

РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ



(19) **BG**

(11) **64627 B1**
7(51) C 12 N 15/51

ОПИСАНИЕ КЪМ ПАТЕНТ

ЗА

ИЗОБРЕТЕНИЕ

C 12 Q 1/68

C 12 N 15/40

C 12 Q 1/70

A 61 K 39/29

C 07 K 14/01

G 01 N 33/576

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(21) Регистров № 101876/1997

(22) Заявено на 05.11.1993

(24) Начало на действие
на патента от: 08.05.1992

Приоритетни данни

(31) 697326 (32) 08.05.1991 (33) US

(41) Публикувана заявка в
бюлетин № 11 на 30.11.1998

(45) Отпечатано на 30.09.2005

(46) Публикувано в бюлетин № 9
на 30.09.2005

(56) Информационни източници:
EP 0318216

(62) Разделена заявка от рег. № 098200

(73) Патентоприитежател(и):

**CHIRON CORPORATION, EMERYVILLE, 4560
HORTON STREET, CALIFORNIA (US)**

(72) Изобретател(и):

Tai-An Cha, San Ramon

Eileen Beall, Walnut Creek

Bruce Irvine, Concord

Janice Kolberg, Hercules

Michael S. Urdea, Alamo, California (US)

(74) Представител по индустриална
собственост:

**Фани Владимирова Божинова, 1000 София,
п.к. 728**

(86) № и дата на PCT заявка:

PCT/US1992/004036, 08.05.1992

(87) № и дата на PCT публикация:

WO1992/019743, 12.11.1992

(54) HCV ГЕНОМНИ ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТИ ЗА ДИАГНОСТИКА И ЛЕЧЕНИЕ

(57) Изобретението се отнася до състав и метод за диагностика и лечение на хепатит С вирусна инфекция (HCV). Съставът включва несрещана в природата аминокиселинна последователност най-малко с осем последователни нуклеотида от централната част на HCV последователността и може да служи като основен компонент при изготвянето на антитела и ваксини. По метода се получава хибридизационен продукт с HCV аминокиселинна последователност и се определят HCV генотиповете.

8 претенции, 2 фигури

BG 64627 B1

(54) HCV ГЕНОМНИ ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТИ ЗА ДИАГНОСТИКА И ЛЕЧЕНИЕ

Област на изобретението

Изобретението се отнася до състав и метод за диагностика и лечение на хепатит С вирусна инфекция (HCV), считана по-рано за нито- А, нито- В хепатитна вирусна инфекция. По-специално изобретението се отнася до състав за диагностициране и лечение на HCV инфекция, метод за получаване на хибридизационен продукт с HCV последователност от нуклеинови киселини и метод за откриване на един или повече HCV генотипове.

Предшестващо състояние на техниката

Прототипът, изолиран от HCV, е охарактеризиран в US заявка за патент N0 122 714 (виж също ЕРО публикация 318 216). Терминът "HCV", така както е използван тук, включва нови изолати от същия вид вируси. Терминът "HCV-1" е обяснен в US заявка за патент No 122 714.

HCV е трансмисивен тип заболяване, което се отличава от другите форми вирусно-асоциирани чернодробни заболявания, включително тези, причинени от известните хепатитни вируси, напр., вируса на хепатит А (HAV), вируса на хепатит В (HBV), и вируса на делта хепатита (HDV), а така също и хепатита, индуциран от цитомегаловирус (CMV) или вируса на Epstein-Barr (EBV). HCV за първи път е установен у индивиди, подлагани на кръвопреливане.

Необходимостта от чувствителни, специфични методи за скрининг и идентифициране на преносителите на HCV и контаминирана с HCV кръв и кръвни продукти е значителна. Посттрансфузионен хепатит (РТН) се явява в около 10% от подложените на кръвопреливане пациенти, като HCV възлиза на около 90% от тези случаи. Често това заболяване прогресира до хронично чернодробно увреждане (25-55%).

Грижата за пациентите, както и предотвратяването на предаването на HCV с кръв и кръвни продукти или чрез близък контакт на персонала изискват сигурни средства за скрининг, диагностика и прогнозиране с оглед откриване на нуклеинови киселини, антигени и антитела, свързани с HCV.

Информацията в това описание предполага, че HCV притежава няколко генотипа. Което означава, че генетичната информация за HCV вируса може да не е напълно идентична за целия HCV, но об-

хваща групи с различна генетична информация.

Генетичната информация се съхранява във верижни молекули ДНК и РНК. HCV геномът се състои от единична позитивна РНК верига. От друга страна HCV геномът притежава непрекъсната, транс- лационна отворена рамка на разчитане (ORF), която кодира полипротеин с около 3 000 аминокиселини. В ORF структурния протеин(и) очевидно са кодирани в приблизително първата четвърт на N-крайния участък, повечето от полипротеините, отговорни за не-структурни протеини.

HCV полипротеинът съдържа, от аминокрая към карбоксилния край, нуклеокапсидния протеин (С), покривния протеин (Е), и неструктурните протеини (NS), 1,2,3,4 (b), и 5.

HCV от различните генотипове може да кодира протеини, които предизвикват изменен отговор на гостоприемниковата имунна система. HCV от различаващи се генотипове може трудно да бъде открита чрез имунодиагностични техники и техники на нуклеокиселинни сонди, които не са специфично насочени към такъв генотип.

По-долу са изложени дефиниции на избраните термини, използвани в описанието, с което да се улесни разбирането на изобретението. Терминът "съответни" означава хомоложни на или комплементарни на „определена последователност от нуклеинови киселини. Както между нуклеинови киселини и пептиди, съответни се отнася и до аминокиселини на пептид в ред, получен от последователността на дадена нуклеинова киселина или нейния комплемент.

Терминът "несрещана в природата аминокиселина" се отнася до част от геномна нуклеинова киселина сДНК, полусинтетична нуклеинова киселина, или синтетична оригинална нуклеинова киселина, която чрез произхода си или при преработване: (1) не е свързана с всички нуклеинови киселини, с които е свързана в природата, (2) е присъединена към нуклеинова киселина или друг химичен агент, различен от този, към който е присъединена в природата, или (3) не се среща в природата.

По подобен начин терминът "несрещан в природата пептид" се отнася до част от голям природен пептид или протеин, или полусинтетичен или синтетичен пептид, който чрез произхода си или при преработка: (1) не се свързва с всички пептиди, с които е свързан в природата, (2) се присъединява към пептиди, функционални групи или химични агенти, различни от тези, към които се присъединява в природата, или (3) не се среща в природата.

Терминът "праймер" се отнася до нуклеи-

нова киселина, която е способна да иницира синтеза на по-голяма нуклеинова киселина, когато е поставена в подходящи условия. Праймерът би бил напълно или по същество комплементарен на участък от нуклеиновата киселина, от която ще бъде копиран. Така, при условия на хибридизация, праймерът ще доведе до комплементарен участък от по-голяма нуклеинова киселина. При добавяне на подходящи реактиви, праймерът се разширява чрез полимеризацията агент за формиране на копие от по-голямата нуклеинова киселина.

Терминът "свързваща двойка" се отнася до която и да е двойка молекули, проявяваща взаимен афинитет или свързващ капацитет. За целите на настоящето описание, терминът "лиганд" се отнася до една молекула от свързващата двойка, а терминът "антилиганд" или "рецептор" или "мишена" се отнася до противоположна на свързващата двойка молекула. Например, по отношение на нуклеиновите киселини, свързваща двойка може да включва две комплементарни нуклеинови киселини. Една от нуклеиновите киселини може да бъде означена като лиганд, а другата верига да е означена като антилиганд, рецептор или мишена. Означаването като лиганд или антилиганд е въпрос на условност. Други свързващи двойки съдържат, например, антигени и антитела, лекарства и места за лекарствени рецептори и ензими или ензимни субстрати и т. н.

Терминът "маркер" се отнася до част от молекула, която може да бъде открита, например, чрез радиоактивни изотопи, ензимилуминисцентни средства, преципитиращи средства и багрила.

Терминът "носител" включва обичайните носители като филтри и мембрани, а така също и възстановени носители, които могат да бъдат по същество диспергирани в средата и отстранени или разделени от средата чрез имобилизация, филтруване, парциониране или по друг подобен начин. Терминът "носещи средства" означава носители, които могат да се свържат с нуклеинови киселини, пептиди или антитела чрез свързващи партньори, или ковалентни или нековалентни връзки.

Същност на изобретението

Нуклеиновата киселина от настоящето изобретение съответства на HCV вирусния геном, който определя различни генотипове. Изобретението предлага също и методи за приложение на съставите, съответстващи на последователностите от HCV вирусния геном, определящи различни генотипове, описани тук.

А. Състави на нуклеинови киселини

Нуклеиновата киселина съгласно изобретението, съответстваща на HCV вирусния геном, който определя различни генотипове, има приложение като сонда в хибридизационни реакции, като праймер на реакции, включващи синтеза на нуклеонова киселина, като свързващ партньор за разделяне на HCV вирусната нуклеинова киселина от други присъстващи конституенти, и като анти-смыслова нуклеинова киселина за предотвратяване транскрипцията или трансляцията на вирусната нуклеинова киселина.

По-специално, настоящето изобретение се отнася до несрещана в природата нуклеинова киселина, съдържаща аминокиселинна последователност от поне осем последователни нуклеотида, съответстващи на не- HCV-1 нуклеотидната последователност на хепатит С вирусния геном. За предпочитане нуклеотидната последователност е подбрана от поне един участък, състоящ се от NS5 участъка, покривният 1 участък, 5' УТ участък и централния участък, номерирани съответно от 1 до 147. По-конкретно, нуклеотидната последователност е подбрана от централния участък, като последователностите, съответстващи на централния участък са номерирани съответно от 53 до 66. Последователност No 52 съответства на HCV-1. Последователностите от 52 до 66 са представени на секвенционния листинг към настоящето описание.

Съставите по настоящето изобретение формират хибридизационни продукти с нуклеинова киселина, съответстваща на различни генотипове на HCV.

HCV притежава поне пет генотипа, които за улеснение в настоящето описание са означени като GI- GV. Първият генотип, GI, е илюстриран с последователностите, номерирани 1-6, 23- 25, 33- 38 и 52- 57. Вторият генотип, GII, е представен с последователностите с номера 7- 12, 26- 28, 39- 45 и 58- 64. Третият генотип, GIII, е илюстриран с последователностите с номера 13- 17, 32, 46- 47 и 65- 66. Четвъртият генотип, GIV, е илюстриран с последователностите с номера 20 - 22 , 29- 31 и 48- 49. Петият генотип, GV, е илюстриран с последователностите с номера 18,19, 50 и 51.

По-специално изобретението се отнася до не- HCV-1 последователност от аминокиселини, представляваща последователност от първи генотип, подбрана от аминокиселинна последователност в рамките на SEQ ID No. 53- 57.

В. Метод за формиране на хибридизационен продукт Обект на настоящето изобретение е също и

метод за формиране на хибридационен продукт с такава нуклеинова киселина, която да притежава последователност, отговаряща на HCV нуклеинова киселина. Този метод включва етапите на поставяне на несрещана в природата нуклеинова киселина с не-HCV-1 последователност, съответстваща на HCV нуклеинова киселина в условия на хибридизация. Несрещаната в природата нуклеинова киселина е способна да формира хибридационен продукт с HCV нуклеинова киселина в условия на хибридизация. Методът по-нататък предвижда етапа на прилагане на хибридационни условия за формиране на хибридационен продукт в присъствието на нуклеинова киселина, съответстваща на определен участък от HCV генома.

Формирането на хибридационен продукт е приложимо за установяване присъствието на един или повече генотипове на HCV. За предпочитане, несрещаната в природата нуклеинова киселина формира хибридационен продукт с нуклеинова киселина от HCV в един или повече участъци, включващи NS5 участък, покривният 1 участък, 5'UT участък и централния участък. За откриване на хибридационния продукт, е целесъобразно свързването на несрещаната в природата нуклеинова киселина с определен маркер. Формирането на хибридационния продукт се установява чрез разделянето му от маркираната несрещана в природата нуклеинова киселина, която не е формирала хибридационен продукт.

Формирането на хибридационен продукт е приложимо като средство за разделяне на един или повече генотипове HCV нуклеинови киселини от други евентуално присъстващи съставки. За целта, целесъобразно е несрещаната в природата нуклеинова киселина да бъде свързана с носител, за да се раздели полученият в резултат хибридационен продукт от другите съставки.

“Сандвич анализ” на нуклеиновите киселини предвижда свързване на една нуклеинова киселина с маркер и на втора нуклеинова киселина с носител. Един вариант на настоящето изобретение включва сандвич анализ, включващ две нуклеинови киселини, и двете притежаващи последователности, които съответстват на HCV нуклеиновите киселини; обаче, поне една несрещана в природата нуклеинова киселина притежава последователност, съответстваща на не-HCV-1 HCV нуклеинова киселина. Поне една нуклеинова киселина е в състояние да се свърже с маркер, а другата - да се свърже с носител. Носителят, свързан с неприродно срещана нуклеинова киселина, се използва за разделяне на хибридационния продукт, който включва HCV нуклеинова киселина и несрещана в природата нуклеинова киселина, притежаваща не-HCV-1 последователност.

Един вариант на изпълнение на настоящето изобретение предвижда метод за установяване на един или повече генотипове на HCV. Методът включва етапите на поставяне на несрещана в природата нуклеинова киселина в условия на хибридизация. Несрещаната в природата нуклеинова киселина е способна да формира хибридационен продукт с нуклеинова киселина от един или повече генотипове на HCV.

Хибридационният продукт на HCV нуклеинова киселина с несрещана в природата нуклеинова киселина, притежаваща не-HCV-1 последователност, съответстваща на последователности от HCV геномът е приложим за инициране на реакция за синтеза на нуклеинова киселина.

Хибридационният продукт на HCV нуклеинова киселина с несрещана в природата нуклеинова киселина, притежаваща последователност, съответна на определен аенотип на HCV, е приложим за инициране на реакцията на синте на нуклеинова киселина от такъв генотип. В един вариант на изпълнение, синтезираната нуклеинова киселина е показателна за присъствието на един или повече генотипове на HCV.

Синтезата на нуклеинова киселина може също да улесни клонирането на нуклеиновата киселина във вектор на експресия, който от своя страна синтезира вирусни протеини.

Варианти на настоящите методи са приложими като антисмислови агенти за предотвратяване транскрипцията или трансляцията на вирусна нуклеинова киселина, формирането на хибридационен продукт на несрещана в природата нуклеинова киселина, притежаваща последователности, които отговарят на определен генотип на HCV генома, може да блокира трансляцията или транскрипцията на такъв генотип. Това дава възможност за разработване на такива терапевтични агенти, които да включват всичките пет генотипа.

С. Пептиди и състави на антителиа

Друг вариант на настоящето изобретение е състав, който съдържа несрещан в природата пептид от три или повече аминокиселини, отговарящи на нуклеинова киселина с не-HCV-1 последователност. За предпочитане, не-HCV-1 последователността съответства на тази, включена в един или повече участъка, състоящи се от NS5 участък, покривният 1 участък, 5' UT участък и централния участък. По-

специално, пептидите, отговарящи на нуклеинова киселина с не- HCV-1 последователност, насочена спрямо централния участък, са със секвенционни номера 53- 66. Последователността с номер 52 съответства на HCV-1. Последователностите с номера 52-66 са представени на приложения секвенционен листинг.

Друг вариант на изпълнение на настоящето изобретение представлява пептиден състав, съответстващ на последователности от нуклеинови киселини от HCV генотипа. Централният участък, който както бе посочено, обхваща нуклеинови киселини с номера от 52 до 66, включва последователности от първи, втори и трети генотип. При това съгласно настоящето изобретение, не-HCV-1 последователността от нуклеинови киселини е от първи генотип и включва нуклеинови киселини със секвенционни номера 53- 57.

Несрещаните в природата пептиди от настоящето изобретение са приложими като компонент на ваксина. Секвенционната информация от настоящето изобретение позволява създаването на ваксина, включваща нуклеинови киселини от конкретен генотип. Насочването на ваксина към определен генотип позволява профилактично приложение с оглед постигане на максимална защита на инфектираните обекти. От друга страна, насочването на ваксината към повече от един генотип, позволява нейното комплексно действие.

Пептидните състави са приложими още и за създаване на специфични антитела спрямо HCV протеините. Един вариант на изпълнение на настоящето изобретение предвижда антитяло спрямо пептиди, отговарящи на не-HCV-1 последователност от HCV генома. За предпочитане, не- HCV-1 последователността е подбрана от тези, включени в централния участък. Това е пептидът, отговарящ на последователност, ограничена от нуклеинови киселини със секвенционни идентификационни номера 53- 66.

Антителата, насочени спрямо пептиди, които отразяват определен генотип, са приложими за откриване на такъв генотип от HCV и като лечебни средства.

Един вариант на изпълнение на настоящето изобретение е антитяло, насочено спрямо пептид, отговарящ на нуклеинова киселина с последователност от определен генотип. Както е посочено по-горе, първият генотип, G1, е представен от последователности с номера 7-12, 23- 25, 33- 38 и 52- 57.

Изобретението по-нататък е илюстрирано с фигури, които представляват последователности, демонстриращи генотиповете на HCV. Последователностите са означени с номера от 52 до 66, показани на секвенционния листинг.

Кратко описание на фигурите и на секвенционния листинг

Фигура 1 изобразява схематично генетичната организация на HCV.

Фигура 2 (5) описва последователностите на нуклеинови киселини с номера от 52 до 66, които произхождат от централния участък на HCV вирусния геном.

Секвенционният листинг представя последователностите, номерирани с номера от 52 до 66.

По-подробно изобретението се илюстрира със следните примерни изпълнения, без да се ограничава:

Пример 1:

Изобретението се описва в детайли по отношение на нуклеинова киселина за целите на диагностиката и профилактика, притежаваща последователности, които отговарят на HCV генома, и нейни сродни пептиди и свързващи партньори.

За осъществяване на изобретението са използвани, освен ако не е указано специално нещо друго, обичайните за химията, молекулярната биология, микробиологията, рекомбинантната ДНК технология и имунологията техники, които са добре известни на специалистите в областта. Виж напр. Maniatis, Fitch & Sambrook, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (1982); *DNA Cloning, Volumes I and II* (D. N. Gait ed, 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (B.D. Hames & S.J.Higgins eds. (1984); the series, *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.), particularly Vol. 154 and Vol. 154 (Wu and Grossman, eds.).

ДНК библиотеките са последователности на нуклеинови киселини, намиращи се в плазмата на инфектирано с HCV шимпанзе. Структурата на една от тези библиотеки, "с" библиотека (ATCC No. 40394), е описана в PCT публикация No. WO90/14436.

Последователностите от библиотеката, релевантни на настоящето изобретение, са представени със секвенционни номера 1, 23, 33 и 52.

Нуклеиновите киселини, изолирани или синтезирани в съответствие с настоящето изобретение, са приложими без ограничение като сонди, праймери, анти- смислови гени и за създаване на експресионни системи за синтезата на пептиди, отговарящи на тези последователности.

Описаните последователности на нуклеинови киселини определят генотиповете на HCV с оглед на четири участъка от вирусния геном. Фигура 1 представя схематично организацията на HCV. Четирите участъка със специален интерес са NS5 участък, покривния 1 участък, 5' УТ участък и централния участък.

За удобство в настоящето изобретение различните генотипове са обозначени с римски цифри и буквата "G".

Последователностите на нуклеинови киселини с номера 48 до 62 предполагат поне три генотипа в централния участък на HCV. Последователностите с номера 52- 66 са представени на фигура (2), както и на секвенционния листинг.

Първият генотип (GI) от централния участък на HCV се илюстрира с последователности, номерирани от 52 до 57. Вторият генотип от централния участък (GII) е илюстриран с последователности, номерирани от 58 до 64. Третият генотип (GIII) от централния участък обхваща последователности с номера 65 и 66. Последователностите с номера от 52 до 65 обхващат 549 нуклеотида, а последователността с номер 66 включва 510 нуклеотида.

Различните генотипове, описани с оглед на всеки участък, са съвместими. Това означава, че HCV, притежаващ характерните особености на първия генотип по отношение на NS5 участъка, по същество потвърждава характерните особености на първия генотип от покривния 1 участък, характерните особености на 5' UT участъка, както и тези на централния участък.

Нуклеиновите киселини, изолирани или синтезирани в съответствие с последователностите, означени с номера от 1 до 66, могат да бъдат използвани като сонди, праймери, свързващи лиганди и анти-смислови агенти. Като такива, нуклеиновите киселини обикновено притежават приблизително осем или повече нуклеотида за специфичност, а така също и способност да образува стабилни хибридационни продукти.

Проби

Нуклеинова киселина, изолирана или синтезирана съгласно последователност, определяща конкретен генотип от участък на HCV генома, може да бъде използвана като сонда за откриване на този генотип, или в комбинация с други сонди от нуклеинови киселини, за откриване на практически всички генотипове на HCV.

Със секвенционната информация, изложена в настоящето изобретение, са идентифицирани последователности от осем или повече нуклеотида, което осигурява желаната инклузивност или ексклузивност по отношение на различните генотипове в HCV, и външни последователности на нуклеинови киселини, които могат да бъдат установени при условия на хибридизация.

За специалистите в областта е очевидно, че при използването им като сонди, последователнос-

тите от нуклеинови киселини могат да бъдат белязани за по-лесно установяване на хибридационния продукт.

Свързващи лиганди

За да бъде използвана като свързващ лиганд, нуклеиновата киселина, подбрана по описания по-горе начин за получаване на сонди, може лесно да бъде свързана с носител. Начинът, по който нуклеиновата киселина се свързва с носител, е добре известен на специалистите в областта. Нуклеинова киселина, притежаваща последователности, съответстващи на последователности със секвенционни номера 1-66, имат способността да разделят вирусната нуклеинова киселина от един генотип от нуклеиновата киселина на HCV на друг генотип. Нуклеиновата киселина, изолирана или синтезирана в съответствие с последователностите с номера 1-66, използвани в комбинация, намира приложение за улавяне на практически всички нуклеинови киселини от всички HCV генотипове.

Праймери

Нуклеиновите киселини, които са изолирани или синтезирани в съответствие с описаните тук последователности, са приложими като праймери за амплификацията на HCV последователности. С оглед на техниката на полимеразната верижна реакция (PCR), последователностите на нуклеинови киселини с осем или повече нуклеотида, отговарящи на една или повече от последователностите с номера 1-66, намират приложение заедно с подходящи ензими и реагенти за създаване на копия от вирусната нуклеинова киселина. Могат да бъдат използвани множество праймери, притежаващи различни последователности, отговарящи на повече от един генотип, за създаване на копия на вирусната нуклеинова киселина за дадените генотипове.

Тези копия могат да бъдат използвани в диагностични проби за откриване на HCV вируса. Копията също могат да бъдат включени във вектори за клониране или експресия за създаване на полипептиди, отговарящи на нуклеиновата киселина, синтезирана чрез PCR, както ще бъде подробно описано по-долу.

Анти-сенс

Изолираните или синтезирани в съответствие с описаните тук последователности нуклеинови киселини са приложими като анти-смислови гени за предотвратяване експресията на HCV.

Нуклеинова киселина, съответстваща на генотип на HCV, се натоварва на подходящ носител напр. липозоми за въвеждане в клетка, инфектирана с HCV. Нуклеинова киселина, притежаваща осем

или повече нуклеотиди, е способна да се свърже с вирусна нуклеинова киселина или вирусна информационна РНР. За предпочитане, анти-смысловата нуклеинова киселина е обхваната от 30 или повече нуклеотида за обезпечаване необходимата стабилност на хибридационния продукт на вирусна нуклеинова киселина или вирусна информационна РНК. Методи за натоварване на анти-смыслова нуклеинова киселина са добре известни на специалистите в областта, както е показано в US патент 4 241 046, публикуван на 23. 12.1980 от Papaioannopoulos et al.

Синтез на пептида

Нуклеиновите киселини, изолирани или синтезирани в съответствие с последователностите, описани по-горе, са приложими за получаване на пептиди. Последователностите с номера от 52 до 66 могат да бъдат клонирани в подходящи вектори, или използвани за изолиране на нуклеинова киселина. Изолираната нуклеинова киселина се комбинира с подходящи ДНК линкери и се клонира в подходящ вектор. Векторът може да бъде използван за трансформиране на подходящ гостоприемников организъм, като E. Coli, и кодираният от последователността пептид да бъде изолиран.

Техниките на молекулярно клониране са описани в текста на Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Maniatis et al., Coldspring Harbor Laboratory (1982).

Изолираният пептид се използва като антигенно средство за получаване на ваксини и антитела, насочени спрямо определен генотип на HCV.

Ваксини и антитела

Пептидите от настоящето изобретение са приложими за получаване на антитела и ваксини.

Наличието на сДНК последователности, или нуклеотидни последователности, получени от тях (включително сегменти и модификации на последователността), позволява конструиране на вектори на експресия, кодиращи антигенно активни участъци от пептида, кодиран във всяка от веригите. От централния участък може да бъдат получени антигенно активни участъци.

Фрагменти, кодиращи желаните пептиди, се получават от сДНК клоновете чрез обичайното разграждане с рестрикционни ензими или чрез синтетични методи, и са свързани във вектори, които могат, например, да съдържат части от слети последователности, такива като бета галактозидаза или супероксиддисмутаза (SOD), за предпочитане SOD. Методи и вектори, които са приложими за получаване на полипептиди, съдържащи фузионни последователности от SOD, са описани в публикация на Европейското патентно ведомство No 0196056, публ. 1. 10. 1986.

Всяка желана част на HCV сДНК, съдържаща отворена четяща рамка, във всяка смыслова верига, може да бъде получена като рекомбинантен пептид, като зрял или фузионен протеин; обратно, пептид, кодиран в сДНК, може да бъде осигурен чрез химична синтеза.

ДНК, кодираща желания пептид, независимо дали е в зряла или фузионна форма и дали съдържа или не сигнална последователност, която да позволи секретирането, може да бъде включена във вектори за експресия, подходящи за всеки удобен гостоприемник. Понастоящем се използват както прокариотични, така и еукариотични системи на гостопириемници за получаване на рекомбинантни пептиди. Пептидът след това се изолира от лизиранияте клетки или от културалната среда и се пречиства до необходимата степен с оглед на по-нататъшното му използване. Пречистването се осъществява с помощта на известни на специалистите техники, например, диференциална екстракция, фракциониране на соли, хроматография върху йонообменни смоли, афинитетна хроматография, центрофугиране и други подобни. Виж, например, методи в ензимологията за различни методи за пречистване на протеини. Такива протеини могат да бъдат използвани като диагностичи, или такива, които водят до неутрализиращи антитела могат да бъдат формирани като ваксини. Антителата, създадени срещу тези пептиди, могат също да бъдат използвани като диагностичи или за пасивна имунотерапия или за изолиране и идентифициране на HCV.

Антигенният участък на пептида е относително малък - обикновено 8 до 10 аминокиселини или по-малко в дължина. Фрагменти, толкова малки колкото 5 аминокиселини, могат да характеризират даден антигенен участък. Тези сегменти могат да отговарят както на централния участък на HCV молекулата, така и на останалите известни участъци. Съответно, с помощта на сДНК от такива участъци, ДНКи кодиращи къси сегменти на HCV пептиди, съответстващи на подобни участъци, могат да бъдат експресирани рекомбинантно както като фузионни протеини, така и като изолирани пептиди. В допълнение, къси аминокиселинни последователности могат да бъдат получени по удобен начин чрез химична синтеза. В случаите, когато синтезираният пептид е с правилна конфигурация, така че да осигури правилен епитоп, но е твърде малък, за да бъде имуногенен, пептида може да бъде прикрепен към подходящ носител.

На специалистите в областта са известни множество техники за свързване, включително форми-

рането на дисулфидни мостове с помощта на N-сукцинимидил-3-(2-пиридилтио)пропионат (SPDP) и сукцинимидил 4- (N-малеимидо-метил)циклохексан-1-карбоксилат (SMCC), получен от Piers Company, Rockford, Illinois, (ако пептидът не притежава сулфхидрилна група, тя може да се набави от цистеинов остатък). Тези реагенти създават дисулфидна връзка между тях и пептидните цистеинови остатъци на един протеин и амидна връзка чрез епсилон-амино в един лизин, или друга свободна аминогрупа в другата. Известни са множество такива дисулфид/амид-формиращи агенти. Виж, например, *Immum Rev.* (1982) 62:185. Други бифункционални купелуващи агенти формират тиоестер вместо дисулфидна връзка. Много от тези тио-естер-формиращи агенти са търговско достъпни и включват реактивни естери на 6-малеимидокапронова киселина, 2-бромоецетна киселина, 2-йодооецетна киселина, 4-N-малеимидо-метил)циклохексан-1-карбоксилна киселина и др. подобни. Карбоксилните групи могат да бъдат активирани чрез комбинирането им със сукцинимид или 1-хидроксил-2-нитро-4-сулфонова киселина, натриева сол. Допълнителни методи на купелуващи антигени използват системата ротавируси/“свързващ пептид“, описана в ЕРО публикация No 259149, включена в литературната справка. Изложеният списък не е изчерпателен и могат да бъдат използвани различни модификации на посочените съединения.

Може да бъде използван който и да е носител, който сам по себе си не индуцира продуциране на антитела, вредни за гостоприемника. Подходящите носители са обикновено големи, бавно метаболизирани се макромолекули като протеини; полизахариди, като функционално модифицирана с латекс сефароза, агароза, целулоза, целулозни перли и други; полимерни аминокиселини, като полиглутаминова киселина, полилизин и др.; аминокиселинни кополимери; и инактивирани вирусни частици. Специално приложими протеинови субстрати са серумни албумини, хемоцианин, имуноглобулинови молекули, тироглобулин, овалбумин, тетанусов токсин и други протеини, добре познати на специалистите в областта.

Пептиди, съдържащи HCV аминокиселинни последователности, кодиращи поне един вирусен епитоп, получен от централния участък, са приложими като имунологични агенти. Например, пептиди, съдържащи такива срязани последователности, могат да бъдат използвани като реагенти в дадено имунологично изследване. Тези пептиди могат също да бъдат кандидат субединици на антигени в

състави за получаване на антисерум или ваксини. Доколкото срязаните последователности могат да бъдат получени чрез различни известни третирания на природния вирусен протеин, обикновено се предпочитат създаването на синтетични или рекомбинантни пептиди, включващи HCV последователност. Пептиди, съдържащи тези срязани HCV последователности, могат да бъдат направени почти напълно от HCV последователности (един или повече епитопи, както съседни, така и несъседни) или HCV последователности и хетероложни последователности във фузионен протеин. Приложимите хетероложни последователности са тези, които обезпечават секретирането от рекомбинантен гостоприемник, повишаване на имунологичната реактивност на HCV епитоп(те), или улесняват купелуването на полипептида към даден носител в имунологична проба или ваксинален носител. Виж, напр. E.G., EPO pub. No.116201; US Pat No 4 722840; EPO Pub No 259149; US pat, No 4 629783.

Размерът на пептидите, включващи срязаните HCV последователности, широко варира, като минималният размер, достатъчен да осигури HCV епитоп, докато максималният е неограничен. За удобство, максималният размер е по същество не по-голям от необходимият за осигуряване на желаните HCV епитопи и функции на хетероложната последователност, ако имат такива. Обикновено, срязаната аминокиселинна последователност граничи от около 5 до около 100 аминокиселини в дължина. Типичен е максимален размер от около 50 аминокиселини в дължина, за предпочитане - максимум около 30 аминокиселини. Обикновено, желателно е да се подберат последователности поне от около 10, 12 или 15 аминокиселини, до максимум около 20 или 25 аминокиселини.

HCV аминокиселинните последователности, съдържащи епитопи, могат да бъдат идентифицирани по различни начини. Например, пълната протеинова последователност, съответстваща на централния участък, може да бъде скринирана чрез изготвяне на серии от къси пептиди, които заедно покриват пълната протеинова последователност на този участък. Започвайки например, с пептиди с приблизително 100 аминокиселини, въпрос на практика е тестването на всеки пептид за наличие на епитоп(и), показващи желаната активност, и след това чрез тестване на прогресивно намаляващи или покриващи се фрагменти от идентифицирани пептиди от 100 аминокиселини за картиране на търсения епитоп. Скринингът на такива пептиди в дадена имунологична проба е във възможностите на спе-

циалиста в областта. Известно е също, че е напълно възможно провеждане на компютърен анализ на дадена протеинова последователност за идентифициране на потенциални епитопи, и след това изготвяне на пептиди, съдържащи идентифицираните участъци за скрининг.

Имуногенността на HCV епитопите може да бъде повишена чрез изготвянето им в бозайникови или дрождеви системи, сляти с или комбинирани с формиращи частици протеини, като например тези, свързани с хепатит В повърхностен антиген. Виж, например, US 4722840. Структури, където HCV епитопът е свързан директно с формиращи частички протеини, които кодират последователности, образуват хибриди, които са имуногенни по отношение на HCV епитопа. В допълнение, всички изготвени вектори включват епитопи, специфични за HBV, притежават различни степени на имуногенност, като например, пре-S пептида. Така, частиците, конструирани от формиращите частици протеини, които включват HCV последователност, са имуногенни по отношение на HCV и HBV.

Освен това, порции от последователността, кодиращ формирацията частички протеин, могат да бъдат заместени с кодони за HCV епитоп. При това заместване, участъци които не са необходими за опосредстване на агрегацията на единиците за формиране на имуногенни частици в дрожди, могат да бъдат делетирани, като по този начин се елиминират допълнителни HBV антигенни места от конкуренция с HCV епитопа.

Ваксини

Ваксини могат да бъдат получени от един или повече имуногенни пептиди, получени от HCV.

От един или повече от епитопите на централния участък да се получи многовалентна ваксина срещу HCV. По-специално, се имат предвид ваксините, включващи един или повече протеина или антигенни субединици, получени от централния участък.

Получаването на ваксини, съдържащи един имуногенен пептид като активна съставка, е известно на специалистите в областта. Обикновено те се изготвят като инжекционни или течни разтвори или суспензии; могат да се изготвят и твърди форми, подходящи за разтваряне или суспендиране в течност преди инжектирането. Препаратът може също

така да бъде емулгируем или протеинът да се капсулира в липозоми. Активната имуногенна съставка често се смесва с фармацевтично приемливи и съвместими с активния компонент аджуванти. Подходящи в това отношение са например вода, разтвор на сол, декстроза, глицерол, етанол и др. подобни, както и комбинации от тях. В допълнение, при желание ваксината може да съдържа минимални количества спомагателни вещества като омокрящи или емулгиращи средства, рН буфериращи средства и/или добавки, които повишават ефективността на ваксината. Примери на такива добавки, без да са ограничаващи, са: алуминиев хидроокис, N-ацетил-мурамил-L-теронил-D-изоглутамин (thr-MDP), N-ацетил-нор-мурамил-аланин-D-изоглутамин (CGP 11637, означено като нор-MDP), N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутаминил-L-аланил-2-(1-2-дипалмитоил-sn-глицеро-3-хидроксофосфорилокси)-етиламен (CGP 19835A, означено като MTP-PE), и RIBI, които съдържат три компонента, екстрахирани от бактерия, монофосфорил липид А, трехалозо димиколат и клетъчни стени (MPL+TDM+CWS) в 2% емулсия на сквален/Tween 80. Ефективността на аджуванта може да бъде определена чрез измерване на количеството антитела, насочени срещу имуногенен пептид, съдържащ HCV антигенна последователност, получена в резултат от въвеждането на този пептид във ваксини, които също са съставени от различни аджуванти.

Обикновено ваксините се прилагат парентерално, чрез инжектиране, мускулно или подкожно. Други форми, подходящи за приложение, са супозитории, и в някои случаи форми за приложение per os. При супозиториумите, традиционни свързващи вещества и носители могат да бъдат примерно полиалкилен гликоли или триглицериди; като супозитории могат да се формират и състави, съдържащи от 0.5% до 10% от активното вещество, за предпочитане 1-2%. Формите за приложение през устата обикновено съдържат такива пълнители като манитол, лактоза, нишесте, магнезиев стеарат, натриев цитрат, целулоза, магнезиев карбонат и др., всички в съответната степен фармацевтично чисти.

По-долу е изложен секвенционният листинг на последователностите на HCV централния участък.

СЕКВЕНЦИОНЕН ЛИСТИНГ**ОБЩА ИНФОРМАЦИЯ****ЗАЯВИТЕЛ:** Tai- An Cha**ЗАГЛАВИЕ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО:** HCV геномни

последователности за диагностика и лечение

Брой на последователностите : 14

АДРЕС ЗА КОРЕСПОНДЕНЦИЯ:

Адрес: Wolf, Greenfield & Sacks, P. C.

Улица: 600 Atlantic Avenue

Boston

Щат: Massachusetts

Държава: USA

ZIP: 02210

КОМПЮТЪРНО ЧИТАЕМА ФОРМА:

Среден тип: Diskette, 5.25 inch

Компютър: IBM compatible

Оперативна система: MS-DOS Version 3.3

Софтуер: WordPerfect 5.1

Текущи данни за заявката:

Номер на заявяване: неизвестен

Дата на заявяване: неизвестен

Класификация: неизвестна

Първични данни за заявката:

Номер на заявяване: 07/ 697326

Дата на заявяване: 8 Май 1991

Патентен представител:

Име: Janiuk, Anthony J.

Регистрационен номер: 29 809

Референс номер: C0772/ 7000

Телекомуникационни данни:

Телефон: (617) 720- 3500

Телефакс: (617) 720- 2441

Телекс: EZEKIEL

ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO: 52

СЕКВЕНЦИОННА ХАРАКТЕРИСТИКА:

ДЪЛЖИНА: 549 нуклеотида

ТИП: нуклеинова киселина

ВЕРИЖНОСТ: едноверижна

ТОПОЛОГИЯ: линейна

МОЛЕКУЛЕН ТИП: ДНК

(vi) ПРОИЗХОД: (ATCC # 40394)

(C) ИНДИВИДУАЛЕН ИЗОЛАТ: hcv1

ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO: 52

ATGAGCACGA	ATCCTAAACC	TCAAAAAAA	AACAACGTA	40
ACACCAACCG	TCGCCCACAG	GACGTCAAGT	TCCCGGGTGG	80
CGGTCAGATC	GTTGGTGGAG	TTTACTTGTT	GCCGCGCAGG	120
GGCCCTAGAT	TGGGTGTGCG	CGCGACGAGA	AAGACTTCCG	160
AGCGGTCGCA	ACCTCGAGGT	AGACGTCAGC	CTATCCCCAA	200
GGCTCGTCGG	CCCGAGGGCA	GGACCTGGGC	TCAGCCCGGG	240
TACCCTTGGC	CCCTCTATGG	CAATGAGGGC	TGCGGGTGGG	280
CGGGATGGCT	CCTGCTCTCC	CGTGGCTCTC	GGCCTAGCTG	320
GGGCCCCACA	GACCCCGGC	GTAGGTCGCG	CAATTTGGGT	360
AAGGTCATCG	ATACCCCTAC	GTCCGGCTTC	GCCGACCTCA	400
TGGGGTACAT	ACCGCTCGTC	GGCGCCCTC	TTGGAGGCGC	440
TGCCAGGGCC	CTGGCGCATG	GCGTCCGGGT	TCTGGAAGAC	480
GGCGTGAAC	ATGCAACAGG	GAACCTTCCT	GGTTGCTCTT	520
TCTCTATCTT	CCTTCTGGCC	CTGCTCTCT		549

ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO: 53

СЕКВЕНЦИОННА ХАРАКТЕРИСТИКА:

ДЪЛЖИНА: 549 нуклеотида

ТИП: нуклеинова киселина

ВЕРИЖНОСТ: едноверижна

ТОПОЛОГИЯ: линеарна

МОЛЕКУЛЕН ТИП: ДНК

(vi) ПРОИЗХОД:

(C) ИНДИВИДУАЛЕН ИЗОЛАТ: us5

ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO: 53

ATGAGCACGA ATCCTAAACC TCAAGAAGAA ACCAAACGTA	40
ACACCAACCG TCGCCACACG GACGTCAAGT TCCCAGGTGG	80
CGGTCAATAT GTTGGTGGAG TTTACTTGTT GCCGCGCAGG	120
GGCCCTAGAT TGGGTGTGCG CGCGACGAGG AAGACTTCCG	160
AGCGGTCGCA ACCTCGAGGT AGACGTCAGC CTATCCCCAA	200
GGCGCGTCCG CCCGAGGGCA GGACCTGGGC TCAGCCCGGG	240
TACCCCTGGC CCCTCTATGG CAATGAGGGT TGCAGGTGGG	280
CGGGATGGCT CCTGTCTCCC CGTGGCTCTC GGCCTAGTTG	320
GGGCCCCACA GACCCCGGC GTAGGTCGCG CAATTTGGGT	360
AAGGTCATCG ATACCCCTAC GTGCGGCTTC GCCGACCACA	400
TGGGGTACAT ACCGCTCGTC GGCGCCCTTC TTGGAGGCGC	440
TGCCAGGGCT CTGGCGCATG GCGTCCGGGT TCTGGAAGAC	480
GGCGTGAAC ATGCAACAGG GAACCTTCCT GGTGCTCTT	520
TCTCTATCTT CCTTCTGGCC CTGCTCTCT	549

ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO: 54

СЕКВЕНЦИОННА ХАРАКТЕРИСТИКА:

ДЪЛЖИНА: 549 нуклеотида

ТИП: нуклеинова киселина

ВЕРИЖНОСТ: едноверижна

ТОПОЛОГИЯ: линеарна

МОЛЕКУЛЕН ТИП: ДНК

(vi) ПРОИЗХОД:

(C) ИНДИВИДУАЛЕН ИЗОЛАТ: aus1

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO:

54:

ATGAGCACGA	ATCCTAAACC	TCAAAGAAAA	ACCAAACGTA	40
ACACCAACCG	TCGCCCACAG	GACGTTAAGT	TCCCAGGTGG	80
CGGTCAGATC	GTTGGTGGAG	TTTACTTGTT	GCCGCGCAGG	120
GGCCCTAGAT	TGGGTGTGCG	CGCGACGAGG	AAGACTTCCG	160
AGCGGTCGCA	ACCTCGAGGT	AGACGTCAGC	CTATCCCTAA	200
GGCGCGTCGG	CCCAGGGGCA	GGACCTGGGC	TCAGCCCGGG	240
TACCCCTGGC	CCCTCTATGG	TAATGAGGGT	TGCGGATGGG	280
CGGGATGGCT	CCTGTCCCCC	CGTGGCTCTC	GGCCTAGTTG	320
GGGCCCTACA	GACCCCCGGC	GTAGGTCGCG	CAATTTGGGT	360
AAGGTCATCG	ATACCCTCAC	GTGCGGCTTC	GCCGACCACA	400
TGGGGTACAT	TCCGCTCGTT	GGCGCCCTTC	TTGGGGGCGC	440
TGCCAGGGCC	CTGGCGCATG	GCGTCCGGGT	TCTGGAAGAC	480
GGCGTGAACT	ATGCAACAGG	GAATCTTCCT	GGTTGCTCTT	520
TCTCTATCTT	CCTTCTGGCC	CTTCTCTCT		549

ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO: 55

СЕКВЕНЦИОННА ХАРАКТЕРИСТИКА:

ДЪЛЖИНА: 549 нуклеотида

ТИП: нуклеинова киселина

ВЕРИЖНОСТ: едностранна

ТОПОЛОГИЯ: линейна

МОЛЕКУЛЕН ТИП: ДНК

(VI) ПРОИЗХОД:

(C) ИНДИВИДУАЛЕН ИЗОЛАТ: sp2

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO:

55:

ATGAGCACGA ATCCTAAACC TCAAAGAAA ACCAAACGTA	40
ACACCAACCG TCGCCACAG GACGTCAAGT TCCCGGGTGG	80
CGGTCAGATC GTTGGTGGAG TTTACTTGTT GCCGCGCAGG	120
GGCCCTAGAT TGGGTGTGCG CACGACGAGG AAGACTTCCG	160
AGCGGTCGCA ACCTCGAGGT AGACGTCAGC CCATCCCCAA	200
GGCTCGTCGA CCCGAGGGCA GGACCTGGGC TCAGCCCGGG	240
TACCCCTGGC CCCTCTATGG CAATGAGGGC TCGGGGTGGG	280
CGGGATGGCT CCTGTCTCCC CGTGGCTCTC GGCCTAGCTG	320
GGGCCCCACA GACCCCGGC GTAGGTCGCG CAATTTGGGT	360
AAGGTCATCG ATACCCTTAC GTGCGGCTTC GCCGACCTCA	400
TGGGGTACAT ACCGCTCGTC GGCGCCCTC TTGGAGGCGC	440
TGCCAGAGCC CTGGCGCATG GCGTCCGGGT TCTGGAAGAC	480
GGCGTGAACAT ATGCAACAGG GAACCTTCCC GGTGCTCTT	520
TCTCTATCTT CCTTCTGGCC CTGCTCTCT	549

ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO: 56

СЕКВЕНЦИОННА ХАРАКТЕРИСТИКА:

ДЪЛЖИНА: 549 нуклеотида

ТИП: нуклеинова киселина

ВЕРИЖНОСТ: едностранна

ТОПОЛОГИЯ: линейна

МОЛЕКУЛЕН ТИП: ДНК

(vi) ПРОИЗХОД:

(C) ИНДИВИДУАЛЕН ИЗОЛАТ: gm2

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO: 29

56:

ATGAGCACGA	ATCCTAAACC	TCAAAGAAGA	ACCAAACGTA	40
ACACCAACCG	TGCCCCACAG	GACGTCAAGT	TCCCGGGTGG	80
CGGTCAGATC	GTGGGTGGAG	TTACTTTGTT	GCCGCGCAGG	120
GGCCCTAGAT	TGGGTGTGCG	CGCGACGAGG	AAGACTTCCG	160
AGCGGTGCGA	ACCTCGAGGT	AGACGTCAGC	CTATCCCCAA	200
GGCAGGTGCG	CCCGAGGGTA	GGACCTGGGC	TCAGCCCGGG	240
TACCCTTGGC	CCCTCTATGG	CAATGAGGGT	TGCGGGTGGG	280
CGGGATGGCT	CCTGTCTCCC	CGCGGCTCTC	GGCCTAAGTG	320
GGGCCCCACA	GACCCCCGGC	GTAGGTCGCG	CAATTTGGGT	360
AAGGTCATCG	ATACCCCTAC	GTGCGGCTTC	GCCGACCTCA	400
TGGGTACAT	ACCGCTCGTC	GGCGCCCTTC	TTGGAGGCGC	440
TGCCAGGGCC	CTGGCGCATG	GCGTCCGGGT	TCTGGAAGAC	480
GGCGTGAAC	ATGCAACAGG	GAACCTTCCT	GGTTGCTCTT	520
TCTCTATCTT	CCTTCTGGCC	CTGCTCTCT		549

ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO: 57

СЕКВЕНЦИОННА ХАРАКТЕРИСТИКА:

ДЪЛЖИНА: 549 нуклеотида

ТИП: нуклеинова киселина

ВЕРИЖНОСТ: едноверижна

ТОПОЛОГИЯ: линейна

МОЛЕКУЛЕН ТИП: ДНК

(vi) ПРОИЗХОД:

(C) ИНДИВИДУАЛЕН ИЗОЛАТ: 121

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO:

57:

ATGAGCACGA	ATCCTAAACC	TCAAAGAAAA	ACCAAACGTA	40
ACACCAACCG	TGCCCCACAG	GACGTCAAGT	TCCCGGGTGG	80
CGGTCAGATC	GTGGGTGGAG	TTACTTTGTT	GCCGCGCAGG	120
GGCCCTAGAT	TGGGTGTGCG	CGCGACGAGG	AAGACTTCCG	160
AGCGGTGCGA	ACCTCGTGGT	AGACGCCAGC	CTATCCCCAA	200
GGCGGTGCGG	CCCGAGGGCA	GGACCTGGGC	TCAGCCCGGG	240
TACCCTTGGC	CCCTCTATGG	CAATGAGGGT	TGCGGGTGGG	280
CGGGATGGCT	CCTGTCTCCC	CGTGGCTCTC	GGCCTAGCTG	320
GGGCCCCACA	GACCCCCGGC	GTAGGTCGCG	CAATTTGGGT	360
AAGGTCATCG	ATACCCCTAC	GTGCGGCTTC	GCCGACCTCA	400
TGGGTACAT	ACCGCTCGTC	GGCGCCCTTC	TTGGAGGCGC	440
TGCCAGGGCC	CTGGCGCATG	GCGTCCGGGT	TCTGGAAGAC	480
GGCGTGAAC	ATGCAACAGG	GAACCTTCCT	GGTTGCTCTT	520
TTTCTATTTT	CCTTCTGGCC	CTGCTCTCT		549

ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO: 58

СЕКВЕНЦИОННА ХАРАКТЕРИСТИКА:

ДЪЛЖИНА: 549 нуклеотида

ТИП: нуклеинова киселина

ВЕРИЖНОСТ: едноверижна

ТОПОЛОГИЯ: линейна

МОЛЕКУЛЕН ТИП: ДНК

(vi) ПРОИЗХОД:

(C) ИНДИВИДУАЛЕН ИЗОЛАТ: us4

ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO: 58

ATGAGCACGA ATCCTAAACC TCAAAGAAAA ACCAAACGTA	40
ACACCAACCG CCGCCACAG GACGTTAAGT TCCCGGGCGG	80
TGGCCAGGTC GTTGGTGGAG TTTACCTGTT GCCGCGCAGG	120
GGCCCCAGGT TGGGTGTGCG CGCGACTAGG AAGACTTCCG	160
AGCGGTGCGA ACCTCGTGGA AGGCGACAAC CTATCCCCAA	200
GGCTCGCCAG CCCGAGGGCA GGGCCTGGGC TCAGCCCGGG	240
TACCCCTGGC CCCTCTATGG CAATGAGGGT ATGGGGTGGG	280
CAGGATGGCT CCTGTCACCC CGTGGCTCTC GGCCTAGTTG	320
GGGCCCCACG GACCCCCGGC GTAGGTGCGG TAATTTGGGT	360
AAGGTGATCG ATACCTCAG ATGCGGCTTC GCCGACCTCA	400
TGGGGTACAT TCCGCTCGTC GCGCCCCCCC TTAGGGGCGC	440
TGCCAGGGCC TTGGCGCATG GCGTCCGGGT TCTGGAGGAC	480
GGCGTGAAC TCGCAACAGG GAATCTGCCC GGTGCTCCT	520
TTTCTATCTT CCTCTTGGCT CTGCTGTCC	549

ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO: 59

СЕКВЕНЦИОННА ХАРАКТЕРИСТИКА:

ДЪЛЖИНА: 549 нуклеотида

ТИП: нуклеинова киселина

ВЕРИЖНОСТ: едноверижна

ТОПОЛОГИЯ: линейна

МОЛЕКУЛЕН ТИП: ДНК

(vi) ПРОИЗХОД:

(C) ИНДИВИДУАЛЕН ИЗОЛАТ: jh1

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO: 59

ATGAGCACA	ATCCTAAACC	TCAAAGAAAA	ACCAAACGTA	40
ACACCAACCG	CCGCCCACAG	GACGTCAAGT	TCCCGGGCGG	80
TGGTCAGATC	GTTGGTGGAG	TTTACCTGTT	GCCGCGCAGG	120
GGCCCCAGGT	TGGGTGTGCG	CGCGACTAGG	AAGACTTCCG	160
AGCGGTGCGA	ACCTCGTGGG	AGGCGACAAC	STATCCCCAA	200
GGCTCGCCAG	CCCGAGGGCA	GGGCCTGGGC	TCAGCCCCGG	240
TACCCCTGGC	CCCTCTATGG	CAACGAGGGT	ATGGGGTGGG	280
CAGGATGGCT	CCTGTCACCC	CGTGGCTCTC	GGCCTAGTTG	320
GGGCCCCACG	GACCCCCGGC	GTAGGTCGCG	TAATTTGGGT	360
AAGGTCATCG	ATACCCCTCAC	ATGCGGCTTC	GCCGACCTCA	400
TGGGGTACAT	TCCGCTTGTC	GCGCCCCCCC	TAGGGGGCGC	440
TGCCAGGGCC	CTGGCACATG	GTGTCCGGGT	TCTGGAGGAC	480
GGCGTGAAC	ATGCAACAGG	GAATTTGCCC	GGTTGCTCTT	520
TCTCTATCTT	CCTCTTGGCT	CTGCTGTCC		549

ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO: 60

СЕКВЕНЦИОННА ХАРАКТЕРИСТИКА:

ДЪЛЖИНА: 549 нуклеотида

ТИП: нуклеинова киселина

ВЕРИЖНОСТ: едновърижна

ТОПОЛОГИЯ: линейна

МОЛЕКУЛЕН ТИП: ДНК

(vi) ПРОИЗХОД:

(C) ИНДИВИДУАЛЕН ИЗОЛАТ: pac5

ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO: 60

ATGAGCACA	ATCCTAAACC	CCAAAGAAAA	ACCAAACGTA	40
ACACCAACCG	TCGCCCACAG	GACGTCAAGT	TCCCGGGCGG	80
TGGTCAGATC	GTTGGTGGAG	TTTACCTGTT	GCCGCGCAGG	120
GGCCCCAGGT	TGGGTGTGCG	CGCGACTAGG	AAGACTTCCG	160
AGCGGTGCGA	ACCTCGTGGG	AGGCGACAAC	STATCCCCAA	200
GGCTCGCCGG	CCCGAGGGCA	GGTCCTGGGC	TCAGCCCCGG	240
TACCCCTGGC	CCCTCTATGG	CAACGAGGGT	ATGGGGTGGG	280
CAGGATGGCT	CCTGTCACCC	CGCGGCTCCC	GGCCTAGTTG	320
GGGCCCCACG	GACCCCCGGC	GTAGGTCGCG	TAATTTGGGT	360
AAGGTCATCG	ATACCCCTCAC	ATGCGGCTTC	GCCGACCTCA	400
TGGGGTACAT	TCCGCTCGTC	GCGCCCCCCC	TAGGGGGCGC	440
TGCCAGGGCC	CTGGCACATG	GTGTCCGGGT	TCTGGAGGAC	480
GGCGTGAAC	ATGCAACAGG	GAATTTGCGT	GGTTGCTCTT	520
TCTCTATCTT	CCTCTTGGCT	CTGCTGTCC		549

ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO: 61

СЕКВЕНЦИОННА ХАРАКТЕРИСТИКА:

ДЪЛЖИНА: 549 нуклеотида

ТИП: нуклеинова киселина

ВЕРИЖНОСТ: едноверижна

ТОПОЛОГИЯ: линеарна

МОЛЕКУЛЕН ТИП: ДНК

(vi) ПРОИЗХОД:

(C) ИНДИВИДУАЛЕН ИЗОЛАТ: arg2

ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO: 61

ATGAGCAGCA ATCCTAAACC TCAAAGAAAA ACCAAACGTA	40
ACACCAACCG CCGCCACAG GACGTCAAGT TCCCGGGCGG	80
TGGTCAATC GTTGGTGGAG TTTACTTGTT GCCGCGCAGG	120
GGCCCCAGGT TGGGTGTGCG CGCGACTAGG AAGACTTCCG	160
AGCGGTGCSA ACCTCGTGGA AGGCGACAAC CTATCCCCAA	200
GGCTCGCCAG CCCGAGGGTA GGGCCTGGGC TCAGCCCGGG	240
TACCCCTGGC CCCTCTATGG CAATGAGGGT ATGGGGTGGG	280
CAGGGTGGCT CCTGTCCCCC CGCGGCTCCC GGCCTAGTTG	320
GGGCCCCACA GACCCCGGC GTAGGTGCGG TAATTTGGGT	360
AAGGTCATCG ATACCCTCAC ATGCGGCTTC GCCGACCTCA	400
TGGGGTACAT TCCGCTCGTC GCGCCCCCCC TAGGGGGCGC	440
TGCCAGGGCC CTGGCGCATG GCGTCCGGGT TCTGGAGGAC	480
GGCGTGAAC ATGCAACAGG GAATCTGCCC GGTTCCTCTT	520
TCTCTATCTT CCTCTTGGCT TTGCTGTCC	549

ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO: 62

СЕКВЕНЦИОННА ХАРАКТЕРИСТИКА:

ДЪЛЖИНА: 549 нуклеотида

ТИП: нуклеинова киселина

ВЕРИЖНОСТ: едноверижна

ТОПОЛОГИЯ: линеарна

МОЛЕКУЛЕН ТИП: ДНК

(vi) ПРОИЗХОД:

(C) ИНДИВИДУАЛЕН ИЗОЛАТ: sp1

ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO: 62

ATGAGCAGCA ATCCTAAACC TCAAGAAAA ACCAAACGTA	40
ACACCAACCG CCGCCACAG GACGTCAAGT TCCCGGGCGG	80
TGGTCAGATC GTTGGTGGAG TTTACCTGTT GCCGCGCAGG	120
GGCCCCAGGT TGGGTGTGCG CGCGACTAGG AAGACTTCCG	160
AGCGGTGCGA ACCTCGTGA AGGCGACAAC CTATCCCCAA	200
GGCTCGCCGG CCCGAGGGCA GGGCCTGGGC TCAGCCCGGG	240
TATCCTTGGC CCTCTATGG CAATGAGGGT CTGGGGTGGG	280
CAGGATGGCT CCTGTACCC CGCGGTCTC GGCCTAGCTG	320
GGGCCCTACC GACCCCGGC GTAGGTGCGG CAACTTGGGT	360
AAGGTATCG ATACCTTAC GTGCGGCTTC GCCGACCTCA	400
TGGGTACAT TCCGCTCTC GCGCCCCCCT TAGGGGCGC	440
TGCCAGGGCC CTGGCGCATG GCGTCCGGGT TCTGGAGGAC	480
GGCGTGAAC ATGCAACAGG GAATTGCCC GGTGCTCTT	520
TCTCTATCTT CCTCTGGCT TTGCTGTCC	549

ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO: 63

СЕКВЕНЦИОННА ХАРАКТЕРИСТИКА:

ДЪЛЖИНА: 549 нуклеотида

ТИП: нуклеинова киселина

ВЕРИЖНОСТ: едноверижна

ТОПОЛОГИЯ: линейна

МОЛЕКУЛЕН ТИП: ДНК

(vi) ПРОИЗХОД:

(C) ИНДИВИДУАЛЕН ИЗОЛАТ: gh1

ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO: 63

ATGAGCAGCA ATCCTAAACC TCAAGAAAA ACCAAACGTA	40
ACACCAACCG CCGCCACAG GACGTCAAGT TCCCGGGCGG	80
TGGTCAGATC GTTGGTGGAG TTTACTTGTG GCCGCGCAGG	120
GGCCCCAGGT TGGGTGTGCG CGCGACTAGG AAGACTTCCG	160
AGCGGTGCGA ACCTCGTGA AGGCGACAAC CTATCCCCAA	200
GGCTCGCCGG CCCGAGGGCA GGGCCTGGGC TCAGCCCGGG	240
TACCTTGGC CCTCTATGG CAATGAGGGT ATGGGGTGGG	280
CAGGATGGCT CCTGTACCC CGTGGTTCTC GGCCTAGTTG	320
GGGCCCCACG GACCCCGGC GTAGGTGCGG CAATTGGGT	360
AAGATCATCG ATACCTCAC GTGCGGCTTC GCCGACCTCA	400
TGGGGTACAT TCCGCTCTC GCGCCCCCCT TAGGGGCGC	440
TGCCAGGGCC CTGGCGCATG GCGTCCGGGT TCTGGAGGAC	480
GGCGTGAAC ATGCAACAGG GAATCTGCCC GGTGCTCTT	520
TTCTCTCTT CCTCTGGCT TTGCTGTCC	549

ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO: 64

СЕКВЕНЦИОННА ХАРАКТЕРИСТИКА:

ДЪЛЖИНА: 549 нуклеотида

ТИП: нуклеинова киселина

ВЕРИЖНОСТ: едностранна

ТОПОЛОГИЯ: линейна

МОЛЕКУЛЕН ТИП: ДНК

(vi) ПРОИЗХОД:

(C) ИНДИВИДУАЛЕН ИЗОЛАТ: i15

ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO: 64

ATGAGCACGA ATCCTAAACC TCAAGAAAA ACCAAACGTA	40
ACACCAACCG CCGCCACAG GACGTCAAGT TCCCCGGCGG	80
TGGTCAGATC GTTGGTGGAG TTTACCTGTT GCCGCGCAGG	120
GGCCCCAGGT TGGGTGTGCG CGCGACTAGG AAGACTTCCG	160
AGCGGTGCGA ACCTCGTGGA AGGCGACAAC CTATCCCCAA	200
GGCTCGCCAG CCCGAGGGCA GGGCCTGGGC TCAGCCCGGG	240
TACCCCTGGC CCCTCTATGG CAATGAGGGT ATGGGGTGGG	280
CAGGATGGCT CCTGTCACCC CGCGGCTCCC GGCCTAGTTG	320
GGGCCCCAAA GACCCCCGGC GTAGGTCGCG TAATTGGGT	360
AAGGTCATCG ATACCCTCAC ATGCGGCTTC GCCGACCTCA	400
TGGGGTACAT TCCGCTCGTC GGCGCCCCCT TAGGGGGCGC	440
TGCCAGGGCC CTGGCGCATG GCGTCCGGGT TCTGGAGGAC	480
GGCGTGAACAT ATGCAACAGG GAATCTACCC GGTGCTCTT	520
TCTCTATCTT CCTCTGGCT TTGCTGTCC	549

ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO: 65

СЕКВЕНЦИОННА ХАРАКТЕРИСТИКА:

ДЪЛЖИНА: 549 нуклеотида

ТИП: нуклеинова киселина

ВЕРИЖНОСТ: едностранна

ТОПОЛОГИЯ: линейна

МОЛЕКУЛЕН ТИП: ДНК

(vi) ПРОИЗХОД:

(C) ИНДИВИДУАЛЕН ИЗОЛАТ: i10

ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO: 65

ATGAGCACA	ATCCTAAACC	TCAAAGAAA	ACCAAAAGAA	40
ACASTAACCG	CCGCCACAG	GACGTCAAGT	TCCCGGGCGG	80
TGGCCAGATC	GTTGGCGGAG	TATACTTGCT	GCCGCGCAGG	120
GGCCCGAGAT	TGGGTGTGCG	CGCGACGAGG	AAAACCTCCG	160
AACGATCCCA	GCCACGCGGA	AGGCGTCAGC	CCATCCCTAA	200
AGATCGTCCG	ACCGCTGGCA	AGTCCTGGGG	AAGGCCAGGA	240
TATCCTTGGC	CCCTGTATGG	GAATGAGGGT	CTCGGCTGGG	280
CAGGGTGGCT	CCTGTCCCCC	CGTGGCTCTC	GCCCTTCATG	320
GGGCCCCACT	GACCCCCGGC	ATAGATCCCG	CAACTTGGGT	360
AAGGTCATCG	ATACCCTAAC	GTGCGGTTTT	GCCGACCTCA	400
TGGGGTACAT	TCCCGTCATC	GGCGCCCCCG	TTGGAGGCGT	440
TGCCAGAGCT	CTCGCCACCG	GAGTGAGGGT	TCTGGAGGAT	480
GGGGTAAATT	ATGCAACAGG	GAATTTGCCC	GTTTGCTCTT	520
TCTCTATCTT	TCTCTAGCC	CTCTTGCT		549

ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO: 66

СЕКВЕНЦИОННА ХАРАКТЕРИСТИКА:

ДЪЛЖИНА: 549 нуклеотида

ТИП: нуклеинова киселина

ВЕРИЖНОСТ: едноверижна

ТОПОЛОГИЯ: линейна

МОЛЕКУЛЕН ТИП: ДНК

(vi) ПРОИЗХОД:

(C) ИНДИВИДУАЛЕН ИЗОЛАТ: arg6

ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO: 66

ATGAGCACA	ATCCTCAACC	TCAAAGAAA	ACCAAAAGAA	40
ACASTAACCG	CCGCCACAG	GACGTCAAGT	TCCCGGGCGG	80
TGGTCAGATC	GTTGGCGGAG	TATACTTGTT	GCCGCGCAGG	120
GGCCCGAGGT	TGGGTGTGCG	CGCGACGAGG	AAAACCTCCG	160
AACGGTCCCA	GCCACGTGGG	AGGCGCCAGC	CCATCCCCAA	200
AGATCGGCGC	ACCACTGGCA	AGTCCTGGGG	GAAGCCAGGA	240
TACCTTGGC	CCCTGTATGG	GAATGAGGGT	CTCGGCTGGG	280
CAGGGTGGCT	CCTGTCCCCC	CGCGGTTCTC	GCCCTTCATG	320
GGGCCCCACT	GACCCCCGGC	ATAGATCACG	CAACTTGGGT	360
AAGGTCATCG	ATACCCTAAC	GTGTGGTTTT	GCCGACCTCA	400
TGGGGTACAT	TCCCGTCGGT	GGTGCCCCCG	TTGGTGGTGT	440
CGCCAGAGCC	CTTGCCCATG	GGGTGAGGGT	TCTGGAAGAC	480
GGGATAAATT	ATGCAACAGG	GAATCTGCCC		510

Патентни претенции

1. Диагностичен и лечебен състав, отнасящ се до HCV, който включва несрещана в природата последователност на нуклеинови киселини, характеризиращ се с това, че посочената нуклеинова киселина включва не- HCV-1 последователност на нуклеинови киселини с най-малко осем последователни нуклеотида от централния участък, подбрани от последователност на нуклеинови киселини в рамките на SEQ ID номера 53-66.

2. Състав съгласно претенция 1, където посочената не- HCV-1 последователност от нуклеинови киселини представлява един или повече генотипа HCV.

3. Състав съгласно претенция 2, където посочената не- HCV-1 последователност от нуклеинови киселини представлява последователност от първи генотип и е подбрана от последователност на нуклеинови киселини със SEQ ID номера 53- 57.

4. Състав съгласно която и да е от претенции 1- 3, включващ маркер.

5. Състав съгласно която и да е от претенции 1- 4, където посочената не- HCV последователност от аминокиселини е фиксирана към твърда фаза.

6. Състав съгласно която и да е от претенции 1- 3, където посочената не- HCV-1 последователност от нуклеинови киселини е праймер за ДНК синтеза.

7. Метод за формиране на хибридационен продукт с HCV последователност от аминокиселини, характеризиращ се с това, че включва етапите на:

а) поставяне на несрещана в природата пос-

ледователност от аминокиселини в контакт с проба, за която се счита, че съдържа HCV последователност от нуклеинови киселини в условия на хибридация;

б) прилагане на хибридационни условия за формиране на хибридационен продукт в присъствие на HCV последователност от аминокиселини.

с) откриване на посочения хибридационен продукт, характеризиращо се с това, че несрещната в природата последователност от аминокиселини е не- HCV-1 последователност от нуклеинови киселини съгласно която и да е от претенции 1- 5.

8. Метод за установяване на един или повече генотипа на HCV, който включва:

а) поставяне на несрещана в природата последователност от нуклеинови киселини в контакт с проба, съдържаща HCV последователност от нуклеинови киселини, за които е желателно определянето на генотипа, в условия на хибридация;

б) прилагане на хибридационни условия за формиране на хибридационен продукт в присъствие на HCV последователност от нуклеинови киселини; и

с) установяване на посочения хибридационен продукт, който е показателен за присъствието на HCV генотипа, характеризиращ се с това, че посочената несрещана в природата последователност от нуклеинови киселини е не- HCV-1 последователност, съгласно която и да е от претенции 1- 5.

Приложение: 2 фигури

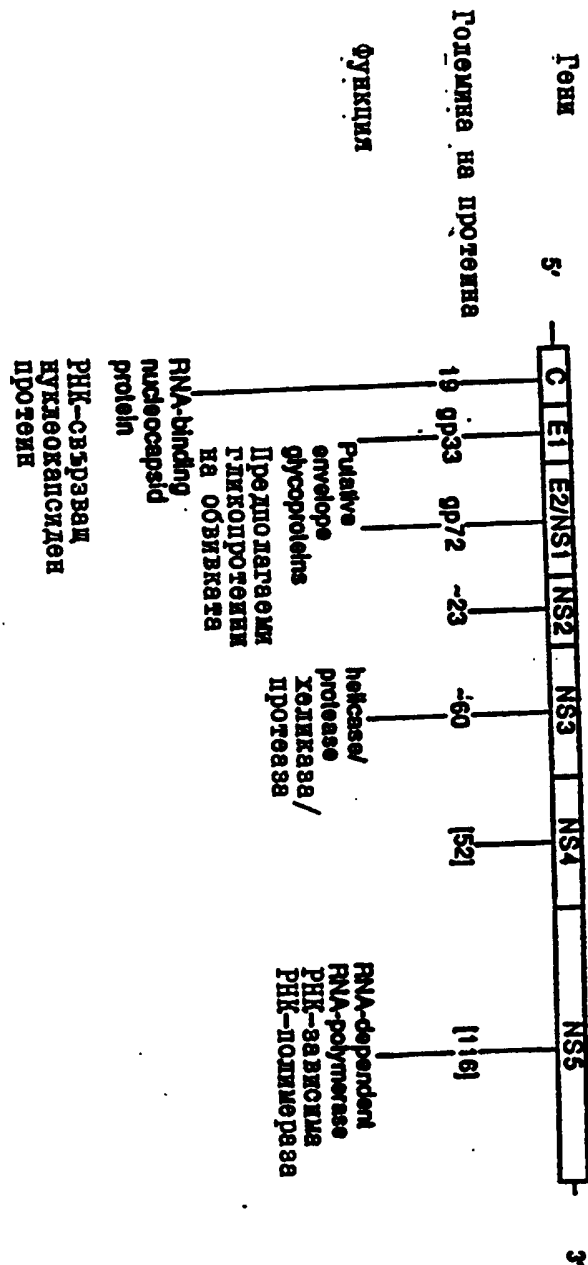
Издание на Патентното ведомство на Република България
1113 София, бул. "Д-р Г. М. Димитров" 52-Б

Експерт: Д.Кацарова

Редактор: Р.Георгиева

Пор. № 42903

Тираж: 40 MB



Фиг. 1

Центральный

850 1D Mc. renortim

52	GI	1	ATGAGCAGCA	ATCTTAAC	TCAAAAGAAA	ACCAAACTTA	ACAACCAACG	TGCGCCACAG
53		1	ATGAGCAGCA	ATCTTAAC	TCAAAAGAAA	ACCAAACTTA	ACAACCAACG	TGCGCCACAG
54		1	ATGAGCAGCA	ATCTTAAC	TCAAAAGAAA	ACCAAACTTA	ACAACCAACG	TGCGCCACAG
55		1	ATGAGCAGCA	ATCTTAAC	TCAAAAGAAA	ACCAAACTTA	ACAACCAACG	TGCGCCACAG
56		1	ATGAGCAGCA	ATCTTAAC	TCAAAAGAAA	ACCAAACTTA	ACAACCAACG	TGCGCCACAG
57		1	ATGAGCAGCA	ATCTTAAC	TCAAAAGAAA	ACCAAACTTA	ACAACCAACG	TGCGCCACAG
58	GI1	1	ATGAGCAGCA	ATCTTAAC	TCAAAAGAAA	ACCAAACTTA	ACAACCAACG	TGCGCCACAG
59		1	ATGAGCAGCA	ATCTTAAC	TCAAAAGAAA	ACCAAACTTA	ACAACCAACG	TGCGCCACAG
60		1	ATGAGCAGCA	ATCTTAAC	TCAAAAGAAA	ACCAAACTTA	ACAACCAACG	TGCGCCACAG
61		1	ATGAGCAGCA	ATCTTAAC	TCAAAAGAAA	ACCAAACTTA	ACAACCAACG	TGCGCCACAG
62		1	ATGAGCAGCA	ATCTTAAC	TCAAAAGAAA	ACCAAACTTA	ACAACCAACG	TGCGCCACAG
63		1	ATGAGCAGCA	ATCTTAAC	TCAAAAGAAA	ACCAAACTTA	ACAACCAACG	TGCGCCACAG
64		1	ATGAGCAGCA	ATCTTAAC	TCAAAAGAAA	ACCAAACTTA	ACAACCAACG	TGCGCCACAG
65	GI11	1	ATGAGCAGCA	ATCTTAAC	TCAAAAGAAA	ACCAAACTTA	ACAACCAACG	TGCGCCACAG
66		1	ATGAGCAGCA	ATCTTAAC	TCAAAAGAAA	ACCAAACTTA	ACAACCAACG	TGCGCCACAG

Физ. 2б
центральный канал (12/9),

ИДЕНТИФИКАЦИЯ
SEQ ID NO: 1080711

```

-----
52      01      61      GACGTCAAGT TCCCGGGGTGG CGGTCAAGTC GTTGTGTGAG TTACTTGTGTT GCCCGCCAGG
53      61      GACGTCAAGT TCCCGGGGTGG CGGTCAAGTC GTTGTGTGAG TTACTTGTGTT GCCCGCCAGG
54      61      GACGTCAAGT TCCCGGGGTGG CGGTCAAGTC GTTGTGTGAG TTACTTGTGTT GCCCGCCAGG
55      61      GACGTCAAGT TCCCGGGGTGG CGGTCAAGTC GTTGTGTGAG TTACTTGTGTT GCCCGCCAGG
56      61      GACGTCAAGT TCCCGGGGTGG CGGTCAAGTC GTTGTGTGAG TTACTTGTGTT GCCCGCCAGG
57      61      GACGTCAAGT TCCCGGGGTGG CGGTCAAGTC GTTGTGTGAG TTACTTGTGTT GCCCGCCAGG
-----
58      011     61      GACGTCAAGT TCCCGGGGTGG TGGCCAGATC GTTGTGTGAG TTACTTGTGTT GCCCGCCAGG
59      61      GACGTCAAGT TCCCGGGGTGG TGGCCAGATC GTTGTGTGAG TTACTTGTGTT GCCCGCCAGG
60      61      GACGTCAAGT TCCCGGGGTGG TGGCCAGATC GTTGTGTGAG TTACTTGTGTT GCCCGCCAGG
61      61      GACGTCAAGT TCCCGGGGTGG TGGCCAGATC GTTGTGTGAG TTACTTGTGTT GCCCGCCAGG
62      61      GACGTCAAGT TCCCGGGGTGG TGGCCAGATC GTTGTGTGAG TTACTTGTGTT GCCCGCCAGG
63      61      GACGTCAAGT TCCCGGGGTGG TGGCCAGATC GTTGTGTGAG TTACTTGTGTT GCCCGCCAGG
64      61      GACGTCAAGT TCCCGGGGTGG TGGCCAGATC GTTGTGTGAG TTACTTGTGTT GCCCGCCAGG
-----
65      011     61      GACGTCAAGT TCCCGGGGTGG TGGCCAGATC GTTGTGTGAG TTACTTGTGTT GCCCGCCAGG
66      61      GACGTCAAGT TCCCGGGGTGG TGGCCAGATC GTTGTGTGAG TTACTTGTGTT GCCCGCCAGG
-----

```

Ф.У.2. 2С
уепрпнен жзсгсх/у)

seq ID	геном
№	
52	01 121
53	121
54	121
55	121
56	121
57	121
58	011 121
59	121
60	121
61	121
62	121
63	121
64	121
65	0111 121
66	121

Фв2.2д
ЧЕРТА НЕН
УРАТЗЕ (4/8)

```

.....
Seq ID  F0H0T0M
.....
Nc
.....
52  01  101  AGAGTCACG CTATCCCA  GAGTCGTGG CCCAAGGCA GAAGCTGGG TCAAGCCGG
53  101  AGAGTCACG CTATCCCA  GAGTCGTGG CCCAAGGCA GAAGCTGGG TCAAGCCGG
54  101  AGAGTCACG CTATCCCA  GAGTCGTGG CCCAAGGCA GAAGCTGGG TCAAGCCGG
55  101  AGAGTCACG CTATCCCA  GAGTCGTGG CCCAAGGCA GAAGCTGGG TCAAGCCGG
56  101  AGAGTCACG CTATCCCA  GAGTCGTGG CCCAAGGCA GAAGCTGGG TCAAGCCGG
57  101  AGAGTCACG CTATCCCA  GAGTCGTGG CCCAAGGCA GAAGCTGGG TCAAGCCGG
.....
58  011  101  AGAGTCACG CTATCCCA  GAGTCGTGG CCCAAGGCA GAAGCTGGG TCAAGCCGG
59  101  AGAGTCACG CTATCCCA  GAGTCGTGG CCCAAGGCA GAAGCTGGG TCAAGCCGG
60  101  AGAGTCACG CTATCCCA  GAGTCGTGG CCCAAGGCA GAAGCTGGG TCAAGCCGG
61  101  AGAGTCACG CTATCCCA  GAGTCGTGG CCCAAGGCA GAAGCTGGG TCAAGCCGG
62  101  AGAGTCACG CTATCCCA  GAGTCGTGG CCCAAGGCA GAAGCTGGG TCAAGCCGG
63  101  AGAGTCACG CTATCCCA  GAGTCGTGG CCCAAGGCA GAAGCTGGG TCAAGCCGG
64  101  AGAGTCACG CTATCCCA  GAGTCGTGG CCCAAGGCA GAAGCTGGG TCAAGCCGG
.....
65  011  101  AGAGTCACG CTATCCCA  GAGTCGTGG CCCAAGGCA GAAGCTGGG TCAAGCCGG
66  101  AGAGTCACG CTATCCCA  GAGTCGTGG CCCAAGGCA GAAGCTGGG TCAAGCCGG
.....

```

50

२०

52	01	241	TACCTTGGC	CCTCTATGG	CAATGAGGC	TGCGGGTGG	TCGGATGAC	CTGTCTGCC
52	01	241	TACCTTGGC	CCTCTATGG	CAATGAGGC	TGCGGGTGG	TCGGATGAC	CTGTCTGCC

53. 441 1ALCCLATOC CCCTCTATOG TAATDAGGOT TCCCGATOGG CCGGATGGCT CCTGTCCCC
54. 241 TACCCCTGGC CCCTCTATOG TAATDAGGOT TCCCGATOGG CCGGATGGCT CCTGTCCCC

55	TACCTTGGC	CCCTCTATGG	CAATGAGGC	TCGCGGTGGG	CGGGAATGGT	CTGTCTGCC
241	TACCTTGGC	CCCTCTATGG	CAATGAGGC	TCGCGGTGGG	CGGGAATGGT	CTGTCTGCC
341	TACCTTGGC	CCCTCTATGG	CAATGAGGC	TCGCGGTGGG	CGGGAATGGT	CTGTCTGCC

Position	Sequence
50	TACCTTGGC CCTCTATGG CATTAGGGT TCCGGGTGGG CCGGATGGC CTCTCTTCC
57	241

```

=====
011 341 TACCTTGC CCTCTATGC CATGAGGCT ATGGGCTGG CAGGATGCT CTTCTACCC
=====

```

59	241	TACCTTGGC	CCCTCTATGG	CACGAGGGCT	ATGGGGTGGG	CAGGATGGCT	CTGTCAACC
59	241	TACCTTGGC	CCCTCTATGG	CACGAGGGCT	ATGGGGTGGG	CAGGATGGCT	CTGTCAACC

60	442	CCCCCTTGGC	CAATGAGGCT	ATCGGGGTGGG	CAGGGTGGCT	CTGTGCCCC
61	241	TACCTTGGC	CCCCCTTGGC	CAATGAGGCT	ATCGGGGTGGG	CAGGGTGGCT

62	241	TATCTTGGC	CCCTCAATGG	CAAGATGGCT	CCTGTACCC
63	241	TACCTTGGC	CCCTCTATGG	ATGGGCTGGG	CAAGATGGCT

05 ТАССТУОС СССТТАТОС САТГАНОГОТ АНДОООИООО ОАВАНУОЛ ОУУУУУУУ
64 241

 65 Q11 241 TATCTTGG CCTGTATGG GATTAGGCT CTCGGCTGG CAGGTTCCT CTCGTCCCT

241 TACCTTGGC CCTGTATGG GANIGAGGAT CCGGCGCGG CCGGCGCGG

Фиг. 2. 2f

Уеппауер Зесетер (6/9)

SEQ ID NO: 1

```

-----
52  01  301  CCGGCTCTC GCGCTACCTG GCGCCCGACA GACCCCGCGC GTAGCTCCG CAATTGCGT
53  301  CCGGCTCTC GCGCTACCTG GCGCCCGACA GACCCCGCGC GTAGCTCCG CAATTGCGT
54  301  CCGGCTCTC GCGCTACCTG GCGCTACCA GACCCCGCGC GTAGCTCCG CAATTGCGT
55  301  CCGGCTCTC GCGCTACCTG GCGCCCGACA GACCCCGCGC GTAGCTCCG CAATTGCGT
56  301  CCGGCTCTC GCGCTACCTG GCGCCCGACA GACCCCGCGC GTAGCTCCG CAATTGCGT
57  301  CCGGCTCTC GCGCTACCTG GCGCCCGACA GACCCCGCGC GTAGCTCCG CAATTGCGT
-----
58  01  301  CCGGCTCTC GCGCTACCTG GCGCCCGACA GACCCCGCGC GTAGCTCCG CAATTGCGT
59  301  CCGGCTCTC GCGCTACCTG GCGCCCGACA GACCCCGCGC GTAGCTCCG CAATTGCGT
60  301  CCGGCTCTC GCGCTACCTG GCGCCCGACA GACCCCGCGC GTAGCTCCG CAATTGCGT
61  301  CCGGCTCTC GCGCTACCTG GCGCCCGACA GACCCCGCGC GTAGCTCCG CAATTGCGT
62  301  CCGGCTCTC GCGCTACCTG GCGCCCGACA GACCCCGCGC GTAGCTCCG CAATTGCGT
63  301  CCGGCTCTC GCGCTACCTG GCGCCCGACA GACCCCGCGC GTAGCTCCG CAATTGCGT
64  301  CCGGCTCTC GCGCTACCTG GCGCCCGACA GACCCCGCGC GTAGCTCCG CAATTGCGT
-----
65  01  301  CCGGCTCTC GCGCTACCTG GCGCCCGACA GACCCCGCGC GTAGCTCCG CAATTGCGT
66  301  CCGGCTCTC GCGCTACCTG GCGCCCGACA GACCCCGCGC GTAGCTCCG CAATTGCGT
-----

```

30