

РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ

(19) BG

(11) 62973 B1



ОПИСАНИЕ КЪМ ПАТЕНТ

ЗА

ИЗОБРЕТЕНИЕ

6(51) C 07 K 5/00
C 07 K 14/00
A 61 K 39/12
C 12 Q 1/70
C 07 H 15/12
C 12 N 1/20
C 12 P 21/00

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(21) Регистров № 98653
(22) Заявено на 11.03.94
(24) Начало на действие
на патента от: 11.09.92

Приоритетни данни

(31) 759575 (32) 13.09.91 (33) US

(41) Публикувана заявка в
бюлетин № 5 на 31.05.95
(45) Отпечатано на 29.12.2000
(46) Публикувано в бюлетин № 12
на 29.12.2000
(56) Информационни източници:

(62) Разделена заявка от рег. №

(73) Патентоприетел(и):
CHIRON CORPORATION,
EMERYVILLE, CA (US)

(72) Изобретател(и):
Amy J. Weiner, Benicia, CA
Michael Houghton, Danville, CA (US)

(74) Представител по индустриална
собственост:
Фани Владимирова Божинова, 1000
София, ул. "Алабин" 38

(86) № и дата на PCT заявка:
PCT/US92/07683, 11.09.92

(87) № и дата на PCT публикация:
WO93/06126, 01.04.93

(54) ИМУНОРЕАКТИВНИ ПОЛИПЕПТИДНИ СЪСТАВИ НА ВИРУСА НА ХЕПАТИТ С

(57) Съставите включват вирусни епитопи на хепатит тип С, методи за имунологични приложения на съставите, материали и методи за получаването им.

21 претенции, 9 фигури

BG 62973 B1

(54) ИМУНОРЕАКТИВНИ ПОЛИПЕПТИДНИ СЪСТАВИ НА ВИРУСА НА ХЕПАТИТ С

Област на техниката

Изобретението се отнася до имунореактивни полипептидни състави, до методи за имунологични приложения на съставите и до материали и методи за тяхното получаване.

Предшествващо състояние на техниката

Вирусът на хепатит С е идентифициран като главен причинител на посттрансфузионния хепатит (нито-А, нито-В) NANHB, а така също и като причина за комунално-придобития NANHB. Материалите и методите за получаване на вирусни геномни последователности са известни от WO89/04669, WO90/11089 и WO90/14436.

Охарактеризирането на молекулно ниво на HCV генома показва, че е налице РНК молекула с позитивна полярност, съдържаща приблизително 10 000 нуклеотида, кодиращи полипротеин с около 3011 аминокиселини. Няколко сигурни линии предполагат, че HCV има сходна генетична организация като тази на вирусите от семейство Flaviviridae, което включва флави- и пестивирусите. Подобно на своите пести- и флавивирусни родственици, HCV кодира голям полипротеинов предшественик, от който са получени индивидуалните вирусни протеини (както структурни, така и неструктурни).

РНК-съдържащи вируси могат да притежават относително високи стойности на спонтанна мутация, например от порядъка на 10^{-3} до 10^{-4} за инкорпориран нуклеотид. Поради това, доколкото хетерогенността и изменчивостта на генотипа са общи за РНК вирусите, в рамките на HCV вирусите може да има множество вирусни изолати, които да бъдат вирулентни или авирулентни.

Идентифицирани са множество различни изолати на HCV. Тяхната посредователност показва ограничената хетерогенна характеристика на РНК вирусите.

Изолатът HCV J1.1 е описан от *Kato, Y. et al. (1989), Japan. Nucl. Acids Res. 17: 10367-10372; Takouchi, K. et al. (1990), Gene 21: 287-291; Takouchi et al. (1990), Nucl. Acids Res. 18: 4626.*

Пълните кодиращи последователности вълос 5'- и 3'-крайните последователности от два независими изолати, "HCV-J" и "BK", са описани от *Kato et al. и Takouchi et al., съответно. (Kato et al. (1990), J. Virol. 65: 1105-1113.)*

Други публикации, описващи HCV изолатите са следните:

"HCV-1": *Choo et al. (1990), Brit. Med. Bull. 46: 423-441; Choo et al. (1991), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2451-2455; Han et al. (1991), Proc. Natl.*

Acad. Sci. USA 88: 1711-1715; European Patent Publication No.318,216.

"HCV-J1" и "HCV-J4": *Okamoto et al. (1991), Japan J. Exp. Med. 61: 167-177.*

"HCV 18", "HCV 23", "Th", "HCV 27", "BC1" и "BC10": *Weiner et al. (1991), Virol. 182: 842-848.*

"P1-1", "HCV-K1" и "HCV-K2": *Enomoto et al. There are two major types of Hepatitis C virus in Japan. Division of Gastroenterology, Department of Internal Medicine, Kanazawa Medical University, Japan.*

Клонове "A", "C", "D" & "E": *Tsukiyama-Koharu et al., A second group of hepatitis virus, in Virus Genes.*

Типичен подход при диагностициране и определяне начина на ваксиниране е да се фокусира вниманието върху съхранените вирусни области. Такъв подход обаче игнорира важни епитопи, които могат да са разположени в различни епитопи.

Обект на настоящото изобретение е осигуряването на полипептидни състави, които да са имунологично кръстосано реактивни с мултиплени HCV изолати, по-специално по отношение на хетерогенни области от вируса.

Описание на изобретението

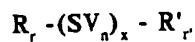
Установено е, че множество важни HCV епитопи варират във вирусните изолати и че тези епитопи могат да бъдат картирани по отношение на специални домени. Това откритие позволява да се създаде стратегия на получаване на имунологично кръстосано-реактивни полипептидни състави, която е фокусирана върху различни (не само съхранените) домени.

Съответно на това, едно от изпълненията на настоящото изобретение е имунореактивен състав, включващ полипептиди, които съдържат аминокиселинната последователност на един епитоп в рамките на първата вариабилна област от HCV, и поне две хетерогенни аминокиселинни последователности от първата вариабилна област от отделни HCV изолати.

Друго изпълнение на настоящото изобретение е имунореактивен състав, включващ множество от набор антигени, където: а) всеки антигенен набор се състои от множество по същество идентични полипептиди, включващи аминокиселинната последователност на един епитоп в рамките на първия вариабилен домен от един HCV изолат, и б) аминокиселинната последователност на епитопа от един набор е хетерогенен по отношение на аминокиселинната последователност на аналогична последователност от поне един друг набор.

Друг вариант на изобретението е имунореактивен състав, включващ множество полипеп-

тиди, където всеки полипептид е с формула:



в която R и R' са аминокиселинни последователности от около 1 – 2000 аминокиселини и са еднакви или различни; r и r' са 0 или 1 и са еднакви или различни; V е аминокиселинна последователност от един HCV вариабилен домен, където вариабилният домен обхваща поне един епитоп; S е цяло число ≥ 1 , представляващо подбран вариабилен домен; и n е цяло число ≥ 1 , представляващо подбран HCV изолат, хетерогенен при даден SV по отношение на поне един друг изолат с различни стойности за n, като n е независимо подбран за всяко x; x е цяло число 1; и при условие, че аминокиселинните последователности, представляващи комбинация, подбрана от групата, състояща се от (i) 1V₁ и 1V₂, (ii) 1V₁ и 1V₂, и (iii) 1V₁ и 2V₁.

Друг аспект на изобретението е метод за получаване на имуногенен фармацевтичен състав HCV, включващ:

a/ осигуряване на имунореактивен състав, както е описан по-горе;

b/ осигуряване на подходящ ексципиент;

и

c/ смесване на имунореактивния състав от a/ с ексципиента от b/ в съотношение, осигуряващо имуногенен отговор при въвеждане в бозайници.

Аспект на изобретението е също метод за получаване на анти-HCV антитела, включващи въвеждане в бозайник на ефективно количество имунореактивен състав, както е описано по-горе.

Изобретението включва метод за откриване на антитела срещу HCV в биологични проби, който се състои от:

a/ осигуряване на биологична проба, за която се счита, че съдържа антитела срещу HCV;

b/ осигуряване на имунореактивния състав, описан по-горе;

c/ реагиране на биологичната проба от a/ с имунореактивния състав от b/;

d/ откриване на образуване на антиген-антитяло комплекси, формирани между имунореактивния състав от a/ и антителата от биологичната проба от b/, ако има такива.

Друго изпълнение на изобретението е комплект за откриване на антитела срещу HCV в биологична проба, съдържащ имунореактивен състав, както е описан по-горе, опакован в подходящ контейнер.

Кратко описание на фигурите

Фигура 1 изобразява схематично генетичната организация на HCV генома;

5 фигура 2 – сравнение на предполагаемите аминокиселинни последователности от E1 протеина, кодиран от група I и група II HCV изолати; фигура 3 – сравнение на аминокиселинните последователности от предполагаемата E1/NS1 област на HCV изолатите;

10 фигура 4 – графика, показваща антигенните профили на аминокрайната област от предполагаемия HCV E2/NS1 протеин (аминокиселини 384 – 420), и gp 120 V3 хипервариабилна област от HIV-1;

15 фигура 5 – серия от графики, даващи процентно вероятността даденият остатък от аминокрайната област от HCV E2/NS1 протеина (аминокиселини 384 до 420) да бъде установен, както в α -хеликоидалния, в β -листовидния, така и в β -насочения (α -helix, β -sheet and β -turn) структурен мотив;

20 фигура 6 – графики, показващи реактивността на антителата в плазмата от HCV 18 (части A-C) или Th (части D-f) с припокриващи се биотинирани 8-мерни пептиди, получени от аминокиселини 384 до 415 или 416 от HCV изолати HCT 18 (A, D), Th (B, E) и HCV J1 (C, F), съответно;

25 фигура 7 – предполагаемите аминокиселинни последователности от две области на E2/NS1 полипептида, аминокиселини 384 – 414 и 547 – 647, дадени за Q1 и Q3 изолатите;

30 фигура 8A – предполагаемите аминокиселинни последователности на изолати HCV J1,1 и J1,2 от аминокиселини 384 до 647;

35 фигура 8B – предполагаемите аминокиселинни последователности на изолатите HCT 27 и HCVE1 от аминокиселини 384 до 651;

40 фигура 9 – цялата полипротеинова структура на изолата HCV-1.

Техническа същност на изобретението

Съгласно настоящото изобретение се използват, доколкото друго не е указано, конвенционални техники на молекулярната биология, микробиология, рекомбинантна ДНК и имунология, които са известни от литературата, например,

50

Maniatis, Fitch & Sambrook. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed. 1989); *DNA Cloning, Volumes I and II* (D.N. Glover ed. 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait ed, 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (B.D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); *Transcription and Translation* (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); *Animal Cell Culture* (R. I. Freudenreich ed. 1986); *Immobilized Cells and Enzymes* (IRL Press, 1986); B. Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984); the series, *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.); *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells* (J. H. Miller and M. P. Calos eds 1987, Cold Spring Harbor Laboratory), *Methods in Enzymology* Vol. 154 and Vol. 155 (Wu and Grossman, and Wu, eds., respectively), Meyer and Walker, eds. (1987), *Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology* (Academic Press, London), Scopes, (1987), *Protein Purification: Principles and Practice, Second Edition* (Springer-Verlag, N. Y.) and *Handbook of Experimental Immunology, Volumes I-IV* (D. M. Weir and C. C. Blackwell eds. 1986); *Immunoassay: A Practical Guide* (D.W. Chen ed. 1987).

HCV е нов член на семейство Flaviviridae, което включва пестивирусите (Холерен вирус по свинете и вируса на Говеждата вирусна диария) и флавивирусите, примери за които са Денга и вируса на Жълтата треска. Схемата на генетичната организация на HCV е показана на фигура 1. Аналогично на флави- и пестивирусите, HCV кодира основна полипептидна област ("С") при N-края от вирусния полипротеин, последвано от два гликопротеинови домена ("E1", "E2/NS1"), upstream от неструктурните гени NS2 до NS5. Координатите на аминокиселините от предполагаемите протеинови домени са показани на таблица 1.

Таблица 1.

Предполагаеми протеинови домени в HCV

а. а. координати (приблизително)	протеин
1 - 191	С
192 - 383	E1
384 - 750	E2/NS1
751 - 1006	NS2
1007 - 1488	NS3
1489 - 1959	NS4
1960 - 3011	NS5

Както е посочено по-горе, идентифицирани

Таблица 2. Класифициране на хепатит С вирусни геномни РНК последователности в три основни групи.

HCV I	HCV II	HCV III
HCV - 1	HCV - J1.1	Клонове А, С, D & E
HCV - J1	HCV - J4	HCV - K2 (a & b)
HCT 18	HCV - J	
HCT 23	ВК	
ЕС1		
Pt - 1		

са много HCV изолати. Сравнителният секвенционен анализ на пълната и частична последователност показва, че на базата на хомоложност на нуклеотидно и аминокиселинно ниво, HCV изолатите могат да бъдат подразделени поне на три основни групи (табл. 2). Виж Houghton et al., (1991) *Hepatology* 14: 381 - 388. Само частичната последователност е подходяща за изолатите от група III. Поради това, когато последователностите от тези изолати са определени, един или повече от тях може да съхрани разделянето на различни групи, включително потенциална четвърта група. Таблица 3 показва секвенционната хомоложност между отделните вирусни протеини от различни HCV изолати, както е предположена от техните нуклеотидни последователности. Може да се види, че протеините от същата вирусна група проявяват по-голямо сходство от същите протеини, кодирани от различни вирусни групи (табл. 3). Изключение от това е нуклеокапсидният протеин, който е силно съхранен измежду всички последователности от група I и II на вирусните изолати. (На табл. 3, символът N/A означава, че последователностите са неподходящи за сравнение). За целите на настоящото изобретение група I изолати може да бъде определена като онези изолати, притежаващи своите вирусни протеини, по-специално E1 и E2/NS1 протеини, около 90 % хомоложни или повече на аминокиселинно ниво на изолатите, класифицирани като група I. Група II е определена аналогично. Бъещите групи могат да бъдат определени по подобен начин на базата на вирусната протеинова хомоложност спрямо изолат - прототип. По същия начин могат да бъдат определени и подгрупите чрез хомоложността им в ограничени протеини, като E1, E2/NS1 или NS2 протеини или просто по-високите нива на хомоложност.

Хомоложност на аминокиселините (%) между вирусните протеини, кодирани от различни HCV изолати.

HCV	C	E1	E2/NS1	NS2	NS3	NS4	NS5
Група							
I в сравнение с							
I	98-100	94 - 100	N/A	N/A	N/A	N/A	99 - 100
II	97 - 98	77 - 79	78 - 81	75 - 77	91 - 92	90 - 93	84 - 88
III	N/A	N/A	N/A	N/A	86	76 - 80	71 - 74
II в сравнение с							
II	98- 100	92 - 100	89 - 100	93 - 100	94 - 100	97 - 100	95 - 100
III	N/A	N/A	N/A	N/A	84	76	74 - 75
III в сравнение с							
III	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	91- 100	89 - 100

Заслужава внимание фактът, че вирусните протеини на обвивката, кодирани от E1 и E2/NS1 гените, показват съществени аминокиселинни вариации между групите I и II. Само NS2 проявява по-висока степен на хетерогенност, докато C, NS3, NS4 и NS5 протеините показват по-висока секвенционна съхранимост между групите. Вариациите в последователността, наблюдавани в предполагаемите протеини на обвивката на вириона между групите I и II отразяват характерното разделяне на аминокиселините между двете групи. Пример за това е показан на фиг. 2, където последователността на E1 генният продукт е сравнена с вирусите от групите I и II. Показани са E1 аминокиселинните последователности от HCV групи I и I. На фигурата хоризонталните ивици показват секвенционната идентичност с HCV-1. Звездичките показват групово-специфичното разделяне на аминокиселините; групово специфичните остатъци могат да бъдат ясно идентифицирани. Последователностите за група I са HCV - 1, HCT18, HCT23, HCT27 и HC - J1. Последователностите за група II са HC - J4, HCV - J, HCV J1,1 и BK. Такова групово-специфично разделяне на аминокиселини е налице и в други генни продукти, включително гр 72, кодирани от E2/NS1 гена. Фиг. 3 показва сравнителна аминокиселинна последователност от предполагаемата E2/NS област на HCV изолат, който се разделя като група I и група II. Късният протеин също съдържа една N-крайна хипервариабилна област ("HV")

от около 30 аминокиселини, което показва голямо вариране между всички изолати. (Weiner et al., 1991). Тази област се намира между аминокиселини 384 до 414, номерирани посредством системата за номериране на HCV-1.

Предполагаемият HCV гликопротеин E2/NS1 на обвивката може да съответства на гр 53 (BVDV) / гр 55 (Hog Cholera Virus) полипептид на обвивката от пестивирусите и NS1 от флавирусите, като и двата придават предпазващ имунитет в гостоприемници, ваксинирани с такива полипептиди.

На базата на сходството между хипервариабилната област ("HV") и HIV-1 гр 120 V3 домена по отношение степента на секвенционно вариране, предсказуемото въздействие на аминокиселинните изменения върху възможното свързване на антитялото в допълнение към отсъствието на дефинирана вторична структура предполага, че HV доменът кодира неутрализиращи антитела.

Имуногенността на домена е показана чрез експериментите на картиране на епитопите, описана в примерите. Резултатите от тези изследвания предполагат, че в допълнение към трите големи групи на HCV, съществуват също и специфични HV подгрупи.

Анализът на биологичните проби от индивиди с HCV индуциран NANBH показва, че индивидите могат да носят два или повече HCV варианта едновременно. Два от едновременно

съществуващите HV варианти са установени в плазмата на един индивид, J1. В допълнение, частичното секвениране на гена от един индивид с хроничен NANBH, който притежава редуващи се пламвания на хепатит, показва, че индивидът Q е инфектиран с два HCV варианта (Q1 или Q3). Всеки вариант се асоциира само с един епизод на заболяването. Изследване по ELISA при използване на Q1 или Q3 специфичен пептид (аминокиселини 396 – 407) показва, че Q развива антители отговор срещу Q1 пептида, но не и срещу съответстващия Q3 пептид, предполагайки, че рисковите за заболяването индивиди Q се дължат на един HV вариант. Присъствието на антитела срещу Q1 пептида по време на втория епизод от заболяването предполага, че вариациите в HV домена може да е резултат от подтискането на имунния подбор. Аминокиселини 396 – 407 явно са обект на най-голям селективен натиск в HV домена. Тези така установени факти потвърждават тезата, че високи нива на хроничност при това заболяване може да се дължат на неадекватния отговор на гостоприемника спрямо HCV инфекция и/или на ефективни вирусни механизми на имунологично отклонение. Нещо повече, те насочват към E2/NS1 HV областта като генетична област, включена във вирусния механизъм за избягване и/или в механизма на неадекватен имунологичен отговор.

Както е описано по-горе, налице са няколко вариантни области в рамките на HCV генома. Един или повече от тях, като че най-много са включени във вирусния механизъм за избягване и/или в механизма на неадекватен имунологичен отговор. Поради това, желателно е да бъдат включвани в съставите за лечение на HCV полипептиди, които биха индуцирали имунологичен отговор срещу тези варианти.

Така E1 и E2/NS1 областите от генома кодират предполагаеми полипептиди от типа на обвивката. Тези области биха били от специален интерес по отношение на имуногенността. Те са сред областите, срещу които е желателно да бъде индуциран и/или повишен даден имуногенен отговор за предпазване на индивида от HCV инфекция и за предотвратяване хроничното протичане на заболяването при инфектираните индивиди. В допълнение, тези области са сред онези, от които е желателно да се установят HCV вариантите, възникващи по време на инфектирането, а така също и като супер- или ко-инфектиране от два или повече варианта.

Настоящото изобретение описва състави и методи за лечение с оглед предотвратяване HCV инфекции, и по-специално хронични HCV инфекции. В допълнение, то описва състави и методи за откриване присъствието на анти-HCV антитела в биологични проби. Този последен метод е специално приложим за идентифициране на анти-HCV антитела, генерирани в отговор на имунологично различни HCV епитопи. Методът може също така да бъде използван за изследване еволюцията на множествени варианти от HCV в рамките на даден инфектиран индивид. В описанието на изобретението са използвани следните термини.

Терминът “полипептид” се отнася до полимер от аминокиселини и не се отнася до специфична дължина на продукта; така в дефиницията за полипептид са включени пептиди, олигопептиди и протеини. Този термин също не се отнася до или изключва постекспресионни модификации на полипептида, например, гликозилиране, ацетилиране, фосфорилиране и други. В рамките на дефиницията са включени също полипептиди, съдържащи един или повече аналози в дадена аминокиселина (включително, например, неприродни аминокиселини и др.), полипептиди със заместени връзки, а така също и други модификации, познати в областта, както срещащи се, така и не срещащи се в природата.

Както се използва тук, А е “по същество изолиран” от В, когато теглото на А е поне около 70 %, за предпочитане поне около 80 % и най-добре поне около 90 % от комбинираните тегла на А и В.

Полипептидните състави от настоящото изобретение са по същество чисти от тъкани на хора или на други примати (включително кръв, серум, клетъчни лизати, органели, протеини и др.) и клетъчно културална среда.

“Рекомбинантен полинуклеотид” предполага полинуклеотид от геномен, сДНК, полусинтетичен източник, който спрямо произхода си или манипулирането: (1) не се асоциира с всички или част от полинуклеотида, с който се асоциира в природата, (2) е свързан с полинуклеотид, различен от този, с който е свързан в природата, или (3) не се среща в природата.

“Полинуклеотид” е полимерна форма на нуклеотиди с каквато и да е дължина, независимо рибонуклеотиди или дезоксирибонуклеотиди. Този термин се отнася само до първична структура на молекулата. Така, този термин включва едно-

или двуверижни ДНК или РНК. Той включва също така познати типове на модификации, например, маркиране, което е познато за областта, метилирания, "капсули", замествания на една или повече от природно срещаните нуклеотиди с даден аналог, интернуклеотидни модификации, например, онези с незаредени свързвания (като напр. фосфоротиоати, фосфородитиоати, и др.), онези, съдържащи очаквани количества, напр. протеини (включително нуклеази, токсини, антитела, сигнални пептиди, поли-L-лизин и др.), с интеркалатори (като акридин, псорален и др.); съдържащи хелатори I като метали, радиоактивни метали и др.); съдържащи алкилатори, такива с модифицирани свързвания (като α -аномерни нуклеинови киселини и др.), а така също и немодифицирани форми на полинуклеотида.

"Рекомбинантни клетки гостоприемници", "клетки гостоприемници", "клетки", "клетъчни линии", "клетъчни култури" и други подобни термини, обозначаващи микроорганизми или повисоки еукариотични клетъчни линии, култивирани като едноклетъчни, които могат да бъдат или са били използвани като реципиенти за рекомбинантен вектор или друг трансферен полинуклеотид, и включва прогените на първоначалната клетка, която е била трансфектирана. Разбираемо е, че прогенът на отделна родителска клетка може да не бъде задължително напълно идентична по морфология или по геномен или общ ДНК компонент като родителската, благодарение на природни, случайни или предумишлени мутации.

"Репликон" е който и да е генетичен елемент като плазмид, хромозома, вирус, козмид и др., който се проявява като автономна единица на полинуклеотидна репликация в рамките на клетката; т.е. способен на репликация под свой собствен контрол.

"Вектор" е репликон, който освен това включва последователности, осигуряващи репликация и/или експресия на отворена рамка на разчитане.

"Контролна последователност" се отнася до полинуклеотидни последователности, които са необходими да предизвикат експресия на последователностите, към които те са лигирани. Природата на такива контролни последователности е различна в зависимост от гостоприемниковия организъм; в прокариоти такива контролни последователности включват главно промотор, рибозомен свързващ сайт и терминатори; в еукариоти такива контролни последователности включват

промотори, терминатори и в някои случаи усилватели (енхансери). Терминът "контролни последователности" е с намерение да включва като минимум всички компоненти, чието присъствие е необходимо за експресия, и може също да включва допълнителни компоненти, чието присъствие е преимущество, например, лидерни последователности, които управляват секрецията.

"Промотор" е нуклеотидна последователност, която включва консенсус-последователности, което позволява свързването на РНК полимераза към ДНК матрицата така, че mРНК продуцирането се иницира при нормален сайт за инициране на транскрипция за съседен структурен ген.

"Оперативно свързан" се отнася до съпоставяне, където така описаните компоненти са във взаимоотношения, позволяващи им да функционират по очакван начин. Контролна последователност, "оперативно свързана" към кодираща последователност е лигирана така, че експресията на кодиращата последователност се постига при условия, конкурентни с контролните последователности.

"Отворена рамка на разчитане (ORF) е област от полинуклеотидната последователност, кодираща полипептид; тази област може да представлява част от кодиращата последователност или цялата кодираща последователност.

"Кодираща последователност" е полинуклеотидна последователност, транскрибирана в mРНК и/или транслирана в полипептид, когато е поставена под контрола на подходящи регулаторни последователности. Свързванията на кодиращата последователност се определят от трансляционен старт кодон при 5'-края и трансляционен стоп кодон при 3'-края. Кодиращата последователност може да включва, но не е ограничена до, mРНК, ДНК (включително сДНК), и рекомбинантни полинуклеотидни последователности.

Както се използва тук, "епитоп" или "антигенна детерминанта" означава аминокиселинна последователност, която е имунореактивна. Обикновено един епитоп се състои от поне около 8, или дори около 10 аминокиселини. Както се използва тук, един епитоп на даден полипептид притежава епитопи със същите аминокиселинни последователности както епитопа на дадения полипептид и неговите имунологични еквиваленти.

"Антиген" е полипептид, съдържащ един

или повече епитопи.

“Имуногенен” означава способността да проявява клетъчен и/или хуморален отговор. Един имуногенен отговор може да се прояви чрез имунореактивните полипептиди самостоятелно или може да изисква присъствието на носител във или без наличие на помощно средство.

“Имунореактивен” се отнася до: (1) способността да се свързва имунологично към антигено и/или към лимфоцитен антигенен рецептор или (2) способността да бъде имуногенен.

“Антитяло” е който и да е имуноглобулин, включително антитела и техни фрагменти, които свързват специфичен епитоп. Терминът обхваща общо поликлонални, моноклонални и химерни антитела. Примери за химерни антитела са описани в US 4 816 567.

“Антигенен комплекс” се определя като състав, състоящ се от множество по същество идентични полипептиди, където полипептидите се състоят от аминокиселинната последователност на един определен епитоп.

“По същество идентични полипептиди” означава полипептиди, които са идентични, с изключение на вариантите, ограничени до типичния обхват на последователност или вариациите в размера, определени от метода на продуциране; например рекомбинантна експресия, химичен синтез, тъканни култури и т.н. Тези вариации не променят желаното функционално свойство на състав с по същество идентични полипептиди; например, съставът се държи като състав от идентични полипептиди. Вариациите могат да се дължат на, например, изменения, дължащи се на секреторни процеси по време на транспортирането на полипептида, на по-малко от 100 % ефективност при химичния синтез и т.н.

Както се използва тук, “вариабилен домен” (VD) на вирусния протеин е домен, който демонстрира постоянен образец на аминокиселинни вариации между поне два HCV изолата или субпопулации. За предпочитане, областта съдържа поне един епитоп. Вариабилната област може да варира от изолат до изолат толкова малко, колкото едно аминокиселинно изменение. Тези изолати могат да са от същата или от различна HCV група (и) или субгрупа (и). Вариабилните домени могат лесно да бъдат идентифицирани чрез състава на последователността измежду изолатите, като примери за тези техники са описани по-долу. За целите на описването на настоящото изобретение, вариабилните области

ще бъдат определяни по отношение на аминокиселинния номер на полипротеина, кодиран от генома на HCV-1, както е показано на фиг. 9, с инициатор метионин, означен като позиция 1.

5 Съответният вариабилен домен в друг HCV изолат е определен чрез подравняване на последователностите на два изолата по начин, който да изведе съхранените области извън която и да е вариабилна област по максимален начин. Това може да бъде осъществено с която и да е компютърна конфигурация, като ALIGN 1,0 (Attn: Dr. William R. Pearson). Виж Pearson et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444 – 2448. Аминокиселинните номера, дадени специално за вариабилния домен, са обект на избор. Така, началото и краят на вариабилните домени следва да се разбират като приблизителни и включващи припокриващи се области или субобласти, до толкова, доколкото са обозначени.

20 Един епитоп е “имунологичен еквивалент” на друг епитоп в даден полипептид, когато реагира кръстосано с антитела, които се свързват имунологично към епитопа в дадения полипептид.

25 Епитопите обикновено са картирани така, че да обхващат поне около 5, понякога поне около 8, и дори около 10 или повече аминокиселини.

30 Аминокиселинните последователности, обхващащи HCV епитопа, могат да бъдат прикачени към друг полипептид (като носещ протеин) както посредством ковалентна връзка, така и чрез експесиране на слетия полинуклеотид за формиране на слят протеин. По желание, може да се инсертира или прикрепят мултиплиени повторения на епитопа, и/или да се инкорпорира множество епитопи. Носещият протеин може да бъде получен от който и да е източник, но ще бъде относително голям, имуногенен протеин като BSA, KLH или други подобни. По желание, може да се използва HCV с по същество цялата дължина на протеина като носителя, мултиплицирайки броя на имуногенните епитопи. Обратно, аминокиселинната последователност от HCV епитопа може да бъде присъединена при аминокрая и/или карбоксикрая към не-HCV аминокиселинна последователност, като по този начин полипептидът би бил “слят полипептид”. Аналогични типове на полипептиди могат да бъдат конструирани с помощта на епитопи от други дадени протеини.

50 “Вариант” на даден полипептид се отнася

до полипептид, в който аминокиселинната последователност на дадения полипептид е била изменена чрез делеция, заместване, добавяне или разместване на една или повече аминокиселини в последователността. Методи, чрез които се получават варианти (например, чрез рекомбинация) или са направени (например, чрез сайт насочена мутагеназа), са известни.

“Трансформиране” се отнася до въвеждане на екзогенен полинуклеотид в гостоприемникова клетка, независимо от използвания метод за въвеждане, например, директно взимане, трансдукция (включително вирусна инфекция), f-удвояване или електропорация. Екзогенният полинуклеотид може да бъде запазен като неинтегриран вектор, например плазмиден или вирусен геном, или обратно, може да бъде интегриран в гостоприемниковия геном.

“Индивид” се отнася до vertebrata (гръбначни), по-специално до някои видове бозайници, и включва, но не се ограничава до гризачи (мишки, плъхове, хамстери, морски свинчета), зайци, кози, свине, говеда, овце и примати (шимпанзета, Африкански зелени маймуни, бабуини, орангутани и хора).

Както се използва тук, “лечение” се отнася до което и да е от (i) предотвратяване на инфекция или реинфекция, както при традиционното ваксиниране, (ii) редуциране или елиминиране на симптомите, и (iii) съществено или пълно елиминиране на вируса. Лечението може да бъде профилактично (преди инфекцията) или терапевтично (следващо инфекцията).

Терминът “ефективно количество” се отнася до количество от носещия епитопа полипептид, достатъчно да индуцира имуногенен отговор у индивида, спрямо който се прилага, или в друг случай да прояви имуногенна реакция, която може да бъде установена в дадената система (например, имунологична проба). За предпочитане е ефективното количество да бъде достатъчно да въздейства при лечението, както е определено по-горе. Точното необходимо количество варира в зависимост от приложението. За ваксинални приложения или за генериране на поликлонални антисерум/антитела, например, ефективното количество може да варира в зависимост от вида, възрастта и общото състояние на индивида, различията в условията на третиране, специфичността на подбрания полипептид, начина на въвеждането му и т.н. Счита се също, че ефективното количество може да бъде установено в рамките на

голям, некритичен интервал. Подходящо ефективно количество може да бъде определено с помощта само на рутинни експерименти.

Както се използва тук, “биологична проба” се отнася до проба от тъкан или течност, изолирани от даден индивид, например, плазма, серум, спинална течност, външните части от кожата, респираторния, интестиналния и гениталния тракт, слъзи, слюнка, мляко, кръвни клетки, тумори, органи, биопсии и така също проби от in vivo клетъчно културални конституенти (кондиционирана среда, получена при развитието на клетките в клетъчно културалната среда, например, Mab продуциращи миеломни клетки, рекомбинантни клетки и клетъчни компоненти).

Имунореактивните полипептидни състави от настоящото изобретение включват смес от изолирано- или групоспецифични епитопи от поне един HCV VD. По този начин в тях ще присъстват поне две хетерогенни аминокиселинни последователности, всяка определяща един епитоп, намерен в отличими HCV изолати, локализирани в същото или по същество същото място в даден HCV протеин; т.е. всяка последователност е разположена на едно и също място в рамките на HCV геном/полипептид. Доколкото последователностите са хетерогенни, местонахождението им се отнася както вариабилен домен (VD).

За по-добро пояснение на изобретението, най-напред ще бъдат обяснени отделните аминокиселинни последователности, влизащи в неговия състав. Следва описанието на множеството от такива последователности, които са установени в съставите съгласно изобретението.

Аминокиселинната последователност, която характеризира полипептидите от изобретението има основна структура както следва:



в която Z представлява аминокиселинната последователност от област на протеина от подбран HCV изолат, където тази област обхваща поне един вариабилен домен и вариабилният домен обхваща поне един епитоп. L и L' са не-HCV аминокиселинни последователности, които не съдържат вариабилен домен, и които могат да бъдат еднакви или различни. y и y' са 0 или 1 и могат да бъдат еднакви или различни. По този начин формула (2) представя аминокиселинна последователност, обхващаща последователността на един HCV VD, където VD включва епитоп.

Както бе дискутирано по-горе, епито-

път(ите) в Z обикновено ще включват минимум от около 5 аминокиселини, по-типично е те да са около 8 и дори още по-типично е да са минимум от около 10 аминокиселини.

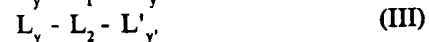
Вариабилният домен от Z може да обхваща повече от един епитоп. Вариабилният домен от Z е поне толкова голям, колкото комбинираните последователности от присъстващия епитоп, като по този начин при наличието на един епитоп се съдържа минимум от около 5 аминокиселини. Доколкото епитопите могат да се припокриват, минимумът аминокиселинни последователности за комбиниран епитоп във вариабилен домен може да бъде по-малка от сумата от индивидуални последователности на епитопите.

Z е аминокиселинната последователност от един HCV изолат, включващ описаната по-горе VD. По този начин минималният размер на Z е минималният размер на VD. Z може да включва повече HCV аминокиселинни последователности освен единствено CD, и дори повече от една CD. Обикновено, обаче, Z е последователността от целия HCV полипротеин (по-специално E1, E2/XS2 NS3, NS4 и NS5) или дори нещо повече – фрагмент от такъв HCV протеин. По този начин, Z за предпочитане ще бъде в границите от минимум около 5 аминокиселини (по-предпочитано около 8 или около 10 аминокиселини минимум) до максимум 1100 аминокиселини (по-предпочитано около 500, още по-предпочитано максимум около 400 или дори по-предпочитано максимум от около 200 аминокиселини максимално). Нещо повече, полипептидът от формула I и/или Z, когато са получени чрез, например, химичен синтез, включва около 50 аминокиселини, около 40 аминокиселини, но най-вече включва – максимум от около 30 аминокиселини.

Не-HCV аминокиселинните последователности, L и L', ако присъстват, могат да определят която и да е от множеството с подобна последователност. Например, L и L' могат да представляват последователности на не-HCV, към които е слят Z, за да улесни рекомбинантната експресия (например, β -галактозидаза, супероксид, дисмутаза, инвертаза, α -фактор, ТРА лидер и др.), както бе посочено по-горе. Обратно, L - L' могат да представляват епитопи на други патогени, като вируса на хепатит В. Bordetella pertussis, тетанусов токсид, дифтерия и др. за осигуряване на състави, които са имунореактивни по отношение на много други патогени. L и L' могат да

бъдат аминокиселинни последователности, които улесняват присъединяването към твърда повърхност по време на пептидния синтез, повърхности, използвани при имунологичните изследвания, носещи протеини на ваксини и др. Фактически, L и L' могат дори да обхващат една или повече излишни аминокиселини, без функционални преимущества. Няма критичен максимален размер за L и L', дължината се регулира главно чрез желаната функция. Типичното е L и L' всеки да бъде максимум от около 2000 аминокиселини, по-типично – максимум от около 1000 аминокиселини. Големината на L и L' последователностите с полезни свойства ще бъде максимум около 500 аминокиселини. Желателно е, разбира се, да се подберат такива L и L', че да не блокират имунореактивността на Z.

Съставът от полипептиди съгласно изобретението се характеризира чрез присъствието (в ефективно количество за имунореактивност) в рамките на състава от поне две аминокиселинни последователности, определени както следва с помощта на формула II и III, съответно:



където L, L', y и y' са дефинирани по-горе, независимо от формулите II и III.

Z₁ и Z₂ са всеки поотделно HCV аминокиселинни последователности, както са определени по-горе за Z, включващ същата вариабилна област (т.е. физично разположение), но получена от различни HCV изолати, притежаващи помежду си поне един хетерогенен епитоп в обща вариабилна област на Z₁ и Z₂. Като пример за илюстрация, аминокиселинна последователност съгласно формула II би съдържала като Z₁ фрагмент хипервариабилна област, покриваща аминокиселините 384-414 от изолата HCV-1 (или по-специално 396-407 или 396-408), докато Z₂ е аналогов фрагмент от изолат HCV-J 1.1. Тези два изолата са хетерогенни в дадената област, като аминокиселинните последователности от епитопа варират значително.

Следва да се разбере, че съставите от настоящото изобретение може да включват повече от точно две дискретни аминокиселинни последователности съгласно формула I, и че Z последователностите могат да бъдат разделени на групи, включващи различни вариабилни области. Например, състав съгласно изобретението може да включва група от HCV последователности (с

аминокиселинни последователности съгласно формула I), включващ хипервариабилната област при аминокиселини 384-411 от изолати HCV-1, HCV-J 1.1, HC-J4 и др. Съставът би могъл още да включва допълнителна група от HCV последователности (включително аминокиселинните последователности съгласно формула I), обхващайки вариабилната област при аминокиселини 215-255 също при изолати HCV-1, HCV-J 1.1, HC-J1, HC-J4 и др. По смисъла на контекста за състава съгласно настоящото изобретение, поради това, последователността от формула I може по-нататък да бъде дефинирана като:

$$SV_n$$

V представя аминокиселинна последователност, включваща последователността от един HCV вариабилен домен, включващ поне един епитоп; т.е. формула 2. S и n са цяло число 1 или повече. S представлява специален вариабилен домен, а n означава определен изолат. Например, S=1 би представлявал вариабилният домен при аминокиселини 215-255; S=2 – вариабилният домен при аминокиселини 215-255; и n=1, 2, 3 и 4 – изолати HCV-1, HCV-J.1, HC-J1 и J4, съответно. По този начин двете групи от последователности могат да бъдат представени чрез:

Група 1: $1V_1, 1V_2, 1V_3 \text{ \& } 1V_4$

Група 2: $2V_1, 2V_2, 2V_3 \text{ \& } 2V_4$

Налице са поне две отчетливи последователности от формула IV в съставите съгласно настоящото изобретение; например, съставът съдържа две различни последователности съгласно формула IV, където стойностите на S или n са различни. Например, присъстват поне $1V_1$ и $1V_2$, или поне $1V_1$ и $2V_2$, или поне $1V_1$ и $2V_2$.

Отчетливите последователности, които попадат в обхвата на формула I, са представени в състава както с едни и същи, така и с различни полипептидни молекули. С помощта на минималната комбинация от $1V_1$ и $1V_2$ като илюстрация, тези две последователности могат да бъдат представени в същата полипептидна молекула (т.е. $1V_1-1V_2$) или в отделни молекули. Тази характеристика на съставите от настоящото изобретение може да бъде описана като състави от полипептиди, както следва:

$$R_x - (SV_n)_x - R'_x \quad (V)$$

където S, V и n са описани по-горе; R и R' са аминокиселинни последователности от около

1 до 2000 аминокиселини и могат да са една и съща или различни; g и g' са 0 или 1, и са една и съща или различни; x е цяло число ≥ 1 ; n е независимо избрано за всяко x; и при положение, че аминокиселинните последователности се съдържат в състава, представляващ комбинация, подбрана от групата, състояща се от (i) $1V_1$ и $1V_2$, (ii) $1V_1$ и $1V_2$, и (iii) $1V_1$ и $2V_1$. Във вариантите за изпълнение на изобретението, където отчетливите последователности от формула IV са в различни пептиди, x може да бъде 1, макар че може да бъде и > 1 , по желание; т.е. смес от полипептиди $1V_1-1V_2$ и $1V_1-2V_2$. Когато x е 1, g и g' са за предпочитане и двете 0, за да се избегне излишъкът от L_y и L'_y, доколкото V може да бъде описан в предпочитания вариант на изпълнение съгласно формула I. Когато x е > 1 , комбинираните дължини от R и съседният L, и R' и съседния L', са за предпочитане не повече от типичните максимални дължини, описани по-горе за L и L'.

Подборът на HCV аминокиселинните последователности, включени в отчетливите V последователности от съставите, ще зависи от приложението на последователностите. На първо място HCV епитопите следва да бъдат систематизирани в два типа. Първият тип епитопи са онези, които са "групово-специфични"; например, съответстващите епитопи във всички или почти всички изолати в рамките на една група от HCV изолати, са имунологично кръстосано-реактивни с всеки друг, но не и със съответстващите епитопи от по същество всички изолати от друга група. За предпочитане, епитопите в групово-специфичен клас са съхранени в рамките на групата, но не и между групите. Вторият тип епитопи са онези, които са "изолат-специфични", например, епитопът е имунологично кръстосано-реактивен с всички или по същество всички отчетливи изолати.

Тези групово- или изолатспецифични епитопи могат да бъдат идентифицирани по смисъла на настоящото изобретение. Първо, последователностите от различни HCV изолати се сравняват, както е описано тук, и областите със секвенционна хетерогенност се идентифицират. Образците на хетерогенност обикновено индикират специфичност за групата или за изолата. Ако за дадена идентифицирана област е известно, че съдържа един или повече епитопи, тогава последователността със задоволителен размер, за да включи желаните епитопи, е подбрана както към вариабилна област, която може да бъде включена

в съставите съгласно изобретението. Ако за дадена хетерогенна област не е известно да е имуно-реактивна, пептидите, представляващи последователностите, намерени в дадената област от различните HCV изолати, могат да бъдат получени и изследвани. Изследването може да включва имунологично изследване с различни източници от анти-HCV анти тяло (като серум на пациента, неутрализиращи Mabs, и др.) или продуциране на анти тяло и тестване на способността на анти тялото да неутрализира вируса *in vitro*. Алтернативно, локусите на епитопите, идентифицирани в протокола на изследване като този, описан по-горе, могат да бъдат изпитани за хетерогенност сред различните изолати с оглед изследване имунологичните свойства на хетерогенните последователности.

Счита се, че вариабилните домени от E1 и/или E2/NS1 домени биха били от особен интерес за приложение като ваксини. По-специално, E1 вариабилен домен в рамките на аминокиселините от 215-255 (фиг. 2), както и E2/NS1 вариабилен домен в рамките на аминокиселини 384-414 (фиг. 3), са идентифицирани като важни имунореактивни домени. Предварителните доказателства предполагат, че един или двата от тези домени могат да бъдат локуси за хетерогенност, отговорни за избягването на мутанти, водещи до хронични HCV инфекции. Така, полипептидните състави, както са описани по-горе, където вариабилният домен (и) в V са един или двата от тези вариабилни домени, са особено предпочитани. Нещо повече, полипептидните състави от настоящото изобретение, доколкото частично засягат основните линейни епитопи във вариабилните домени, могат също да включват конформационни епитопи. Например, съставът може да бъде включен в смес от рекомбинантни E1 и/или E2/NS1 протеини (проявяващи вариабилните домени от различни изолати), експресирани в дадена рекомбинантна система (напр., клетки на инсекти или бозайници), които съхраняват конформационни епитопи както вътре, така и извън вариабилния домен. Обратно, една E1 и/или E2/NS1 антигенна единица от отделен изолат, който съхранява конформационните епитопи, може да бъде комбиниран с полипептиден състав съгласно изобретението (напр., смес от синтетични полипептидни или денатурирани рекомбинантни полипептиди). В друго предпочитано приложение като ваксини, полипептидните състави, описани тук, се комбинират с други HCV антигенни субединици, опи-

сани в "Hepatitis C Virus Asialoglycoproteins" (Attorney Docket No 0154.002) от Robert O. Ralston, Frank Marcus, Kent B. Thidium, Barbara Gervase and John Hall.

За диагностично приложение би било полезно да се използват съставите съгласно изобретението като антигени, поради подобряване способността за установяване на анти тяло за строго определени HCV изолати. Обикновено полипептидните смеси могат да бъдат използвани директно за изследване в хомогенна или хетерогенна форма, последната за предпочитане включваща имобилизирането на полипептидите върху твърда повърхност (например микротитърни блюда с ямки, пластмасови перли, нитроцелулоза и др.). Виж напр. WO90/11089; EP 360088; Immunoassay: a Practical Guide, *supra*. Обратно, всеки по същество идентичен полипептид, който образува полипептидния състав от настоящото изобретение, може да бъде имобилизиран върху същата повърхност при дискретни локуси, като по този начин обезпечава информация спрямо кой изолат или група е продуцирано анти тялото. Това може да бъде по-специално важно в диагностиката, ако множество изолати причиняват хепатит, рак или други заболявания с различни клинични прогнози. Предпочитаната форма е Chiron RIBA™ ивичеста форма за имунологично изследване, описана в U.S.S.N. 07/138894 A и US 07/456637 A.

Полипептидите, приложими при производството на съставите от настоящото изобретение, могат да бъдат получени по рекомбинантен път, синтетично или чрез тъканна култура. Рекомбинантните полипептиди, включени в скъсената HCV последователност или в цялата дължина на протеините, могат да бъдат изградени изцяло от HCV последователности (с един или повече епитопа, изцяло прилежащи или неприлежащи), или последователности на слетия протеин. В слетите протеини полезните хетероложни последователности включват последователности, обезпечаващи секретирането от страна на рекомбинантния гостоприемник, благодарение на имунологичната реактивност на HCV епитопа (ите), или улесняват присъединяването на полипептида към повърхността или ваксиналния носител. EP 116201; US 4722840; EP 259149; US 4629783, които са включени в литературната справка.

Полипептиди с пълна дължина, както и включени в скъсени HCV последователности, и техните мутанти могат да бъдат получени чрез химичен синтез. Методите за получаване на

полипептиди чрез химичното им синтезиране са известни. Те могат да бъдат получени също така и чрез рекомбинантна технология. ДНК последователност, кодираща HCV-1, като ДНК последователности с вариабилни области от други HCV изолати са описани и/или включени в литературната справка. Достъпността на тези последователности позволява конструирането на полинуклеотиди, кодиращи имунореактивни области на HCV полипептиди.

Полинуклеотиди, кодиращи желан полипептид, включени от един или повече от имунореактивните HCV епитопи от различни домени на HCV, могат да бъдат синтезирани по химичен път или да бъдат изолирани и да бъдат включени в експресионен вектор. Векторите могат или не да съдържат части от слети последователности, като β -галактозидаза или супероксид дисмутаза (SOD). Приложими методи и вектори за получаване на полипептиди, съдържащи слети последователности на SOD, са описани в EP 0196056.

ДНК, кодираща желан полипептид, независимо дали е в слята или в зряла форма и дали съдържа или не сигнална последователност, за да позволи секрецията, може да бъде лигирана към експресионни вектори, подходящи за който и да е удобен гостоприемник. Гостоприемниците след това се трансформират с експресионния вектор. Както еукариотните, така и прокариотните гостоприемникови системи понастоящем се използват за формиране на рекомбинантни полипептиди. По-долу са представени сумарно някои от по-общите контролни системи и гостоприемникови клетъчни линии. Гостоприемниковите клетки са инкубирани при условия, които позволяват експресиране на желан полипептид. След това полипептидът се изолира от лизирани клетки или от културалната среда и се пречиства до необходимата за неговото приложение степен на чистота.

Известни са основните похвати, използвани при екстрахиране на HCV генома от даден вирус, получаване и проби за ДНК библиотеки, секвениране на клонове, конструиране на експресионни вектори, трансформиране на клетки, осъществяване на имунологични изпитания като радиоимуноизследвания и ELISA изследвания, култивиране на клетки в култура и други.

Трансформирането на вектора, съдържащ желаната последователност в подходящ гостоприемник, може да бъде осъществено по който и да е познат метод за въвеждане на полинук-

леотиди в гостоприемникова клетка, включително, например, опаковането на полинуклеотида във вирус и трансдукцията на гостоприемниковата клетка с вируса, или чрез директно поглъщане на полинуклеотида. Използваната процедура за трансформиране зависи от гостоприемника, подлежащ на трансформиране. Бактериалната трансформация чрез директно поглъщане обикновено се осъществява чрез третиране с калциев или рубидиев хлорид (Cohlen, 1972), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69:2110. Трансформирането на дрождите чрез директно поглъщане може да бъде осъществено по метода на Hinnen et al. (1978), J. Adv. Enzyme Reg. 7: 1929. Трансформирането на бозайникови клетки чрез директно поглъщане може да бъде осъществено по метода на преципитиране с калциев фосфат на Graham and Van der Eb (1978), Virology 52:546, или различни познати модификации на този метод. Други методи за въвеждане на рекомбинантни полинуклеотиди в клетки, по-специално в клетки на бозайници, които са познати на специалистите в областта, включват декстраново медираната трансфекция, калциево-фосфатно медирана трансфекция, полибреново медирана трансфекция, протопластна фузия, електропорация, капсулиране на полинуклеотиди в липозоми и директно микроинжектиране на полинуклеотиди в ядро.

С оглед получаване на желани кодиращи последователности, гостоприемникови клетки се трансформират с полинуклеотиди (които могат да бъдат експресионни вектори), които да са включени в контролни последователности, оперативно свързани към желани кодиращи последователности. Контролните последователности са съвместими с посочения гостоприемник. Сред прокариотните гостоприемници, най-често се използва *E. coli*. Експресионните контролни последователности за прокариоти включват промотори, факултативно съдържащи операторни частици и рибозомални свързващи сайтове. Векторите за трансфер, съвместими с прокариотните гостоприемници, са най-общо получени от, например pBR322-плазмидсъдържащ оперони, допринасящи за ампицилинова и тетрациклинова резистентност, и различните pUC вектори, които също съдържат последователности на допринасящите за антибиотичната резистентност маркери. Промоторните последователности могат да бъдат природно срещани, например, β -лактамаза (пеницилиназа) (Weisman, 1981), "The cloning of interferon and

other mistakes" in Interferon 3 (ed. I. Gresser), лактоза (lac) (Chang et al. (1977), Nature 198:1056) и триптофан (trp) (Goeddel et al. (1980), Nucl. Acids Res. 8:4057), и α -получена P_L промоторна система и N генен рибозомален свързващ сайт (Shimatake et al. (1981), Nature 292:128). В допълнение, синтетични промотори, които не се срещат в природата, също функционират като бактериални промотори. Например, транскрипционни активиращи последователности от един промотор могат да бъдат съединени с последователностите на оперона на друг промотор, създавайки синтетичен хибриден промотор (например, tac промотор, който е получен от последователности на trp и lac промотори (De Boer et al. (1983), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:21). Описаните системи специално са конкурентни на *E. coli*; по желание, могат да бъдат използвани други прокариотни гостоприемници като щамове на *Bacillus* или *Pseudomonas* със съответните контролни последователности.

Еукариотните гостоприемници включват дрождеви и бозайникови клетки в културални системи. Най-широко използваните дрождеви гостоприемници са *Saccharomyces cerevisiae* и *Saccharomyces carlsbergensis* и са удобни фунгални гостоприемници. Дрождевите конкурентни вектори обикновено носят маркери, които позволяват подбор на успешни трансформанти чрез осъществяване на прототрофия срещу ауксотрофни мутанти или устойчивост на тежки метали у дивите щамове. Дрождевите съвместими вектори могат да използват двумикронното начало на репликация (Broach et al. (1983), Meth. Enz. 101:307), комбинацията от CEN3 и ARS1 или други средства за осигуряване на репликацията, като последователности, които биха довели до включване на подходящ фрагмент в гостоприемниковия клетъчен геном. Контролни последователности за дрождеви вектори са познати за специалистите в областта и включват промотори за синтез на гликолитични ензими (Hess et al. (1968), J. Adv. Enzyme Reg. 7:149); например, алкохол дехидрогеназа (ADH) (E.P.O. Publication № 284044), енолаза, глюкокиназа, глюко-6-фосфатизомераза, глицералдехид-3-фосфат дехидрогеназа (GAP или GAPDH), хексокиназа, фосфорцитоксикиназа, 3-глицерофосфатмутаза и пируваткиназа (PyK) (EP 329203). Дрождевият PH05 ген, кодиращ кисела фосфатаза, също осигурява полезни промоторни последователности.

В допълнение, синтетични промотори, които не се срещат в природата, също функционират като дрождеви промотори. Например, активизиращите в посока upstream последователности (UAS) от един дрождев промотор може да бъде свързана с областта за активиране на транскрипцията от друг дрождев промотор, създавайки синтетичен хибриден промотор. Примери за такива хибридни промотори включват ADH регулаторна последователност, присъединена към GAP областта за активиране на транскрипцията (US 4876197 и US 4880734). Други примери за хибридни промотори включват промотори, които се състоят от регулаторните последователности както от ADH2, GAL4, GAL10 или PH05 гените, комбинирани с областта за активиране на транскрипцията на гена на гликолитичния ензим, напр. GAP или PyK (EP 164556). Нещо повече, дрождев промотор може да включва природно срещани промотори от недрождев произход, който притежава способността да свързва дрождева РНК полимераза за подходящо инициране на транскрипцията.

Други контролни елементи, които могат да бъдат включени в дрождевите експресионни вектори, са терминатори, напр. от GAPDH, и от енолазния ген (Holland (1981), J. Biol. Chem. 256:1385) и лидерни последователности. Лидерният секвенционен фрагмент обикновено кодира сигнална пептид, включен в хидрофобни аминокиселини, които насочват секретирането на протеина от клетката. ДНК, кодираща подходящи сигнални последователности, могат да бъдат получени от гени за секретирани на дрождеви протеини, като генът за дрождева инвертаза (EP 12873) и генът за α -фактора (US 4588684). Обратно, лидери с недрождев произход, например интерфероновни, също осигуряват секрецията в дрожди (EP 60057). Предпочитаният клас от секреторни лидери са онези, които използват фрагмент от дрождевия ген за α -фактора, който съдържа както "пре" сигнална последователност, така и "про" област. Типовете на α -факторните фрагменти, които могат да бъдат използвани, включват пре-про- α -факторния лидер с пълната му дължина, както и същински α -факторни лидери (US 4546084 и US 4870008; US 324274). Допълнителни лидери, използващи α -факторен лидерен фрагмент, който обезпечава секрецията, включват хибридни α -факторни лидери, образувани от пре-последователност на една дрождева клетка и про-област от втори дрождев α -фактор. (WO 89/02463).

Експресионни вектори, както екстрахромозомни репликони, така и интегриращи вектори, са създадени с оглед трансформиране в много дрожди. Например, експресионни вектори са получени за *Candida albicans* (Kurtz et al. (1986), *Mol. Cell Biol.* 6:142), *Candida maltosa* (Kunze et al. (1985), *J. Basic Microbiol.* 25:141), *Hansenula polymorpha* (Gleeson et al. (1986), *J. Gen. Microbiol.* 132:3459), *Kluiveromices fragilis* (Das et al. (1984), *J. Bacteriol.* 154: 1165), *Kluiveromices lactis* (De Louvencourt et al. (1983), *J. Bacteriol.* 154: 737), *Pichia guilliermondii*, (Kunze et al. (1985), supra), *Pichia pastoris* (Cregg et al. (1985), *Mol. Cell Biol.* 5:3376; US 4 837 148 и US 4 929 555), *Schizosaccharomyces pombe* (Beach and Nurse (1981), *Nature* 300:706) и *Yarrowia lipolytica* (Davidow et al. (1985), *Curr. Genet.* 10:39).

Като подходящи гостоприемници за експресия са известни и клетъчни линии от бозайници. Последните включват клетъчни линии, достъпни от American Type Culture Collection (ATCC), като например HeLa клетки, овариални клетки от Китайски хамстер (CHO), бъбречни клетки от хамстер в младенческа възраст (BHK), COS маймунски клетки и много други клетъчни линии. Подходящи промотори за клетки на бозайници също са известни в областта и включват вирусни промотори като тези от Simian virus 40 (SV40), Rous sarcoma virus (RSV), adenovirus (ADV) и говежди папиломен вирус (BPV) (виж Sambrook (1989) за примери на подходящи промотори). Бозайниковите клетки могат да изискват освен това терминални последователности и поли А допълнителни последователности; подсилващите последователности, т.е. такива, които подсилват експресията, също могат да бъдат включени, а също и такива, които причиняват амплификация на гена също са желателни. Посочените последователности са известни.

Познати са и подходящите за репликация в бозайникови клетки вектори. Последните могат да включват вирусни репликони или последователности, които обезпечават интегриране на подходящи последователности, кодиращи желаните полипептиди в гостоприемниковия геном.

Вектор, приложим за експресия на чужда ДНК и който може да бъде използван също и при получаването на ваксини, е *Vaccinia* вирус. В този случай, хетероложната ДНК е инсерирана в генома на *Vaccinia*. Техниките за инсериране на чуждата ДНК във ваксиналния вирусен геном са познати в областта и използват, например,

хомоложна рекомбинация. Инсерирането на хетероложната ДНК обикновено е в ген, който е неесенциален в природата, например, генът на тимидин киназа (tk), който освен това осигурява селективен маркер. Описани са плазмидни вектори, които силно улесняват конструирането на рекомбинантните вируси (виж, например, Mackett et al. (1984) in "DNA Cloning", Vol. II. IRL Press, p. 191, Chakrabarti et al. (1985), *Mol. Cell Biol.* 5:3403; Moss (1987) in "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (Miller and Calos, eds., p. 10). След това експресия на желаните полипептиди, включени в имунореактивните региони се осъществява в клетки или индивиди, които са инфектирани и/или имунизирани с жив рекомбинантен *Vaccinia* вирус.

Други системи за експресия на полипептиди включват клетки на насекоми и вектори, подходящи за приложение върху тези клетки. Тези системи са познати и включват, например, насекомни експресионни трансфер вектори, получени от бакуловируса *Autographa californica* ядрен полихидрозен вирус (AcNPV), който е хелпер-независим, вирусен експресионен вектор. Експресионни вектори, получени от тази система, обикновено използват силния вирусен полихидрозен генен промотор за водене на експресията на хетероложни гени. Напоследък най-широко използваният трансфер вектор за въвеждане на чужди гени в AcNPV е pAc373. За подобряване на експресията са проектирани много други вектори, познати на специалистите в областта. Те включват, например, pVL985 (който изменя полихедрон старт кодона от ATG на ATT, и който въвежда BamHI клониращ сайт от 32 двойки бази в посока downstream от ATT; Виж Luckow and Summers (1989), *Virology* 17:31. Добра експресия на нефузионни чужди протеини обикновено изискват чужди гени, които по идея притежават къса лидерна последователност, съдържаща подходящи транслационни сигнали, предшестващи ATG стартсигнала. Плазмидът също така съдържа полихедроновия полиаденилационен сигнал и ампицилинрезистентния (amp) ген и източник на репликация за подбор и размножаване в *E. coli*.

Методи за въвеждането на хетероложна ДНК в желания сайт в бакуловируса са познати в областта. (Виж Summers and Smith, *Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No 15555*; Ju et al. (1987), in "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (Miller and Calos, eds.); Smith et al.

(1989), supra). Например, инсерцията може да бъде осъществена в ген като полихедроновия ген чрез хомоложна рекомбинация; инсерцията може да бъде също в мястото на рестрикция с рестрикционния ензим в конкретен бакуловирен ген. Инсертраните последователности могат да бъдат такива, които кодират всички или различни сегменти от желаните HCV полипептиди, включително при поне един епитоп от вариабилния домен.

Сигналите за постраниционни модификации, например разграждане на сигналния пептид, протеолитично разграждане и фосфорилиране, очевидно се разпознават от клетките на насекоми. Сигналите, необходими за секретирание и ядрено акумулиране също очевидно се съхраняват между клетките на гръбначни и на безгръбначни. Примери за сигнални последователности от клетки на гръбначни, които са ефективни в клетки на безгръбначни, са познати в областта, например, човешки интерлевкин-2 сигнал (IL2), който е сигнал за транспортиране извън клетките, се разпознава и наистина се отстранява от клетките на насекоми.

Често е желателно полипептидите, използващи горните гостоприемникови клетки и вектори, да бъдат слети полипептиди. Както и неслетите полипептиди, слетите могат да останат интрацелуларни след експресиране. Обратно, слети протеини могат също да бъдат секретирани от клетката към културалната среда, ако са обхванати от лидерния секвенционен фрагмент. За предпочитане, съществуват действащи сайтове между лидерния фрагмент и останалия от чуждия ген, който може да бъде разграден както *in vivo*, така и *in vitro*.

В случаите, когато съставът следва да бъде използван за лечение на HCV, желателно е той да бъде имуногенен. Тогава, когато синтезираният полипептид е с правилна конфигурация, така че да обезпечи коректен епитоп, но е твърде малък, за да бъде имуногенен, полипептидът може да бъде свързан към подходящ носител. Множество техники за получаване на подобно свързване са известни в областта, включително формирането на дисулфидни връзки с помощта на N-сукцинимидил-3-(2-пиридил-тио)пропионат (SPDP) и сукцинимидил 4-(N-малеимидометил) циклохексан-1-карбоксилат (SMCC) (ако в пептида отсъства сулфхидрилна група, тя може да бъде осигурена чрез добавяне на цистеинов остатък). Тези реагенти създават дисулфидно свързване помежду

им и пептидните цистеинови остатъци от един протеин и една амидна връзка през ϵ -амино от лизин или друга свободна аминогрупа в други аминокиселини. Познати са множество такива дисулфид/амидформиращи средства. Виж, напр. *Immun. Rev.* (1982) 62:185, "Други бифункционални свързващи средства за тиоестерно вместо дисулфидно свързване". Много от тези тиоестерформиращи агенти са търговски стоки и включват реактивни естери на 6-малеимидокапроинова киселина, 2-бромооцетна киселина, 2-йодооцетна киселина, 4-(N-малеимидо-метил)циклохексан-1-карбоксилна киселина и други подобни. Карбоксилните групи могат да бъдат активирани чрез комбинирането им със сукцинимид или 1-хидроксил-2-нитро-4-сулфонова киселина, натриева сол. Допълнителни методи за свързване на антигени използват ротавирусната / "свързващ пептид" система, описана в EP 149259. Могат да бъдат използвани също и много модификации на посочените съединения.

Може да се прилага какъвто и да е носител, който сам по себе си не индуцира продукцията на антитела, вредни за гостоприемника. Подходящите носители са обикновено големи, бавно метаболизиращи макромолекули като протеини; полизахариди като активирани с латекс сефароза, агароза, целулоза, целулозни перли и други подобни; полимерни аминокиселини като полиглутаминова киселина, полилизин и др.; аминокиселинни кополимери; и инактивирани вирусни частички. Специално приложими протеинови субстрати са серумни албумини, хемоцианин, имуноглобулинови молекули, тироглобулин, овалбумин, тетанусов токсин и други известни протеини.

Имуногенността на епитопите от HCV вариабилните домени, по-специално E1 и E2/NS1, може също да бъде подсилена чрез получаването им в еукариотни системи, слети с или комбинирани с частичко-формиращи протеини, например тези, асоциирани с хепатит В повърхностен антиген. Виж, например US 4722840. Структурите, където полипептидът, съдържащ HCV епитопа от вариабилен домен, се свързва директно към частичко-формиращ протеин, кодиращ последователности, продуцира хибриди, които са имуногенни по отношение на HCV епитопа. В допълнение, всички от получените вектори включват епитопи, специфични за HCV, притежаващи различни степени на имуногенност, например, пре-S пептида. Така частичките, конструирани от частичко-формиращ протеин, който

включва HCV последователности, са имуногенни по отношение на HCV и HBV.

Показано е, че хепатитният повърхностен антиген (HBSAg) е формиран и събран в частици в *S. cerevisiae* (Valenzuela et al. (1982), Nature 298:344), както и, например, в клетки на бозайници (Valenzuela et al. (1984), in "Hepatitis B", Milman I. et al., ed.). Показано е, че формирането на такива частички повишава имуногенността на мономерните субединици. Структурите могат освен това да включват имунодоминантния епитоп на HBSAg, включващ 55-те аминокиселини от преповърхностната (pre-S) област. Neurath et al. (1984). Структурите от pre-S-HBSAg частичките, подходящи за експресиране в дрожди, са разкрити в EP 174 444; хибриди, включващи хетероложни вирусни последователности за дрождева експресия, са разкрити в EP 175 261. Тези структури могат също да бъдат експресирани в клетки на бозайници като CHO клетки с помощта на SV40-дихидрофолат редуктазния вектор (Michelle et al (1984)).

В допълнение, частици от частичко-формиращата протеинова последователност може да бъдат изместени с кодони, кодиращи епитоп от един HCV вариабелен домен. При това изместване областите, които не са необходими за медиране агрегирането на единиците за формиране на имуногенни частици в дрождеви или бозайникови клетки, могат да бъдат делетираны, по този начин елиминирайки допълнителни HCV антигенни сайтове от конкуренцията с HCV епитопа (ите).

Получаването на ваксини, които съдържат имуногенен полипептид(и) като активен ингредиент(и), е познато на специалистите в областта. Обикновено такива ваксини се приготвят като инжекционни - както течни разтвори, така и суспензии; твърди форми, подходящи за разтваряне или суспендиране в течности преди инжектирането, също могат да бъдат приготвяни. Получаването им може да се съпътства от емулгиране или полипептидът(те) да бъде капсулиран в липозоми. Активните имуногенни компоненти често се смесват с ексципиенти, които са фармакологично подходящи и конкурентни с активната съставка. Подходящи ексципиенти са, например, вода, физиологичен разтвор, декстроза, глицерол, етанол или други подобни и комбинации между тях. В допълнение, по желание, ваксината може да съдържа малки количества от допълнителни субстанции като омокрящи или емулгиращи агенти, рН буферни агенти и/или помощни средства,

които повишават ефективността на ваксината. Примери за помощни средства, които могат да бъдат ефективни, включват алуминиев хидроксид, X-ацетил-мурамил-L-треонил-D-изоглутамин (thr-MDP), азот-ацетил-нор-мурамил-L-аланил-D-изоглутамин (CGP 11637), отнасян като нор-MDP; N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутаминил-L-аланин-2-(1'-2'-дипалмитоил-sn-глицеро-3-хидрокси фосфорилокси)-етиламин (CGP 19835A, отнасян като MTP-PE и RIBI, който съдържа три компонента, екстрахирани от бактерия, монофосфорил липид А, трехалозо димиколат и скелет на клетъчните стени (MPL + TDM + CWS) в 2%-ен сквален/Tween 80 емулсия. Ефективността на помощното средство може да бъде определена чрез измерване на количеството на антителата, насочени срещу имуногенен полипептид, съдържащ HCV епитоп от вариабелен домен, антителата, резултиращи от въвеждане на този полипептид във ваксини, които също са включени в различни помощни средства.

Протеините могат да бъдат включени във ваксината като неутрални или соли форми. Подходящите във фармацевтично отношение соли включват соли с излишък на киселина (формирана със свободни аминокиселини от пептида) и които са образувани с неорганична киселина като хидрохлорна или фосфорна киселина, или органични киселини като оцетна, оксалова, тартарова и други. Соли, образувани със свободните карбоксилни групи, също могат да бъдат получени от неорганични бази, например, натрий, калий, калций, амоний или ферохидроксида и такива органични бази, като изопропиламид, 2-етил-аминоетанол, хистидин, прокаин и др.

Ваксините се въвеждат парентерално чрез инжектиране, например както субкутатно, така и интрамускулно. Допълнителни форми, подходящи за други начини на въвеждане, включват супозитории и, в някои случаи, орални форми. Традиционните свързващи вещества и носители за супозиториите могат да включват, например, полиалкиленгликоли или триглицериди; такива супозитории могат да бъдат формирани от смеси, съдържащи активните компоненти в интервала от 0,5 до 10%, за предпочитане 1-2%. Оралните форми включват такива обичайно включвани ексципиенти като манитол, лактоза, нишесте, магнезиев стеарат, натриев захарин, целулоза, магнезиев карбонат и др. подходящи за фармацевтични цели вещества. Тези съединения могат да са под форма на разтвори, суспензии, таблетки,

прахове, капсули, издържали освобождаване форми или прахове и съдържат от 10 до 95% от активните ингредиенты, за предпочитане от 25 до 70%.

В допълнение към горното, възможно е да се изготвят и живи ваксини от атенюирани микроорганизми, които експресират рекомбинантни полипептиди от HCV антигенните вериги. Подходящи атенюирани микроорганизми са известни в областта и включват, например, вируси (например, *vaccinia virus*), а така също и бактерии.

Ваксините се въвеждат по начин, съответстващ на дозите, в които количеството би било профилактично и/или терапевтично ефективно. Количеството на въвеждане, което е обикновено в границите от 5 до 250 μg от антигена за доза, зависи от субекта, подлаган на третиране, капацитета на неговата имунна система да синтезира антитела и степента на желаната защита. Точното количество на необходимите за въвеждане активни ингредиенты зависи от преценката на лекуващия лекар и е специфична за всеки индивид.

Ваксината може да бъде давана по схема в единични дози, или за предпочитане, по схема с множество дози. Схемата с множество дози може да бъде такава, съгласно която първичният курс на ваксиниране може да бъде проведен с 1-10 отделни дози, последвани от други дози, давани в следващи във времето интервали, необходими за съхраняване и/или повторно засилване на имунния отговор, например, 1-4 месеца за втората доза, ако е необходимо, с последваща доза (и) след няколко месеца. Разпределението на дозите, ще се определя също, поне частично, в зависимост от нуждата на индивида и в зависимост от преценката на лекуващия лекар.

В допълнение, ваксината, съдържаща антигенния комплекс от HCV полипептидите, описани по-горе, могат да бъдат въведени и съвместно с други имунорегулаторни агенти, например, имуноглобулини.

Съставите съгласно настоящото изобретение могат да бъдат въведени у индивидите с оглед генериране поликлонални антитела (пречиствени или изолирани от серум с помощта на конвенционални техники), които след това могат да бъдат използвани за много различни приложения. Например, поликлоналните антитела могат да бъдат използвани за пасивно имунизирани на индивиди или като имунохимични реагенти.

В друг вариант на изобретението описаните по-горе имунореактивни състави, включени в

множество от HCV антигенни комплекси, се използват за насочване на анти-HCV антитела в рамките на биологични проби, включително кръвни или серумни проби. Конструиранието на имунологичните проби силно варира и множество от вариантите са известни. Независимо от това, имунопробата ще използва антигенни комплекси, състоящи се от множество по същество идентични полипептиди, включващи аминокиселинната последователност от даден епитоп в рамките на първия вариабилен домен от даден HCV изолат и аминокиселинната последователност от един комплекс е хетерогенен по отношение на аминокиселинната последователност на поне един друг комплекс. Начините на провеждане на имунологичното изпитване може да се основават, например на конкурентност или директна реакция, или на сандвичев тип анализ. Освен това, може да бъдат използвани твърди повърхности или да бъдат имунопреципитирани. Повечето анализи включват използването на белязано антитяло или полипептид; маркерите могат да бъдат, например, флуоресцентни, хемилуминесцентни, радиоактивни или цветни молекули. Сигналите, които амплифицират сигналите от сондата, също са познати, примери за които са изпитвания с биотин и авидин и ензимнобелязани и медирирани имуноизпитвания, например ELISA.

Китове, удобни за имунодиагностика и съдържащи подходящи белязани реагенти, са конструирани посредством опаковането на съответните подходящи материали, включително съставите от изобретението, съдържащи HCV епитопи от вариабилни домени, в удобни контейнери, успоредно с останалите реагенти и материали (например буфери, солени разтвори и др.), необходими за провеждане на изпитването, а така също и съответните инструкции за това.

Следващите примери илюстрират изобретението, без да го ограничават.

Примери на изпълнение

В примерите са използвани следните материали и методи:

Проби от пациенти и РНК екстракция
Асимптоматични HCV носители HCT 18 и HCV J1 и хронично инфектиран HCV пациент Th са описани от Weiner et al. (1991) *Virology* 180: 842-848. Пациент Q е диагностициран като носител на хронично активен хепатит, на базата на чернодробна биопсия и е поставен на α -2b интер-

феронова терапия (3 милиона единици, три пъти в седмицата) за 6 месеца. РНК от 0,2 ml плазма се екстрахира съгласно метода на Chomczynski and Sacchi, (1987) *Anal. Biochem.* 162: 156-159, с помощта на РНКзол™ В реагент (Cinna/Biotech Laboratories), съдържащ 10 µg/ml MS2 носител на РНК (Boehringer Mannheim, 165-948), както е посочено от производителя. РНК се ресуспендира в 200 µl диетилпирокарбонатно третирана дестилирана вода и се репреципитира в крайна концентрация от 0,2M натриев ацетат и два и половина обема от 100% етанол (-20°C).

сДНК и полимеразни верижни реакции

Всички реакции са проведени съгласно Weiner et al. (1990) *Lancet* 335:1-5. Съгласуването на M13 се осъществява съгласно Messing et al. (1983), *Methods in Enzymology* 101:20-37. Консенсус последователностите от поне четири клонирани инсерта са представени с изключването на HCV J1.2 E2/NS1 последователност, получена от два клона.

Клонирането и секвенирането на НСТ 18 и Th се провежда така, както е докладвано от Weiner et al. (1991), по-горе. PCR праймерите, използвани за клониране на аминокрайния и проксимален сегмент на E2/NS1 у пациента Q, са:

PCR I

X (E2) 14 GGTGCTCACTGGGGAGTCCT (1367 - 1386) S

X (E2) 18J TCCATGGTGGGGAAGTGGGC (1608 - 1588) A,

PCR II

X (E2) 4 TCCATGGTGGGGAAGTGGGC (1406 - 1425) S

X (E2) 19J TGCCAACTGCCATTGGTGTT (1528 - 1562) A;

PCR I

X (E2) 14 (above) S

J1rc12 TAACGGGCTGAGCTCGGA (2313 - 2296) A

PCR II

US (E2) 5 CAATTGGTTCGGTTGTACC (1960 - 1978) S

J1rc13 CGTCCAGTTGCAGGCAGCTTC (2260 - 2240) A.

PCR праймерите, използвани за клониране на HCV J1 E2/NS гена са :

PCR I

J1 (E2) 14 (above) S

J1 (E2) rc30** CAGGGCAGTATCTGCCACTC (2349 - 2330) A

J1IZ - 2* TGAGACGGACGTGCTGCTCCT (1960 - 1978) S

J1 (E2) rc32** TTTGATGTACCAGGCGGCGCA (2658 - 2636) A

PCR II - E2384 . 5*

GGATCCGCTAGCCATACCCGCGTGACGGGGGGGGTCAA

(1469 - 1495) S

DSCON1JBX*

GGATCCTCTAGATTAAGTCTTCTGACCTATCCCTGTCCTCCAAGT

CACA (2272 - 2301) A

* , nt последователност от *Takeuchi et al.* , (1990) *Nucl. Acids Res.* 18: 4626 ;

** , nt последователност от *Kato et al.* , (1989) *Proc. Jpn. Acad.* 65B: 219-223.

Сенс или антисенс праймери са дадени в 5' към 3' ориентация съгласно нуклеотидните номера в литературната справка.

Синтез на биотинирани пептиди

Припокриващите се октапептиди за хипервариабилните области на три шама от HCV са синтезирани върху линкер, способен на разграждане, произведен и полиетиленови иглички, както са описани от Maeji et al., (1990) *J. Immunol. Methods* 134: 23-33, който се присъединява към N-края на всеки пептид. Накрая биотинът се присъединява към N-края с помощта на 150 μ l диметилформамидов разтвор, съдържащ 40 mM биотин, 40 mM 1-хидроксibenзотриазол (HOBt), 40 mM бензотриазол-1-ил-окси-трис-пирилидонофосфониум хексафлуорофосфат (PyBOP, NOVABIOSCHEM) и 60 mM N-метилморфолин (NMM), реагиращи за една нощ при -20°C .

След биотинирането се извършва премахване на защитата на страничните вериги на пептидите и тяхното промиване и пептидите от всяка игличка се разграждат в 200 μ l 0,1 M фосфатен буфер (pH 7,2). Микротитърните блюда, съдържащи разтворите от разцепени пептиди, се съхраняват при -20°C до необходимост.

Тестване по ELISA на биотинираните пептиди

Полистиренови блюда (Nunc immuno plate maxisorb R96) се покриват със стрептавидин чрез инкубиране за една нощ при 4°C с 0,1 ml/за кладенче от 5 $\mu\text{g/ml}$ разтвор на стрептавидин (Sigma Cat. No. S4762) в 0,1 M карбонатен буфер при pH 9,6. След отстраняването на стрептавидиновия разтвор, ямките се промиват четирикратно с 0,1% разтвор на Tween 20 в PBS. Неспецифичните свързвания се блокират чрез инкубиране на всяка ямка с 0,2 ml от 2% BSA в PBS за 1 h при 20°C . След инкубирането, блюдата се промиват четирикратно с PBS/Tween 20. Всяка ямка се инкубира със 100 μ l от подходящ разтвор на серум (разреден с 2% BSA в PBS, съдържащ 0,1% натриев азид) за 1 h при 20°C или за една нощ при 4°C , последвано от четири промивания с PBS/Tween 20. Свързаното анти тяло се открива чрез реакция за 1 h при 20°C в 0,1 ml конюгат. Той се състои от 0,25 ml/l (наситено ниво) белязан с пероксидаза от хрян кози анти-пльши IgG (H+L) (Kirkegaard and Perry Labs, Gauthersburg, MD) в CASS (0,1% овчи серум, 0,1% Tween 20, 0,1% натриев казеинат, разреден в 0,1 M PBS, pH 7,2). Ямките се промиват двукратно с PBS/Tween 20, последвано от две промивания само с

PBS. Присъствието на ензима се открива посредством реакция за 45 min при 20°C с 0,1 ml пряно приготвен разтвор, съдържащ 50 mg амониев 2,2'-азино-бис[3-етилбензотиазолин-6-сулфонат (ABTS, Boeringer Mannheim Cat, no. 122661) и 0,03 ml от 35% (w/w) разтвор на разтвор на водороден прекис в 100 ml от 0,1 M фосфат / 0,08 M цитратен буфер, pH 4,0. Цветно развитие е измерено в Titertek Multiscan MC пластинка по двойно вълнистия начин при 405 nm срещу цитирана дължина на вълната от 492 nm.

- Компютърно генериран антигенен профил
- Антигенните профили за HCV E2/NS1 протеин и HIV-1 gp 120 хипервариабилен регион V3 (aa 303 -338), са получени от компютърна програма, основана на степента на секвенционна вариабилност, както е предложено на Kabat [Sequences of proteins of immunological interest. U.S. Department of Health Service, National Institutes of Health (1983)] за идентифициране на хипервариабилните бримки от имуноглобулини, мултиплицирани чрез средната от индивидуалните вероятности, която анти тяло свързването е съхранило за всяка вероятна двойка аминокиселини.
- 25 Вероятностите за съхраняване на анти тяло свързването, асоциирано с дадено изменение на аминокиселина, са степените, експериментално определени чрез оценяване ефектите на анти тяло свързване за всички възможни аминокиселинни замествания за 103 охарактеризирани линейни епитопи. Geysen et al., (1988) *J. Mol. Res.* 1:32-41. Така този алгоритъм дава значението на индекса на вариабилност, за да придаде по-голяма значимост на аминокиселинните изменения, подобно на анти тяло свързването, т.е. компенсират консервативните аминокиселинни изменения. Петнадесет HCV последователности [HCV-1, Q3.2, HCT 23, EC10, HC-J1, HCVE1, TH, HCT 27, Q1.2, HCT18, HC-J4, HCV J1. 2/HCV J1.1, HCV J, 40 HCV BK], са използвани за определяне антигенния профил за HCV.H CV-1 V3 профилът е получен чрез осредняване на 242 индивидуални профила на 15 последователности, подбрани случайно от числово по-голяма база данни, състояща се от уникални HIV-1 последователности. La Rosa et al., (1990) *Science* 249:932-935 & Correction in *Science* (1991) p. 811.

Компютърно предсказани вторични структури

50 Спирала, β -sheet и β -turn вторични структурни варианти за аминокрайния регион (384-420) са определени с помощта на алгоритъм,

който определя възможностите за всяка от трите горни вторични структурни мотива спрямо всеки остатък. Използваните коефициенти в алгоритъма са получени за всички двойки комбинации от остатъци на структурната база данни. Levitt and Greer, (1977) J.Mol.Biol. 114:181-293. Предсказаните параметри, получени от тези коефициенти, пастват към наблюдавания резултат, когато алгоритъмът се прилага обратно върху базата данни за получаване вероятността даден остатък да бъде намерен в един от трите определени вторични структурни мотива.

Пример 1.

Сравнение на вторичната структура и вариането в аминокиселините в HCV E2/NS1 HV и HIV -1 gp 120 областите

Аминокиселинните последователности от петнадесет HCV и H²V-1 изолати са сравнени по отношение числото на позициите, при които се наблюдава хетерогенност в аминокиселинната последователност в HCV E2 HV или H/V-1 gp 120 V3 областите (фиг.4, А и В, съответно). Тиретата на х-оста на фиг.4А и В представят аминокиселинните позиции, където вариабилните аминокиселини са дадени в еднобуквен аминокиселинен код. Антигенните профили, показани на фигура 4, означават, че аналогично на V3 бримката от HIV-1 gp 120 протеина (фиг.4В), е идентифициран блок от аминокиселинни остатъци в HCV E2 (аминокиселини 384-414 на фиг.4А), чиито вариации имат предсказуем неблагоприятен ефект върху антигено свръзването. Данните на фиг.4 показват, че HCV E2 областта е сходна на HIV-1 gp 120 V3 областта, за която се знае, че кодира вирус неутрализиращи епитопи както по степен, така и по предсказуема значимост на наблюдаваните аминокиселинни вариации и предполага, че E2 HV областта може да има аналогична функция, както gp 120 V3 областта.

Линейните епитопи са в по-голямо подобие асоциирани с по-малко структурни региони от протеини, в частност, краищата на протеини, или с повърхностно удължени бримки. За предсказване вероятността даден отделен остатък да се асоциира с определен вторичен структурен мотив за 15 E2 HV аминокиселинни последователности между остатъците 384 до 420 се използва компютърен анализ. Фиг.4 показва, че областта между E2 аминокрайния остатък 384 и строго предсказаня, добре съхранен β -turn (остатъци 415-418) е относително неструктурирано, както

е показано с по-малко от 50% вероятност за α -спирала, β -sheet или β -turn характер. Липсата на строго предсказуема структура в E2 HV домена се съгласува с устойчивостта на екстензивни секвенционни вариации, намерени между изолатите, и е в противоположност на силно структурираните региони, определящи четвъртичната структура на протеина. HCV E2 HV областта се явява дори по-малко структурирана от V3, по принцип неутрализираща област от HIV-1 gp 120, за която е докладвано, че съдържа β -верижан тип II β -turn α -верижно спиралообразен мотив и може да притежава по-голяма структурна строгост на аминокиселината вариабилност отколкото HCV E2 HV домена. Като цяло, доказателството предполага, че E2 HV доменът очевидно притежава характерна черта на протеинови области, които съдържат подобни сайтове на линейни неутрализиращи епитопи.

Пример 2

Картиране на епитопите от HCV E2/NS1NV домена

Припокриващите се биотинирани 8-мерни пептиди, съответстващи на и разширяващи се зад E2/NS1 HV домена (аминокиселини 384 до 416) от HCT 18 (A,D), Th (b,E) и HCV J1 (C,F), се свързват към бляда, покрити със стрептавидин и реагират с плазма както от HCT 18 (A-C), така и с Th (D-F). Резултатите са показани на фиг.6 за HCV изолати HCV 18 (фиг.6А и 6D), Th (Фиг.6В и 6Е), и HCV J1 (Фиг.6С HCV и 6F). HCT 18 плазма се разрежда 1:20 и Th плазма се разрежда 1:500. HVE-1, -2, -3, -4 и -5 представят изолат специфичните епитопи.

Както може да се види от фиг.6, HCT 18 плазма идентифицира линейен епитоп (⁴⁰⁷PKQNV⁴¹¹) при тестване с пептиди, получени от HCT18 последователността (HVE-I kd Brhw, d 6D), но не реагира с пептиди, съответстващи на HV домена от два различни щама Th и HCV J1 (фиг. 6В и 6С). Противоположно на това, Th плазма идентифицира линейен епитоп HVE-IV в HV домен от HV на Th (⁴⁰⁹QNIQLI⁴¹⁴, фиг.6Е), и също епитопи в щам HCT 18 (³⁹⁹IVRFFAP⁴⁰⁵, фиг.6D) и HCV. J1 Jh 1, би могъл да бъде изложен на множество щамове HCV.

Както Th, така и HCT 18 плазмата, реагират с епитоп (аминокиселини 413-419), общи за всичките три изолата (данни не са показани тогава, когато се използва ELISA със синтезирани припокриващи се 8-мерни пептиди от всеки изолат.

За да се оцени специфичността на свързването на антиялото, антигела, свързани към биотинирани пептиди и съдържащи аминокиселини 403-407, се елюират и се използват за блокиране реактивността на НСТ 18 плазма с иглички, съдържащи припокриващи се 8-мери за НСТ 18 HV домена. Тези данни показват, че 1) E2/NS1 HV доменът е имуногенен, 2) налице са множество епитопи, които прилягат към тази област и 3) комплекс от епитопи (HVE-1,-2,-3,-4 или -5 на фиг.6) в HV домена се изолират специфично.

Пример 3. Определяне на факта, че варианти E2/NS1HV домени могат да бъдат асоциирани с избухвания на хепатит

За да се изследва възможността за намиране на HCV варианти, свързани с редуващи се избухвания на хепатит, често установявани при хроничните HCV инфекции, частично се секвенира E2/NS1 генът от пациента Q с хроничен хепатит по време на два отчетливи периода на заболяване приблизително две години назад (Q1 и Q3, съответно). Вторият хепатитен епизод бе след назначаване на интерфероново лечение.

Различията в дедуцираната аминокиселинна последователност на Q1 и Q3 E2/NS1 HV област бяха поразителни само между аминокиселини 391-408 със седем от осем изменения, появяващи се между аминокиселина 398 и 407 (фиг.7). Фиг. 7 показва дедуцираните аминокиселинни последователности на два региона от E2/NS1 полипептида, аминокиселини 384-414 и 547-647, за Q1 и Q3 изолати. Аминокиселинната

(E) над Q1 последователността е установена в един от четирите Q1 клона. Заградените аминокиселини представят локализацията на Q1 или Q3 HVE 12-мерен пептид. Аминокиселинните различия, установени между Q1 и Q3 са напечатани удебелено.

Между аминокиселини 547 и 647 от Q1 и Q3 E2/NS1 полипептидите (фиг.7) е установена само една аминокиселинна хетерогенност.

За изпитване въздействието на аминокиселинните замествания, наблюдавани в Q1 и Q3 E2 HV при антияло свързването, се синтезира Q1 и Q3 специфичен 12-мерен пептид от аминокиселини 396 до 407 (HVE Q1 или Q3 на фиг.7B) и се осъществява специфична реакция на Q1 и Q3 плазма с всеки пептид в ELISA. Таблица 4 показва, че антигелата както в плазма Q1, така и в плазма Q3 реагират с Q1 пептида, но не и с Q3 пептида. Статистическият анализ (Student's Test) показва, че свързването на Q1/Q3 плазма към Q1 пептида е значително над нивото на свързването на тази плазма към блок от 12 случайно избрани контролни пептиди ($P < 0.001$), докато свързването както на Q1, така и на Q3 плазмата към Q3 пептида не е статистически значимо. Данните показват, че макар пациентът Q да развива антигела спрямо HCV Q1 HV областта, които могат да бъдат открити, дори две години по-късно във времето при точка Q3, не се установява развитие на хуморален отговор срещу Q3 E2 HV варианта, който е преобладаващ по време на втория хепатитен епизод.

ТАБЛИЦА 4

Резултати, получени на ELISA за 12- мерен пептид

плазма	TARFAGFFQSGA		TAGFVRLFETGP	
	Q1 seq		Q3 seq	
	Стойност	sd	Стойност	sd
Q1	1.158	0.134	0.691	0.123
Q3	1.022	0.123	0.693	0.036

Пример 4.

Установяване на съвместно съществуващи E2/NS1 гени, различни FE2/NS1 HV домени в HCV инфектирани индивиди

Фигура 8A показва аминокиселинните последователности, изведени от два изолата на HCV J1 (J1.1 & J1.2), които са клонирани от една плазмена проба на Японски доброволен донор на кръв HCV J1. Kubo et al., (1989) Nucl.Acids Res.17:10367-10372. От общо 23-те аминокиселин-

ни изменения между HCV J1.1 и HCV J1.2, девет различия, индикирани с удебелен шрифт, са групирани в състоящия се от 30 аминокиселини E2/NS1 HV домен. Доколкото HCV J1 е единствената група II HCV геном, която е клонирана съгласно изобретението, като че ли тези разлики се дължат на кръстосаното контаминиране на HCV J1 плазмата. HCV J1.2 последователността представлява малката последователност в HCV J1 кръвта, доколкото са идентифицирани само

два E2/NS1 HV вариантни последователности от 7-те клонирани последователности, произхождащи от две независими PCR реакции.

Интересно е това, че сравнението на HCT 27 и HCV E1 изолатите (фиг.8B), които са секвенирани в различни лаборатории и са получени от несвързани по презумпция индивиди показва, че числото на аминокиселинните различия в E2/NS1 HV областта на тези изолати е по-малко от тези на наблюдаваните различия между изолати от същия индивид.

Описаните по-горе резултати водят до предположението, че HCV геномът е силнозастъпен в индивидите и популацията.

Пример 5. Формулиране и изготвяне на ваксина. Присъединяване на Дифтерийния токсиден носещ протеин към MCS. Необходими материали:

- етилен диамин тетраоцетна киселина (EDJA $\text{Na}_2\text{2H}_2\text{O}$) (MW 372);
 - 6-малеимидо-капроинова киселина N-хидроксисукцинимиден естер (MCS);
 - (Sigma) - 95% чистота;
 - натриев дихидрогенен ортофосфат (NaH_2PO_4);
 - азот;
 - диметилформамид - APON;
 - мили Q вода;
 - 0.1 M фосфатен буфер, съдържащ 5 mM EDTA, pH 6.66;
 - 0.1 M фосфатен буфер, pH 8.0;
 - 0.1 M фосфатен буфер, pH 7.0;
 - натриев сукцинат [$(\text{CH}_2\text{COONa})_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$];
 - цистеин;
 - хидрохлорна киселина (2% разтвор);
 - 0.1 M натриев сукцинат/ 0.1 EDTA, pH 5.6.
- Пречистен дифтерийен токсид (Commonwealth Serum Laboratories, Victoria, Australia) се

присъединява към MCS съгласно метода, описан от Lee et al., (1980) Mol. Immunol. 17:749; Partis et al., (1983) Prot. Chem. 2:263 Peeters et al., (1989) J.Immunol. Methods 120:133; Jones et al., (1989) J; Immunol. Methods 123:211. 100 ml от дифтерийния токсид се прекарват през колона G25 Sephadex (17 x 4 cm) за отстраняване на тиомерсала. Токсидът се елюира с 0.1 M фосфатен буфер с pH 7.0 и протеиновото съдържание на елюата се изпитва с помощта на ВСА протеиново определяне (Pierce). Полученият в резултат разтвор се концентрира с помощта на Амиконова ултрафилтрационна единица до крайна концентрация от 10 mg/ml.

1 ml от токсидния разтвор се диализира с 0.1 M фосфатен буфер, pH 8.0 и след това се смесва с разтвор от 1.5 mg MCS в 200 μl DMF. Полученият в резултат разтвор се инкубира на стайна температура за 1 h на тъмно при разбъркване от време на време. За да се отдели несвързаният MCS от MCS-токсоида, разтворът се прекарва през колона Sephadex PD10, уравновесена с 0.1 фосфатен буфер, pH 6.66 и протеиновата фракция се събира.

Броят на малеимидовите групи, присъединени към една молекула носител, се определя преди присъединяването на HCV пептидите.

30 ml от сукцинат/EDTA буфера се поставят в азотна среда за 2 min. 5 mg цистеин се прехвърлят в 25 ml по обем колби и се разтварят в 25 ml от така обработения буфер. Равни количества от разтворите, показани на таблица 5, се прехвърлят в две 25 ml бутилки със завинтващи се запушалки. С помощта на отделни пипети всяка от тях се продухва с азот. Всяка бутилка след това се инкубира на стайна температура и на тъмно за 40 min при разбъркване от време на време.

ТАБЛИЦА 5

Разтвор	Проба (ml)	Стандарт (ml)	Празна (ml)
активиран носител	0.3	-	-
фосфатен буфер	-	0.3	0.3
цистеинов разтвор	1.0	1.0	-
сукцинатен разтвор	-	-	1.0

A* 0.1 ml количество от всеки от прите разтвора се взема за определяне по Ellman.

A* 0.1 ml количество от всеки от трите разтвора се взема за определяне по Ellman.

Тест на Ellman за количествено сулфхидрилно определяне

Необходими материали:

Фосфатен буфер, pH 8.0.

Разтварят се 15.6 g NaH_2PO_4 или 12.0 g NaH_2PO_4 анхидрид в приблизително 700 ml Milli Q вода. pH се довежда до 8.0 с помощта на 50% NaOH. Добавя се Milli Q вода за краен обем от 1000 ml. Следва коригиране на pH, ако е необходимо.

Реагент на Ellman.

Разтварят се 10.0 mg от 5,5'-дителибис-2-нитробензолна киселина (DTNB) в 2.5 ml фосфатен буфер, pH 8.0.

0.1 ml от реагента на Ellman се добавя към всяка от 0.1 ml част на разтвора, приготвен както по-горе, наречени проба, стандарт и празни разтвори. 5 ml от фосфатния буфер, pH 8.0 след това се добавят към всяка от тези части, смесват се добре и се оставят за 15 min. Абсорбцията на всяка от частите се измерва в 1 cm клетка при 412 nm.

Броят на малеимидовите групи, присъстващи върху носещия протеин, се определя съгласно следния метод. 0.01 mol за ml разтвор на -SH предизвиква адсорбция от 0.136 в 1 cm светла пътека при 412 nm. Абсорбирането на Стандартната или на Проба (A) е еднакво на количеството цистеин, реагирало с присъединените малеимидови групи върху активирания носещ протеин. Докато 1 mol от свободните -SH реагират с 1 mol малеимида, концентрацията в μmol на малеимидовите групи, присъстващи в тестваната част, е еднаква на $A(0.01)/0.136 \mu\text{mol/ml}$. Общият обем на разтвора е 5.2 ml. Поради това общият брой на присъстващите μmol е равен на $A(0.01)(5.2)/0.136$. Разтворът на пробата има общ обем от 1.3 ml, от които 0.3 представляват активирания носещ протеин. Количеството на малеимидовите групи, присъстващи в разтвора на пробата, се изчислява като $A(0.01)(5.2)(1.3)/(0.136)(0.1)(0.3) = A916 = 57 \mu\text{mol/ml}$. MCS-активираният носещ протеин се съхранява при -20°C .

Редукция на HCV пептидите

Преди присъединяването на HCV пептидите към MCS- активирания носещ протеин, пептидите се редуцират така, че да е гарантирано тиоловите групи, присъстващи в пептида, да са в напълно редуцирана -SH форма.

Необходими материали:

- дитиотреитол (DDT);

- амониев хидроген карбонат (NH_4HCO_3);

- метанол;

SEP-PAKs (C18 патрон, Воден), 1 патрон

5 за всеки 8 mg от пептида 0.1 M амониев хидроген карбонатен буфер

Разтварят се 7.9 g NH_4HCO_3 в 1 l Milli Q

вода

10 Буфер А, 0.1% v/v трифлуороцетна киселина (TFA) в Milli Q вода.

Буфер В, 60% v/v ацетонитрил, 0.1% v/v TFA в Milli Q вода.

15 15 mg от всеки два пептида, съответстващи на аминокиселини 384-411 и 225-260, съответно, от HIV полипротеина, се добавят към 2.5 ml от 0.1 M амониев хидроген карбонат, съдържащ 10кратно по-голямо моларно количество от DTT. Получените в резултат разтвори се смесват, докато пептидът се разтвори и след това се оставя на стайна температура. Две двойки SEP-PAKs се свързват в серии и се активират чрез прекарване приблизително 20 ml от метанола и след това 20 ml от Буфер А през всяка двойка от SEP-PAKs. Всяка пептидно/DTT проба се прекарва бавно през двойка от SEP-PAKs. DTT се елимира със 7 ml от Буфер В в предварително претеглена колба и след това се лиофилизира през нощта. След това колбите се претеглят за определяне количеството на възстановения пептид. Редуцираните пептиди след това незабавно се присъединяват към MCS-активиран носещ протеин.

Присъединяване на HIV пептиди към MCS-активиран носещ протеин

35 Приблизително 100 ml от 0.1 M фосфатен буфер с 5 mM EDTA, pH 6.66 се вакуумират и след това се напръсква с азот за 10 min.

40 20 ml от 10 mg/ml разтвор на MCS-активиран носещ протеин внимателно се напръсква с азот за предотвратяване интензивното разпенване. 5 mg от всеки от редуцираните пептиди се разтваря в приблизително 0.2 ml от фосфатния буфер, обработен както по-горе, pH 6.66 и след това се смесва с разтвор на MCS-активиран протеинов носител. Получената в резултат смес се прехвърля в колба със запушалка на винт, която след това се пълни с азот и се запечатва. След това разтворът се обезгазва чрез поставяне на колбата в ултразвукова баня на Branson 2000® за 2 min. Колбата след това се покрива с алуминиево фолио и се инкубира за една нощ при стайна температура при бавно размесване на

клатачка.

Полученият в резултат конюгат е разтворим и несвързаният пептид се отстранява чрез прекарване на сместа през колона на Sephadex PD 10, която се уравнива с фосфатно/EDTA буфер, рН 6.66. Протеиновата фракция се събира и количеството пептид, конюгиран с протеиновия носещ протеин, се определя чрез аминокиселинен анализ.

Провежда се аминокиселинен анализ на

150 µl части от конюгата и от носещия протеин. Определя се средното съотношение от нивото на аминокиселините, дължащи се на носещия протеин, за да се изчисли количеството на получения конюгиран пептид. Нивата на серин, треонин, триптофан, метионин, тирозин и цистеин не се определят, тъй като тези аминокиселини са модифицирани при условията на стандартната хидролиза. Типичните резултати, получени при тези изчисления, са представени в таблица 6.

ТАБЛИЦА 6

АМИНО -- КИСЕЛИНИ	САМО НОСИТЕЛ	КОНЮГАТ
D	212	193
E	194	170
G	153	108
R	60	56
A	150	384
P	79	163

За конюгата стойностите на удебелените аминокиселини са на присъстващите в пептидите. За конюгати, съдържащи аланин и пролин, факторът $(193 + 179 + 180 + 56) / (212 + 194 + 153 + 60) = 0.8659$ се умножава по количеството на нивото на аминокиселините за нормализиране на резултата.

Получаване на ваксинални състави

Инжекционни състави, състоящи се от HCV пептиди, конюгиран с MCS-активирани дифтерийни токсидни носители на протеин, се приготвят, както е описано по-горе и субмиконно маслено-водно емулсионно помощно средство, както е описано в WO 9014837. Допълнително се изготвят инжекционни състави, състоящи се от имуностимулант, липофилен мурамилов пептид (MTP-PE, CIBA-GELGY, Basel, Switzerland) в допълнение към HCV конюгираните пептиди и помощното средство. Ваксиналните състави представляват общо 50% протеин и 50% помощно средство.

Формула за ваксинални състави с MTP-PE
За получаване на 10 ml инжекционен ваксинален състав:

2.5 ml сквален (Sigma Chemical Co., St.Louis, Mo.)

0.25 ml Твин 80 (Sigma Chemical Co.)

0.25 ml SPAN 85 (Sigma Chemical Co.)

1 000 µg MTP-PE

1 000 µg HCV пептид, конюгиран с MCS-активиран дифтерин токсиден носещ протеин.
Формула за ваксинален състав без MTP-PE.
За получаване на 10 ml инжекционен ваксинален състав:

2.5 ml сквален (Sigma Chemical Co., St.Louis, Mo.)

2.25 ml Твин 80 (Sigma Chemical Co.)

0.25 ml SPAN 85 (Sigma Chemical Co.)

1000 µg HCV пептид, конюгиран с MCS-активиран дифтериен токсиден носещ протеин

Пример 6. Метод за тестване на ваксинални препарати за токсичност

Ваксината, изготвена съгласно методиката от пример 5, се тества за токсичност у малки животни. 50 mg/kg от ваксината се въвежда в морски свинчета, мишки и зайци чрез интраперитонеално инжектиране. Ваксината също така се въвежда чрез интраперитонеално инжектиране в маймуни резус и примати. Половината от тестваната популация от маймуните резус и приматите получават 5 µg/kg дози от ваксината, докато другата половина получава 50 µg/kg дози. Използваните контролни животни във всяко от изследванията се инжектират със сравнимо количество от състава, състоящо се от компонентите на ваксиналния препарат, с изключение на вирусните пептиди.

Всяко от животните се наблюдава за симп-

томи, показателни за отговор на токсичния материал, по-специално в продължение на две седмици се следи за треска, летария, загуба на теглото, изменения в хранителните навици и за лезии, подувания и чувствителност на мястото на инжектирането. Лимфните възли проксимално на мястото на инжектирането също се изпитват за подувания и/или изсъхване. Животните също така се наблюдават по за две седмици в цялостен период от няколко месеца.

Пример 7. Демонстрация на получаването на неутрализиращо анти тяло у ваксинираните животни

Ваксина, получена съгласно методологията от примера 5, се тества в шимпанзета за определяне ефективността на ваксината при предизвикване продуцирането на вирус неутрализиращо анти тяло у ваксинираните субекти. Шимпанзетата се ваксинира с доза 5 µg/kg ваксина, получена съгласно методологията, описана в пример 5, в продължение на период от над 6 мес. в интервали 0, 1, 3, и 6 месеца. Контролните шимпанзета се инжектират със сравними количества от състав, включващ компонентите от ваксината, с изключение на вирусните пептиди. Две седмици след въвеждането на последната доза, тестваните и контролните шимпанзета всяко се провокира с 10 CIU₅₀ (Инфекциозни за шимпанзетата единици) доза от CDC/910 плазмен инокулум. Започвайки една седмица след вирусната провокация, всяко от шимпанзетата се наблюдава за вiremия в продължение на една седмица.

За откриване на виремия, кръвните проби и чернодробната биопсия се събират от контролните и тествани животни в продължение на една седмица до няколко месеца. Тъканите, събрани от чернодробната биопсия, се изпитват хистологично за белези на некрозис и/или възпаление. В допълнение, хепатоцити от биопсичния материал се изпитват чрез електронна микроскопия за присъствие на тубули, характеризиращи HCV инфекцията. Кръвните проби също се анализират по метода ELISA, описан по-горе, за присъствието на анти тела при сегментите на вирусните полипептиди, които не са използвани при получаването на ваксината. В частност, всяка от кръвните проби се скринира с ELISA за присъствие на анти тела срещу NS₃, NS₄ и NS₅ пептиди. Присъствието на анти тела спрямо тези пептиди в серума на шимпанзе е показателно за HCV инфекция.

За установяване на вирусни РНК, циркулиращи в плазмата или присъстващи в черно-

дробните биопсични тъкани, събрани от шимпанзетата, се използва следният метод.

sPCR метод за откриване на HCV РНК в черен дроб и в серум

В sPCR пробите, вероятната вирусна РНК в проба е обратно транскрибирана в сДНК с обратна транскриптаза; сегмент от получената в резултат сДНК след това се амплифицира с помощта на модифицирана версия на PCR техниката, описана от Saiki et al. (1986). Праймерите за PCR техниката са получени от HCV РНК, която може да бъде идентифицирана със семейството от HCV сДНК, описани тук.

sPCR/KCV изследване, използвано в тези изследвания, се осъществява с помощта на следващите методи за получаване на РНК, обратното транскрибиране на РНК в сДНК, амплифициране на специфични сегменти от сДНК чрез PCR и анализ на PCR продуктите.

РНК се екстрахира от черен дроб с помощта на гуанидин тиоцианатен метод за получаване на обща РНК, описан от Maniatis et al. (1982).

За изолиране на обща РНК от плазмата, плазмата се разрежда пет- до десеткратно с TENB (0.1 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA) и се инкубира в протеиназен K/SDS разтвор (0.5% SDS, 1 mg/ml протеиназа K, 20 µg/ml Pvu A носител) за 60 до 90 min при 37°C. Пробите се екстрахират веднъж с фенол (pH 6.5), получената органична фаза се реекстрахира веднъж с TENB, съдържащ 0.1% SDS, и водните фази от двете екстракции се отливат и екстрахират двукратно с еднакъв обем от фенол/CHCl₃/изоамилов алкохол [1:1 (99:1)]. Получените в резултат водни фази се екстрахират с еднакъв обем CHCl₃/изоамилов алкохол (99:1) двукратно, и се преципитират с алкохол с помощта на 0.2M натриев ацетат, pH 6.5, и 2.5 обема от 100% етанол; преципитацията се осъществява за една нощ при -20°C.

Използваната като матрица сДНК за PCR реакцията се изготвя с помощта на посочените проби за получаване на съответните сДНК.

Всяка РНК проба (съдържаща или 2 µg от денатурираната с висока температура обща чернодробна РНК от шимпанзе или РНК от 2 µl плазма) се инкубира в 25 µl-ова реакция, съдържаща 1 µmol от всеки праймер, 1 µmol от всеки дезоксирибонуклеотид трифосфат (dNTP), 50 mol Tris-HCl, pH 8. 3,5 µmol MgCl₂, 5 µmol дитиотреитол (DTT), 73 µmol KCl, 40 единици от

РНК азен инхибитор (RNASLN) и 5 единици от AMV обратна транскриптаза. Инкубацията се осъществява за 60 min при 37°C. След сДНК синтеза, реакцията се разрежда с 50 µl дейонизирана вода (DIW), вряла 10 min и охладена върху лед.

Амплифицирането на сегмент от HCV сДНК се осъществява с помощта на два синтетични олигомерни 16-мерни праймера, чиито последователности са получени от HCV сДНК клонове 36 (антисенс) и 37 b (сенс). Последователността на праймера от клон 36 е:

5' GCA TGT CAT GAT GTA T3'

Последователността на праймера от клон 37b е:

5' ACA ATA CGT GTG TCA C 3'.

Праймерите са използвани при крайна концентрация от по 1 µmol всеки. За амплифициране на сегмента от KCV сДНК, който е обграден от праймерите, сДНК пробите се инкубират с 0.1 µg РНКаза А и PCR реактанти от Perkin Elmer Cetus PCR kum (N801-0043 или N801-0055) съгласно инструкциите на производителя. PCR реакцията се осъществява или за 30, или за 60 цикъла в Perkin Elmer Cetus ДНК термален циклизатор. Всеки цикъл се състои от едноминутен денатуриращ етап при 94°C, етап на ренатуриране с продължителност от 2 min при 37°C и етап на удължаване от 3 min при 72°C. Обаче, етап на удължаване в крайния цикъл (30 или 60) е 7 вместо 3 min. След амплифицирането, пробите се екстрахират с еднакъв обем от фенолхороформ (1:), последвано от екстракция с еднакъв обем от хлороформ и след това пробите се преципитират с етанол, съдържащ 0.2 M натриев ацетат.

PCR продуктите се анализират, както следва:

Продуктите се подлагат на електрофореза върху 1.8% алкално-агарозен гел съгласно Mura-kawa et al. (1988), и се прехвърлят върху хартия ZETA® (BioRad Corp.) чрез осветяващи гелове за през нощта в 0.4 M NaOH. Петната се неутрализират в 2 x SSC (1 x SSC съдържа 0.15 M NaCl, 15 mM натриево фосфатен буфер, pH 6.8, 15 mM EDTA, 1.0% SDS, 0.5% обезмаслено мляко (Carnation Co.), и 0.5 mg/ml денатурирана с ултразвук ДНК от сперма на пъстърва. Петната, подлежащи на анализ за HCV сДНК фрагменти, се хибридизират с 32p - белязана проба, генерирана чрез pick-транслация на HIV сДНК инсерционна последователност в клон 35, описана в US

07/456,637. След хибридизиране, петната се промиват в 0.1 x SSC (1 x SSC съдържа 0.15 M NaCl, 0.01 + Na-цитрат) при 65°C, изсушават се и се автордиографираат. Очакваният размер на продукта е 586 нуклеотида дължина, продуктите, които се хибридизират с пробата и мигрират в гелове в този размер се счита за позитивни за вирусна РНК.

Като контрола се използват сPCR праймерите, предназначени за амплифициране на α-анти-трипсинова mРНК с оглед доказване присъствието на РНК във всяка анализирана проба. Кодиращата област от α-1-анти-трипсиновия ген е описана в Rosenberg et al. (1984). Получени са синтетични олигомерни 16-мерни праймери, създадени за амплифициране на 365 нуклеотиден фрагмент от кодиращата област на α-1-анти-трипсиновия ген от нуклеотиди 22-27 (сенс) и 372-387 (антисенс). PCR продуктите се откриват с помощта на ³²P pick-транслационна проба, която лежи между и не включва сДНК/PCR праймерните последователности.

Благодарение на изключителната чувствителност на PCR реакцията, всички проби се обработват минимум три пъти. Всички лъжливи позитивни сигнали се отстраняват, като се вземат предвид следните предпазни мерки: 1) отстраняване на аерозоли с помощта на епруветки със завинтващи се запушалки с ръбесто 0-пръстенно запечатване; 2) пипетиране с Ranin MICROMAN® позитивни гутатори с разместване бутило/капилляри; и 3) подбор на олигонуклеотидни последователности за сДНК и PCR праймери от два неприлежащи сДНК клона.

Индустриална приложимост

Имунореактивните състави от изобретението са приложими за получаване на материали, например ваксини, които на свой ред могат да бъдат използвани за лечение на отделни индивиди срещу HCV инфекции, по-специално хронични HCV инфекции. В допълнение, съставите могат да бъдат използвани за получаване на материали за откриване на множество варианти на HCV в биологични проби. Например, имунореактивни състави от настоящето изобретение могат да се прилагат за генериране на състави на поликлонални антитела, които разпознават повече от един HCV изолат, или като антиген в анти-HCV антитяло имунологични изследвания. Последният метод може да служи за скрининг на кръвни продукти за позитивна HCV контаминация. Поликлоналният антисерум или антитела могат да бъ-

дат използвани за позитивно имунизирание на отделен индивид.

Патентни претенции

1. Имунореактивен състав, характеризиращ се с това, че включва полипептиди, съдържащи аминокиселинна последователност от един епитоп в рамките на един първи вариабилен домен от вируса на хепатит С (HCV), и поне две хетерогенни аминокиселинни последователности от първия вариабилен домен на отделен HCV изолат.

2. Имунореактивен състав съгласно претенция 1, включващ множество антигенни комплекси, характеризиращ се с това, че а) всеки антигенен комплекс се състои от множество по същество идентични полипептиди, включващи аминокиселинната последователност от един епитоп в рамките на първия вариабилен домен от един HCV изолат, и (b) аминокиселинната последователност от епитопа на един комплекс е хетерогенна по отношение на аминокиселинната последователност на аналогната последователност на поне един друг комплекс.

3. Имунореактивен състав съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че първата хетерогенна аминокиселинна последователност е от един HCV група I изолат, а втората хетерогенна аминокиселина е от HCV група II изолат.

4. Имунореактивен състав съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че вариабилният домен е в рамките на E2/NS1 протеина.

5. Имунореактивен състав съгласно претенция 4, характеризиращ се с това, че вариабилният домен е кодиран от аминокиселина 384 до аминокиселина 411 от HCV полипротеина.

6. Имунореактивен състав съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че вариабилният домен е в рамките на E1 протеина.

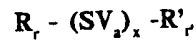
7. Имунореактивен състав съгласно претенция 6, характеризиращ се с това, че вариабилният домен е кодиран от аминокиселина 225 до аминокиселина 260 от HCV полипротеина.

8. Имунореактивен състав съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че полипептидите включват освен това аминокиселинна последователност от един епитоп в рамките на втори вариабилен домен от вируса на хепатит С (HCV), и поне две хетерогенни аминокиселинни последователности от втория вариабилен домен на отделни HCV изолати.

9. Имунореактивен състав съгласно претен-

ция 8, характеризиращ се с това, че първият вариабилен домен е в рамките на E2/NS1 протеин и вторият вариабилен домен е в рамките на E1 протеина.

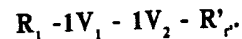
5 10. Имунореактивен състав, включващ множество полипептиди, съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че всеки полипептид е с формулата



10 в която R и R' са аминокиселинни последователности от около 1-2000 аминокиселини, и са еднакви при различни; r и r' са 0 или 1, и са еднакви или различни; V е аминокиселинна последователност, включваща последователността от един HCV вариабилен домен, където вариабилният домен съдържа поне един епитоп; S е цяло число ≥ 1 , представляващо подбрания вариабилен домен, и p е цяло число ≥ 1 , представляващо подбраният HCV изолат хетерогенен при даден S+ по отношение на поне един друг изолат с различна степен за p, и p е независимо подбран за всяко x;

25 x е цяло число ≥ 1 ; и при условие, че аминокиселинните последователности са представени в състава, представляващ комбинация, подбрана от групата, състояща се от (i) $1V_1$ и $2V_1$, (ii) $1V_1$ и $2V_2$, и (iii) $1V_1$ и $2V_1$.

30 11. Имунореактивен състав съгласно претенция 10, характеризиращ се с това, че полипептидът е с формула



35 12. Имунореактивен състав съгласно претенция 10, характеризиращ се с това, че полипептидният състав включва смес от полипептиди с формули



40 13. Метод за получаване на имуногенен състав за лечение на HCV, характеризиращ се с това, че се осигурява имуногенен състав съгласно претенция 1; осигурява се подходящ пълнител и се смесва имуногенният състав от етап I с пълнителя от етап II.

45 14. Метод за получаване на анти-HCV антители, характеризиращ се с това, че се въвежда у бозайници ефективно количество имунореактивен състав съгласно претенция 1.

50 15. Състав на поликлонално антитяло, създаден съгласно претенция 14.

16. Метод за откриване на антитела срещу HCV в рамките на биологична проба, характеризира се с това, че а) се осигурява биологична проба, за която се счита, че съдържа антитела срещу множество щамове на HCV;

б) осигурява се имунореактивен състав съгласно претенция 1;

в) биологичната проба от (а) реагира с имунореактивния състав от (б) при условия, които позволяват образуването на антиген-антитяло комплекси;

и

д) открива се образуването на комплекси между антигена от (а) и антителата от биологичната проба от (б) при наличие на такива.

17. Комплект за откриване на антитела срещу множество щамове на HCV в рамките на биологична проба, съдържащ имунореактивен състав съгласно претенция 1, включен в подходящ контейнер.

18. ДНК молекула, кодираща полипептид, съдържащ две хетерогенни аминокиселинни последователности от същия вариабилен домен от чисти HCV изолати.

5 19. Клетка-гостоприемник, съдържаща ДНК молекулата от претенция 18.

10 20. Клетка-гостоприемник съгласно претенция 19, характеризираща се с това, че ДНК молекулата съдържа контролни последователности, способни да предизвикат експресия на полипептида.

15 21. Метод за получаване на рекомбинантен протеин, включващ култивиране на популация от клетки-гостоприемници от претенция 20 при условия, обезпечаващи експресията на полипептида.

20

Приложение: 9 фигури

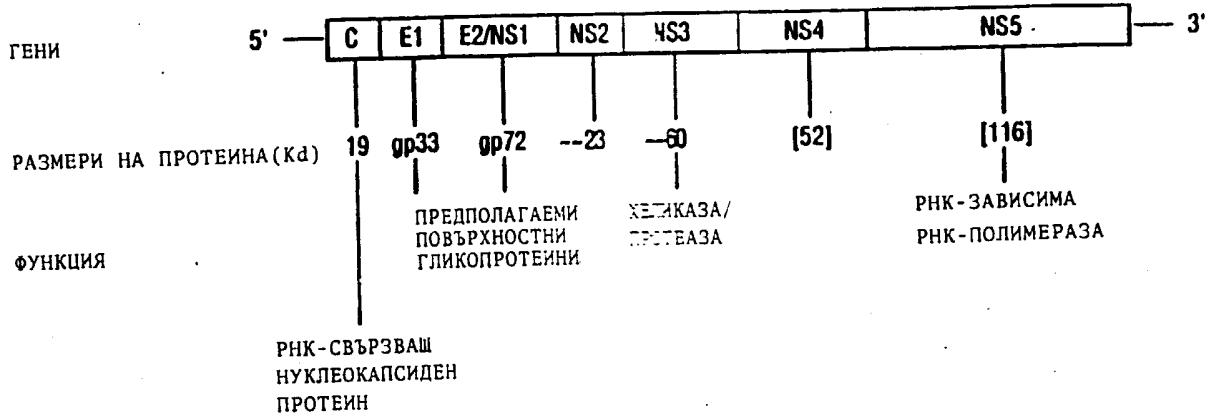
Издание на Патентното ведомство на Република България
1113 София, бул. "Д-р Г. М. Димитров" 52-Б

Експерт: Д.Кацарова

Редактор: Е.Синкова

Пор. № 40427

Тираж: 40 МВ



Фиг. 1

HCV-1	192	YQVFNSTGLYHVTNDCPNSSIVYEADAAILHTPGCVPC
HCT18		H-----A-----
Th		-----A-----
HCT23		-----S-I-----T-T-S-----
HCT27		-----H-----
HC-J1		* * * * *
		-E-VS-I-----S-----M-M-----
HC-J4		-E-VS-I-----S-----M-M-----
HCV-J		-E-VS-I-----S-----V-M-A-----
HCV J1		-E-H-VS-I-----S-A-----L-M-----
BK		
HCV-1	230	VREGNASRCWVAMPTVATRDGKLPATQLRRHIDLLVGSATLCSALYVGDLCGSVFLVGO
HCT18		-H-V-----V-----A-R-----I-----
Th		---D-V-----V-----K-----I-----
HCT23		---K---PVA-----N-----I-----
HCT27		---V-----I-----
HC-J1		* * * * * * * * * *
		---D-S-----L---L-A-NASV-T-TI---V---A-AF---M-----S-----
HC-J4		---S-P-----L---L-A-NSSI-T-TI---V---A-A---M-----S-----
HCV-J		---N-S-----L---L-A-NASV-T-TI---V---T-AF---M-----IS-----
HCV J1		---S-----L---L-A-NVTI-T-TI---V---A-AF---M-----S-----
BK		
HCV-1	290	LFTFSPRRHWTTQGCNCSIYPGHITGHRMAMMMNWSPTTALVMAQLLRIPQAILDMIA
HCT18		-----A-----M-----
Th		-----V-----
HCT23		-----D-----A---V-----
HCT27		-----D-----A-----
HC-J1		-----A-----
		* * * * * * * * * *
		---E-V-D-----LS-----VS-----VV-V-----
HC-J4		---YE-V-D-----VS-----VS-----VV-V-----
HCV-J		---E-V-D-----VS-----A---VS-----VM-V-----
HCV J1		---V-L-D-----VS-----VS-----VV-V-----
BK		

Фиг. 2-1

HCV-1	350	GAHWGVLGAIAYFSMVGWNAKVLVLLLFAGVDA
HCT18	
Th	
HCT23	M.....
HCT27	
HC-J1	
		* * * * *
HC-J4	L-Y.....I-A.....G
HCV-J	L-Y.....I-M.....G
HCV J1	L-Y.....I-M.....G
BK	L-Y-A.....I-M.....G

Фиг. 2-2

Сравнителна аминокиселинна последователност E2/NS1 регион на HCV изолати от предполагаемия

HCV-1	370	KVLVLLLFAGVDAETHVTGGSAGHTVSGFVSLLPAGAKQNVQLINTNGSMHLNSTALNC
HCT27	T-YT---N-AR-TQALT-PFS---DI-----I-R-----
HCVE1		..L.....YT---TAR-TQ-L---FSR---DI-----I-R-----
H77	R-TA-L-G-T-----I-----I-----
H90	RS-L-IA-F-TR-P---I---K-----I-----
Th	T-----A-GAL-IA--FNQ--R---I-----I-----
HC-J1	I-S-Q-ARAM-L---FT-----I-----I-----
HC-J4		..I-A-----G-YTS-A-S-T-TLA-FS---S-RI-V-----I-R-----
HCV-J		..I-M-----GH-----RVASSTQSL-W-SQ-PS-KI-V-----I-R-----
JH-1		..I-M-----GH-R-----VQ-VT-TLT-FR---S-KI-V-----I-R-----
BK		..I-M-----GD-----AQAK-TNRL-MF-S-PS-KI-----I-R-----
HCV-1	430	NDSLNTGWLGLFYHHKFNSSGCPERLASCRPLTDFDQGWGPISYANGSGPDQRPYCWHY
HCT27		-G-D-V---Y-----M-----A-Q-----EH-----
HCVE1		-E-D-V---Y-----M-----A-----T-EH-----
H77		-E-----R---A-----L-E-----
H90		..A-I-----G-----R-----E-----
Th	****	..h-I---Y-----R-----H-----
HC-J1		-E-----I-Q-----R-----H-----
HC-J4		..H-F-A---T-R-----M-----IDW-A---T-TEPDS---
HCV-J		..Q-FI-A---A-R---A---M-----IDE-A---THDMPES---
JH-1		..Q-F-A---T---A---M-----SIDK-----T-QPDNS---
BK		..Q-F-A---T-S-----M-Q-TIDK-----T-ES-RS---
HCV-1	490	PPKPCGIVPAKSVCGPVYCFPTSPVVVGTDRSGAPTYSWGENDTDFVFLNTRPPLGNW
HCT27	QN-----NKL-----N-S-E-----
HCVE1	QT-----NKL-----N-C-----
H77		..R-----A-----
H90		..R-----N-----LI-----
Th	N-A-----
HC-J1	
HC-J4		A-R-----SQ-----
HCV-J		A-R-----SQ-----F-----E-LL-S---Q---
JH-1		A-RQ-----SQ-----F-----N-D-E-LL---H---
BK		..PQ-T---SE-----F-V---R---E-LL---Q---

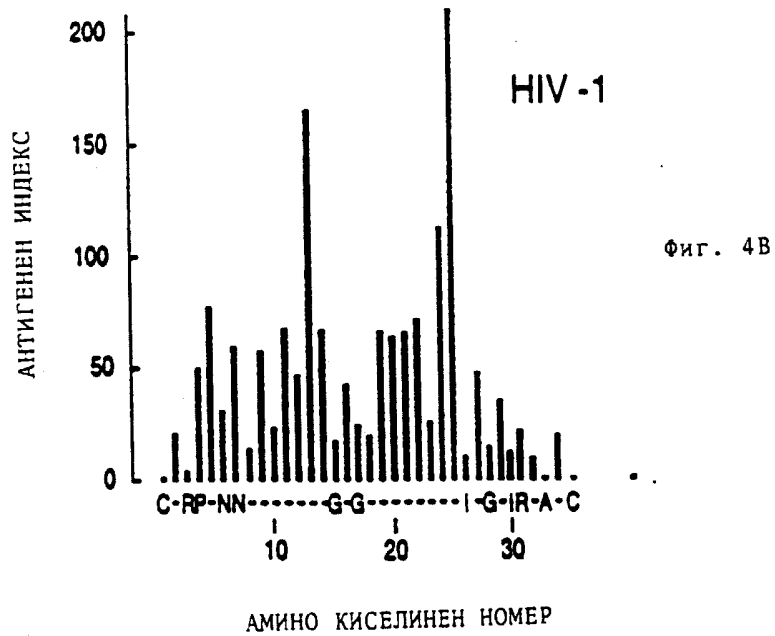
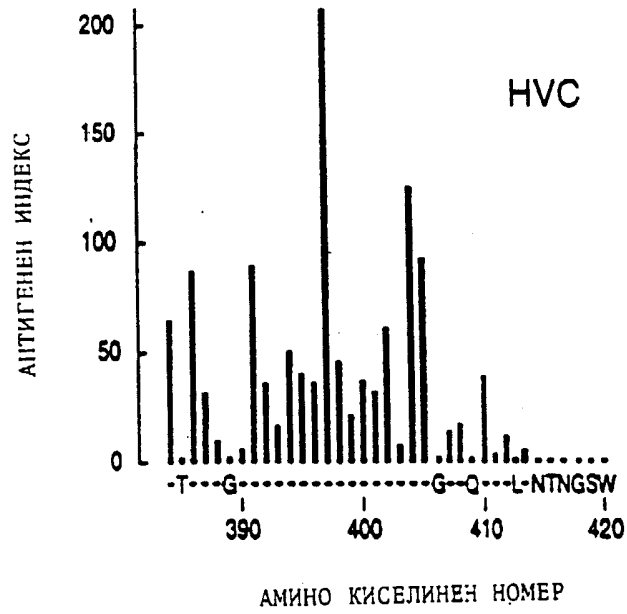
Фиг. 3-1

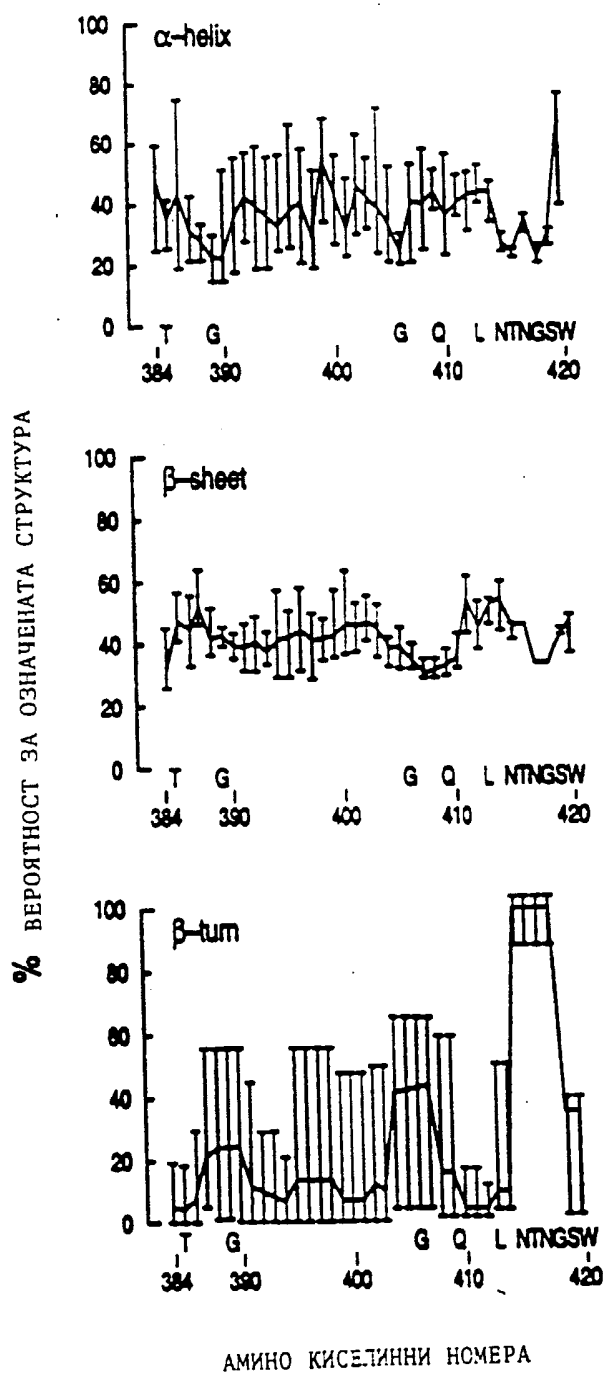
HCV-1	550	FGCTWMNSTGFTKVCGAPPCVIGGAGNNTLHCPTDCFRKHPDATYSRCGSGPWITPRCLV
HCT27	S.....V.....Q.....AA.....
HCVE1	V-S.....Y.....E.....M-
H77	V.....L.....E.....M-
H90	V.....R.....E.....M-
Th	V.....
HC-J1	T-G-N-V-V.....E-TK-L-M-
HC-J4	T-G-N-V-T.....E-TK-L-M-
HCV-J	T-G-N-V-T.....E-TK-L-M-
JH-1	T-G-N-V-T.....E-TK-L-M-
BK	T-G-N-V-T.....E-TK-L-M-
HCV-1	610	DYPYRLWHYPCTINYTIFKIRMYVGGVHRLEAACNWRGERCDLEDRDRSELSPLLLTT
HCT27		H.....V-VQ.....D-V.....D.....RL-S-
HCVE1		G.....V-L-V.....QV.....N-D.....S-
H77	V.....I.....S-
H90		H.....V.....I.....S-
Th		N.....V.....
HC-J1	V-F-V-V.....N.....S-
HC-J4	V-F-V.....
HCV-J	V-F-V.....N.....P.....S-
JH-1	V-F-V.....N.....P.....S-
BK	V-F-V.....N.....P.....S-

Фиг. 3-2

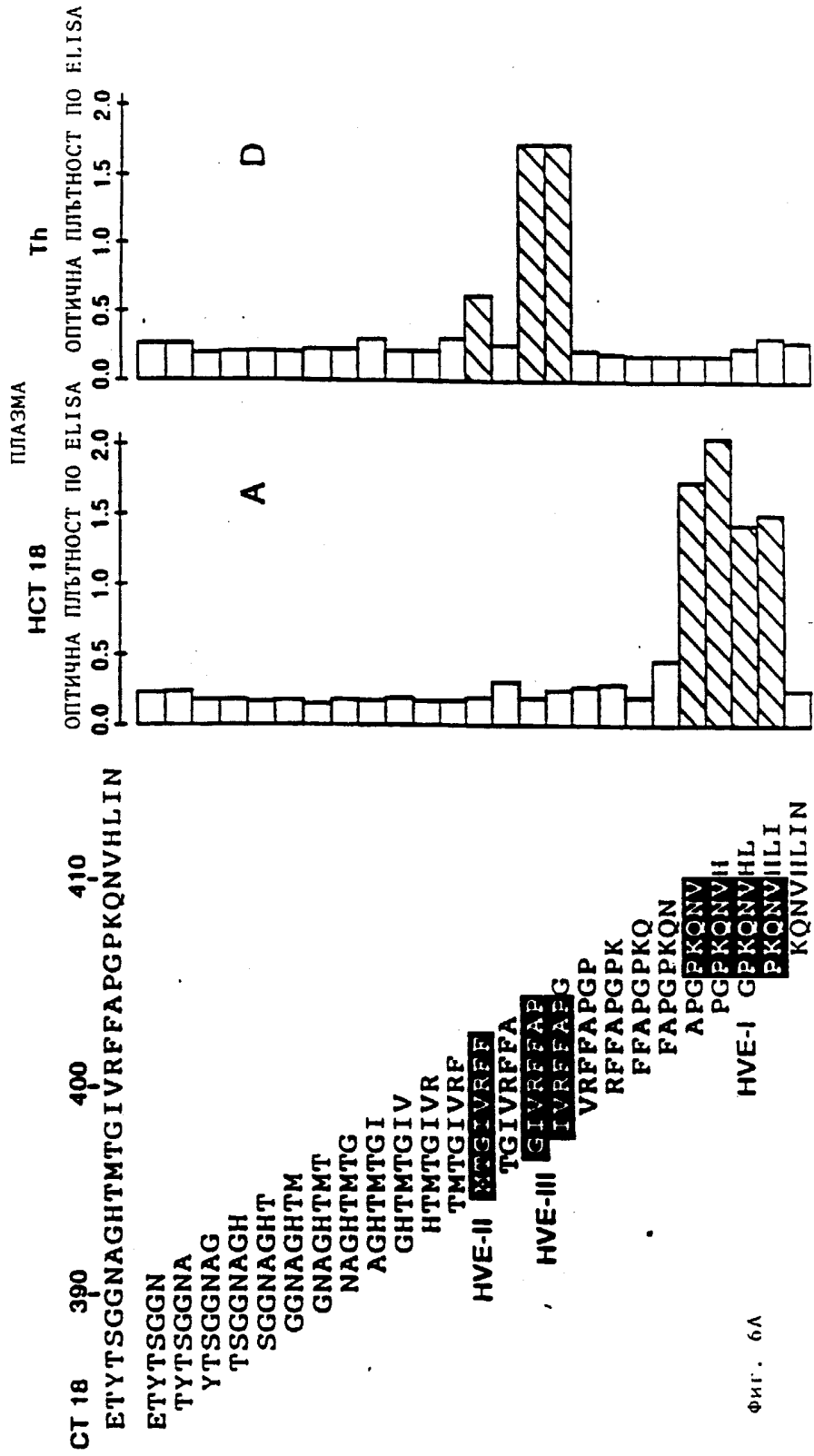
HCV-1	670	TQWQVLPCSFTTLPALSTGLIHHCNIQVVDVQYLYGVGSSIASWAIKWEYVLLFLLLADA
HCT27	T.....V.....I.....N-
HCVE1	T.....V.....I.....
H77	T.....
H90	T.....
Th	T.....
HC-J1	E-I.....R.....I-AVV-F.....IL.....
HC-J4	E.....I-AVV-F.....L.....
HCV-J	E.....I-AVV-F.....L.....
JH-1	E.....I-AVV-F.....L.....
BK	E.....I-AVV-F.....L.....
HCV-1	730	RVCSCLMMLLLISQAEAALENLVILNAASLAGTHGLVSLVFFCFAWYKLGKWPVAVYT
HCT27		-I.....L.....A-AVA.....R.....A-A
HCVE1	
H77	A.....
H90	A.....
Th	A.....
HC-J1	A.....A.....T.....V.....V-A-L.....A-I-RL.....A-A
HC-J4	A.....A.....V-S-V-A-IL.....A-I-RL.....T-A
HCV-J	A.....A.....V-S-V-A-IL.....A-I-RL.....T-A
JH-1	A.....A.....V-S-V-A-IL.....A-I-RL.....T-A
BK	A.....A.....V-S-V-A-IL.....A-I-RL.....T-A
HCV-1	790	PYGMPLLLLLLALPQRAYALDTEVAASC GG VVLVGLMALTLSPYYKRYISWCLWNLQYF
HCT27	M
Th	M
HC-J1		L-V.....P-M-R-M.....A-F-VL.....VFLARLI.....
HC-J4		L-V.....P-M-R-M.....A-F-VL.....VFLARLI.....
HCV-J		L-V.....P-M-R-M.....A-F-VL.....VFLARLI.....
JH-1		L-V.....P-M-R-M.....A-F-VL.....VFLARLI.....
BK		L-V.....P-M-R-M.....A-F-VL.....VFLARLI.....

Фиг. 3-3

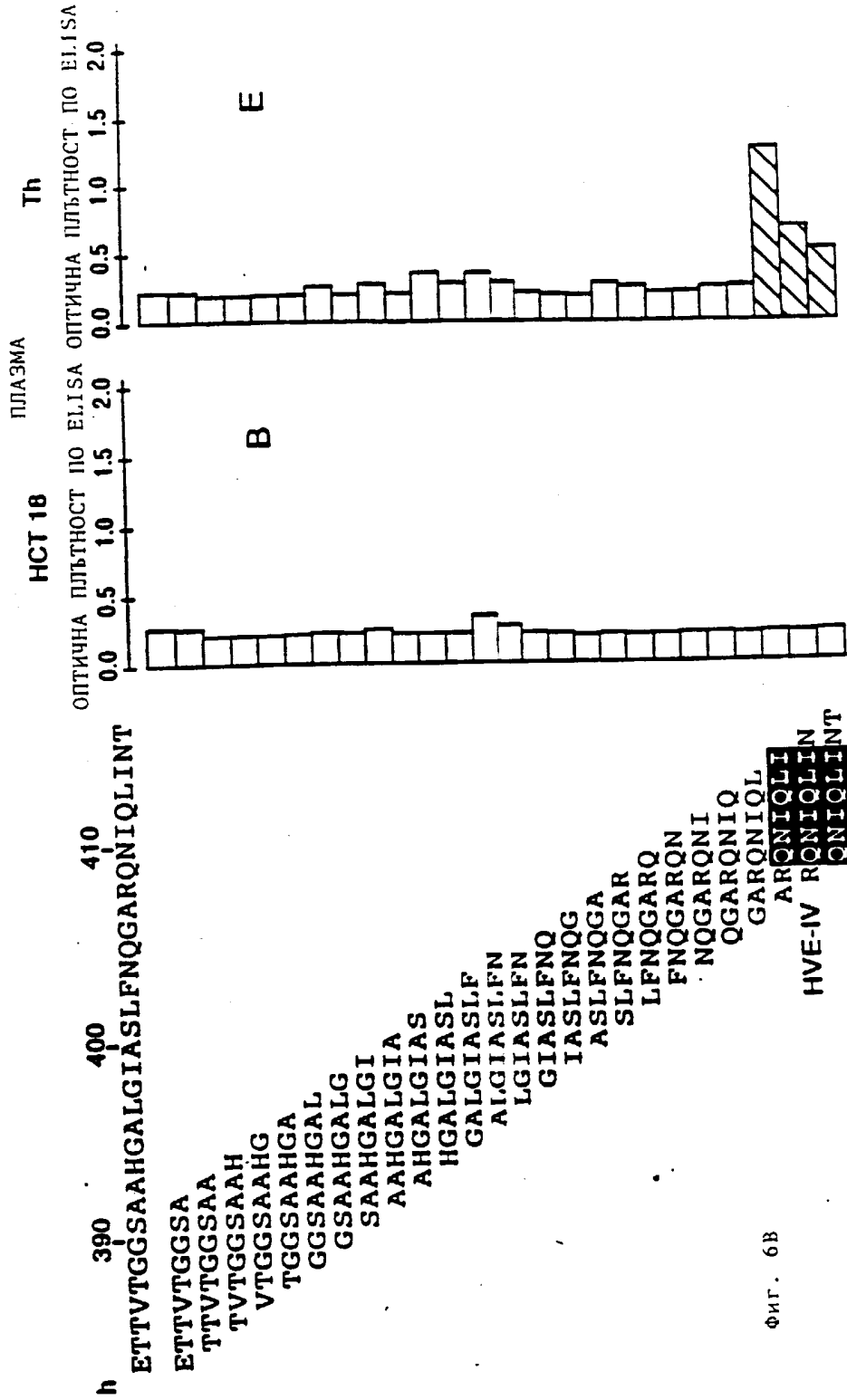




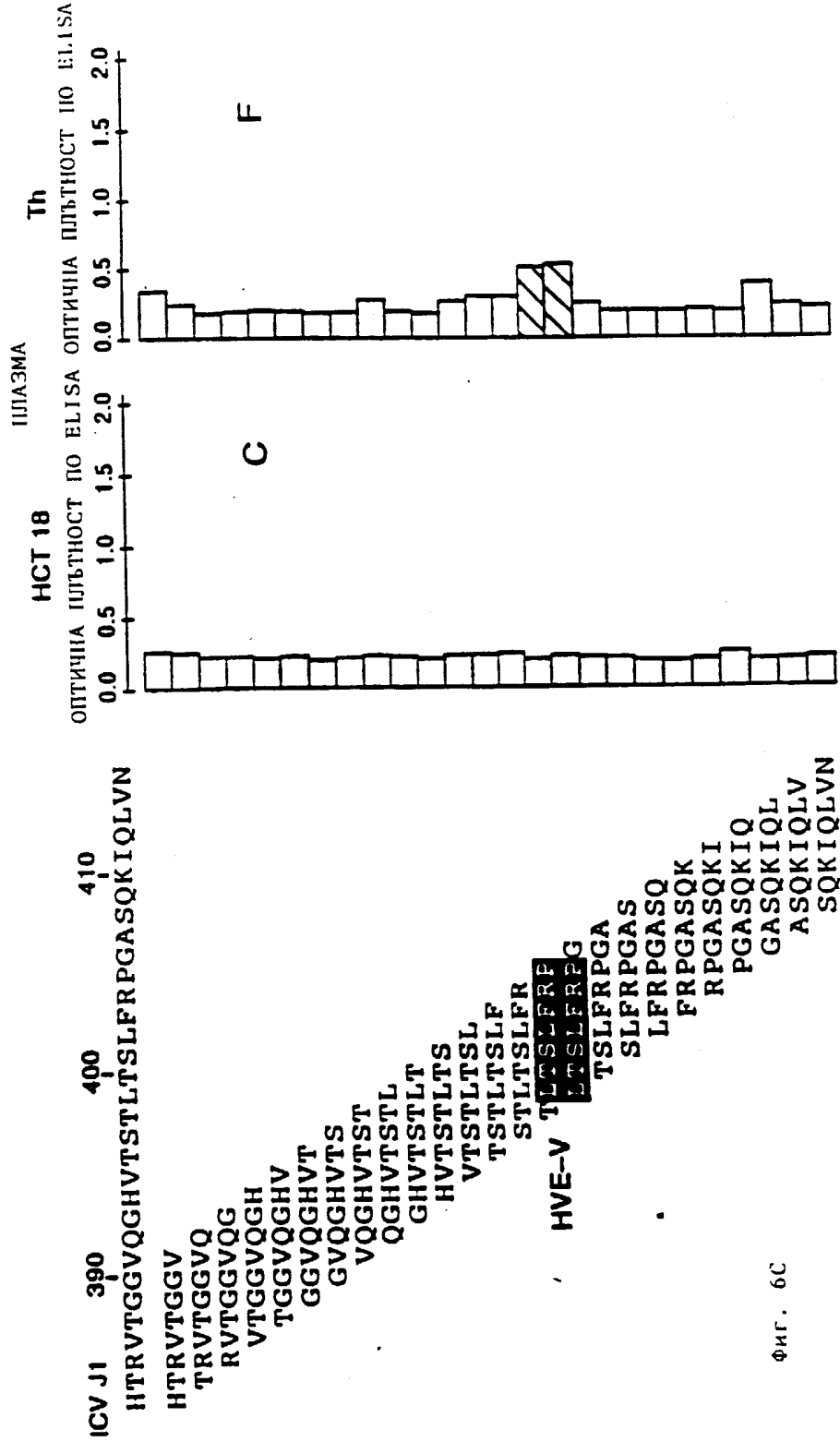
Фиг. 5



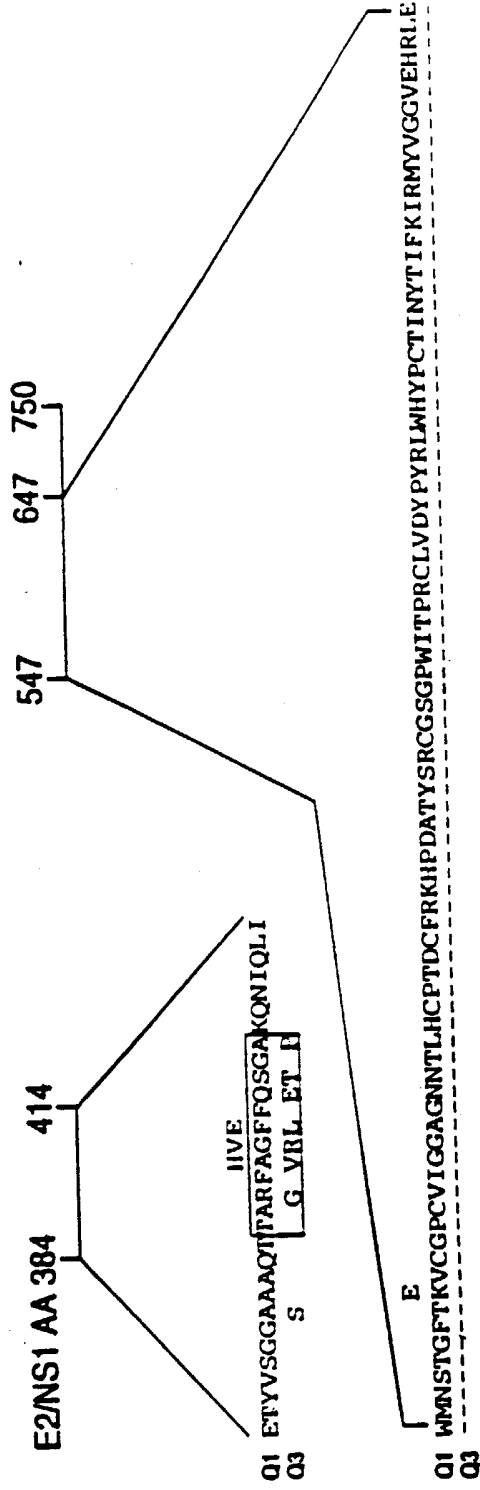
Фиг. 6А



Фиг. 6B



Фиг. 6C



Фиг. 7

E2 HV

			M				
HCV J1.1	384	HTRVTGGVQGHVSTLTSLFRPGASQKIQLVNTNGSWHINRTALNCNDSLQTFGLAALFY					
HCV J1.2		N-H-----GAFG-----Q-----K-----					
		R A					
			VG	R'			
HCV J1.1	444	THKFNASGCPERMASCRSIDKFDQGWGPITYAQPDNSDQRPYCWYAPRQCGIVPASQVC					
HCV J1.2		--R-----T-----					
			F V				
HCV J1.1	504	GPVYCFTPSPVVVGTDRSGAPTYNWGDNETDVLLLNNTRPPHGNWFGCTWMNSTGFTKT					
HCV J1.2		-----					
			A	I	R	E	R
HCV J1.1	564	CGGPPCNIGGVGNNTLTCPTDCFRKHPDATYTKCGSGPWLTPRCLVDYPYRLWHYPCTVN					
HCV J1.2		-----					
			K	E			
HCV J1.1	624	FTIFKVRMYVGGVEHRLDAACNWRGER 651					
HCV J1.2		-----					

Фиг. 8-1

E2 HV

HCT27	384	TTYTTGGNAARTTQALTSFFSPGAKQDIQLINTNGSWHINRTALNCNGLDGTGWVAGLFY	
HCVB1		E-----ST-----G-V-L-R-----E-----	
HCT27	444	YHKFNSSGCPERMASCRPLADFQGWGPISYANGSGPEHRPYCWYPPKPCGIVPAQNV	
HCVB1		-----D-----T-----T-----	
HCT27	504	GPVYCFTPSPVVVGTINKLGAPTYNWGSNETDVFLNNTRPPLGNWFGCTWMNSSGFTKV	
HCVB1		-----C-D-----V-----	
HCT27	564	CGAPPCVIGGVGNNTLQCPDCFRKHPDATYSRCAAGPWITPRCLVHYPYRLWHYPCTVN	
HCVB1		-----A-----Y-----E-----GS-----G-----	
HCT27	624	YTIVQIRMYVGGVDHRLEVACNWRGERCDLDRSELRLLLLSTTQWQVLPCSFTTLP	
HCVB1		--LPKV-----E--Q-----N-----SP-----	
HCT27	684	ALTTGLIHLHQNIVDVQYLYGVGSSIVSWAIKWEYVILLFLLANARICSLW	
HCVB1		-----D--V-----	

Фиг. 8-2

Met Ser Thr Asn Pro Lys Pro Gln Lys Lys Asn Lys Arg Asn Thr Asn
 1 5 10 15
 Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly
 20 25 30
 Gly Val Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Leu Gly Val Arg Ala
 35 40 45
 Thr Arg Lys Thr Ser Glu Arg Ser Gln Pro Arg Gly Arg Arg Gln Pro
 50 55 60
 Ile Pro Lys Ala Arg Arg Pro Glu Gly Arg Thr Trp Ala Gln Pro Gly
 65 70 75 80
 Tyr Pro Trp Pro Leu Tyr Gly Asn Glu Gly Cys Gly Trp Ala Gly Trp
 85 90 95
 Leu Leu Ser Pro Arg Gly Ser Arg Pro Ser Trp Gly Pro Thr Asp Pro
 100 105 110
 Arg Arg Arg Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Ile Asp Thr Leu Thr Cys
 115 120 125
 Gly Phe Ala Asp Leu Met Gly Tyr Ile Pro Leu Val Gly Ala Pro Leu
 130 135 140
 Gly Gly Ala Ala Arg Ala Leu Ala His Gly Val Arg Val Leu Glu Asp
 145 150 155 160
 Gly Val Asn Tyr Ala Thr Gly Asn Leu Pro Gly Cys Ser Phe Ser Ile
 165 170 175

Фиг. 9-1

Phe Leu Leu Ala Leu Leu Ser Cys Leu Thr Val Pro Ala Ser Ala Tyr
 180 185 190
 Gln Val Arg Asn Ser Thr Gly Leu Tyr His Val Thr Asn Asp Cys Pro
 195 200 205
 Asn Ser Ser Ile Val Tyr Glu Ala Ala Asp Ala Ile Leu His Thr Pro
 210 215 220
 Gly Cys Val Pro Cys Val Arg Glu Gly Asn Ala Ser Arg Cys Trp Val
 225 230 235 240
 Ala Met Thr Pro Thr Val Ala Thr Arg Asp Gly Lys Leu Pro Ala Thr
 245 250 255
 Gln Leu Arg Arg His Ile Asp Leu Leu Val Gly Ser Ala Thr Leu Cys
 260 265 270
 Ser Ala Leu Tyr Val Gly Asp Leu Cys Gly Ser Val Phe Leu Val Gly
 275 280 285
 Gln Leu Phe Thr Phe Ser Pro Arg Arg His Trp Thr Thr Gln Gly Cys
 290 295 300
 Asn Cys Ser Ile Tyr Pro Gly His Ile Thr Gly His Arg Met Ala Trp
 305 310 315 320
 Asp Met Met Met Asn Trp Ser Pro Thr Thr Ala Leu Val Met Ala Gln
 325 330 335
 Leu Leu Arg Ile Pro Gln Ala Ile Leu Asp Met Ile Ala Gly Ala His
 340 345 350

Фиг. 9-2

62973

Trp Gly Val Leu Ala Gly Ile Ala Tyr Phe Ser Met Val Gly Asn Trp
355 360 365

Ala Lys Val Leu Val Val Leu Leu Phe Ala Gly Val Asp Ala Glu
370 375 380

Thr His Val Thr Gly Gly Ser Ala Gly His Thr Val Ser Gly Phe Val
385 390 395 400

Ser Leu Leu Ala Pro Gly Ala Lys Gln Asn Val Gln Leu Ile Asn Thr
405 410 415

Asn Gly Ser Trp His Leu Asn Ser Thr Ala Leu Asn Cys Asn Asp Ser
420 425 430

Leu Asn Thr Gly Trp Leu Ala Gly Leu Phe Tyr His His Lys Phe Asn
435 440 445

Ser Ser Gly Cys Pro Glu Arg Leu Ala Ser Cys Arg Pro Leu Thr Asp
450 455 460

Phe Asp Gln Gly Trp Gly Pro Ile Ser Tyr Ala Asn Gly Ser Gly Pro
465 470 475 480

Asp Gln Arg Pro Tyr Cys Trp His Tyr Pro Pro Lys Pro Cys Gly Ile
485 490 495

Val Pro Ala Lys Ser Val Cys Gly Pro Val Tyr Cys Phe Thr Pro Ser
500 505 510

Pro Val Val Val Gly Thr Thr Asp Arg Ser Gly Ala Pro Thr Tyr Ser
515 520 525

Фиг. 9-3

Trp Gly Glu Asn Asp Thr Asp Val Phe Val Leu Asn Asn Thr Arg Pro
530 535 540

Pro Leu Gly Asn Trp Phe Gly Cys Thr Trp Met Asn Ser Thr Gly Phe
545 550 555 560

Thr Lys Val Cys Gly Ala Pro Pro Cys Val Ile Gly Gly Ala Gly Asn
565 570 575

Asn Thr Leu His Cys Pro Thr Asp Cys Phe Arg Lys His Pro Asp Ala
580 585 590

Thr Tyr Ser Arg Cys Gly Ser Gly Pro Trp Ile Thr Pro Arg Cys Leu
595 600 605

Val Asp Tyr Pro Tyr Arg Leu Trp His Tyr Pro Cys Thr Ile Asn Tyr
610 615 620

Thr Ile Phe Lys Ile Arg Met Tyr Val Gly Gly Val Glu His Arg Leu
625 630 635 640

Glu Ala Ala Cys Asn Trp Thr Arg Gly Glu Arg Cys Asp Leu Glu Asp
645 650 655

Arg Asp Arg Ser Glu Leu Ser Pro Leu Leu Thr Thr Thr Gln Trp
660 665 670

Gln Val Leu Pro Cys Ser Phe Thr Thr Leu Pro Ala Leu Ser Thr Gly
675 680 685

Leu Ile His Leu His Gln Asn Ile Val Asp Val Gln Tyr Leu Tyr Gly
690 695 700

Фиг. 9-4

Val Gly Ser Ser Ile Ala Ser Trp Ala Ile Lys Trp Glu Tyr Val Val
 705 710 715 720
 Leu Leu Phe Leu Leu Leu Ala Asp Ala Arg Val Cys Ser Cys Leu Trp
 725 730 735
 Met Met Leu Leu Ile Ser Gln Ala Glu Ala Ala Leu Glu Asn Leu Val
 740 745 750
 Ile Leu Asn Ala Ala Ser Leu Ala Gly Thr His Gly Leu Val Ser Phe
 755 760 765
 Leu Val Phe Phe Cys Phe Ala Trp Tyr Leu Lys Gly Lys Trp Val Pro
 770 775 780
 Gly Ala Val Tyr Thr Phe Tyr Gly Met Trp Pro Leu Leu Leu Leu Leu
 785 790 795 800
 Leu Ala Leu Pro Gln Arg Ala Tyr Ala Leu Asp Thr Glu Val Ala Ala
 805 810 815
 Ser Cys Gly Gly Val Val Leu Val Gly Leu Met Ala Leu Thr Leu Ser
 820 825 830
 Pro Tyr Tyr Lys Arg Tyr Ile Ser Trp Cys Leu Trp Trp Leu Gln Tyr
 835 840 845
 Phe Leu Thr Arg Val Glu Ala Gln Leu His Val Trp Ile Pro Pro Leu
 850 855 860
 Asn Val Arg Gly Gly Arg Asp Ala Val Ile Leu Leu Met Cys Ala Val
 865 870 875 880

Фиг. 9-5

His Pro Thr Leu Val Phe Asp Ile Thr Lys Leu Leu Leu Ala Val Phe
 885 890 895
 Gly Pro Leu Trp Ile Leu Gln Ala Ser Leu Leu Lys Val Pro Tyr Phe
 900 905 910
 Val Arg Val Gln Gly Leu Leu Arg Phe Cys Ala Leu Ala Arg Lys Met
 915 920 925
 Ile Gly Gly His Tyr Val Gln Met Val Ile Ile Lys Leu Gly Ala Leu
 930 935 940
 Thr Gly Thr Tyr Val Tyr Asn His Leu Thr Pro Leu Arg Asp Trp Ala
 945 950 955 960
 His Asn Gly Leu Arg Asp Leu Ala Val Ala Val Glu Pro Val Val Phe
 965 970 975
 Ser Gln Met Glu Thr Lys Leu Ile Thr Trp Gly Ala Asp Thr Ala Ala
 980 985 990
 Cys Gly Asp Ile Ile Asn Gly Leu Pro Val Ser Ala Arg Arg Gly Arg
 995 1000 1005
 Glu Ile Leu Leu Gly Pro Ala Asp Gly Met Val Ser Lys Gly Trp Arg
 1010 1015 1020
 Leu Leu Ala Pro Ile Thr Ala Tyr Ala Gln Gln Thr Arg Gly Leu Leu
 1025 1030 1035 1040
 Gly Cys Ile Ile Thr Ser Leu Thr Gly Arg Asp Lys Asn Gln Val Glu
 1045 1050 1055

Фиг. 9-6

Gly Glu Val Gln Ile Val Ser Thr Ala Ala Gln Thr Phe Leu Ala Thr
 1060 1065 1070
 Cys Ile Asn Gly Val Cys Trp Thr Val Tyr His Gly Ala Gly Thr Arg
 1075 1080 1085
 Thr Ile Ala Ser Pro Lys Gly Pro Val Ile Gln Met Tyr Thr Asn Val
 1090 1095 1100
 Asp Gln Asp Leu Val Gly Trp Pro Ala Pro Gln Gly Ser Arg Ser Leu
 1105 1110 1115 1120
 Thr Pro Cys Thr Cys Gly Ser Ser Asp Leu Tyr Leu Val Thr Arg His
 1125 1130 1135
 Ala Asp Val Ile Pro Val Arg Arg Arg Gly Asp Ser Arg Gly Ser Leu
 1140 1145 1150
 Leu Ser Pro Arg Pro Ile Ser Tyr Leu Lys Gly Ser Ser Gly Gly Pro
 1155 1160 1165
 Leu Leu Cys Pro Ala Gly His Ala Val Gly Ile Phe Arg Ala Ala Val
 1170 1175 1180
 Cys Thr Arg Gly Val Ala Lys Ala Val Asp Phe Ile Pro Val Glu Asn
 1185 1190 1195 1200
 Leu Glu Thr Thr Met Arg Ser Pro Val Phe Thr Asp Asn Ser Ser Pro
 1205 1210 1215
 Pro Val Val Pro Gln Ser Phe Gln Val Ala His Leu His Ala Pro Thr
 1220 1225 1230

Фиг. 9-7

Gly Ser Gly Lys Ser Thr Lys Val Pro Ala Ala Tyr Ala Ala Gln Gly
 1235 1240 1245
 Tyr Lys Val Leu Val Leu Asn Pro Ser Val Ala Ala Thr Leu Gly Phe
 1250 1255 1260
 Gly Ala Tyr Met Ser Lys Ala His Gly Ile Asp Pro Asn Ile Arg Thr
 1265 1270 1275 1280
 Gly Val Arg Thr Ile Thr Thr Gly Ser Pro Ile Thr Tyr Ser Thr Tyr
 1285 1290 1295
 Gly Lys Phe Leu Ala Asp Gly Gly Cys Ser Gly Gly Ala Tyr Asp Ile
 1300 1305 1310
 Ile Ile Cys Asp Glu Cys His Ser Thr Asp Ala Thr Ser Ile Leu Gly
 1315 1320 1325
 Ile Gly Thr Val Leu Asp Gln Ala Glu Thr Ala Gly Ala Arg Leu Val
 1330 1335 1340
 Val Leu Ala Thr Ala Thr Pro Pro Gly Ser Val Thr Val Pro His Pro
 1345 1350 1355 1360
 Asn Ile Glu Glu Val Ala Leu Ser Thr Thr Gly Glu Ile Pro Phe Tyr
 1365 1370 1375
 Gly Lys Ala Ile Pro Leu Glu Val Ile Lys Gly Gly Arg His Leu Ile
 1380 1385 1390
 Phe Cys His Ser Lys Lys Lys Cys Asp Glu Leu Ala Ala Lys Leu Val
 1395 1400 1405

Фиг. 9-8

Ala Leu Gly Ile Asn Ala Val Ala Tyr Tyr Arg Gly Leu Asp Val Ser
1410 1415 1420

Val Ile Pro Thr Ser Gly Asp Val Val Val Val Ala Thr Asp Ala Leu
1425 1430 1435 1440

Met Thr Gly Tyr Thr Gly Asp Phe Asp Ser Val Ile Asp Cys Asn Thr
1445 1450 1455

Cys Val Thr Gln Thr Val Asp Phe Ser Leu Asp Pro Thr Phe Thr Ile
1460 1465 1470

Glu Thr Ile Thr Leu Pro Gln Asp Ala Val Ser Arg Thr Gln Arg Arg
1475 1480 1485

Gly Arg Thr Gly Arg Gly Lys Pro Gly Ile Tyr Arg Phe Val Ala Pro
1490 1495 1500

Gly Glu Arg Pro Ser Gly Met Phe Asp Ser Ser Val Leu Cys Glu Cys
1505 1510 1515 1520

Tyr Asp Ala Gly Cys Ala Trp Tyr Glu Leu Thr Pro Ala Glu Thr Thr
1525 1530 1535

Val Arg Leu Arg Ala Tyr Met Asn Thr Pro Gly Leu Pro Val Cys Gln
1540 1545 1550

Asp His Leu Glu Phe Trp Glu Gly Val Phe Thr Gly Leu Thr His Ile
1555 1560 1565

Asp Ala His Phe Leu Ser Gln Thr Lys Gln Ser Gly Glu Asn Leu Pro
1570 1575 1580

Фиг. 9-9

Tyr Leu Val Ala Tyr Gln Ala Thr Val Cys Ala Arg Ala Gln Ala Pro
1585 1590 1595

Pro Pro Ser Trp Asp Gln Met Trp Lys Cys Leu Ile Arg Leu Lys Pro
1605 1610 1615

Thr Leu His Gly Pro Thr Pro Leu Leu Tyr Arg Leu Gly Ala Val Gln
1620 1625 1630

Asn Glu Ile Thr Leu Thr His Pro Val Thr Lys Tyr Ile Met Thr Cys
1635 1640 1645

Met Ser Ala Asp Leu Glu Val Val Thr Ser Thr Trp Val Leu Val Gly
1650 1655 1660

Gly Val Leu Ala Ala Leu Ala Ala Tyr Cys Leu Ser Thr Gly Cys Val
1665 1670 1675 1680

Val Ile Val Gly Arg Val Val Leu Ser Gly Lys Pro Ala Ile Ile Pro
1685 1690 1695

Asp Arg Glu Val Leu Tyr Arg Glu Phe Asp Glu Met Glu Glu Cys Ser
1700 1705 1710

Gln His Leu Pro Tyr Ile Glu Gln Gly Met Met Leu Ala Glu Gln Phe
1715 1720 1725

Lys Gln Lys Ala Leu Gly Leu Leu Gln Thr Ala Ser Arg Gln Ala Glu
1730 1735 1740

Val Ile Ala Pro Ala Val Gln Thr Asn Trp Gln Lys Leu Glu Thr Phe
1745 1750 1755 1760

Фиг. 9-10

Trp Ala Lys His Met Trp Asn Phe Ile Ser Gly Ile Gln Tyr Leu Ala
 1765 1770 1775
 Gly Leu Ser Thr Leu Pro Gly Asn Pro Ala Ile Ala Ser Leu Met Ala
 1780 1785 1790
 Phe Thr Ala Ala Val Thr Ser Pro Leu Thr Thr Ser Gln Thr Leu Leu
 1795 1800 1805
 Phe Asn Ile Leu Gly Gly Trp Val Ala Ala Gln Leu Ala Ala Pro Gly
 1810 1815 1820
 Ala Ala Thr Ala Phe Val Gly Ala Gly Leu Ala Gly Ala Ala Ile Gly
 1825 1830 1835 1840
 Ser Val Gly Leu Gly Lys Val Leu Ile Asp Ile Leu Ala Gly Tyr Gly
 1845 1850 1855
 Ala Gly Val Ala Gly Ala Leu Val Ala Phe Lys Ile Met Ser Gly Glu
 1860 1865 1870
 Val Pro Ser Thr Glu Asp Leu Val Asn Leu Leu Pro Ala Ile Leu Ser
 1875 1880 1885
 Pro Gly Ala Leu Val Val Gly Val Val Cys Ala Ala Ile Leu Arg Arg
 1890 1895 1900
 His Val Gly Pro Gly Glu Gly Ala Val Gln Trp Met Asn Arg Leu Ile
 1905 1910 1915 1920
 Ala Phe Ala Ser Arg Gly Asn His Val Ser Pro Thr His Tyr Val Pro
 1925 1930 1935

Фиг. 9-11

Glu Ser Asp Ala Ala Ala Arg Val Thr Ala Ile Leu Ser Ser Leu Thr
 1940 1945 1950
 Val Thr Gln Leu Leu Arg Arg Leu His Gln Trp Ile Ser Ser Glu Cys
 1955 1960 1965
 Thr Thr Pro Cys Ser Gly Ser Trp Leu Arg Asp Ile Trp Asp Trp Ile
 1970 1975 1980
 Cys Glu Val Leu Ser Asp Phe Lys Thr Trp Leu Lys Ala Lys Leu Met
 1985 1990 1995 2000
 Pro Gln Leu Pro Gly Ile Pro Phe Val Ser Cys Gln Arg Gly Tyr Lys
 2005 2010 2015
 Gly Val Trp Arg Val Asp Gly Ile Met His Thr Arg Cys His Cys Gly
 2020 2025 2030
 Ala Glu Ile Thr Gly His Val Lys Asn Gly Thr Met Arg Ile Val Gly
 2035 2040 2045
 Pro Arg Thr Cys Arg Asn Met Trp Ser Gly Thr Phe Pro Ile Asn Ala
 2050 2055 2060
 Tyr Thr Thr Gly Pro Cys Thr Pro Leu Pro Ala Pro Asn Tyr Thr Phe
 2065 2070 2075 2080
 Ala Leu Trp Arg Val Ser Ala Glu Glu Tyr Val Glu Ile Arg Gln Val
 2085 2090 2095
 Gly Asp Phe His Tyr Val Thr Gly Met Thr Thr Asp Asn Leu Lys Cys
 2100 2105 2110

Фиг. 9-12

62973

Pro Cys Gln Val Pro Ser Pro Glu Phe Phe Thr Glu Leu Asp Gly Val
2115 2120 2125
Arg Leu His Arg Phe Ala Pro Pro Cys Lys Pro Leu Leu Arg Glu Glu
2130 2135 2140
Val Ser Phe Arg Val Gly Leu His Glu Tyr Pro Val Gly Ser Gln Leu
2145 2150 2155 2160
Pro Cys Glu Pro Glu Pro Asp Val Ala Val Leu Thr Ser Met Leu Thr
2165 2170 2175
Asp Pro Ser His Ile Thr Ala Glu Ala Ala Gly Arg Arg Leu Ala Arg
2180 2185 2190
Gly Ser Pro Pro Ser Val Ala Ser Ser Ser Ala Ser Gln Leu Ser Ala
2195 2200 2205
Pro Ser Leu Lys Ala Thr Cys Thr Ala Asn His Asp Ser Pro Asp Ala
2210 2215 2220
Glu Leu Ile Glu Ala Asn Leu Leu Trp Arg Gln Glu Met Gly Gly Asn
2225 2230 2235
Ile Thr Arg Val Glu Ser Glu Asn Lys Val Val Ile Leu Asp Ser Phe
2245 2250 2255
Asp Pro Leu Val Ala Glu Glu Asp Glu Arg Glu Ile Ser Val Pro Ala
2260 2265 2270
Glu Ile Leu Arg Lys Ser Arg Arg Phe Ala Gln Ala Leu Pro Val Trp
2275 2280 2285

Фиг. 9-13

Ala Arg Pro Asp Tyr Asn Pro Pro Leu Val Glu Thr Trp Lys Lys Pro
2290 2295 2300
Asp Tyr Glu Pro Pro Val Val His Gly Cys Pro Leu Pro Pro Pro Lys
2305 2310 2315 2320
Ser Pro Pro Val Pro Pro Pro Arg Lys Lys Arg Thr Val Val Leu Thr
2325 2330 2335
Glu Ser Thr Leu Ser Thr Ala Leu Ala Glu Leu Ala Thr Arg Ser Phe
2340 2345 2350
Gly Ser Ser Ser Thr Ser Gly Ile Thr Gly Asp Asn Thr Thr Thr Ser
2355 2360
Ser Glu Pro Ala Pro Ser Gly Cys Pro Pro Asp Ser Asp Ala Glu Ser
2370 2375 2380
Tyr Ser Ser Met Pro Pro Leu Glu Gly Glu Pro Gly Asp Pro Asp Leu
2385 2390 2395 2400
Ser Asp Gly Ser Trp Ser Thr Val Ser Ser Glu Ala Asn Ala Glu Asp
2405 2410 2415
Val Val Cys Cys Ser Met Ser Tyr Ser Trp Thr Gly Ala Leu Val Thr
2420 2425 2430
Pro Cys Ala Ala Glu Glu Gln Lys Leu Pro Ile Asn Ala Leu Ser Asn
2435 2440 2445
Ser Leu Leu Arg His His Asn Leu Val Tyr Ser Thr Thr Ser Arg Ser
2450 2455 2460

Фиг. 9-14

Ala Cys Gln Arg Gln Lys Lys Val Thr Phe Asp Arg Leu Gln Val Leu
 2465 2470 2475 2480
 Asp Ser His Tyr Gln Asp Val Leu Lys Glu Val Lys Ala Ala Ala Ser
 2485 2490 2495
 Lys Val Lys Ala Asn Leu Leu Ser Val Glu Glu Ala Cys Ser Leu Thr
 2500 2505 2510
 Pro Pro His Ser Ala Lys Ser Lys Phe Gly Tyr Gly Ala Lys Asp Val
 2515 2520 2525
 Arg Cys His Ala Arg Lys Ala Val Thr His Ile Asn Ser Val Trp Lys
 2530 2535 2540
 Asp Leu Leu Glu Asp Asn Val Thr Pro Ile Asp Thr Thr Ile Met Ala
 2545 2550 2555 2560
 Lys Asn Glu Val Phe Cys Val Gln Pro Glu Lys Gly Gly Arg Lys Pro
 2565 2570 2575
 Ala Arg Leu Ile Val Phe Pro Asp Leu Gly Val Arg Val Cys Glu Lys
 2580 2585 2590
 Met Ala Leu Tyr Asp Val Val Thr Lys Leu Pro Leu Ala Val Met Gly
 2595 2600 2605
 Ser Ser Tyr Gly Phe Gln Tyr Ser Pro Gly Gln Arg Val Glu Phe Leu
 2610 2615 2620
 Val Gln Ala Trp Lys Ser Lys Lys Thr Pro Met Gly Phe Ser Tyr Asp
 2625 2630 2635 2640

Фиг. 9-15

Thr Arg Cys Phe Asp Ser Thr Val Thr Glu Ser Asp Ile Arg Thr Glu
 2645 2650 2655
 Glu Ala Ile Tyr Gln Cys Cys Asp Leu Asp Pro Gln Ala Arg Val Ala
 2660 2665 2670
 Ile Lys Ser Leu Thr Glu Arg Leu Tyr Val Gly Gly Pro Leu Thr Asn
 2675 2680 2685
 Ser Arg Gly Glu Asn Cys Gly Tyr Arg Arg Cys Arg Ala Ser Gly Val
 2690 2695 2700
 Leu Thr Thr Ser Cys Gly Asn Thr Leu Thr Cys Tyr Ile Lys Ala Arg
 2705 2710 2715 2720
 Ala Ala Cys Arg Ala Ala Gly Leu Gln Asp Cys Thr Met Leu Val Cys
 2725 2730 2735
 Gly Asp Asp Leu Val Val Ile Cys Glu Ser Ala Gly Val Gln Glu Asp
 2740 2745 2750
 Ala Ala Ser Leu Arg Ala Phe Thr Glu Ala Met Thr Arg Tyr Ser Ala
 2755 2760 2765
 Pro Pro Gly Asp Pro Pro Gln Pro Glu Tyr Asp Leu Glu Leu Ile Thr
 2770 2775 2780
 Ser Cys Ser Ser Asn Val Ser Val Ala His Asp Gly Ala Gly Lys Arg
 2785 2790 2795 2800
 Val Tyr Tyr Leu Thr Arg Asp Pro Thr Thr Pro Leu Ala Arg Ala Ala
 2805 2810 2815

Фиг. 9-16

Trp Glu Thr Ala Arg His Thr Pro Val Asn Ser Trp Leu Gly Asn Ile
 2820 2825 2830
 Ile Met Phe Ala Pro Thr Leu Trp Ala Arg Met Ile Leu Met Thr His
 2835 2840 2845
 Phe Phe Ser Val Leu Ile Ala Arg Asp Gln Leu Glu Gln Ala Leu Asp
 2850 2855 2860
 Cys Glu Ile Tyr Gly Ala Cys Tyr Ser Ile Glu Pro Leu Asp Leu Pro
 2865 2870 2875 2880
 Pro Ile Ile Gln Arg Leu His Gly Leu Ser Ala Phe Ser Leu His Ser
 2885 2890 2895
 Tyr Ser Pro Gly Glu Ile Asn Arg Val Ala Ala Cys Leu Arg Lys Leu
 2900 2905 2910
 Gly Val Pro Pro Leu Arg Ala Trp Arg His Arg Ala Arg Ser Val Arg
 2915 2920 2925
 Ala Arg Leu Leu Ala Arg Gly Gly Arg Ala Ala Ile Cys Gly Lys Tyr
 2930 2935 2940
 Leu Phe Asn Trp Ala Val Arg Thr Lys Leu Lys Leu Thr Pro Ile Ala
 2945 2950 2955 2960
 Ala Ala Gly Gln Leu Asp Leu Ser Gly Trp Phe Thr Ala Gly Tyr Ser
 2965 2970 2975
 Gly Gly Asp Ile Tyr His Ser Val Ser His Ala Arg Pro Arg Trp Ile
 2980 2985 2990

Фиг. 9-17

Trp Phe Cys Leu Leu Leu Leu Ala Ala Gly Val Gly Ile Tyr Leu Leu
 2995 3000 3005
 Pro Asn Arg
 3010

Фиг. 9-18