

632489

Humán HIV-1 vírus

07004

4

ELJÁRÁS HUMÁN IMMUNHIÁNY VIRUSRA SPECIFIKUS ANTITESTEKHEZ KÖTŐDŐ
PEPTIDEK ELŐÁLLÍTÁSÁRA, ELJÁRÁS A FENTI VIRUS DIAGNOSZTIZÁLÁSÁRA,
ÉS AZ ERRE HASZNÁLHATÓ DIAGNOSZTIKAI KÉSZLET

16.01.01
C. C. F. K. T. 1/10
G. C. W. 31/100

THE WELLCOME FOUNDATION LIMITED, London, Nagy-Britannia

G. C. W. 31/100

Bejelentés napja: 1989. 11. 30.

Elsőbbsége: 1988. 12. 01. (8828097.9) Nagy-Britannia

K I V O N A T

-55834-

A fenti leírás tárgyát képező eljárás

A legfeljebb 30 aminosavmaradékból álló szintetikus
peptidek, amelyek tartalmaznak egy X_1X_2WGC szekvenciát - a
képletben

X_1 és X_2 egymástól függetlenül aminosavmaradékot jelent -
és képesek valamilyen típusu HIV-re specifikus antitesthez kö-
tődni, továbbá terminális karboxilcsoportjuk adott esetben amid-
formában van, és a bennük lévő cisztein-maradékok merkaptocso-
portja blokkolt, diagnosztikai vizsgálatokban használhatók, HIV
antitestek jelenlétének kimutatására.

A fenti peptidek előállítását is ismertetik.

1. leírás (1)
2. leírás

6224/83

27894

Handwritten pleading

A'

Képviselő:

Nagy C. D. D. 17/83

DANUBIA SZABADALMI ÉS VÉDJEGY IRODA KFT

C. D. D. 2/80

Budapest

C. D. D. 33/80

C. D. D. 33/80

. - 55834 -

ELJÁRÁS HUMÁN IMMUNHIÁNY VIRUSRA SPECIFIKUS ANTITESTEKHEZ KÖ-
TŐDŐ PEPTIDEK ELŐÁLLÍTÁSÁRA, ELJÁRÁS A FENTI VIRUS DIAGNOSZ-
TIZÁLÁSÁRA, ÉS AZ ERRE HASZNÁLHATÓ DIAGNOSZTIKAI KÉSZLET

THE WELLCOME FOUNDATION LIMITED, London, Nagy-Britannia

Feltaláló:

DUNCAN Richard Julian Stuart,

Beckenham, Kent, Nagy-Britannia

Bejelentés napja: 1989. 11. 30.

Elsőbbsége: 1988. 12. 01. /8828097.9/ Nagy-Britannia

68446-881-SI

A találmány tárgya eljárás olyan peptidek előállítására, amelyek a humán immunhiány virusra (HIV-ra) specifikus antitestekhez képesek kötődni, eljárás a HIV diagnosztizálására, és az erre használható diagnosztikai készlet.

A HIV felfedezése után szükségessé vált e vírus jelenlétének kimutatása. Az 1-es típusu HIV-re specifikus antitestek kimutatására szolgáló első generációs vizsgálatokban inaktivált HIV-1-et használnak. Olyan második generációs vizsgálati módszer fejlesztettünk ki az antitestre, amelyben a viruson azonosított antigén-molekularészletnek megfelelő szintetikus peptideket használunk. Gnann és munkatársai [*Science* 237, (1987. 09. 11.)] ismertettek olyan szintetikus peptides immunológiai vizsgálatokat, amelyekben meg lehet különböztetni az 1-es és 2-es típusu HIV (HIV-2) által okozott fertőzéseket.

Sikerült olyan különlegesen specifikus immunológiai vizsgálatot kifejleszteni a HIV antitestekre, szintetikus peptidek alkalmazásával, amelyek szabad merkaptocsoportjai blokkoltak. A peptidek a HIV-1 gp41 glikoproteinjén levő, immunológiai szempontból domináns antigén-molekularész szekvenciáján és a megfelelő HIV-2 szekvencián alapulnak.

Ennek megfelelően a találmány tárgya eljárás legfeljebb 30 aminosavmaradékból álló, valamely HIV típusra specifikus antitesthez kötődni képes peptidek előállítására, amelyek egy (I) általános képletű szekvenciát tartalmaznak. A képletben X_1 és X_2 jelentése azonosan vagy eltérően egy aminosavmaradék; a terminális karboxilcsoport adott esetben amid formában van; és minden C-maradék merkaptocsoportja blokkolt.

Az aminosavmaradékokat az egybetűs kóddal jelöljük

[Eur. J. Biochem. 138, 9 - 37 (1984)]. A terminális karboxil-csoport előnyösen amid - azaz $-\text{CONH}_2$ - formában van, karboxil - azaz $-\text{COOH}$ - forma helyett. Az oldalláncban lévő merkaptocsoport(ok) jellemző módon blokkoltak. Ezzel megakadályozható a diszulfid-hidak kialakulása, megelőzhető a cisztein-maradékok oxidációja, és megakadályozható a peptidek hordozókhoz való nemkívánatos kötődése.

A peptidek (I) általános képletű szekvenciát tartalmaznak. A HIV-1 antitesthez kötődő peptidekben X_1 jelentése előnyösen I, L vagy M. A HIV-2 antitesthez kötődő peptidekben X_1 jelentése előnyösen N és X_2 jelentése S. A többi aminosavmaradékot azonban változtathatjuk, feltéve, hogy a peptid a kívánt módon képes a HIV antitesthez kötődni. Tehát az (I) általános képletű szekvencia N-terminálisához és/vagy C-terminálisához rendszerint további maradékok is kapcsolhatók, és a peptid így is kötődik az antitesthez. Az N-terminális vég legfeljebb 14 aminosavmaradékkal, például legfeljebb 8, vagy legfeljebb 4 aminosavmaradékkal meghosszabbítható. A C-terminálishoz legfeljebb 14, például legfeljebb 8, vagy 6 aminosavmaradék kapcsolható.

Az (I) általános képletű szekvencia a HIV-1 gp41 glikoproteinjén lévő immunológiailag domináns antigén-molekularész egy részéből, és a HIV-2 megfelelő helyéből származik. Ezek a HIV-1 esetén az 599 - 603. aminosavak, és a HIV-2 esetén az 593 - 597. aminosavak. A HIV-1 számozása Wain-Hobson és munkatársai [Cell 40, 9 (1985)] szerint történik, a HIV-2 számozási rendszere Guyader és munkatársai [Nature 326, 662 (1986)] szerinti. Az (I) általános képletű szekvencia egyik vagy mindkét

oldalán lévő aminosavak a HIV specifikus törzsei szekvencia-adatiból következnek. Előnyösek azok a peptidek, amelyek egy HIV-1 törzs 598 - 609. aminosav-maradékból álló szekvenciát, vagy egy másik HIV-típusu törzs megfelelő aminosav-maradékainak szekvenciáját tartalmazzák. HIV-2 esetén ezért előnyösek azok a peptidek, amelyek az 592 - 603. aminosavakból álló szekvenciát tartalmazzák. A szekvencia egy vagy több aminosav szubsztitúciójával módosítható, ami nem változtatja meg a peptid kívánt antitesthez - azaz HIV-1-re vagy HIV-2-re specifikus antitesthez - való kötődését.

A megfelelő aminosav-helyettesítéseket úgy választjuk meg, hogy azok nem változtatják meg az eredeti szekvencia fizikai-kémiai jellegét, például nem változik meg a töltés-sűrűség, hidrofíli/hidrofób jelleg, méret és konfiguráció. Az S például T-vel helyettesíthető, és fordítva; az E D-vel, és fordítva; és a Q N-nel, és fordítva. Ezenkívül a HIV-1 peptid esetén az 598. aminosavmaradék, vagy a HIV-2 peptid esetén az 592. aminosavmaradék K is lehet.

A peptidek rendszerint legalább 6, például legalább 9, vagy legalább 12 aminosavmaradékot tartalmaznak.

A peptidek nem tartalmazzák 30-nál több aminosavmaradékot, például legfeljebb 25 vagy legfeljebb 15 aminosavmaradékból állnak. A peptid teljes szekvenciája előnyösen egy HIV-törzs természetes szekvenciájának felel meg, a szekvencia tartalmazza a HIV-1 esetén az 599 - 603. aminosavmaradékokat, vagy más HIV típusok esetén a megfelelő aminosavmaradékokat. A fenti természetes szekvenciában azonban egy vagy több fent említett szubsztitúció is előfordulhat. A peptidek például az alábbi izolált HIV

törzsekből származhatnak:

HIV-1 (Z-3): Wiley és munkatársai, PNAS USA, 83, 5038 (1986);

HIV-1 (LAV_{BRU}; HTVL-III_B; HTVL-II_{IFR}; WMJ-1; ARV-2): Wain-Hobson és munkatársai (1985); Ratner és munkatársai, Nature 313, 277 (1985); Starcich és munkatársai, Cell, 45, 637 (1986); és Sanchez-Pescador és munkatársai, Science 277, 484 (1985);

HIV-1 (LAV-ELI) és HIV-1 (LAV-MAL): Alizon és munkatársai, Cell, 46, 36 (1986); és

HIV-2_{ROD}: Guyader és munkatársai (1987).

Előnyösek az alábbi szekvenciájú peptidek:

HIV-1: LGLWGCSGKLI

LGIWGCSGKLI

LGIWGCSGKHIC

LGMWGCSGKHIC

HIV-2: NSWGCAFRQVC

KYLQDQARLNSWGCAFRQVC

AIEKYLQDQARLNSWGC

KNSWGCAFRQVCHTTVPWVN

RVTAIEKYLQDQARLNSWGCAFRQVC

A peptidben lévő minden merkaptocsoport védett. A merkaptó-védőcsoport acetamido-metil-csoport lehet, vagy egy szerves higanyvegyületből, maleimidből vagy diszulfid-blokkolószerből származtatható csoport. Diszulfid-blokkolószerre példaként említhetjük az Ellman-reagenst, ditio-piridilt. A védőcsoport előnyösen N-etil-maleimidből származó (a) képletű csoport, vagy (b) képletű acetamido-metil-csoport.

A találmány szerinti **peptidek szintetikus peptidek**.

Ezeket kémiai szintézissel állíthatjuk elő. Szilárd fázisu vagy oldatban végbemenő peptidszintézist alkalmazhatunk. A peptidet így az alábbi eljárással állíthatjuk elő:

- (a) az egyes aminosavakat és/vagy két vagy több aminosavból álló aminosav-fragmentumokat a találmány szerinti peptidnek megfelelő sorrendben kondenzáljuk, mimellett ha az aminosav cisztein, a merkaptocsoport szabad formában van, vagy blokkolt; ily módon egy találmány szerinti peptidet kapunk, amelynek terminális karboxilcsoportja szabad, vagy amid formában van; és
- (b) kivánt esetben a cisztein-maradék(ok) szabad merkaptocsoportját blokkoljuk.

Szilárd fázisu peptidszintézis esetén a kivánt peptid aminosav-szekvenciáját a C-terminális aminosavtól kezdve építjük fel, amelyet oldhatatlan gyantához kötünk. A kivánt peptid-szekvencia kialakítása után a peptidet a gyantáról lehasítjuk.

Ha a peptid-szintézist oldatban hajtjuk végre, a peptidet ismét a C-terminális aminosavból kiindulva építhetjük fel. A fenti aminosav karboxilcsoportja a szintézis során végig blokkolt megfelelő védőcsoporttal, amelyet a szintézis végén eltávolítunk.

Bármelyik - szilárd fázisu vagy oldat-fázisu - eljárás esetén a reakció-rendszerbe beadagolt összes aminosav rendszerint védett α -amino-csoporttal és aktivált karboxilcsoporttal rendelkezik. Az aminocsoportot fluoren-9-il-metoxi-karbonil-csoporttal (Fmoc) vagy terc-butoxi-karbonil-csoporttal (Boc) védhetjük. A karboxilcsoportot pentafluor-fenil- vagy 1-oxo-2-hidroxi-dihid-

ro-benzotriazin-észter formájában aktiválhatjuk. Az egyes kondenzációs lépéseket diciklohexil-karbodiimid vagy 1-hidroxi-benzotriazol jelenlétében hajthatjuk végre.

Az oldalláncokban lévő funkciós csoportokat rendszerint szintén védjük, például a lizin oldalláncban lévő aminocsoportját, vagy a treonin oldalláncban lévő hidroxilcsoportját, vagy a cisztein oldalláncban lévő merkaptocsoportját.

Az α -amino-védőcsoportot minden egyes szintézis-lépés után eltávolítjuk. Az oldallánc-védőcsoportokat azonban rendszerint csak a szintézis befejezése után távolítjuk el, vagy kivánt esetben nem távolítjuk el azokat. Védett merkaptocsoport esetén viszont kivánt esetben a védőcsoportot nem távolítjuk el, ha azal blokkolni kívánjuk a merkaptocsoportot. Ha más blokkoló csoportot kívánunk bevinni a peptidbe, vagy a peptidet szabad merkaptocsoport(ka)t tartalmazó formában kívánjuk előállítani, a védőcsoportot eltávolítjuk.

A peptideket tetszés szerint C-terminális karboxilcsoporttal vagy amidcsoporttal állíthatjuk elő. Szilárd fázisú peptid-szintézis esetén ez attól függ, hogy a C-terminális aminosav hogyan kötődik a hordozó gyantához és/vagy a kész peptidet hogyan hasítjuk le a gyantáról. A gyanta általában egy sztirol és/vagy divinil-benzol polimer. A C-terminális aminosav a gyantához észter-kötéssel kapcsolódhat, amelyet erős savval, például trifluor-ecetsavban hidrogén-bromiddal, vagy hidrogén-fluoriddal hasíthatunk C-terminális karboxilcsoportot tartalmazó peptiddé. Ammonolizissel megfelelő amidot állíthatunk elő szabad karboxilcsoportot tartalmazó peptid helyett.

A peptid-amid szilárd fázisu szintézissel való előállításának másik módja az, hogy a peptid C-terminális aminosavját peptid amino-benzhidril-kötéssel kapcsoljuk a gyantához. Ezt úgy alakítjuk ki, hogy diciklohexil-karbediimiddel végezzük a kapcsolást, és a kötést hidrogén-fluoriddal hasíthatjuk, rendszerint hidegen. Oldat-fázisu szintézis esetén attól függ, hogy C-terminális karboxil- vagy amidcsoportot kapunk, hogy a C-terminális aminosav karboxilcsoportját hogyan blokkoljuk, és a szintézis befejezése után hogyan távolítjuk el a védőcsoportot.

A C-terminális karboxilcsoportot tartalmazó peptidet C-terminális amidcsoportot tartalmazó peptiddé alakíthatjuk, és fordítva.

A peptideket rekombináns DNS-eljárásokkal is előállíthatjuk. Így a peptidet kódoló DNS-szekvenciát állítjuk elő. Készítünk egy expressziós vektort, amely a DNS-szekvenciát magában foglalja, és amely képes megfelelő gazdasejtben a peptid kifejezésére.

A DNS-szekvencia a vektorban transzlációs start és stop jelek között helyezkedik el. Megfelelő transzkripciós szabályozó elemeket is alkalmazunk, különösen promotert a DNS-szekvenciára, és egy transzkripciós terminációs helyet.

A DNS-szekvencia a helyes transzkripciós keretben van, így a peptid kifejeződhet a vektorral összeférhető gazdaszervezetben.

Bármely megfelelő gazda-vektor rendszert alkalmazhatunk. A vektor például plazmid lehet. Ebben az esetben bakteriális vagy élesztő gazdaszervezetet használhatunk. A vektor virá-

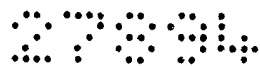
lis vektor is lehet. Ezt emlős sejtvonal sejtjeinek fertőzésére használhatjuk, a peptid kifejezésére.

A blokkolt merkaptocsoportokat tartalmazó peptideket kétféle módon állíthatjuk elő. Egyik módszer szerint védett merkaptocsoportokat tartalmazó cisztein-molekulákat használhatunk az (a) lépésben, amikor a peptidet az aminosav-prekurzorokból felépítjük. Másik módszer szerint szabad merkaptocsoporto(ka)t tartalmazó találmány szerinti peptidet állítunk elő, amelyeket ezután blokkolunk. A merkaptocsoportot blokkoló szer vagy a szabad ciszteinnel, vagy az (I) általános képletű peptiddel reagáltatjuk, a módszertől függően.

Bármely megfelelő, merkaptocsoportot blokkoló szer alkalmazhatunk. Példaként az acetamido-metanolt és a szerves higany, maleimid és diszulfid blokkolószereket említhetjük. Megfelelő diszulfid blokkolószer például az Ellman-reagens és a ditio-piridil. Előnyösen N-etil-maleimidet vagy acetamido-metanolt használunk.

Ha a találmány szerinti peptidet szabad merkaptocsoporto(ka)t tartalmazó formában kapjuk, amelye(ke)t azután blokkolni kívánunk, a peptidet először redukáljuk. Rendszerint erős redukálószer, így ditionitot, 2-merkaptó-etanol, dition-treitol vagy ditio-eritritolt használunk. Előnyös a ditio-treitol használata. Ha a redukálószer csak kis feleslegben használjuk, a redukált peptidet nem szükséges szeparálni a merkaptocsoportot blokkoló szer hozzáadása előtt.

Rendszerint úgy járunk el, hogy a peptid 100 - 500 μ mól/l koncentrációju oldatát pufferben ($\sim$ pH 7) közelítőleg



kétszeres moláris feleslegben lévő redukálószerrel, például ditionitrit-tal (azaz 200 - 1000 $\mu\text{mol/l}$ redukálószerrel) redukáljuk, legalább 20 percen keresztül, rendszerint 30 percen át. Ezután hozzáadjuk a blokkolószert, például N-etil-maleimidet, közelítőleg kétszeres moláris feleslegben az összes jelenlévő merkaptocsoportra számolva. A blokkolószert legalább 1 órán keresztül reagáltatjuk. A módosított peptidet ezután megfelelő pufferoldattal géliszűrhetjük. Ugy is eljárhatunk, hogy a módosított peptidet továbbreagáltatjuk a kapcsolószerrel, például S-acetil-tioglikolsav N-hidroxi-szukcinimid-észterével (SATA) vagy 4-(N-maleimido-metil)-ciklohexán-1-karboxiláttal (SMCC) a géliszűrés előtt.

A találmány szerinti peptidet HIV-re, például HIV-1-re és/vagy HIV-2-re specifikus antitestek vizsgálatára alkalmazhatjuk. A vizsgálat bármely megfelelő biológiai folyadékban - például vizeletben, plazmában, vérben, szérumban, ondóban, könnyben, nyálban vagy agygerincvelő-folyadékban - elvégezhetjük. A vizsgálati eljárás abból áll, hogy a vizsgálandó mintához hozzáadjuk a peptidet, és meghatározzuk, hogy kötődik-e antitest a peptidhez. Erre a célra készíthetünk egy teszt-készletet, amely egy találmány szerinti peptidet és olyan eszközöket tartalmaz, amelyek alkalmasak annak meghatározására, hogy a mintában esetleg jelenlévő, HIV-re specifikus antitest kötődik-e a peptidhez.

Számos vizsgálati forma alkalmazható. A peptidet használhatjuk a HIV-re szelektív antitest oldatból való megkötésére, a már megkötött antitest jelölésére, vagy mind megkötésre, mind jelölésre. Ezenkívül a peptidet számos homogén vizsgálati



formában is alkalmazhatjuk, amikor a peptiddel reagáló antitestet oldatban detektáljuk, a fázisok szétválasztása nélkül. A peptidet HIV antigén detektálására is használhatjuk.

Az olyan vizsgálatban, amikor a peptidet az antitestek oldatból való megkötésére használjuk, a peptidet egy szilárd felületen immobilizáljuk. Ez a felület valamilyen módon mosható kell, hogy legyen. Az alkalmazható felületek például különféle típusu polimerek (mikrotitrátor lemezzé préseltek; gyöngyök; különféle típusu mérőpálcák; felszívó hegyek; elektródok és optikai eszközök), részecskék (például latex; stabilizált vér-, bakteriális vagy gombasejtek; spórák; arany vagy egyéb fém-szolok; és protein jellegű kolloidok; a részecskék átlagos mérete 0,1 - 5 mikron lehet), membránok (például nitro-cellulóz; papír; cellulóz-acetát; és nagyporcitású vagy nagyfelületű, szerves vagy szervetlen anyagokból készült membránok) lehetnek.

A peptid felülethez való kötése történhet optimális összetételű oldatból való passzív adszorpcióval (az oldat felületaktiv szereket, oldószereket, sókat, szuszpendálószeret tartalmazhat) vagy aktív kémiai kötéssel. Az aktív kötést különféle reakcióképes vagy aktiválható funkciós csoportokon keresztül alakíthatjuk ki, amelyeket a felülethez kapcsolhatunk (ilyenek például a kondenzálószeret, aktív észterek, halogenidek, anhidridek; aminos-, hidroxil- vagy karboxilcsoportok; merkaptocsoportok; karbonilcsoportok; diazocsoportok; telítetlen csoportok).

Az aktív kötést proteinen keresztül is kialakíthatjuk (magát a proteint kapcsoljuk a felülethez passzívan vagy aktív kötéssel) vagy hordozó proteinen - például albuminon vagy kaze-

inen - keresztül, amelyhez a peptidet különféle eljárásokkal kémiaiilag köthetjük, és amely előnyöket biztosíthat izoelektromos pontja, töltése, hidrofil jellege vagy egyéb fizikai-kémiai tulajdonságai következtében. A peptidet is köthetjük a felülethez (rendszerint, de nem szükségszerűen membránhoz) a reakcióelegy, például immun-precipitációs elegy elektroforetikus szétválasztása után.

A peptidet hordozó felületet a vizsgálandó mintával val érintkeztetve (reagáltatva), majd a vizsgálandó minta feleslegét valamely arra alkalmas módszerrel (mcsással, centrifugálással, szüréssel, mágnesességgel, kapilláris hatással) eltávolítva a megkötött antitestet valamilyen detektálható jelet szolgáltató módszerrel meghatározzuk. Például egy fent megadott jelzett molekulát vagy részecskét használunk, amely reagál a megkötött antitesttel (például protein A-t vagy protein G-t vagy hasonló molekulát; anti-speciest vagy anti-immunglobulin altípust; reumatoid faktort; a peptidhez kompetitív módon vagy irreverzibilisen kötődő antitestet; vagy bármely olyan molekulát, amely a peptidet felépítő részt vagy magát a peptidet tartalmazza; vagy a HIV-ből közvetlen vagy közvetett módon származó más proteineket és peptideket).

A detektálható jel optikai, radioaktív vagy fizikai-kémiai jellegű lehet, amelyet úgy nyerünk, hogy a kívánt molekulát közvetlenül például egy festékkel, radioaktívan, elektroaktívan, mágneses rezonanciásan vagy fluoreszcenciásan; vagy közvetve jelezzük, például úgy, hogy a molekulát vagy részecskét egy enzimmel jelezzük, amely képes valamely mérhető válto-

zást okozni. A detektálható jel például agglutináció, diffrakciós hatás vagy kétszeres fénytörés következménye is lehet, amely akkor lép fel, ha az említett felület részecske formában van.

Az olyan típusu vizsgálatokban, amikor a peptidet arra használjuk, hogy azzal egy már megkötött antitestet jelezzünk, a peptidet valamilyen módon jelezni kell, amelynek segítségével azután detektálni tudjuk. A jelzés közvetlen lehet, amikor a peptidhez kémiaiilag vagy passzívan például radio-, mágneses rezonancia-, részecske- vagy enzim-jelzőt kötünk; vagy közvetett, amikor egy olyan molekulát jelzünk valamilyen formában, amely maga képes reagálni a peptiddel, ilyen molekula például a peptiddel szembeni antitest, és a jelzett molekula ezt követően a peptiddel reagál.

A jelzésnek a peptidhez való kötése kémiaiilag közvetlen lehet olyan csoporton keresztül, amely eredetileg is jelen van a peptidben, ilyen például egy aminocsoport; vagy egy, a peptidbe utólagosan bevitt csoporton, például maleimidcsoporton keresztül. Az antitestek megkötése lejátszódhat valamely fent említett felületen, bármilyen módon, például passzív vagy aktivált adszorpcióval, amelynek eredményeként specifikus antitest vagy kötött immun-komplexek keletkeznek. Az antitest megkötése közelebből anti-speciesek vagy anti-immunglobulin-altípusok, reumatoid faktorok, protein A, G és hasonlóak által; vagy bármely, a peptid antigén-szakaszát tartalmazó molekula által történhet.

Az olyan típusu vizsgálatokban, amikor a peptidet a mintában lévő HIV antitest mérésére használjuk, a peptidet valamely fent ismertetett módon jelezhetjük, és vagy kompetitív mó-

don való kötésre használjuk, amikor is a peptidnek a fent ismertett felületen lévő specifikus molekulához való kötődését gátolja a mintában lévő antigén; vagy nem-kompetitív módon való kötésre, amikor is a mintában lévő antigént kötjük specifikusan vagy nem-specifikusan egy fenti felülethez, ami viszont egy specifikus két vagy több vegyértékű molekulához - például antitesthez - kötődik, és a molekula fennmaradó vegyértékét használjuk fel a jelzett peptid megkötésére.

Homogén vizsgálati módszer alkalmazása esetén általában a peptidet és az antitestet jelezzük, úgy, hogy amikor az antitest a peptiddel szabad oldatban reagál, a két jelzés kölcsönhatása következtében például az egyik jelzéssel kapcsolódó energia a másik jelzésre nem-sugárzásos módon áttevődik, és a gerjesztett második jel vagy keltett első jel megfelelően mérhető (például fluorimetrián, mágneses rezonancián vagy enzimatikusan). Antigén vagy antitest hozzáadása a mintában a jelzett párok közötti kölcsönhatást gyengíti, így a detektálás során eltérő nagyságu jelet kapunk.

A HIV-1 vagy HIV-2 detektálására alkalmas módszer a közvetlen szendvics enzim immunvizsgálati módszer (EIA). A mikrotitrátor lemez bemélyedéseit bevonjuk egy találmány szerinti peptiddel, amelyhez a HIV-1 és HIV-2 antitestek egyike kötődik. Ezután egyidejűleg bemérjük a vizsgálandó mintát és egy, a fenti HIV-1 és HIV-2 antitestek egyikéhez kapcsolódni képes találmány szerinti peptidet, amelyet egy enzimhez kapcsolunk (konjugált peptidet).

A specifikus antitestek mind a mélyedést bevonó peptidhez, mind a konjugált peptidhez kötődnek. Rendszerint ugyan-

azt a találmány szerinti peptidet alkalmazzuk a szendvics mindkét oldalán. Mosás után a megkötött enzimet színváltozást okozó specifikus szubsztráttal detektáljuk. A fenti EIA kivitelezésére alkalmas készlet összetétele az alábbi:

- (1) egy enzimmel jelzett, találmány szerinti eljárással előállított vegyület, amelyhez a HIV-1 és HIV-2 antitestek közül az egyik kötődik;
- (2) az enzim egy szubsztrátja;
- (3) olyan eszköz, amely megfelelő felülettel rendelkezik a találmány szerinti eljárással előállított, jelzetlen peptid immobilizálására, és amelyhez a HIV-1 és HIV-2 antitestek közül az egyik kötődik; és
- (4) kivánt esetben mosóoldatok és/vagy pufferek.

A találmány szerinti peptideket kombinált vizsgálatban is használhatjuk, a HIV-1-re és HIV-2-re specifikus antitestek együttes kimutatására. Ekkor a vizsgálandó mintát egy, a HIV-1 és HIV-2 antitestek közül az egyiket megkötő, találmány szerinti eljárással előállított peptiddel, és egy olyan polipeptiddel hozzuk érintkezésbe, amely a HIV-1 és HIV-2 antitestek közül a másikra specifikus antitestet megkötő antigén-molekularészt tartalmazza, és meghatározzuk, hogy kötődik-e antitest a találmány szerinti peptidhez és/vagy a fenti polipeptidhez. Bármely fent említett vizsgálati módszert alkalmazhatjuk erre a célra, megfelelő módosításokkal.

A HIV-1-re és HIV-2-re specifikus antitestek kimutatására alkalmas kombinált vizsgálatra megfelelő készlet tartalmaz egy találmány szerinti eljárással előállított peptidet, amelyhez a HIV-1 és HIV-2 antitestek közül egyik kötődik, egy olyan poli-

peptidet, amely egy, a HIV-1 és HIV-2 antitestek közül a másikat megkötő antigén-molekularészt tartalmaz, és olyan eszközöket, amelyekkel kimutatható, hogy a vizsgált mintában esetleg jelenlévő HIV-1 vagy HIV-2 elleni antitestek kötődtek-e a fenti polipeptidhez, vagy a találmány szerinti eljárással előállított peptidhez.

A fent említett EIA módszer alkalmas a kombinált vizsgálatra is. A HIV-1 és HIV-2 antitestek közül a másikat megkötő antigén-molekularészt tartalmazó polipeptiddel is bevonjuk a mikrotitrátor lemez bemélyedéseit. A fenti polipeptidet, például egy enzimmel jelzett azonos polipeptidet a vizsgálandó mintával és a találmány szerinti eljárással előállított konjugált peptiddel együtt hozzáadjuk. A polipeptiden lévő enzim-jelzés azonos vagy különböző lehet, mint a találmány szerinti peptiden lévő jelzés. Így a fenti (1) - (4) komponenseken kívül az ilyen EIA vizsgálatra alkalmas készletek az alábbi komponenseket tartalmazzák:

- (5) egy, a HIV-1 és HIV-2 antitestek közül a másikat megkötő antigén-molekularészt képviselő polipeptidet, amely egy enzimmel van jelezve;
- (6) abban az esetben, ha az enzim a találmány szerinti peptid jelzésére használt enzimtől eltérő, egy szubsztrátot az enzim számára; és
- (7) a HIV-1 és HIV-2 közül a másikat megkötő antigén-molekularészt képviselő jelzetlen polipeptid immobilizálására alkalmas felületet biztosító eszközöket.

Ha a találmány szerinti peptidet és a (7) pontban említett, jelzetlen polipeptidet ugyanazon felületen immobilizáljuk, a (3) és a (7) pontban megadott eszközök azonosak.

A HIV-1 és HIV-2 antitestek közül a másikat megkötő polipeptidet kémiai úton is előállíthatjuk. Ez egy olyan polipeptid is lehet, amelynek egy vagy minden merkaptocsoportja blokkolt a találmány szerinti eljárásnak megfelelően. A fenti polipeptid azonban rekombináns polipeptid is lehet.

A HIV-1 különösen kétféle típusu antitestet provokál. Ezek a gag protein elleni anti-p24 és az env protein elleni anti-gp41. Előállítottunk egy olyan speciális fúziós peptidot, amelyhez mind az anti-p24, mind az anti-gp41 kötődik. Ez a protein ezért a HIV-1 antitestet megkötő antigén-molekularészt képviselő polipeptidként használható. A fenti protein szekvenciája az alábbi:

10	20
MetAsnSerProAspThrGlyHisSerSerGlnValSerGlnAsnTyrProIleValGln	
p18>	p24>
30	40
AsnIleGlnGlyGlnMetValHisGlnAlaIleSerProArgThrLeuAsnAlaTrpVal	
50	60
LysValValGluGluLysAlaPheSerProGluValIleProMetPheSerAlaLeuSer	
70	80
GluGlyAlaThrProGlnAspLeuAsnThrMetLeuAsnThrValGlyGlyHisGlnAla	
90	100
AlaMetGlnMetLeuLysGluThrIleAsnGluGluAlaAlaGluTrpAspArgValHis	
110	120
ProValHisAlaGlyProIleAlaProGlyGlnMetArgGluProArgGlySerAspIle	

130	140
AlaGlyThrThrSerThrLeuGlnGluGlnIleGlyTrpMetThrAsnAsnProProIle	
150	160
ProValGlyGluIleTyrLysArgTrpIleIleLeuGlyLeuAsnLysIleValArgMet	
170	180
TyrSerProThrSerIleLeuAspIleArgGlnGlyProLysGluProPheArgAspTyr	
190	200
ValAspArgPheTyrLysThrLeuArgAlaGluGlnAlaSerGlnGluValLysAsnTrp	
210	220
MetThrGluThrLeuLeuValGlnAsnAlaAsnProAspCysLysThrIleLeuLysAla	
230	240
LeuGlyProAlaAlaThrLeuGluGluMetMetThrAlaCysGlnGlyValGlyGlyPro	
250	260
AsnSerProArgGlnLeuLeuSerGlyIleValGlnGlnGlnAsnAsnLeuLeuArgAla	
gp41>	
270	280
IleGluAlaGlnGlnHisLeuLeuGlnLeuThrValTrpGlyIleLysGlnLeuGlnAla	
290	300
ArgIleLeuAlaValGluArgTyrLeuLysAspGlnGlnLeuLeuGlyIleTrpGlyCys	
310	320
SerGlyLysLeuIleCysThrThrAlaValProTrpAsnAlaSerTrpSerAsnLysSer	
330	340
LeuGluGlnIleTrpAsnAsnMetThrTrpMetGluTrpAspArgGluIleAsnAsnTyr	
350	360
ThrSerLeuIleHisSerLeuIleGluGluSerGlnAsnGlnGlnGluLysAsnGluGln	
370	
GluLeuLeuGluLeuAspLysTrpAlaSerLeuTrpAsnTrpPheAsnGlyAspPro.	

A fenti proteint DM626 jelzéssel láttuk el. Előállítását 8830170.5 számú európai szabadalmi bejelentésünkben ismertettük. A protein szekvenciája egy vagy több aminosav helyettesítésével, inzerciójával és/vagy deléciójával és/vagy egyik vagy mindkét vég meghosszabításával módosítható, feltéve, hogy az ilyen módosított szekvenciájú protein képes megkötni az anti-p24-et és az anti-gp41-et, és legalább 75 % homológia van a módosított és módosítatlan szekvencia között.

A módosítatlan szekvencia alapvetően a HIV-1-ből izolált CBL-1 p24 és gp41 protein részeinek fuzionálásából származik (WO 86/C4423). Ezek a részek a 121 - 356. és 542 - 674. aminosavaknak felelnek meg, Meusing és munkatársai számozási rendszerre szerint [Nature 313, 450 - 458 (1985)]. A fenti részek kezdete a fenti aminosavszekvencia 17. és 244. aminosavjánál van. Az 5 - 16. aminosavak a p18 proteinből származnak. Az 1 - 4., 241 - 243. és 377 - 379. aminosavak abból az expressziós vektorból származnak, amelyből a fuzió proteint kaptuk, illetve a DNS-manipulációkból.

A szekvencia egy vagy több aminosav helyettesítésével, inzerciójával és/vagy deléciójával módosítható. Ezek a módosítások a szekvenciában bárhol előfordulhatnak, de különösen a szekvencia azon részeiben, amelyek nem a p24 és gp41 proteinből származnak. Szubsztitúció esetén a módosítatlan szekvencia egy vagy több aminosavját egy vagy több olyan aminosavval helyettesítjük, amelyek megőrzik a szekvencia fizikai-kémiai tulajdonságait, például nem változik a töltés-sűrűség, hidrofíli/hidrofób jelleg, méret és konfiguráció. Így például a Ser-t Thr-nal helyettesíthetjük, és megfordítva; a Glu-at Asp-val, és megfordítva; míg a

Gln-t Asn-nal, és megfordítva. A 10. aminosavat képviselő Ser-t Asn-nal helyettesíthetjük.

A szekvenciát egyik vagy mindkét végén meg is nyújthatjuk. Ez adott esetben legfeljebb egy további karboxil-terminális Cys-maradék hozzáadását jelenti. Az aminosav-szekvenciát azonban 50 aminosav-maradék hozzáadásával is meghosszabbíthatjuk, egyik vagy mindkét végén. A módosítatlan szekvenciához így legfeljebb 40 aminosavat, például 20 aminosavat adhatunk az amino-terminális és/vagy karboxil-terminális végen. Az amino-terminális aminosav azonban rendszerint Met, a proteint kifejező nukleinsav-szekvencia transzlációs start-kodonja következtében.

Ez a helyzet, ha csak a protein nem úgy fejeződik ki, hogy amino-terminálisán egy hordozó-proteinnel van fuzionálva, és a fúziós proteint hasítva kapjuk a találmány szerinti proteint.

A szekvenciát úgy módosíthatjuk, hogy a módosítatlan proteint kódoló DNS-szekvenciában végrehajtjuk a megfelelő változtatásokat. Ezt bármely arra alkalmas módszerrel végrehajthatjuk, például a szekvenciát egy endonukleázzal megrövidítjük, beillesztünk egy kötő-szekvenciát, exonukleázokat és/vagy polimerázokat és hely-irányított mutagenézis technikát alkalmazunk. Azt, hogy a módosított DNS-szekvencia olyan módosított proteint kódol-e, amelyhez mind az anti-p24, mind az anti-gp-41 képes kötődni, egyszerűen megállapíthatjuk. A módosított szekvenciát egy megfelelő plazmidba klónozzuk, a plazmiddal egy gazdasejtet transzformálunk, és a kifejeződött proteint megvizsgáljuk, hogy képes-e kötődni az anti-p24-gyel és az anti-gp41-gyel. Tehát legalább 75 %, például 85 %, vagy több, vagy 90 % vagy több kell,

hogy legyen a homológia mértéke a módosított és módosítatlan proteinek aminosav-szekvenciájában.

A találmány szerinti peptidre specifikus antitestek termelődését egy fenti peptid alkalmazásával válthatjuk ki. Az antitest monoklonális vagy poliklonális lehet. Az antitestet a peptid-sarzsok minőségi kontroll-vizsgálatára; a rekombináns protein, peptid vagy virális lizátum tisztítására; antigén-molekularész feltérképezésére; és ha jelzett, antitest-detektálási kompetitív típusú vizsgálatban konjugátumként; valamint antigén-detektálási vizsgálatokban használhatjuk.

Poliklonális antitest előállítására a hordozóhoz kapcsolt (I) általános képletű peptidet egy emlős vagy egyéb állati szervezetbe injektáljuk, például egérbe, patkányba, birkába vagy nyulba, és a peptiddel szemben termelődött antitestet kinyerjük. A peptid-hordozó konjugátumot rendszerint injektálható készítmény formájában adagoljuk, amely fiziológiailag elfogadható hígítószer is tartalmaz. A készítmény adjuvánst - például Freund-féle adjuvánst (FCA-t) vagy Freund-féle nem teljes adjuvánst (FIA-t) is tartalmazhat. Az állatokat megfelelő időtartamon keresztül immunizáljuk. Az állatoktól megfelelő időközökben vért veszünk a peptid-ellenes aktivitás meghatározására. Ha az aktivitás megfelelő szintet ér el, az állatokat elvéreztetjük. Az antitestet extraháljuk és például sóval kicsapva és affinitási kromatográfiás eljárással tisztítjuk, immobilizált szintetikus peptidet alkalmazva.

A monoklonális antitestet termelő hibridómát úgy állíthatjuk elő, hogy a szaporodást biztosító sejteket a találmány szerinti peptiddel szembeni antitestet termelő sejtekkel fu-

zionáljuk. Jellegzetes módon egy állati gazdaszervezetet, például egeret immunizálunk a peptiddel szemben. A lépét eltávolítjuk az immunizált állatból. A lépsejteket egy fenntartó sejtvonallal, például egérből származó myeloma-sejtvonallal fuzionáljuk. Ily módon peptid-specifikus monoklonális antitestet kiválasztó hibridomát kapunk. Az antitestet a fent ismertetett módon tisztíthatjuk.

A találmányt közelebbről az alábbi példákkal kívánjuk szemléltetni. Három referenciapéldát is ismertetünk.

1. referenciapélda

Karboxil-terminálisán amidcsoportot tartalmazó KYIQDQ-ARINSWGCAFRQVC peptid előállítása

A peptidet Merrifield módszerének [Merrifield, JACS, 85, 2149 - 2154 (1963)] Houghten által leírt módosításával szintetizáljuk [Houghten, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 5131 - 5135 (1985)].

A peptidet p-metil-benzhidril-amin-divinil-benzol gyantán szintetizáljuk. Az egyes aminosavak α -amino-csoportját terc-butoxi-karbonil-csoporttal (Boc) védjük. Az egyes kapcsolási lépések az alábbiak:

1. a gyantát diklór-metánnal mossuk - 10 perc
2. mosás 5 % diizopropil-etil-amint tartalmazó diklór-metánnal - 2 perc, háromszor
3. mosás diklór-metánnal - 1 perc, kétszer
4. terc-butoxi-karbonil-aminosav kapcsolása diklór-metánban, 0,3 mól/l diizopropil-karbodiimid jelenlétében - 60 perc
5. azonos a 3. lépéssel

6. védőcsoport eltávolítása 50 % trifluor-ecetsavat tartalmazó diklór-metánnal - 20 perc
7. mosás diklór-metánnal - 1 perc, hatszor
8. folytatni a 2. lépéstől.

A kapcsolási ciklusok befejezése után a peptidet a gyantáról lehasítjuk, hidrogén-fluoriddal 1 órán keresztül kezelve, 10 % anizol (scavenger) jelenlétében. A peptidet a fenti módon C-terminálisán amidcsoportot tartalmazó formában kapjuk. A terméket ezután éterrel mossuk, szárítjuk, 15 %-os ecetsavban oldjuk és liofilizáljuk.

2. referenciapéllda

Karboxil-terminálisán amidcsoportot tartalmazó AIEKYL-QDQARLNSWGC és KNSWGCAFRQVCHTTVPWVN peptidek előállítása

A cím szerinti peptideket az 1. referenciapéllda szerint állítjuk elő. Ezért mindkét peptid C-terminálisán amidcsoportot tartalmaz.

1. példa

Merkaptocsoportok blokkolása

Az 1. és 2. példa szerint előállított egyes peptidek merkaptocsoportjait az alábbiak szerint blokkoljuk.

A peptid 25 mmól/l koncentrációju HEPES pufferrel (pH 7,0) készült, 100 - 150 μ mól/l koncentrációju oldatát kétszeres mólfelcslegü (azaz 200 - 1000 μ mól/l) ditio-treitolal redukáljuk 30 percen keresztül. Az AIEKYLQDQARLNSWGC peptid esetén azonban csak egyszeres mólfelcslegü (azaz 100 - 500 μ mól/l) ditio-treitolal használunk, mivel a peptid csak egyetlen cisztein-ma-

radéket tartalmaz.

Az összes jelenlévő merkaptocsoportra számítva kétszeres moláris feleslegben N-etil-maleimidet adunk az elegyhez. A blokkolási reakciót 1 órán keresztül hagyjuk végbemenni. A módosított peptidet ezután pufferoldatba géliszűrjük.

2. példa

Blokkolt merkaptocsoportokat tartalmazó KYIQDQARLNSW-GCAFRQVC peptiddel végzett közvetlen szendvics EIA

A peptiddel passzivan bevonjuk a mikrotitrátor lemez lyukait. A lyukakba a szérum-mintákkal együtt bemérjük a konjugált peptidet. A peptid-konjugátum enzim-komponense lugos foszfátáz. A lemezt kb. 1 órán keresztül inkubáljuk, majd a lyukakat kimossuk és bemérjük az enzim szubsztrátját. A szubsztrát ciklusos erősítési rendszerrel nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát (NADP). Az anti-HIV-2 jelenlétét a mintában hasonló módon kezelt standarddal összehasonlítva mutatjuk ki. Az eredményeket az 1. táblázatban ismertetjük.

1. táblázat

	Ismerten HIV-2 pozitív minták	Ismerten HIV-1 pozitív minták	Ismerten HIV negatív minták
vizsgálatban +	115	0	0
vizsgálatban -	2	15	170



3. referenciapélda

Enzim immunvizsgálat 1-es és 2-es típusu humán immun-
hiány vírus (HIV-1 és HIV-2) kimutatására, KYIQDQARL-
NSWGCAFEQVC HIV-2 peptid és a 17 - 18. oldalakon hi-
vatkozott szekvenciájú HIV-1 fúziós peptid felhasználá-
sával

A peptidekkel bevonjuk a mikrotitrátor lemez lyukait. A konjugált peptidekkel együtt bemérjük a szérum-mintákat az így előkészített lyukakba. A konjugátumok ugyanezen antigének elegyei, amelyeket előzőleg lugos foszfáttal jeleztünk. A lemezeket kb. 1 órán keresztül inkubáljuk, majd a lyukakat kimossuk és az enzim szubsztrátját bemérjük. Szubsztrátként ciklusos erősítő rendszerrel nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfátot (NADP) használunk, amely színes reakcióterméket eredményez. Az enzimreakciót megfelelő inkubálás után leállítjuk, és a szint spektrofotometriásan meghatározzuk. A konjugátum mennyisége, és ennek következtében a szín a lyukakban egyenesen arányos a HIV-vel szembeni antitest koncentrációjával a mintában. Az eredményeket a 2., 3. és 4. táblázatban ismertetjük.

2. táblázat: HIV-1-re és HIV-2-re specifikus antitest kimutatása szérum-mintákban (A, C, D és E csoport) és plazma-mintában (B csoport) európai véradók esetén

Csoport	Vizsgált minta száma	Nem reagáló	Kezdetben reagáló	Ismételten reagáló
A	2064	2055	9	3
B	1842	1836	6	1
C	1897	1893	4	2
D	1757	1756	1	0
E	1557	1553	4	1
Összesen	9117	9093	14 (0,26%)	7 (0,08%)

3. táblázat: AIDS-es, AIDS-szel kapcsolatos betegségben szenvedő, erősen veszélyeztetett csoportba tartozó és egyéb betegségben szenvedő egyedekből vett szérum reaktivitása, európai klinikai minták esetén

Klinikai csoport	Minták száma	HIV-1 és HIV-2 antitestre pozitív	Ismételten HIV-1 anti- testre pozitív ^a
AIDS	117	117	117
ARC	107	107	107
erősen veszélyez- tetett ^b	304	219	219
vegyes ^c	15	13	13
AIDS-sel nem kapcso- latos beteg- ségek	140	1	1

a: Western blot és/vagy legalább két másik immunológiai vizsgálattal megerősítve

- b: meghatározott veszélyeztetett csoportba tartozó betegek
- c: AIDS-szel kapcsolatos betegségeken szenvedő betegek (például állandósult és általános nyirokcsomómegbetegedés)
- d: akut virális fertőzésben, autoimmun betegségben és daganatos betegségben szenvedő betegek^a

4. táblázat: A Wellcozyme HIV-1 és HIV-2 antitest reaktivitását 386 nyugat-afrikai mintában vizsgáltuk. Az összes HIV-1-re és HIV-2-re detektált mintát pozitívnak találtuk HIV-2 antitest immunológiai vizsgálatban. Nyugat-afrikai betegek szérumának reaktivitása

Minták száma	Antitest-pozitív HIV-1-re és HIV-2-re vizsgálva	Antitest-pozitív HIV-2-re végzett immunológiai vizsgálatban
386	261 ^a	259 ^b

- a: két minta ellentmondó eredményt adott; az egyik anti-HIV-1 és anti-HIV-2 alternatív kimutatására szolgáló vizsgálatokban negatív volt, csak p24-et lehetett kimutatni HIV-1 Western Blot módszerrel, és nem kaptunk HIV-2 Western Blot eredményeket; a másik minta anti-HIV vizsgálatban negatív volt, egyértelműen az anti-HIV-2 vizsgálatban, és határozatlan az együttes HIV-1 és HIV-2 Western Blot vizsgálatban
- b: az összes minta pozitív volt anti-HIV-2 immunvizsgálatban; a mintákat HIV-2 Western Blot vizsgálatnak alávetve 26 egyértelműen pozitív volt, míg 3 nem adott határozott eredményt.

S z a b a d a l m i i g é n y p o n t o k

1. Eljárás legfeljebb 30 aminosavmaradékból álló, valamely HIV típusra specifikus antitesthez kötődni képes peptidek előállítására, amelyek egy (I) általános képletű szekven-
ciát tartalmaznak, ahol

X_1 és X_2 jelentése azonosan vagy eltérően egy aminosavmaradék; a terminális karboxilcsoport adott esetben amid formában van; és minden cisztein-maradék merkaptocsoportja blokkolt,

a z z a l j e l l e m e z v e ; hogy

- (a) - az egyes aminosavakat és/vagy két vagy több aminosav-
ból álló aminosav-fragmentumokat a kívánt sorrendben kon-
denzáljuk, mimellett ha az aminosav cisztein, annak mer-
kaptocsoportja szabad vagy blokkolt formában van; és
- kívánt esetben a kapott peptid terminális karboxilcsoport-
ját amidcsoporttá alakítjuk, és kívánt esetben a cisztein-
maradék(ok) szabad merkaptocsoportját blokkoljuk;
vagy
- (b) - egy gazdasejtet egy olyan vektorral transzformálunk, amely
tartalmazza a tárgyi körben meghatározott peptidet kódo-
ló gént, és amely képes a gazdasejtben a peptidet expresz-
szálni;
- a transzformált gazdasejtet tenyésztjük; és
- a kifejeződött peptidet kinyerjük.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás olyan peptidek elő-
állítására, amelyek terminális karboxilcsoportja amid formában
van, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy a megfelelő ki-

indulási vegyületeket használjuk.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás olyan peptidek előállítására, amelyekben minden cisztein-maradék merkaptocsoportja blokkolt, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy a megfelelő blokkolószereket használjuk.

4. A 3. igénypont szerinti eljárás olyan peptidek előállítására, amelyekben a merkaptocsoportok acetamido-metil-, ditio-piridil- vagy Ellman-reagensből, szerves higanyvegyületből vagy maleimid-vegyületből származó csoporttal vannak blokkolva, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy a megfelelő blokkolószereket használjuk.

5. A 3. igénypont szerinti eljárás olyan peptidek előállítására, amelyekben a merkaptocsoportok N-etil-maleimiddből származó csoporttal vannak blokkolva, a z z a l j e l l e m e z v e ; hogy a megfelelő blokkolószert használjuk.

6. Az 1. igénypont szerinti eljárás olyan peptidek előállítására, amelyekben az (I) általános képletű szekvenciában X_1 jelentése G és X_2 jelentése I, L vagy M, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy a megfelelő kiindulási vegyületeket használjuk.

7. Az 1. igénypont szerinti eljárás olyan peptidek előállítására, amelyekben az (I) általános képletű szekvenciában X_1 jelentése N és X_2 jelentése S, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy a megfelelő kiindulási vegyületeket használjuk.

8. Az 1. igénypont szerinti eljárás olyan peptidek előállítására, amelyek N-terminálisukon és/vagy C-terminálisukon aminosav-meghosszabitást tartalmaznak, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy a megfelelő kiindulási vegyületeket használjuk.

9. A 8. igénypont szerinti eljárás olyan peptidek előállítására, amelyek N-terminálisukon 1 - 14 aminosavmaradékkal vannak meghosszabitva, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy a megfelelő kiindulási vegyületeket használjuk.

10. A 8. igénypont szerinti eljárás olyan peptidek előállítására, amelyek C-terminálisukon 1 - 14 aminosavmaradékkal vannak meghosszabitva, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy a megfelelő kiindulási vegyületeket használjuk.

11. Az 1. igénypont szerinti eljárás a
 KYLQDQARLNSWGCAFRQVC
 aminosav-szekvenciájú peptid előállítására, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy a megfelelő kiindulási vegyületeket használjuk.

12. Az 1. igénypont szerinti eljárás a
 KYLQDQARLNSWGCAFRQVC
 aminosav-szekvenciájú peptid előállítására, amelynek terminális karboxilcsoportja amid formában van, és minden C-maradék merkaptocsoportja blokkolt, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy a megfelelő kiindulási vegyületeket használjuk.

13. Eljárás HIV1-re és/vagy HIV-2-re specifikus antitestek jelenlétének kimutatására testfolyadékokban, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy

- (a) a vizsgálati mintát egy szilárd fázison immobilizált, egy, az 1 - 12. igénypontok bármelyike szerinti eljárással előállított peptiddel hozzuk érintkezésbe, és
- (b) megfelelő eszközökkel meghatározzuk, hogy a vizsgálati minta tartalmaz-e egy fenti antitestet.

14. A 13. igénypont szerinti eljárás; a z z a l j e l l e m e z v e , hogy eszközként jelzett molekulát vagy részecskét használunk.

15. A 14. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy jelzett molekulaként vagy részecskeként lugos foszfátázt, protein A-t, protein-G-t, anti-speciest, vagy anti-immunglobulin-altípusokat, reumatoid faktort, vagy az 1 - 12. igénypontok bármelyike szerinti eljárással előállított peptidre, vagy a peptid antigén-szakaszát tartalmazó bármely molekulára specifikus antitestet használunk.

16. Teszt-készlet a HIV-1 és/vagy HIV-2 antitestek jelenlétének kimutatására, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy

- (a) egy, az 1 - 12. igénypontok szerinti eljárások bármelyikével előállított, enzimmel jelzett peptidet,
- (b) az enzim egy szubsztrátját,
- (c) az 1 - 12. igénypontok bármelyike szerinti eljárással előállított peptid immobilizálására alkalmas felületet biztosító

tosító eszközöket, és
(d) kívánt esetben mosóoldatokat és/vagy puffereket
tartalmaz.

17. A 16. igénypont szerinti teszt-készlet, a z z a l
j e l l e m e z v e , hogy a peptid egy HIV-1 gag és/vagy env
szekvencia.

18. A 17. igénypont szerinti teszt-készlet, a z z a l
j e l l e m e z v e , hogy a gag szekvencia a 121 - 356. ami-
nosavakat magában foglaló HIV-1 szekvencia, és az env szekvencia
az 542 - 674. aminosavakat magában foglaló HIV-1 szekvencia.

Dr. Kiss Ildikó
Dr. Kiss Ildikó
Dr. Kiss Ildikó
Dr. Kiss Ildikó

A meghatalmazott:

[Signature]
DANUBIA
Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.
6. *[Signature]*

Aktaszámunk: 68446-881-SI

Ügyintézőnk: dr. Kiss Ildikó

0324-89

laborellatörési példány

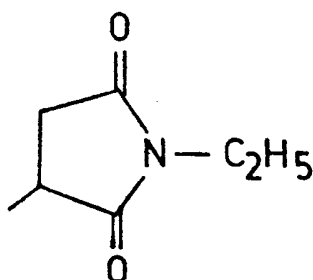
27894

1/1

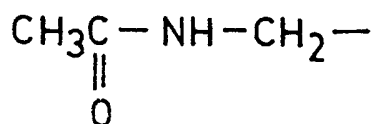
-55834-

X₁X₂WGC

(1)



(a)



(b)

DANUBIA
Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.
8.