



NORGE

(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **304151**

(13) B1

(51) Int Cl⁶ C 07 K 14/16, 1/06, 17/02, 17/08,
G 01 N 33/569, 33/68

Patentstyret

(21) Søknadsnr	19914725	(86) Int. inng. dag og	
(22) Inng. dag	29.11.1991	søknadsnummer	04.06.1990, PCT/US90/03148
(24) Løpedag	04.06.1990	(85) Videreføringsdag	29.11.1991
(41) Alm. tilgj.	29.01.1992	(30) Prioritet	02.06.1989, US, 360513
(45) Meddelt dato	02.11.1998		

(73) Patenthaver	Genetic Systems Corp, 3005 First Avenue, Seattle, WA 98121, US
(72) Oppfinner	James Blake, Seattle, WA, US
	Carol-Ann Cole, Seattle, WA, US
	Patrick Coleman, Edmonds, WA, US
	Nobuo Monji, Seattle, WA, US
	John P. Montana, Mountlake Terrace, WA, US
(74) Fullmektig	Dag Dawes, Bryn & Aarflot AS, 0104 Oslo

(54) **Benevnelse** **Oksydert peptid som er immunreaktivt med antistoffer mot et naturlig retrovirus-protein, fremgangsmåte for fremstilling av og anvendelse av en peptidbelagt fast fase**

(56) **Anførte publikasjoner** NO A1 901899, US 4111924
US 4499080, WO 87/06005
Winkler et al.: (1987) „J. gen. Virol., 68, 2239-2244
McDougal et al. (1986), J. Immunology, 137 (9), 2937-2944
Storey et al. (1972), J. American Chem.Soc., 94(17) side 6170-6178
Gnann et al. (1987), J. Virology, 61(8), 2639-2641

(57) **Sammendrag**

Peptider som er immunreaktive med antistoffer mot naturlige proteiner og som har minst to cysteinrester som bidrar til likhet med en epitop av protein, fremstilles med cystein-tiol-gruppene beskyttet. Når beskyttelsen er fjernet fra peptidene, har de øket immunreaktivitet. Peptidene er spesielt egnet for påvisning av antistoffer eller antigener knyttet til retrovirus, innbefattende de klinisk viktige lymfotropiske retrovirus HIV-1, HIV-2, HTLV-I og HTLV-II.

Den foreliggende oppfinnelse angår peptidmaterialer som har likhet med epitoper for anvendelse ved immunanalyser, og mer spesielt forbedrede peptidmaterialer som viser forbedrede epitoper og forøket spesifikk immunreaktivitet med antistoffer dannet som svar på naturlige proteiner.

For tiden bestemmes individer med antistoffer som er reaktive med humant immunmangel-virus (HIV) ved immunanalyser med den vanlige "sandwich"-ELISA-form. Disse analyser består av et immobilisert viruslysats som bringes i kontakt med blod eller serum som man formoder inneholder HIV-antistoffer. Skjønt de eksisterende kommersielle tester viser seg å ha minsket overføringen av HIV via blodprodukter i betydelig grad, har viruslysatsbaserte tester flere betydelige ulemper. Disse ulemper innbefatter, men er ikke begrenset til, behovet for å dyrke og håndtere store mengder levende infeksiose virus; muligheten for at levende virus kan innlemmes i forsøksmaterialer; den variable beskaffenhet av det resulterende lysat og det vesentlige antall falske positive og falske negative resultater som nødvendiggjør ytterligere kombinasjonsutprøving, så som ved Western blot.

I US-patent 4 629 783 tilhørende Cosand, medtatt i det foreliggende som referanse, er det beskrevet flere syntetiske peptider som har likhet med immunologisk reaktive virusprotein-epitoper. Blant disse ble et peptid omfattende en sekvens av 26 aminosyrer av gp41, betegnet peptid 39, funnet å være reaktivt med alle kjente utprøvde HIV-1-positive sera, og var ikke reaktivt med noen utprøvd negativ prøve. Deretter er flere grupper blitt klar over betydningen av peptid 39-området, definert av Cosand å inneholde en dominerende antigen determinant. Se J.J.G. Wang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 83:6159 (1986), R.L. Shoeman et al., Analyt. Biochem. 161:370 (1987), J.W. Gnann et al., J. Virol. 61:2639 (1987) og J.W. Gnann et al., J. Infect. Dis. 156:261 (1987).

Syntetiske peptider gir betydelige fordeler fremfor viruslysater. Fordelene innbefatter, men er ikke begrenset til, spesifisitet, renhet, letthet ved fremstilling o.s.v. Potensielle ulemper innbefatter behovet for anvendelse av mer enn ett peptid

for påvisning av alle virusstammer, og peptider som i seg selv har liten størrelse, og tap av immunologisk reaktivitet ved immobilisering på en fast fase.

Små peptider som anvendes som immobiliserte antigener i immunologiske analyser, syntetiseres vanligvis ved fastfasemetoder hvor hver aminosyre som utgjør peptidet, tilsettes sekvensielt i beskyttet form, mens den voksende peptidkjede immobiliseres på en uløselig harpiksbærer. Under synteseprosessen blir sidekjeder av visse aminosyrer som omfatter den voksende kjede, beskyttet, blokkert ved forskjellige kjemiske grupper som forblir festet inntil det fullstendige peptid fjernes fra den uløselige harpiksbærer, vanligvis ved omsetting med konsentrert flussyre eller trifluorediksyre. Under spaltingen fjernes hovedandelen av de beskyttende grupper, og det fullstendige peptid renses ved hvilken som helst av forskjellige metoder som er velkjente på området.

Ubearbeidet eller rensert peptid blir så immobilisert på en fast fase ved forskjellige metoder innbefattende direkte konjugering, konjugering til et løselig, ikke-immunologisk reaktivt protein eller annet inert molekyl, eller ved direkte adsorpsjon på en fast fase. US-patent 4 629 783 beskriver eksempler på flere av disse metoder.

Peptider som har likhet med epitoper fra gp36-proteinet i HIV-2, et glykoprotein som antas å være sammenliknbart når det gjelder retrovirus-funksjon med gp41 i HIV-1, er beskrevet i US-patentsøknader USSN 030 403 og USSN 035 408, inngitt henholdsvis 25. mars 1987 og 7. april 1987, medtatt i det foreliggende som referanse. Blant disse ble et peptid betegnet 41-2-1, som besto av 26 aminosyrer kodet for i et område likt området for peptid 39 i HIV-1, funnet å være reaktivt med alle kjente utprøvde HIV-2-positive sera, og var ikke reaktivt over hensiktsmessige utestengningsnivåer med negative prøver som ble undersøkt. En forkortet versjon av peptid 41-2-1, betegnet 41-2-3, omfattende aminosyre-rester fra karboksylenden av peptid 41-2-1, ble også funnet å være reaktivt med HIV-2-seraene og funksjonerte i noen tilfeller bedre enn peptid 41-2-1.

Peptider 39, 41-2-1 og 41-2-3 inneholder hvert i sin aminosyresekvens to cysteinrester. Tilstedeværelsen av cysteinrester i

en peptidsekvens gir mulighet for dannelsen av inter- og intramolekylære disulfidbindinger under rensning, immobilisering og ved langtidslagring av et peptid hvor beskyttelsen er fjernet. Slike peptidmaterialer immobiliseres derfor vanligvis på en fast fase som en blanding av forskjellige oksydative former, innbefattende monomer, dimer og polymerer av forskjellige størrelser. Det tas vanligvis ikke forholdsregler for regulering av den oksydative form av peptider immobilisert på en fast fase. J.I. Rosen et al. (WO87/06005) ble klar over at visse peptider som stammet fra det sterkt antigene område i HIV-1, identifisert av Cosand, som ovenfor, som inneholdt mer enn én cystein-rest, ble immobilisert som en blanding av forskjellige oksydative former, og antydte at den oksydative form av et peptid, spesielt polymerer, kan ha betydning for reaktiviteten av visse peptider. Rosen et al. beskriver at i noen tilfeller er den sykliske form av visse peptider mindre effektiv ved binding til faste overflater enn polymere former. Variasjonen av oksydative former av peptidene kan være en kilde til variabilitet ved følsomme immunanalyser, og dette kan også påvirke resultatene basert på disse analyser.

Følgelig finnes det et betydelig behov på området for peptidmaterialer med forbedret reaktivitet og som tilveiebringer så få falske negative og få falske positive resultater som mulig. Den foreliggende oppfinnelse innfrir disse og andre behov.

Forbedrede peptidmaterialer egnet ved påvisning av HIV-virus eller antistoff mot HIV-virus er tilveiebrakt. Det er også tilveiebrakt fremgangsmåter for fremstilling av forbedrede peptidmaterialer, som gir mulighet for regulering av den oksydative form av peptider, som omfatter denne blanding før og etter immobilisering på en fast fase som antigen ved immunanalysemetoder. Regulering av den oksydative form tilveiebringer peptidmaterialer med forbedret immunologisk reaktivitet, målt ved spesifisitet og følsomhet. Peptider syntetiseres under anvendelse av standard-fastfasepeptidsyntesemetoder, med unntak av at en kjemisk reversibel beskyttelsesanordning som er bestandig overfor de sterkt sure spaltningsbetingelser, anvendes i stedet for vanlig anvendt S-benzylblokkering av cystein-tiolgrupper. Kjemisk reversibel beskyttelse kan innbefatte for eksempel etylkarbamoyl,

acetamidometyl, 3-nitro-2-pyridinsulfinyl, difenyl-4-pyridyl-metyl og liknende.

Det finnes en alternativ utførelsesform når reversibel beskyttelse av cystein-tiolgrupper er tilveiebrakt etter sammenstilling av aminosyresekvensen. Reduksjon av peptidmaterialet før beskyttelse av peptidet er nødvendig for å sikre at det ikke er tilbake noen disulfidbindinger før beskyttelse. Betingelser for oksydasjon er valgt slik at dannelsen av intramolekylær disulfidbinding begunstiges, d.v.s. meget fortynnede og nøytrale til svakt alkaliske betingelser.

Oppfinnelsen består av oksydert peptid som er immunreaktivt med antistoffer mot et naturlig retrovirus-protein og er karakterisert ved at peptidet er immobilisert på en fast fase immunotest og omfatter en aminosyresekvens på 7-50 aminosyrer og har minst syv etter hverandre følgende aminosyrer fra følgende sekvens:

HIV-1 gp41

Arg-Ile-Leu-Ala-Val-Glu-Arg-Tyr-Leu-Lys-
Asp-Gln-Gln-Leu-Leu-Gly-Ile-Trp-Gly-Cys-
Ser-Gly-Lys-Leu-Ile-Cys,

HIV-2 gp36

Arg-Val-Thr-Ala-Ile-Glu-Lys-Tyr-Leu-Gln-Asp-
Gln-Ala-Arg-Leu-Asn-Ser-Trp-Gly-Cys-
Ala-Phe-Arg-Gln-Val-Cys,

HTLV-I gp21

Gln-Asn-Arg-Arg-Gly-Leu-Asp-Leu-Leu-Phe-Trp-
Glu-Gln-Gly-Gly-Leu-Cys-Lys-Ala-Leu-Gln-Glu-
Gln-Cys eller

HTLV-II gp21

Gln-Asn-Arg-Arg-Gly-Leu-Asp-Leu-Leu-Phe-Trp-
Glu-Gln-Gly-Gly-Leu-Cys-Lys-Ala-Ile-Gln-Glu-
Gln-Cys,

hvor sekvensen til peptidet omfatter minst to Cys-rester skilt ved minst 2, men færre enn 20, ikke-Cys-aminosyrer, og tiol-gruppene på Cys-restene i peptidet var beskyttet mot oksydasjon under syntesen med kjemisk reversible midler som er bestandige overfor sterkt sur spaltning, og ble deretter avbeskyttet under eller etter immobiliseringen til immunotestens faste fase og utsatt for oksyderende betingelser som førte til dannelsen av intramolekylære disulfidbindinger.

Ifølge foretrukne utførelsesformer av oppfinnelsen er Cys-restene beskyttet mot oksydasjon ved hjelp av etylkarbamoyl, acetamidometyl, 3-nitro-2-pyridinsulfinyl eller difenyl-4-peptidylmetyl og videre kan peptidet omfatte en Cys-rest i sin N-terminale ende som ikke er beskyttet mot oksydasjon. Spesielt foretrukket utførelsesform er hvor de N-terminale aminosyrer omfatter Cys-Gly-Gly.

Mange forskjellige immunanalyseprotokoller kan anvende peptidmaterialer, hvilke peptider kan være i løsning eller immobilisert på en fast fase. Forskjellige faste faser kan anvendes, innbefattende latekser (mikropartikkel-materialer) av silika, cellulose, fluorkarbonpolymerer, polyakrylamid og polystyren. Faste faser som omfatter for eksempel silika, cellulose, fluorkarbon-polymerer, nylon, polyakrylamid og polystyren, kan også anvendes. Immobilisering til den faste fase kan være enten ved adsorpsjon eller ved kovalent binding.

En immunanalyse-protokoll beskrevet i den foreliggende oppfinnelse for bestemmelse av tilstedeværelse av antistoffer mot HIV-virus, eller antigener av HIV-virus i et kroppsfluid omfatter vanligvis følgende trinn: (a) under betingelser som gjør mulig immobilisering, bringes en fast fase i kontakt med et materiale av minst ett peptid som omfatter aminosyresekvensen:

(I)

Y-Arg-Ile-Leu-Ala-Val-Glu-Arg-Tyr-Leu-Lys-
Asp-Gln-Gln-Leu-Leu-Gly-Ile-Trp-Gly-Cys*-
Ser-Gly-Lys-Leu-Ile-Cys*-X;

(II)

Y-Arg-Val-Thr-Ala-Ile-Glu-Lys-Tyr-Leu-Gln-Asp-
Gln-Ala-Arg-Leu-Asn-Ser-Trp-Gly-Cys*-
Ala-Phe-Arg-Gln-Val-Cys*-X; eller

(III)

Y-Gln-Asp-Gln-Ala-Arg-Leu-Asn-Ser-Trp-Gly-
Cys*-Ala-Phe-Arg-Gln-Val-Cys*-X

hvor X er OH eller NH_2 , Y omfatter ytterligere aminosyrer tilsatt for forbedring av peptidenes reaktivitet, og Cys* er en cystein-rest som består av en tiolgruppe beskyttet ved kjemisk reversible

hjelpemidler; (b) det kjemisk reversible beskyttelseshjelpemiddel fjernes fra cystein-tiolgruppene i det immobiliserte peptid; (c) det immobiliserte peptid inkuberes under betingelser som bidrar til disulfindbinding-dannelse; (d) under betingelser som gir mulig immunspesifikk binding, bringes et kroppsfluid i kontakt med det immobiliserte peptid under dannelse av en reaksjonsblanding; (e) det påvises hvorvidt immunspesifikk binding har funnet sted mellom det immobiliserte peptid og en antistoffkomponent av det kroppsfluid hvor påvisningen av immunspesifikk binding viser tilstedeværelsen av antistoffer mot HIV-virusene i kroppsfluidet.

Immunspesifikk binding kan påvises ved fjerning av ubundne komponenter fra reaksjonsprodukter dannet i immunreaksjonsblandingen, tilsetning av et merket antistoff til immunreaksjonsblandingen, idet det merkede antistoff er i stand til immunspesifikk binding til en komponent av reaksjonsproduktet og merkingen tilveiebringer et påvisbart signal. Ubundne komponenter kan fjernes fra reaksjonsblandingen ved filtrering.

Andre aspekter ved oppfinnelsen vil bli klare ved henvisning til følgende detaljerte beskrivelse og de tilknyttede krav.

IV. BESKRIVELSE AV DE SPESIFIKKE UTFØRELSESFORMER

Den foreliggende oppfinnelse angår oksydert peptidmaterialer for anvendelse ved immunanalysemetoder for kvantifisering og/eller påvisning av antistoffer mot eller antigener av naturlig retrovirusprotein. Peptidene anvendes ved påvisning av retrovirusantigener eller antistoffer mot disse, og mer spesielt antigenene eller antistoffene som er knyttet til retrovirus så som HIV-1 og HIV-2 og den beslektede familie lentivirus. Andre mønsterpeptider i henhold til den foreliggende oppfinnelse har likhet med epitope områder av HTLV-I og HTLV-II.

Peptider kan identifiseres som er i stand til å bindes til antistoffer frembrakt ved et protein som innføres i en fremmed vert. I flere tilfeller omfatter Cys-rester en del av peptid-epitopen(e) som oppfatter og binder antistoffene. Beskyttelse av Cys-restene under syntesen av peptidene hindrer utviklingen av oksydative former av peptidene og tilveiebringer forbedret peptid-immunologisk reaktivitet, målt f.eks. ved øket følsomhet og/eller spesifisitet.

Peptidmaterialer ifølge den foreliggende oppfinnelse har cysteinrester i sekvensen som er kjemisk modifisert slik at de beskyttes reversibelt mot reaksjon, f.eks. oksydasjon. Et peptid som er egnet ved den foreliggende oppfinnelse, vil således vanligvis ha minst to Cys-rester som bidrar til konformasjonen av peptidet som kan binde antistoffer frembrakt ved det naturlige protein. Vanligvis vil minst to av Cys-restene være i stand til å danne intramolekylære disulfidbindinger. For dannelse av de intramolekylære bindinger skilles Cys-restene ved minst én aminosyrerest, typisk minst to, og mer vanlig fra ca. tre opp til ca. 15 rester eller flere. Ved visse foretrukkede utførelser skilles Cys-restene med ca. 5-8 rester. Ved dannelse av intrakjede-disulfidbindinger presenterer de vicinale Cys-rester en sløyfe eller et syklisk peptidområde som kan være viktig ved forbedret immunreaktivitet.

Peptider ifølge den foreliggende oppfinnelse kan fremstilles på mange forskjellige måter. Peptidene er vanligvis i området fra 6 opp til ca. 50 aminosyrerester, mer typisk fra ca. 6 opp til ca. 35 aminosyrer. På grunn av sin forholdsvis korte lengde kan de syntetiseres i løsning eller på en fast bærer i henhold til vanlige teknikker. Se for eksempel Stewart og Young, Solid Phase Peptide Synthesis, 2. utg., Pierce Chemical Company, 1984, og Tam et al., 1983, J. Am. Chem. Soc. 105:6442, som er medtatt i det foreliggende som referanse.

Alternativt kan hybrid-DNA-teknologi anvendes for ekspresjon av det ønskede peptid i transformerte eukaryote eller prokaryote vertsceller. Se for eksempel Maniatis et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, N.Y. 1982, medtatt i det foreliggende som referanse. Det må selvfølgelig være klart at det med peptid menes en sekvens på minst ca. 6 aminosyrer, typisk 10 eller flere, opp til 200 aminosyrer eller mer, innbefattende komplette proteiner. Det uttrykte peptid kan så isoleres og beskyttes som beskrevet i det foreliggende.

Reversibel kjemisk beskyttelse av cysteintiol-sidekjeden hos de foreliggende peptider kan utføres under sammensettingen av peptidsekvensen ved kjemisk syntese av peptidmaterialet. Når et aktuelt peptidmateriale settes sammen ved standard-fastfase-teknikker, velges et kjemisk reversibelt beskyttelseshjelpemiddel

for resistens overfor de betingelser som anvendes under aminosyre-addisjons-syklusene, og overfor de høye konsentrasjoner av syre som anvendes for spalting av peptidet fra den faste harpiksfase. Blant de atskillige tilgjengelige tiolbeskyttende grupper vil valget av en spesiell syntese sannsynligvis avhenge av strukturen av peptidet som syntetiseres, og av beskaffenheten av andre beskyttende eller blokkerende grupper som syntetiseres, så vel som det spesielle reagens som velges for spalting av peptidet fra harpiksen. Beskyttelseshjelpemidler som er egnet for anvendelse ved den foreliggende oppfinnelse, innbefatter for eksempel, men er ikke begrenset til, acetamidometyl (Stewart og Young, som ovenfor), 3-nitro-2-pyridinsulfinyl (Matsueda et al., 1986, Int. J. Peptide Res. 28:167, R.J. Ridge et al. 1986, Int. J. Peptide Res. 19:490) og difenyl-4-pyridylmetyl (S. Coyle et al., 1976, J. Chem. Soc. Chem. Comm. s. 980). En spesielt foretrukket beskyttelse er S-(N-etylkarbamoyl). Se St. Gutmann (Helv. Chim. Acta. (1966) 49:83) og H.T. Storey et al. (J. Amer. Chem. Soc. (1972) 94:6170). Hver av de forannevnte artikler er medtatt i det foreliggende som referanse.

Cystein-tiolgruppene kan alternativt beskyttes reversibelt etter sammensetting av aminosyresekvensen. Ved denne utførelsesform reduseres peptidet, som kan være renset eller på annen måte anrikt i sykliske eller polymere former, før beskyttelse av peptidet for å sikre at få, hvis noen, disulfidbindinger blir tilbake.

Peptidene som er tiol-beskyttet, avdekkes for anvendelse ved immunanalyse. Peptidet kan anvendes bundet til en bærer, eller adsorbert til en fast fase. Fjerning av beskyttelse og oksydasjon kan utføres under, eller etter, immobilisering. Hjelpemidler for fjerning av beskyttelse vil i stor utstrekning svare til den spesielle anvendte beskyttende gruppe og er velkjent av fagfolk på områdene. Betingelser for oksydasjon velges slik at dannelsen av intramolekylær disulfidbinding begunstiges, d.v.s. meget fortynnet og nøytrale til svakt alkaliske betingelser.

For påvisning og/eller kvantifisering av antistoffer mot HIV, spesielt HIV-1, innbefatter et mønsterpeptid som kan etterlikne HIV-1-glykoproteinet, gp41, følgende peptidsekvens, hvor oligopeptider av minst 7 aminosyrer og under 50 vil være innbefattet i

sekvensen:

(I)

Y-Arg-Ile-Leu-Ala-Val-Glu-Arg-Tyr-Leu-Lys-
Asp-Gln-Gln-Leu-Leu-Gly-Ile-Trp-Gly-Cys*-
Ser-Gly-Lys-Leu-Ile-Cys*-X;

hvor X er OH eller NH_2 , Y omfatter eventuelle tilstedeværende aminosyrer tilsatt for forbedring av peptidenes reaktivitet, og Cys* er en cysteinrest som består av en tiolgruppe beskyttet ved kjemisk reversible hjelpemidler.

For påvisning og/eller kvantifisering av antistoffer mot HIV-2, innbefatter mønsterpeptider som kan etterlikne HIV-2-glykoproteinet, gp36, følgende peptidsekvenser, hvor oligopeptider med minst 7 aminosyrer og under 50 vil være innbefattet i sekvensen:

(II)

Y-Arg-Val-Thr-Ala-Ile-Glu-Lys-Tyr-Leu-Gln-Asp-
Gln-Ala-Arg-Leu-Asn-Ser-Trp-Gly-Cys*-
Ala-Phe-Arg-Gln-Val-Cys*-X; eller

(III)

Y-Gln-Asp-Gln-Ala-Arg-Leu-Asn-Ser-Trp-Gly-
Cys*-Ala-Phe-Arg-Gln-Val-Cys*-X

hvor X er OH eller NH_2 , Y omfatter eventuelt tilstedeværende aminosyrer tilsatt for forbedring av peptidenes reaktivitet, og Cys* er en cysteinrest som består av en tiolgruppe beskyttet ved kjemisk reversible hjelpemidler.

For påvisning og/eller kvantifisering av antistoffer mot HTLV-I og HTLV-II, innbefatter mønsterpeptider som kan etterlikne HTLV-1- og -II-transmembran-glykoproteinene, begge betegnet gp21, følgende peptidsekvenser, hvor oligopeptider av minst 7 aminosyrer og mindre enn 50 vil være innbefattet i sekvensene:

IV (HTLV-1)

Y-Gln-Asn-Arg-Arg-Gly-Leu-Asp-Leu-Leu-Phe-Trp-
Glu-Gln-Gly-Gly-Leu-Cys*-Lys-Ala-Leu-Gln-Glu-
Gln-Cys*-X; og

V (HTLV-II)

Y-Gln-Asn-Arg-Arg-Gly-Leu-Asp-Leu-Leu-Phe-Trp-
Glu-Gln-Gly-Gly-Leu-Cys*-Lys-Ala-Ile-Gln-Glu-
Gln-Cys*-X;

hvor X er OH eller NH_2 , Y omfatter eventuelt tilstedeværende aminosyrer tilsatt for forbedring av peptidenes reaktivitet, og Cys* er en cysteinrest som består av en tiolgruppe beskyttet ved kjemisk reversible hjelpemidler.

Det må være klart at peptidmaterialene ifølge den foreliggende oppfinnelse ikke behøver være identiske med noen spesiell protein- eller retrovirus-sekvens, så som en HIV-polypeptid-sekvens, så lenge de foreliggende materialer kan etterlikne en epitop og således tilveiebringe immunologisk konkurranse i en viss utstrekning med det naturlige protein, f.eks. gp41-glykoprotein av minst én stamme av HIV-1 eller det naturlige gp36-glykoprotein av minst én stamme av HIV-2.

De aktuelle peptider kan for eksempel modifiseres ved innføring av konserverende eller ikke-konserverende erstatninger i peptidene, idet vanligvis færre enn 20 prosent-enheter, mer vanlig færre enn 10 prosent-enheter, av aminosyrene utbyttes. Det kan være ønskelig å variere én eller flere spesielle aminosyrer for mer effektivt å etterlikne de avvikende epitoper i det naturlige protein, så som for eksempel de forskjellige retrovirus-stammer.

De foreliggende polypeptider kan derfor underkastes forskjellige forandringer så som innføringer, utelukkelse og erstatninger, enten konserverende eller ikke-konserverende, hvor slike forandringer kan tilveiebringe visse fordeler ved anvendelse av dem. Med konserverende erstatninger er det ment kombinasjoner så som gly, ala; val, ile, leu; asp, glu; asn, gln; ser, thr; lys, arg; og phe, tyr. Sekvensen vil vanligvis ikke avvike med mer enn 20% fra sekvensen av minst én stamme av HIV, bortsett fra hvor ytterligere aminosyrer kan adderes til begge ender under tilveiebringelse av en "arm" ved hvilken de foreliggende peptider for eksempel lett kan immobiliseres.

Dessuten kan peptidsekvensen være forskjellig fra den naturlige sekvens ved modifiseringen av den terminale NH_2 -gruppe ved acylering, f.eks. acetylering, eller tioglykolsyre-amidering, terminal-karboksyamidering, f.eks. ammoniakk, metylamin o.s.v. I noen tilfeller kan disse modifiseringer tilveiebringe seter for binding til en bærer eller annet molekyl.

Som nevnt ovenfor, kan aminosyrearmer tilveiebringes ved den C- og N-terminale ende av peptidet eller oligopeptidet. Hvis tilstede, vil armene vanligvis være minst én aminosyre og kan være 50 eller flere aminosyrer, oftere 1-10 aminosyrer, og fortrinnsvis under 5 aminosyrer for å lette syntesen. Armene kan tjene forskjellige formål så som avstandsmaterialer, for å feste peptider til en bærer, for immobiliseringer av peptider til en fast fase, o.s.v. For tilveiebringelse av egnede funksjonaliteter for kopling til en bærer, fast fase, eller for dannelsen av høyere-ordens strukturer så som dimerer, trimerer, eller andre multimerer, kan aminosyrer så som tyrosin, cystein, asparaginsyre eller liknende innføres eller tilveiebringes i den C- og/eller N-terminale ende av armen eller peptidet. For forbedring av epitop-presentasjonen, er tilstedeværelsen av fra 1 til 10 aminosyrer i den C- og/eller N-terminale ende av spesiell interesse, mer foretrukket 1-5 aminosyrer, og mest foretrukket ca. 1-3. Spesielt foretrukkede utførelsesformer av visse peptider beskrevet i det foreliggende fås når 3 aminosyrer tilføyes som en arm, vanligvis i den N-terminale ende, idet den N-terminale rest av armen fortrinnsvis er Cys. Ved mønster-utførelser er mellom-materialrestene mellom peptidet og den terminale funksjonelle gruppe Gly. Et spesielt foretrukket peptid har således en arm som omfatter Cys-Gly-Gly, hvor Cys er den N- eller C-terminale rest. En terminal Cys-rest kan også være koplet via en disulfidbinding til en ditio- eller tio-funksjonalisert bærer eller en tioeterbinding til en aktivert olefinbærer.

Peptidsekvenser av spesiell interesse for påvisning av antistoffer mot HIV-1 fås fra sekvensen av Peptid 39 som definert av Cosand, som ovenfor. Peptid 39GC består av de 26 aminosyrer av Peptid 39 ovenfor, hvor Y består av sekvensen Cys-Gly-Gly og X består av $-\text{NH}_2$. peptidet består derfor av aminosyresekvensen:

Peptid 39GC

Cys-Gly-Gly-Arg-Ile-Leu-Ala-Val-Glu-Arg-Tyr-Leu-Lys-
 Asp-Gln-Gln-Leu-Leu-Gly-Ile-Trp-Gly-Cys*-
 Ser-Gly-Lys-Leu-Ile-Cys*-NH₂

hvor Cys* er cysteinrester beskyttet ved kjemisk reversibelt hjelpemiddel.

På liknende måte fås peptidsekvenser av spesiell interesse for påvisning av antistoffer mot HIV-2, fra sekvensen av peptid 41-2-1, hvor Y består av sekvensen Cys-Gly-Gly- og X består av -NH₂. Peptidet er derfor representert ved aminosyresekvensen:

Peptid 41-2-1GC

Cys-Gly-Gly-Arg-Val-Thr-Ala-Ile-Glu-Lys-Tyr-Leu-Gln-Asp-
 Gln-Ala-Arg-Leu-Asn-Ser-Trp-Gly-Cys*-
 Ala-Phe-Arg-Gln-Val-Cys*-NH₂

hvor Cys* er cysteinrester beskyttet ved kjemisk reversible hjelpemidler.

Peptid 41-2-3GC består av sekvensen av 41-2-3 ovenfor, hvor Y er sekvensen Cys-Gly-Gly og X er NH₂ og er representert ved aminosyresekvensen:

Peptid 41-2-3GC

Cys-Gly-Gly-Gln-Asp-Gln-Ala-Arg-Leu-Asn-Ser-Trp-Gly-
 Cys*-Ala-Phe-Arg-Gln-Val-Cys*-NH₂

hvor Cys* er cysteinrester beskyttet ved kjemisk reversible hjelpemidler.

Peptidsekvenser av spesiell interesse for påvisning av antistoffer mot HTLV-I fås fra gp21-sekvensen av Peptid IV. Ved en foretrukket utførelsesform, peptid 121-1GC1, består Y av sekvensen Cys-Gly-Gly- og X består av -NH₂. Peptidet er derfor representert ved aminosyresekvensen:

121-1GC1

Cys-Gly-Gly-Gln-Asn-Arg-Arg-Gly-Leu-Asp-Leu-Leu-Phe-
 Trp-Glu-Gln-Gly-Gly-Leu-Cys*-Lys-Ala-Leu-Gln-Glu-
 Gln-Cys*-NH₂,

hvor Cys* er cysteinrester beskyttet ved kjemisk reversible hjelpemidler.

Peptidsekvenser av spesiell interesse for påvisning av antistoffer mot HTLV-II fås fra gp21-sekvensen av Peptid V. Ved en foretrukket utførelsesform, peptid 221-1GC1, består Y av sekvensen Cys-Gly-Gly- og X består av $-NH_2$. Peptidet er derfor representert ved aminosyresekvensen:

221-1GC1

Cys-Gly-Gly-Gln-Asn-Arg-Arg-Gly-Leu-Asp-Leu-Leu-Phe-
Trp-Glu-Gln-Gly-Gly-Leu-Cys*-Lys-Ala-Ile-Gln-Glu-
Gln-Cys*- NH_2 ;

hvor Cys* er cysteinrester beskyttet ved kjemisk reversible hjelpemidler. Det må være klart at på grunn av vesentlig sekvenshomologi mellom HTLV-I- og -II-peptidene beskrevet i det foreliggende, må det ventes en viss kryssreaktivitet mellom peptidene.

Formen for immunanalyse som de oksyderte peptider fremstilt i form av en peptidbelagt fast fase ifølge den foreliggende oppfinnelse anvendes i, er avhengig av hvorvidt antistoff eller antigen skal bestemmes. Immunanalyseformer utformet for påvisning av antistoff eller antigen er velkjente på området. Før, eller på tidspunktet for, omsetting av prøven med peptidet, fjernes imidlertid den kjemiske beskyttelse av peptidet, og proteinet som har fått fjernet beskyttelsesgruppene, inkuberes under betingelser som bidrar til dannelsen av disulfidbindinger. I analyseformer hvor peptidet immobiliseres til en fast fase, kan peptid-cysteinrestene befris for beskyttelsesgrupper i løsning under betingelser som bidrar til dannelsen av intramolekulære disulfidbindinger under eller etter immobilisering.

Peptidmaterialene kan anvendes umerket eller merket, avhengig av anvendelsen av dem. (Med merke menes et molekyl som direkte eller indirekte tilveiebringer et påvisbart signal). Forskjellige merkematerialer kan anvendes, så som radionuklider, enzymer, fluorescerende midler, kjemiluminescerende midler, enzym-substrater, kofaktorer eller inhibitorer, partikler, f.eks.

magnetiske partikler, kombinasjoner av ligander og reseptorer, f.eks. avidin og biotin, eller liknende. Dessuten kan polypeptidene modifiseres på forskjellige måter for binding til en overflate, f.eks. mikrotiterplater, glass- eller lateksperler, rør, filtere, kromatografiske overflater, f.eks. papir, cellulose, silikagel eller liknende. Den spesielle måte på hvilken peptider kan knyttes til en annen forbindelse eller en fastfaseoverflate, er vanlig og finner vid illustrasjon i litteraturen. Se for eksempel US-patenter nr. 4 371 515 og 4 487 715, og patenter angitt i disse. Reagenser så som p-maleimidobenzosyre, p-metylditiobenzosyre, maleinsyreanhydrid, ravsyreanhydrid, glutaraldehyd, heterobifunksjonelle tverrbindingsmidler og liknende anvendes vanligvis for slike formål.

Forskjellige analyseprotokoller kan anvendes for påvisning av tilstedeværelse av enten antistoffer mot retrovirusprotein eller selve retrovirus-proteinene. Peptidet kan anvendes som det merkede reagens, hvor merkematerialet gir mulighet for et påvisbart signal. Alternativt kan peptidet immobiliseres enten direkte eller indirekte på en overflate, hvor antistoff mot peptidet i prøven vil bli bundet til peptidet på overflaten. Tilstedeværelse av humant antistoff bundet til peptidet kan så påvises ved anvendelse av et xenogent antistoff spesifikt for humant immunglobulin, normalt både humant IgG og IgM, eller et merket protein spesifikt for immunkomplekser, f.eks. Rf-faktor eller S. aureus protein A.

Forskjellige heterogene protokoller kan anvendes, enten konkurrerende eller ikke-konkurrerende. Peptid kan bindes til en overflate eller bærer og merket antistoff få konkurrere med antistoff i prøven når det gjelder den begrensede mengde bundet peptid. Merkingsmengden bundet til bæreren vil ha forbindelse med mengden konkurrerende antistoff i prøven.

Antistoff kan bindes til bæreren og prøven blandes med merket peptid. Etter at reaksjonsblandingen er brakt i kontakt med det bundne antistoff, vil merkingsmengden bundet til bæreren være i samsvar med mengden beslektet antistoff i prøven.

Xenogent antihumant antistoff, f.eks. antistoffer mot Fc på IgG og IgM (immunglobuliner) kan bindes til en bærer. Prøven vil bli brakt i kontakt med immunglobulinene og merket peptid, hvorved

mengden av merket peptid bundet til bæreren vil vise tilstedeværelsen av de beslektede antistoffer.

Anvendelsen av immunkonsentrering, f.eks. filtrering, er illustrerende for analyseteknikken. Ved denne adsorberes det aktuelle peptidmateriale eller konjugater derav til en fast fase, f.eks. lateksperler, enten kovalent eller ikke-kovalent. Prøven, en biologisk fluidprøve, f.eks. spytt, urin, cerebral-spinalvæske, blod, plasma eller serum kan for-behandles ved fortynning i et analysemedium, som vanligvis vil være et vandig bufret medium hvor det anvendes én av mange forskjellige buffere, så som fosfat, Tris eller liknende. Prøven blandes så med de antigenbelagte lateksperler i en beholder, med en filtermembran, og det får gå en tilstrekkelig tid for kompleksdannelse mellom peptidet (peptidene) og eventuelt beslektede antistoffer i prøven. Supernatanten får passere gjennom filteret, og filteret på hvilket de belagte perler immobiliseres, vaskes for fjerning av ikke-spesifikt bundne proteiner.

Et merket spesifikt bindingsprotein som bindes spesifikt til komplekset, anvendes for påvisning. Til den immunreaktive membran kan det tilsettes xenogene antisera mot humant immunglobulin, spesielt anti-(humant IgG og IgM) i et passende bufret medium. De xenogene antisera vil normalt merkes med et påvisbart merkemateriale, f.eks. enzym eller radionuklide. I stedet for antisera kan det anvendes proteiner spesifikke for immunkomplekset, f.eks. S. aureus protein A. Merkingen kan så påvises. For eksempel tilsettes det med et enzym, etter fjerning av ikke-spesifikt bundet enzym-merking, en fremkallerløsning. Fremkallerløsningen vil inneholde et enzymsubstrat og eventuelt enzym-kofaktorer, kromogener o.s.v. som ved reaksjon gir et farget eller fluorescerende produkt som kan påvises henholdsvis kolorimetrisk eller fluorimetrisk.

Følgende eksempler er gitt som illustrasjon.

EKSEMPEL I

Tiol-avdekkede peptider

påviser antistoffer mot HIV-1 og HIV-2Syntese av peptider

Derivater av peptid 39 ble sammensatt ved sekvensiell kopling av t-butyloksykarbonyl-beskyttede aminosyrer på 0,40 mmol p-metylbenzhydrylamin-harpiks (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA). Aminosyre-sidekjede beskyttelse skjedde med benzybaserte standard-grupper. Tryptofan ble beskyttet med formyl-delen. Når kjemisk reversibel beskyttelse av en cysteinrest var ønsket, ble beskyttelse tilveiebrakt ved anvendelse av etylkarbamoyl-beskyttelse, og kopling ble oppnådd ved anvendelse av standard-hydroksybenzotriazolester-kjemi som anvendt for glutamin eller asparagin.

N-t-butyloksykarbonyl-S-etyl-karbamoylcystein ble fremstilt som beskrevet av St. Gutmann, og Storey et al., som ovenfor. Kort angitt ble 15,3 ml trifluoreddiksyre tilsatt dråpevis til en blanding av 24,2 g L-cystein (fri base) og 200 ml dimetylformamid (DMF) ved 0°C med konstant omrøring. Etylisocyanat (17,8 ml) ble så tilsatt dråpevis, og blandingen ble omrørt ved romtemperatur i 18 timer. Den resulterende blanding ble inndampet under vakuum og residuet oppløst i 180 ml vann. To porsjoner eter (100 ml) avkjølt til 0°C ble anvendt for vasking av den vandige løsning, og pH ble justert til 7,0 ved tilsetning av natriumhydroksyd. Absolutt etanol (550 ml) ble tilsatt, og produktet fikk utkrystalliseres over natten ved 4°C. Vasking av det krystallinske faststoff med kaldt 20% etanol/vann og eter etter filtrering ga 18,9 g S-etyl-karbamoylcystein.

For fremstilling av N-t-butyloksykarbonyl-derivatet, ble 23 g fast di-t-butyldikarbonat langsomt tilsatt til en kraftig omrørt blanding av 18,9 g S-etylkarbamoylcystein, 180 ml dimetylsulfoksyd og 16,4 ml diisopropyletylamin. Blandingen ble omrørt i 2 timer ved romtemperatur før 400 ml isvann pluss 100 ml mettet natriumklorid ble tilsatt. Saltsyre ble tilsatt for justering av pH i blandingen til 2,0, og den vandige blanding ble vasket med to 200 ml porsjoner etylacetat. De organiske ekstrakter ble blandet

og inndampet under vakuum. Residuet ble omkrystallisert fra etylacetat/heksan fulgt av omkrystallisering fra 20% etanol/vann. Et 19,4 g utbytte av N-t-butylloksykarbonyl-S-etylkarbamoylcystein ble oppnådd.

Sluttproduktet ble vist å være homogent ved tynnsjikt-kromatografi på silikagel med et kloroform/eddiksyre-(15:1)-løsningsmiddel; Rf 0,25. Produktets smeltepunkt var 144-146°C, likt det som tidligere var rapportert å være 139-140°C (Storey, som ovenfor).

Beskyttelsen ble fjernet fra ferdige peptider, og peptidene ble skilt fra harpiksen ved standard-høy-HF-fremgangsmåten eller lav-høy-HF-fremgangsmåten ifølge Tam et al. (J. Amer. Chem. Soc. 105:6442, 1983). Peptid ble ekstrahert fra harpiksen i 50% eddiksyre og underkastet gelkromatografi i 20% eddiksyre på Sephadex G-25. Fraksjoner som inneholdt peptid, ble blandet og frysetørket.

Immunologisk reaktivitet

Peptid 39 og dets analoger ble undersøkt med hensyn til immunologisk reaktivitet ved en testrør-analyse hvor peptidene ble immobilisert ved adsorpsjon eller kovalent binding på lateks-perler.

Adsorpsjon av peptid 39GC og avdekket peptid 39GC på lateks-perler ble utført ved at perlene først ble vasket (5 mg, IDC, Interfacial Dynamics Corporation, Portland, Oregon, 1 µm diameter) med destillert vann, og gjenoppslemmet i 0,5 ml 0,1 M HEPES, pH 7,4, med kraftig blanding. Fortynnet peptid fra en 4 mg/ml 6 M GuHCl-forrâds-løsning ble tilsatt til de vaskede perler (25-200 µg peptid) til et endelig volum på 550 µl. Blandingen ble omrørt kraftig i 30 sekunder, fulgt av mindre kraftig blanding over natten. Etter inkubering over natten, ble 500 µl destillert vann tilsatt, og perlene ble oppsamlet ved sentrifugering. Perlene ble vasket med 1 ml destillert vann to ganger før de ble suspendert i 100 µl destillert vann, fulgt av tilsetning av 100 µl 0,5 N NaOH med umiddelbar blanding under avdekking av cysteinrestene i det adsorberte peptid. Avdekkingen ble stoppet ved tilsetning av 1 ml 0,25 N HEPES, pH 7,4.

Luftoksydasjon av peptid/perle-løsningen ble utført over natten ved romtemperatur. Kaliumferricyanid ble tilsatt til

peptid/perle-løsningen for fullføreelse av oksydasjonen. Røret ble sentrifugert, og perlene ble vasket tre ganger med 1 ml destillert vann. Peptid/perle-kompleks kan anvendes umiddelbart eller lagres som vandige suspensjoner ved 4°C i tidsrom på opp til 6 måneder uten betydelig tap av reaktivitet.

Peptid 39, hvor X er -OH, Y er -NH₂ og cystein-tiolgrupper ikke er EC-beskyttet, ble adsorbert til lateksperler ved tilsetting av 0,1 ml av en 2 mg/ml peptid-forrådsløsning av peptid 39 i 6 M guanidin-HCl til vaskede lateksperler (fremstilt som ovenfor) som var blitt gjenoppslemmet i 0,9 ml 0,2 M Tris, pH 8,0. Peptid-lateksperle-suspensjonen ble inkubert over natten ved 45°C i vannbad. Etter inkubering ble perlene oppsamlet ved sentrifugering og vasket én gang i 0,01 M PBS, pH 7,0.

Peptidbelagte perler kan blokkeres, hvis nødvendig, for å hjelpe på forhindring av ikke-spesifikk binding ved tilsetting av 20 µl av en 0,84 vekt/volum% suspensjon av belagte perler til 1 ml 1% bovint serumalbumin (BSA) og kraftig blanding. Perlene ble oppsamlet ved sentrifugering og supernatanten fjernet. Vaske-trinnene ble gjentatt to ganger etter hverandre.

Serum eller plasma som skulle undersøkes, ble fortynnet 1:80 i prøvefortynningsbuffer (2,5 vekt/volum% fettfri tørrmelk, 15 ppm Kathon CG, 0,01% antiskum A i 0,01 M natriumfosfat, pH 7,2, 0,15 M natriumklorid), og 100 µl ble tilsatt til det blokkerte peptid/lateksperle-konjugat ved blanding med virvling. Prøven ble inkubert med peptid/lateksperle-konjugatet i 15 minutter ved romtemperatur før tilsetting av 0,9 ml vaskeløsning (0,05% Tween 20 i Tris-saltløsning, 1 mM magnesiumklorid), blanding ved virvling og sentrifugering under oppsamling av peptid/perle-konjugatet. Peptid/perle-konjugatet ble vasket igjen og oppsamlet ved sentrifugering, og 100 µl av en 1/100 fortynning av antihuman-IgG,A og M-alkalisk fosfatase-konjugat i fortynningsbuffer ble tilsatt i 15 minutter ved romtemperatur. Peptid/perle-konjugatet ble vasket igjen som ovenfor.

Immunologisk reaktivitet av peptidene ble påvist indirekte ved aktivitet av alkalisk fosfatase. Enzymløsning (0,8 ml, 0,1 M Tris-HCl/0,1 M NaCl/5 mM MgCl₂, pH 9,5) ble tilsatt, fulgt av 100 µl substrat (9 mg p-nitrofenylfosfat i enzymløsning). Substratet ble inkubert i 15 minutter ved 37°C, og reaksjonen ble stoppet ved

tilsetting av 100 μ l 3 N natriumhydroksyd. Perlene ble dannet til klump ved sentrifugering, og supernatanten ble målt med hensyn til absorbans i et spektrofotometer ved 405 nm. Peptidene 39GC og 39GC avdekket viste vesentlig forbedring fremfor peptid 39 ved denne analyseform.

Alternativt ble peptidene immobilisert kovalent på lateksperler gjennom den karboksyl-terminale ende. Karboksyl-terminal konjugering ble utført med en peptid 39-analog, betegnet 39-I, som består av følgende sekvens:

Arg-Ile-Leu-Ala-Val-Glu-Arg-Tyr-Leu-Lys-
Asp-Gln-Gln-Leu-Leu-Gly-Ile-Trp-Gly-Cys*-
Ser-Gly-Lys-Leu-Ile-Cys*-Thr-Gly-SH

Cysteinrestene ble etylkarbamoyl-beskyttet, og peptidet ble syntetisert som beskrevet ovenfor. Fullstendig peptid ble spaltet fra den faste fase under anvendelse av 90% flussyre/10% anisol ved 0°C i vakuum, under omrøring. Flussyren ble inndampet, og resten ble vasket med etylacetat før oppløsning av det ubearbeidede peptid i 6 M Gu-HCl/0,4 M kaliumfosfat. Ubearbeidet peptid ble citrakonylert ved fremgangsmåten ifølge Blake et al. (Int. J. Peptide Res. 1981, 17:273, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1981, 78:4055, begge medtatt i det foreliggende som referanse) fulgt av gelfiltrering i ammoniumbikarbonatbuffer. Det resulterende peptid, 39-IX, besto av en aminoterminal ende og lysinrester som var blitt citrakonylert, formyltryptofan, etylkarbamoyl-cysteiner og C-terminal tioglycinrest.

Peptid 39-IX ble konjugert til de frie aminogrupper på pentalysiner konjugert til karboksylerte lateksperler (Seradyne, 1,1 μ m diameter, 0,01 mekv./g) via karbodiimid-aktivering. En porsjon av perlesuspensjon (0,3 ml) ble sentrifugert under oppsamling av perlene. Perlene ble vasket én gang med destillert vann, oppsamlet og suspendert i en løsning av H-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-amid i vann. pH ble justert til mellom 5,0 og 5,5 før tilsetting av 1-etyl-3-(3-dimetylaminopropyl)-karbodiimid (EDC). Etter henstand over natten, ble perlene oppsamlet og vasket med destillert vann som ovenfor.

Halvparten av de resulterende perler ble behandlet med 27 $\mu\text{g}/\text{mg}$ perler av peptid 39-IX i en vandig løsning av sølvnitrat og 0,1 M N-hydroksysuksinimid ved pH 7,4 i 2 timer ved romtemperatur. Perlene ble vasket med 0,2 M natriumcyanid og oppbevart i 15% vandig eddiksyre over natten under fjerning av citrakonylgruppene. Beskyttende etylkarbamoyl- og formyl-grupper ble fjernet ved kort behandling med 0,2 N natriumhydroksyd. Cysteinrestene fikk luftoksyderes over natten, fulgt av omsetting med kaliumferricyanid for å sikre fullstendig oksydasjon.

De gjenværende pentalysin-konjugerte lateksperler ble behandlet på en måte identisk med ovenfor, bortsett fra at det ikke ble tilsatt noe sølvnitrat. De resulterende perler tjente som blindprøve for sammenlikning.

Peptid 39-derivater ble også kovalent immobilisert gjennom den aminoterminalen ende til karboksy-modifiserte lateksperler (Polysciences) via karbodiimid-aktivering. Åtte milligram lateksperler ble anbrakt i et mikrofuge-rør, og 0,5 ml destillert vann ble tilsatt. Perlene ble oppsamlet ved sentrifugering og supernatanten fjernet. Aktivering ble utført ved tilsetning av 0,5 ml 0,2 M EDC (38,2 mg/ml) og 0,1 M N-hydroksysuksinimid (22 mg/ml), og reaksjonen fikk gå i 90 minutter ved romtemperatur med roterende blanding. Aktiverte perler ble oppsamlet som ovenfor, og all supernatant, bortsett fra ca. 50 μl , ble fjernet. Klumpen ble dispergert, og 250 μl 1 M HEPES, pH 7,5, inneholdende forskjellige konsentrasjoner av peptid 39, ble tilsatt (190-760 μg). Peptidet fikk reagere med de aktiverte perler over natten ved romtemperatur med roterende blanding. Perlene ble oppsamlet som ovenfor og vasket med 0,1 M HEPES, pH 7,5. To ytterligere vaskinger ble utført med 1% BSA i Tris-saltløsning (0,1 M, pH 7,4), og peptidet/lateksperlene ble gjenoppslemmet i 0,5 ml 1% BSA/Tris-saltløsning.

Alternativt ble N-terminal kovalent immobilisering utført via tioeterbindingsdannelse. Peptid 39-GC ble konjugert til NH_2 -modifiserte lateksperler (Pandex, Mundelein, IL). Fem milligram perler ble vasket én gang med destillert vann og gjenoppslemmet i 200 μl 0,1 M HEPES, pH 7,4. N-suksinimidyl-4-(N-maleimidometyl)-cykloheksan-1-karboksylat (SMCC, 100 μl 1 mg/100 μl i DMF) ble tilsatt til perle-suspensjonen og fikk reagere i 2 timer ved

romtemperatur med konstant omrøring. Aktiverte perler ble oppsamlet som ovenfor, vasket to ganger med destillert vann og én gang med 0,1 M HEPES, pH 7,4, som inneholdt 5 mM EDTA. En 200 μ l suspensjon av aktiverte perler i HEPES-buffer ble fremstilt, og 200 μ g peptid 39-GC i 100 μ l 6 M GuHCl ble tilsatt. Konjugeringen fikk foregå over natten ved romtemperatur i en rotator. Peptid-konjugerte perler ble oppsamlet som ovenfor, vasket tre ganger i destillert vann og suspendert til 0,84% i destillert vann. Immunologisk kryssreaktivitet ble undersøkt som beskrevet ovenfor.

Alternative fremgangsmåter for utprøving av immunologisk kryssreaktivitet ble også anvendt. Ved én slik fremgangsmåte ble peptider 39 og 39GC undersøkt ved hjelp av ELISA som tidligere beskrevet i US-patent 4 629 783. Kort angitt ble forrådsløsninger av peptidene 39 og 39-GC tillaget i 6 M Gu-HCl. Arbeidsfortynninger på henholdsvis 20 μ g/ml og 6 μ g/ml ble tillaget ved fortynning av forrådsløsning med 0,05 M karbonat/bikarbonat-buffer, pH 9,5. Brønnene i mikrotiterplater ble fylt med 100 μ l av arbeidsfortynningen av peptidene og fikk stå over natten ved romtemperatur. Belegningsløsning ble fjernet, og 300 μ l blokkeringsløsning, som ovenfor, inneholdende 0,5 M etanolamin ble tilsatt i 1 time ved romtemperatur. Blokkeringsløsningen ble fjernet, og platene ble anvendt straks eller fikk tørke og ble lagret for senere anvendelse.

Plasmaprøver ble fortynnet (se tabell 1) i prøvefortynningsbuffer (ovenfor), og 100 μ l ble tilsatt til individuelle brønner. Prøvene ble inkubert i 30 minutter ved 37°C og deretter fjernet, og brønnene ble vasket seks ganger med 0,15 M NaCl, 0,05% Tween 20. Ett hundre mikroliter geit-antihuman-Ig-pepperrotperoksydase-konjugat fortynnet i citratbuffer, pH 7,0, 1% normalt geiteserum, ble tilsatt i hver brønn i 30 minutter ved 37°C før vasking seks ganger som ovenfor. ELISA-analysen ble utviklet ved tilsetting av 100 μ l substratløsning pr. brønn (80 μ g/ml tetrametylbenzidin, 0,0015% hydrogenperoksyd i citrat/fosfatbuffer, pH 6,0) i 30 minutter ved romtemperatur. Reaksjonene ble stoppet ved tilsetting av 100 μ l 1 N H₂SO₄ pr. brønn, og forholdet mellom den optiske densitet ved 450 nm og 630 nm ble bestemt ved en automatisk ELISA-avlesningsanordning. Utelukkelsesverdien for et positivt resultat ble satt ved 0,225 absorbans-enheter over den

gjennomsnittlige absorbans oppnådd for tre kjente negative prøver. Resultatene i tabell 1 viser at peptid 39GC kunne gi et positivt resultat ved høyere fortynning enn peptid 39.

I atskilte forsøk viste det tiol-beskyttede peptid 39GC markert redusert immunreaktivitet ved analyser sammenliknet med tiol-avdekket peptid 39GC. Liknende resultater ble observert med HIV-2-peptidet, 41-2-3GC.

TABELL 1
FORTYNNINGSPANEL-SAMMENLIKNING AV PEPTID 39
OG PEPTID 39GC VED HJELP AV ELISA

<u>Prøve</u>	<u>Diagnose</u> <u>39GC/39</u>	<u>Bekreftet</u> <u>serumpositiv</u>	<u>PEPTID</u> <u>39GC</u>	<u>PEPTID</u> <u>39</u>
PlasmaO (1:40)	Pos/Pos	Ja	1,439	0,859
PlasmaO (1:80)	Pos/Pos	Ja	1,010	0,547
PlasmaO (1:160)	Pos/Pos	Ja	0,742	0,351
PlasmaO (1:320)	Pos/Neg	Ja	0,397	0,197
PlasmaO (1:640)	Neg/Neg	Ja	0,279	0,128
PlasmaO (1:1280)	Neg/Neg	Ja	0,165	0,078
PlasmaG (1:40)	Pos/Pos	Ja	0,895	0,585
PlasmaG (1:80)	Pos/Neg	Ja	0,820	0,321
PlasmaG (1:160)	Pos/Neg	Ja	0,575	0,241
PlasmaG (1:320)	Neg/Neg	Ja	0,349	0,148
PlasmaG (1:640)	Neg/Neg	Ja	0,179	0,092
PlasmaG (1:1280)	Neg/Neg	Ja	0,107	0,078
Utelukkelsesverdi			0,348	0,341

EKSEMPEL II

Membrankonsentrerings-immunanalyse for antistoffer mot HIV-1 under anvendelse av avdekkede proteiner

Forskjellige kjente serum- og plasmaprøver ble undersøkt med hensyn til immunologisk kryssreaktivitet under anvendelse av en modifisert mikropartikkel-analyse hvor de forbedrede fremgangsmåter og materialer ifølge den foreliggende oppfinnelse anvendes. De foreliggende peptidmaterialer ble immobilisert på lateksperler og oppfanget på en mikroporøs membran oppå et absorpsjonsmateriale

for bestemmelse og/eller kvantifisering av antistoffer mot HIV. Eksempler på slikt immunanalyseapparat og -fremgangsmåter er gjenstanden for US-patenter 4 633 901 og 4 727 019, som begge er medtatt i det foreliggende som referanse. Membrankonsentrerings-immunanalysen innbefatter tre inkuberinger omfattende en total analysetid på 10 minutter. Undersøkte peptider ble adsorbert til lateksperler ved metodene beskrevet ovenfor.

Hver prøve ble undersøkt på en filtrerings-enhet omfattende tre flekker på en nylonmembran med porestørrelse 1,2 μm . Én flekk omfattet forsøkspeptid/lateksperle-preparatet, én flekk omfattet en positiv fremgangsmåtekontroll og den annen omfattet en negativ fremgangsmåtekontroll.

Peptid/lateksperle-preparatet ble suspendert i 0,1 M Tris-buffer, pH 7,2, 0,15 M NaCl, 0,01 M MgCl_2 , 10% sakkarose, 2% føtalt kalveserum. Membranene ble påført flekker av en 0,1-0,2% suspensjon av peptid/perle-preparat. Negative fremgangsmåtekontroll-flekker besto av lateksperler belagt ved adsorpsjon med BSA, mens positive fremgangsmåtekontroll-flekker besto av lateksperler belagt ved adsorpsjon med geit-antihuman-immunglobuliner.

Serum- eller plasmaprøver (40 μl) ble fortynnet 1:10 i fortynningsbuffer (10% varme-inaktivert normalt geiteserum, 1% dekstransulfat, 0,2% Tween 20, 2,5% fettfri tørrmelk, 15 ppm Kathon CG, 0,005% antiskum A, i 20 mM natriumcitratbuffer, pH 7,4). Fortynnet prøve ble tilsatt til overflaten av membranen og fikk absorberes fullstendig. Etter venting i 2 minutter fra tidspunktet for prøvetilsetting, ble 1 ml vaskebuffer (0,01 M Tris-bufret saltløsning, pH 6,0, 0,05 M NaCl, 0,005 M MgCl_2 , 0,1% natriumazid, 10 $\mu\text{g/ml}$ nitroblått-tetrazolium, 0,5 M kaliumtiocyanat) tilsatt og fikk absorberes fullstendig gjennom membranen. Ca. 0,150 ml (3 dråper) geit-antihumant Ig-alkalisk fosfatase-konjugat fortynnet i 10 mM fosfatbufret saltløsning, pH 7,4, 0,2% geite-gammaglobulin, 1% bovint serumalbumin, 1 mM MgCl_2 , 0,1 mM ZnCl_2 ble tilsatt til membranen og fikk absorberes fullstendig. Membranen ble vasket to ganger som ovenfor (2 ml) og ca. 0,150 ml (3 dråper) substrat (1 M 2-amino-2-metyl-1-propanol, pH 10,3, 5 mg/ml 3-indoksylofosfat) ble tilsatt og fikk absorberes fullstendig. Etter ca. 5 minutter ble ca. 1 ml 0,5 M EDTA, pH 7,4, ledet gjennom membranen for stopping av reaksjonen. Etter at

stoppløsningen var fullstendig absorbert, ble enhetene avlest visuelt eller halvkvantitativt ved reflektans.

Et resultat var negativt hvis bare den positive kontrollfleck viste noe tegn til fargeutvikling og forsøksflekken og den negative kontrollfleck ikke viste noen fargeutvikling. Resultatet var positivt hvis forsøksflekken viste et visst nivå av fargeutvikling (fra spor til 4+), den positive kontrollfleck viste fargeutvikling og den negative kontrollfleck ikke viste noen fargeutvikling. Forsøket ble betraktet som ugyldig hvis alle flekker viste en fargeutvikling, hvis det ikke ble sett noen fargeutvikling for den positive kontroll, eller hvis den negative kontrollfleck viste fargeutvikling.

Mange forskjellige positive, negative, EIA-positive/Western blot-atypiske og immun-sensibiliserte prøver er blitt undersøkt med den foretrukkede peptid 39-analog, peptid 39-GC, som forsøksantigen. Positive prøver viste en reaktivitetsgradering på fra 0,5+ til 4+, idet alle gyldige forsøk resulterte i tydelig avgrensede fargede flekker på en ren hvit bakgrunn. Den negative kontroll viste ingen fargeutvikling, og den positive kontroll ga en farging på ca. 2+.

Tabell 2

OPPSUMMERING AV RESULTATER AV FORSKJELLIGE TYPER PRØVER
UNDERSØKT VED MEMBRAN-IMMUNKONSENTRERINGS-IMMUNANALYSE
MED PEPTID 39-GC SOM ANTIGEN

<u>Klasse</u>	<u>Ant. positive/Totalt ant.</u>
Normale blodbank-donor	0/1187
Western Blot neg./LAV-EIA Pos.	0/79
Western Blot p25 Neg./LAV-EIA Pos. (Atypisk 1)	0/39
Western Blot p25 Pos./LAV-EIA Pos. (Atypisk 2)	0/170
Western Blot Pos./LAV-EIA Pos. (OD<1,5)	120/120
Western Blot Pos./LAV-EIA Pos. (OD>1,5)	29/29
Autoimmun-prøver 1	0/51
Sekundære, atypiske syfilis-sera/HIV-neg.	0/26
Sekundære, atypiske syfilis-sera/HIV-pos.	4/4
Problematiske HIV-I-seronegative prøver 2	0/72

n=1777

1. Autoimmun-prøver innbefattet 11 astmapasienter, 11 pasienter med Sjögrens syndrom, 7 pasienter med systemisk lupus erythematosus, 4 spondylitt-pasienter med stivhet, 3 ukjente tilstander og 15 forskjellige syndromer/sykdommer.
2. Ikteriske, lipemiske, bakteriemi, askorbinsyre- og forskjellige antikoagulas-behandlede prøver.

Forskjellige peptidmaterialer ifølge den foreliggende oppfinnelse er blitt undersøkt under anvendelse av noen av analyseformene beskrevet ovenfor. En oppsummering av resultatene finnes i følgende tabeller. I tabell 3 er det vist resultater av sammenlikningen av peptid 39 ved ELISA- og membrankonsentrerings-immunanalyse, med helvirus-ELISA på atypiske prøver. Ti av de 11 atypiske prøver ga positiv test ved helvirus-ELISA og ble ikke bekreftet å være positive ved Western Blot. Alle ble funnet å være negative når peptid 39 ble anvendt som det immobiliserte antigen både ved ELISA- og membrankonsentrerings-immunanalyse.

Resultater av helvirus-ELISA med peptid 39GC ved ELISA- og membrankonsentrerings-immunanalyse og peptid 39 ved ELISA på to serumomdannelsesplater er vist i tabell 4. Peptid 39GC og peptid 39 ga positivt resultat tidligere enn helvirus-ELISA. peptid 39GC ga positivt resultat tidligere enn peptid 39 på én av serumomdannelsesplatene.

TABELL 3

ENZYMBUNDET IMMUNANALYSE-SAMMENLIKNING AV PEPTID OG
HELVIUS SOM ANTIGEN PÅ ATYPISK WESTERN BLOT-SERUMPRØVE

<u>Prøve</u>	<u>Diagnose LAV/peptider</u>	<u>Bekreftet serumpositiv</u>	<u>LAV ELISA</u>	<u>Peptid 39 ELISA</u>	<u>Peptid MCI¹</u>
Y34150	Pos/Neg	Nei	0,526	0,063	Neg
Z00132	Neg/Neg	Nei	0,307	0,083	Neg
H62111	Pos/Neg	Nei	0,751	0,047	Neg
Y45719	Pos/Neg	Nei	0,581	0,048	Neg
Y49300	Pos/Neg	Nei	0,523	0,048	Neg
V44932	Pos/Neg	Nei	0,617	0,068	Neg
G16211	Pos/Neg	Nei	0,387	0,027	Neg
G15694	Pos/Neg	Nei	0,367	0,078	Neg
Y40646	Pos/Neg	Nei	0,655	0,057	Neg
H63547	Pos/Neg	Nei	0,901	0,092	Neg
Y38248	Pos/Neg	Nei	0,386	0,048	Neg

¹ Membrankonsentrerings-immunanalyse

TABELL 4

SAMMENLIKNEDE RESULTATER UNDER ANVENDELSE AV PEPTID
SOM ANTIGEN I ELISA- OG MEMBRANKONSENTRERINGS-IMMUNANALYSE-
FORMER FOR TO SERUMOMDANNELSES-PLATER

<u>Prøve nummer</u>	<u>Diagnose</u>	<u>Bekreftet serumpositiv</u>	<u>LAV ELISA</u>	<u>Peptid 39GC</u>	<u>Peptid 39</u>	<u>MCI 39GC</u>
BBI-1	Negativ	Nei	0,067	0,347	0,128	-
BBI-2	Negativ	Nei	0,075	0,317	0,129	-
BBI-3	Pos/Neg	Ja	0,180	0,842	0,514	+
BBI-4	Positiv	Ja	0,858	1,105	0,632	++
BBI-5	Positiv	Ja	1,164	1,757	1,098	++
BBI-6	Positiv	Ja	1,359	2,160	1,531	++
BBI-7	Positiv	Ja	1,430	1,986	1,307	++
BBI-8	Positiv	Ja	1,556	2,317	1,688	+++
BBI-9	Positiv	Ja	1,507	2,328	2,122	+++
Utelukkelsesverdi			0,291	0,384	0,341	
BBI-20	Negativ	Nei	0,038	0,136	0,037	-
BBI-21	Negativ	Nei	0,055	0,158	0,053	-
BBI-22	Pos/Neg	Ja	0,057	0,450	0,244	+
BBI-23	Pos/Neg	Ja	0,123	0,890	0,540	+
BBI-24	Pos/Neg	Ja	0,127	1,064	0,636	+
BBI-25	Pos/Neg	Ja	0,216	0,845	0,553	++
BBI-26	Pos/Neg	Ja	0,259	0,852	0,445	++
BBI-27	Positiv	Ja	0,335	1,104	0,590	++
BBI-28	Positiv	Ja	0,431	1,177	0,769	++
BBI-29	Positiv	Ja	0,718	2,085	1,566	++
BBI-30	Positiv	Ja	0,837	2,214	1,871	+++
BBI-31	Positiv	Ja	0,798	2,207	1,812	+++
BBI-32	Positiv	Ja	0,920	2,263	1,925	+++
BBI-33	Positiv	Ja	0,833	2,277	1,961	+++
BBI-34	Positiv	Ja	0,728	1,622	1,363	+++
BBI-35	Positiv	Ja	0,902	2,198	1,861	+++
BBI-36	Positiv	Ja	0,881	2,265	1,959	+++
BBI-37	Positiv	Ja	0,953	2,105	1,530	+++
Utelukkelsesverdi			0,291	0,384	0,341	

EKSEMPEL III

Påvisning av antistoffer mot HIV-2 ved anvendelse av avdekkede
peptider

Immunreaktiviteten av HIV-2-peptider syntetisert med beskyttede cystein-tiolgrupper ble bestemt. HIV-2-peptid 41-2-3 ble syntetisert som beskrevet i eksempel I, med Cys-gruppene beskyttet og med en N-terminal Cys-Gly-Gly, hvilket ga peptidet 41-2-3GC. EIA-analyser ble utført som beskrevet ovenfor, med anvendelse av viruslysater av HIV-1 og HIV-2 og peptider 39GC (HIV-1) og 41-2-3GC. Reaktiviteten ble bestemt for fortynninger av to HIV-2-positive sera, F504282 fra en pasient i New York, og "GOM" fra Institut Pasteur. Resultatene, vist i tabell 5, viser at de syntetiske peptider skiller klart mellom HIV-1 og HIV-2 og gir spesielt forøket spesifikk immunreaktivitet sammenliknet med resultater oppnådd med helvirus-lysate-EIA'ene.

Tabell 5: Reaktiviteter i EIA av fortynningsserier tillaget av HIV-2-positive prøver

Fortynning	HIV-1-peptid 39GC	HIV-2-peptid 41-2-3GC	HIV-1-lysats	HIV-2-lysats
A*				
Ingen	0,075	3,000	IB [#]	2,026
1:5	0,049	3,000	0,494 ^s	1,808
1:10	0,042	3,000	<u>0,293</u>	1,687
1:20	0,037	3,000	0,170	1,405
1:40	0,035	2,828	0,101	1,182
1:80	0,033	2,107	0,072	0,876
1:160	0,040	1,441	0,046	0,597
1:320	0,031	0,941	0,039	<u>0,367</u>
1:640	0,031	<u>0,588</u>	0,034	0,171
1:1280	0,039	0,302	IB	IB
1:2560	0,030	0,180	IB	IB

B*				
1:2	0,052	3,000	0,839	2,113
1:4	0,037	3,000	0,510	1,953
1:8	0,040	3,000	<u>0,317</u>	1,703
1:16	0,031	3,000	0,177	1,433
1:32	0,035	3,000	0,099	1,083
1:64	0,074	2,524	0,060	0,736
1:128	0,031	2,202	0,047	0,552
1:256	0,035	1,452	IB	<u>0,280</u>
1:512	0,040	0,811	IB	0,176
1:1024	0,037	0,571	IB	0,114

* A er serum fra pasient F504282, B er serum fra pasient GOM.

IB = Ikke bestemt

s Linjen representerer utelukkelse. Verdier over denne er positive, og verdier under anses for negative.

Immunreaktiviteten av ubeskyttet HIV-2-peptid 41-2-3 ble sammenliknet med den avdekkede form med en Cys-Gly-Gly-forlengelse i den N-terminale ende (41-2-3GC), og med et HIV-2-helviruslysats. Analysene var EIA-analyser utført generelt som beskrevet ovenfor med varierende fortynninger av HIV-2-positive serumprøver. Resultatene for representative sera er vist i tabell 6.

Tabell 6: Reaktivitet av utvalgte HIV-2-sera med avdekkede og ubeskyttede HIV-2-peptider og HIV-2-viruslysat

Prøve	Fortynning	41-2-3GC	41-2-3	Lysat
"GOM"	1:2	3,000	2,239	2,113
	1:4	3,000	1,932	1,953
	1:8	3,000	1,517	1,703
	1:16	3,000	1,143	1,433
	1:32	3,000	0,693	1,083
	1:64	2,524	<u>0,343</u> [§]	0,736
	1:128	2,202	0,228	0,552
	1:256	1,452	0,092	<u>0,280</u>
	1:512	0,811	0,069	0,176
	1:1024	0,571	0,058	0,114
"PIN"	1:2	3,000	2,082	1,336
	1:4	3,000	1,695	1,035
	1:8	2,596	1,154	0,834
	1:16	1,940	0,607	0,711
	1:32	1,209	<u>0,369</u>	<u>0,387</u>
	1:64	0,582	0,182	0,188
	1:128	<u>0,368</u>	0,123	0,147
	1:256	0,186	0,091	0,087
"SAMB"	1:2	3,000	1,535	1,047
	1:4	3,000	1,089	0,968
	1:8	2,854	0,659	0,708
	1:16	2,710	<u>0,433</u>	0,485
	1:32	2,112	0,239	0,398
	1:64	1,400	0,121	<u>0,289</u>
	1:128	0,834	0,081	0,144
	1:256	<u>0,404</u>	IB [#]	IB
"S"	1:2	3,000	2,208	1,855
	1:4	3,000	1,942	1,806
	1:8	3,000	1,440	1,590
	1:16	3,000	0,910	0,917
	1:32	2,632	0,581	0,647
	1:64	2,155	<u>0,273</u>	0,455
	1:128	1,442	0,159	<u>0,289</u>
	1:256	0,725	0,089	0,157
	1:512	0,516	0,061	0,103

IB = Ikke bestemt

§ - Linjen representerer utelukkelse. Verdier over denne er positive, og verdier under anses for negative.

EKSEMPEL IV

Påvisning av antistoffer mot HTLV-I under anvendelse av
avdekkede peptider

Et område på HTLV-I-transmembranglykoprotein, gp21, ble identifisert å svare til transmembranområder på HIV-1 og HIV-2 og således å være potensielt immundominant. Syntetiske peptider ble fremstilt basert på den kjente aminosyresekvens av HTLV-I. Peptidene ble syntetisert og beskyttet generelt ifølge fremgangsmåtene skissert i eksempel I. Analyser ble utført generelt som beskrevet i eksempler I og II. Resultatene er vist i tabell 6.

Tabell 6: HTLV-I-peptider undersøkt med hensyn til reaktivitet overfor antistoffer mot HTLV-I.

Peptid [§] /sekvens	Serumprøve [#]		
	40359	0435	032EC1
121-1G1			
H- QNRRGLDLLFWEQGGLC* KALQEQC* -NH ₂	spor	-	-
121-1GC1			
H- CGG-QNRRGLDLLFWEQGGLC* KALQEQC* -NH ₂	3+	1+	-
121-2G1			
H-GLDLLFWEQGGLC* KALQEQC* -NH ₂	-	-	-
121-2GC1			
H-CGG-GLDLLFWEQGGLC* KALQEQC* -NH ₂	3+	0,5+	-
121-3G1			
H- NRRGLDLLFWEQGGLC* -NH ₂	-	-	-
121-3GC1			
H- CGG-NRRGLDLLFWEQGGLC* -NH ₂	3+	-	-
121-3EG1			
H- C*GG-NRRGLDLLFWEQGGLC* -NH ₂	IB	-	-
121-1D1			
H-QNRRGLDLLFWEQGGLCKALQEQC-OH	IB	-	-

- [§] - Belegningsnivå for peptider på lateks-mikropartikler var 50 µg peptid/5 mg perler/ 550 µl volum.
[#] - Serumprøver 40359 og 0435 er HTLV-I-EIA-positive kontrollsera anvendt ufortynnet; 032EC1 er HTLV-1-EIA-negativ kontroll.
^{*} - Viser at Cys-rest var beskyttet under syntese under anvendelse av etylkarbamoyl-beskyttelse.

Resultatene av analyser med peptid 121-1GC1 ble sammenliknet med resultatene oppnådd med andre HTLV-I/II-forsøk så som polymerase-kjedereaksjonen (PCR), radioimmun-utfelning (RIP), Western blot (WB) og viruslysats-EIA-analyser. Fremgangsmåten som

beskrevet i eksempel II ble anvendt for peptid 121-1GC1, bortsett fra at to dråper av prøvene ble anvendt og at konjugatet ble anvendt i en to ganger høyere konsentrasjon. Analysene ble utført med 10 serumprøver som man hadde mistanke om inneholdt antistoffer mot HTLV-I og/eller HTLV-II. PCR-analysen med hensyn til HTLV-II ble utført generelt ifølge PCR Technology, Principles and Applications for DNA Amplification, red. H.A. Ehrlich, Stockton Press, N.Y. (1989), medtatt i det foreliggende som referanse. Resultatene er vist i tabell 7.

TABELL 7: Sammenlikning av analyser med hensyn til HTLV-I/II med avdekket peptid 121-1GC1.

<u>Prøve nr.</u>	<u>PCR</u> <u>HTLV-II</u>	<u>EIA</u> <u>HTLV-I</u>	<u>RIP</u> <u>HTLV-1</u>	<u>WB</u> <u>HTLV-1</u>	<u>Status</u>	<u>121-1GC1</u>
89379	+	+	+	+	+	spor
89365	+	+	-	ms [§]	us [#]	0,5+
39266	+	+	-	ms	us	spor
89430	+	+	-	+	us	spor
89433	+	+	-	-	us	1+
89442	-	+	-	us	us	spor
89232	+	+	+	+	+	spor
89283	+	+	+	+	+	1+
89359	+	+	+	+	+	1+
88002					-	-
12-97-854					-	-

Belegningsnivå: 80 µg peptid/5 mg perle/550 µl volum

§ - ms er meget svar reaksjon.

- us er ubestemmelig status.

I andre forsøk ga undersøkelse av HTLV-I-peptidet i forskjellige former mot et serum-utvalg av formodede HTLV-I/II-positive individer ikke-overbevisende resultater sammenliknet med resultater oppnådd ved RIP, Western blot og kommersielt tilgjengelige HTLV-I EIA-analyser. Noen prøver som var antatt positive ved noen av forsøkene, var negative med peptid 121-1GC1. Disse resultater kan skyldes flere faktorer, innbefattende den mulighet at prøver som var negative med peptid 121-1GC1 og positive med andre kriterier, inneholdt antistoffer som hovedsakelig var reaktive med viruskjerneantigener og ikke med transmembranglykoprotein-antigener.

P a t e n t k r a v

1. Oksydert peptid som er immunreaktivt med antistoffer mot et naturlig retrovirus-protein, k a r a k t e r i s e r t v e d at peptidet er immobilisert på en fast fase immunotest og omfatter en aminosyresekvens på 7-50 aminosyrer og har minst syv etter hverandre følgende aminosyrer fra følgende sekvens:

HIV-1 gp41

Arg-Ile-Leu-Ala-Val-Glu-Arg-Tyr-Leu-Lys-
Asp-Gln-Gln-Leu-Leu-Gly-Ile-Trp-Gly-Cys-
Ser-Gly-Lys-Leu-Ile-Cys,

HIV-2 gp36

Arg-Val-Thr-Ala-Ile-Glu-Lys-Tyr-Leu-Gln-Asp-
Gln-Ala-Arg-Leu-Asn-Ser-Trp-Gly-Cys-
Ala-Phe-Arg-Gln-Val-Cys,

HTLV-I gp21

Gln-Asn-Arg-Arg-Gly-Leu-Asp-Leu-Leu-Phe-Trp-
Glu-Gln-Gly-Gly-Leu-Cys-Lys-Ala-Leu-Gln-Glu-
Gln-Cys eller

HTLV-II gp21

Gln-Asn-Arg-Arg-Gly-Leu-Asp-Leu-Leu-Phe-Trp-
Glu-Gln-Gly-Gly-Leu-Cys-Lys-Ala-Ile-Gln-Glu-
Gln-Cys,

hvor sekvensen til peptidet omfatter minst to Cys-rester skilt ved minst 2, men færre enn 20, ikke-Cys-aminosyrer, og tiol-gruppene på Cys-restene i peptidet var beskyttet mot oksydasjon under syntesen med kjemisk reversible midler som er bestandige overfor sterkt sur spaltning, og ble deretter avbeskyttet under eller etter immobiliseringen til immunotestens faste fase og utsatt for oksyderende betingelser som førte til dannelse av intramolekulære disulfidbindinger.

2. Peptid ifølge krav 1,
k a r a k t e r i s e r t v e d at Cys-restene var beskyttet mot oksydasjon ved hjelp av etylkarbamoyl, acetamidometyl, 3-nitro-2-pyridinsulfinyl eller difenyl-4-pyridylmetyl.

3. Peptid ifølge krav 1,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det videre omfatter en Cys-rest i sin N-terminale ende som ikke er beskyttet mot oksydasjon.

4. Peptid ifølge krav 3,
k a r a k t e r i s e r t v e d at de N-terminale aminosyrer
omfatter Cys-Gly-Gly.

5. Peptid ifølge krav 3,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den C-terminale aminosyre
er amidert.

6. Peptid ifølge krav 1,
k a r a k t e r i s e r t v e d at Cys-restene er skilt fra
hverandre ved ca. 4-6 ikke-Cys-rester.

7. Fremgangsmåte for fremstilling av en peptidbelagt fast fase
for immunologisk påvisning og/eller kvantifisering av antistoff
mot et naturlig retrovirusprotein, ved bruk av et oksydert
peptid som krevet i krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d
at den omfatter følgende trinn:

- a) syntetisering av et tiolbeskyttet peptid hvor de reversible
beskyttelsesmidler er bestandige overfor sterkt sur
spaltning,
- b) immobilisering av det beskyttede peptid på en fast fase,
- c) fjerning av den kjemisk reversible beskyttelse fra det
immobiliserte peptid og
- d) inkubering av det immobiliserte peptid under betingelser
som bidrar til dannelsen av disulfidbindinger.

8. Fremgangsmåte ifølge krav 7,
k a r a k t e r i s e r t v e d at cystein-tiolgruppene
beskyttes før syntetisering av peptidet.

9. Fremgangsmåte ifølge krav 7,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den faste fase er lateks,
silika, cellulose, fluorkarbonpolymerer, nylon, polyakrylamid
eller polystyren.

10. Fremgangsmåte ifølge krav 7,
k a r a k t e r i s e r t v e d at peptidet avbeskyttes under
eller etter immobiliseringen til immunotestens faste fase.

11. Anvendelse av en peptidbelagt fast fase fremstilt ifølge krav 8, for bestemmelse av tilstedeværelse av antistoffer mot HIV-1, HIV-2, HTLV-I eller HTLV-II eller antigener derav i en biologisk prøve, k a r a k t e r i s e r t v e d a t

- den biologiske prøve bringes i kontakt med et immobilisert peptid under betingelser som bidrar til immunspesifikk binding, under dannelsen av en reaksjonsblanding, og
- det påvises hvorvidt immunspesifikk binding har funnet sted, hvorved tilstedeværelsen av antistoffene eller antigenene i den biologiske prøve påvises.

12. Anvendelse ifølge krav 11,

k a r a k t e r i s e r t v e d a t immunspesifikk binding påvises ved at ubundne komponenter skilles fra immunreaksjonsblandingen, et merket antistoff som kan bindes til en komponent i reaksjonsproduktet, tilsettes, og det påvises hvorvidt det merkede antistoff bindes til reaksjonsproduktet.

13. Anvendelse ifølge krav 12,

k a r a k t e r i s e r t v e d a t atskillelsen skjer ved filtrering.