

(19) DANMARK

(11)

DK 175901 B1



(12) PATENTSKRIFT

Patent- og
Varemærkestyrelsen

(51) Int.Cl.: C 07 K 7/04 C 07 K 14/435 C 12 P 21/00 G 01 N 33/68

(21) Patentansøgning nr: PA 1987 06149

(22) Indleveringsdag: 1987-11-23

(24) Løbedag: 1987-03-20

(41) Alm. tilgængelig: 1987-11-23

(45) Patentets meddelelse bkg. den: 2005-05-30

(86) International ansøgning nr: PCT/US87/00577

(86) International indleveringsdag: 1987-03-20

(85) Videreførelsesdag: 1987-11-23

(30) Prioritet: 1986-03-24 US 843437

(73) Patenthaver: Ortho Pharmaceutical Corporation, Route nr. 202, Raritan, New Jersey 08869-0602, USA

(72) Opfinder: Jonathan I. Rosen, 10264 Meadowview Drive, San Diego, California 92131, USA
Robert B. Naso, 2640 Vistosa Place, Carlsbad, California 92008, USA
Ralph B. Arlinghaus, 3262 Lahitte Court, San Diego, California 92122, USA

(74) Fuldmægtig: Budde, Schou & Ostenfeld A/S, Vester Søgade 10, 1601 København V, Danmark

(54) Benævnelse: Syntetiske HTLV-III peptider, sammensætninger, anvendelser samt fremgangsmåde til fremstilling deraf

(57) Sammendrag:

Syntetiske peptider, der kan anvendes til påvisning af antistoffer mod HTLV-III virus. Disse syntetiske peptider efterligner en del af et eller flere proteiner fremstillet af de HTLV-III eller HTLV-III-lignende virus, som er etiologisk associeret med de som AIDS og ARC kendte sygdomssyndromer.

Den foreliggende opfindelse angår syntetiske peptider og nærmere bestemt syntetiske peptider, som efterligner en del af et eller flere proteiner fremstillet af de HTLV-III eller HTLV-III-lignende virusser, som er etiologisk associeret med de som AIDS og ARC kendte sygdomssyndromer.

Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS) blev først konstateret i USA i 1981, og antallet af tilfælde i USA er siden da blevet fordoblet ca. hver 10 måned. Siden 1981 er der blevet registreret ca. 16.000 AIDS tilfælde i USA, af hvilke ca. halvdelen allerede er døde. Det forventede resultat af sygdommen er uden undtagelse døden, da der i øjeblikket ikke kendes nogen behandling, som effektivt kan forsinke eller forebygge sygdommens hærgen. Selv om sygdommen først viste sig hos homoseksuelle eller biseksuelle mænd og misbrugere af intravenøse stoffer, har den nu spredt sig til andre ved fælles brug af kontaminerede nåle eller ved intim seksuel kontakt med eller modtagelse af blodprodukter fra en bærer af viruset.

Det med AIDS associerede etiologiske middel er blevet identificeret som en gruppe beslægtede retrovirusser kendt enten som Human T-cell Lymphotropic Viruses-type III (HTLV-III), Human Immunodeficiency Virus (HIV), Lymphadenopathy Viruses (LAV) eller AIDS-beslægtede virusser (ARV). Disse virusser vil for nemhedens skyld her samlet blive omtalt som "HTLV-III virusser".

Da AIDS kan overføres med blodprodukter, har der lige fra sygdommen blev kendt været et stærkt incitament til at udvikle diagnostiske tests til screening af blod fra antistoffer eller antigener, som er specifikke for det inficerende virus. Bestræbelser indenfor dette område har båret frugt, og ved udgangen af 1985 var fem firmaer blevet godkendt til at markedsføre tests til påvisning af antistoffer mod HTLV-III virus. Disse tests hviler alle på anvendelse af virusproteiner opnået fra dyrkede HTLV-III inficerede T-lymfocytter til påvisning af antistofferne. Det fra de dyrkede celler opnåede virus sønderdeles (for eksempel med detergent), og et fluidum (kaldet "viruslysats") opnås. Dette lysat (inde-

holdende forskellige fragmenter af virusprotein) anvendes derefter typisk som fastfasekomponenten ved en immunoanalyse.

De gængse kommercielle immunoanalyser er af det konventionelle sandwich ELISA format, hvor fastfasekomponenten (med viruslysatet aflejret derpå) bringes i kontakt med blod eller serum, som mistænkes for at indeholde HTLV-III antistoffer. Hvis antistofferne forefindes, forventes de at binde til viruslysatet, og efter at ubundet materiale er vasket bort, bringes de i kontakt med enzym-mærket anti-humant immunoglobulin. De mærkede antistoffer vil binde til eventuelle humane antistoffer knyttet til den faste fase, og det er derfor viruslysatet, som giver testen specificitet for HTLV-III antistoffer.

Selv om de eksisterende tests synes at have mindsket overførslen af HTLV-III virus via blodprodukter signifikant, har disse tests baseret på viruslysat nogle betydelige ulemper.

For det første er der, da viruslysatet fremstilles af celler inficeret med levende HTLV-III virus, en mulighed for, at de, der fremstiller testsproduktet, kan blive inficeret under fabrikationen. Der er i det mindste også den teoretiske mulighed, at det levende virus kan overleve sønderdelingsproceduren og finde vej til den diagnostiske test og således inficere brugeren.

En anden ulempe hænger sammen med vanskeligheden ved at opnå lysatet og den variable natur af det resulterende lysat, der afhænger af variation i fremstillingsproceduren eller i karakteristika for de inficerede celler, som anvendes til opnåelse af viruslysatet.

En tredje og langt mere alvorlig praktisk ulempe er det betydelige antal falske positive og i mindre udstrækning falske negative resultater, som iagttages under de gængse tests. Det er nu velkendt, at de gængse viruslysat ELISA tests giver et betydeligt antal falske positive resultater. Som det i oversættelse lyder i Hastings Center Report, Special Supplement/August 1985, med titlen "AIDS; The Emerging Ethical Dilemmas":

"Imidlertid er ELISA testen ikke så specifik, som den er følsom. Det vil sige, at i en population af raske bloddonorer vil så mange som et ud af hver hundrede testresultater være positivt, og af disse vil så mange som 90 ud af 100 være falsk positive. I national målestok vil 40.000 ud af de 8 millioner årlige
5 bloddoneringer være falsk positive." (side 9)

De falske positive menes til dels at skyldes forekomsten af ikke-virusproteiner i viruslysatpræparaterne, der anvendes i fastfasekomponenten ved de gængse analyser.

Rapporten indikerer yderligere, at en Western aftryksbekræftelsestest
10 (som er mere bekostelige og teknisk vanskeligere end ELISA testen) må udføres for at udelukke de falske positive resultater. Da Western aftryksanalyser i sig selv er behæftet med fejl og genstand for subjektiv fortolkning, er en simpel, hurtig og objektiv bekræftelsestest for HTLV-III antistof stadig ønskelig.

Falske negative er også et problem, selv om sådanne falske negative
15 delvis kan skyldes analysens natur, sygdommens immunosuppressive natur eller latensperioden mellem eksponering for HTLV-III virus og udviklingen af antistof.

En yderligere ulempe ved de i øjeblikket tilgængelige tests er, at de kun påviser antistof mod HTLV-III viruset og ikke selve viruset eller virusantigenet.
20 Et positivt resultat indikerer derfor kun, at det testede individ på et tidspunkt blev eksponeret for HTLV-III viruset og udviklede antistoffer mod dette. Det siger intet om, hvorvidt individet i øjeblikket er inficeret eller infektiøst eller har AIDS. Det bør bemærkes, at ifølge den reviderede Center for Disease Control definition af AIDS (juni 1985) udelukkes patienter som AIDS tilfælde, hvis de er
25 negative for serumantistof mod HTLV-III og ikke har et lavt antal T-hjælperlymfocytter eller et lavt forhold mellem T-hjælper og T-suppressorlymfocytter.

Til trods for deres ufyldstgørende diagnostiske værdi anvendes de gængse tests ikke blot til påvisning af viruskontamineret blod men også til på-
30 visning af inficerede personer (om hvem det formodes, at de muligvis kan ud-

vikle egentlig AIDS og overføre sygdommen til andre). Da et betydeligt antal mennesker, som er positive ved de kommercielt tilgængelige antistoftests, hverken udviser kliniske symptomer eller (tilsyneladende) er i stand til at inficere andre, er der en betydelig risiko for ved de gængse tests falsk at identificere en person som AIDS-bærer med de deraf følgende sociale og psykologiske resultater.

Mange af ulemperne ved den gængse lysatbaserede test kunne undgås ved i stedet for viruslysate at anvende et materiale, som ikke hidrører fra virusinficerede celler. Et sådant materiale kunne for eksempel være et virusspecifikt syntetisk peptid eller et virusspecifikt peptid hidrørende fra en rekombinant organisme (typisk *E. coli*).

Arbejde med sidstnævnte løsningsmodel er blevet rapporteret af Robert C. Gallo og medarbejdere i en række artikler i den senere tid indbefattende *Biotechnology*, bind 3, side 905-909 (oktober 1985), *Science*, bind 228, side 93-96 (5. april 1985) og *Nature*, bind 315, side 151-154 (9. maj 1985). Disse forskere har identificeret et 82 aminosyrepeptid, for hvilket der kodes af et gensegment i ENV området af det via rekombinant *E. coli* teknik producerede HTLV-III virus. Dette peptid genkendes af antistoffer mod HTLV-III virus. For nylig har en Genentech gruppe rapporteret et arbejde med et 102 aminosyrepeptid, som i sig indeholder Gallo gruppens 82 aminosyrepeptid. *Biotechnology*, bind 4, side 128-133 (februar 1986).

Selv om teknikken med syntetiske peptider frembyder flere åbenbare fordele (for eksempel specificitet, renhed, fremstillingslethed), er der kun udført få arbejder indenfor dette område. I realiteten er den eneste publikation, som de foreliggende opfindere er bekendt med vedrørende sådant arbejde, et indlæg af Dr. Dino Dina og medarbejdere på Fifth Annual Congress for Recombinant DNA Research, 3-6. februar 1985. Selv om det i sammendraget anføres, at forskellige syntetiske peptider "anvendes (1)" til vurdering af immunreaktioner i AIDS patienter og (2) til fremkaldelse af antisera i dyr", blev de anvendte specifikke peptider ikke omtalt. Endvidere blev der i selve indlægget ikke identificeret

nogen specifikke peptider, og det blev ikke angivet, at noget enkelt peptid eller en kombination af peptider kunne genkende alle eller de fleste af de kendte positive sera. Siden dette indlæg i februar 1985 og op til nærværende ansøgnings prioritetsdato er opfinderne ikke bekendt med nogen yderligere publikationer fra denne forskergruppe eller nogen anden om syntetiske HTLV-III peptider. Senere, i august 1986, blev en publikation af Wang et al., Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A. (1986) 83:6159-6163 offentliggjort.

Syntetiske peptider, som vellykket ville efterligne en del af HTLV-III proteinet og derfor ville kunne anvendes både til påvisning af antistof mod HTLV-III og til fremstilling af antistof, som ville genkende HTLV-III virus eller virusantigen, ville være en betydelig fordel indenfor området. Den foreliggende opfindelse tilvejebringer sådanne peptider, præparater indeholdende sådanne peptider og fremgangsmåder til anvendelse af disse peptider og præparater til terapi og diagnose. Opfindelsen tilvejebringer også anti-peptidantistoffer, præparater indeholdende disse antistoffer og fremgangsmåder til anvendelse af antistofferne og præparaterne.

Den foreliggende opfindelse tilvejebringer syntetiske peptider, som defineret i krav 1 og 2, udvalgt blandt:

- 20 IWGCSGKLICTTAVP (II)
- IWGCSGKLICTTAVPWNAS (III)
- AVERYLKDQQLLGIWGCSGKLI (IV)
- AVERYLKDQQLLGIWGCSGKLICTTAVPWNAS (V)
- LKDQQLLGIWGCSGKLI (VI)
- 25 QQLLGIWGCSGKLICTTAVPWNAS (VIII)
- CSGKLICTTAVPWNAS (X)
- AVERYLKDQQLLGIWGCSGKLI (XII)
- GCSGKLICTTAVPWN (XIII)
- LKDQQLLGIWGCSGK (XIV)

Disse peptider genkendes af størsteparten af HTLV-III antistofpositive sera fra patienter med AIDS/ARC samt antistofpositive sera af ukendt diagnose. Desuden giver de omhandlede peptider næsten ikke nogen falske positive.

5 Disse resultater er yderst overraskende i betragtning af, at andre peptider svarende til dele af HTLV-III svøbproteinerne ikke er effektive til selektivt at genkende antistoffer mod HTLV-III virus.

Den foreliggende opfindelse omfatter yderligere opdagelsen af, at genkendelsen af antistoffer mod HTLV-III virus forøges stærkt, hvis bestemte peptider, som defineret i krav 3, anvendes i kombination.

Kombinationen af peptider (IV) eller (XII) med peptider (III), (XIII) eller (X) foretrækkes specielt. Kombinationen af (III) og (IV) eller (XIII) og (IV) er de foretrukne kombinationer.

I betragtning af disse resultater er det klart, at der i syv aminosyrerest-peptiderne, som indbefatter sekvensen med formel CSGKLIC (I), er indeholdt en betydelig antigenisk determinant af HTLV-III viruset, som reagerer med HTLV-III antistoffer. Selv om hvert af de omhandlede peptider reagerer med de fleste HTLV-III positive sera, har individuelle patientsera desuden vist sig at reagere specifikt med et af de omhandlede peptider men ikke med et andet.

20 Denne iagttagelse indikerer, at der forefindes yderligere antigeniske determinanter i længere peptider indeholdende sekvensen med formel (I) såsom peptiderne (II) til (X). Peptiderne ifølge opfindelsen indeholder mindst en cysteinrest og i visse tilfælde to sådanne rester. De omhandlede peptider kan følgelig eksistere i forskellige oxidative former. Ud over den monomere form, hvori cysteinrestens eller -resternes sulfhydrylgruppe er reduceret, kan der også eksistere

25 dimere eller polymere former, hvori sulfhydrylgrupper på to eller flere peptidmolekyler bliver oxyderet og danner disulfidbindinger. Mens de omhandlede peptider, som kun har en cysteinrest, kun kan danne lineære dimerer, kan sådanne, som har to cysteinrester, danne cykliske monomerer eller lineære eller

30 cykliske dimerer og lineære polymerer af forskellig længde. Disse forskellige

oxidative former anses for en del af opfindelsen og er indbefattet i udtrykket "omhandlede peptider".

Den foreliggende opfindelse tilvejebringer desuden en fremgangsmåde til påvisning eller bestemmelse af HTLV-III antistoffer og et diagnostisk sæt eller udstyr til påvisning eller bestemmelse af HTLV-III antistoffer ved hjælp af et eller flere syntetiske peptider ifølge opfindelsen. Den omhandlede fremgangsmåde til påvisning eller bestemmelse af antistoffer mod HTLV-III i et fluidum, som mistænkes for at indeholde antistofferne, for eksempel blod, serum, plasma, salvia eller urin, er defineret i krav 8.

Det kan være værdifuldt at adskille den faste overflade fra fluidet og bortvaske ubundet materiale fra materialet på den faste overflade efter trin b i afhængighed af den anvendte påvisningsmetode. Selv om den specifikke påvisningsteknik ikke er kritisk, har enzymmærket anti-humanimmunoglobulin vist sig at fungere godt. Det omhandlede diagnostiske sæt eller udstyr til udøvelse af fremgangsmåden omfatter en fast overflade med mindst et omhandlet peptid bundet dertil og mærket (fortrinsvis enzymmærket) anti-humant immunoglobulin. Andre konventionelle materialer til mærkning af antistof kan også anvendes såsom for eksempel biotin eller en radioisotop.

Den foreliggende opfindelse tilvejebringer desuden en fremgangsmåde til fremstilling af anti-peptidantistoffer, som kan anvendes til påvisning af HTLV-III virus eller virusantigen, der omfatter, at man immuniserer et værtsdyr med et omhandlet peptid i polymeriseret form eller knyttet til en passende immunogen bærer. Fremgangsmåden til fremstilling af polyklonale antistoffer mod HTLV-III omfatter immunisering af en vært med mindst et omhandlet peptid i polymeriseret form eller knyttet til en passende immunogen bærer og overladning af værten. Fremgangsmåden til fremstilling af monoklonale antistoffer mod HTLV-III omfatter immunisering af et værtsdyr med mindst et omhandlet peptid eller et immunogenfragment deraf i polymeriseret form eller knyttet til en passende immunogen bærer, isolering af splenocytter fra den immuniserede vært, fusivering af splenocytterne med en passende myelomacellelinie, udvælgelse af

de fusionerede celler ved reaktivitet med det immuniserende peptid eller fragment, med HTLV-III eller med HTLV-III-inficerede celler og enten dyrkning af den udvalgte hybridom *in vitro* eller injektion af den i en passende vært. Det resulterende ønskede monoklonale antistof kan udvindes fra supernatanten
5 over den dyrkede hybridom eller fra den innokulerede værts serum eller ascites.

Selve anti-peptidantistofferne, fremgangsmåden til påvisning af HTLV-III virus ved hjælp af antistofferne og diagnostiske sæt eller udstyr indeholdende antistoffet (som kan anvendes til påvisning af HTLV-III virus) er også omfattet
10 af opfindelsen.

En sandwichmetode ifølge opfindelsen er defineret i krav 12.

Det kan være værdifuldt at adskille den faste overflade fra fluidet, som skal testes og bortvaske ubundet materiale fra den faste overflade efter trin b i afhængighed af den anvendte påvisningsmetode.

15 En konkurrencemetode ifølge opfindelsen er defineret i krav 13.

Et diagnostisk sæt til påvisning eller bestemmelse af HTLV-III virus ved sandwich- eller konkurrencemetode er defineret i krav 14.

Et omhandlet peptid kan også anvendes for at forbedre specificiteten af den omhandlede peptidtest eller en, hvortil der anvendes rekombinant HTLV-III
20 protein og således formindske afhængigheden af den mere vanskelige Western aftryksbekræftelsestest. Nøjagtigheden af et positivt resultat ved den omhandlede peptidtest eller en rekombinant proteintest kan bekræftes ved at gentage testen i nærvær af en virksom blokerende mængde af et omhandlet peptid.
Hvis binding af de formodede HTLV-III antistoffer til pladen blokeres af det
25 tilsatte peptid, bekræftes det oprindelige positive resultat; hvis bindingen ikke blokeres, var det oprindelige resultat en falsk (ikke-specifik) positiv.

Den foreliggende opfindelse omfatter derfor også en fremgangsmåde til bestemmelse af nøjagtigheden af et positivt resultat af en test for HTLV-III antistoffer på en fluidumprøve, som mistænkes for at indeholde disse antistoffer,
30 hvilken test er en sandwichanalyse, hvor et rekombinant HTLV-III protein eller

et syntetisk HTLV-III peptid knyttes til den faste overflade, hvilken fremgangs-
måde er defineret i krav 15. Udtrykket "virksom blokerende mængde" af det
omhandlede peptid betyder en mængde, som i det væsentlige reagerer fuld-
stændigt med eventuelle HTLV-III antistoffer rettet mod den eller de antigeniske
5 determinanter, som er indeholdt i peptidet, der forefindes i den testede prøve
og således i det væsentlige blokerer disse antistoffers reaktion med peptidet
eller proteinet på analysens faste overflade. Sandwichanalysen er fortrinsvis en
ELISA analyse.

De omhandlede peptider kan fremstilles ved hjælp af en hvilken som helst
10 konventionel teknik (indbefattende rDNA teknologi og teknikker til syntese i fly-
dende fase), selv om fastfasesynteser af Merrifield-type er en bekvem måde at
fremstille og isolere peptidet på. En yderligere beskrivelse af denne teknik og
andre teknikker kendt indenfor området kan findes i litteraturen, for eksempel
M. Bodanszky, et al., Peptide Synthesis, John Wiley & Sons, anden udgave,
15 1976 samt i andre referenceværker, som er kendte for fagmanden. Syntese-
teknikker (i modsætning til rDNA teknikker) foretrækkes af sådanne årsager
som renhed, antigenisk specificitet, frihed for uønskede biprodukter, fremstil-
lingslethed og lignende. Passende beskyttende grupper til anvendelse ved så-
danne synteser og forkortelser for disse vil kunne findes i ovenstående tekst
20 såvel som i J.F.W. McOmie, Protective Groups in Organic Chemistry, Plenum
Press, New York, 1973. Begge disse bøger inkorporeres heri ved henvisning.

Typiske bærere, hvortil de omhandlede peptider kan knyttes for udvikling
af anti-peptidantistoffer indbefatter for eksempel bovins serumalbumin, teta-
nustoxoid, "keyhole limpit" hæmacyanin, procin-, bovin- eller equinimmunoglo-
25 bulin og kolera eller E. coli varmelabil toxin B-underenhed.

De omhandlede peptiders struktur er angivet ved hjælp af de konventio-
nelle enkeltbogstavskoder for aminosyrer og skal læses fra venstre mod højre
som retningsmæssigt svarende til amino-til-carboxyretningen af sekvensen. For
at gøre det lettere for læseren kan det oplyses, at enkeltbogstavskoderne for
30 de i de omhandlede peptider indeholdte aminosyrer er:

- I=L-isolucin; W=L-tryptophan; G=glycin; C=L-cystein;
S=L-serin; K=L-lysin; L=L-leucin; T=L-threonin;
A=L-alanin; V=L-valin; P=L-prolin; D=L-asparaginsyre;
N=L-asparagin; E=L-glutaminsyre; R=L-arginin;
5 Y=L-tyrosin; Q=L-glutamin; M=L-methionin; og F=
L-phenylalanin.

Opfindelsen illustreres nærmere i de følgende eksempler.

10 **Eksempel 1**

A. Syntese af BOC-prolinharpiks

- Chlormethyleret styren-divinylbenzenpolymer indeholdende 1,3 mækv.
chlorid/gram harpiks forestredes med Boc-prolin i vandfrit N,N-
15 dimethylformamid (DMF) under anvendelse af kaliumiodid (KI) som katalytisk
middel. Omsætningen udførtes ved 55°C i 24 timer (1). Boc-
prolinsubstitutionen var 0,92 mmol/gram bestemt ved pikrinsyreanalyse på en
portion deblokeret harpiks.

20 **B. Syntese og karakterisering af peptid (II)**

- Syntese af peptidet med formel (II) udførtes ved hjælp af klassisk Merri-
field-teknik (2). Peptidsekvensen "IWGCSGKLICTTAVP" syntetiseredes på en
automatiseret peptidsyntetisator af typen Vega 250C under anvendelse af et
dobbelt koblingsprogram. 1,8326 g Boc-prolinharpiks dobbeltkoblede sekven-
25 tielt med følgende Boc-L-aminosyrer (3,8) i tolv mækv. overskud:

	<u>Aminosyre</u>	<u>Opløsningsmiddel</u>
	Boc-Val	CH ₂ Cl ₂
	Boc-Ala	CH ₂ Cl ₂
	Boc-(O-Bzl)-Thr	CH ₂ Cl ₂
5	Boc-(O-Bzl)-Thr	CH ₂ Cl ₂
	Boc-(MeOBzl)-Cys	CH ₂ Cl ₂
	Boc-Ile	CH ₂ Cl ₂
	Boc-Leu	10% DMF/CH ₂ Cl ₂
	Boc-(Cl-Z)-Lys	CH ₂ Cl ₂
10	Boc-Gly	CH ₂ Cl ₂
	Boc-(O-Bzl)-Ser	CH ₂ Cl ₂
	Boc-(MeOBzl)-Cys	CH ₂ Cl ₂
	Boc-Gly	CH ₂ Cl ₂
	Boc-Trp	10% DMF/CH ₂ Cl ₂
15	Boc-Ile	CH ₂ Cl ₂

Peptider spaltedes fra harpiksen med 10% anisol i flussyre og ekstrahe-
redes med 20% vandig eddikesyre. Denne opløsning filtreredes for at fjerne
fast harpiks og kørtes gennem en afsaltningsøjle af typen Fractogel TSK HW-
20 40F ved hjælp af et elueringsmiddel af 20% vandig eddikesyre. Fraktioner op-
samledes i 10 ml portioner, og søjleafgangsstrømmen overvågedes ved 280
nm. Fraktioner, som udviste positiv absorbans ved 280 nm, fortyndedes med
0,1% trifluoreddikesyre (TFA) i vand og analyseredes ved højpræstationsvæ-
skrokromatografi (HPLC) (4). Hovedabsorbanstoppen ved 214 nm bestemtes til
25 at have en retentionstid på 12,42 minutter. De Fractogenfraktioner, som inde-
holdte mere 70% af denne top, sammenbandedes og mærkedes Fr:1. De
Fractogelfraktioner, der indeholdt mindre end 70% men mere end 50% af den-
ne top, sammenbandedes og mærkedes Fr:2.

Analytisk HPLC (4) på Fr:1 viste, at 12,42 minutters toppen udgjorde 87%
30 af det samlede areal. Fr:1 karakteriseredes yderligere ved aminosyreanalyse

(5), sekvensbestemmelse (6) og bestemmelse af % peptidindhold (7). Peptid-sekvensanalyse (6) udførtes også på peptidharpiksen for at bekræfte den forventede sekvens af peptidet.

- 5 (1) Stewart & Young, Solid Phase Peptide Synthesis, 2. udgave (1984),
Pierce Chemical Co.
- (2) Merrifield, R.B. (1963), J. Amer. Chem. Soc. 85, side 2149-2154
- 10 (3) Alle Boc-aminosyrer leveret fra Bachem Inc., Torrance, Calif.
- (4) Analytiske HPLC betingelser:
puffer A: 0,1% TFA/destilleret deioniseret vand
puffer B: 0,1% TFA/acetonitril af HPLC kvalitet
15 gradientbetingelser: 10% "B" til 50% "B" over 20 minutter
 bølgelængde: 214 nm
 gennemstrømning: 1,0 ml/min
 søjle: Vydac 214TP54 C-4 proteinsøjle, 250 x 4,5 mm
- 20 (5) Aminosyreanalyse udført på en aminosyreanalysator af typen LKB
4150 ALpha Amino Acid Analyzer.
- (6) Peptidsekvensbestemmelse udførtes på et sekvensbestemmelses-
apparat af typen Applied Biosystems 470A Protein Sequencer.
- 25 (7) Peptidindhold bestemt ud fra genvinding ved aminosyreanalyse af
kendt mængde peptid.
- (8) Boc er en kemisk forkortelse for tert-butyloxcarbonylalpha-
30 aminobeskyttelsesgruppen. Den funktionelle gruppe fjernes ved hydrolyse i

50% trifluoreddikesyre (TFA)/50% dichlormethan (CH₂Cl₂) efter at aminosyren er koblet til den voksende peptidkæde. Denne handling frilægger kædens aminoterminal, hvorefter den næste aminosyre kan tilkobles effektivt.

Udover den beskyttende Boc-gruppe på hver aminosyre beskyttes sidekæderne i nogle aminosyrer yderligere mod angreb af peptidsyntesekemien. Disse beskyttende grupper, som i oversigten er anført i parentes, er alle stabile under peptidsyntesebetingelserne men kan let fjernes fra aminosyren ved spaltning i flussyre. Anisol (methylphenylether) virker som et nukleofilt uddrivningsmiddel under HF spaltningstrinnet for at forebygge alkylering af peptidet med de frigjorte carboniumioner fra de beskyttende grupper. De beskyttende grupper for de anførte aminosyrer defineres nedenfor:

O-benzyl: benzylester, knyttet til hydroxylsidekæden af både serin og threonin for at hindre acylering eller forgrening af peptidkæden.

MeObzl: 4-methoxybenzyl, knyttet til sulfhydrylgruppen i cystein for at forebygge oxidation af denne under peptidsyntese.

Cl-Z: 2-chlorbenzyloxycarbonyl, knyttet til lysins alpha-aminogruppe for at hindre dannelse af sidekædevækst fra dette sted i peptidet.

C. Polymerisation af peptidet med formel (II):

Peptidet indeholdt i Fr:1 forrådet fra del B lyofiliseredes for at fjerne edikesyre og solubileredes til 200 µg/ml i 0,1 M natriumbicarbonatpuffer, pH 9,0. Portioner af dette peptid fortyndet til 20 µg/ml i natriumbicarbonatpuffer anvendtes til belægning af mikrotiterbrønde til ELISA'er vist i tabel IV. Til tests vist nedenfor i tabel I-III solubileredes peptid i vand til 10 mg/ml og fortyndedes i fosfatpuffer, pH 7,3, til 5 µg/ml til belægning af mikrotiterbrønde. Peptidet i Fr:1 eksisterer primært i en enkelt form, som menes at være uoxyderet monomer. Da peptidet med formel (II) indeholder to cysteiner, polymeriseres det imidlertid ved solubilisering i neutral eller basisk vandig puffer. Det i de nedenfor beskrevne ELISA'er anvendte peptid er en blanding af meget små mængder lineær monomer og større mængder cyklisk monomer (dannet ved

intramolekylær disulfidbinding) og endnu større mængder polymerer (dannet ved intermolekylær disulfidbinding) af forskellig størrelse. Uden at ville være bundet af denne teori mener ansøgeren, at polymerformerne er vigtige for de her beskrevne reaktiviteter. Den cykliske monomerform menes, selv om den 5 bibeholder en del af polymerformens antigenicitet, at være mindre effektiv ved binding til mikrotiterbrøndene og mindre egnet som fastfasekomponenten ved ELISA'en. Den formodede cykliske monomer viser sig som en skarp top ved ca. 12,7 minutters retentionstid ved HPLC analyse, mens polymeren karakteriseres som en bred top ved ca. 15,9 minutters retentionstid. Oxidationsbetingel- 10 ser kan, som det er fagmanden bekendt, ændres med hensyn til temperatur, pH, peptidkoncentration og lignende for at ændre forholdet mellem monomer, cyklisk monomer og polymer, som er tilbage i præparatet eller størrelsen af de dannede polymerer. Små mængder af såkaldte deleteringspeptider (som mangler en eller flere aminosyrer) og deres oxidationsformer kan også findes i 15 de til ELISA'en anvendte peptidpræparater, men disse mindre urenheder påvirker ikke peptidets anvendelse.

Eksempel II

20 Syntese og karakterisering af peptider (III) til (XI)

Syntese af disse peptider udførtes ved i det væsentlige at anvende samme klassiske Merrifield-teknik som beskrevet tidligere for peptid (II). Til peptid (III) anvendtes Boc-serinharpiks med en substitution på 0,92 mmol/g. Til peptid (IV) anvendtes Boc-isoleucinuharpikssubstitution på 0,8 mmol/g. Syntese af 25 Boc-serin- og Boc-isoleucinuharpikserne udførtes ved Gisin metoden som beskrevet af Stewart & Young (1).

A. Til peptid (III) syntetiseredes peptidsekvensen "IWGCSGKLICTTAV-PWNAS" ved hjælp af følgende Boc-L-aminosyrer i tolv mækv. overskud:

15

	<u>Aminosyre</u>	<u>Opløsningsmiddel</u>
	Boc-Ala	CH ₂ Cl ₂
	Boc-Asn/Hobt	DMF
	Boc-Trp	10% DMF/CH ₂ Cl ₂
5	Boc-Pro	CH ₂ Cl ₂
	Boc-Val	CH ₂ Cl ₂
	Boc-Ala	CH ₂ Cl ₂
	Boc-(O-Bzl)-Thr	CH ₂ Cl ₂
	Boc-(O-Bzl)-Thr	CH ₂ Cl ₂
10	Boc-(MeOBzl)-Cys	CH ₂ Cl ₂
	Boc-Ile	CH ₂ Cl ₂
	Boc-Leu	10% DMF/CH ₂ Cl ₂
	Boc-(Cl-Z)-Lys	CH ₂ Cl ₂
	Boc-Gly	CH ₂ Cl ₂
15	Boc-(O-Bzl)-Ser	CH ₂ Cl ₂
	Boc-(MeOBzl)-Cys	CH ₂ Cl ₂
	Boc-Gly	CH ₂ Cl ₂
	Boc-Trp	10% DMF/CH ₂ Cl ₂
	Boc-Ile	CH ₂ Cl ₂
20		

B. Til peptid (IV) syntetiseredes peptidsekvensen "AVE-RYDKDQQLLGIWGCSGKLI" ved anvendelse af følgende Boc-aminosyrer i 12 mækv. overskud:

	<u>Aminosyre</u>	<u>Opløsningsmiddel</u>
25	Boc-Leu	10% DMF/CH ₂ Cl ₂
	Boc-(Cl-Z)Lys	CH ₂ Cl ₂
	Boc-Gly	CH ₂ Cl ₂
	Boc-(O-Bzl)-Ser	CH ₂ Cl ₂
30	Boc-(MeOBzl)-Cys	CH ₂ Cl ₂

	Boc-Gly	CH ₂ Cl ₂
	Boc-Trp	10% DMF/CH ₂ Cl ₂
	Boc-Ile	CH ₂ Cl ₂
	Boc-Gly	CH ₂ Cl ₂
5	Boc-Leu	10% DMF/CH ₂ Cl ₂
	Boc-Leu	10% DMF/CH ₂ Cl ₂
	Boc-Gln/Hobt	DMF
	Boc-Gln/Hobt	DMF
	Boc-(Bzl)-Asp	CH ₂ Cl ₂
10	Boc-(Cl-Z)Lys	CH ₂ Cl ₂
	Boc-Leu	10% DMF/CH ₂ Cl ₂
	Boc-(Br-Z)-Tyr	CH ₂ Cl ₂
	Boc-(Tosyl)-Arg	10% DMF/CH ₂ Cl ₂
	Boc-(Bzl)-Glu	CH ₂ Cl ₂
15	Boc-Val	CH ₂ Cl ₂
	Boc-Ala	CH ₂ Cl ₂

Som ved peptid (II) er ud over Boc beskyttelsesgruppen på hver aminosyre sidekæderne på visse aminosyrer beskyttet yderligere mod angreb af peptidsyntesekemien. Ud over de beskyttende grupper, som er beskrevet for aminosyrerne ved peptid (II) syntesen, anvendtes følgende beskyttende grupper for aminosyrer, som er specielle for peptid (III) og (IV):

20 Hobt: 1-hydroxybenzotriazol, anvendt i ækvimolære mængder til glutamin og asparagin under kobling for at hindre dehydratisering til nitrilformerne.

25 Tosyl: p-toluensulfonyl, anvendt til at asylere guanidingruppen i sidekæden på arginin.

Bzl: beta-benzylester, blokerer carboxylgrupperne i sidekæden på asparaginsyre og glutaminsyre.

30 BrZ: 2-brombenzyloxycarbonyl, blokerer hydroxylgrupperne i sidekæden på tyrosin.

Peptider spaltedes fra harpiksen, filtreredes, ekstraheredes med eddikesyre og kørt igennem en Fractogelafsaltningsøjle som i eksempel I. For peptid (IV) analyseredes Fractogelfraktioner ved analytisk HPLC, og fraktioner indeholdende mindst 30% af den samlede absorption ved 214 nm som hovedtoppen, der migrerede ved ca. 14 minutters retentionstid, sammenblandedes. De sammenblandede fraktioner kromatograferedes på carboxymethylcellulose bragt i ligevægt med 0,01 M ammoniumacetat, pH 4,4. Søjlen elueredes med en tringradient af ammoniumacetat, og fraktionen, der eluerede 0,2M ammoniumacetat, opsamledes, lyofiliseredes og analyseredes ved analytisk HPLC.

5 Hovedtoppen, som migrerede ved 14 minutters retentionstid, udgjorde mellem 30 og 40% af den samlede absorption ved 214 nm, og materialet havde et acceptabelt aminosyreindhold. Dette materiale genopløstes og anvendtes til ELISA som beskrevet for peptid (II).

For peptid (III) analyseredes Fractogelfraktioner ligeledes ved analytiske HPLC. Fraktioner indeholdende mindst 70% af den samlede absorption ved 214 nm som hovedtoppen, der migrerede ved ca. 12,99 minutters retentionstid, sammenblandedes, lyofiliseredes og analyseredes ved HPLC og for aminosyreindhold. Dette materiale genopløstes og anvendtes til ELISA som beskrevet for peptid (II).

20 Ved anvendelse i kombination som fastfasekomponenten ved en ELISA anvendtes et mikrogram af hvert af peptiderne (III) og 0,5 mikrogram peptid (IV) pr. mikrotiterbrønd. Peptidet enten tørredes på brønden ved 37°C eller "våd-pakkedes" på pladen ved inkubation natten over ved 4°C.

25 C. Til peptid (V) anvendtes Boc-serinharpiks som beskrevet for syntese af peptid (III). Syntese af (V) forløb som beskrevet for syntese af (III) ved tilsætning af C-terminalisoleucinet i peptid (III). Fra dette punkt fulgtes proceduren for tilføjelse af aminosyrerne i sekvensen AVERYLKDQQLLG i peptid (IV) til fuldendelse af (V) sekvensen.

Peptid (V) spaltedes fra harpiksen, filtreredes, ekstraheredes med eddikesyre og kørtes gennem en Fractogelafsaltningsøjle som beskrevet i eksempel I. Fractogelfraktion indeholdende hovedabsorptionstoppen ved 280 nm sammenblandedes og mærkedes Fr:1. Fr:1 analyseredes for aminosyreindhold og fandtes at være acceptabel. Denne fraktion lyofiliseredes og anvendtes til ELISA som beskrevet for peptid (II).

D. Ved at følge lignende procedurer fremstilledes peptiderne med formlerne (I) og (VI) til (XVI).

10

E. Polymerisation af peptid (III), (IV) og (V):

Peptid (I) til (III), (V) og (VII) til (X) indeholder to cysteiner. Disse peptider kan følgelig polymerisere og ringslutte ved oxidativ disulfidbinding. Tilføjes af de fire aminosyrer ved C-terminalenden af (III) tillader tilsyneladende den cykliske form af peptidet at binde til formstoffet ved ELISA analysen. Som resultat deraf er den cykliske form af (III) mere effektiv ved fastfase-ELISA end cyklisk (II) er. De former af (II), (III) og (V) peptider, som hidtil har været anvendt ved ELISA for at teste for HTLV-III antistofgenkendelse, har typisk været en blanding af lineær monomer, cyklisk monomer, dimer og polymer.

Peptid (IV), (VI) og (XI) indeholder kun et cystein. Disse peptider kan danne en dimer struktur via disulfidbinding.

Under betingelser til solubilisering af peptider som forberedelse til ELISA (for eksempel 0,1M natriumbicarbonatpuffer, pH 9,0) er de fleste af sulfhydryl-grupperne i peptid (II), (III), (IV) og (V) blevet omdannet til disulfidformen.

25

Eksempel III

Fremstilling af sammenligningspeptider

Ved at følge lignende procedurer som i eksempel II og III syntetiseredes peptider med følgende formler i sammenligningsøjemed:

30

- 5 QLQARILAVERY (C-I),
AVERYLKDQQLLG (C-II),
LKDQQLLGIWGCS (C-III),
IWGCSGKLI (C-IV), og
LICTTAVPWNASWSN (C-VIII)

Disse peptider har hver især sekvenser svarende til HTLV-III svøbets sekvens, men de svarer ikke til opfindelsens anvisninger. Nærmere bestemt er peptiderne med formel (C-I) og (C-II) sekvenser opstrøms for aminoenden af sekvensen med formel (I), det vil sige CSGKLIC. Peptider med formelen (C-III) indeholder kun aminoterminaldelen af sekvensen med formel (I). Peptider med formelen (C-IV) indeholder hele sekvensen i formel (I) bortset fra carboxyterminal L-cysteinresten. Peptider med formelen C-VIII er sekvenser nedstrøms for carboxyenden af sekvensen med formel (I), og som det vil blive beskrevet udviser ingen af disse peptider de ønskelige immunoreaktive egenskaber.

Eksempel IV

20 Fremstilling af ELISA analysesæt eller -udstyr og procedurer for anvendelse.

Procedure nr. 1 for ELISA (tabel IV):

- 25 (1) Belæg ELISA pladen med peptid- 1µg/50µl/brønd i 0,1 M NaHCO₃, pH 9.
- (2) Lad plader tørre utildækket natten over ved 37°C, vask derefter med PBS.
- (3) Bloker plader med 300 µl/brønd 5% NCS-PBS i 2 timer ved 37°C.
- 30 (4) Udryst blokeringspuffer og tør godt.

- (5) Tilsæt 50 µl/brønd testantiserer i 30 til 120 minutter ved 37°C. (Hvis antiserer skal fortyndes, brug T-wash). Vi har anvendt 1:2 til 1:100 fortyndinger.
- (6) Udryst testantiserer og vaske plade seks gange med PBS-Tween20.
- (7) Tilsæt 100 µl/brønd andet antistof fortyndet 1:4000 med T-wash. 30
5 til 120 minutter ved 37°C.
- (8) Udryst andet antistof og vask plade seks gange med PBS-Tween20.
- (9) Tilsæt 100 µl/brønd OPD substrat (eller 5 µl ABTS opløsning) i 20 minutter ved RT.
- 10 (10) Tilsæt 50 µl/brønd 4N H₂SO₄ for at standse OPD reaktion (eller 100 µl/brønd 1% SDS til ABTS reaktion).
- (11) Aflæs plade på MR 600 Microplate ELISA pladeaflæser. (490 nm til OPD eller 405 nm til ABTS)

15 **Reagenser:**

- (1) 0,1M NaHCO₃, pH 9.
- (2) PBS + 5% normalt kalveserum.
- (3) T-wash : (780 ml TBS + 20 ml NCS + 1,6 g BSA + 0,4 ml Tween 20)
TBS 12,11 g Trisbase
20 17,5 g NaCl
1800 ml H₂O
pH til 7,6 med HCl (ca. 3N)
slutvolumen til 2000 ml
- (4) Vaskepuffer/PBS-Tween20: 0,5 ml Tween10/IL PBS.
- 25 (5) OPD substrat: 1OPD tablet/3 ml H₂O/1,24 µl 30% H₂O₂.
- (6) 4N H₂SO₄.
- (7) ABTS: H₂O₂ i 1:1 volumenforhold af opløsninger leveret af Kirkegaard and Perry Laboratories, Inc., Gaithersbury, Md.)
ABTS = 2,2'-azino-di(3-ethyl-benzthiazolinsulfonat)_
- 30 (8) 1% SDS.

Det i trin 1 anvendte materiale til belægning af ELISA pladen er peptid med formel (II), (III), (IV), (V) eller en blanding deraf som ovenfor beskrevet. Det andet antistof er enten et kommercielt tilgængeligt peroxidmærket polyklo-

5 nalt antistof (Cappel Laboratories Catalog No. 3201-0231; peroxidasekonjugeret IgG fraktion af gedeanti-humane immunoglobuliner) eller et peroxidase-

mærket musemonoklonalt anti-humant IgG antistof eller en blanding af peroxidase-

mærkede musemonoklonale anti-humane IgG, IgA og IgM antistoffer.

10 **Procedure nr. 2 for ELISA (tabel I-III):**

- (1) Belæg ELISA pladen med peptider - μg peptid (IV), 0,5 μg peptid (III), 200 μl /brønd i 0,1M carbonatpuffer, pH 9,6.
- (2) Inkuber plader natten over ved 4°C.
- 15 (3) Bloker plader med 300 μl /brønd i 1,0% BSA-PBS plus additiver i 2 timer ved 37°C.
- (4) Udryst blokeringspuffer.
- (5) Tør plader ved 37°C i 1,5 time.
- (6) Tilsæt 200 μl /brønd 1% bovingammaglobulin - 5% BSA - 0,5% Tween-PBS, pH 7,2.
- 20 (7) Tilsæt 10 μl /brønd testsera, inkuber ved 37°C i 30 minutter.
- (8) Udryst testsera, vask plade 5 gange med PBS - 0,5% Tween.
- (9) Tilsæt 200 μl /brønd monoklonant anti-human IgG fortyndet 1:3500 med 50% kalvefosterserum - 1% hesteserum - 0,5% Tween-PBS.
- 25 (10) Inkuber 30 minutter ved 37°C.
- (11) Udryst testsera, vask plade 5 gange med PBS - 0,05% Tween.
- (12) Tilsæt 200 μl /brønd OPD substrat og inkuber ved stuetemperatur i 30 minutter.
- (13) Tilsæt 50 μl /brønd 4 N H₂SO₄ for at standse reaktion.
- 30 (14) Aflæs plade ved 490 nm i MR 600 Microplate Reader.

Reagenser:

- 5 (1) Phosphatforpufret saline (PBS), pH 7,3
8,0 g natriumchlorid
0,2 g kaliumphosphat, monobasisk
1,16 g natriumphosphat, dibasisk
0,2 g kaliumchlorid
0,2 thimerosal
10 vand til 800 ml og bland
juster pH om nødvendigt, tilsæt vand til 1 l
- 15 (2) Belægningspuffer, pH 9,6
0,01M carbonatpuffer.
- 20 (3) Blokeringspuffer (1% BSA-PBS plus additiver)
1% bovins serumalbumin (Signa nr. A7030)
10 K μ /ml aprotinin
10 μ g/ml trypsininhibitor
20 10 nM EACA (E-aminokaprønsyre)
0,5 mM PMSF (phenyl-methyl-sulfonylfleurid)
2,0 mM EDTA
10% glycerol
- 25 (4) Prøvefortyndingsmiddel

30 10,0 g bovingammeglobulin, fraktion II, lyofiliseret
50,0 g bovinalbumin, fraktion V
0,5 ml polysorbat 20 (Tween 20)
tilsæt vand til 1 l og bland

filtrer gennem 0,2 µm filter.

(5) Konjugatfortyndingsmiddel

490 ml PBS

5 500 ml varmeinaktiveret kvægfosterserum

10 ml varmeinaktiveret hesteserum

0,1 g thimerosal

0,329 g kaliumferricyanid

vand til 1 l, bland, filtrer gennem 0,2 µm filter.

10

Eksempel V

De i eksempel IV under procedure 1 beskrevne ELISA sæt, som var fremstillet med peptid (II), vurderedes over for et panel af sera omfattende sera fra normale individer, patienter med lidelser eller sygdomme uden relation til
15 AIDS, kendte AIDS patienter, kendte ARC patienter og patienter, hvis diagnose er ukendt, men som er antistofpositive ved kommercielle tests eller ved Western aftryksanalyse. Resultaterne summeres i tabel I - IV. I sammenligningsøjemed analyseredes samme seraprøver med kommercielt tilgængelige sæt og ved Western aftryksanalyse. De kommercielle sæt, som valgtes til disse undersøgelser, var fra Abbott Laboratories, North Chicago, Ill. og Electro-
20 Neucleonics, Inc. (ENI), Columbia, Md.

A. Tabel viser resultater med normale sera.

25

Tabel 1

Analyse af normale sera ved ELISA med peptid (II).

30

	<u>Antal prøver</u>	<u>E8 analyse</u>	<u>ENI analyse</u>	<u>Abbott analyse</u>	<u>Diagnose/prøve I.D.</u>
	198	-	5-,194NT	41-,156NT	Normal
5	1	-	-	+	Normal/749
	<u>1</u>	+	NT	NT	Normal/2846
	200				

Middelværdi af normalværdier = 0,016 for E8 analyse

10 Standardafvigelse (S.D.) fra middelværdi = 0,017

Grænseværdi ved middelværdi + S.D. = 0,104

Hyppeghed af falske positive i 200 prøver ved 0,104 grænseværdi = 0,5%
(1/200)

NT = ikke testet

15 Som det fremgår af ovenstående tabel reagerer de omhandlede sera, som ikke indeholder antistoffer mod HTLV-III, i almindelighed ikke på peptid (II) ved en standard ELISA. Dette muliggør beregning af en absorptionsgrænseværdi til skelning mellem antistofnegative og antistofpositive sera. Ved ovenstående analyse af 200 normale sera valgtes en grænseværdi på 0,104. Ved
20 denne grænse forventes hyppigheden af falske positive at være mindre end eller lig med 0,5%.

B. For at vise den bedre effektivitet til eliminering af falske positive ved anvendelse af peptidet med formel (II) fremfor de kommercielt tilgængelige sæt
25 med viruslysat testedes en række sera fra patienter med to lidelser uden relation til AIDS, nemlig Naso-Pharyngeal Carcinoma og Rheumatoid Arthritis ved den omhandlede analyse og kommercielle test. Resultaterne summeres i tabel II nedenfor og viser den øgede specificitet med den omhandlede analyse.
Mange prøver, som gav falske positive resultater med kommercielle tests, blev
30 korrekt identificeret som negative ved den omhandlede analyse.

Tabel IITest af patienter med Naso-Pharyngeal Carcinoma og Rheumatoid Arthri-5 tis

	<u>Antal</u>	<u>Omhandlet</u>	<u>ENI</u>	<u>Abbott</u>	<u>Diagnose/</u>
	<u>prøver</u>	<u>analyse</u>	<u>analyse</u>	<u>analyse</u>	<u>prøve I.D.</u>
10	6	(+)	NT	(+)	NPC/NON-AIDS
	17	-	NT	(+)	NPC/NON-AIDS
	8	-	NT	-	NPC/NON-AIDS
	1	-	NT	NT	NPC/NON-AIDS;920
	1	-	(+)	-	RA/NON-AIDS;305
15	7	-	2-,5NT	3-,4NT	RA/NON-AIDS
	1	-	-	(+)	RA/NON-AIDS;615

(+) = falske positive

NT = ikke testet

NPC = Naso-Pharyngeal Carcinoma; RA = Rheumatoid Arthritis

20

C. For at vise effektiviteten af den omhandlede analyse til påvisning af HTLV-III antistof i AIDS/ARC patientsera sammenlignet med kommercielle sæt, vurderedes det i eksempel IV under procedure 1 beskrevne ELISA sæt over for at panel af sera hidrørende fra diagnosticerede AIDS og ARC patienter. Re-

25 sultaterne summeres i tabel III og viser, at analysen er ækvivalent med kommercielle sæt, hvad dens evne til at identificere seraindeholdende antistof mod HTLV-III angår.

30

Tabel III

Analyse af AIDS/ARC sera:

5	Antal <u>prøver</u>	Omhandlet <u>analyse</u>	ENI	Abbott <u>analyse</u>	Diagnose/ <u>prøve I.D.</u>
	67	+		+	+ (16NT) AIDS
	2	(-)		(-)	AIDS/533,3621
10	1	(-)		+	AIDS/653
	2	+		+	AIDS/661,662
	21	+		+	ARC
	<u>2</u>	(-)		(-)	ARC/512,529
	95				

15

(-) = falske negative

ARC = Aidsrelateret kompleks

D. Den høje hyppighed af falske positive, som er karakteristisk for de i øjeblikket tilgængelige sæt med viruslysatsat, skyldes til dels tilstedeværelsen af cellulære antigener i lysatet, som reagerer med antistoffer, som forefindes både i AIDS og ikke-AIDS patientsera. Desuden indeholder komplekse antigener såsom antigener hidrørende fra et virus såsom HTLV-III mange epitoper og er mere tilbøjelige til at reagere ikke-specifikt med antistoffer, som forefindes i humane sera. Det omhandlede peptid (II) reducerer kompleksiteten af det til reaktion med patientsera anvendte antigen ned til en eller måske kun nogle få epitoper. Risikoen for ikke-specifik interaktion med ikke-HTLV-III antistoffer forventes at være stærkt reduceret. Ikke-specifikke interaktioner kan imidlertid fortsat forekomme, da nogle antistoffer er "klæbrige" og kan binde til den ved analysen anvendte plastbærer eller til andre proteiner såsom bovins serumalbumin.

min eller gedesera anvendt til blokering af pladen efter tilsætning af peptidet. I tabel IV nedenfor vises data vedrørende analysen af forskellige patientsera. Udover den sædvanlige analyse med peptid (II) som beskrevet i eksempel IV under procedure 1 analyseredes hvert serum over for peptid (II) efter blanding af serumprøverne med en effektiv blokerende mængde af peptidet (II). Tabel-
 5 af serumprøverne med en effektiv blokerende mængde af peptidet (II). Tabellen indeholder også resultater af analyse af hver af prøverne med i handelen tilgængelige sæt.

Tabel IV

Konkurrenceanalyse til bekræftelse af positiv/negativ ELISA:

10

Prøve I.D.	ELISA værdi		Abbott analyse	ENI analyse	Western analyse	Diag.
	og bedømmelse med peptid					
	ikke blokeret	blokeret (bedømmelse)				
15 615	0,031	0,033(-)	-	-	-	RA
3195	0,026	0,045(-)	-	+	-	DP
3196	0,028	0,039(-)	-	+	-	DP
3197	0,065	0,073(-)	-	+	-	DP
20 3376	0,104	0,105(-)	-	+	-	UNK
3362	0,740	0,727(-)	-	+	-	UNK
912	0,055	0,065(-)	+	NT	-	NPC
918	0,100	0,092(-)	+	NT	-	NPC
922	0,127	0,103(-)	+	NT	NT	NPC
25 923	0,114	0,080(-)	+	NT	NT	NPC
3644	0,336	0,380(-)	+	+	-	UNK
3406	1,400	1,390(-)	+	+	-	DP
3461	1,426	1,137(-)	+	+	-	DP

	3532	1,770	0,080(+)	+	+	+	UNK
	3469	0,300	0,030(+)	+	+	+	UNK
	3431	0,507	0,087(+)	NT	+	+	UNK
	644	0,160	0,024(+)	NT	+	+	AIDS
5	659	0,510	0,042(+)	+	+	+	AIDS
	661	0,500	0,031(+)	-**	+	+	AIDS
	662	0,160	0,030(+)	-**	+	+	AIDS

* = Falsk positiv

DP = Dialyse patient, ikke-Aids

10 ** = Falsk negativ

NPC = Naso-Pharyngeal Carcinoma,

UNK = Ukendt

ikke-Aids

RA = Rheumatoid Arthritis, ikke-Aids

Af disse resultater fremgår det klart, at ikke-AIDS seraprøver, som ukorrekt, identificeres som positive med et af de kommercielt tilgængelige sæt eller begge korrekt identificeres som negative med peptidkonkurrenceanalysen. Endvidere bliver selv prøver, der korrekt identificeres som positive ved analysen, korrekt identificeret som negative ved peptidkonkurrenceanalysen. Det er endvidere bemærkelsesværdigt, at blokerings- eller konkurrenceanalysen også tjener som bekræftende analyse ved tests af serumprøver, som ikke indeholder antistoffer mod HTLV-III. De sidste syv testede prøver, der vises i tabel IV, er positive for antistof både ved den omhandlede test og kommercielt tilgængelige analyser (med undtagelse af to falske negative ved anvendelse af Abbott sættet) og ved Western aftryksanalyse. Reaktiviteten af disse sera med peptid (II) blokeres effektivt ved blanding af seraene med peptid (II), hvilket indikerer, at reaktiviteten af antistof til peptidet er peptidspecifik, og at disse sidste syv prøver er sande positive.

Eksempel VI

30 ELISA sæt som beskrevet i eksempel IV, procedure 1, fremstilledes med peptidformel (I) til (XV) samt formel (C-1) til (C-VIII). ELISA sættene vurderedes hver især over for at serapanel på ti prøver omfattende klinisk positive prøver, det vil sige prøver, som var symptomatiske for HTLV-III infektionen ved be-

stemmelse ved kommercielle analyser og Wester aftryksanalyse. Resultaterne af disse tests vises i tabel V nedenfor.

En peptidanalyse anses for positiv, hvis absorptionsniveauet ved ELISA testen er mere end dobbelt så stort som baggrunds niveauet bestemt ved udregning af gennemsnit af absorptionen for to normale sera. Den rapporterede
 5 middelværdi repræsenterer middelværdien af den optiske densitet ved ELISA'en beregnet efter, at baggrunds niveauet var subtraheret. Det rapporterede indeks er en vægtet aktivitet af et givet peptid i forhold til aktiviteten af peptidet med formel (II). Indekset vægtes til gunst for en given peptidanalyser evne til
 10 korrekt at rapportere en positiv værdi skelnet fra niveauet af den normale baggrundsreaktion. Formlen til beregning af indekset er som følger:

$$\frac{(\% \text{ positive})_3 \times \text{middelværdi}}{(\% \text{ positive})_{II} \times \text{middelværdi}_{II}} = \text{indeks}$$

15

hvor % positive er % positive for den pågældende peptidanalyse,

middelværdi er middelværdien for den pågældende peptidanalyse,

20

% positiv_{II} er % positive for peptidanalyse med formel (II), og

% middelværdi_{II} er middelværdi for peptidanalysen med formel (II).

25

Tabel V

<u>Peptid- formel</u>	<u>Sekvens</u>	<u>%Positive</u>	<u>Middel- værdi</u>	<u>Indeks</u>
(II)	IWGCSGKLICTTAVP	80	1,67+0,82	1,00
(C-V) QLTWVGIKQLQARIL		0	- -	0
(C-VI) GIKQLQARILAVERY		20	0,45+0,06	0,01
(C-I) QLQARILAVERY		0	- -	0
(C-IX) QARILAVERYLKDOQ		0	- -	0
(XV) RILAVERYLKDOQLLGIWGCS		90	2,01+1,40	1,56
(C-II) AVERYLKDOQLLG		10	0,04 -	<0,01
(C-VII) AVERYLKDOQLLGIW		60	1,18+0,68	0,35
(IV) AVERYLKDOQLLGIWGCSGKLI		100	2,23+0,68	2,26
(XII) AVERYLKDOQLLGIWGCSGKLI		100	1,95+0,27	2,11
(C-III) LKDQQLLGIWGCS		30	0,28+0,06	0,02
(XIV) LKDQQLLGIWGCSGK		90	1,69+0,65	1,43
(VI) LKDQQLLGIWGCSGKLI		100	1,19+0,85	1,65
(VII) LLGIWGCSGKLI		50	0,22+0,05	0,09
(XI) LLGIWGCSGKLICTT		80	1,53+0,77	0,96
(C-IV) IWGCSGKLI		20	0,17+0,00	0,01
(I) CSGKLI		60	0,34+0,11	0,19
(VIII) QQLLGIWGCSGKLICTTAVPWNAS		90	0,51+0,25	0,79
(IX) IWGCSGKLICTTAVPWN		70	0,86+0,45	0,48
(III) IWGCSGKLICTTAVPWNAS		100	2,20+0,86	2,24
(XIII) GCSGKLICTTAVPWN		100	2,14+0,58	2,21
(X) CSGKLICTTAVPWNAS		100	1,74+1,01	1,99
(XI) SGKLICTTAVPWNAS		50	0,86+0,63	0,17
(C-VIII) LICTTAVPWNASWSN		0	- -	0
(V) AVERYLKDOQLLGIWGCSGKLICTTAVPWNAS		100	1,53+0,66	1,89
(III) & (IV) AVERYLKDOQLLGIWGCSGKLI + IWGCSGKLICTTAVPWNAS		100	>3,0 -	2,62

Som det fremgår af ovenstående tabel, giver analyser foretaget med peptider med formlerne (I) til (XV) alle positive resultater på mindst 50% eller mere og manifesterer i hvert enkelt tilfælde et indeks på mindst 0,1. På den anden side giver hvert af sammenligningssegmenterne, til trods for at de repræsenterer nært tilgrænsende eller overlappende eller delvis overlappende segmenter fra HTLV-III svøbet, ikke sådanne positive resultater eller så høje indeks.

Eksempel VII

Yderligere AIDS/ARC patient sera testedes med ELISA analyser under anvendelse af to stærkt reaktive peptider med formel (III) og (IV) (eksempel IV-procedure 1). Reaktiviteten af nogle af disse sera udtrykt som absorptionsværdier vises i tabel VI.

Tabel VI

	<u>Serumprøve</u>	<u>Peptidformel</u>	
		<u>(III)</u>	<u>(II)</u>
5			
	3362	0,503	0,151
	3412	>2,00	0,540
	A. 3693	0,559	0,120
	3722	0,620	0,193
10	0649	1,756	0,379
<hr/>			
	3544	0,428	>2,00
	3575	0,350	1,773
15	3744	0,311	1,326
	B. 3790	0,224	1,765
	0509	0,403	2,000
	0653	0,111	0,999
	0662	0,301	1,392
20	<hr/>		
	3416	1,914	>2,00
	3456	1,670	1,780
	C. 3666	>2,00	>2,00
25	3414	1,453	1,057
	3411	>2,00	>2,00
	3413	>2,00	>2,00
<hr/>			

30 De fleste sera, som testedes, reagerede særdeles godt med begge peptider, meget som det ses med prøver i tabel VI, gruppe C. Lejlighedsvis var nogle prøver imidlertid langt mere reaktive med det ene peptid end med det andet, således som det fremgår af tabel VI, gruppe A og B. Disse data indike-

rer, at der kan være mere end en epitop (for eksempel en lineær eller en konformationsmæssige epitop) i dette område på toogtredive aminosyrer, som almindeligvis findes hos patienter, der har været udsat for AIDS virus. HPLC analyse af peptider med formel (III) og (IV) i opløsning indikerer, at peptider med formel (III) i stor udstrækning forefindes som cykliske monomerer, mens peptider med formel (IV) for det meste er på dimer form. De strukturelle karakteristika, som disse to peptider giver ved disulfidbinding, kan både have relation til antigenpræsentation og skabelsen af en konformationsmæssig epitop.

10 Eksempel VIII

Yderligere bevis på at der forekommer mere end en epitop i peptider med formel (III) og (IV) kan udledes af konkurrenceundersøgelser, og resultaterne er et eksempel herpå vises i tabel VIIA. Ved denne undersøgelse påførtes peptider med formel (III) og (IV) begge en mikrotiterplade som immobiliseret antigen, og en ELISA analyse udførtes under fem forskellige betingelser: uden konkurrence eller konkurrence med overskud af peptid med formel (III), formel (IV), begge peptider eller et heterologt peptid. Konkurrencen udførtes ved tilsætning af det eller de passende peptider til det fortyndede serum umiddelbart før tilsætning af serumprøven til mikrotiterbrønden.

20

Tabel VIIA

Prøve	Ublokeret	<u>Formelkonkurrerende peptid</u>				
		<u>(III)</u>	<u>(IV)</u>	<u>(III)/(IV)</u>	<u>Heterologt</u>	
25	3412	1,450	0,113	1,182	0,059	1,348
	3413	>2,00	0,381	2,032	0,068	2,026
	3416	>2,00	1,811	1,055	0,197	2,041
	3544	1,810	0,876	0,137	0,048	1,750
30	3575	1,267	0,982	0,105	0,036	1,304
	3693	0,340	0,103	0,217	0,065	0,293
	3790	1,558	1,320	0,635	0,134	1,349

Under disse betingelser er det meget klart, at nogle prøver reagerer særdeles godt med hvert af de omhandlede peptider eller begge. For eksempel reagerer prøve 3416 godt med begge peptider, da konkurrence med peptidet med formel (III) giver en optisk densitet (OD) på $>1,8$, konkurrence med peptidet med formel (IV) giver en OD på $1,055$, og i nærvær af begge konkurrerende peptider går OD i det væsentlige ned til baggrundsniveauet. Andre serumprøver såsom 3412 reagerer meget stærkere med det ene peptid end med det andet. I dette tilfælde reduceres OD fra $>1,4$ til $0,113$ ved blokering med peptid med formel (III) og forbliver >1 ved konkurrence med peptid med formel (IV).

10 Det er imidlertid klart, at der er en vis reaktivitet med peptidet med formel (III), da immunreaktivitet ophæves fuldstændigt ($0,059$) i nærvær af begge peptider.

En anden konkurrenceundersøgelse med peptidet med formel (I) på pladen viser, at peptidet med formel (IV) ikke konkurrerer effektivt med peptidet med formel (I), selv om peptidet med formel (III) konkurrerer meget effektivt. Se tabel VIIB nedenfor.

Tabel VIIB

Prøve	Ublokeret	<u>Formelkonkurrerende peptid</u>			
		<u>(III)</u>	<u>(IV)</u>	<u>(III)/(IV)</u>	<u>Heterologt</u>
013	1,77	0,038	0,046	0,770	0,865
014	0,383	0,050	0,067	0,273	0,324

25 Det fremgår således af disse analyser, at en epitop, som forefindes i peptidet med formel (III), også forefindes på peptidet med formel (I), og at denne epitop afviger væsentligt fra dem, der forefindes i peptidet med formel (IV). Baseret på selv samme prøve reagerer praktisk taget alle sera yderligere med de

30 epitoper, der forefindes på peptiderne med formel (III) og (IV), selv om de i mange tilfælde reagerer stærkere med det ene peptid end med det andet.

Eksempel IX

Ved anvendelse af 1 µg kombination af formel (III) og 0,5 µg formel (IV) peptider som fastfaseantigenet ved en ELISA analyse (eksempel IV - procedure 2) var specificiteten og sensitiviteten af denne analyse lig med eller bedre end et hvilket som helst af de testede kommercielt tilgængelige viruslysantistofpåvisningssæt.

Tabel VIII viser ELISA resultater opnået ved anvendelse af patientsera, normale sera og sera fra forskellige sygdomsgrupper indbefattende rheumatoid arthritis, naso-pharyngeal carcinoma (NPC), Epstein-Barr virusinfektion, cytomegalovirusinfektion, gramnegativ sepsis, toxoplasma gondii, systemisk lupus erythematosus og herpes virusinfektioner.

Tabel VIII

Prøvegruppe	Antal sera	ENI+	(III)/	(III)/
			(IV)+	ENI- (IV)-
AIDS + ARC	458(243)*	449	450	9 8
Symptomatisk PLS	320(146)	239	242	81 78
Asymptomatisk/høj risiko for immunabnormiteter	135(87)	38	39	97 96
Asymptomatisk/høj risiko for immunnormal	134(69)	10	10	124 124
Normal/ikke-AIDS	728(728)	12	4	716 724
Forskellige sygdomsgrupper/ikke-AIDS	387(387)	10	7	377 380
Samlet antal ikke-AIDS	1115	22	11	1093 1104

* angiver antal patienter

- Når bona fide normale sera testedes for reaktivitet ved (III)/(IV) analysen og analysen markedsført af Electronucleonics, Incorporated (ENI), gav (III)/(IV) peptidanalysen signifikant lavere hyppighed af falske positive. Som tabel VIII
- 5 viser, var hyppigheden af falske positive for ENI 1,65% (12/728), mens hyppigheden af falske positive for (III)/(IV) peptidanalysen kun er 0,55% (4/728). Når hyppigheden af falske positive i gruppen af forskellige sygdomme undersøges, giver peptidanalysen en lidt lavere hyppighed af falske positive end ENI analysen, 1,81% kontra 2,58% (7/387 kontra 10/387).
- 10 Ovenstående eksempler er kun givet i illustrationsøjemed og ikke for at begrænse opfindelsens omfang, der kun defineres i de følgende krav.

PATENTKRAV

1. Syntetisk peptid med en af de følgende formler:

5

IWGCSGKLICTTAVP (II),
IWGCSGKLICTTAVPWNAS (III),
AVERYLKDQQLLGIWGCSGKLI (IV),
AVERYLKDQQLLGIWGCSGKLICTTAVPWNAS (V),
10 LKDQQLLGIWGCSGKLI (VI),

QQLLGIWGCSGKLICTTAVPWNAS (VIII),

15

CSGKLICTTAVPWNAS (X),
AVERYLKDQQLLGIWGCSGKLI (XII),
GCSGKLICTTAVPWN (XIII),

20

LKDQQLLGIWGCSGK (XIV),

2. Peptid ifølge krav 1 KENDETEGNET ved, AT det er på cyklisk monomer, dimer eller polymer form.

25

3. Blanding af mindst et første peptid og et andet peptid, hvor:

blandingen har forstærket genkendelse af antistoffer mod HTLV-III virus i forhold til hvert af peptiderne alene;

30

det første af peptiderne er et af de følgende peptider:

CSGKLIC (I)
IWGCSGKLICTTAVP (II),

- IWGCSGKLICTTAVPWNAS (III),
 AVERYLKDQQLLGIWGCSGKLICTTAVPWNAS (V),
 LKDQQLLGIWGCSGKLI (VI),
 LLGIWGCSGKLI (VII),
 5 QQLLGIWGCSGKLICTTAVPWNAS (VIII),
 IWGCSGKLICTTAVPWN (IX),
 CSGKLICTTAVPWNAS (X),
 AVERYLKDQQLLGIWGCSGKLI (XII),
 GCSGKLICTTAVPWN (XIII),
 10 det andet af peptiderne er et af de følgende:
 AVERYLKDQQLLGIWGCSGKLI (IV),
 AVERYLKDQQLLGIWGCSGKLICTTAVPWNAS (V),
 LKDQQLLGIWGCSGKLI (VI),
 QQLLGIWGCSGKLICTTAVPWNAS (VIII)
 15 AVERYLKDQQLLGIWGCSGKLI(XII),
 LKDQQLLGIWGCSGK (XIV)
 RILAVERYLKDQQLLGIWGCS (XV)

eller et hvilket som helst af disse peptider, hvori aminosyren I i undersekvensen
 20 LLGIW er erstattet med aminosyren L, M eller F, forudsat det første og andet
 peptid er forskelligt.

4. Blanding ifølge krav 3, hvor det første peptid er et af peptiderne III,
 X og XIII som defineret i krav 3; og
 25 det andet peptid er enten peptid IV eller peptid XII som defineret i krav 3,
 eller begge disse peptider i hvilke aminosyren I i undersekvensen LLGIW er
 erstattet med aminosyren L, M eller F.

5. Blanding ifølge krav 4, hvor det første peptid er peptid III og det an-
 30 det peptid er peptid IV eller peptid IV i hvilket aminosyren I i undersekvensen
 LLGIW er erstattet med med en L, M eller F aminosyre.

6. Blanding ifølge krav 4, hvor det første peptid er peptid XIII og det andet peptid er peptid IV eller peptid IV i hvilket aminosyren I i undersekvensen LLGIW er erstattet med med en L, M eller F aminosyre.

5 7. Blanding ifølge krav 5 eller 6, hvor det andet peptid er peptid IV.

8. Fremgangsmåde til påvisning eller bestemmelse af antistoffer mod HTLV-III i et fluidum, som mistænkes for at indeholde antistoffet KENDETEGNET ved, AT man

10

a) tilvejebringer et peptid ifølge krav 1 eller krav 2 knyttet til en fast overflade,

b) bringer den peptidbelagte faste overflade i kontakt med fluidet, som
15 skal testes i tilstrækkelig tid til at tillade en immunologisk reaktion at finde sted, og

c) påviser eller bestemmer tilstedeværelsen eller mængden af antistoffer bundet til peptidet eller det antigeniske fragment på overfladen af det
20 faste stof.

9. Fremgangsmåde ifølge krav 8 KENDETEGNET ved, AT påvisnings- eller bestemmelsestrinnet omfatter, at man bringer overfladen i kontakt med mærket anti-humant immunoglobulin.

25

10. Fremgangsmåde til fremstilling af antistoffer mod HTLV-III virus omfattende at man immuniserer et dyr med en immunogent virksom mængde af et peptid ifølge krav 1 eller krav 2, i polymeriseret form og/eller knyttet til en passende immunogen bærer og overlader dyret.

30

11. Diagnostisk sæt til påvisning eller bestemmelse af antistoffer mod HTLV-III KENDETEGNET ved, AT det omfatter: (a) en fast overflade, hvortil

der er bundet et peptid ifølge krav 1 eller krav 2; og (b) mærkede anti-humane immunoglobuliner.

12. Sandwichmetode til påvisning eller bestemmelse af HTLV-III virus
5 eller virusspecifikt antigen i et fluidum, som mistænkes for at indeholde viruset eller antigenet KENDETEGNET ved, AT man

a) tilvejebringer antistof mod et peptid ifølge krav 1 eller krav 2 knyttet
10 til en fast overflade,

b) bringer den antistofbelagte faste overflade i kontakt med fluidet,
som skal testes, i tilstrækkelig tid til at tillade en immunologisk reaktion at finde
sted, og

15 c) påviser eller bestemmer tilstedeværelsen eller mængden af HTLV-III virus eller virusspecifikt antigen knyttet til antistofferne på den faste overflade.

13. Konkurrencemetode til påvisning eller bestemmelse af HTLV-III vi-
20 rus eller virusspecifikt antigen i et fluidum, der mistænkes for at indeholde viruset eller antigen KENDETEGNET ved, AT man

a) tilvejebringer et antistof mod et peptid ifølge krav 1 eller krav 2, hvilket antistof er knyttet til en fast overflade,
25

b) blander en portion af fluidet, som skal testes, med en kendt mængde mærket omhandlet peptid til frembringelse af en blandet prøve,

c) bringer den antistofbelagte faste overflade i kontakt med den blandede prøve i tilstrækkelig tid til at tillade en immunologisk reaktion at finde sted,
30

d) adskiller den faste overflade fra den blandede prøve,

e) påviser eller bestemmer tilstedeværelsen eller mængden af mærket peptid, som enten er bundet til den faste overflade eller er tilbage i den blandede prøve, og

5 f) ud fra resultatet af trin e) bestemmer tilstedeværelsen eller mængden af viruset eller antigenet i fluidet.

14. Diagnostisk sæt til påvisning eller bestemmelse af HTLV-III virus eller virusspecifikt antigen KENDETEGNET ved, AT det omfatter:

10

a) en fast overflade, hvortil der er bundet antistof mod et peptid ifølge krav 1 eller krav 2, og

b) en kendt mængde mærket antistof mod HTLV-III, mod et virusspecifikt antigen eller mod et peptid ifølge krav 1 eller krav 2.

15. Fremgangsmåde til bestemmelse af nøjagtigheden af et positivt resultat ved en test for HTLV-III antistoffer på en fluidumprøve, der mistænkes for at indeholde antistofferne, hvilken test er en sandwich-analyse ved hvilken et syntetisk HTLV-III peptid ifølge krav 1 eller krav 2 knyttes til den faste overflade KENDETEGNET ved, AT man

20

a) blander en portion af prøven med en virksom blokerende mængde af det syntetiske HTLV-III peptid til frembringelse af en blandet prøve,

25

b) bringer den blandede prøve i kontakt med testens faste fase i tilstrækkelig tid til at tillade en immunologisk reaktion at finde sted,

c) bestemmer om binding af antistofferne i den blandede prøve til den faste fase er inhiberet i forhold til bindingen i fravær af peptidet, og

30

d) på basis af tilstedeværelsen eller fraværet af inhibering bestemmer nøjagtigheden af det positive resultat.

16. Diagnostisk sæt til bestemmelse eller påvisning af antistof mod HTLV-III og bekræftelse af det positive resultat KENDETEGNET ved, AT det omfatter:

5

a) en fast overflade, hvortil der er bundet et peptid ifølge krav 1 eller krav 2,

10

b) en virksom blokerende mængde af peptidet, og

c) mærket anti-humant immunoglobulin.

17. Fremgangsmåde til fremstilling af monoklonale antistoffer mod HTLV-III KENDETEGNET ved, AT man a) immuniserer et værtsdyr med et
15 peptid ifølge krav 1 eller krav 2 i polymeriseret form eller knyttet til en passende immunogen bærer, b) isolerer splenocytter fra den immuniserede vært, c) fusionerer splenocytterne med en passende myelomacellelinie, d) udvælger de fusionerede celler ved reaktivitet med det immuniserende peptid, med HTLV-III eller med HTLV-III inficerede celler, e) enten dyrker den udvalgte hybridoma in
20 vitro eller injicerer den i en passende vært, og f) udvinder det ønskede monoklonale antistof fra supernatanten over den dyrkede hybridoma eller fra den injicerede værts serum eller ascites.

25

30