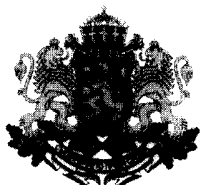


РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ



(19) BG

ЗАЯВКА ЗА ПАТЕНТ

ЗА

ИЗОБРЕТЕНИЕ

(11) 98332A

(51) C07K 14/18

C07K 16/08

A61K 39/29

G01N 33/569

C07K 7/06

C07K 7/08

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(21) Заявителски № 98332				(71) Заявител(и):	
(22) Заявено на 23.12.1993				NOVARTIS VACCINES & DIAGNOSTICS,	
(24) Начало на действие				INC. , , 94608 EMERYVILLE , 4560 HORTON	
на патента от:				STREET CALIFORNIA (US) ;	
Приоритетни данни				(72) Изобретател(и):	
				CHIEN , David Y . , CA 94507 Alamo	
(31) 722489	(32) 24.06.1991	(33)	US	CALIFORNIA (US) ; RUTTER , WILLIAM . ,	
				SAN FRANCISCO,CA (US) ;	
(41) Публикувана заявка в				(74) Представител по индустриална	
бюлетин № 2 28.02.1995				собственост:	
(45) Отпечатано на				Фани Владимирова Божинова , 1000	
(46) Публикувано в бюлетин №				София , п.к.728	
на				(86) № на PCT заявка:	
(56) Информационни източници:				PCT/ US92/0 / 5388 , 24.06.1992	
				(87) № и дата на PCT публикация:	
(62) Разделена заявка от рег. №				93/003 / 65 , 07.01.1993	

(54) ПОЛИПЕПТИДИ НА ВИРУСА НА ХЕПАТИТ С (HCV)

(57) Разкрити са епитопи на вируса на хепатит с /hcv/, приложими като имуногенни реагенти и съответните антитела, както и метод за тяхното използване.

10 претенции, 0

BG 98332A

рек. № 98332

ПОЛИПЕПТИДИ НА ВИРУСА НА ХЕПАТИТ С / HCV /

ОБЛАСТ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО

Изобретението се отнася до материали и методи за регулиране разпространението на хепатит С вирусната инфекция /HCV/. По-специално, то се отнася до полипептиди, приложими като имунологични реагенти при откриването, предотвратяването и лечението на HCV инфекции.

НИВО НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО

HCV най-напред е идентифициран и охарактеризиран като причинителя на нито-А, нито-В хепатит от Нейлтън ет ал. Това довежда до откриването на много общи и специфични полипептиди, приложими като имунологични реагенти. Вж напр. Нейлтън ет ал., ЕРО публикация № 318216 : Нейлтън ет ал., ЕРО публикация № 388232, Слюе ет ал., Science /1989/ 244 : 359-362 : Кю ет ал., Science /1989/ 244 : 362-364 : Нейлтън ет ал., Hepatology /1991/ 14:381-388.

Тези публикации осигуряват екстензивно ниво на уменията в областта на HCV, а така също и получаването и приложението на HCV полипептидни имунологични реагенти.

Други прилагат наготово и доразширяват работата на Ноиоптон et al., виж също и Ноиоп/леф et al., ИК Пат. описание 2239245 / The Wellcome Foundation Ltd. / , Уолъ, ЕРО публ. № 442,394 / United Biomedical Inc. / , Џеню et al., ЕРО публ. № 445423 / Авотт Лавог. / , Навит et al., ЕРО публикация № 451891 / Ак о II.V. / , Реу-е et al., РСТ публ. № WO 91/155516 / Сепелав Инс. / , Мак1 et al ЕРО публ. № 468 657 / Топеп Согр. / , и Камада et al., ЕРО публ. № 469348 / Сиппоо1 Сейуаки К.К. / .

Чувствителни, специфични методи за скрининг и идентификация на носители на HCV и HCV-контаминирана кръв или кръвни продукти са важно постижение на медицината. Пост-трансфузионен хепатит / РТН / се появява у приблизително 10% от пациентите, на които е преливано кръв, като HCV се установява в близо 90% от тези случаи. Най-големият проблем в това заболяване е честотата на прогресиране до хронично чернодробно увреждане /25-55% /. Гримата за пациентите, като напр. предотвратяване на кръвопреливанетона замърсена с HCV кръв и кръвни продукти или тесен контакт на персонала изисква надеждни диагностични и прогностични средства, като HCV полипептиди, за откриване на антитела, свързани с HCV. Такива полипептиди са приложими също и като ваксини и имунотерапевтични агенти за предотвратяване и/или лечение на заболяването.

Доколкото HCV е сравнително нов агент, съществува продължителна нужда от определяне на допълнителни имунологични реагенти, които биха позволили по-нататъшно изследване на кленечният курс на заболяването и епидемиологията на HCV в популацията.

ОПИСАНИЕ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО

Изобретението се отнася до характеризирането на нови HCV епитопи. Охарактеризирането на тези епитопи позволява получаване на полипептидни продукти, които реагират имунологично с антитела срещу HCV и/или продуцират анти-HCV антитела in vivo. Тези полипептидни продукти са приложими като стандарти или реагенти в диагностични тестове и/или като компоненти на ваксини. Антитела, включително както моноклонални, така и поликлонални, насочени срещу HCV епитопи, съдържащи се вътре в а полипептидните последователности, са също приложими, например, в диагностични тестове, като терапевтични агенти, за скрининг на антивирусни агенти, и за изолването на изолирани/премистени HCV полипептиди или частици.

В неговия най-широк смисъл, настоящето изобретение е насочено към полипептиди, съдържащи новоохарактеризирани HCV епитопи, разкрити тук, методи за получаване на такива полипептиди /вкл. рекомбинантни и синтетични методи /методи за използване на такива полипептиди / като диагностични, ваксинални и терапевтични / и вещества на производство, състави или форми, адаптирани за такова използване / като полипептиди, закрепени към имунопроба или друга твърда повърхност, орален или инжекционен фармакологичен състав /. Аналогично, антитела / поликлонални, моноклонални, или еквиваленти като свързващи фрагменти, едно-веригни антиген-свързващи протеини и др. / срещу HCV епитопите разкрити тук, са също включени в обхвата на настоящето изобретение, а така също и методи за получаване на такива антитела, методи за използване на такива антитела /в диагностиката, ваксините и терапията / и обекти на производство, състав или фармацевтична форма, адаптирани към такова приложение / като антитела, фиксирани към имунопроба или друга повърхност, орален или инжекционен фармацевтичен състав /.

Други аспекти на изобретението се отнасят до китове за анализ на проби с оглед присъствието на HCV антиген, включващи горните антитела в подходящо съдържание. Други аспекти на изобретението се отнасят до китове за анализ на проби за присъствие на антитела, насочени срещу HCV антиген, включващи полипептиди както са описани по-горе в подходящо съдържание.

Освен тези, посочени по-горе, други аспекти на настоящето изобретение са : метод за получаване на полипептид, съдържащ новооткритите HCV епитопа, включващ инкубиране на гостоприемникови клетки, трансформирани с експресионен вектор, съдържащ последователност, кодираща полипептид, който притежава HCV епитопа при условия, позволяващи експресията на полипептида ; и полипептид, съдържащ такъв HCV епитоп, получен по посоченият метод.

Имунологичните изследвания са също включени в изобретението. Те предвиждат имунологично изследване за откриване на HCV антиген, включващо инкубиране на проба, за която се предполага че съдържа HCV антиген с анти тяло, както е описано по-горе при условия, позволяващи формирането на антиген-анти тяло комплекс ; и откриване на антиген-анти тяло комплекса, съдържащ анти тялото. Изследване за установяване на анти-HCV антитела включва инкубиране на проба, която вероятно съдържа анти-HCV антитела с полипептид, както е описано по-горе, при условия, позволяващи формирането на анти тяло-антиген комплекс ; и откриване на анти тяло-антиген комплекса, съдържащ полипептида.

Съгласно изобретението са предвидени и ваксини за лечение на HCV инфекция, които включват имуногенен пептид, съдържащ HCV епитопа, описан по-горе.

Още един аспект на изобретението е метод за получаване на

антитела срещу HCV, включващ въвеждане у даден индивид на изолиран полипептид, който е имуногенен и съдържа HCV епитоп, описан тук, в количество достатъчно, за да предизвика имунен отговор.

Изброените по-горе аспекти на изобретението са осъществени чрез откриването на HCV епитопи от формулата :

$$aa_x - aa_y$$

където aa означава аминокиселина

x и y са цяло число, така че $y-x \geq 6$

$aa_x - aa_y$ означава част от аминокиселинната последователност на Фигура 1.

и

x е избран от групата, състояща се от :

23-34, 36, 66-79, 81-94,
96-98, 101-103, 186-189, 191, 206, 223, 232, 256, 286, 297-299, 321, 347, 357,
413, 414, 432, 465-471, 480-484, 501, 502, 521, 540-549, 579, 594-599, 601-
613, 641, 662-665, 685, 705, 706, 729, 782-789, 801, 851-855, 893, 916, 928,
946, 952-954, 1026, 1072, 1109, 1112-1117, 1218, 1240, 1280-1285, 1322, 1338,
1371, 1384, 1410, 1411, 1454, 1492, 1493, 1532-1535, 1560, 1561, 1566-1568,
1571-1577, 1601-1607, 1615-1620, 1655, 1695, 1710-1712, 1728, 1729, 1758-
1762, 1781, 1808, 1821, 1851, 1880, 1908-1913, 1925, 1940-1948, 1951, 1966-
1969, 1999, 2001-2004, 2006-2014, 2024, 2048-2053, 2055-2057, 2071, 2088-
2093, 2108, 2122-2148, 2165, 2187, 2226-2232, 2244-2249, 2267, 2281-2286,
2288, 2289, 2325-2327, 2346, 2347, 2349, 2382, 2401, 2417-2422, 2439-2444,
2446-2456, 2469, 2471-2476, 2495, 2533, 2534, 2573-2578, 2602-2604, 2606-
2612, 2632-2638, 2660, 2676-2679, 2688-2693, 2707, 2721, 2757-2762, 2779,
2794, 2795, 2797-2799, 2801, 2802, 2817-2843, 2863-2867, 2878-2884, 2886-
2895.

Горните обекти се постигат също и с помощта на HCV епитопи от формулата :

aa - aa

където aa означава аминокиселинна

x и y са цяло число, различно от y - x - 6

aa - aa, означава част от аминокиселинната последователност съгласно Фигура 1;

и

x е избрано от група, състояща се от 35 /когато y е по-малко от 45/, 80 /когато y е по-малко от 90/, 95 /когато y е по-малко от 110 /, 99 / когато y е по-малко от 210/ 500 /когато y е по-малко от 550 /, 600 /когато y е по-малко от 625 / 1260 / когато y е по-малко от 1280 / , 1569 /когато y е по-малко от 1931/, 1570 /когато y е по-малко от 1590/, 1694 /когато y е по-малко от 1735/ , 1949 /когато y е по-малко от 2124 / , 1950 когато y е по-малко от 1985/ , 2000 /когато y е по-малко от 2050/, 2005 /когато y е по-малко от 2223 / , 2250 / когато y е по-малко от 2330 /, 2287 /когато y е по-малко от 2385/, 2290 /когато y е по-малко от 2310/ , 2345 /когато y е по-малко от 2375/, 2348 /когато y е по-малко от 2464/, 2445 / когато y е по-малко от 2475/, 2470 /когато y е по-малко от 2490 /, 2605 / когато y е по-малко от 2620/, 2780 /когато y е по-малко от 2830 / , 2796/когато y е по-малко от 2886 /или по-малко от 2800 /когато y е по-малко от 2850 / и 2885 /когато y е по-малко от 2905/.

Във всяка от формулите по-горе, x-y е по-малко или равно на 10, 20, 30, 40 или 50 в някои изпълнения на изобретението.

КРАТКО ОПИСАНИЕ НА ЧЕРТЕЖИТЕ

Фиг. 1 показва полипротеина на HCV прототипния изолат на HCV₁.

Фиг. 2 показва съставната ДНК последователност за HCV.

Фиг. 3 показва нуклеотидната съгласувана последователност на човешки изолат 23, вариантите последователности са показани и под секвенционната линия. Показани са също и аминокиселините, кодирани в съгласуваните последователности.

Фиг. 4 показва нуклеотидната съгласувана последователност на човешки изолат 27, вариантите последователности са показани под секвенционната линия. Показани са също и аминокиселините, кодирани в съгласуваната последователност.

Фиг. 5 показва подравнените последователности на човешки изолати 23 и 27 и на HCV₁. Хомоложните последователности са обозначени с +/. Нехомоложните последователности са с малки букви.

Фиг. 6 показва подравнените последователности на човешки изолати 23 и 27 и на HCV₁. Хомоложните последователности са с малки букви.

Фиг. 7 показва сравнение на подравнената съставна нуклеотидна последователност на изолатите Тпоп, ЕС₁, НСТ-18 и HCV₁.

Фиг. 8 показва сравнение на нуклеотидните последователности на ЕС₁₀ и състава на HCV₁ последователността; ЕС₁₀ последователността е на линията над пунктира, а HCV₁ последователността е на линията под пунктира.

Фиг. 9 показва сравнение на аминокиселините последователности 117-308 /съответстващи на HCV₁/, кодирани в "Ен/І" последователността на човешки изолати НСТ-18, ІН23, ІН27, Тпоп, ЕС₁

и HCV1.

НАЧИНИ ЗА ПРОВЕЖДАНЕ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО

Пълното цитиране на публикациите, отнасящи се до този раздел може да бъде намерено в "Ниво на изобретението" и в "Библиография".

I. ДЕКЛАРАЦИИ

"Хепатит С вирус" или "HCV" се отнася до известни вирусни видове, патогенни щамове от които причиняват HAIHIN, както и до атенирани щамове или дефективни интерфериращи частици, получени от тях. Основно следва да се видят публикациите, цитирани в раздел "Ниво на изобретението". HCV геном е обхванат от РНК. Известно е, че РНК съдържащите вируси притежават относително висока степен на спонтанна мутация, докато данни са стойности от 10^3 до 10^4 за импортиран нуклеотид / Gelo Kipe /. Поради това, доколкото хетерогенността и изменчивостта на генотипа се отнасява в РНК вирусите, налице са множество щамове/изолати, които могат да бъдат вирулентни или авирулентни, в рамките на HCV видовете. Размножаването, идентифицирането, окриването и изолирането на вирусните HCV щамове или изолати е добре документирано в литературата. Нещо повече, разкритото тук позволява получаване на диагностични и ваксини за вирусни щамове/изолати, а така също и състави и методи, които са приложими в серуминговите процедури за анти-вирусни агенти за фармакологични нужди, както и агенти, които инхибират репликацията на HCV.

В текете на изобретението е предоставена и информация за различни щамове/изолати на HCV, и по-специално за щам или изолат CDC/HCV1 /наричан още HCV1/. Информация за един щам или изолат, като частична геномна или аминокиселинна последователност, е достатъчна, за да позволи на специалиста в областта, използвайки

стандартни техники да изолира нови щамове/изолати и да установи дали такива нови щамове/изолати са HCV. Например, няколко различни щамове/изолата са описани по-долу. Тези щамове, които са получени от човешки серум, различен по отношение на принадлежност и географски произход, са изолирани с помощта на информация от геномната последователност на HCV₁.

Информацията, представена тук, е показателна за това, че HCV е вероятно далечен родственик на флавирусите. Семейството Флавириди съдържа много вируси, които са малки, капсулирани патогени за човека. Морфологията и състава на флавирусиите частици са известни и са дискутирани в Brinton /1986/. Най-общо, по отношение на морфологията, флавирусите съдържат централен нуклеокапсид, заобиколен с липидна двойна обвивка. Вирионите са сферични и имат диаметър около 40-50 nm. Техните ядра са около 25-30 nm в диаметър. По продължение на външната повърхност от вирусната обвивка има проекции, които са около 5-10 nm дълги с терминални изпъкналости около 2 nm в диаметър. Типични примери за семейството са Yellow fever virus, West Nile virus and Dengue fever virus. Те притежават позитивно-верижни РНК геноми / 11000 нуклеотида /, които са малко по-дълги от тези на HCV и кодират протеинов прекурсор около 3500 аминокиселини. Индивидуални вирусни протеини се разграждат с този прекурсорен полипептид.

Геномната структура и нуклеотидната последователност на HCV геномната РНК са резултат на дедукция. Геномът се явява едно-верижна РНК, съдържаща приблизително 10 000 нуклеотида. Геномът е позитивно-верижен и притежава непрекъсната, транслационна отворена четвърта рамка / ORF /, която кодира полипротеин от около 3 000 аминокиселини. В ORF, структурният протеин /и/ явно са кодирани в първата четвъртина на II-крайната област, с преобладаването на полипротеин, отговорен за не-структурните протеини.

Когато се прави сравнение с всички известни последователности, се наблюдават малки, но значими ко-линеарни хомоложности с не-структурните протеини от семейството на флавивирусите, а така също и на пестивирусите /които сега се счита, че също принадлежат към семейство Флавивириде/.

На базата на предполагаемите аминокиселини, кодирани в нуклеотидните последователности на HCV1 и други доказателства, вероятните протеинови области на кодиращият HCV полипротеин, както и приблизителните граници, са следните :

<u>Предполагаема област</u>	<u>Приблизителна граница</u>
C / нуклеокапсиден протеин /	1-191
E / вирусен капсуларен протеин /	192 - 383
E ₂ / II-1 /капсула /	384 - 800
II-2 /неизвестна функция /	800 - 1050
II-3 /протеаза /	1050 - 1650
II-4 /неизвестна функция /	1651 - 2100
II-5 /полимераза /	2100 - 3011 /край/

Тези области са, обаче предварителни, експериментални. Например, E₁-II-2 границата е приблизително в 750-810 областта, а II-3-II-4 границата е около 1640-1650. Налице е също показателство, че 191 aa версията на C е прекурсор, който е получен по-нататък / към приблизително 170 aa в дължина /, а II-2, II-4 и II-5 протеините са получени всеки с два по-нататъшни зрели протеина.

Очаква се различните щамове, изолати или субтипове да съдържат вариации на аминокиселини и нуклеинови киселини, в сравнение с HCV₁. За много изолати се очаква да покажат по-голяма хомология / т.е. повече от около 40% / в общата аминокиселинна последователност, сравнена с HCV₁. Обаче, може да бъде намерено, че има други по-малко хомоложни изолати. Те биха могли да бъдат определени като HCV съгласно различни критерии, като например, една ORF с приблизително 9 000 нуклеотида до приблизително 12 000 нуклеотида, кодираща полипротеин, сходен по размер на този на HCV₁, колиран полипротеин със сходна хидрофобна и/или антигенна характеристика на HCV₁ и присъствието на ко-линеарни пептидни последователности, които са съхранени с HCV₁. В допълнение, генома би бил позитивно-верижна РНК.

HCV кодира поне един епитоп, който е имунологично идентифицируем с един епитоп в HCV₁ полипротеина. Епитопа е уникален за HCV когато се сравнява с известните от по-рано Флавивируси. Уникалността на епитопа може да бъде детерминирана чрез неговата имунологична реактивност с анти-HCV антитела и отсъствие на имунологична реактивност с антитела срещу известни видове от Флавивируса. Методи за определяне на имунологичната реактивност са известни в областта, например, като радиоимунологично изпитване, изпитване по ELISA, хемаглутинация и различни примери на подходящи изследвания, осигурени чрез изобретението.

Обратно, сравняването на последователността на HCV епитопа с познати от по-рано последователности на членове от семейството Флавивириде може да бъде използвано за оценка на "уникалността".

В допълнение към посоченото по-горе, следващите параметри на нуклеиново киселинната хомоложност и аминокиселинната хомоложност са приложими както самостоятелно, така и в комбинация, да идентифициране на щам/изолата като HCV. Доколкото щамове HCV и изолатите

са еволюционно свързани, очаква се, че хомологията по целия геном на нуклеотидно ниво може да е около 10% или повече, като вероятно е около 40% или повече, дори вероятно 60% или повече и най-вероятно - около 80% или повече, и в допълнение, ще има кореспондирещи непрекъснати последователности по продължение на поне около 13 нуклеотида. Следва да се отбележи, че са налице и варианти и хипер-варианти области в рамките на HCV генома; поради това хомологията в тези области се очаква да бъде значимо по-малко от тази по продължение на целия геном. Съответствието между предполагаемата геномна последователност на HCV щам и, например, СДС/HCV с ДНК последователността, може да бъде определена като се използват известни техники. Например, те могат да бъдат определени чрез директно сравняване на секвенционната информация за полинуклеотида от предполагаемия HCV и HCV с ДНК последователностите, описани тук. Например, още, те могат да бъдат определени чрез хибридация на полинуклеотидите при условия, които формират стабилни дуплекси между хомоложните области /като напр. онези, които биха били използвани преди разграждането/, последвано от разграждане с едноверижна специфична нуклеаза/и/, след което се определя размера на разградените лъквити фрагменти.

Поради еволюционните взаимоотношения на щамове или изолатите на HCV, предполагаемите HCV щамове или изолати могат да бъдат идентифицирани на базата на тяхната хомоложност на полипептидно ниво. Най-общо, HCV щамове или изолатите се очаква да бъдат поне 10% хомоложни, повече от 40% хомоложни, вероятно повече от около 70% хомоложни и дори по-вероятно повече от 80% хомоложни, като някои дори може да са повече от 90% хомоложни на полипептидно ниво. Техниките за определяне аминокиселинната секвенционна хомоложност са известни в областта. Например, аминокиселинната последователност може да бъде определена директно и сравнена с последователностите,

предоставени в описанието на настоящето изобретение. Обратно, нуклеотидната последователност на геномния материал от предполагаемия HCV може да бъде определен /обикновено чрез посредничеството на с ДНК/, аминокиселинната последователност, която е кодирана може да бъде определена и съответстващите области -сравнени.

Както се употребява тук, полинуклеотид "получен от " определена последователност, се отнася до полинуклеотидна последователност, която е обхваната от последователност с приблизително поне около 6 нуклеотида, за предпочитане около 8 нуклеотида, още по-добре от поне 10-12 нуклеотида и дори най-добре от поне около 15-20 нуклеотида, съответстващи на областта от определената нуклеотидна последователност. "Съответстващи" означава хомоложност с или комплементарност спрямо определена последователност. За предпочитане, последователностите от областта, от която е получен полинуклеотид, да са хомоложни или комплементарни на последователността, която е уникална на HCV генома. Дали е или не е уникална за HCV генома, може да се определи посредством известни в областта техники. Например, последователността може да бъде сравнена с тази от базата данни /както за приоритетна дата /, напр. Сепевани, за да се определи дали тя присъства в неинфектиран гостоприемник или в други организми. Последователността освен това може да бъде сравнена с известни / до приоритетната дата / последователности от други вируси и агенти, включително онези, които индуцират хепатит, напр. HAV, HBV и HDV и с членовете от семейство Флавиивириде. Съответствието или несъответствието на получената последователност спрямо други такива може също да бъде определено чрез хибридиране при подходящи условия. Хибридизационните техники за определяне на комплементарността на нуклеиново киселинните последователности са известни за специалистите в областта. Вж. напр. Maniatis et al. /1982/.

В допълнение, несъпадаемията на дуплексните полинуклеотиди, формиращи чрез хибридизация може да бъде определено по познати техники, включително например, разграждане с нуклеази като 1, които специфично разгражда едноверижните области в дуплексните полинуклеотиди. Области, от които могат да бъдат "получени" типични ДНК последователности включват, но не са ограничени до, напр. областите, кодиращи специфични епитопи, като не-транскрибирани и/или не-транслирани области.

Полученият полинуклеотид е незадължително получен по физичен начин от нуклеотидна последователност, която е позната, но може да бъде продуциран по различен начин, например - химичен синтез или ДНК репликация или обратна транскрипция или транскрипция. В допълнение, комбинации от области съответстващи на определените последователности могат да бъдат модифицирани по начини, които са познати в обхвата с оглед предполагаемото приложение.

Аналогично, полипептид или аминокиселинна последователност, получена от "определена аминокиселина или нуклеинова киселина" се отнася до полипептид с идентична аминокиселина на този полипептид, който е кодиран в последователността, или на негова част, като тази част се състои от най-малко 3-5 аминокиселини, и за предпочитане поне 8-10 аминокиселини, и дори по-предпочитано - 11-15 аминокиселини, или които могат да бъдат идентифицирани по имунологичен начин с полипептида, кодиран в последователността. Тази терминология включва също полипептид, експресиран от определената нуклеос киселинна последователност.

Рекомбинантният или получен полипептид не е задължително транслиран от определената последователност на нуклеиновата киселина; той може да бъде продуциран по който и да е начин, включително например химичен синтез или експресия на рекомбинантна експресионна

на система, или изолиране от HCV, включително мутация на HCV. Рекомбинантния или получен полипептид може да включва един или повече аналози на аминокиселини или не срещани в природата /синтетични/ аминокиселини в тяхната последователност. Методи за инсертиране на аналози на аминокиселини в последователностите са познати за специалистите в областта. Те могат да включват едно или повече маркирания, които също са познати на специалистите.

Терминът "рекомбинантен полинуклеотид" както се използва тук предполага полинуклеотид от геномна, с ДНК, синтетична, или със синтетичен произход, постигнат благодарение на своя произход или манипулиране : 1/ не е асоцииран с всички или част от полинуклеотида с които не се асоциира в природата ,2/ присъединен е към полинуклеотид, различен от този, към който се присъединява в природата, или 3/ не се среща в природата.

Терминът "полинуклеотид", както се употребява тук, се отнася до полимерна форма на нуклеотид с каквато и да е дължина, независимо рибонуклеотид или дезоксирибонуклеотид. Този термин се отнася само до първичната структура на молекулата. Така, този термин включва дидвойно- или едно-верижна ДНК или РНК. Той включва също типове на модификация, например, белязания, известни за специалистите, метилирания, "капсулирания", заместване на един или повече от природно срещаните нуклеотиди с даден аналог, интернуклеотидни модификации, като например незаредени свързвания / като метил фосфонати, фосфотриестери, фосфорамидати, карбамати и др. / и със заредени връзки / напр. фосфоротиоати, фосфородитиоати и др. / , онези, съдържащи допълнително присъединени части, като напр. протеини /включително нуклеази, токсини, антитела, сигнални пептиди, поли-L-лизин и др. / , онези с интеркалатори / напр. акридин, псорален и др. / , онези, съдържащи хелатори / като метали, радиоактивни метали, бор, окисляващи метали / онези, съдържащи алкилатори, онези с модифицирани връзки / като алфа

аномерни нуклеинови киселини и др. /, както и немодифицирани форми на полинуклеотида.

"Пречистен" полипептид като термин се отнася до полипептида, който е в състояние, показващо че е свободен от други полипептиди, т.е. в ~~срещаването~~ който съдържа минимум от около 50% тегл. /желан полипептид/ общо количество полипептид в състава /, за предпочитане около 70% и дори около 90% от желаният полипептид, без оглед на непротеиноните материали в състава. Техниките за пречистване на вирусните полипептиди са известни за специалистите в областта. Пречистените антители са дефинирани аналогично.

"Рекомбинантни гостоприемникови клетки", "клетки гостоприемници", "клетки", "клетъчни линии", "клетъчни култури" и други подобни термини обозначаващи микроорганизми или други еукариотични клетъчни линии, култивирани като едноклетъчни, се отнася до клетки, които могат да са, били са или ще бъдат използвани като реципиенти на рекомбинантен вектор или друг трансфер на ДНК, и включват потомство на оригиналната клетка, която е била трансфектирана. Знае се, че /може да се разбере, че/ потомството на отделна парентална клетка може да не ~~бъда~~ ~~само~~ задължително идентична в морфологично геномю или ДНК отношение като оригиналната родителска клетка, благодарение на природни, случайни или преднамерени мутации.

"Репликация" е генетичен елемент, т.е. плазмид, хромозома, вирус, козмид и др., които се отнасят като автономни единици на полинуклеотидна репликация в рамките на клетката; т.е. те са способни на репликация под свой собствен контрол.

"Вектор" е репликон, в който други полинуклеотидни сегменти са присъединени, така че да допринесе за репликацията и/или експресията на присъединения сегмент.

"Контролна последователност" се отнася до полинуклеотидни последователности, които са необходими, за да въздействат на екс-

пресията на кодиращите последователности, към които те са свързани. Природата на такива контролни последователности се различава в зависимост от гостопримниковия организъм; в прокариотите подобни контролни последователности включват предимно промотори, рибозомен сайт за свързване и терминатори; в еукариотите контролните последователности включват промотори, терминатори и в някои случаи, ген-усилватели. Терминът "контролна последователност" включва като минимум всички компоненти, чието присъствие е необходимо за експресия, и може също да включва допълнителни компоненти, чието присъствие е преимуществено, например, лидерни последователности

"Оперативно свързан" се използва за да обозначи съпоставяне, при което така описаните компоненти са във взаимоотношения, позволяващи им да функционират по очаквания начин. Контролна последователност "оперативно свързана" към кодираща последователност е лигатирана по такъв начин, че експресията на кодиращата последователност се постига при условия, конкурентни с контролната последователност.

"Отворена четяща рамка" /ORF/ е област от полинуклеотидната последователност, която кодира полипептид; тази област може да представи част от кодиращата последователност или цялата кодираща последователност.

"Кодираща последователност" е полинуклеотидна последователност, която се транскрибира в мРНК и/или се транслира в полипептид, което се поставя под контрола на подходящи регулаторни последователности. Границите на кодиращата последователност са определени посредством транслационен стартерен кодон при 5 - края и транслационен стоп кодон при 3 - края. Кодиращата последователност може да включва, но не е ограничена до мРНК, сДНК и рекомбинантни полинуклеотидни последователности.

"Имунологично идентифицируем" с/като се отнася до присъствието на епитопи и полипептиди, които също присъстват в дадения полипептид/и/, обикновено HCV ~~и други~~ протеини. Имунологична и специфичност може да бъде определена чрез свързване с анти тяло и/или конкуренция при свързването; тези техники са известни за специалистите в областта.

Както е употребено тук, "епитоп" се отнася до антигенна детерминанта на полипептида. Един епитоп може да обхване 3 или повече аминокиселини, които определят сайта на свързване на даденото анти тяло. Най-общо, един епитоп се състои от поне 5 аминокиселини и понякога от по 8 аминокиселини. Методите за картиране на епитопите са известни в областта.

Един полипептид е "имунологично реактивен" с дадено анти тяло, когато то се свързва с това анти тяло благодарение на разпознаването на анти тялото от специфичен епитоп, съдържащ се в полипептида. Имунологичната реактивност може да бъде определена чрез свързването на анти тялото, и по-специално чрез кинетиката на свързването на анти тялото, и/или чрез конкурентното свързване с помощта на познати полипептиди като конкуренти, които съдържат епитоп срещу който е насочено анти тялото. Техниките за определяне дали дадено анти тяло е имунологично реактивно или не, са познати в областта.

Както е употребено тук, терминът "анти тяло" се използва за полипептид или група от полипептиди, които са обхванати от поне един анти тяло комбиниращ сайт. "Анти тяло комбиниращ сайт" или "свързваща област" се формира от гънката на различни области на молекулата /а/ на анти тялото, за да се образува три-дименсионална свързващо пространство с вътрешна повърхност, формата и заряда на която са разпределени комплементарно на това в един епитоп на даден антиген и който дава възможност за имунологична реакция с антигена. Един анти тяло комбиниращ сайт може да бъде формиран от

тежко и леко верижна област V_H и V_L / съответно /, които формират хипервариабилна бримка, способстваща на антигенното свързване. Терминът "антитяло" включва, например, антитяла от организми от разред вертебрата, хибридни антитела, химерни антитела, едновалентни антитела, изменени антитела, Γ ав протеините и антитела с еднинична област.

Както тук е употребено, "антитяло с еднинична област" $/\alpha\text{Ab}/$ е антитяло, което е обхванато от V_H област, реагираща самостоятелно имунологично с определен антиген. αAb не съдържа V_L област, но може да съдържа друга антиген свързваща област, ~~нивинични~~ съществувва в антителата, например, капа и ламбда областите. Методите за получаване на αAb са известни в областта. Виж, напр. Ward et al. /1989/

Антителата могат също така да бъдат обхванати от V_H и V_L области, както и други познати свързващи области. Примери за тези типове антитела и методи за тяхното получаване са известни в областта / виж, напр. US Патент № 4 816 467, който е включен в приложната литературна справка /, и включва следното :

Например "вертебрата антителата" са такива антитела, които са тетрамери или ^{техни} агрегати, ~~включващи~~ леки и тежки вериги, обикновено агрегирани в "Y" конфигурация и които може да са или да не са ковалентно свързани. Амино киселините в тези антитела са хомоложни с аминокиселините последователности, намерени в антитяло, продуцирано от лимфоцити, ~~какви~~ ^{или} ~~in situ~~, или *in vitro* /например в хибридоми/. Вертебрата антителата обикновено включват природни антитела, например пречистени поликлонални антитела и моноклонални такива. Примери за получаване на такива антитела са описани по-горе.

"Хибридни антитела" са антителата, в които една двойка от тежките или леки вериги е хомоложна на онази от първото антитяло, докато друга двойка от тежката или лека верига е хомоложна на двойка от различна втора антитяло. Типично е, че всяка от тези две

двойки свързва различни епитопи, по-специално от различни антигени. Това води до свойството "бивалентност", т.е. способността да свързва два антигена едновременно. Подобни хибриди могат да бъдат формирани с помощта на химерни вериги, както е посочено по-рано.

"Химерни антитела" са антитела, в които тежката и /или лека вериги са слети протеини. Обикновено постоянната област от веригите е от един специален вид и/или клас, като различните области са от различен вид и/или клас. Към тази група се включва и което и да е анти тяло, в което всяка или и двете вериги - тежката или леката, са съставени от комбинация на последователности, имитираща секвенциите на антитела от различни източници, независимо дали тези източници са от различни класове ^{или} различни видове по произход, и дали или не точката на сливане е на различни/постоянни гранични места. Така, възможно е да се продуцират антитела, в които нито постоянната, нито различната област да имитират известна анти тяло последователност. След това става възможно, например, да се конструират антитела, чиито вариабилен регион притежава по-висок специфичен афинитет за специалния антиген, или чиято постоянна област може да покаже повишена фиксация на комплемента, или да ~~използват~~ създаде други подобрения в свойствата, постигнати с частично постоянната област.

Друг пример е "изменени антитела", който се отнася до антитела, в които природно срещаната аминокиселинна последователност във вертебрата анти тялото варира. С помощта на рекомбинантни ДНК техники, анти тялото може да бъде реконструирано за получаване на желаната ~~характеристика~~ характеристика. Възможните варианти са много, и граничат от изменение на една или повече аминокиселини до пълното реконструиране на дадена област, например, константна област. Измененията в постоянната област, най-общо, за получаване на

желана клетъчна характеристика, като напр. изменение на комплементарната фиксация, взаимодействия с мембраните, и други функции. Измененията в различните области могат да бъдат направени с оглед изменение на антигенните характеристики. Антитялото може да бъде реконструирано така че да се постигне специфичното разделяне на молекула или вещество при специфично клетъчно или тъканно място. Желаното изменение може да бъде осъществено чрез познати техники в молекулярната биология, като рекомбинантни техники, сайн насочена мутагенеза и др.

Още един пример е "едновалентното антитяло", което е агрегат, обхванат от тежко/леко верижен димер. Този тип антитяло избягва антигенните модуляции. Виж, напр. Clepple et al./1982/.

В определението на антителата са включени също и "Гав" фрагментите на антителата. "Гав" областите се отнасят до онези части на тежко и леко верижните антитела, които са грубо еквивалентни, или аналогични, на последователностите, които обхващат разклонението на тежките или леките вериги, и които както се знае, са имунологично свързани към специфичен антиген, но които не притежават ефекторната Fc част. "Гав" включва ~~и~~ агрегати от една тежка и от една лека верига/известна като Гав/ така както тетрамери, съдържащи 2H и 2L вериги /отнесени към Гав/2 /, които са способни на селективна реакция с определен антиген или антигенно семейство. "Гав" антителата може да бъдат разделени на субединици, подобно на тези описани по-горе, напр. "вертебрата Гав", хибридни Гав, химерни Гав и изменени Гав. Методи за получаване на Гав фрагменти на антителата са известни за специалистите в областта, и включват, например, протеолизис, и синтез чрез рекомбинантни техники.

В термина "антитела" са включени също и едно-верижни, антиген свързани / SA/ протеини, като типа, описан в статията на sp10m, I. в изданието от 15. юни, 1992, Салсег Ре еагеп /като статията, цитира

Както се употребява в текста, терминът "имуногенен полипептид" е полипептид, който проявява целуларен и/или хуморален имуноен отговор, независимо дали е самостоятелен или е присъединен към носител в присъствието или отсъствието на адjuвант.

Терминът "полипептид" се отнася до полимер от аминокиселини и не се отнася до специфична дължина на продукта; така, пептиди, олигопептиди и протеини са включени в рамките на дефиницията за полипептид. Този термин също така не се отнася до или изключва пост-експресионните модификации на полипептида, като гликозилация, ацетилиране, фосфорилация и др. В дефиницията са включени още, например, полипептиди, съдържащи един или повече аналози на една аминокиселина /включително напр. неприродна аминокиселина /, полипептиди със замесетин свързвания, а така също и други модификации, познати в областта, както природно, така и не-природно срещани се.

"Трансформация", както се употребява тук, се отнася до инсерция на екзогенен полинуклеотид в гостоприемникова клетка, независимо от метода, който е използван за инсерция, напр. директно поглъщане, трансдукция, /-кръстосване или електропорация. Екзогенният полинуклеотид може да бъде съхраняван като не-интегриран вектор, напр. плазмид, или обратно, може да бъде интегриран в гостоприемников геном.

"Лечение", както се употребява тук, означава профилактика и/или терапия.

"Индивид", както се употребява тук, се отнася до ^{гръбначни}вертебрата и по-специално до членове от вида бозайници, и включва, но не се ограничава до животни като кучета, котки, овце, свине, плъхове, мишки, морски свинчета, рогати животни и др. /но и примати, включително маймуни, шимпанзета, бабуни и хора.

Както се употребява в текста, "смисловата верига" на нуклеинова киселина съдържа последователността, която притежава секвенционна хомология с тази на РНК. "Анти-смисловата верига" съдържа последователност, която е комплементарна на тази от "смисловата верига".

Както се употребява тук, "позитивно верижен геном" на даден вирус е този, който, независимо дали е РНК или ДНК, е едно-верижен и който кодира вирусен полипептид/и/. Примери за позитивно верижните РНК на вируси включват: *Togaviridae*, *Coronaviridae*, *Picornaviridae*, *Caliciviridae*. Тук се причисляват също и *Flaviviridae*, които формално се отнасят към *Togaviridae* / Виж Fields & Knipe /1986/ /.

Както се употребява тук, "антитяло, съдържащо телесен компонент" се отнася до компонент от тялото на индивида, който е източник на интересувашите ни антитела. Антитяло, съдържащо телесни компоненти са известни в областта на техниката и включват, но не са ограничени до, например, плазма, серум, спинална течност, лимфна течност, външните отдели на респираторния тракт, чревния и генитален тракт, слъзи, слонка, мляко, бели кръвни телца и миеломи.

Както се употребява тук, "биологична проба" се отнася до проба, от тъкан или течност, изолирани от даден индивид, включително, но не ограничено до, например, плазма, серум, приблизително мозъчна течност, лимфа, външни отдели на кожата, респираторния тракт, интестинума и гениталиите, слъзи, слонка, мляко, кръвни клетки, тумори, органи и така също и проби от клетъчни култури /включително, но не ограничаващо се до постоянна среда, получена културалната клетъчна среда.

II. ОПИСАНИЕ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО

Съгласно настоящето изобретение се използват, доколкото не са указани други, конвенционални техники от молекулярната биология,

микробиология, рекомбинантна ДНК, и имунология, които са известни за специалистите. Тези техники са обяснени напълно в литературата.

See e.g., Maniatis, Fitch &

Sambrook, "Molecular Cloning; A Laboratory Manual" (1982); "DNA Cloning, Volumes I and II" (D.N. Glover ed. 1985); "Oligonucleotide Synthesis" (M.J. Gait ed, 1984); "Nucleic Acid Hybridization" (B.D. Hames & S.J. Higgins eds. 1984); "Transcription and Translation" (B.D. Hames & S.J. Higgins eds. 1984); "Animal Cell Culture" (R.I. Freshney ed. 1986); "Immobilized Cells And Enzymes" (IRL Press, 1986); B. Perbal, "A Practical Guide To Molecular Cloning" (1984); the series, "Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc.); "Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells" (J.H. Miller and M.P. Calos eds. 1987, Cold Spring Harbor Laboratory), Meth Enzymol Vol. 154 and Vol. 155 (Wu and Grossman, and Wu, eds., respectively), Mayer and Walker, eds. (1987), "Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology" (Academic Press, London); Scopes, (1987) "Protein Purification: Principles and Practice", Second Edition (Springer-Verlag, N.Y.); and "Handbook of Experimental Immunology", Volumes I-IV (D.M. Weir and C. C. Blackwell eds 1986). All patents, patent applications, and publications mentioned herein, both *supra* and *infra*, are hereby incorporated herein by reference.

II. A. Скъсени HCV полипептиди

Материалите и методите съгласно настоящето изобретение са осъществени чрез идентифицираните и описани по-долу нови HCV епитопи. Познанията за тези епитопи /или антигенни области / позволяват конструирането на полипептиди, съдържащи скъсени /по-точно срязани / HCV последователности, които могат да бъдат използвани като имунологични реагенти.

Скъсените HCV аминокиселинни последователности, кодирани поне един вирусен епитоп са полезни имунологични реагенти. Например, полипептиди съдържащи чужда скъсени последователности могат да бъдат използвани като реагенти в дадено имунологично изследване. Тези полипептиди са също кандидат субединици на антигените в състав за получаване на антисерум или ваксини. Особено тези скъсени после-

дователности могат да бъдат получени чрез различни познати методи, включително третиране на нативен вирусен протеин, предпочита се да се получават по синтетичен или рекомбинантен път. Полипептиди, съдържащи тези скъсени HCV последователности могат да бъдат получени до пълната HCV последователност /един или повече епитопи, както непрекъснати, така и прекъснати / или HCV последователности и хетероложни последователности на сляти протеини. Полезните хетероложни последователности включват такива, които обезпечават секретирането от рекомбинантен гостоприемник, постигат имунологичната реактивност на HCV епитопа/те/, или улеснява удвояването на полипептида с имунологична повърхност или ваксинален носител. Виж ЕРО публ. № 116 201, II патент № 4 722 840, ЕРО публ. № 259 149, II патент № 4 629 783, включени в литературната справка.

Размера на полипептидите, обхващащи скъсените HCV последователности може да варира широко, като минималният размер е последователност с размер достатъчен да подситури HCV епитоп, докато максималният размер не е ограничен. За удобство, максималният размер обикновено е не по-голям от онзи, който се изисква за обезпечаване на желаните HCV епитопи и функции на хетероложната последователност, ако има такава. Обикновено скъсената HCV последователност е в обхвата на от около 5 /или 8/ до около 100 аминокиселини в дължина. По-типично е, обаче, HCV последователността да бъде максимум от около 50 ~~ж~~ /или 40 / аминокиселини в дължина, и понякога максимум от около 20, 25 или 30 аминокиселини. Обикновено е желателно да се подберат HCV последователности от поне около 8, 10, 12 или 15 аминокиселини.

Примери за скъсени аминокиселинни последователности /октамери /, които са приложими така, както е описано тук, са дадени по-долу ~~и~~ примерните изпълнения. Следва да се разбере, че

тези пептиди не винаги точно картират даден епитоп. Невимуногенни части от последователността могат да бъдат определени с помощта на конвенционални техники и след това да бъдат deletирани от нея. По-нататък, може да бъде идентифицирана друга следваща скъсена HCV аминокиселина по начина, който вече е описан.

Полипептидни продукти, съдържащи скъсените HCV аминокиселинни последователности могат да бъдат изготвени като дискретни пептиди или да са инкорпорирани в по-дълъг полипептид, и може да намерят приложение както бе описано вече. В предпочитаният начин на приложение, скъсените последователности от E1 и/или E2 областите намират приложение като ваксини или терапевтични продукти. Докато в повечето случаи всяка от областите може да има някаква диагностична приложимост, C, II 3, II 4 и II 5 са специално предпочитани в комбинация с C епитопи с епитопи от един или повече от II 3, II 4 или II 5.

II. В. ПОЛУЧАВАНЕ НА ПОЛИПЕПТИДИ

Наличността на ДНК последователности, кодиращи HCV аминокиселинни последователности позволява конструирането на експресионни вектори, кодиращи антигенно активни области от полипептида / Виж напр. Фиг. 2. / . Тези антигенно активни области могат да бъдат получени от покриващи или капсулни антигени или от антигени от вътрешността, които не са структурни, включително, например полинуклеотид свързващи протеини, полинуклеотид полимераз и други вирусни протеини, необходими за репликацията и/или съставянето на вирусната частица. Фрагменти, кодиращи желаните полипептиди се получават, например от вирусни с ДНК клонове с помощта на конвенционални начини за рестрикционно разграждане или чрез син-

тетични методи, и са включени във вектори, които могат, например да съдържат части от фузионните секвенци като -галактозидаза или супероксид дисмутаза / /, с предпочитание към . Методи и вектори, които са приложими за получаване на полипептиди, които съдържат фузионни последователности на са описани в ЕР публикация № 0196056, публ. на 1. октомври, 1986. Вектори, кодиращи фузионни полипептиди на ОД и HCV полипептиди, като IIAIIV₅₋₁₋₁, IIAIIV₈₁ и C100-3, които са кодирани в структурата на HCV еДНК, са описани в Разделите IV.B.1, IV.B.2 и IV.B.4, съответно. Всяка част /по желание/ на HCV еДНК, съдържаща отворена четяна рамка /или нейна синтетична версия /, може да бъде използвана за да експресира рекомбинантен полипептид, като зрелия или фузионен протеин.

Обратно, полипептид, съдържащ HCV епитопи може да бъде получен чрез химичен синтез с помощта на стандартни техники на базата на аминокиселинната последователност от фигурите и примерите.

ДНК, кодираща желаният полипептид, независимо дали е в слита или не форма, и дали съдържа или не сигнална последователност за да позволи секретирание, може да бъде лигатирана в експресионни вектори, подходящи за всеки подходящ гостоприемник. Както еукариотичните, така и прокариотичните гостоприемникови системи по-рано са използвани за формиране на рекомбинантни полипептиди и клетъчните линии са посочени в ЕРО публ. № 318 216. Полипептида е изолиран от лизирани клетки или от културалната среда и са пречистени до степен, необходима за приложението им. Пречистването може да е с техники, познати в областта, например, различни експансии, фракционирание със сол, хроматография върху йонообменна смола, афинитетна хроматография, центрофугиране и др. подобни. Виж, напр. Метод 1п Еп/ум100у за различните методи за пречистване на протеини.

Такива полипептиди могат да бъдат използвани като диагностични, или онези, които допринасят за неутрализирането на антитела може да бъдат формирани във ваксини. Антитела, действещи срещу тези полипептиди може също да бъдат използвани като диагностични, или за пасивна имунизация. В допълнение, както е дискутирано по-горе, антителата срещу тези полипептиди са приложими например за изолване и идентифициране на HSV частици.

HSV полипептидите могат също да бъдат изолирани от HSV вириони и да бъдат срязани/ако още не са/. Вирсионите могат да бъдат култивирани в HSV инфектирани клетки в тънени култури или в инфектиран гостоприемник.

II.C. ПОЛУЧАВАНЕ НА АНТИГЕННИ ПОЛИПЕПТИДИ И КОНЮГАЦИЯ С НОСИТЕЛ

Антигенна област на полипептид е обикновена сравнително малка - 8 до 10 аминокиселини или по-малко в дължина. Фрагменти толкова малки, колкото 5 аминокиселини могат да характеризират даден антигенен регион. Тези сегменти могат да кореспондират на HSV ~~режим~~ антигена. Съответно с това, използвайки cДНК на HSV като база, ДНК кодиращи тези сегменти на HSV полипептиди могат да бъдат експресирани рекомбинантно както като фузионни протеини, така и като изолирани полипептиди. В допълнение, тези аминокиселинни последователности могат удобно да бъдат получени чрез химичен синтез. В случаите, когато синтезираният полипептид е с правилна конфигурация, така че да обезпечи правилния епитоп, но е твърде малък за да е имуногенен, полипептида може да бъде присъединен към подходящ носител.

Много техники, които да са приложими за получаване на подробни свързвания биха могли да бъдат използвани и те са познати за спе-

циалистите в областта. Това са формирането на дисулфидни мостове с помощта на II-сукцинимид-3-/2-пиридилтио/прошвенат / P I P / и сукцинимид-4-/ II-маленимидо-метил/циклохексан-1-карбоксилат / MCC / получен от Pierce Comp. Роск/ого, Illinois, ако в пептида липсва сулфхидридна група, тя може да бъде доставена с добавяне на цистеинов остатък/. Тези реагенти създават дисулфидни мостове помежду си и пептидните цистеинови остатъци на един протеин и амидната връзка чрез епсилон-амино с лизина, или друга свободна аминокиселина в другия. Известни са различни такива дисулфидно/амид-формиращи агенти. Виж, напр. *Imanin Rey* /1982/ 621185. Други бифункционални удвояващи агенти формират тиоестер вместо дисулфидно свързване. Много от тези тио-естер-формиращи агенти са търговско подходящи и включват реактивни естери на 6-маленимидокапронова киселина, 2-бромоецетна киселина, 2-йодооецетна киселина, 4- / II-маленимидо-метил/циклохексан-1-карбоксилна киселина и други подобни. Карбоксилните групи могат да бъдат активирани чрез комбинирането им със сукцинимид или 1-хидроксил-2 нитро-4-сулфонова киселина, натриева сол. Допълнителни методи за удвояване на антигени с помощта на ротавирус/ "свързваща система" е описана в ЕРО публикация № 259 149, която е включена в литературната справка. Изброените по-горе методи не са изчерпателно дадени, могат да бъдат използвани и други варианти и модификации на посочените съединения.

Може да бъде използван какъвто и да е носител, който сам по себе си не индуцира продуцирането на вредни за гостоприемника антигени. Подходящите носители са обикновено големи, бавно метаболитизирувани макромолекули, като протеините; полизахариди, агароза, целулоза, целулозни четки и др. подобни; полимерни аминокиселини, като полиглутаминова киселина, полилизин и др., аминокиселинни кополимери и

инактивиранни вирусни частици, виж напр. Раздел II, Д. Особено полезни протеинови субстрати са серумните албумини, хемоглобин, имуноглобулинови молекули, тироглобулин, овалбумин, и други протеини, добре познати на специалистите в областта.

II.1 ПОЛУЧАВАНЕ НА ХИБРИДНИ ИМУНОГЕННИ ЧАСТИЧКИ СЪДЪРЖАЩИ HCV ЕПИТОПИ

Имуногенността на епитопите на HCV може да бъде постигната също чрез получаването им в дрождени или безайзикови системи, които са слети с или комбинирани с формирещи частички протеини, като например онези, асоцииращи се с хепатит В повърхностен антиген. Виж напр. II- пат. 4 722 840. Структурите, където HCV епитопа е свързан директно към протеин, формирещ частички, кодирайки последователности, продуцират хибриди, които са имуногенни що се касае до HCV епитопа. В допълнение, всички от векторите, които са получени, включват епитопи, специфични за HCV и притежават различна степен на имуногенност, като напр. пре- пептида. Така частици, конструирани от частици формирещи протеин, който включва HCV последователности, са имуногенни що се касае до HCV и HBV.

Хепатитния повърхностен антиген / HB_{Ag} / както се знае, е формиран и включен в частици на .сега / P. Valen/nela et al. /1984/ /. Формирането на такива частици постига имуногенността на мономерна субединица. Структурата може също да включва имуногенния епитоп на HB_{Ag}, включвайки 55 -те аминокиселини на пред-повърхностния /пре- / регион. Поигати et. al. /1984/. Структурата на пре- HB_{Ag} частица, експресируема в дрожди е разкрита в EPO публ. № 174 444, публ. Март 19, 1986; хибриди, включващи хетероложни вирусни последователности за дрождена експресия, са разкрити в EPO 175 261, публ. Март, 26, 1986. Тези структури могат да бъдат

експресирани в клетки на бозайници, като напр. овариални клетки на японски хамстер /CHO/ с помощта на V40-дихидрофолат редуказен вектор / Mispelle et.al. /1984/ /.

В допълнение, частична протеина, формирайки частички, който поддържа последователност, може да бъде преместен с кодони, кодиращи HCV епитоп. В това преместване, областите, които не е задължително да медирират агрегацията на единиците за формиране на имуногенни частици, в дрожди или бозайници, могат да бъдат deletирани, като по този начин се елиминират допълнителните HBV антигенни сайтове от конкуренция с HCV епитопа.

II. Б. ПОЛУЧАВАНЕ НА ВАКСИНИ

Ваксини могат да бъдат получени от един или повече имуногенни полипептида, получени от своя страна от HCV. Тези полипептиди могат да бъдат експресирани в различни гостоприемникови клетки / напр. бактерии, дрожди, инсекти или бозайникови клетки /, или обратно, може да бъдат изолирани от вирусни препарати или да са синтетично създадени. Едно-или мулти-валентните ваксини срещу HCV могат да бъдат обхванати от един или повече епитопи на един или повече структурни протеини, и /или един или повече епитопи от един или повече неструктурни протеини. Тези ваксини могат да обхващат напр. рекомбинантни HCV полипептиди и /или полипептиди, изолирани от вирioni. В частност, ваксините включват един или повече от следните HCV протеини, или субединици на антигени, получени от тях : E1, E2, C, P22, P23, P24 и P25. Специално предпочитани са ваксини включващи E1 и /или E2, или техни субединици.

В допълнение към горното, възможно е да се създаде и жива ваксина от атеноирани микроорганизми, които експресират един или повече рекомбинантни HCV полипептиди. Подходящи атеноирани микро-

организми са известни за специалистите в областта и включват, например вируси / като ваксинални вируси , виж. Brown и et al., 1986 / , а така също и бактерии.

Получаването на ваксини, които съдържат имуногенен полипептид като ~~активен ингредиент~~ **активен ингредиент**, е известно за специалистите в областта. Обикновено такива ваксини се изготвят за инжекционно приложение, както като течни разтвори, така и суспенсии; твърди форми, подходящи за разтваряне или суспендиране в течност преди инжектирането също могат да бъдат изготвени. Препаратите могат да бъдат емулгирани или протеина да бъде капсулиран в липозоми. Активните имуногенни ingredienti често се смесват с ексципиенти които са фармакологично подходящи и конкулиращи с активните ingredienti. Подходящи ексципиенти са например вода, солудекстроза, глицерол, етанол и други подобни и комбинации от тях. В допълнение по желание ваксината може да съдържа малки количества спомагателни вещества, като омекрящи или емулгиращи такива, буфери и/или адjuванти които повишават ефективността на ваксината. Примери за адjuвантите, които могат да бъдат ефективни са напр. / без да се ограничават до / : алуминиев хидроксид, N-ацетил-мурамил-L-треонинил-D-изоглутамин / **thg-MDP** / , N-ацетил-ноо-муламил-L-аланил-D-изоглутамин / **CGP 11637** , отнасящ се като нор-MDP / , N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутаминил-L-аланил-2- / 1'-2'-дипалмитоил-сп-глицеро-3-хидроксифосфорилокси / -етил-амин / **CGP 19835A** , отнасящ се като **MTP-PE** / и **PIBI** , които съдържат три компонента, екстрахирани от бактерии, монофосфорил липид A, трехалоза димиколат и скелет на клетъчни стени / **MPL + TDM + CWS** / в 2% сквален / **Tween® 80** емулсия. Ефективността на адjuванта може да бъде определена чрез измерване на количеството антитела, насочено срещу имуногенен полипептид, съдържащ **HSV** анти-

генна последователност, получена в резултат от въвеждането на този полипептид във ваксини, които са включени също в различни адjuванти.

Ваксините се въвеждат конвенционално - по парентален път, инжекционно, напр. субкутанно или интрамускуларно. Допълнителни форми, които са подходящи за други начини на въвеждане предвиждат супозитории, и в някои случаи, орални форми. За супозиториуми, традиционните свързващи и носещи вещества могат да включват, например, полиалкилен гликоли или триглицериди; такива супозитории могат да бъдат формирани от смеси, съдържащи активни инградиенти в интервала от 0,5% до 10%, за предпочитане 1%-2%. Оралните форми включват такива обикновени експоненти, като напр. фармацевтични по качества манитол, лактоза, нишесте, магнезиев стеарат, натриев захарид, целулоза, магнезиев карбонат и др. подобни. Тези състави са във форма на разтвори, суспензии, таблетки, прахове, капсули, преносими освобождаващи форми или прахове и съдържат 10% - 95% от активния инградиент, за предпочитане 25% - 75%.

Протеините могат да бъдат включени във ваксината като неутрални или солеви форми. Фармацевтично подходящи соли са тези, включващи допълнително количество киселинни соли /формирещи три аминокиселини от пептида / и които се формират в неорганични киселини като, например, хидрохлорна или фосфорна киселина, или такива органични киселини като оцетна, оксалова, малеинова, тартарова и др. Соли, формирани със свободните карбоксилни групи могат да бъдат получени също и от неорганични основи, като например, натрий, калий, амоний, калций или железен хидроксид, както и такива органични основи като изопропиламин, триметиламин, 2-етиламино етанол, хистидин, прокаин и др. подобни.

II. P. ДЗИРАНЕ И ВЪВЕЖДАНЕ НА ВАКСИНТЕ

Ваксините се въвеждат по начин, съобразен с дозата във формите, и в такива количества, че да е профилактично и/или терапевтично ефективна. Количеството за въвеждане, което обикновено е от 5 до 250 μ г антиген за доза, зависи от субекта на лечение, капацитета на имунната му система или синтезираните антитела и степента на желаната защита. Необходимите количества активен ingredient за въвеждане зависи от съображенията на практикуващия и са различни за всеки субект.

Ваксината може да бъде давана в единична доза по схема или в повече дози също по схема. Схемата за мултиплено приложение предвижда начален курс от 1-10- единични дози, последван от други дози, давани в следващи интервали от време, необходимо да съхрани и подсили имунният отговор, напр. 1-4 месеца за втората доза, и ако е необходимо, последващи дози след няколко месеца. Режим на позите ще бъде, поне отчасти, детерминиран от необходимостта на индивида и би зависил от съображенията на практикуващия.

В допълнение, ваксината съдържаща имуногенните HCV антигени може да бъде въведена в комбинация с други имуномодулаторни агенти, например, имуно глобулини.

II. C. ПОЛУЧАВАНЕ НА АНТИТЕЛА СРЕЩУ HCV ЕПИТОПИ

Имуногенните полипептиди, описани в текста на настоящето изобретение се използват за получаване на антитела, включително моноклонални и поликлонални. Ако се цели получаване на поликлонални антитела / като миши, плъшци, кози, конски и др. / , подобрите жи-

вотни се имунизират с имуногенен полипептид, носещ HCV епитоп/и/. Серума от имунизирани животни се събира и третира съобразно известни процедури. Ако серума съдържащ поликлонални антитела срещу HCV епитоп съдържа антитела за други антигени, поликлоналните антитела могат да бъдат прецистени посредством имуноафинитетна хроматография. Техниките за продуциране и обработване на поликлонален антисерум са известни в областта, виж напр. Meyer и Vaiker/1987/. Обратно, поликлоналните антитела могат да бъдат изолирани от бозайници, които преди това са били инфектирани с HCV.

Моноклоналните антитела, насочени срещу HCV епитопи могат да бъдат получени от специалистите в областта. Основната методология за получаване на моноклонални антитела чрез хибридоми е добре известна. Важни антитяло-продуциращи клетъчни линии могат да бъдат създадени чрез фузия на клетки, а също и чрез други техники като директна трансформация на В лимфоцити с онкогенна ДНК, или трансфекция с вируса на Epstein-Barr. Виж, напр. M. Spiegel et al. /1980/, Hammerling et al., /1981/, Kappes et al., /1980/, виж също II патент № 4 341 761 , 4 399 121 , 4 427 783 , 4 444 887, 4 466 917 , 4 472 500 , 4 491 632 , и 4 493 890. Моноклоналните антитела, продуцирани срещу HCV епитопите може да бъдат скринирани за различни свойства, като напр. изотип, епитопен афинитет и др.

Антитела, както моноклонални, така и поликлонални, които са насочени срещу HCV епитопи са специално приложими в диагностиката, а онези които са неутрализиращи са приложими в пасивната имуноterapia. Моноклонални антитела могат да бъдат използвани и за повишаване анти-идиотипичните антитела.

Анти-идиотипните антитела са суперглобулини, които носят "вътрешен имидж" на антигена от инфекциозния агент срещу който е желана защита. Виж напр. Hl opo//, A., et al. /1981 / и Drees map

ет а1., /1985/. Техниките за получаване на анти-идиотипни антитела са известни в областта. Виж, напр. Сг/усп /1985/, MacIIаmага ет а1. /1984/ и Vутоспаао ет а1. /1985/. Тези анти-идиотипни антитела могат също така да бъдат използвани за лечение, ваксиниране и/или диагностика на HCV, както и за изясняване на имуногенните области на HCV антигените.

II. H. ИМУНОБОЛЕЩАНИЕ И ДИАГНОСТИЧНИ КИТОВЕ

Полипептидите и антителата от настоящето изобретение са приложими за откриване на присъствието на HCV антитела, или присъствието на вируса или HCV полипептиди /или епитопи/, в например биологични проби. Дизайна на имунопробите е обект на множества вариации, като са познати много форми за специалистите. Имунопробата използва поне един вирусен епитоп, получен от HCV. В едно изпълнение, имунопробата иж съдържа комбинация от вирусни епитопи, получени от HCV. Тези епитопи могат да бъдат получени от различни вирусни полипептиди, и могат да са в различни рекомбинантни или природни полипептиди, или заедно в същите рекомбинантни полипептиди. Една имунопроба може да използва, например, моноклонално антитяло, насочено срещу вирусни епитопи, комбинация от моноклонални антитела, насочена срещу епитопите на един вирусен антиген, моноклонални антитела, насочени срещу епитопите от един вирусен антиген, моноклонални антитела насочени срещу епитопите от различни вирусни антигени, поликлонални антитела насочени срещу различни вирусни антигени. Методиката може да се базира, например, на конкурентни или директни и насочени реакции, или сандвичев тип изследвания. Методиките могат също например да използват твърди повърхности или да бъдат имунопреципитирани. Повечето от изследванията използват белязани антитела или полипептиди; маркерите могат да бъдат

например, ензиматични, флуоресцентни, хемилюминисцентни, радиоактивни или отцветяващи молекули. Изследвания, които да амплифицират сигнали те от сондата също са познати; примери за които са изследвания, използващи биотин и авидин и ензим-белязани и метираны имунопроби, като EII A /описани по-рано /.

Обикновено едно изследване за анти-HCV антитела включва подбор и изготвяне на тестови проби, за които се счита че съдържат антителата, като напр. биологична проба, след това се инкубират с антигенен / т.е. епитоп-съдържащ / HCV полипептид при условия, позволяващи формирането на антиген-антитело комплекси, и след това се откриват формираните комплекси. Подходящите условия за инкубация са добре известни на специалистите. Имуноизследването може да бъде без ограничения, в хетерогенна или хомогенна форма, и от стандартен или конкурентен тип.

В хетерогенната си форма, полипептида е обикновено свързан с твърда повърхност за да улесни разделянето на пробата от полипептида след инкубацията. Примери за твърди повърхности, които могат да бъдат използвани са нитроцелулоза / напр. в мембранна или микротитърни кладенчета /, поливинил хлорид / като листи или микротитърни кладенчета /, полистиренов латекс / като напр. **вария** или микротитърни панички /, поливинил флуорид / известен като Immilon /, лиазотирана хартия, найлонова мембрана, активирани **вария** и протеинови A **вария**. Например, Dupontes Immilon 1 или Immilon 2 микротитърни панички или 0,25 инчови полистиренови **вария** / Presclon Plastic Ball / могат да бъдат използвани за хетерогенната форма. Твърдите повърхности, съдържащи антигенният полипептид обикновено се промива след сепарирването от тестовите проби и преди определянето на свързаните антитела. Като стандартните, така и конкурентните форми са известни за специалистите.

В хомогенната форма, тест пробите се инкубират в антиген в разтвор. Например, това може да стане при условия, които да позволят до преципитиране на всеки антиген-антитяло комплекс, който се формира. Като стандартните, така и конкурентните форми са известни за специалистите в областта.

В стандартната форма, количеството на антителата, формиращи антитяло-антигенния комплекс може да се наблюдава директно. То може да бъде съпътствено от определяне дали белязаните анти-хеногенни антитела ще се свържат благодарение на образуването на комплекси. В конкурентната форма, количеството на HCV антителата в пробата се определя дедуктивно чрез наблюдаване ефекта на конкуренция при свързването на познато количество от белязаното антитяло /или други конкуриращи лиганди / в комплекса.

Комплексите, в които при образуването им е включено анти-HCV антитяло / или, в случаите на конкурентно изпитване, на количеството от конкурентно антитяло / се определят по който и да е от познатите техники, в зависимост от формата. Например, небелязачи HCV антитела в комплекса могат да бъдат открити с помощта на конкурент на антихеногенен I_0 свързан в комплекс с маркер / напр. ензимен маркер /.

В имунологичните изпитания, където HCV полипептиди се подложени на анализ, тест пробата, обикновено биологична проба, се инкубира с анти-HCV антитела при условия, които да позволят формирането на антиген-антитяло комплекси. Могат да бъдат използвани различни форми. Например, "сандвичева проба", където антитяло, прикрепено към твърда повърхност се инкубира с тест пробата; промива се, инкубира се с второ, белязано антитяло за анализ и повърхността се промива отново. Анализираното вещество се открива чрез определяне дали вто-

рото анти тяло е свързано с повърхността. В конкурентната форма, която може да бъде както хетерогенна, така и хомогенна, тест пробата обикновено се инкубира с анти тяло и се маркира, конкуриращият антиген също се инкубира както последователно, така и едновременно. Тези и други форми са добре познати на специалистите в областта.

Ефективни системи за откриване на HCV инфекции са тези, които включват употребата на пластини от епитопи, както е описано по-горе. Епитопите в пластината могат да бъдат конструирани в един или мулти пептиди. Изпитването за варираните епитопи може да е последователно или едновременно.

Ензим-свързаното имуносорбентно изпитване / ЕИ А / може да бъде използвано за измерване концентрацията както на натигена, така и на анти тялото. Този метод е в зависимост от концентрацията на даден ензим с антиген или анти тяло, и използва свързаната ензимна активност като количествена мярка. За измерване на анти тялото, познатият антиген се фиксира към твърда фаза / като микропластична или пласмасова чаша /, инкубира се с тест серумно разреждане, промива се, инкубира се с анти-имноглобулин, белязан с ензим и отново се промива. Ензимите, подходящи за маркиране са известни на специалистите и включват, например пероксидаза от хряк. Ензимната активност се измерва чрез добавяне на специфични субстрати и се определя формирания продукт или асимилираният субстрат по калориметричен начин. Степента на активност е директна функция на количеството на анти тялото.

За да се измери антиген, известно специфично анти тяло се фиксира към твърда ~~микропластична~~ фаза, добавя се тестуваният материал, съдържащ антиген, след инкубация твърдата фаза се промива и се добавя второ ензимно-маркирано анти тяло. След промиване, се добавя субстрат, ензимната активност се ~~измерва~~ калориметрично и се свързва с концентрацията на антигена. Подходящите за имунодиагностика китове,

съдържащи подходящите белизани реагенти са конструирани чрез опаковане в подходящи материали, включително полипептиди от изобретението, съдържащи HCV епитопи или антигена, срещу HCV епитопи в подходящи контейнери, заедно с постоянните реагенти и материали, необходими за осъществяване на изпитването, както и инструкции за провеждане на изпитването.

III. ОСНОВНИ МЕТОДИ

Основните методи, използвани в практиката на настоящето изобретение могат да бъдат намерени, например, в приложената литературна справка, по-специално в ЕПО публикации № 318 216 и 388 232.

IV. ПРИМЕРИ

По-долу са описани примери от настоящето изобретение, които са дадени само с илюстративна цел и не ограничават обхвата на изобретението. В светлината на изложеното, за специалист в областта биха били очевидни множество примери изпълнения в рамките на предвидените патентни претенции.

V. Картиране на епитопите от HCV генома

Следващите примери са резултат от картирането на епитопите в експеримент, проведен с HCV1 полипротеинова последователността, показана на Фиг. 1. Както е показано на Фиг. 3-11, налице е хетерогенност сред HCV изолатите, показваща, че тези замествания на аминокиселините може да бъдат осъществени в октамера, описан по-долу. Като допълнение към заместванията с аминокиселини от съответстващи локализации в други HCV изолати, замествания със синтетични аналози на специфични аминокиселини или съхранени замествания на базата на зареда /по-специално когато замества-

нето не разрушава съвкупването на веществото / , се в обхвата на изобретението.

IV. A.1. СИНТЕЗ НА ПРИОКИФИКАЦИ СЕ ПЕПТИДИ

Полиетиленови игли, оформени в блок с размер 8×12 / Co 3 -
eisco Миметоре , Victoria, Англетрия / , се почистват чрез поста-
вянето им в баня / 20% V/V пиперидин в диметилформамид / ДМГ /
за 30 мин на стайна температура. След това полиетиленовите игли
се отстраняват, промиват се с ДМГ за 5 мин., промиват се в метанол
четирикратно / 2 мин/промиване /, оставят се да изсъхнат
на въздуха за поне 10 мин, след което се промиват за определен
път в ДМГ / 5 мин /. 1-Хидроксифензотриазол / НОВТ , 367 мг /
се разтваря в ДМГ / 50 мл / за използване за синтезиране на
Гмос-защитните аmino киселини : Гмос-L-Ala-OP/p, Гмос-L-Cy
/Tyr/ -OP/p, Гмос-L-Asp/O-t-Bu/-OP/p, Гмос-L-Ser/O-t-Bu/-OP/p,
Гмос-L-Phe-OP/p, Гмос-L-Tyr-OP/p, Гмос-L-His/Boc/-OP/p,
Гмос-L-Ile-OP/p, Гмос-L-Iu/Boc/-OP/p, Гмос-L-Leu-OP/p, Гмос-
L-Met-OP/p, Гмос-L-Asp-OP/p, Гмос-L-Pro-OP/p, Гмос-L-Glu-OP/p,
Гмос-L-Arg/Mtg/-OP/p, Гмос-L-Ser/t-Bu/-ODпт, Гмос-L-Thr/t-
Bu/-ODпт, Гмос-L-Val, OP/p и Гмос-L-Trp-OP/p.

Защитените аmino киселини се почистват в микротитърни лавич-
ки с НОВТ и игличките се потопят в флуорометата, след което се
оставят да реагират на 25°C за 18 часа. Купиците се промиват с
ДМГ / 2 мин /, NaOH / 4 x 2 мин / и отново с ДМГ / 2 мин / за по-
чистване и деагоктиране на свързаните аmino киселини. Процеду-
рата се повтаря за всяко допълнително утвърждение на аmino кисе-
лини, докато се получи всички аминокиселини.

Свободните N-крайца след това се ацетилизират за да се компенсират свободният амид, тъй като повечето епитопи не се откриват при N-края и поради това не притежават позитивен заряд. Ацетилирането се съпровожда със запълване на кладенчетата от микротитърната паничка с DMF/оцетен анхидрид/триетиламин / 5:2:1 // // което позволява на игличките да реагират в кладенчетата за 90 минути при 20°C. След това те се промиват с DMF /2 мин/ и MeOH / 4 x 2 мин / , изсушават се на въздух за поне 10 мин.

Защитните ~~киселинни~~ групи от страничните вериги се отстраняват чрез третиране с флуоро оцетна киселина /фенол/ дитиоетан / 95:2,5 : 2,5 // // в полипропиленови торби за 4 часа при стайна температура. След това игличките се промиват в дихлорометан / 2 x 2 мин / , 5% ди-изопропилетиламин/дихлорометан /2 x 5 мин / , дихлорометан /5 мин / и се изсушават на въздух за 10 мин. След това игличките се промиват с вода /2 мин / , MeOH /18 часа / , изсушават се под вакуум и се оставят на съхранение в пластмасови торби върху силика гел.

IV. ИЗПИТВАНЕ НА ПЕПТИДИ

Носещите ектамери иглички, изготвени както е описано по-горе, най-напред се третират с ултразвук за 30 мин в буфер за разрушаване / 1% натриев додецил сулфат, 0,1% 2-меркаптоетанол, 0,1 M NaH_2PO_4 / на 60°C. След това игличките се потапят във вода /60°C/ последвано от варене в MeOH /2 мин / и се оставят да се изсушат на въздух. Игличките след това се покриват отново за 1 час при 25°C в микротитърни кладенчета съдържащи 200 μL блокиращ буфер / 1% овалбумин , 1% BSA , 0,1% Твин и 0,05% NaN_3 в PBS / при разклащане. След това игличките се потапят в микротитърни кладенчета съдържащи 175 μL антисерум, получен от хора, диагностицирани като носители на HCV и се оставят да се инкубират

на 4°C за една нощ. След това игличките се изпитват ~~на~~ срещу антисерум от три различни пациента. Проба # PAA 3663 / "А" / проявяваща силна реактивност към HCV Western blot, HCV конкурентна ELISA, HCV ELISA към клон C100-3 / при 1:1000 разреждане / и RIBA отговори от 4+ до C100, 5-1-1, и C33c / C22 не се дава /. /Антигенните клонове се както се дадени в ЕРО публ. #318 216 и 388 232, както онези, описани в литературата, отнасяща се до HCV имуно изпитания на разположение от Ortuo Diagnostic System, Inc./. Неразредената плазма се разрежда 1 : 500 в блокиращ буфер. Проба #PAA 33028 / "В" /, проявяваща силна реактивност при Western blot, HCV конкурентна ELISA, HCV ELISA за клон C100-3 / при 1:500 разреждане / и RIBA отговори от 4+ до C100, 5-1-1, C33C и C22. Поликлонален антисерум се пречиства на части чрез пропускане през протеин А колона и се използва ~~като~~ при разреждане от 1:200 в блокиращ буфер. Проба #PAA 32931 / "С" / проявява умерена реактивност към HCV Western blot /3+ /, HCV конкурентна ELISA, HCV ELISA към клон C100-3 / при разреждане 1:64 / и RIBA отговори от 3+ и 4+ до C100 и 5-1-1-, респективно / C33c и C22 не се дадени/. Поликлонален антисерум се пречиства ^{на} части чрез пропускане през протеин А колона, и се използва при разреждане 1:500 в блокиращ буфер.

Игличките се промиват в PBS /Tween 20 /4 x 10 мин / на стайна температура, след което се инкубира в микротитърни кладенчета, съдържащи пероксидаза от хрян -белязан кози анти-човешки IgG антисерум / 175 мI, 1:2000 разреждане в блокиращ буфер без NaH₂Po₄ / за един час при 25°C с разклаждане. Античовешкия антисерум е специфичен за човешки IgG-нови леки и тежки вериги, и реагира с IgG и IgM -класове. Игличките отново се промиват в PBS /Tween 20 /4 x 10 мин / на стайна температура. Субстратен раз-

Субстратни разтвори се приготвя чрез разреждане на NaH_2PO_4 / 1M, 200 мl / и лимонена киселина / 1M, 160 мl / до 2 l с дистилирана вода, довеждайки рН до 4,0. Амино-3-етилбензтиазодинсулфонат / АВТ , 50 мг / и водороден пероксид / 0,3 мl/мl / се добавя към 100 мl буфер непосредствено преди използването за допълване на субстратният разтвор. Субстратният разтвор /150 мl / след това се прибавя към всяко кладенче от микротитърната плочка, и игличките се потапят в кладенчетата и се инкубират ~~в хладилника~~ при 25°C на тъмно. След появяване на оцветяването реакцията се прекратява чрез отстраняване на игличките и абсорбцията на разтворите възлиза до 405 nm.

Изброените по-долу октамери са имунореактивни с анти-HCV антисерум. Пептидите, реагиращи с всичките три антисерума са изброени като епитопи, докато пептидите, реагиращи само с един или два антисерума са посочени като леки епитопи /означени с " ~ " /. Силните епитопи са маркирани с букви вместо с номера /напр. ЕРАА /.

Cervhermya		Cervhermya			
AA#	Sequence	AA#	Sequence		
5	23	KEPGGGQA	87	GNEGCGWA	
	24	EPGGGQAV	Ep2	88	NEGCGWAG
	25	PGGGQAVG		89	EGCGWAGW
	26	GGGQAVGG		90	GCGWAGWL
	27	GGQAVGGV		91	CGWAGWLL
28	GQAVGGVY	92		GWAGWLLS	
10	29	QAVGGVYL ~		93	WAGWLLSP
	30	AVGGVYLL		94	AGWLLSPR
	31	VGGVYLLP		95	GWLLSPRG
	32	GGVYLLPR		96	WLLSPRGS
	33	GVYLLPRR		97	LLSPRGSR
15	34	VYLLPRRG		98	LSPRGSRP
	35	YLLPRRGP		99	SPRGSRPS
	36	LLPRRGPR			
20	66	PKARRPEG Ep1	100	PRGSRPSW Ep3	
	67	KARRPEGR	101	RGRSPSWG	
	68	ARRPEGRT	102	GSRPSWGP	
	69	RRPEGRTW	103	SRPSWGPT	
	70	RPEGRTWA			
25	71	PEGRTWAQ	186	TVPASAYQ Ep4	
	72	EGRTWAQP	187	VPASAYQV	
	73	GRTWAQPG EpA	188	PASAYQVR	
	74	RTWAQPGY	189	ASAYQVRN	
	75	TWAQPGYP	190	SAYQVRNS	
30	76	WAQPGYPW	191	AYQVRNST	
	77	AQPGYPWP			
	78	QPGYPWPL	206	DCPNSSIV ~	
	79	PGYPWPLG	223	TPGCVPCV ~	
	80	GYPWPLYG	232	EGNASRCW Ep5	
35	81	YPWPLYGN	256	TQLRRHID ~	
	82	PWPLYGNE	286	LVGQLFTF ~	
	83	WPLYGNEG	297	RHWTQTGC Ep6	
	84	PLYGNEGC	298	HWTTQGCN	
	85	LYGNEGCG	299	WTTQGCNC	
40	86	YGNEGCGW	321	MMMNWSPI ~	
			347	DMIAGAHW Ep7	
			357	LAGLAYFS Ep8	
45					

5	413	LINTNGSW EpB		594	YSRCGSGP F _A
	414	INTNGSWH		595	SRCGSGPW
	432	SLNTGWLA ~		596	RCGSGPWL
	465	FDQGWGPI EpC		597	CGSGPWLT
	466	DQGWGPIS		598	GSGPWLT
10	467	QGWGPISY		599	SGPWLT
	468	GWGPISYA		600	GPWLT
	469	WGPISYAN		601	PWLT
	470	GPISYANG		602	WLT
	471	PISYANGS		603	LTPRCLVD EpF
15	480	PDQRPYCW EpD		604	TPRCLVDY
	481	DQRPYCWH		605	PRCLVDYP
	482	QRPYCWYH		606	RCLVDYPY
	483	RPYCWYHP		607	CLVDYPYR
	484	PYCWYHPP		608	LVDYPYRL
20	500	KSVCGPVY Ep9		609	VDYPYRLW
	501	SVCGPVYC		610	DYPYRLWH
	502	VCGPVYCE		611	YPYRLWHY F _B
				612	PYRLWHYP
				613	YRLWHYPC
25	521	RSGAPTYS Ep10	Ep12	641	EAACNWTR
	540	NNTRPPLG EpE		662	LSPLLLII Ep13
	541	NTRPPLGN		663	SPLLLII
	542	TRPPLGNW		664	PLLLIIQ
	543	RPPLGNWF		665	LLLLIIQW
30	544	PPLGNWFG		685	LSTGLIHL ~
	545	PLGNWFGC		705	VGSSIASW ~
	546	LGNWFGCT		706	GSSIASWA
	547	GNWFGCTW		729	ARVCSCITW Ep14
	548	NWFGCTWM		782	WVPGAVYT
35	549	WFGCTWMN		783	VPGAVYTF
	579	LHCPTDCF ~	EpG	784	PGAVYTFY
				785	GAVYTFYG
				786	AVYTFYGM
				787	VYTFYGMW
40				788	YTFYGMWP
				789	TFYGMWPL
				801	LALPQRAY ~
45					

5	851	RVEAQLHV EpH		1384	VIKGRHL Ep20
	852	VEAQLHVW			
	853	EAQLHVWI		1410	LGNAVAY Ep21
	854	AQLHVWIP		1411	GINAVAYY
	855	QLHVWIPP			
10	893	LAVFGPLW ~		1454	CNTCVIQT ~
	916	QGLLRFCA ~		1492	GRGKPGIY Ep22
				1493	RGKPGIYR
	928	MIGGHYVQ Ep15		1532	PAETTVRL Ep23
	946	TGTYYVYNH EpI		1533	AETTVRLR
15				1534	ETTVRLRA
	952	NHLTPLRD EpJ		1535	TTVRLRAY
	953	HLTPLRDW			
	954	LTPLRDWA		1560	GVFIGLIH Ep24
				1561	VFIGLIHI
20	1026	LAPITAYA ~	Ep25	1581	ENLPYLVA
	1072	TCINGVCW EpK		1567	NLPYLVAY
	1109	LVGWPAQ Ep16		1568	LPYLVAYQ
				1569	PYLVAYQA
				1570	YLVAYQAT
25	1171	CPAGHAVG Ep17		1571	LVAYQATV
	1113	PAGHAVGI		1572	VAYQATVC
	1114	AGHAVGIF		1573	AYQATVCA
	1115	GHAVGIFR		1574	YQATVCAR
	1116	HAVGIFRA		1575	QATVCARQ
30	1117	AVGIFRAA		1576	ATVCARQA
				1577	TVCARQAP
	1218	VVPQSEQV EpL			
	1240	VPAAYAAQ ~	Ep26	1601	PPSWDQMW
	1260	ATLGFGAY ~		1602	PSWDQMWK
35				1603	SWDQMWKC
	1280	GVRITTGS Ep18		1604	WDQMWKCL
	1281	VRITTGSP		1605	DQMWKCLI
40	1282	RITTGSP		1606	QMWKCLIR
	1283	ITTGSPIT		1607	MWKCLIRL
	1284	TTGSPITY			
	1285	TGSPITYG		1615	KPTLHGPI Ep27
				1616	PTLHGPI
45	1322	DATSILGI ~		1617	TLHGPIPL
	1338	TAGARLVV ~		1618	LHGPIPLL
				1619	HGPIPLLY
				1620	GPIPLLYR
	1371	GEIPFYGK Ep19		1655	VVTSTWVL ~

	1694	IIPDREVL EpM		1966	SECTIPCS EpS
	1695	IPDREVL		1967	ECTIPCSG
				1968	CTIPCSGS
	1710	ECSQHLPY EpN		1969	TIPCSGSW
5	1711	CSQHLPYI			
	1712	SQHLPYIE		1999	LMPQLPGI EpT
				2000	MPQLPGIP
	1728	EKQKALGL EpO		2001	PQLPGIPE
10	1729	KQKALGLL		2002	QLPGIPEV
				2003	LPGIPEVS
	1758	EIEWAKLM EpP		2004	PGIPEVSC
	1759	IEWAKLMW		2005	GIPEVSCQ
	1760	EWAKLMWN		2006	IPEVSCQR
15	1761	WAKLMWNE		2007	PEVSCQRG
	1762	AKLMWNEI		2008	EVSCQRGY
				2009	VSCQRGYK
	1781	LPGNPAIA ~		2010	SCQRGYKG
				2011	CQRGYKGV
20	1808	LFNILGGW Ep28		2012	QRGYKGVW
	1821	AAPGAATA ~		2013	RGYKGVWR
				2014	GYKGVWRG
	1851	ILAGYGAG Ep29		2024	IMHTRCHC
25	1880	VNLLPAIL ~	Ep31		
				2048	VGPRICRN EpU
	1908	PGEGAVQW EpG		2049	GPRICRNY
	1909	GEGAVQWM		2050	PRICRNYW
30	1910	EGAVQWMN		2051	RICRNYWS
	1911	GAVQWMNR		2052	ICRNYWSG
	1912	AVQWMNRL		2053	CRNYWSGT
	1913	VQWMNRLI		2054	RNYWSGTE
				2055	NYWSGTEP
35	1925	RGNHVSPI EpR		2056	YWSGTEPI
				2057	WSGTEPIN
	1940	AAARVTAI Ep30			
	1941	AARVTAI		2071	TPLPAPNY Ep32
	1942	ARVTAIS			
40	1943	RVTAISS		2088	EEYVIRQV EpV
	1944	VTAILSSL		2089	EYVIRQVG
	1945	TAILSSLV		2090	YVIRQVGD
	1946	AILSSLVT		2091	VIRQVGDF
	1947	ILSSLVTQ		2092	IRQVGDFH
45	1948	LSSLVTQL		2093	RQVGDFHY
	1949	SSLVTQLL			
	1950	SLVTQLLR		2108	DNLKCPCQ ~
	1951	LVTQLLR			

	2122	EIELDGVR EpW		2280	REAQALPV EpZ
	2123	IELDGVRL		2281	EAQALPVW
	2124	ELDGVRLH		2282	AQALPVWA
5	2125	LDGVRLHR		2283	QALPVWAR
	2126	DGVRLHRF		2284	ALPVWARP
	2127	GVRLHRFA		2285	LPVWARPD
	2128	VRLHRFAP		2286	PVWARPDY
	2129	RLHRFAPP		2287	VWARPDYN
10	2130	LHRFAPPC		2288	WARPDYNP
	2131	HRFAPPCK		2289	ARPDYNPP
	2132	RFAPPCKP		2290	RPDYNPPL
	2133	FAPPCKPL			
	2134	APPCKPLL		2325	PPPRKKRT Ep35
15	2135	PPCKPLL		2326	PPRKKRTV
	2136	PCKPLLRE		2327	PRKKRTVV
	2137	CKPLLREE			
	2138	KPLLREEV		2345	AELASRSE Ep36
	2139	PLLREEVS		2346	ELASRSEG
20	2140	LLREEVSF EpX		2347	LASRSEGS
	2141	LREEVSFR		2348	ASRSEGSS
	2142	REEVSFRV		2349	SRSEGSSS
	2143	EEVSFRVG			
	2144	EVSFRVGL		2382	AESYSSMP Ep37
25	2145	VSFRVGLH			
	2146	SFRVGLHE		2401	SDGSWSTV
	2147	FRVGLHEY	Ep38		
	2148	RVGLHEY			
				2417	VVCCSMSY
30	2165	EPEPDVAV ~	EpAA		
	2187	GRRLARGS ~		2418	VCCSMSYW
				2419	CCSMSYWI
	2226	LIEANLLW EpY		2420	CSMSYWIG
35	2227	IEANLLWR		2421	SMSYWIGA
	2228	EANLLWRQ		2422	MSYWIGAL
	2229	ANLLWRQE			
	2230	NLLWRQEM			
	2231	LLWRQEMG			
40	2232	LWRQEMGG			
	2244	VESENKVV Ep33			
	2245	ESENKVVI			
	2246	SENKVVIL			
45	2247	ENKVVILD			
	2248	NKVVILDS			
	2249	KVVILDSF			
	2250	VVILDSFD			
	2267	EISVPAEI Ep34			

5	2439	QKLPINAL EpBB	EpDD	2602	LPLAVMGGS
	2440	KLPINALS		2603	PLAVMGSS
	2441	LPINALSN		2604	LAVMGSSY
	2442	PINALSNS		2605	AVMGSSYG
	2443	INALSNSL		2606	VMGSSYGE
10	2444	NALSNSLL	Ep41	2607	MGSSYGEQ
	2445	ALSNSLLR		2608	GSSYGEQR
	2446	LSNSLLRH		2609	SSYGEQRV
	2447	SNSLLRHH		2610	SYGEQ RVE
	2448	NSLLRHHN		2611	YGEQRVEE
15	2449	SLLRHHNL	Ep41	2612	GEQRVEEL
	2450	LLRHHNLV		2632	KTPMGFSY
	2451	LRHHNLVY		2633	TPMGFSYD
	2452	RHHNLVYS		2634	PMGFSYDT
	2453	HHNLVYST		2635	MGFSYDTR
20	2454	HNLVYSTI	EpEE	2636	GFSYDTRC
	2455	NLVYSTIS		2637	FSYDTRCE
	2456	LVYSTISR		2638	SYDTRCED
	2469	QKKVTFDR Ep39		2660	YQCCDLDP ~
	2470	KKVTFDRL		2676	LTERLYVG
25	2471	KVTFDRLQ	EpEE	2677	TERLYVGG
	2472	VTFDRLQV		2678	ERLYVGGP
	2473	TFDRLQVL		2679	RLYVGGPL
	2474	FDRLQVLD		2688	NSRGENC G
	2475	DRLQVLDS		2689	SRGENCGY
30	2476	RLQVLDSH	EpFF	2690	RGENCGYR
	2495	ASKVKANL ~		2691	GENCGYRR
	2533	RKAVTHIN EpCC		2692	ENCGYRRC
	2534	KAVTHINS		2693	NCGYRRCR
	2573	GRKPARLI Ep40		2707	TSCGNTLI Ep42
35	2574	RKPARLIV	Ep43	2721	AACRAAGL ~
	2575	KPARLIVF		2757	AFTEAMTR
	2576	PARLIVFP		2758	FTEAMTRY
	2577	ARLIVFPD		2759	TEAMTRY S
	2578	RLIVFPDL		2760	EAMTRYSA
40			Ep43	2761	AMTRY SAP
				2762	MTRY SAPP
45			Ep43		

		2779	DLELIISC Ep44	2878	DLPPIIQR Ep47
		2780	LELIISCS	2879	LPPIIQR
		2794	HDGAGKRV	2880	PPIIQR
5	Ep45	2795	DGAGKRVY	2881	PIIQR
		2796	GAGKRVYY	2882	IIQR
		2797	AGKRVYYL	2883	IQR
		2798	GKRVYYLT	2884	QRLHGLS
10		2799	KRVYYLTR	2885	RLHGLSAF
		2800	RVYYLTRD	2886	LHGLSAFS
		2801	VYYLTRDP	2887	HGLSAFSL
		2802	YYLTRDPT	2888	GLSAFSLH
				2889	LSAFSLHS
15	EpGG	2817	WETARHTP	2890	SAFSLHSY
		2818	ETARHTPV	2891	AFSLHSYS
		2819	TARHTPVN	2892	FSLHSYSP
		2820	ARHTPVNS	2893	SLHSYSPG
20		2821	RHTPVNSW	2894	LHSYSPGE
		2822	HTPVNSWL	2895	HSYSPGEI
		2823	TPVNSWL		
		2824	PVNSWLGN		
		2825	VNSWLGN		
25		2826	NSWLGN		
		2827	SWLGN		
		2828	WLGNI		
		2829	LGNIMEA		
		2830	GNIIMEAP		
30		2831	NIIMEAPT		
		2832	IIMEAPTL		
		2833	IMEAPTLW		
		2834	MEAPTLWA		
		2835	EAPTLWAR		
35		2836	APTLWARM		
		2837	PTLWARM		
		2838	TLWARM		
		2839	LWARM		
		2840	WARM		
40		2841	ARM		
		2842	RM		
		2843	M		
		2863	LDCEIYGA Ep46		
45		2864	DCEIYGAC		
		2865	CEIYGACY		
		2866	EIYGACYS		
		2867	IYGACYSI		

2912	ICVPPIPA	Er48
2913	CVPPIPAV	
2914	VPPIPAV P	
2938	AAICCKVI	Er49
2939	AICCKVIE	
2940	ICCKVIEI	
2966	II CVETA	
ErNN 2984	V NAPPV	ErII

IV. В. ДИФЕРЕНЦИАЛНО ИЗСЛЕДВАНЕ

Следващото по-долу изследване се провежда за да бъдат отличени ранните антигени от по-късните. Антителата срещу ранните антигени могат да бъдат открити и използвани за диагностициране на HCV инфекцията много по-бързо.

Няколко кръвни проби са получени от хора с повишени стойности на АЛТ, но негативни за анти-C100-3 антитяло. Пет кръвни проби, получени преди пълната сероконверсия /C100-3 позитивно/ се използват за изследване при разреждане 1:2000. Изследването се провежда както е описано в Раздел IV. А. по-горе. Успоредно с това, се провежда инкубиране на дубликат от иглички с пероксидазно-белязан кози анти-човешки IgM специфичен антисерум. Епитопите, имунореактивни с IgM антитела са ранни епитопи.

Резултатите показват, че най-ранните епитопи са намерени в областта, отстояща от около аминокиселина 480 до аминокиселина 650. Частично силни епитопи са намерени между аминокиселини номера 506, 510, 523, 553, 562, 580 и областта от 590 до 620, като за тях е установено, че са IgM октамери. Изследвания, които

използват антигени, носещи епитопи от тази област позволяват диагностициране на HCV инфекция на един ранен етап в сравнение с последващи, използващи други антигени.

Допълнително са изследвани серия от плазмени проби, взети от пет пациента, страдащи от пост-трансфузионен HANB хепатит, които изследвания се провеждат в 3-12 години. Наред с кининско-рибонуклеазин Първите данни от кръвни проби са по-малко от водния седимент. Всяка проба се тества за IgG и IgM посредством ELA срещу един същински антиген /C22/, два повърхностни /напухнали / антигена / E1 и E2 / и три антигена от не-структурни области / C33e, C100/и II 5 /. Установи се, че IgM отговора на C22 и C33e предшества IgG отговора за тези антигени. II-5 също индуцира IgM отговор, но този отговор не предшества IgG отговора за този антиген. Така, може да се приготви проба, способна да определи на много ранен етап от инфекцията посредством използване на епитопи, получени от C22 и C33e области и изпитване за IgM свързване. Антитела срещу C33e областта се съхраняват за много дълъг период от време, което предполага, че диагностични проби, насочени срещу C33e биха били най-надеждни.

IV. C. Секвенционни варианти в HCV изолати от различни индивиди.

Изолати от HCV, които съдържат последователности, отклоняващи се от C/DC/HCV1, са идентифицирани у хора, някои от които са серологично позитивни за анти-C100-3 антитела / HC10 e антитело негативен /. Идентифицирането на тези нови изолати се съпътства от клониране и съгласяване на сегменти от HCV генома които са амплифицирани посредством PCR техника с помощта на

СДС/НС1 последователности. Методът използва праймери и сонди основани на НСV сДНК последователностите, описани тук. Първият етап в метода е синтезата на сДНК за всеки от НСV генома, или неговия мекдинен репликатор, с помощта на обратна транскрип-таза. След синтезата на НСV сДНК и преди амплификацията, РНК в пробата се разгражда по познати начини. Разграденият сегмент от НСV сДНК след това се амплифицира чрез използването на под-ходящи праймери. Амплифицираните крайни последователности се клонират и клоновете, съдържащи амплифицираните последовател-ности се откриват със сонда, която е комплементарна на последо-вателността, лежаща между праймерите, но която не се припокрива с тях.

IV.C.1. НСV изолати, изолирани от хора в САЩ

Кръвните проби, които са използвани като източник на НСV вирусни, са получени от *University of California, Los Angeles* и от *University of California, San Francisco*. Пробите се скринират за антигела срещу НСV С100-3 антиген с помощта на Е11А изпитване и се подлагат на V *blast* анализ с помощта на нови анти-човешки НРР за измерване на анти НСV антигела. Две проби, # 23 и #27 от American Red Cro *NSV* и от *University of California, San Francisco* съответно, се определят като *NSV* *NSV* позитивни съгласно това изследване.

Вирусните частици, намиращи се в серума от тези проби се изолират чрез *ultra* центрофугиране при условията, описани от Вгас *et al.* /1985/. РНК се екстрахира от частичките чрез разграж-дане с протеиназа К и *SLS* при крайна концентрация 10 μ g/ml протеиназа К и 0,1% Д / разграждането се осъществява за 1 час при 37°C. Вирусната РНК по-нататък се пречиства чрез экс-

чиства чрез екстракция с хлороформ-фенол.

HCV РНК от препаратите на РНК се транскрибира обратно в cДНК. След като се синтезират двете вериги на cДНК, получената cДНК се амплифицира по PCR метода. HCV cДНК-те в три клона, получени от всеки HCV изолат, се подлага на секвенционен анализ. Анализът се провежда главно чрез метода, описан от Снеп и Seeberg /1985/.

Съгласуваните последователности от клона, получени от HCV в пробите 23 и 27 са показани на Фиг. 3 и Фиг. 4, съответно. Различните последователности са също показани на тези фигури, доколкото са аминокиселини, кодирани в съгласуваните последователности.

Фигури 5 и 6 показват сравнение на позитивно верижните нуклеотидни последователности / Фиг.5/ и предполагаемите аминокиселинни последователности / Фиг.6 / от пробите 23, 27 и HCV1. Аминокиселинните последователности от HCV1 на Фиг.6 представят аминокиселинните номера 129-467 от HCV полипротеина, кодиран от голямата ORF в HCV геномната РНК. Изследване на Фиг.5 и Фиг.6 показва, че това са варианти в последователностите на трите изолирани клона. Секвенционните вариации на нуклеотидно ниво и на аминокиселинно ниво са сумирани на таблицата, която следва непосредствено по-долу. В таблицата, аминокиселините означени като S и NS1 представят аминокиселинните номера 130 до 380 и 380 до 470, съответно, като тези области са познати. Номерацията е от предполагаемия инициращ метионин. Определянето като S и NS1 се основава на позиционирането на последователностите, кодиращи полипептидите, с помощта на модела на Флавивирусите. Както бе дискутирано по-рано, обаче, последните доказателства показват, че няма пълна корелация между HCV и Флавивирусите по отношение на вирусните полипептидни области,

по-специално в предполагаемите E/NS1 области. Наистина, HCV полипептидите и техните кодиращи области могат да показват съществени отклонения от Флавивирусния модел.

ТАБЛИЦА 1

Хомоложност на последователностите

	навсякъде	%	NS1	навсякъде	%	NS1
	%	%	%	%	%	%
HCV ₁ /HCV ₂₃	93	95	95	92	95	87
HCV ₁ /HCV ₂₇	89	93	84	89	96	82
HCV ₂₃ /HCV ₂₇	89	93	85	90	93	84

Независимо че са налице вариации в новонзолираните HCV последователности, клонираните последователности от проби 23 и 27 / наречени HCV₂₃ и HCV 27 / всеки съдържа 1019 нуклеотида показвайки отсъствие на делетиране и допълнителни мутанти в тази област в подобраните клонове. Последователностите на Фиг. 5 и 6 също показват, че изолираните последователности не са преустроени в тази област.

Сравнението на съгласуваните области от HCV₁ и другите изолати на HCV е сумирано на Таблицата , по-горе. Секвенционните вариации между изолатата HCV₁ от шимпанзе и HCV изолиран от хора са почти еднакви с тези, наблюдавани между HCV с човешки произход.

Интересно е да се знае, че секвенционните вариации между в два от предполагаемите области не са еднакви. Последователностите в предполагаемия S регион очевидно е относително постоянна и по-малко разхвърляна по този регион. Обратно, предполагаемата II 1 област има по-висока степен на вариационност от

колкуто цялостната последователност, като вариациите очевидно са поместени в един хипервариабилен дял от около 28 аминокиселини, които са локализирани около 70 аминокиселини надолу от вероятният N-край от предполагаемия полипротеин.

Независимо че може да се смята че откритите вариации са въведени по време на амплификационния процес, като че не всички вариации са от този характер. Установено е, че Тао полимеразата въвежда грешки в последователността при приблизително 1 база за 10 килобази от ДНК матрицата за един цикъл / $aik1$ от $a1$, 1988 /. На основата на тази оценка, могат да бъдат въведени до 7 грешки по време на амплификационният PCR процес в 1019 bp ДНК фрагмент. Независимо от това, трите субклона на HCV-23 и HCV-27 водят до 29 и 14 базови вариации, съответно. Това предполага, че тези вариации са природно срещани се. Около 60% от измененията в базите са тихи /слаби/ мутации, които не променят аминокиселинната последователност. Вариации, въведени от Тао полимеразата по време на PCR амплификацията би следвало да се очаква, че се проявява само понякога; обаче резултатите показват, че вариантите последователности са сгрупирани при поне един специфичен регион.

IV.C.2. HCV ИЗОЛАТИ ОТ ХОРА В ИТАЛИЯ И САЩ

Сегменти от HCV РНК представени в различни изолати, се амплифицират посредством HCV/cPCR метода. Тези сегменти обхващат област от 0,6 Kb до 1,6 Kb надолу от метионина-кодиращият старт кодон от предполагаемият HCV полипротеин. Изолатите са от биологични проби, получени от HCV инфектирани индивиди. По-специално, изолат HCT #18 е от човешка плазма от индивид от САЩ, HС1 и HС10 са от чернодробна биопсия на пациент от Италия, и T₂ е от мононуклеотична фракция на периферна кръв

от Американски пациент. Сравним сегменти на HCV РНК се изолирани от шимпанзе.

РНК се изолира от проби човешка плазма с помощта на фенол:CHCl₃: изоамил алкохолна екстракция. 0,1 мІ или 0,01 мІ плазма се разрежда до крайна обем 1,0 мІ, с TEIV/протеиназа K / разтвор / 0,05 М Трис-HCl, рН 8,0, 0,001 М ЕДТА, 0,1 М I₂Сl, 1 мо/мІ протеиназа K и 0,5% /, съдържащ 10 до 40 мо/мІ полидезоксирибонуклеинова киселина и се инкубира на 37°C за 60 мин. След това протеиназно разграждане, получената в резултат плазма на фракция се депротеинизира посредством екстрахиране с TE / 50 mM Трис-HCl, рН 8,0, 1 mM ЕДТА / наситен фенол, рН 6,5. Фенолната фаза се отдели чрез центрофугиране и се реекстрахира с TEIV съдържащ 0,1% . Получените в резултат водни фази от всяка екстракция се отливат и се екстрахират двукратно с еднакъв обем фенол/хлороформ/изоамилов алкохол / 1:1 / 99:1 // и след това двукратно с еднакъв обем от смес 99:1 от хлороформ /изоамилов алкохол. След фазово разделяне чрез центрофугиране, водната фаза се довежда до крайна концентрация от 0,2 М I₂а-ацетат и нуклеиновите киселини се преципитират чрез добавяне на два обема етанол. Преципитираните нуклеинови киселини се възстановяват чрез ултрацентрифугиране в S V 41 ротор при 38K, за 60 мин при 4°C или в микрофужна епруветка за 10 мин при 10 K, 4°C.

РНК, екстрахирана от чернодробна биопсия бе осигурена от др. F. Bonino, O. resale Macrolago et al. CioVanni Battista, Torino, Италия. Мононуклеотидната фракция е получена чрез седиментация на еднакви количества кръв от хора чрез Ficoll - Paque / Paque1a Cогр. / с помощта на инструкциите на производител. Общото количество РНК се екстрахира от фракцията с помощта на гуанидин-тиоцианатната процедура, описана от Choo et al., 1989.

Синтезата на HCV cДНК от пробите се осъществява посредством участието на обратна транскриптаза. След фенолно преципитиране, преципитираната РНК или фракция на нуклеинова киселина се изсушава и се ресуспендира в третирана с ДЕРС дистилирана вода. Вторичните структури в нуклеиновите киселини се разрушават чрез нагряване при 65°C за 10 мин, и пробите се охлаждат незабавно върху лед. cДНК се синтезира използвайки 1 до 3 мо от общата РНК от черен дроб, или от нуклеинова киселина /или РНК / екстрахирана от 10 до 100 мl плазма. При синтезата се използва обратна транскриптаза и се провежда в 25 мl реакционна смес, както е указано на производителя, BPL. Всички реакционни смеси за cДНК синтезата съдържат 23 единици от РНК-аза инхибитор, Рна 1п, / П-пег / Ромеда /. След cДНК синтезата, реакционните смеси се разреждат с вода, варят се 10 мин и бързо се охлаждат върху лед.

Всеки набор от проби се подлага на два цикъла PCR амплификация. Праймерите за амплификация са подбрани така, че да амплифицират области, означени като "Еп I" и "Еп R". Първата обхваща нуклеотиди 669-1243 и предполагаемите аминокиселини 117 до 308; втората област - "Еп R" обхваща нуклеотиди 1215-1629 и кодира предполагаемите аминокиселини от 300 до 408 /предполагаемите аминокиселини са номерирани започвайки от предполагаемия мотивен инициращ кодон./.

PCR реакциите се провеждат предимно според инструкциите на производителя /Сети -Регип - Емег/, с изключение на добавянето на 1 мо РНК-аза А. Реакциите се провеждат в краен обем 100 мl. PCR се осъществява за 30 цикъла, при режим от 94°C /1 мин/, 37°C /2 мин/ и 72°C /3 мин/, със 7 минутна екстензия при 72°C за последният цикъл. След това пробите се экс-

трахират с фенол: CHCl_3 , двукратно етанолна преципитация, ресуспендиране в 10 mM Трис HCl , pH 8,0 и концентриране с помощта на Центрикон-30 / Амикон / филтрация. При тази процедура успешно се отстраняват олигонуклеотиди, по-малки от 30 нуклеотида по размер; по този начин се отстраняват праймерите от първия кръг на PCR амплификацията.

Концентрираните с Центрикон-30 проби се подлагат на втори кръг PCR амплификация. Тя се повтаря 35 цикъла при режим 94°C / 1 мин /, 60°C / 1 мин / и 72°C / 2 мин / със 7-минутна екстензия при 72°C за последния цикъл. След това пробите се екстрахират с фенол: CHCl_3 , преципитират се двукратно и се разграждат с EcoRI . PCR реакционните продукти се анализират чрез електрофоретично разделяне на продуктите върху 6% полиакриламидни гелове. ДНК с приблизителен размер като този на очакваният PCR продукт се подлага на електроелуация от геловите и се субклонира или в pSEM-4 плазмиден вектор или в pOT11. Очакваният размер на продукта за E_H I и E_H R след първият кръг на амплификация е 615 вр и 683 вр съответно; след вторият кръг на амплификацията, очакваният размер на продукта за E_H I и E_H R е 414 вр и 575 вр, съответно. Плазмидите, съдържащи амплифицираните продукти се използват за ~~инфекционни~~ трансформиране на гостоприемникоми клетки; pSEM-4 плазмид се използва за трансформиране на ДНБ-алфа, и pOT11 се използва за трансформиране на С600 делта -HPI. Клоновете на трансформираните клетки, които се хибрилизират към подходящи HCV сонди или пак които имат инсерти с правилен размер, се ~~кни~~ подбират. След това инсерти-те се клонират в M13 и се съгласуват. Сондите за всички HCV / cPCR продукти се състоят от ^{32}P белязани сектори от HCV cДНК получени посредством PCR амплификация.

Секвенционна информация за варианти на Еп I областта е получена от 3 клона от НСТ-18, 2 клона от ТН, 3 клона от ЕС1 и от НCV1 клоновете. Сравнение на структурата на нуклеотидната последователност от всеки изолат, получен от тези клонове е показано на Фиг. 7. На фигурата всяка последователност е показана от 5 до 3 за смисловата верига за Еп I областта и секвенциите са подредени. Вертикалните линии и главните букви показват секвенционната хомоложност, отсъствието на линии и малките букви показват липса на хомоложност. Последователностите, показани на линиите са както следва: линия 1, ТНорп; линия 2, ЕС1; линия 3, НСТ-18; линия 4, НCV1.

Секвенционната информация за вариантите в Еп Р областта е получена от два клона на ЕС10, и от НCV1 клоновете. Двата ЕС10 клона се отличават само по един нуклеотид. Сравнение на нуклеотидните последователности на ЕС10 /клон 2 / и състава на НCV1 последователностите е показано на Фиг. 8; всяка последователност е показана от 5 до 3 края за смисловата верига на Еп Р областта и последователностите са подравнени. Двойният пуктир между последователностите обозначава секвенционната хомология.

Сравнение на аминокиселинните последователности, кодирани в Еп VI /аминокиселини # 117-308 / и Еп Р областта /аминокиселини = 300-438 / за всеки от изолатите е показано на Фиг. 9 и Фиг. 10 съответно. Във фигурите са включени последователностите за изолатите IN23 и IN27, описани по-горе. Освен това, означени са последователностите за Японският изолат; тези последователности са предоставени от Др. Т. Миязума, Япония. На фигурите, аминокиселинните последователности за областта са дадени в тяхната цялост за НCV1 и нехомоложните аминокисе-

лини в различните изолати са означени.

Както се вижда на Фиг. 9, в областта Еп I навсякъде има хомоложност около 93% между HCV1 и другите изолати. HCV18, Tп и EC1 имат около 97% хомоложност с HCV1; IN23 и IN27 притежават около 96% и около 95% хомоложност, съответно, с HCV1.

Фиг. 10 показва, че хомологите в Еп. Р областта са значително по-малки от Еп. I областта; не по-малко един субрегион се явява хипервариабилен / т.е. от аминокиселини 383-405 /.

Тези данни са сумирани на Таблицата която следва непосредствено по-долу.

ТАБЛИЦА : ХОМОЛОЖНОСТ на Еп. Р областта

Изолат	Процент хомоложност с HCV1	
	AA330 - AA438	AA383 - AA405
IN23 / US /	83	57
IN27 / US /	80	39
Японски	73	48
EC10/Италия /	84	48

VI. ИНДУСТРИАЛНА ПРИЛОЖИМОСТ

Епитопите, идентифицирани тук могат да бъдат използвани за получаване на полипептидни продукти, както е описано по-горе за приложения като скрининга на кръв за HIV инфекция, клинична HCV диагностика, получаването на антитела и медикаменти. Други приложения са описани по-горе и още нови се очакват за специалистите в областта.

VII. ~~Antiparipa~~

- Barr *et al.*, Biotechniques (1986) 4:428.
- Bradley *et al.*, Gastroenterology (1985) 88:773.
- Botstein, Gene (1979) 8:17.
- 5 M.A. Brinton, (1986) in "The Viruses: The Togaviridae and Flaviviridae" (Series eds. Fraenkel-Conrat and Wagner, vol. eds. Schlesinger and Schlesinger, Plenum Press), p.327-374.
- Broach (1981) in: "Molecular Biology of the Yeast - *Saccharomyces*, Vol. 1, p.445, Cold Spring Harbor Press.
- 10 Broach *et al.*, Meth Enzymol (1983) 101:307.
- Catty (1988), "Antibodies, Volume 1: A Practical Approach" (IRL Press).
- Chaney *et al.*, Cell Mol Genet (1986) 12:237.
- Chakrabarti *et al.*, Mol Cell Biol (1985) 5:3403.
- Chang *et al.*, Nature (1977) 198:1056.
- 15 Chen and Seeburg, DNA (1985) 4:165.
- Chirgwin *et al.*, Biochemistry (1979) 18:5294.
- Chomczynski and Sacchi, Anal Biochem (1987) 162:156.
- Choo *et al.*, Science (1989) 244:359.
- Clewell *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA (1969) 62:1159.
- 20 Clewell, J Bacteriol (1972) 110:667.
- Cohen, Proc Natl Acad Sci USA (1972) 69:2110.
- Cousens *et al.*, Gene (1987) 61:265.
- De Boer *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA (1983) 292:128.
- Dreesman *et al.*, J Infect Dis (1985) 151:761.
- 25 S.M. Feinstone and J.H. Hoofnagle, New Engl J Med (1984) 311:185.
- Felgner *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA (1987) 84:7413.
- Fields & Knipe (1986), "Fundamental Virology" (Raven Press, N.Y.).
- Fiers *et al.*, Nature (1978) 273:113.
- R.J. Gerety *et al.*, in "Viral Hepatitis and Liver Disease" (B.N. Vyas, J.L. Dienstag, and J.H. Hoofnagle, eds)
- 30 Glennie *et al.*, Nature (1982) 295:712.
- Gluzman, Cell (1981) 23:175.
- Goeddel *et al.*, Nuc Acids Res (1980) 8:4057.

- Graham and Van der Eb, Virology (1978) 52:546.
- Grunstein and Hogness, Proc Natl Acad Sci USA (1975) 73:3961.
- Grych *et al.*, Nature (1985) 316:74.
- Gubler and Hoffman Gene (1983) 25:263.
- 5 Hahn, Virology (1988) 162:167.
- Hammerling *et al.*, (1981), "Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas".
- Han, Biochemistry (1987) 26:1617.
- Helfman, Proc Natl Acad Sci USA (1983) 80:31.
- Hess *et al.*, J Adv Enzyme Reg (1968) 7:149.
- 10 Hinnen *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA (1978) 75:1929.
- Hitzeman *et al.*, J Biol Chem (1980) 255:2073.
- Holland *et al.*, Biochemistry (1978) 17:4900.
- Holland, J Biol Chem (1981) 256:1385.
- Holland and Holland, J Biol Chem (1980) 255:2596.
- 15 Hoopes *et al.*, Nuc Acids Res (1981) 9:5493.
- Houghton *et al.*, Nuc Acids Res (1981) 9:247
- T.V. Hunyh *et al.*, (1985) in "DNA Cloning Techniques; A Practical Approach"
(D. Glover, Ed., IRL Press, Oxford, U.K.) pp. 49-78.
- Immun Rev (1982) 62:185.
- 20 Ito *et al.*, Agric Biol Chem (1984) 48:341.
- Iwarson, British Medical J (1987) 295:946.
- Kennett *et al.* (1980) "Monoclonal Antibodies".
- Kniskern *et al.*, Gene (1986) 46:135.
- Kyte and Doolittle, J Mol Bio (1982) 157:105-132.
- 25 Laemmli, Nature (1970) 227:680.
- Lee *et al.*, Science (1988) 239:1288.
- Luckow and Summers, Virology (1989) 17:31.
- Mackett *et al.*, J Virol (1984) 49:857.
- T. Maniatis *et al.* (1982) "Molecular Cloning; A Laboratory Manual" (Cold
Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y.).
- 30 Sambrook *et al.* (1989), "Molecular Cloning; A Laboratory Manual", Second
Edition (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y.).
- Manning and Mocarski, Virology (1988) 167:477.

3. Mayer and Walker, eds. (1987), "Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology" (Academic Press, London).
- Maxam *et al.*, Meth Enzymol (1980) 65:499.
- MacNamara *et al.*, Science (1984) 226:1325.
- 5 Messing *et al.*, Nuc Acids Res (1981) 9:309.
- Messing, Meth Enzymol (1983) 101:20-37.
- Michelle *et al.*, Int. Symposium on Viral Hepatitis.
- Monath (1986) in "The Viruses: The Togaviridae And Flaviviridae" (Series eds. Fraenkel-Conrat and Wagner, vol. eds. Schlesinger and Schlesinger, Plenum Press), pp. 375-440.
- 10 Moss (1987) in "Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells" (Miller and Calos, eds., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.), p. 10.
- Nagahuma *et al.*, Anal Biochem (1984) 141:74.
- Neurath *et al.*, Science (1984) 224:392.
- 15 Nisonoff *et al.*, Clin Immunol Immunopathol (1981) 21:397-406.
- L.R. Overby, Curr Hepatol (1985) 5:49.
- L.R. Overby, Curr Hepatol (1986) 6:65.
- L.R. Overby, Curr Hepatol (1987) 7:35.
- Pachl *et al.*, J Virol (1987) 61:315.
- 20 Peleg, Nature (1969) 221:193.
- Pfefferkorn and Shapiro (1974), in "Comprehensive Virology", Vol. 2 (Fraenkel-Conrat & Wagner, eds., Plenum, N.Y.) pp. 171-230.
- A.M. Prince, Ann Rev Microbiol (1983) 37:217.
- Rice *et al.*, Science (1985) 229:726.
- 25 Rice *et al.* (1986) in "The Viruses: The Togaviridae And Flaviviridae" (Series eds. Fraenkel-Conrat and Wagner, vol. eds. Schlesinger and Schlesinger, Plenum Press), p.279-328.
- Roehrig (1986) in "The Viruses: The Togaviridae And Flaviviridae" (Series eds. Fraenkel-Conrat and Wagner, vol. eds. Schlesinger and Schlesinger, Plenum Press)
- 30 Sadler *et al.*, Gene (1980) 8:279.
- Saiki *et al.*, Nature (1986) 324:163.
- Saiki *et al.*, Science (1988) 239:487.

- Sanger *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA (1977) 74:5463.
- Setlow, ed. (1988), "Genetic Engineering" Vol. 10, pp. 195-219 (Plenum Publishing Co., N.Y.
- Schlesinger *et al.*, J Virol (1986) 60:1153.
- 5 M. Schreier *et al.*, (1980) "Hybridoma Techniques"
Scopes (1984), "Protein Purification, Principles and Practice", 2nd Ed., (Springer-Verlag, N.Y.).
- Shimatake *et al.*, Nature (1981) 292:128.
- Singh *et al.*, Nuc Acids Res (1983) 11:4049.
- 10 Sippel, Eur J Biochem (1973) 37:31.
- Smith *et al.*, Mol Cell Biol (1983) 3:2156-2165.
- Steimer *et al.*, J Virol (1986) 58:9.
- Stollar (1980), in "The Togaviruses" (R.W. Schlesinger, ed.), pp. 584-622.
- Stuve *et al.*, J Virol (1987) 61:326.
- 15 Sumiyoshi *et al.*, Virology (1987) 161:497.
- Taylor *et al.*, Biochim Biophys Acta (1976) 442:324.
- Towbin *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA (1979) 76:4350.
- Tsu and Herzenberg (1980), in "Selected Methods In Cellular Immunology" (W.H. Freeman and Co.) pp. 373-391.
- 20 Vytdehaag *et al.*, J Immunol (1985) 134:1225.
- P. Valenzuela *et al.*, Nature (1982) 298:344.
- P. Valenzuela *et al.*, (1984), in "Hepatitis B" (I. Millman *et al.*, ed, Plenum Press) pp. 225-236.
- Warner, DNA (1984) 3:401.
- 25 Ward *et al.*, Nature (1989) 341:544.
- Wu and Grossman, Meth Enzymol (1987), 154 "Recombinant DNA", Part E.
- Wu, Meth Enzymol (1987), 155, "Recombinant DNA", part F.
- Zoller, Nuc Acids Res (1982) 10:6487.
- U.S. Patent No. 4,341,761 U.S. Patent No. 4,466,917
- 30 U.S. Patent No. 4,399,121 U.S. Patent No. 4,472,500
- U.S. Patent No. 4,427,783 U.S. Patent No. 4,491,632
- U.S. Patent No. 4,444,887 U.S. Patent No. 4,493,890
- U.S. Patent No. 4,816,467

ПАТЕНТНИ ПРЕТЕНЦИИ

1. Полипептид, обхващащ скъсена HCV последователност, която съдържа HCV епитоп с формулата :

$$aa_x - aa_y$$

където aa означава аминокиселина ;

x и y са цяло число, такова че $y - x - 6$;

$aa_x - aa_y$ означава част от аминокиселинната последователност на Фигура 1 ; и

x е избран от групата, състояща се от :

23-34, 36, 66-79, 81-94, 96-98, 101-103, 186-189, 191, 206, 223, 232, 256, 286, 297-299, 321, 347, 357, 413, 414, 432, 465-471, 480-484, 501, 502, 521, 540-549, 579, 594-599, 601-613, 641, 662-665, 685, 705, 706, 729, 782-789, 801, 851-855, 893, 916, 928, 946, 952-954, 1026, 1072, 1109, 1112-1117, 1218, 1240, 1280-1285, 1322, 1338, 1371, 1384, 1410, 1411, 1454, 1492, 1493, 1532-1535, 1560, 1561, 1566-1568, 1571-1577, 1601-1607, 1615-1620, 1655, 1695, 1710-1712, 1728, 1729, 1758-1762, 1781, 1808, 1821, 1851, 1880, 1908-1913, 1925, 1940-1948, 1951, 1966-1969, 1999, 2001-2004, 2006-2014, 2024, 2048-2053, 2055-2057, 2071, 2088-2093, 2108, 2122-2148, 2165, 2187, 2226-2232, 2244-2249, 2267, 2281-2286, 2288, 2289, 2325-2327, 2346, 2347, 2349, 2382, 2401, 2417-2422, 2439-2444, 2446-2456, 2469, 2471-2476, 2495, 2533, 2534, 2573-2578, 2602-2604, 2606-2612, 2632-2638, 2660, 2676-2679, 2688-2693, 2707, 2721, 2757-2762, 2779, 2794, 2795, 2797-2799, 2801, 2802, 2817-2843, 2863-2867, 2878-2884, 2886-2895.

2. Полипептид, съгласно претенция 1, който има дължина около 100 аминокиселини или по-малко.
3. Полипептид, съгласно претенция 2, където $y - x = 50$.
4. Полипептид, съгласно претенция 2, където $y - x = 20$.
5. Полипептид, съгласно претенция 2, където $y - x = 10$.
6. Полипептид, съгласно претенция 2, където x е избран от групата, състояща се от 506, 510, 523, 553, 562, 580 и 590-620.
7. Полипептид с дължина от около 100 аминокиселини или по-малко, обхващащ един HCV епитоп в формулата

$$aa_x - aa_y$$

където aa означава аминокиселина ;

x и y са цели числа, така че $y - x = 6$;

$aa_x - aa_y$ означава част от аминокиселинната последователност от Фигура 1 ; и x е избран от група състояща се от 35 / където y е по-малко от 45 / ,

80 / където y е по-малко от 90 / , 95 / където y е по-малко от 110 / , 99 / където y е по-малко от 120 / , 100 / където y е по-малко от 130 / , 130 / където y е по-малко от 210 / , 500 / където y е по-малко от 550 / , 600 / където y е по-малко от 625 / , 1260 / където y е по-малко от 1280 / , 1569 / където y е по-малко от 1931 / , 1570 / където y е по-малко от 1590 / , 1694 / където y е по-малко от 1735 / , 1949 / където y е по-малко от 2124 / , 1950 / където y е по-малко от 1985 / , 2000 / където y е по-малко от 2050 / , 2005 / където y е по-малко от 2025 / , 2054 / където y е по-малко от 2223 / , 2250 / където y е по-малко от 2330 / , 2287 / където y е по-малко от 2385 / , 2290 / където y е по-малко от 2310 / , 2345 / където y е по-малко от 2345 / , 2348 / където y е по-малко от 2466 / , 2445 / където y е по-малко от

2475/, 2470/където у е по-малко от 2490/, 2605/където у е по-малко от 2620/, 2780/където у е по-малко от 2830/, 2796/където у е по-малко от 2886/, 2800/където у е по-малко от 2850/ и 2885/където у е по-малко от 2905/.

8. Реагент за имунологично изпитване, включващ полипептид съгласно нолто и да е от претенции 1 - 7.

9. Реагент за имунологично изпитване съгласно претенция 8, където у - х = 50.

10. Реагент за имунологично изпитване съгласно претенция 8, където х е избран от групата състояща се от 506, 510, 523, 553, 562, 560 и 590 - 620.