

A TT-vírus szekvenciájából való peptidek és a TT-vírushoz kötődő monospecifikus ellenanyagok

K I V O N A T

1. azonosítószám szerinti aminosav-szekvenciájú peptidet írunk le, és opcionálisan ezen peptidet 3-11. azonosítószám szerinti aminosav-szekvenciájú peptidek közül eggyel vagy többel keverékben. Ezen peptidek mindegyike TT-vírus genomiális szekvenciája régióinak felel meg. Továbbá TT-vírushoz kötődő monospecifikus ellenanyagokat is feltárunk. A peptideket hordozóhoz és/vagy jelölőanyaghoz kapcsolhatjuk, vagy szilárd fázison immobilizálhatjuk. A peptid vagy peptidkeverék, vagy a monospecifikus ellenanyag gyógyszerben vagy diagnosztikai reagenskészletben alkalmazható. A peptid vagy peptidkeverék alkalmazható nem ember emlős immunizálására is TT-vírus ellen irányuló monospecifikus ellenanyagok előállítására.

Felelős:

A TT-vírus szekvenciájából való peptidek és a TT-vírushoz kötődő monospecifikus ellenanyagok

A találmány tárgyát TT-vírus genomiális szekvenciájából származó peptidek és a TT-vírushoz kötődő monospecifikus ellenanyagok képezik. Továbbá a találmány tárgyát a találmány szerinti peptidek és ellenanyagok képezik megfelelő gyógyszerekben történő alkalmazásra. A találmány tárgyát képezik a találmány szerinti peptideket diagnosztikus antigénként tartalmazó diagnosztikai reagenskészletek, a találmány szerinti ellenanyagokat diagnosztikus ellenanyagként tartalmazó diagnosztikai reagenskészletek is. A találmány szerinti peptidek alkalmazhatók nem ember emlős immunizálására TT-vírus ellen irányuló monospecifikus ellenanyagok előállítására.

1997-ben új fertőző ágenszt azonosítottak transzfúzió utáni nem A-G hepatitiszben szenvedő japán beteg szérumjából, amit TT-vírusnak neveztek el (TTV) [1]. TTV-DNS-t detektáltak fulminát nem A-G hepatitiszben szenvedő betegek 47%-ában és ismeretlen kóroktanú krónikus májbetegségben szenvedő betegek 46%-ában [2], ami azt sugallja, hogy a TTV lehet az oka bizonyos idiopátiás májbetegségeknek. A TTV globális [3], és gyakoribbnak tűnik vér útján terjedő vírusokkal történő fertőzésre veszélyeztetett populációkban [2], például hemofiliásokban és kábítószeresekben. Azonban nem szülői átadás is lehetségesnek tűnik [2].

A TTV burok nélküli, egyszálú DNS-vírus, legalább 3,7 kb hosszúságú genommal [4]. A szekvenciája divergens, lehetővé téve az osztályozását különböző genotípusokra és altípusokra [4]. A *Parvoviridae* családdal való rokonságát tárgyalták [4]. További elemzések TTV hepatotropizmusának bizonyítékát tárta fel [2], és bizonyos, nem A-G transzfúziós hepatitiszben és TTV-virémiában szenvedő betegekben a TTV-DNS titerek korreláltak az aminoszferáz szintekkel [1].

Azonban a TTV-fertőzés és súlyos májbetegség közötti kapcsolat tényét nem lehetett megerősíteni [3, 5, 6]. A TTV-fertőzés járványtani, immunológiai és klinikai jelentősége még mindig bizonytalan. Ezenkívül még nem áll rendelkezésre szerológiai teszt TTV-fertőzésre, és jelen pillanatban PCR az egyetlen rendelkezésre álló diagnosztikai eszköz.

Igény lenne TTV-fertőzés diagnosztizálásának képességére emberben, és peptideken alapuló, immunizálásra szolgáló gyógyszerek kifejlesztésére és/vagy TTV elleni ellenanyagokra.

A találmány a napjainkban leírt TT-vírus (TTV; [1]) genomiális szekvenciájából különböző régióknak megfelelő szintetikus peptideken alapul. Összesen 80, a két nyílt leolvasási fázisnak (ORF1 és ORF2, Genbank lajstromszám: AB008394) megfelelő átfedő peptidet szintetizáltunk. Ezeket nyolc TTV-vel fertőzött emberi szérummintával, és nyolc TTV-vel nem fertőzött emberi szérummintával elemeztük. A reaktív emberi szérumminták mindegyike reagált az 1. azonosítószámú szekvenciával (TATTTYAYPGTNRPPV). A reaktivitá-

sokat finomíthattuk a 2. azonosítószámú szekvenciára (YAYPGTNRPPV), ahol a PV oldalláncok bizonyultak a leglényegesebbnek emberi ellenanyagok kötésében.

Ezáltal a találmány tárgya TATTTTYAYPGTNRPPV aminosav-szekvenciájú peptid (1. azonosítószámú szekvencia), amelyben az N-terminális TATTTT aminosavak közül 1-6 elhagyható.

A találmány egy megvalósítási módja szerint a peptid aminosav-szekvenciája YAYPGTNRPPV (2. azonosítószámú szekvencia).

A találmány tárgya peptidkeverék is, amely a TATTTTYAYPGTNRPPV (1. azonosítószámú szekvencia) aminosav-szekvenciájú peptidet (amelyben az N-terminális TATTTT aminosavak közül 1-6 elhagyható) és legalább egy másik, 4. táblázatban listázott, 3-11. azonosítószám szerinti aminosav-szekvenciájú peptidet tartalmaz.

A találmány szerinti peptidet és/vagy a találmány szerinti peptidkeverék legalább egy peptidjét hordozóhoz és/vagy jelölőanyaghoz köthetjük. Hordozók példái műanyag felületek, mint például mikrotiterlemezek, gyöngyök, stb.; szerves molekulák, mint például biotin; fehérjék, mint például marhaszérum-albumin; peptid-kapcsolómolekulák, vagy polipeptidek. Alkalmazható - elsősorban diagnosztikai célra - jelölőanyagok példái radioaktív izotópok, enzimek, fluoreszcens markerek, stb.

Továbbá a találmány szerinti peptidet és/vagy a találmány szerinti peptidkeverék legalább egy peptidjét szilárd fázison immobilizálhatjuk, mint például üveg vagy mű-

anyag felületre, elsődlegesen diagnosztikai célra vagy ellenanyagok tisztítására.

A találmány tárgya továbbá találmány szerinti peptid vagy peptidkeverék, gyógyszerben történő alkalmazásra, opcionálisan egyéb biológiailag aktív vagy inaktív alkotórészekhez kötve vagy azokkal kombinációban, mint például oltóanyagként TT-vírusfertőzés megelőzésére.

Továbbá a találmány tárgyát képezik a TT-vírushoz kötődő monospecifikus ellenanyagok is.

A találmány egy megvalósítási módja szerint a monospecifikus ellenanyag kötődik az 1-11. azonosítószám szerinti aminosav-szekvenciák bármelyikéhez.

A találmány tárgya ezenfelül találmány szerinti monospecifikus ellenanyag, gyógyszerben történő alkalmazásra, opcionálisan egyéb biológiailag aktív vagy inaktív alkotórészekhez kötve vagy azokkal kombinációban, mint például gyógyszerként TTV-vel már megfertőzött betegnek történő beadásra.

A találmány tárgya találmány szerinti peptidet vagy peptidkeveréket diagnosztikus antigén(ek)ként tartalmazó diagnosztikai reagenskészlet is. A reagenskészlet alkalmazható immunológiai vizsgálati eljárásban, mint például EIA, RIA, stb., TTV elleni ellenanyagok jelenlétének detektálására biológiai folyadékokban, mint például vér vagy plazma.

A találmány tárgya továbbá egy vagy több, találmány szerinti ellenanyagot diagnosztikus ellenanyagként tartalmazó diagnosztikai reagenskészlet. A reagenskészlet alkalmazható immunológiai vizsgálati eljárásban, mint például

EIA, RIA, stb., TTV elleni ellenanyagok jelenlétének detektálására biológiai folyadékokban, mint például vér vagy plazma.

A diagnosztikai reagenskészlet normálisan tartalmazhat immunológiai vizsgálati eljárás végrehajtására szolgáló további alkotóelemeket is. Ezen további alkotóelemek az alkalmazandó aktuális vizsgálati eljárástól függhetnek, és gyakran tartalmazhatnak pozitív és negatív standard szérummintákat és írott használati utasítást.

A találmány tárgya ezenfelül találmány szerinti peptid alkalmazása nem ember emlős immunizálására TT-vírus ellen irányuló monospecifikus ellenanyagok előállítására.

Az alábbi kísérletekkel és specifikus megvalósítási módokkal a találmányt részletesebben is bemutatjuk, azonban az igénypontokban meghatározott oltalmi kört nem kívánjuk a bemutatott megvalósítási módokra korlátozni.

Kísérletek leírása

Szérumminták:

Kódolt szérummintákat szereztünk be egészséges donороk véréből tartalmazó szérumbankból, májbeteg és nem májbeteg gyermekektől, IVDU (intravénás kábítószeres) anyáktól és gyermekeiktől.

PCR-amplifikáció TTV detektálására szérumban

Totál DNS-t izoláltunk 50 µl betegszérumból fenol/kloroformos tisztítással. Az összes beteg DNS-ét két különböző láncindító-készlettel elemeztük (félig) egymásba ágyazott [„(semi)nested”] PCR-rel. 5 µl betegszérumot adtunk 1 U *taq*-polimeráz-t (Perkin-Elmer Applied Biosystems,

Norwalk, CO), 10x PCR-puffert, 200 μmol MgCl_2 -t, dNTP-eket (125 μmol /nukleotid) és az egyes láncindítók 20 pmol-ját tartalmazó 45 μl reakcióelegyhez. Az első menetben alkalmazott láncindítók az 5TTVout5 (5' -ACA GAC AGA GGA GAA GGC AAC ATG- 3') és leolvasással megegyező irányban lévő láncindítóként vagy a 3TTVout (5' -CTG GCA TTT TAC CAT TTC CAA AGT T- 3'), vagy a 3TTXout (5' -TAC CAY TTA GCT CTC ATT CTW AT- 3') voltak. A DNS-t az alábbiak szerint amplifikáltuk: 95°C-on 4,5 perc, és azután 33 ciklus: 95°C-on 30 másodperc, 50°C-on 30 másodperc, 72°C-on 1 perc, és a végén 72°C-on 4 perc. A második PCR-menetet az első menet PCR-termékének 5 μl -ével végeztük azonos körülmények között. A második menet belső láncindítói leolvasással ellentétes irányban lévő láncindítóként vagy 5TTVin (5' -GGC AAC ATG YTR TGG ATA GAC TGG- 3'), vagy 5TTVXin (5' -ACA GGA GAC HMA AAC ATA SA- 3'), és 3TTVout voltak. A körülbelül 275, illetve 140 bp helyes méreteket agaróz-gélelektroforézissel (3%) határoztuk meg. Azon mintákat tekintettük TTV-pozitívnak, amelyek akár mindkét láncindító-készlettel pozitívak voltak, akár reprodukálható módon pozitívak voltak az egyik láncindító-készlettel. A láncindító-szekvenciákat az AB008394-es Genebank lajstromszámú szekvencia alapján terveztük.

Peptidszintézis

TTV ORF1 és ORF2 szekvenciájának (1. táblázat, Genebank lajstromszám: AB008394) megfelelő átfedő peptideket (18 aminosav hosszúságú, 8 aminosav átfedéssel) állítottunk elő több peptid szintézisére alkalmas szintetizá-

torral, szokásos Fmoc-kémia alkalmazásával. [7] (Syro, Syntex, Germany).

Emberi ellenanyagok detektálása szérumban

Az EIA-eljárások főként korábbi protokollokat követtek [8]. Mikrotiterlemezeket (Nunc, Denmark) 48 órán át szintetikus peptidekkel vontunk be 10 µg/ml koncentrációban 0,05 M nátrium-karbonát pufferben, pH 9,6. Két órás, 1% marhaszérum-albumint, 2% kecskeszérumot és 0,05% Tween-20-at tartalmazó foszfát-pufferelt sóoldattal (hígítási puffer) szobahőmérsékleten történő blokkolás után a lemezeket hígítási pufferben 1:100 arányban hígított emberi szérummal inkubáltuk. A kötött IgG-t alkalikus-foszfátázzal konjugált anti-ember IgG-ellenanyagokkal (Sigma Chemicals, St. Louis, MO) történő inkubálással mutattuk ki. A lemezeket dinitro-fenilén-diamin (Sigma) hozzáadásával hívtuk elő, és az optikai denzitásokat 405 nm-en határoztuk meg.

Immunizálás és TTV-specifikus ellenanyagok indukálása

Balb/c egerek csoportjait intraperitoneálisan immunizáltuk 100 µg, komplett Freund-adjuvánsban 1:1 arányban emulgeált 35-ös TTV-peptiddel (1. azonosítószámú szekvencia). 100 µg, inkomplett Freund-adjuvánsban beadott megerősítő dózist adtunk 4 héttel később. Vénás vérmintákat gyűjtöttünk hetente egyszer 6 héten keresztül, és azokat 35-ös TTV-peptid (1. azonosítószámú szekvencia) elleni reaktivitásra teszteltük.

Eredmények

Az ORF1-et és ORF2-t lefedő 97 peptid elleni emberi reaktivitásokat a 2. és 3. táblázatban adjuk meg. Az ORF1-

en belüli reaktív peptidek az alábbiak voltak: 10 (3. azonosítószámú szekvencia), 18 (4. azonosítószámú szekvencia), 29 (5. azonosítószámú szekvencia), 35 (1. azonosítószámú szekvencia), 42 (6. azonosítószámú szekvencia), 44 (7. azonosítószámú szekvencia), 50 (8. azonosítószámú szekvencia), 51 (9. azonosítószámú szekvencia) és 69 (10. azonosítószámú szekvencia) (2. táblázat). A tesztelt emberi szérumok közül kettő reagált a 19-es peptiddel (11. azonosítószámú szekvencia) az ORF2-ből (3. táblázat). Az összes reaktív peptidet listáztuk a 4. táblázatban. A leggyakrabban detektált peptid a TATTTTYAYPGTNRPPV szekvenciájú 35-ös peptid volt (1. azonosítószámú szekvencia). A 35-ös peptiddel való reaktivitás a szérumminták hígításától függött (5. táblázat). Az emberi szérumminták mikrotiterlemezen lévő peptiddel való reakcióját a gátolhattuk ugyanazon peptid oldatban történő hozzáadásával, de egy irreleváns peptiddel nem (adatok nem közlünk). Ez azt mutatja, hogy a reaktivitás specifikus a TATTTTYAYPGTNRPPV szekvenciájú 35-ös peptidre (1. azonosítószámú szekvencia).

A TATTTTYAYPGTNRPPV peptiddel való reaktivitást tovább jellemeztük deléciós és szubsztituált peptidanalógokkal. Ezen elemzés azt mutatta, hogy a felismert régió a YAYPGTNRPPV szekvenciát (2. azonosítószámú szekvencia) tartalmazta (6. táblázat). Alanin-szubsztituált analógok alkalmazásával a Pro-Val szekvencia bizonyul t a leglényegesebbnek emberi ellenanyagok kötésében (6. táblázat).



1. Táblázat A TTV ORF1 és ORF2 (Genebank lajstromszám: AB008394) 80 átfedő peptid szintézisére alkalmazott teljes aminosav-szekvenciája.

ORF1

MAYGWRRRRRRWRRWRRRPWRRRWTRRRRPARRRGRRRNVRRRRRGGRWRR
RYRRWKRKGRRRKAKIIIRQWQPNYRRRCNIVGYIPVLICGENTVSRNYATHSDDT
NYPGPFGGGMTTDKFTLRILYDEYKRFMNYWTASNEDDLDCRYLGVNLYFFRHPDV
DFIIKINTMPPFLLDTELTAPSIHPGMLALDKRARWIPSLKSRPGKKHYIKIRVGAPRMF
T
DKWYPQTDLCMVLLTVYATAADMQYPFGSPLTDSVVVNFQVLQSMYDKTISILPD
EKSQREILLNKIASYIPFYNTTQTIAQLKPFIDAGNVTSGATATTWASYINTTKFTTAT
T
TTYAYPGTNRPPVTMLTCNDSWYRGTVYNTQIQQLPIKAAKLYLEATKTLLGNTFTN
EDYTLEYHGGLYSSIWLSPGRSYFETTGAYTDIKYNPFTDRGEGNMLWIDWLSKKN
MNYDKVQSKCLISDLPLWAAAYGYVEFCAKSTGDQNIHMNARLLIRSPFTDPQLLVH
TDPTKGFVPYSLNFGNGKMPGGSSNPVIRMRAKWYPTLFHQQEVLEALAQSGPFAY
HSDIKKVS LGMKYRFKWIWGGNPVRQQVVRNPCKETHSSGNRVPRSLQIVDPKYNS
PELTFHTWDFRRGLFGPKAIQRMQQOQPTTTDI FSAGRKRPRRDTEVYHSSQEGEQKES
LLFPPVKLLRRVPPWEDSQQEESGSQSSEEETQTVSQQLKQQQLQQQRILGVKLRLLEN
QVQKIQQNQDINPTLLPRGGDLASLFQIAP

ORF2

MAEFSTPVRSGEATEGDLRVPRAGAEGEFTHRSQGAI RARDWPGYGQGSEKSMFIGR
HYRKKRALSLCAVRTTKKACKLLIVMWTPPRNDQHLYLNWQWYSSILSSHAAMCGC
PDAVAHFNHLASVLRAPQNPPPPGPQRNLPLRRLPALPAAPEAPGDRAPWPMAGGAE
GEDGGAGGDADHGGAAGGPEDADLLDAVAAAE

2. Táblázat Emberi ellenanyag-reaktivitások elemzése EIA-ban a TT-vírus teljes 1-es nyílt leolvasási fázisának (ORF1) megfelelő átfedő szintetikus peptidekkel. Az értékeket 405 nm-en mért optikai denzitásban adtuk meg. 0,500 feletti OD-értékeket tekintettünk pozitívnak, és félkövér betűtípussal írtuk.

TTV ORF1 peptid	TTV-DNS-re negatív minták PCR-rel								TTV-DNS-re pozitív minták PCR-rel							
	1	2	3	4	5	6	7	11	9	18	36	48	98	110	155	157
1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	0,08	0,08	0,07	0,11	0,07	0,09	0,08	0,14	0,07	0,06	0,08	0,10	0,05	0,08	0,07	0,08
3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
6	0,08	0,08	0,07	0,10	0,07	0,09	0,07	0,11	0,08	0,06	0,08	0,09	0,05	0,07	0,08	0,07
7	0,07	0,07	0,08	0,10	0,07	0,08	0,08	0,10	0,07	0,064	0,07	0,09	0,05	0,07	0,08	0,08
8	0,07	0,06	0,07	0,08	0,07	0,09	0,07	0,10	0,07	0,07	0,08	0,10	0,05	0,07	0,09	0,09
9	0,07	0,08	0,08	0,09	0,08	0,10	0,07	0,10	0,08	0,06	0,07	0,10	0,05	0,08	0,10	0,11
10	0,09	0,10	0,11	0,11	0,11	0,13	1,09	0,12	0,09	0,07	0,07	0,11	0,06	0,09	0,12	0,12

2004

11	0,09	0,10	0,10	0,10	0,10	0,09	0,11	0,09	0,12	0,09	0,07	0,08	0,10	0,07	0,08	0,12	0,13
12	0,09	0,09	0,10	0,10	0,10	0,08	0,11	0,09	0,12	0,10	0,08	0,08	0,11	0,06	0,08	0,13	0,13
13	0,09	0,08	0,08	0,09	0,09	0,08	0,09	0,09	0,10	0,09	0,07	0,08	0,10	0,07	0,08	0,11	0,11
14	0,09	0,10	0,11	0,11	0,11	0,08	0,12	0,09	0,12	0,08	0,07	0,07	0,09	0,05	0,07	0,14	0,14
15	0,08	0,09	0,11	0,10	0,10	0,09	0,13	0,09	0,13	0,09	0,06	0,07	0,13	0,05	0,08	0,15	0,16
16	0,08	0,09	0,08	0,10	0,10	0,08	0,14	0,09	0,11	0,08	0,07	0,07	0,09	0,04	0,06	0,12	0,12
17	0,08	0,10	0,09	0,11	0,11	0,09	0,13	0,09	0,13	0,08	0,08	0,08	0,11	0,04	0,09	0,12	0,13
18	0,09	0,09	0,15	0,29	0,29	0,07	0,13	0,62	0,28	0,08	0,07	0,13	0,12	0,04	0,08	0,19	0,18
19	0,08	0,09	0,10	0,10	0,10	0,09	0,16	0,12	0,13	0,08	0,07	0,07	0,14	0,04	0,08	0,15	0,14
20	0,07	0,06	0,06	0,07	0,07	0,06	0,08	0,08	0,11	0,08	0,07	0,07	0,09	0,04	0,06	0,09	0,10
21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
22	0,07	0,07	0,07	0,08	0,08	0,08	0,09	0,09	0,11	0,08	0,07	0,08	0,10	0,04	0,07	0,11	0,11
23	0,09	0,09	0,11	0,11	0,11	0,08	0,16	0,09	0,12	0,08	0,07	0,07	0,10	0,05	0,07	0,14	0,14
24	0,07	0,09	0,12	0,12	0,12	0,08	0,12	0,08	0,11	0,08	0,07	0,07	0,10	0,05	0,10	0,13	0,15
25	0,07	0,09	0,08	0,08	0,08	0,06	0,11	0,07	0,12	0,07	0,06	0,06	0,06	0,06	0,07	0,11	0,12
26	0,07	0,09	0,07	0,08	0,08	0,08	0,10	0,07	0,10	0,07	0,07	0,06	0,05	0,07	0,08	0,09	0,11
27	0,07	0,08	0,07	0,08	0,08	0,06	0,11	0,07	0,08	0,06	0,06	0,06	0,06	0,08	0,06	0,09	0,10

...

28	0,07	0,08	0,08	0,08	0,08	0,07	0,50	0,07	0,10	0,07	0,06	0,06	0,06	0,07	0,06	0,06	0,06	0,09	0,10
29	0,42	0,36	0,45	0,53	0,22	0,95		0,29	0,14	0,21	0,11	0,09	0,10	0,09	0,25	0,59	0,62		
30	0,07	0,07	0,06	0,07	0,06	0,09		0,07	0,09	0,07	0,07	0,07	0,07	0,08	0,08	0,09	0,12		
31	0,05	0,09	0,09	0,08	0,06	0,09		0,07	0,08	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,09	0,09		
32	0,06	0,08	0,06	0,25	0,06	0,09		0,06	0,07	0,06	0,05	0,06	0,05	0,07	0,06	0,09	0,09		
33	0,07	0,08	0,06	0,07	0,06	0,08		0,06	0,07	0,06	0,05	0,06	0,05	0,07	0,06	0,08	0,09		
34	0,07	0,07	0,05	0,06	0,06	0,06		0,06	0,07	0,06	0,09	0,06	0,15	0,06	0,06	0,08	0,08		
35	0,18	0,17	0,27	1,40	0,25	0,64	2,10	0,64	0,10	0,10	0,10	1,22	1,11	0,05	0,47	0,95	0,86		
36	0,07	0,07	0,06	0,07	0,06	0,11		0,07	0,08	0,09	0,06	0,06	0,07	0,07	0,07	0,08	0,08		
37	0,10	0,11	0,11	0,12	0,09	0,14		0,12	0,14	0,09	0,08	0,08	0,20	0,10	0,08	0,14	0,14		
38	0,07	0,08	0,08	0,09	0,08	0,11		0,09	0,11	0,08	0,07	0,07	0,07	0,09	0,08	0,19	0,11		
39	0,08	0,09	0,07	0,09	0,07	0,37		0,09	0,10	0,08	0,09	0,09	0,08	0,09	0,09	0,11	0,13		
40	0,09	0,16	0,24	0,12	0,11	0,16		0,09	0,12	0,09	0,09	0,08	0,08	0,10	0,09	0,15	0,16		
41	0,08	0,12	0,10	0,11	0,10	0,20		0,09	0,15	0,09	0,07	0,09	0,08	0,11	0,09	0,15	0,16		
42	0,08	0,11	0,09	0,10	0,17	0,23		0,11	0,19	0,27	0,12	0,10	0,09	0,16	0,42	0,35	1,24		
43	0,09	0,21	0,11	0,11	0,10	0,41		0,10	0,14	0,08	0,08	0,08	0,08	0,12	0,11	0,20	0,25		
44	0,09	0,11	0,11	0,12	0,98	0,15		0,10	0,14	0,09	0,09	0,08	0,08	0,12	0,13	0,17	1,25		

...

45	0,08	0,06	0,06	0,12	0,10	0,17	0,10	0,14	0,09	0,08	0,06	0,09	0,11	0,09	0,16	0,17
46	0,08	0,08	0,07	0,09	0,08	0,22	0,10	0,12	0,08	0,07	0,07	0,07	0,09	0,08	0,19	0,26
47	0,07	0,09	0,08	0,09	0,09	0,13	0,09	0,12	0,07	0,07	0,07	0,07	0,10	0,09	0,15	0,19
48	0,08	0,11	0,10	0,12	0,10	0,16	0,11	0,13	0,08	0,09	0,08	0,08	0,12	0,09	0,15	0,15
49	0,09	0,11	0,10	0,11	0,10	0,15	0,15	0,15	0,08	0,08	0,07	0,08	0,10	0,11	0,26	0,25
50	0,07	0,09	0,08	0,09	0,08	0,86	0,29	0,18	0,08	0,07	0,07	0,07	0,10	0,20	0,63	0,46
51	0,06	0,09	0,08	0,10	0,12	0,24	0,13	0,13	0,07	0,07	0,08	0,08	0,11	0,09	0,24	0,78
52	0,10	0,13	0,11	0,11	0,10	0,20	0,11	0,13	0,10	0,09	0,08	0,08	0,14	0,11	0,21	0,38
53	0,12	0,12	0,09	0,10	0,08	0,16	0,09	0,11	0,09	0,10	0,08	0,07	0,09	0,10	0,16	0,15
54	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
55	0,10	0,10	0,07	0,08	0,07	0,14	0,09	0,08	0,35	0,08	0,07	0,07	0,08	0,09	0,14	0,12
56	0,10	0,16	0,11	0,11	0,09	0,18	0,09	0,11	0,10	0,09	0,09	0,09	0,10	0,10	0,18	0,15
57	0,14	0,12	0,10	0,12	0,09	0,17	0,11	0,12	0,11	0,08	0,09	0,09	0,10	0,12	0,19	0,43
58	0,07	0,06	0,06	0,07	0,06	0,07	0,07	0,08	0,07	0,06	0,08	0,08	0,04	0,06	0,08	0,09
59	0,06	0,05	0,05	0,06	0,06	0,06	0,06	0,08	0,06	0,05	0,05	0,06	0,04	0,05	0,07	0,08
60	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
61	0,07	0,06	0,06	0,08	0,06	0,10	0,07	0,10	0,08	0,05	0,06	0,08	0,04	0,07	0,12	0,12

2020

62	0,07	0,07	0,06	0,09	0,07	0,08	0,07	0,09	0,08	0,05	0,07	0,11	0,05	0,07	0,11	0,14
63	0,11	0,16	0,12	0,13	0,11	0,16	0,11	0,05	0,08	0,08	0,08	0,08	0,11	0,09	0,15	0,15
64	0,09	0,08	0,08	0,09	0,07	0,10	0,08	0,09	0,08	0,08	0,08	0,07	0,08	0,08	0,11	0,12
65	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
66	0,10	0,12	0,10	0,10	0,10	0,14	0,12	0,16	0,10	0,09	0,09	0,09	0,11	0,10	0,13	0,15
67	0,10	0,11	0,09	0,12	0,10	0,15	0,12	0,15	0,10	0,09	0,09	0,09	0,10	0,10	0,21	0,24
68	0,11	0,14	0,16	0,16	0,13	0,23	0,13	0,19	0,10	0,10	0,09	0,10	0,12	0,12	0,20	0,21
69	0,10	0,15	0,16	0,14	0,12	0,51	0,11	0,13	0,09	0,08	0,08	0,09	0,10	0,11	0,15	0,21
70	0,09	0,11	0,11	0,11	0,09	0,19	0,12	0,12	0,08	0,08	0,08	0,09	0,10	0,11	0,18	0,20
71	0,10	0,13	0,14	0,14	0,11	0,20	0,11	0,17	0,10	0,08	0,10	0,09	0,13	0,14	0,21	0,20
72	0,10	0,15	0,12	0,13	0,10	0,19	0,12	0,16	0,08	0,08	0,09	0,09	0,11	0,11	0,18	0,19
73	0,08	0,09	0,09	0,10	0,09	0,12	0,10	0,13	0,09	0,08	0,07	0,08	0,11	0,09	0,13	0,14
74	0,08	0,09	0,07	0,08	0,08	0,10	0,09	0,11	0,09	0,08	0,07	0,08	0,08	0,08	0,09	0,11
75	0,11	0,12	0,12	0,11	0,10	0,17	0,44	0,15	0,10	0,10	0,10	0,09	0,11	0,10	0,15	0,16
76	0,10	0,13	0,15	0,14	0,11	0,28	0,13	0,14	0,11	0,09	0,08	0,09	0,12	0,26	0,01	0,22
77	0,14	0,14	0,15	0,12	0,09	0,18	0,12	0,13	0,18	0,07	0,07	0,08	0,08	0,09	0,11	0,14

...

3. Táblázat Emberi ellenanyag-reaktivitások elemzése EIA-ban a TT-vírus teljes 2-es nyílt leolvasási fázisának (ORF2) megfelelő átfedő szintetikus peptidekkel. Az értékeket 405 nm-en mért optikai denzitásban adjuk meg. 0,500 feletti OD-értékeket tekintettünk pozitívnak, és félkövér betűtípussal írtuk.

TTV ORF2 peptid	TTV-DNS-re negatív minták PCR-rel								TTV-DNS-re pozitív minták PCR-rel							
	1	2	3	4	5	6	7	11	9	18	36	48	98	110	155	157
1	0,09	0,10	0,13	0,11	0,10	0,16	0,09	0,12	0,08	0,08	0,09	0,08	0,08	0,08	0,14	0,14
2	0,10	0,11	0,11	0,10	0,08	0,12	0,09	0,14	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,09	0,14	0,13
3	0,08	0,10	0,11	0,10	0,08	0,29	0,28	0,14	0,10	0,08	0,13	0,08	0,11	0,10	0,14	0,04
4	0,09	0,09	0,08	0,08	0,07	0,09	0,07	0,09	0,08	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,10	0,10
5	0,08	0,08	0,08	0,08	0,07	0,10	0,08	0,10	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,08	0,12	0,13
6	0,07	0,10	0,08	0,10	0,07	0,10	0,07	0,10	0,08	0,28	0,09	0,08	0,10	0,09	0,09	0,11
7	0,11	0,10	0,11	0,14	0,91	0,13	0,10	0,11	0,08	0,09	0,10	0,11	0,10	0,09	0,10	0,13
8	0,09	0,10	0,11	0,13	0,10	0,12	0,10	0,14	0,09	0,08	0,10	0,11	0,10	0,10	0,11	0,12
9	0,08	0,09	0,09	0,09	0,09	0,10	0,09	0,11	0,09	0,08	0,08	0,09	0,09	0,09	0,13	0,14
10	0,09	0,11	0,10	0,09	0,08	0,11	0,08	0,10	0,09	0,09	0,07	0,08	0,08	0,08	0,11	0,13

2024

11	0,10	0,10	0,11	0,08	0,09	0,09	0,09	0,11	0,10	0,12	0,09	0,07	0,09	0,09	0,14	0,14
12	0,12	0,09	0,09	0,08	0,09	0,08	0,07	0,13	0,09	0,08	0,10	0,07	0,14	0,12	0,16	0,14
13	0,07	0,09	0,09	0,08	0,10	0,09	0,11	0,07	0,08	0,07	0,08	0,07	0,09	0,08	0,12	0,12
14	0,08	0,07	0,08	0,07	0,08	0,07	0,10	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,10	0,10
15	0,08	0,08	0,08	0,07	0,09	0,07	0,10	0,08	0,07	0,07	0,08	0,07	0,08	0,08	0,10	0,12
16	0,08	0,09	0,09	0,07	0,09	0,08	0,09	0,08	0,08	0,08	0,08	0,07	0,08	0,08	0,12	0,11
17	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
18	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
19	0,09	0,12	0,17	0,12	0,08	0,51	0,57	0,15	0,08	0,07	0,33	0,07	0,08	0,08	0,14	0,14
20	0,09	0,10	0,09	0,08	0,07	0,10	0,07	0,09	0,10	0,10	0,08	0,08	0,08	0,10	0,14	0,16

2021

4. Táblázat Emberi szérummintákkal reagáló TTV-peptidek
szekvenciái.

ORF1		
Peptid száma	Peptid szekvenciája	Szekvencia- azonosítószám
10	VLICGENTVSRNYATHS	3
18	KINTMPPFLDTELTAPS	4
29	PDEKSQREILLNKIASY	5
35	TATTTTYAYPGTNRPPV	1
42	GLYSSIWLSPGRSYFET	6
44	YTDIKYNPFTDRGEGNM	7
50	DQNIHMNARLLIRSPFT	8
51	LIRSPFTDPQLLVHTDP	9
69	QKESLLFPPVKLLRRVP	10
ORF2		
Peptid száma	Peptid szekvenciája	
19	EDGGAGGDADHGGAAGGP	11

5. Táblázat Három emberi szérumminta TATTTTYAYPGTNRPPV szekvenciájú TTV-peptiddel (1. azonosítószámú szekvencia) történő sorozathígítása reaktivitásának elemzése. Az értékeket 405 nm-en mért optikai denzitásban és szórásban (SD) adjuk meg.

Szérumminta hígítása	Emberi szérumminta					
	P 4	SD	P 6	SD	P 7	SD
1:100	1,285	0,072	0,687	0,082	1,782	0,054
1:200	0,758	0,056	0,375	0,003	1,23	0,02
1:400	0,411	0,021	0,19	0,007	0,79	0,018
1:800	0,234	0,008	0,104	0,003	0,45	0,002
1:1600	0,131	0,005	0,067	0,001	0,246	0,013
1:3200	0,076	0,003	0,049		0,131	0,006
1:6400	0,058	0,001	0,043		0,087	
1:12800	0,046		0,041		0,061	

6. Táblázat Három emberi szérumminta reaktivitásának elemzése a TATTTTYAYPGTNRPPV szekvenciájú TTV-peptid (1. azonosítószámú szekvencia) deléciós és alanin-szubsztitúciós analógjaival. Az értékeket 405 nm-en mért optikai denzitásban adjuk meg. A pozitív reaktivításokat, azaz az eredeti peptid reaktivitásának 50%-ánál magasabbakat félkövér betűtípussal írtuk.

Deléciós vagy szubsztitúciós peptidanalóg	Emberi szérumminta		
	P4	P7	P36
TATTTTYAYPGTNRPPV	0,839	1,845	0,825
TATTTTYAYPGTNRPP	0,096	0,144	0,086
TATTTTYAYPGTNRP	0,100	0,099	0,078
TATTTTYAYPGTNR	0,092	0,103	0,078
TATTTTYAYPGTN	0,186	0,888	0,083
TATTTTYAYPGT	0,095	0,087	0,072
TATTTTYAYPG	0,095	0,085	0,074
TATTTTYAYP	0,095	0,096	0,082
TATTTTYAY	0,098	0,089	0,083
TATTTTYA	0,115	0,089	0,090
TATTTTY	0,142	0,105	0,076
TATTTT	0,108	0,093	0,082
TATTT	0,101	0,091	0,078
TATT	0,099	0,105	0,076
ATTTTYAYPGTNRPPV	1,042	1,960	0,923
TTTTYAYPGTNRPPV	0,805	1,587	0,776

TTYAYPGTNRPPV	0,697	1,488	0,810
TTYAYPGTNRPPV	0,748	1,659	0,722
TYAYPGTNRPPV	0,707	1,508	0,712
YAYPGTNRPPV	0,647	1,546	0,677
AYPGTNRPPV	0,662	1,488	0,669
YPGTNRPPV	0,300	1,091	0,406
PGTNRPPV	0,166	0,430	0,123
GTNRPPV	0,300	0,887	0,210
TNRPPV	0,110	0,146	0,056
NRPPV	0,135	0,242	0,076
AATTTYAYPGTNRPPV	1,045	1,852	0,915
TGTITTYAYPGTNRPPV	0,855	1,829	0,806
TAATTTYAYPGTNRPPV	0,897	1,675	0,764
TATATTYAYPGTNRPPV	0,971	1,722	0,824
TATTATYAYPGTNRPPV	1,076	1,867	0,955
TATTTAYAYPGTNRPPV	1,011	1,833	1,027
TATTTTAAYPGTNRPPV	0,898	1,619	0,901
TATTTYGYPGTMRPPV	0,836	1,769	0,850
TATTTYAAPGTNRPPV	0,899	1,697	0,903
TATTTYAYAGTNRPPV	0,886	1,738	0,903
TATTTYAYPATNRPPV	0,895	1,503	0,734
TATTTYAYPGANRPPV	0,891	1,594	0,714
TATTTYAYPGTARPPV	1,226	1,723	0,696
TATTTYAYPGTNAPPV	0,761	1,558	0,708
TATTTYAYPGTNRAPV	0,720	1,551	0,812
TATTTYAYPGTNRPAV	0,090	0,092	0,100
TATTTYAYPGTNRPPA	0,108	0,105	0,095

Hivatkozások

1. Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K, Yoshizawa H, Miyakawa Y, Mayumi M., "A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology", Biochem. Biophys. Res. Commun. 241, 92-97. old. (1997)
2. Okamoto H, Akahane Y, Ukita M, Fukuda M, Tsuda F, Miyakawa Y, Mayumi M., "Fecal excretion of a nonenveloped DNA virus (TTV) associated with posttransfusion non-A-G hepatitis", J. Med. Virol. 56, 128-132. old. (1998)
3. Cossart Y., "TTV a common virus, but pathogenic?" [comment], Lancet 352, 164. old. (1998)
4. Okamoto H, Kato N, Iizuka H, Tsuda F, Miyakawa Y, Mayumi M., „Distinct genotypes of a nonenveloped DNA virus associated with posttransfusion non-A to G hepatitis (TT virus) in plasma and peripheral blood mononuclear cells" [In Process Citation], J. Med. Virol. 57, 252-258. old. (1999)
5. Naoumov NV, Petrova EP, Thomas MG, Williams R., "Presence of a newly described human DNA virus (TTV) in patients with liver disease", Lancet 352, 195-197. old. (1998)
6. Viazov S, Ross RS, Varenholz C, Lange R, Holtmann M, Niel C, Roggendorf M., "Lack of evidence for an association between TTV infection and severe liver

- disease" [In Process Citation], J. Clin. Virol. 11, 183-187. old. (1998)
7. Sällberg M, Ruden U, Magnus LO, Norrby E, Wahren B., "Rapid 'tea-bag' peptide synthesis using 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) protected amino acids applied for antigenic mapping of viral proteins", Immunology Letters 30, 59-68. old. (1991)
 8. Zhang ZX, Chen M, Hultgren C, Birkett A, Milich DR, Sällberg M., "Immune responses to the hepatitis C virus NS4a are profoundly influenced by the combination of the viral genotype and the host major histocompatibility complex", J. Gen. Virol. 78, 2735-2746. old. (1997)

SZEKVENCIALISTA

<210> 1

<211> 17

<212> PRT

<213> TT vírus

<400> 1

Thr Ala Thr Thr Thr Thr Tyr Ala Tyr Pro Gly Thr Asn Arg Pro
Pro Val

<210> 2

<211> 11

<212> PRT

<213> TT vírus

<400> 2

Tyr Ala Tyr Pro Gly Thr Asn Arg Pro Pro Val

<210> 3

<211> 17

<212> PRT

<213> TT vírus

<400> 3

Val Leu Ile Cys Gly Glu Asn Thr Val Ser Arg Asn Tyr Ala Thr
His Ser

<210> 4

<211> 17

<212> PRT

<213> TT virus

<400> 4

Lys Ile Asn Thr Met Pro Pro Leu Asp Thr Glu Leu Thr Ala Pro
Ser

<210> 5

<211> 17

<212> PRT

<213> TT virus

<400> 5

Pro Asp Glu Lys Ser Gln Arg Glu Ile Leu Leu Asn Lys Ile Ala
Ser Tyr

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

<213> TT virus

<400> 6

Gly Leu Tyr Ser Ser Ile Trp Leu Ser Pro Gly Arg Ser Tyr Phe
Glu Thr

<210> 7

<211> 17

<212> PRT

<213> TT virus

<400> 7

Tyr Thr Asp Ile Lys Tyr Asn Pro Phe Thr Asp Arg Gly Glu Gly
Asn Met

<210> 8

<211> 17

<212> PRT

<213> TT virus

<400> 8

Asp Gln Asn Ile His Met Asn Ala Arg Leu Leu Ile Arg Ser Pro
Phe Thr

<210> 9

<211> 17

<212> PRT

<213> TT virus

<400> 9

Leu Ile Arg Ser Pro Phe Thr Asp Pro Gln Leu Leu Val His Thr
Asp Pro

<210> 10

<211> 17

<212> PRT

<213> TT virus

<400> 10

Gln Lys Glu Ser Leu Leu Phe Pro Pro Val Lys Leu Leu Arg Arg
Val Pro

<210> 11

<211> 18

<212> PRT

<213> TT virus

<400> 11

Glu Asp Gly Gly Ala Gly Gly Asp Ala Asp His Gly Gly Ala Ala
Gly Gly Pro

Szabadalmi igénypontok

1. Thr Ala Thr Thr Thr Thr Tyr Ala Tyr Pro Gly Thr Asn Arg Pro Pro Val (1. azonosítószámú szekvencia) aminosav-szekvenciájú peptid, amelyben az N-terminális Thr Ala Thr Thr Thr Thr aminosavak közül 1-6 elhagyható.

2. Az 1. igénypont szerinti peptid, amelynek aminosav-szekvenciája Tyr Ala Tyr Pro Gly Thr Asn Arg Pro Pro Val (2. azonosítószámú szekvencia).

3. Peptidkeverék, amely az 1. igénypont szerinti peptidet és az alábbi peptidek közül legalább egyet tartalmaz:

Val Leu Ile Cys Gly Glu Asn Thr Val Ser Arg Asn Tyr Ala Thr His Ser (3. azonosítószámú szekvencia),

Lys Ile Asn Thr Met Pro Pro Phe Leu Asp Thr Glu Leu Thr Ala Pro Ser (4. azonosítószámú szekvencia),

Pro Asp Glu Lys Ser Gln Arg Glu Ile Leu Leu Asn Lys Ile Ala Ser Tyr (5. azonosítószámú szekvencia),

Gly Leu Tyr Ser Ser Ile Trp Leu Ser Pro Gly Arg Ser Tyr Phe Glu Thr (6. azonosítószámú szekvencia),

Tyr Thr Asp He Lys Tyr Asn Pro Phe Thr Asp Arg Gly Glu Gly Asn Met (7. azonosítószámú szekvencia),

Asp Gln Asn Ile His Met Asn Ala Arg Leu Leu Ile Arg Ser Pro Phe Thr (8. azonosítószámú szekvencia),

Leu Ile Arg Ser Pro Phe Thr Asp Pro Gln Leu Leu Val His Thr Asp Pro (9. azonosítószámú szekvencia),

Gln Lys Glu Ser Leu Leu Phe Pro Pro Val Lys Leu Leu Arg Arg Val
Pro (10. azonosítószámú szekvencia), és

Glu Asp Gly Gly Ala Gly Gly Asp Ala Asp His Gly Gly Ala Ala Gly
Gly Pro (11. azonosítószámú szekvencia).

4. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti peptid, vagy a 3. igénypont szerinti peptidkeverék, amely peptid, vagy amelyek közül legalább egy peptid hordozóhoz és/vagy jelölőanyaghoz van kapcsolva.

5. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti peptid, vagy a 3. igénypont szerinti peptidkeverék, amely peptid, vagy amelyek közül legalább egy peptid immobilizálva van szilárd fázison.

6. Az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti peptid, gyógyszerben történő alkalmazásra.

7. TT-vírushoz kötődő monospecifikus ellenanyag.

8. A 7. igénypont szerinti monospecifikus ellenanyag, amely az 1-11. azonosítószám szerinti aminosav-szekvenciák bármelyikéhez kötődik.

9. A 7. vagy 8. igénypont szerinti monospecifikus ellenanyag, gyógyszerben történő alkalmazásra.

10. Diagnosztikai reagenskészlet, amely diagnosztikai antigén(ek)ként 1-5. igénypontok bármelyike szerinti peptidet vagy peptidkeveréket tartalmaz.

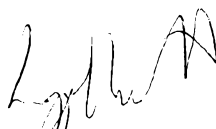
11. Diagnosztikai reagenskészlet, amely diagnosztikai ellenanyagként 7. vagy 8. igénypont szerinti, egy vagy több ellenanyagot tartalmaz.

12. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti peptid vagy peptidkeverék alkalmazása embertől különböző emlős immunizálására TT-vírus ellen irányuló monospecifikus ellenanyagok előállítására.

A meghatalmazott:

DANUBIA

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.



Lengyel Zsolt

szabadalmi ügyvivőjelölt

Lengyel