paranemiseen, ts. tunnistetaan kaikki immunoglobuliiniluokat, kuten mahdollisesti IgG, IgM, IgA ja IgE, että spesifisyyden paranemiseen, ts. epäspesifinen reaktiivisuus vähenee. Keksinnön mukaisella menetelmällä onnistuu siten spesifisten immunoglobuliinien luokista riippumaton osoitus parannetulla herkkyydellä. Herkkyyden paraneminen koskee erityisesti vähäaffiniteettisten immunoglobuliinien lisätunnistusta, esimerkiksi IgM:n
30 multimeerisillä antigeeneillä, kun sitä vastoin monomeerisillä antigeenillä tunnistetaan hyvin vain suuriaffiniteettisiä vasta-aineita. Kaksoisantigeenisiltatestin spesifisyyttä ja herkkyyttä voidaan parantaa edelleen, jos suoritetaan kaksivaiheinen testin suoritus, jossa ensimmäisessä
35 vaiheessa näytteenestettä sekoitetaan ensimmäisen ja toisen antigeenin kanssa, ja seuraavaksi, erikoisesti 1 - 4 tunnin kuluttua, erityisen edullisesti 1,5 - 2,5 tunnin kuluttua,

lisätään reseptori ensimmäisen antigeenin hapteenimerkitsemistä varten, joka ensimmäinen antigeeni sisältää signaalin muodostavan ryhmän.

- 5 Keksintö koskee lopulta myös edellä määritellyä kaavojem
Ia, Ib ja II mukaisia uusia antigeenejä.

Keksintöä kuvatan edelleen seuraavilla esimerkeillä, sek-
venssiluettelolla ja kuvioilla.

10

Sekvenssiluettelossa merkitsee

SEKVENSSINTUNNISTUSNUMERO 1: HIV I:n gp120-alueelta olevan
erään epitoopin aminohapposekvenssi;

15

SEKVENSSINTUNNISTUSNUMERO 2: HIV I:n gp120-alueelta olevat
edelleen erään eitoopin aminohapposekvenssi;

SEKVENSSINTUNNISTUSNUMERO 3: HIV I:n alatyypin O gp120-alu-
eelta olevan edelleen erään epitoopin aminohapposekvenssi;

SEKVENSSINTUNNISTUSNUMERO 4: HIV I:n gp41-alueelta olevan
epitoopin aminohapposekvenssi;

20

SEKVENSSINTUNNISTUSNUMERO 5: HIV I:n gp41-alueelta olevan
edelleen erään epitoopin aminohapposekvenssi;

SEKVENSSINTUNNISTUSNUMERO 6: HIV I:n gp41-alueelta olevan
yhä edelleen erään epitoopin aminohapposekvenssi;

25

SEKVENSSINTUNNISTUSNUMERO 7: HIV I:n alatyypin O gp41-alu-
eelta olevan erään epitoopin aminohapposekvenssi;

SEKVENSSINTUNNISTUSNUMERO 8: HIV I:n, alatyypin O gp41-alu-
eelta olevan edelleen erään epitoopin aminohapposekvenssi;

SEKVENSSINTUNNISTUSNUMERO 9: HIV I:n alatyypin O gp41-alu-
eelta olevan yhä edelleen erään epitoopin aminohapposekvens-

30

si;
SEKVENSSINTUNNISTUSNUMERO 10: HIV II:n gp32-alueelta olevan
erään epitoopin aminohapposekvenssi;

SEKVENSSINTUNNISTUSNUMERO 11: HCV:n NS5-alueelta olevan
erään epitoopin aminohapposekvenssi;

35

SEKVENSSINTUNNISTUSNUMERO 12: HCV:n ydinalueelta olevan
erään epitoopin aminohapposekvenssi;

- SEKVENSSINTUNNISTUSNUMERO 13: HCV:n NS4-alueelta olevan erään epitoopin aminohapposekvenssi;
 SEKVENSSINTUNNISTUSNUMERO 14: HCV:n NS4-alueelta olevan edelleen erään epitoopin aminohapposekvenssi;
 5 SEKVENSSINTUNNISTUSNUMERO 15: HCV:n NS4-alueelta olevan edelleen erään epitoopin aminohapposekvenssi;
 SEKVENSSINTUNNISTUSNUMERO 16: HCV:n ydinalueelta olevan edelleen erään epitoopin aminohapposekvenssi;
 SEKVENSSINTUNNISTUSNUMERO 17: olevan erään epitoopin amino-
 10 happosekvenssi NS3-alueelta HCV;
 Kuviossa 1 esitetään: yhdistelmä-DNA-HIV-p24-antigeenin aminohapposekvenssi,
 Kuviossa 2 esitetään: mittaussignaalien vertailu kaksoisan-
 tigeeni-siltatestissä käyttäen monomeeristä ja multimeeristä
 15 rutenyloitua HIV-gp120-antigeeniä, ja
 Kuviossa 3 esitetään: mittaussignaalien vertailu kaksoisan-
 tigeenisiltatestissä käytettävässä monomeeristä ja multimee-
 ristä biotinyloitua HIV-gp41-antigeeniä.
- 20 Esimerkki 1
 Peptidiepitoppialueiden valmistus
 Peptidi-epitoppialueet valmistettiin fluorenyylimetyyliok-
 sikarbonyyli-(Fmoc)-kiintofaasipeptidisynteesillä eräpepti-
 disyntetisoijalla, esimerkiksi yhtiön Applied Biosystems
 25 laitteella A431 tai A433. Tähän käytettiin kulloinkin 4,0
 ekvivalenttia taulukossa esitettyjä aminohappojohdannaisia:
- Taulukko 1:
- | | | |
|----|---|-------------------|
| 30 | A | Fmoc-Ala-OH |
| | C | Fmoc-Cys(Trt)-OH |
| | D | Fmoc-Asp(OtBu)-OH |
| | E | Fmoc-Glu(OtBu)-OH |
| | F | Fmoc-Phe-OH |
| 35 | G | Fmoc-Gly-OH |
| | H | Fmoc-His(Trt)-OH |
| | I | Fmoc-Ile-OH |

	K1	Fmoc-Lys(fenyyliasetyyli)-OH
	K2	Fmoc-Lys(Boc)-OH
	K3	Boc-Lys(Fmoc)-OH
	K4	Fmoc-Lys(BPRu)-OH
5	L	Fmoc-Leu-OH
	M	Fmoc-Met-OH
	N	Fmoc-Asn(Trt)-OH
	P	Fmoc-Pro-OH
	Q	Fmoc-Gln(Trt)-OH
10	R	Fmoc-Arg(Pmc)-OH
	S	Fmoc-Ser(tBu)-OH
	T	Fmoc-Thr(tBu)-OH
	U	Fmoc- β -alaniini-OH
	V	Fmoc-Val-OH
15	W	Fmoc-Trp-OH
	Y	Fmoc-Tyr(tBu)-OH
	Z	Fmoc- ϵ -aminokapronihappo-OH
	Nle	Fmoc-norleusiini-OH
	Abu	Fmoc- γ -aminovoihappo-OH

20

Kysteiinitähteiden läsnä ollessa peptidisekvenssissä tapahtui välittömästi synteessin päätyttyä hapetus kiintofaasilla jodilla heksafluori-isopropanoli/dikloorimetaanissa.

- 25 Aminohapot tai aminohappojohdannaiset liuotettiin N-metyyli-pyrrolidoniin. Peptidi muodostettiin 400 - 500 mg:lla 4-(2',4'-dimetoksifenyyli-Fmoc-aminometyyli)-fenoksihartsia (Tetrahedron Letters 28 (1987), 2107) panostuksella 0,4 - 0,7 mmol/g (JACS 95 (1973), 1328). Liitosreaktiot suoritettiin Fmoc-aminohappojohdannaisten suhteen 4 ekvivalentilla disykloheksyylikarbodi-imidiä ja 4 ekvivalentilla N-hydroksibentsotriatsolia dimetyyliformamidia reaktioväliaineena 20 min aikana. Jokaisen synteisivaiheen jälkeen Fmoc-ryhmä lohkaistiin 20-prosenttisella piperidiinillä dimetyyliformamidissa 20 min aikana.
- 30
- 35

Peptidin vapautus synteesihartsilta ja happolabiilien suoja-ryhmien lohkaus fenyyliaesityylisuojarahmää lukuun ottamatta tapahtui 20 ml:lla trifluorietikkahappoa, 0,5 ml:lla etaaniditiolia, 1 ml:lla tioanisolia, 1,5 g:lla fenolia ja 1

5 ml:lla vettä 40 min aikana huoneenlämpötilassa. Seuraavaksi reaktioliuos sekoitettiin 300 ml:n kanssa jäädytettyä diisopropyylieetteriä, ja pidettiin peptidin täydellisesti saostamiseksi 40 min ajan 0 °C:ssa. Sakka suodatettiin pois, jälkipestiin di-isopropyylieetterillä, liuotettiin pienellä

10 määrällä 50-prosenttista etikkahappoa, ja lyofilisoitiin. Saatu raakamateriaali puhdistettiin preparatiivisella HPLC:llä Delta-PAK RP C18-materiaalilla (kolonni 50 x 300 mm, 100 Å, 15-µm) vastaavilla gradienteilla (Eluentti A: vesi, 0,1 % trifluorietikkahappoa, eluentti B: asetonitriili, 0,1 % trifluorietikkahappoa) noin 120 min aikana. Eluoi-

15 dun materiaalin identiteetti testattiin ionisuihkumassaspektrometrialalla.

Hapteeni-, esimerkiksi digoksigeniini- tai digoksiinimerkin

20 lisääminen tapahtui kytkemällä peptidin vapaisiin aminoryhmiin vastaavia aktiiviesterijohdannaisia, esimerkiksi digoksigeniini-3-karboksimetyylieetteri-N-hydroksisukkinimidies-teriä (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, SLT) liuoksessa. Derivatisoitava peptidi liuotettiin seokseen, jossa oli

25 DMSO:ta ja 0,1 M kaliumfosfaattipuskuria, pH 8,5. Seuraavaksi lisättiin tipoittain 2 ekvivalenttia aktiiviesteriä vapaata primääristä aminofunktiota kohden pieneen DMSO-määrään liuotettuna, ja sekoitettiin huoneenlämpötilassa. Reaktiota seurattiin analyttisellä HPLC:llä. Tuote puhdistettiin

30 preparatiivisella HPLC:llä.

Lysiinijohdannaista K1 käytettiin asemin, joissa ei pitänyt tapahtua lainkaan hapteenimerkintää. Lysiinijohdannaista K2 käytettiin asemin, joihin piti tapahtua hapteenimerkintä.

35 Lysiinijohdannaista K3 käytettiin ε-aminoryhmän kytkemiseen peptidiin välikealueella.

Jos peptidi sisäölsi vielä fenyyliasetyyllillä suojattuja lysiinejä, niin nämä suojaryhmät lohkaistiin viimeisessä vaiheessa entsyymaattisesti penisilliini-G-amidaasilla huoneenlämpötila vesipohjaisessa ympäristössä, jossa oli orgaanisen liuottimen osuus. Entsyymi suodatettiin pois, ja peptidi puhdistettiin preparatiivisella HPLC:llä. Eluoidun materiaalin identiteetti testattiin ionisuihkumassaspektrometrialalla.

- 10 Ruteniummerkkiryhmän lisääminen tapahtui joko N-terminaalisesti rutenium(bispyridyyli)₃-karboksyylihappojohdannaisen (BPRu-COOH), esimerkiksi Ru-(bispyridyyli)₃²⁺-N-hydroksisukkinimidiesterin tai sekvenssissä ϵ -derivatisoidun lysiinitähteen K4 (Fmoc-Lys(BPRu)OH) kautta.

15

Biotiinimerkin lisääminen tapahtui joko N-terminaalisesti derivatisoimalla hartsilla (biotiiniaktiiviesteri) tai sekvenssin sisäpuolella analogisesti ruteniummerkin lisäämisen kautta vastaavasti biotiinilla ϵ -derivatisoidulla lysiinillä.

20

Haaroittuneiden multimeeristen peptidien synteesi tapahtui lineaaristen peptidien synteessille analogisesti. Kiintofaasiksi valittiin tässä alhaisen varausasteen omaava hartsi, jolla oli esimerkiksi varaus 0,2 mmol/g. Haaroittamiseen käytettiin bis-Fmoc-suojattua diaminokarboksyylihappoa, kuten mahdollisesti Fmoc-Lys(Fmoc)-OH:ta.

25

Taulukoissa 2 ja 3 esitetään luettelo valmistetuista peptideistä.

30

HIV I:n tai HIV II:n alueista gp120, gp41 ja gp32 valmistettiin taulukossa 2a-2d esitetyt peptidiyhdisteet.

35

Taulukko 2a: SH-aktivoituneet lineaariset peptidit

5

gp41/1	CUZU-WGIRQLRARLLALETLLQN
gp41/2	CUZU-LSLWGCKGKLV CYTS
gp41/4	CUZU-ALETLLQNQLLSLW
gp120	CUZU-IDIQEMRIGPMAWYS

Taulukko 2b: Digoksigeniinimerkityt lineaariset peptidit

10

gp120	digoksigeniini-3-cme-UZU-NNTRKSISIGPGRAFYT digoksigeniini-3-cme-UZ-NTTRSISIGPGRAFY digoksigeniini-3-cme-UZU-IDIQEERRMRIGPMAWYS
gp41/1	digoksigeniini-3-cme-UZU-AVERYLKDQQLLGIW digoksigeniini-3-cme-ZUZU-AVERYLKDQQLLGIW digoksigeniini-3-cme-UZ-QARILAVEYLKDQQLLGIWGASG digoksigeniini-3-cme-ZGGGG-QARILAVEYLKDQQLLGIW- GASG digoksigeniini-3-cme-UZU-WGIRQLRARLLALETLLQN
gp41/2	digoksigeniini-3-cme-UZU-LGIWGCSGKLICTTAV LGIWGCSGK- (cme-3-digoksigeniini) -LICTTAV digoksigeniini-3-cme-UZU-LGIWGCSGK- (cme-3- digoksigeniini) -LICTTAV digoksigeniini-3-cme-ZU-GCSGKLICTTAVPWNASWS GCSGK- (cme-3-digoksigeniini) -LICTTAVPWNASWS GCSGKLICTTAVPWNASWSK (cme-3-digoksigeniini) G digoksigeniini-3-cme-UZU-LSLWGCKGKLV CYTS
gp41/3	digoksigeniini-3-cme-UZU-KDQQLLGIWGSSGKL
gp41/4	digoksigeniini-3-cme-UZU-ALETLLQNQLLSLW
gp32	digoksigeniini-3-cme-Z-NSWGCAFRQVCHTT

15

Taulukko 2c: Rutenyloidut lineaariset peptidit

gp120	BPRu-UZU-NNTRKSISIGPGRAFYT BPRu-UZ-NTTRSISIGPGRAFY BPRu(etyleeniglykoli)-UZ-NTTRSISIGPGRAFY NNTRKSISIGPGRAFYT-K(BPRu) BPRu-UZU-IDIQEERRMRIGPGMAWYS
gp41/1	BPRu-UZU-AVERYLKDQQLLGIW BPRu-UGGG-QARILAVERYLKDQQLLGIWGASG BPRu-GGGG-QARILAVERYLKDQQLLGIWGASG BPRu-UZU-WGIRQLRARLLALETLLQN
gp41/2	BPRu-UZU-LGIWGCSGKLICTTAV BPRu-UGGG-GCSGKLICTTAVPWNASWS (GCSGKLICTTAVPWNASWS) K- (BPRu)
gp41/3	BPRu-UZU-KDQQLLGIWGSSGKL
gp41/4	BPRu-UZU-ALETLLQNQLLSLW
gp32	BPRu-UZU-NSWGCAFRQVCHTT BPRu-GGG-QAQLNSWGCAFRQVCHTTVPWPNDSLT

10 Taulukko 2d: Haaroittuneet peptidit

gp120	(NTTRSISIGPGRAFY-AbuZ AbuZ) ₂ -K-Z-AbuZ-K- (Bi) ((NTTRSISIGPGRAFY-ZU) ₂ -K-UU-K- (Bi) ((NNTRKSISIGPGRAFYT-UZU-K) ₂ -UZU- NNTRKSISIGPGRAFYT-UZU-K) ₂ -UZU-Bi
gp120	(NTTRSISIGPGRAFY-ZU) ₂ -K-UU-K- (BPRu)

15 HCV:n NS5-alueelta, NS4-alueelta, ydinalueelta ja NS3-
alueelta syntetisoitiin seuraavat taulukoissa 3a-d esitetyt
peptidit.

Taulukko 3a: SH-aktivoituneet lineaariset peptidit

NS4/3	C-UZ-SRGNHVSPTHYVPESDAA
-------	-------------------------

5 Taulukko 3b: Hapteenimerkityt lineaariset peptidit

	NS5/1	digoksigeniini-3-cme-UZU-SRRFAQALPVWARPD
	Core2m	digoksigeniini-3-cme-U-PQDVKFPGGGQIVGGV
	NS4/1	digoksigeniini-3-cme-UU-Nle-EEASQHLPIEQ
10	NS4/2	digoksigeniini-3-cme-UU-QKALGLLQT
	NS4/3	digoksigeniini-3-cme-UZU-SRGNHVSPTHYVPESDAA
	Core1	digoksigeniini-3-cme-UZU-KNKRNTNRR
	Core1+2	digoksigeniini-3-cme-U-PQRKNKRNTNRRPQDVKFPGG- GQIVGW
	NS 3/1	digoksigeniini-3-cme-UZ-AWYELTPAETTVRL- RAYMNTPLPV

15

Taulukko 3c: Rutenyloidut lineaariset peptidit

	Core1	BPRu-GGGG-KNKRNTNRR
	Core1+2	BPRu-UZU-KNKRNTNRRPQDVKFPGGGQIVGGV
20	NS4/1+2	BPRu-UZ-SQHLPIEQG-NleNle-LAEQFKQALGLLQT
	NS4/3m	BPRu-UZ-SRGNHVSPTHYVPESDAA
	NS5/1	BPRu-UZ-SRRFAQALPVWARPD
	Core1+2+3	BPRu-UZ-KNKRNTNRRPQDVKFPGGGQIVGGVLLPRR
	Core1m	BPRu-UZ-NPKPQKKNKRNTNRR
25	Core3m	BPRu-UZ-GQIVGGVYLLPRRGPRLG
	Core2m	BPRu-UZ-PQDVKFPGGGQIVGGV
	NS4/3m-1	BPRu-UZU-SRGNHVSPTHYVPESDAA
	NS4/1	BPRu-UZU-SQHLPIEQ

30

Taulukko 3d: Haaroittuneet peptidit

5	NS4/3m	(SRGNHVSPHTHYVPESDAA-UU) ₂ KUUK (BPRu)
		(SRGNHVSPHTHYVPESDAA-UU) ₄ K ₂ KUUK (BPRu)
		(SRGNHVSPHTHYVPESDAA-UU) ₈ K ₄ U ₄ K ₂ KUUK (BPRu)
		(SRGNHVSPHTHYVPESDAA-UU) ₂ KUUK (Z-Bi)
		(SRGNHVSPHTHYVPESDAA-UU) ₄ K ₂ KUUK (Z-Bi)
		(SRGNHVSPHTHYVPESDAA-UU) ₈ K ₄ U ₄ K ₂ KUUK (Z-Bi)

Esimerkki 2

- 10 Kantajaan sidottujen, peptidiepitoppeja sisältävien multi-meeristen antigeenien (polyhapteenien) valmistus
- Vastaavat peptidit valmistettiin reaktiivisella merkaptofunktiolla, esimerkiksi lisäämällä lisäkysteiinin (katso taulukoita 2a ja 2b). Peptidi voi tällöin olla modifioitu
- 15 joko N- tai C-terminaalaisesti tai myös mielivaltaisesti sekvenssiin nk. linkkerillä. Vastaavien peptidien synteesi tapahtui esimerkissä 1 kuvatulla tavalla.

- Polyhapteeniksi reagoimaan saattamista varten NH₂-ryhmäpi-
- 20 toinen kantaja ladattiin ensin merkkiryhmän vastaavalla aktiiviesterillä ja seuraavaksi maleinimidoalkyyli-ryhmillä, käsittelemällä erikoisesti maleinimidoheksyyli- (MHS) tai maleinimidopropyli-N-hydroksisukkinimidiesterillä (MPS). Tämän kautta primääriset aminoryhmät kantajassa (esimerkiksi
- 25 lysiinitähteiden ε-aminosivuketju) merkittiin osaksi, ja osaksi muutettiin maleinimidiryhmiksi.

- Kantajen reaktio aktiiviesterien kanssa tapahtui erikoisesti 0,1 mol/l kaliumfosfaattipuskurissa, pH 7,0 - 8,5 ja kon-
- 30 sentraatiossa 5 - 20 mg/ml 2 - 4 tunnin sisällä huoneenlämpötilassa. Pienimolekyylliset ainesosat erotettiin joko dialyysillä tai geelikromatografialla (AcA 202-Gel, eluentti 0,1 mol/l kaliumfosfaattipuskuri, pH 7 - 8,5).

- 35 Edelleen eräässä vaiheessa peptidi tai peptidiseos, jossa oli reaktiivinen merkaptofunktio, liitettiin sitten MHS-modifioituun, varautuneeseen kantajaan 0,1 mol/l kaliumfos-

faattipuskurissa, pH 8,5, 6 tunnin sisällä huoneenlämpötilassa. Reagoimaton peptidi erotettiin joko dialyysillä tai geelikromatografialla.

- 5 Jos merkin on oltava suoraan peptidissä, polyhapteeni syntetisoitiin analogisesti, ja käytettiin vastaavasti merkittyä, SH-aktivoitua peptidiä.

- Kantajina käytettiin kani-IgG:tä, naudanseerumialbumiinia,
10 β -galaktosidaasia, aminodekstraania ja nauta-Fab-vasta-ainefragmentteja. Kantajan panostus peptidisekvensseillä oli 1:2 - 1:20 moolipohjalta. Kantajan panostus merkkiryhmällä oli 1:1 - 1:20 moolipohjalta.

- 15 Esimerkki 3

Kanjatalle sidottujen multimeeristen antigeenien (polyhapteenien) valmistus, joissa oli polypeptidiepitoopeja esimerkissä poly-p24-RSA-BPRu:sta

- 20 1. Periaate

Naudanseerumialbumiinia (RSA) saatettiin reagoimaan rutenium-(bis-pyridyyl)₃²⁺-N-hydroksisukkinimidiesterin (BPRU) ja maleinimidoheksanoyyli-N-hydroksi-sukkinimidiesterin (MHS) kanssa ilmoitetussa järjestyksessä, ja dialysoitiin
25 kulloinkin vapaiden, liittymättömien derivatisointireagenssien poistamiseksi.

- E. colista saatua yhdistelmä-DNA-p24-antigeeniä (Ghrayeb ja Chang, DNA 5 (1986), 93-99), jolla oli kuviossa 1 esitetty
30 aminohapposekvenssi, saatettiin reagoimaan N-sukkinimidyyli-S-asetyylitiopropionaatin (SATP) kanssa tiolitähteiden liissäämiseksi aminoryhmien kautta, ja dialysoitiin vapaan, liittymättömän SATP:n poistamiseksi.

- 35 Aktivoidussa p24-antigeenissä olevien SH-ryhmien vapautuksen jälkeen liitettiin RSA-BPRU:n maleinimidofunktiot. Ykimää-

räiset funktionaaliset liitosryhmät salvattiin kysteiniinillä ja N-metyylimaleinimidillä, ja täten reaktio pysäytettiin.

Sitten tuote eristettiin reaktioseoksesta Sephacryl S
5 200:lla kromatografoimalla.

2.1 RSA (MH)-BPRU:n valmistus

250 mg:aan RSA:ta lisättiin proteiinikonsentraatiossa 20
mg/ml PBS-puskurissa, pH 8,0, 5-kertainen molaarinen ylimää-
10 rä BPRU-reagenssia (0,4 ml BPRU-kantaliuosta, jossa oli 47
mg/ml DMSO:ssa).

Lisäyksen jälkeen sekoitettiin edelleen 75 min ajan 25
°C:ssa. Sitten reaktio pysäytettiin lisäämällä lyysiiniä
15 loppukonsentraatioon 10 mmol/l, ja sekoitettiin edelleen 30
min ajan 25 °C:ssa.

Läsnä olevat RSA:n SH-ryhmät derivatisoitiin lisäämällä
jodiasetamidia loppukonsentraatioon 10 mmol/l. Tätä varten
20 erää sekoitettiin edelleen 45 min ajan 25 °C:ssa ja pH-ar-
vossa 8,0.

Vapaat, liittymättömät derivatisointireagenssit erotettiin
täydellisesti dialysoimalla (20 tuntia, 4 °C) >500-kertaista
25 PBS-puskurin, pH 7,5 (50 mmol/l Na-fosfaattia, 150 mmol/l
NaCl, pH 7,5), tilavuutta vastaan.

BPRU:n muodostuminen oli 4,7 mol/mol RSA. Saanto oli 220 mg
RSA-BPRU:ta (89 %).
30

220 mg:aan RSA-BPRU:ta lisättiin sitten proteiinikonsentraa-
tiossa 20 mg/ml PBS-puskurissa, pH 7,1, 25-kertainen molaa-
rinen ylimäärä MHS-reagenssia (0,5 ml MHS-kantaliuosta, 50
mg/ml DMSO), ja sekoitettiin edelleen 60 min ajan 25 °C:ssa.
35

Reaktio pysäytettiin lisäämällä lyysiiniä loppukonsentraatioon 10 mmol/l, ja sekoitettiin edelleen 30 min ajan 25 °C:ssa.

- 5 Vapaa, liittymätön MHS-reagenssi erotettiin täydellisesti dialysoimalla (20 tuntia, 4 °C) >500-kertaista PBS-putkurin, pH 7,5, tilavuutta vastaan. Saanto: 210 mg RSA(MH)-BPRU:ta (84 %).
- 10 2.2 p24-antigeenin (SATP) valmistus
100 mg:aan p24-antigeeniä lisättiin proteiinikonsentraatiossa 10 mg/ml 0,1 M Na-fosfaattia, 0,1 % (paino/tilavuus) SDS:ää, pH 7,1, 3-kertainen molaarinen ylimäärä SATP-reagenssia (0,06 ml SATP-kantaliuos, jossa oli 35 mg/ml DMSO:-ssa), ja sekoitettiin edelleen 60 min 25 °C:ssa.

Sitten reaktio pysäytettiin lisäämällä lyysiiniä loppukonsentraatioon 10 mmol/l, ja sekoitettiin edelleen 30 min ajan 25 °C:ssa.

20

Vapaa, liittynätön SATP-reagenssi poistettiin seuraavaksi täydellisesti dialysoimalla (20 tuntia, huoneenlämpötila) >500-kertaista tilavuutta vastaan liuosta, jossa oli 0,1 mol/l Na-fosfaattia, 0,1 % (paino/tilavuus) SDS, pH 6,5.

- 25 Saanto: 95 mg p24-antigeeniä (SATP) (95 %).

2.3 Poly-p24-antigeeni-RSA-BPRU:n valmistus

- 95 mg:aan p24-antigeeniä (SATP) lisättiin proteiinikonsentraatiossa 10 mg/ml liuoksessa, jossa oli 0,1 mol/l Na-fosfaattia, 0,1 % (paino/tilavuus) SDS:ää, pH 7,5 hydroksyyliamiinia (1 mol/l; Merck) loppukonsentraatioon 30 mmol/l, ja erää sekoitettiin edelleen 60 min ajan 25 °C:ssa.

- 35 Lisättiin 18 mg RSA(MH)-BPRU:ta, ja erää sekoitettiin edelleen 60 min ajan proteiinikonsentraatiossa 9 mg/ml (pH 7,1; 25 °C). Pysäyttämiseksi lisättiin kysteiiniä loppukonsentraatioon 2 mmol/l, ja sekoitettiin edelleen 30 min ajan pH-

arvossa 7,1. Seuraavaksi lisättiin N-metyylimaleimidiä (Sigma) loppukonsentraatioon 5 mmol/l, ja sekoitettiin edelleen 30 min ajan pH-arvossa 7,1 ja 25 °C:ssa.

- 5 Täten pysäytettyä erää dialysoitiin 18 tunnin ajan huoneenlämpötilassa (RT) >500-kertaista tilavuutta vastaan liuosta, jossa oli 0,1 mol/l Na-fosfaattia, 0,1 % (paino/tilavuus) SDS:ää, pH 6,5, ja puhdistettiin Sephacryl S 200-kolonnilla (Pharmacia). Kolonniajon tärkeimmät reunaehdot: kolonnitilavuus 340 ml, lisäystilavuus 12 ml, virtausnopeus 13,0
- 10 cm/tunti, ajopuskuri 0,1 mol/l Na-fosfaattia, 0,1 % (paino/tilavuus) SDS:ää, pH 6,5, käyttölämpötila huoneenlämpötila.
- 15 Kolonniajoa seurattiin läpivirtausfotometrillä aallonpituudella 280 nm, ja kerättiin fraktioissa (fraktion koko noin 0,5 % kolonnin tilavuudesta).

- 20 Suurimolekyläärisen eluointiprofiilin fraktiot kerättiin UV-investoinnin jälkeen pooliksi, tuote konsentroitiin Amicon-sekoitussolussa YM30-membraanilla (Amicon) proteiinikonsentraatioon 10 mg/ml, ja jäädytettiin -80 °C:ssa.

- 25 Rakenne: 5 mol p24-antigeeniä/mol p24-antigeeni-RSA-BPRU:ta.
Saanto: 19 mg.

- Esimerkki 4
Siltatestiformaatin herkkyyden paraneminen multimeerisiä antigeenejä käytettäessä

30

- a) Kantaajalle sidotut multimeeriset antigeenit (polyhapteenit)
Käytettiin erilaisia biotinyloitujen polyhapteenien muunnelmia kaksoisantigeeni-immunomäärityksessä yhdistelmänä monomeerisen digoksigenyloidun hapteenin kanssa, ja biotinyloidun tai digoksigenyloidun hapteenin samalla moolimäärällä. Epitooppina käytettiin aminohapposekvenssiä NNTRKSI-
- 35

SIGPGRAFYT HIV:n gp120-alueelta. Hapteenien valmistus tapahtui esimerkeissä 1 ja 2 kuvatulla tavalla. Natiivi-anti-HIV-seerumien suhteellinen reaktiivisuus eri biotinyloitujen polyhapteenien kanssa normitettiin seerumien reaktiivisuuden vastaavan biotinyloidun monomeerisen hapteenin kanssa (= 100-% reaktiivisuus).

Tämän kokeen tulokset esitetään taulukossa 4.

Kantajamolekyyli	tehokas lataus/-kantajamolekyyli		Reaktiivisuus: vertailu monomeerisen antigeenin kanssa (= 100-%)
	biotiini	peptidi	
RSA (MW: 69000) (n. 627 aminohappoa)	1	4,2	noin 173,0 %
	1	5,1	noin 185,0 %
ß-Gal (MW:465000) (n. 4227 aminohappoa)	1	2,2	noin 123,5 %
	1	3,6	noin 151,8 %
	1	9,4	noin 125,0 %
Nauta-Fab (MW: 75000) (n. 682 aminohappoa)	1	5,9	noin 146,0 %

b) Multimeeriset haaroittuneet antigeenit

Suoritettiin biotinyloitujen ja rutenyloitujen antigeenien vertailu monomeerisillä tai multimeerisillä haaroittuneilla epitoopeilla kaksoisantigeeniimmunomäärityksessä siltatestiformaatissa.

Yhden epitoopin kohdalla HCV:n NS4-alueelta (sekvenssi SRGNHVSPTHYVPESDAA) verrattiin monomeerisen biotinyloidun antigeenin ja monomeerisen rutenyloidun antigeenin yhdistelmää multimeerisen haaroittuneen biotinyloidun antigeenin (katso taulukkoa 3d, rivi 2) ja monomeerisen rutenyloidun antigeenin yhdistelmää siltatestissä. Määritettiin signaalierottaminen, ts. positiivisten ja negatiivisten näytteiden mittasignaalin ero. Suurempi signaalierottaminen merkitsee parempaa herkkyyttä. Multimeeristä biotinyloitua antigeeniä käytettäessä saatiin signaalierottaminen 386 verrattuna

signaalierottamiseen vain 208 molempien monomeeristen antigeenien yhdistelmällä.

Vastaavasti suoritettiin kaksoisantigeenisiltatesti anti-
 5 geenisekvenssillä HIV:n gp120-alueelta. Käytetyn epitoopin
 aminohapposekvenssi oli NTTRSISIGPGRAFY. Verrattiin monomee-
 risen biotinyloidun ja monomeerisen rutenyloidun antigeenin
 yhdistelmää multimeerisen haaroittuneen biotinyloidun anti-
 geenin (katso taulukkoa 2d, rivi 2) ja multimeerisen rute-
 10 nyloidun antigeenin (katso taulukkoa 2d, rivi 4) yhdistel-
 mään. Testissä molempien multimeeristen antigeenien yhdis-
 telmällä saatiin positiivisen ja negatiivisen näytteen vä-
 lillä signaalierottaminen 12. Molempien monomeeristen anti-
 geenien yhdistelmällä sitä vastoin nähtiin signaalierottami-
 15 nen vain 10.

Esimerkki 5

Siltatestiformaatin herkkyyden parantaminen multimeerisiä
 kantajalle sidottuja antigeenejä käyttämällä

20 Tutkittiin monomeerisen biotinyloidun ja monomeerisen ru-
 tenyloidun antigeenin yhdistelmää monomeerisen biotinyloidun
 antigeenin ja kantajalle sidotun multimeerisen rutenyloidun
 antigeenin (kantajamolekyylillä: naudanseerumialbumiini; epi-
 tooppi: HIV-p24-antigeeni; valmistus esimerkin 3 mukaan)
 25 yhdistelmän ja kantajalle sidotun multimeerisen biotinyloi-
 dun antigeenin ja monomeerisen rutenyloidun antigeenin yh-
 distelmän kanssa siltatestissä. Kahdessa eri positiivisessa
 näytteessä (HIV-seerumeita) havaittiin kummankin monomeerien
 antigeenin yhdistelmällä kulloinkin positiivinen/negatiivi-
 30 nen-signaalierottaminen 2, kun taasi monomeerisen biotiny-
 loidun antigeenin ja multimeerisen rutenyloidun antigeenin
 yhdistelmällä saatiin tulokseksi erottaminen 19 tai 7, ja
 multimeerisen biotinyloidun antigeenin ja monomeerisen ru-
 tenyloidun antigeenin yhdistelmälle erottaminen 4 tai 3.

35 Myös käytettäessä monomeerisen biotinyloidun antigeenin ja
 toisen multimeerisen rutenyloidun antigeenin (kantajamole-

kyyli: kani-immunoglobuliini) yhdistelmää, saatuun kolmella eri positiivisella näytteellä oleellisesti suurempi positiivinen/negatiivinen-signaalierottaminen 3,22 tai 10 verrattuna signaalierottamiseen 2,9 tai 8 monomeeristen antigeenien yhdistelmällä.

Myös käytettäessä toista epitooppia (proteiini HIV-gp41-alueelta) voitiin osoittaa multimeeristen antigeenien ylivoimaisuus monomeerisiin antigeeneihin verrattuna. Kun monomeeristen biotinyloitujen ja digoksigenyloitujen antigeenien yhdistelmällä ei siltatestissä havaittu käytännöllisesti lainkaan erottamista negatiivisen ja positiivisen välillä, nähtiin multimeeristen polyhapteenien yhdistelmällä erittäin hyvä erottaminen.

15

Esimerkki 6

Siltatestiformaatin herkkyyden paraneminen multimeerisiä antigeenejä käytettäessä

Erityisesti seinänpuoleisen monomeerisen antigeenin ja merkityn multimeerisen antigeenin yhdistelmä on optimaalisen herkkyyden saavuttamiseksi leveällä konsentraatioalueella spesifisellä immunoglobuliinilla edullinen. Edullisia käytömmääriä ovat 1 ekvivalentti seinänpuoleista epitooppia 0,2 - 10 ja erityisesti 0,2 - 8 ekvivalenttiin merkittyä epitooppia.

25

Kuviossa 2 esitetään vertailu monomeerisen biotinyloidun antigeenin ja monomeerisen rutenyloidun antigeenin yhdistelmästä epitooppisuhteessa 1:1 (käyrä 1) ja monomeerisen biotinyloidun antigeenin ja multimeerisen rutenyloidun kantajalle sidotun antigeenin yhdistelmästä epitooppisuhteella 1:2 (käyrä 2) tai 1:4 (käyrä 3).

30

Epitooppina käytettiin esimerkissä 4a esitettyä sekvenssiä HIV:n gp120-alueelta. Multimeerisen antigeenin kantajamolekyyli oli RSA. Kantajan lataus oli epitooppiryhmillä 5:1 ja BPRu-ryhmillä 3:1 kulloinkin moolipohjalta.

35

Kuviosta 2 ilmenee, että multimeeristen antigeenien käyttö johtaa Hook-efektin vähenemiseen ja yleiseen herkkyyden kohoamiseen.

5 Esimerkki 7

Siltatestiformaatin herkkyyden paraneminen multimeerisiä antigeenejä käytettäessä merkkiryhmien lukumäärää kohottamalla

- 10 Edelleen laajempi testiherkkyyden paraneminen saavutetaan siten, että merkki- tai kiintofaasinsidosryhmien lukumäärän kohottaminen on mahdollista suuremmassa laajuudessa epitoop-pialueita naamioimatta tai hydrofobisuutta kohottamalla epäspesifisiä tausta-arvoja kohottamatta.

15

Verrattiin digoksigenyloituja multimeerisiä antigeenejä, jotka sisälsivät epitooppeja HIV:n gp120-alueelta (katso esimerkkiä 4b) liitettyinä nauta-Fab-vasta-ainefragmentti-kantajalle. Kantajana lataus peptidiepitoopilla oli kulloinkin alueella 1:6 - 1:7 molaariselta pohjalta. Kantajan lataus digoksigeniiniryhmillä oli 1:2 tai 1:4.

- 25 Tämän kokeen tulokset esitetään taulukossa 5. On havaittavissa, että merkkiryhmien lukumäärää kohottamalla saavutettiin ei-lineaarinen herkkyyden paraneminen ja Hook-efektin huomattava väheneminen.

Taulukko 5

30	Näyte	Stökiometria	Stökiometria
		Kantaja: Dig.	Kantaja: Dig.
		1:4	1:2
35	Mittausalueen dynamiikka	mE	mE
	Laimennosasteet		
	1/16384	36	148
	1/8192	48	159
	1/4096	49	151

	1/2048	82	158
	1/1024	132	159
	1/512	302	157
	1/256	675	164
5	1/128	1503	190
	1/64	3493	259
	1/32	7436	480
	1/16	9306	1066
	1/8	9449	3036
10	1/4	9449	3378
	1/2	9449	2694
	laimentamaton	9474	2266

Esimerkki 8

- 15 Stabiilisuuden paraneminen multimeerisiä antigeenejä käyttä-
mällä

Testattiin monomeeristen ja multimeeristen antigeenien sta-
biilisuus. Tätä varten määritettiin signaalitoisto 3-päiväi-
sen 35 °C:ssa inkuboinnin jälkeen alkuperäiseen signaali-
20 intensiteettiin verrattuna.

Monomeeriselle rutenyloidulle antigeenille HIV:n gp120-alu-
eelta (sekvenssi katso esimerkkiä 4) mitattiin yhdistelmänä
tuoreen biotinyloidun monomeerisen antigeenin kanssa signaa-
25 litoisto 3,0 tai 4,0 % kahdella näytteellä. Käytettäessä
kantajalle sidottua multimeeristä rutenyloitua antigeeniä
(kantaja: kani-IgG, 4 merkkiryhmää ja 3 epitooppia/kantaja-
molekyyli) saatiin samoissa testiolosuhteissa signaalitoisto
73,1 tai 73,6 %.

30

Vastaavalla tavalla biotinyloitua monomeeristä antigeeniä,
jolla oli sama epitooppisekvenssi, tutkittiin kantajalle
sidotun, biotinyloidun multimeerisen antigeenin kanssa (kan-
taja: kani-IgG, 18 biotiiniryhmää ja 3 epitooppia/kantaja)
35 yhdistelmänä monomeerisen rutenyloidun antigeenin kanssa.
Monomeeriselle biotinyloidulle antigeenille saatiin tulok-

seksi signaalitoistot 25,0 tai 37,0 %, ja multimeeriselle antigeenille signaalitoistot 120,3 tai 79,9 %.

Esimerkki 9

- 5 Herkkyyden paraneminen alhaisemman affiniteetin omaavien antigeenien kanssa reaktiivisuuden suhteen
- Multimeerisiä antigeenejä käytetään edullisesti alhaisemman affiniteetin omaavan spesifisen immunoglobuliinin tunnistukseen, esimerkiksi äskettäin tapahtuneen serokonversion ja
- 10 uusien virusalatyyppien kohdalla.

a) Rutenyloidut multimeeriset antigeenit

- Tutkittiin positiivinen/negatiivinen-signaalierottamista käyttäen antigeenejä, joissa oli epitooppsekvenssi HCV:n
- 15 NS4/3-alueelta. Monomeerisen rutenyloidun ja monomeerisen biotinyloidun antigeenin yhdistelmä antoi tulokseksi kahdella eri positiivisella serokonversionäytteellä positiivisen/negatiivinen-signaalierottamisen 3 tai 1, ts. positiivista näytettä ei tunnistettu sellaiseksi. Multimeerisiä
- 20 IgG-kantajalle sidottuja biotinyloitua ja rutenyloitua antigeenejä käytettäessä saatiin kulloinkin tulokseksi signaalierottaminen 21. Vasta multimeerisiä antigeenejä käyttämällä positiiviset näytteet voidaan luokitella oikein.

- 25 b) Biotinyloidut ja digoksigenyloidut multimeeriset antigeenit

- Verrattiin kulloinkin samaa peptidiepitooppi HIV:n gp41-alueelta (gp41/3) kantajalle sidottuna multimeerisenä antigeeninä ja monomeerisenä antigeeninä. Käytettiin kulloinkin
- 30 50 ng/ml biotinyloitua ja digoksigenyloitua monomeeristä peptidiä. Multimeerisillä antigeeneillä käytettiin 50 ng/ml "peptidiekvivalenttia", jolloin peptidimäärä laskettiin polyhapteenin latausasteen kautta. Testi suoritettiin ES700-analyysiautomaatilla.

- 35 Testit suoritettiin eri serokonversiopaneleja näytteinä käyttäen. Kuviossa 3 osoitetaan, että panelit luokiteltiin

"cut-off"-indeksi on kokeen negatiivisen ja positiivisen
5 arvioinnin raja. Se määritellään 2x negatiivisen kontrollin
arvoksi.

SEKVENSSILUETTELO

(1) YLEISET TIEDOT:

(i) HAKIJA:

- 5 (A) NIMI: Boehringer Mannheim GmbH
 (B) KATU: Sandhofer Str. 116
 (C) KAUPUNKI: Mannheim
 (E) MAA: Saksa
 (F) POSTINUMERO: 63305

- 10 (ii) KEKSINNÖN NIMITYS: Spesifisen immunoglobuliinin
 määriys moninkertaisia
 antigeenejä käyttäen

(iii) SEKVENSSIEN LUKUMÄÄRÄ: 17

15 (iv) KONEKOODIMUOTO:

- (A) VÄLINETYYPPI: disketti
 (B) TIETOKONE: IBM PC-yhteensopiva
 (C) KÄYTTÖJÄRJESTELMÄ: PC-DOS/MS-DOS
 (D) OHJELMISTO: PatentIn Release #1.0,
 20 Version #1.25 (EPA)

(2) SEKVENSSIN ID NO:1 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

- 25 (A) PITUUS: 17 aminohappoa
 (B) TYYPPI: aminohappo
 (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(vi) ALKUPERÄ:

- 30 (A) ORGANISMI: ihmisen immuunikatovirus tyyppi 1

(viii) ASEMA PERIMÄSSÄ:

- (A) KROMOSOMI/SEGMENTTI: gp120

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO: 1:

35

Asn Asn Thr Arg Lys Ser Ile Ser Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr

1

5

10

15

Thr

(2) SEKVENSSIN ID NO:2 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

- 5 (A) PITUUS: 16 aminohappoa
 (B) TYYPPI: aminohappo
 (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

10 (vi) ALKUPERÄ:

(A) ORGANISMI: ihmisen immuunikatovirus tyyppi 1

(viii) ASEMA PERIMÄSSÄ:

(A) KROMOSOMI/SEGMENTTI: gp120

15 (xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:2:

Asn Thr Thr Arg Ser Ile Ser Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr
 1 5 10 15

20 (2) SEKVENSSIN ID NO:3 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

- (A) PITUUS: 19 aminohappoa
 (B) TYYPPI: aminohappo
 (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

25 (ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(vi) ALKUPERÄ:

(A) ORGANISMI: ihmisen immuunikatovirus tyyppi 1

(B) KANTA: alatyyppi O

30 (viii) ASEMA PERIMÄSSÄ:

(A) KROMOSOMI/SEGMENTTI: gp120

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:3:

35 Ile Asp Ile Gln Glu Glu Arg Arg Met Arg Ile Gly Pro Gly Met Ala
 1 5 10 15

Trp Tyr Ser

(2) SEKVENSSIN ID NO:4 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

(A) PITUUS: 24 aminohappoa

(B) TYYPPI: aminohappo

5 (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(vi) ALKUPERÄ:

(A) ORGANISMI: ihmisen immuunikatovirus tyyppi 1

10 (viii) ASEMA PERIMÄSSÄ:

(A) KROMOSOMI/SEGMENTTI: gp41

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:4:

15 Gln Ala Arg Ile Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu Lys Asp Gln Gln Leu
 1 5 10 15

Leu Gly Ile Trp Gly Ala Ser Gly
 20

20

(2) SEKVENSSIN ID NO:5 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

(A) PITUUS: 23 aminohappoa

(B) TYYPPI: aminohappo

25 (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(vi) ALKUPERÄ:

(A) ORGANISMI: ihmisen immuunikatovirus tyyppi 1

30 (viii) ASEMA PERIMÄSSÄ:

(A) KROMOSOMI/SEGMENTTI:gp41

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:5:

35 Leu Gly Ile Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile Cys Thr Thr Ala Val
 1 5 10 15

Pro Trp Asn Ala Ser Trp Ser
 20

(2) SEKVENSSIN ID NO:6 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

(A) PITUUS: 15 aminohappoa

(B) TYYPPI: aminohappo

5 (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(vi) ALKUPERÄ:

(A) ORGANISMI: ihmisen immuunikatovirus tyyppi 1

10 (viii) ASEMA PERIMÄSSÄ:

(A) KROMOSOMI/SEGMENTTI: gp41

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:6:

15 Lys Asp Gln Gln Leu Leu Gly Ile Trp Gly Ser Ser Gly Lys Leu
 1 5 10 15

(2) SEKVENSSIN ID NO:7 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

20 (A) PITUUS: 15 aminohappoa

(B) TYYPPI: aminohappo

(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

25 (vi) ALKUPERÄ:

(A) ORGANISMI: ihmisen immuunikatovirus tyyppi 1

(B) KANTA: alatyyppi O

(viii) ASEMA PERIMÄSSÄ:

(A) KROMOSOMI/SEGMENTTI: gp41

30

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:7:

Ala Leu Glu Thr Leu Leu Gln Asn Gln Gln Leu Leu Ser Leu Trp
 1 5 10 15

35

(2) SEKVENSSIN ID NO:8 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

(A) PITUUS: 15 aminohappoa

- (B) TYYPPI: aminohappo
 (D) TOPOLOGIA: lineaarinen
 (ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi
 (iii) HYPOTEETTINEN: EI
 5 (vi) ALKUPERÄ:
 (A) ORGANISMI: ihmisen immuunikatovirus tyyppi 1
 (B) KANTA: alatyyppejä 0
 (viii) ASEMA PERIMÄSSÄ:
 (A) KROMOSOMI/SEGMENTTI: gp41
 10 (xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:8:

Leu Ser Leu Trp Gly Cys Lys Gly Lys Leu Val Cys Tyr Thr Ser
 1 5 10 15

- 15 (2) SEKVENSSIN ID NO:9 TIEDOT:
 (i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
 (A) PITUUS: 19 aminohappoa
 (B) TYYPPI: aminohappo
 20 (D) TOPOLOGIA: lineaarinen
 (ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi
 (iii) HYPOTEETTINEN: EI
 (vi) ALKUPERÄ:
 (A) ORGANISMI: ihmisen immuunikatovirus tyyppi 1
 25 (B) KANTA: alatyyppejä 0
 (viii) ASEMA PERIMÄSSÄ:
 (A) KROMOSOMI/SEGMENTTI: gp41
 (xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:9:

30 Trp Gly Ile Arg Gln Leu Arg Ala Arg Leu Leu Ala Leu Glu Thr Leu
 1 5 10 15

- Leu Gln Asn
 35 (2) SEKVENSSIN ID NO:10 TIEDOT:
 (i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
 (A) PITUUS: 27 aminohappoa

- (B) TYYPPI: aminohappo
 (D) TOPOLOGIA: lineaarinen
 (ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi
 (iii) HYPOTEETTINEN: EI
 5 (vi) ALKUPERÄ:
 (A) ORGANISMI: ihmisen immuunikatovirus tyyppi 1
 (B) KANTA: alatyyppe O
 (viii) ASEMA PERIMÄSSÄ:
 (A) KROMOSOMI/SEGMENTTI: gp32
 10 (xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:10:

Gln Ala Gln Leu Asn Ser Trp Gly Cys Ala Phe Arg Gln Val Cys His
 1 5 10 15
 15 Thr Thr Val Pro Trp Pro Asn Asp Ser Leu Thr
 20 25

- (2) SEKVENSSIN ID NO:11 TIEDOT:
 20 (i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
 (A) PITUUS: 15 aminohappoa
 (B) TYYPPI: aminohappo
 (D) TOPOLOGIA: lineaarinen
 (ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi
 25 (iii) HYPOTEETTINEN: EI
 (vi) ALKUPERÄ:
 (A) ORGANISMI: hepatiitti C-virus
 (viii) ASEMA GENOMISSA:
 (A) KROMOSOMI/SEGMENTTI: NS5
 30 (xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:11:

Ser Arg Arg Phe Ala Gln Ala Leu Pro Val Trp Ala Arg Pro Asp
 1 5 10 15
 35

- (2) SEKVENSSIN ID NO:12 TIEDOT:
 (i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
 (A) PITUUS: 16 aminohappoa
 (B) TYYPPI: aminohappo

- (D) TOPOLOGIA: lineaarinen
- (ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi
- (iii) HYPOTEETTINEN: EI
- (vi) ALKUPERÄ:
- 5 (A) ORGANISMI: hepatiitti C-virus
- (viii) ASEMA PERIMÄSSÄ:
- (A) KROMOSOMI/SEGMENTTI: ydin
- (xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:12:
- 10
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Pro | Gln | Asp | Val | Lys | Phe | Pro | Gly | Gly | Gly | Gln | Ile | Val | Gly | Gly | Val |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
- (2) SEKVENSSIN ID NO:13 TIEDOT:
- 15 (i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
- (A) PITUUS: 12 aminohappoa
- (B) TYYPPI: aminohappo
- (D) TOPOLOGIA: lineaarinen
- (ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi
- 20 (iii) HYPOTEETTINEN: EI
- (vi) ALKUPERÄ:
- (A) ORGANISMI: hepatiitti C-virus
- (viii) ASEMA PERIMÄSSÄ:
- (A) KROMOSOMI/SEGMENTTI: NS4
- 25 (xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:13:
- | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Glu | Glu | Ala | Ser | Gln | His | Leu | Pro | Tyr | Ile | Glu | Gln |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | |
- 30 (2) SEKVENSSIN ID NO:14 TIEDOT:
- (i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
- (A) PITUUS: 9 aminohappoa
- (B) TYYPPI: aminohappo
- 35 (D) TOPOLOGIA: lineaarinen
- (ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi
- (iii) HYPOTEETTINEN: EI
- (vi) ALKUPERÄ:

(A) ORGANISMI: hepatiitti C-virus
 (viii) ASEMA PERIMÄSSÄ:
 (A) KROMOSOMI/SEGMENTTI: NS4

5 (xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:14:

Gln Lys Ala Leu Gly Leu Leu Gln Thr
 1 5

10 (2) SEKVENSSIN ID NO:15 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
 (A) PITUUS: 18 aminohappoa
 (B) TYYPPI: aminohappo
 (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

15 (ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(vi) ALKUPERÄ:

(A) ORGANISMI: hepatiitti C-virus
 (viii) ASEMA PERIMÄSSÄ:

20 (A) KROMOSOMI/SEGMENTTI: NS4

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:15:

Ser Arg Gly Asn His Val Ser Pro Thr His Tyr Val Pro Glu Ser Asp
 25 1 5 10 15

Ala Ala

(2) SEKVENSSIN ID NO:16 TIEDOT:

30 (i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
 (A) PITUUS: 28 aminohappoa
 (B) TYYPPI: aminohappo
 (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

35 (iii) HYPOTEETTINEN: EI

(vi) ALKUPERÄ:

(A) ORGANISMI: hepatiitti C-virus
 (viii) ASEMA PERIMÄSSÄ:

(A) KROMOSOMI/SEGMENTTI: ydin

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:16:

5 Pro Gln Arg Lys Asn Lys Arg Asn Thr Asn Arg Arg Pro Gln Asp Val
1 5 10 15

Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly Val Val
20 25

10

(2) SEKVENSSIN ID NO:17 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

(A) PITUUS: 25 aminohappoa

(B) TYYPPI: aminohappo

15 (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(vi) ALKUPERÄ:

(A) ORGANISMI: hepatiitti C-virus

20 (viii) ASEMA PERIMÄSSÄ:

(A) KROMOSOMI/SEGMENTTI: NS3

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:17:

25 Ala Trp Tyr Glu Leu Thr Pro Ala Glu Thr Thr Val Arg Leu Arg Ala
1 5 10 15

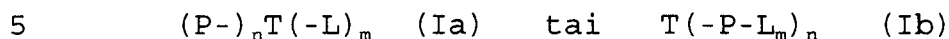
Tyr Met Asn Thr Pro Gly Leu Pro Val
20 25



Patenttivaatimukset

1. Menetelmä spesifisen vasta-aineen immunologiseen määri-
tykseen näytenesteessä, jolloin näytenestettä inkuboidaan
kiintofaasin läsnä ollessa kahden, määritettävää vasta-ai-
5 netta vastaan suunnatun antigeenin kanssa, jolloin ensimmäi-
sessä antigeenissä on vähintään yksi merkitsemisryhmä ja
toinen antigeeni (a) on sidottu kiintofaasille tai (b) on
kiintofaasille sitoutumaan pystyvässä muodossa, ja osoite-
taan määritettävä vasta-aine määrittämällä merkkiryhmän
10 kiintofaasissa tai/ja nestefaasissa, t u n n e t t u sii-
tä, että vähintään toinen molemmista antigeeneistä käsittää
useampia epitooppialueita, jotka reagoivat määritettävän
vasta-aineen kanssa.
- 15 2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t -
t u siitä, että vähintään toinen molemmista antigeeneistä
käsittää useampia samoja epitooppialueita.
3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, t u n -
20 n e t t u siitä, että ensimmäinen merkitty antigeeni käsit-
tää useampia epitooppialueita.
4. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, t u n -
25 n e t t u siitä, että toinen kiintofaasinpuoleinen antigeeni
käsittää useampia epitooppialueita.
5. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, t u n -
n e t t u siitä, että ensimmäinen merkitty antigeeni ja
toinen kiintofaasinpuoleinen antigeeni käsittävät useampia
30 epitooppialueita.
6. Yhden patenttivaatimuksista 1 - 5 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että käytetään antigeeniä, joka
käsittää määritettävän vasta-aineen kanssa reagoimatonta
35 kantajaa, jolle on liitetty kovalenttisesti useampia epi-
tooppialueita.

7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, t u n n e t -
t u siitä, että käytetään yleisen kaavan (Ia) tai (Ib) mu-
kaista antigeeniä:



jolloin T on kantaja, P on peptidi- tai polypeptidisekvens-
sejä, jotka sisältävät samoja tai erilaisia, immunologisesti
reaktiivisia epitooppialueita ja ovat liittyneet kovalentti-
sesti kantajalle, ja L on merkkiryhmiä tai kiintofaasille
kiinnittymään kykeneviä ryhmiä, jotka on liitetty kovalent-
tisesti kantajalle tai peptidi- tai polypeptidisekvensseil-
le, n on luku yli 1 - 40, ja m on luku 1 - 10.

8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen menetelmä, t u n n e t -
t u siitä, että P on synteettisiä peptidisekvenssejä, joi-
den pituus on 6 - 50 aminohappoa, ja jotka käsittävät epi-
tooppialueiden ohella vielä mahdollisesti immunologisesti
inaktiivisia välikealueita.

9. Patenttivaatimuksen 7 mukainen menetelmä, t u n n e t -
t u siitä, että P on yhdistelmä-DNA-polypeptidisekvenssejä,
joiden pituus on enintään 1 000 aminohappoa.

10. Yhden patenttivaatimuksista 1 - 5 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että käytetään antigeeniä, joka
käsittää useampia suoraan tai välikealueiden kautta keske-
nään kovalenttisesti liitettyjä epitooppialueita.

11. Patenttivaatimuksen 10 mukainen menetelmä, t u n -
n e t t u siitä, että käytetään yleisen kaavan (II) mukais-
ta antigeeniä:



jolloin P^1 , P^2 , P^3 ja P^4 ovat peptidisekvenssejä, joiden pi-
tuus on enintään 50 aminohappoa, jolloin vähintään 2 pepti-

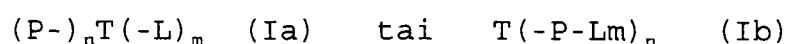
disekvenssit sisältää samoja tai erilaisia, immunologisesti reaktiivisia epitooppialueita, r on 1 tai 2, s on kokonaisluku 0 - 4, ja t on kokonaisluku 0 - 8, jolloin antigeeni sisältää vähintään yhden haaroittumiskohdan ja vähintään yhden merkkiryhmän tai kiintofaasille sitoutumaan kykenevän ryhmän.

12. Yhden patenttivaatimuksista 1 - 5 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että antigeeninä, joka käsittää useampia epitooppialueita, käytetään yhdistelmä-DNA-fuusiopolypeptidiä, jonka aminohapposekvenssi sisältää useampia immunologisesti reaktiivisia epitooppialueita, jotka voi olla liitetty yhteen immunologisesti inaktiivisten välikealueiden kautta.

13. Reagenssi spesifisen vasta-aineen immunologiseen määrittämiseen näytenesteessä, käsittäen reaktiivista kiintofaasia, kaksi, määritettävää vasta-ainetta vastaan suunnattua antigeeniä, jolloin ensimmäisessä antigeenissä on merkkiryhmä ja toinen antigeeni (a) on sidottu kiintofaasille tai (b) on kiintofaasille sitoutumaan pystyvässä muodossa, t u n n e t t u siitä, että vähintään toinen molemmista antigeeneistä käsittää useampia epitooppialueita, jotka reagoivat määritettävän vasta-aineen kanssa.

14. Multimeeristen antigeenien käyttö osoitusreagensseina immunologisessa testausmenetelmässä spesifisen vasta-aineen määrittämiseksi, t u n n e t t u siitä, että antigeenit sisältävät useampia samoja, määritettävän vasta-aineen kanssa immunologisesti reaktiivisia epitooppialueita ja vähintään yhden merkkiryhmän tai kiintofaasille sitoutumaan kykenevän ryhmän.

15. Yleisen kaavan (Ia) tai (Ib) mukainen antigeeni



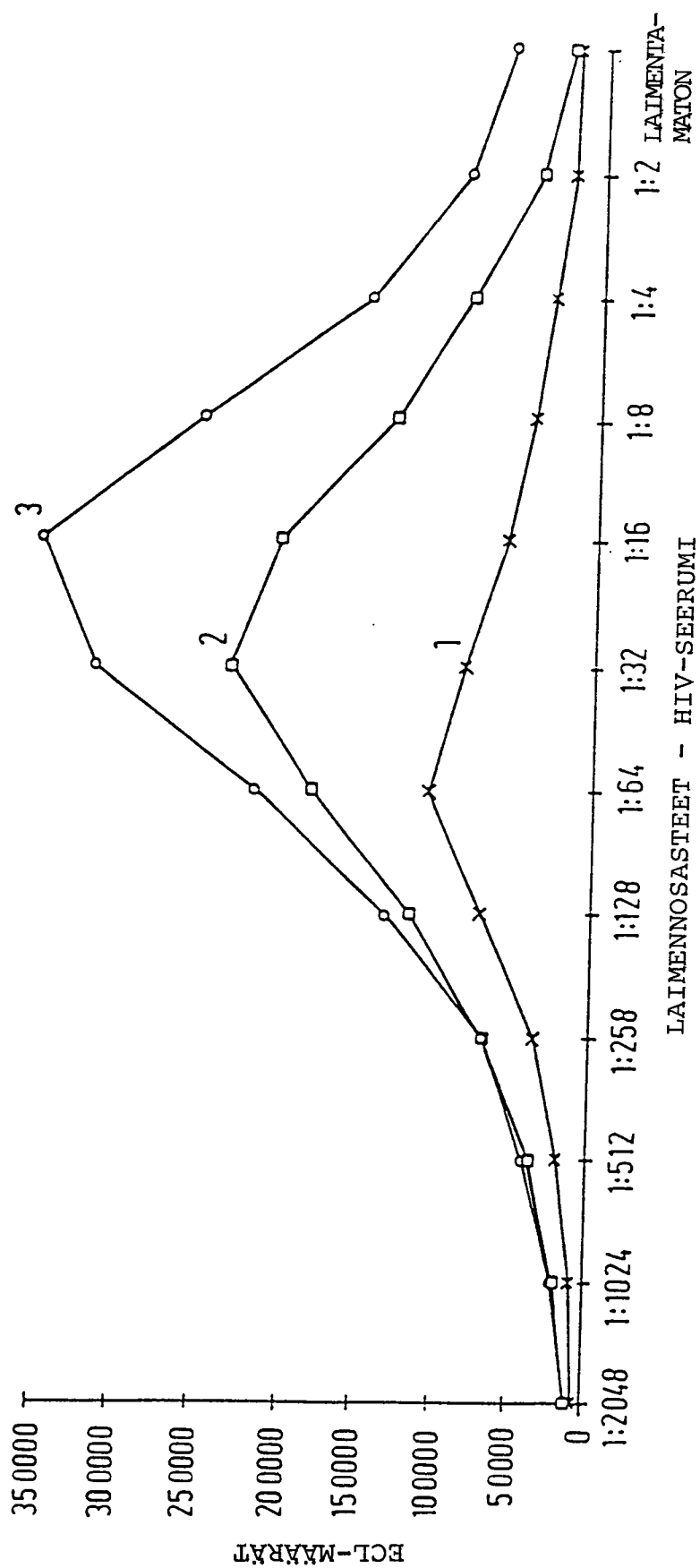
jolloin T on kantaja, P on peptidi- tai polypeptidisekvenssejä, jotka sisältävät samoja tai erilaisia, immunologisesti reaktiiviset epitooppialueita ja on liitetty kovalenttisesti kantajalle, ja L on merkkiryhmiä tai kiintofaasille kiinnittymään kykeneviä ryhmiä, jotka on liitetty kovalenttisesti kantajalle tai peptidi- tai polypeptidisekvensseille, n on luku yli 1 - 40, ja m on luku 1 - 10.

16. Yleisen kaavan (II) mukainen antigeeni

$$P^1\{P^2[P^3(P^4)_t]_s\}_r \quad (II)$$

jolloin P^1 , P^2 , P^3 ja P^4 ovat peptidisekvenssejä, joiden pituus on enintään 50 aminohappoa, jolloin vähintään 2 peptidisekvenssiä sisältää samoja tai erilaisia, immunologisesti reaktiivisia epitooppialueita, r on 1 tai 2, s on kokonaisluku 0 - 4, ja t on kokonaisluku 0 - 8, jolloin antigeeni sisältää vähintään yhden haaroittumiskohdan ja vähintään yhden merkkiryhmän tai kiintofaasille sitoutumaan kykenevän ryhmän.

KUVIO 2



KUVIO 3

Orig. Nr.	p24 Ag	p17	p24	p31	gp41	p51	p55	p66	gp120	Taudinkuva	Peptidi P3-B1/-Dig	Polyhapteeni P3-B1/-Dig
Paneeli U 1	+++									negatiivinen	0,3	1,8
Paneeli U 2	+++									negatiivinen	0,3	24,9
Paneeli U 3	++		++						++	HIV 1pos	0,3	25,0
Paneeli U 4	+		++						++	HIV 1pos	0,3	25,0
Paneeli U 5			++						++	HIV 1pos	0,3	22,7
Paneeli U 6			++						++	HIV 1pos	0,3	21,2

BBI Serokonversio-paneeli U

