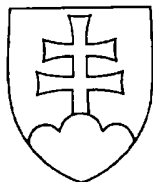


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ
PATENTOVÁ PRIHLÁŠKA

- (22) Dátum podania prihlášky: **3. 11. 2000**
(31) Číslo prioritnej prihlášky:
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky:
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority:
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **11. 9. 2003**
Vestník ÚPV SR č.: **9/2003**
(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **PCT/IT00/00442**
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **WO02/37115**

(11), (21) Číslo dokumentu:

536-2003

(13) Druh dokumentu: **A3**

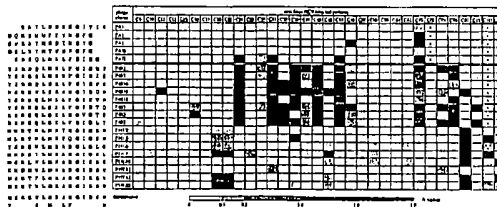
(51) Int. Cl.7 :

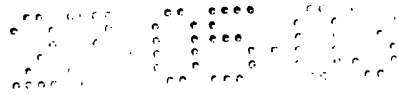
**G01N 33/576,
C07K 7/08,
C07K 14/18,
C12N 15/10**

- (71) Prihlasovateľ: **KENTON S. R. L., Pomezia, IT;**
(72) Pôvodca: **Felici Franco, Rome, IT;**
Gargano Nicola, Rome, IT;
Minenkova Olga, Montecompatri, IT;
Monaci Paolo, Rome, IT;
(74) Zástupca: **PATENTSERVIS BRATISLAVA, a. s., Bratislava, SK;**

(54) Názov: **Spôsob stanovenia antigénu**

- (57) Anotácia:
Spôsob na prípravu diagnózy antigénu založený na identifikácii väzobnej špecificity anti-antigénových molekúl protilátky v sére metódou detekcie protilátky napodobňujúcim antigénom (ADAM). Spôsob je založený na skríningu fágových knižníc použitím sér pacientov infikovaných antigénom a neinfikovaných jedincov, identifikácii peptidových väzobných protilátok (ligandov) špecifických pre uvedený antigén. Zlepšený spôsob je dosiahnutý in vitro maturačnou stratégiou; naviazanie ligandov na spoločné jadro ako MAP. Spôsob sa týka predovšetkým HCV.





Spôsob stanovenia antigénu

Oblasť techniky

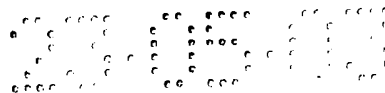
Predkladaný vynález sa týka diagnostického stanovenia infekčných pôvodcov, predovšetkým vírusov, hlavne ľudského vírusu hepatitídy C (tu skratkou označeného ako HCV), peptidových protilátok voči infekčnému pôvodcovi pre toto stanovenie, prípravy uvedených peptidov a kitov pre uskutočnenie týchto stanovení. Predkladaný vynález sa týka predovšetkým HCV, anti-HCV peptidov viažucich protilátky pre diagnostické stanovenie, spôsobov ich prípravy a kitov pre uskutočnenie týchto stanovení.

Doterajší stav techniky

Vírus hepatitídy C je hlavný etiologický pôvodca parenterálne prenosnej nie-A, nie-B hepatitídy. Tento vírus veľmi často spôsobuje pretrvávajúcu infekciu a často vedie k rozvoju chronickej hepatitídy a k cirhóze pečene. Predstavuje hlavnú príčinu chronických ochorení pečene vo svete (Boyer N., Marcellin P.: Pathogenesis, diagnosis and management of hepatitis C. J Hepatol 2000, 32:98-112).

Vírusová infekcia je diagnostikovaná detekciou anti-HCV protilátok v sére, alebo detekciou vírusovej RNA metódami amplifikácie nukleovej kyseliny (Robbins D.J., Pasupuleti V., Cuan J., Chiang C.S.: Reverse transcriptase PCR quantification of hepatitis C virus. Clin Lab Sci 2000, Winter; 13:23-30). Tieto metódy sú veľmi citlivé, sú však drahé a nie veľmi spoľahlivé a reprodukovateľné. Okrem toho, spoľahlivosť a špecificita PCR techniky nie sú štandardizované (Gretch D.R.: Diagnostic tests for hepatitis C. Hepatology 1997, 26 (3 Suppl 1):43S-47S).

Predkladaný vynález sa týka diagnózy infekčných ochorení, ako sú vírusové infekcie, predovšetkým HCV infekcie,



pomocou stanovenia protilátok voči infekčnému pôvodcovi, predovšetkým protilátok anti-HCV.

Len nedávno bol zverejnený systém pre citlivú detekciu HCV proteínu (Komatsu F., Takasaki K.: *Liver* 1999, 19(5): 375-80).

Veľmi veľké množstvo patentovaných a nepatentovaných literárnych údajov je zameraných na diagnostické metódy a kity pre detekciu HCV.

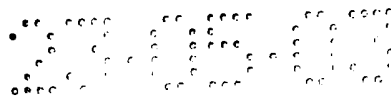
US 5,985,542 (Sumitomo Chemical Company), poskytuje kit pre ochorenia pečene, ako je hepatitída C a alkoholická cirhóza, ktorý obsahuje protilátku schopnú rozpoznať cytochróm P450.

US 5,972,347 (Baxter Aktiengesellschaft) popisuje kompozíciu pre liečenie HCV infekcie obsahujúci inaktivovaný naviazaný HCV pre neutralizáciu ľudských protilátok voči HCV, kde protilátky sú voči najmenej jednému proteínu vybranému zo skupiny obsahujúcej hlavný HCV proteín a NS3-proteín.

US 5,939,262, US 5,919,625 a US 5,677,124 (Ambion and Cenetron) poskytujú veľmi širokú metódu pre stanovenie prítomnosti sekvencie testovanej nukleovej kyseliny vo vzorke, čo zahrňuje získanie (ribo)nukleovej kyseliny rezistentnej voči (ribo)nukleáze.

US 5,866,139 (Institut Pasteur) poskytuje kit pre stanovenie prítomnosti špecifických protilátok voči HCV E-1. Pozri tiež US 5,854,001 (Abbot).

US 5,800,982 (Tonen) popisuje antigénne peptidy schopné špecifickej reakcie s protilátkami voči skupine II HCV. JP 10019897 (Tonen) poskytuje kit obsahujúci peptid so sekvenciou aminokyselín, kde najmenej päť aminokyselín tvoriacich proteín sa nachádza v neštruktúrnej oblasti 4A proteínu (NS4A) v HCV a v peptide, ktorý má sekvenciu aminokyselín, kde najmenej päť aminokyselín tvoriacich proteín sa nachádza v neštruktúrnej oblasti 4B (NS4B) v HCV.

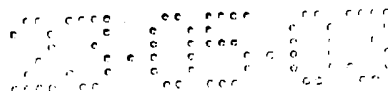


Prehľad doterajšieho stavu techniky tiež dopĺňujú US 5,871,904, US 5,869,253, US 5,750,331, US 5,747,241, US 5,667,992, US 5,645,983, US 5,625,034, US 5,610,009, WO 9707400, WO 9637783, EP 593291, EP 593290, EP 586065, JP 4349885.

Najrozšírenejším používaným stanovením HCV infekcie je stanovenie anti-HCV protilátok v sére. Od roku 1987, keď bol klónovaný genóm HCV, bolo vyvinutých množstvo anti-HCV diagnostických stanovení. Bežne dostupné diagnostické kity stanovia v sére protilátky voči zmеси štyroch rekombinantných antigénov zodpovedajúcich jadru HCV, neštrukturálnej oblasti 3, neštrukturálnej oblasti 4 a neštrukturálnej oblasti 5 HCV polypeptidu (Gretch D.R.: Diagnostic tests for hepatitis C. *Hepatology* 1997,26(3 Suppl 1):43S-47S). Vzorky, ktoré sú pozitívne týmto ELISA stanovením, musia byť potvrdené immunoblot metódou, keď je samostatne stanovená prítomnosť protilátok voči tým istým antigénom. Pozitívny výsledok si vyžaduje stanovenie protilátok voči najmenej dvom rekombinantným antigénom.

Pre určitú časť populácie s anti-HCV protilátkami, bola zistená reaktivita voči len jednému antigénu, čo znemožňuje jednoznačnú diagnózu. Ďalší problém spočíva v používaní rekombinantných antigénov, ktoré môžu byť rozpoznané protilátkami, ktoré sa nevzťahujú k HCV, a ktoré tvoria falošnú pozitívnu diagnózu. Pre konečnú diagnózu sú potrebné ďalšie vyšetrenia a dlhodobé monitorovanie pacienta.

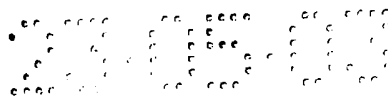
Kontakt cudzieho antigénu v organizme aktivuje špecifickú imunitnú odpoveď. Vlastnosti antigénu, ktorý je detekovaný humorálnou odpoveďou, sú definované epitópmi rozpoznávanými hosťiteľskými protilátkami. Pri predpoklade, že väzobné miesto pre protilátku je negatívnym obrazom epitopu, molekula, ktorá špecificky viaže paratop, reprezentuje pozitívny



obraz epitopu. Táto myšlienka predpokladá, čo sa týka humórálnej odpovede, že antigén môže byť vierohodne popísaný špecifickými ligandami, ktoré sa viažu na antigén-špecifické protilátky. Identifikácia týchto ligandov by poskytla spôsob odhalenia špecifickej humorálnej odpovede voči antigénu, nezávisle od toho, či rovnaký antigén je známy a/alebo dostupný.

Táto koncepcia bola použitá pre vyvinutie diagnostického stanovenia pre detekciu protilátok spôsobujúcich infekciu, HCV infekciu u ľudí. Skríning fágových knižníc HCV-pozitívnych sér, identifikoval peptidové ligandy, ktoré špecificky viažu anti-HCV protilátky. Dosiahlo sa to ad hoc stratégiou, hoci séra infikovaných pacientov obsahovali vírus-špecifické protilátky vo veľkej populácii iných protilátok s rozdielnymi väzobnými špecificitami.

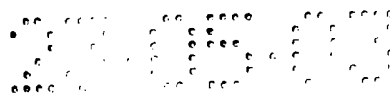
Skríning peptidov veľkým počtom negatívnych sér vylúčil také ligandy, ktoré detekovali protilátky v negatívnych vzorkách (falošne pozitívne), čo viedlo k výberu sady vysoko špecifických peptidov. Výskyt nešpecifických reakcií bol znížený použitím sekvencie krátkeho peptidu mimo prirodzeného antigénu. Tento postup je popísaný v EP 0 698 091 B1, publikovaný 28.02.1996. Pozri tiež J. Mol. Biol. (1991), 222, 301-310; Gene, 128 (1993), 51-57; Gene, 148 (1994), 7-13; The EMBO Journal, zv. 13, č. 9, 2236-2243, 1994; Bacterial Protein Toxins, Zb. Bakt. Suppl 24, 415-425 (1994); The Journal of Immunology (1996) 4504-4513; Methods in Molecular Biology, vol. 87, Humana Press Inc. str. 195-208; Combinatorial Libraries (R. Cortese ed.). Walter de Gruyter 1996, kapitola 8; Methods in Enzymology, (1996), zv. 267, 116-129; Biol. Chem. zv. 378, 495-502, June 1997; The EMBO Journal zv. 17, č. 13, 3521-3533, 1998; Nature Biotechnology, zv. 16, November 1998, 1068-1073.



Tieto stratégie výberu identifikujú také peptidové štruktúry, ktoré najlepšie viažu imunodominantné anti-HCV protilátky. Okrem toho, mnohoväzobnosť ligandu prispieva pri stanovení citlivosti k pozoruhodnej avidite. Pritom testovanie zmesou ADAM-HCV (ADAM = detekcia protilátky napodobňujúcim antigénom) viacerých sér, ktoré neboli použité v skríningu, viedlo k citlivosti nižšej ako 100 %, teda dosť vysokej. Príslušná anti-HCV humorálna odpoveď môže vysvetliť tento výsledok, nakoľko nezahrňuje hlavný imunodominantný epitop, ktorý je skôr nasmerovaný voči mnohým vírovým determinantom. Túto skutočnosť ďalej komplikuje existencia rôznych vírusových genotypov.

Bežne dostupné diagnostické kity určia v sére protilátky voči štyrom rekombinantným antigénom zodpovedajúcim veľkým oblastiam HCV polypeptidu (Gretch D.R: Diagnostic tests for hepatitis C. *Hepatology* 1997, 26(3 Suppl 1):43S-47S). Pozitívna diagnóza si vyžaduje stanovenie protilátok v sére voči najmenej dvom rekombinantných antigénom; preto je nemožné vyjadriť definitívnu diagnózu pre určitú populáciu s protilátkami voči HCV, hoci výnimočne môže byť odhalená reaktivita len s jedným antigénom. ADAM-HCV EIA (enzymatické imunostanovenie) používa viacej napodobujúcich imunodominantných epitopov z rôznych antigénov, čo zaisťuje istotu analýzy. Veľmi výrazne sa zníži výskyt pozitívnych vzoriek.

Venovali sme úsilie pre technický vývoj ADAM-HCV stanovenia (stratégia zverejnená vo vyššie uvedenom EP 0 698 091). Peptidy z fágových knižníc sú vybraté na základe N-koncovkej fúzie hlavného kapsidového proteínu pVIII. Použitie fágu ako diagnostického reakčného činidla má mnohé výhody: je výnimočne flexibilným reakčným činidlom, ktoré je namierené voči rôznym typom imunostanovenia (Dente a spol., 1994; F. Felici,



G. Galfre, A. Luzzago, P. Monaci, A. Nicosia a R. Cortese „Phage-displayed peptides as tools for characterization of human sera“. *Methods in Enzymology* 267, 116-129, 1996; Bartoli a spol., *Nature Biotechnology*, zv. 16, November 1998, 1068-1073), a nízka škála produkcie je ľahká a lacná.

Napriek týmto výhodám, koncentráciu molekuly peptidu obmedzuje veľkosť fágovej častice v stanovení. Interferencia protilátok v sére voči fágovému kapsidu si vyžaduje pridanie nosného fágu do zmesi, čo sekvestruje anti-fágové protilátky. Nakoniec, tvorba veľkej škály protilátok prináša pre biologické reagenty problémy mikrobiologickej kontaminácie, opakovania, kontroly kvality, prečistenia a nákladov.

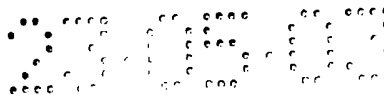
Jednoduché, lineárne syntetické peptidy odvodené od sekvencie fágového peptidu si vo väčšine týchto prípadov pre detekciu účinnej protilátky nezachovávajú citlivosť a špecificitu.

Anotácia

Zistilo sa, a je predmetom predkladaného vynálezu, že spôsob pre diagnózu infekčných ochorení, ako sú infekčné ochorenia, predovšetkým hepatitída C, je založený na identifikácii väzobnej špecificity molekúl anti-antigénových protilátok v sére metódou stanovenia protilátky pomocou napodobujúceho antigénu (ADAM). Obsahuje skríning knižnice fágov zo sér pacientov infikovaných antigénom a neinfikovaných jedincov, čím sú identifikované protilátky (ligandy) viažuce špecifické peptidy voči uvedenému antigénu. Vo výhodnom uskutočnení sa predkladaný vynález týka HCV infekcie.

Podrobný popis vynálezu

Prvé, výhodné uskutočnenie vynálezu sa týka spôsobu,



v ktorom sú ligandy upravené *in vitro* maturačným postupom.

Druhé uskutočnenie predkladaného vynálezu predstavuje spôsob, kde ligandy sú syntetické peptidy.

V treťom uskutočnení vynálezu sú uvedené ligandy naviazané na spoločné jadro. Predovšetkým vo výhodnom uskutočnení sú uvedené ligandy spolu s uvedeným spoločným MAP, podľa definície uvedené ďalej.

Iný cieľ predkladaného vynálezu je kolekcia HCV-špecifických ligandov získaných procesom obsahujúcim:

a) prvý selektívny výber fágovej knižnice n pozitívneho séra za vytvorenia prvých sérií n fágových fondov;

b) príprava zmesi n fondov obsahujúcich $n-1$ fondy;

c) výber afinity každej z n zmesi voči séru, ktoré vytvára výlučne fágový fond, za vzniku druhých sérií n fágových fondov, a prípadne

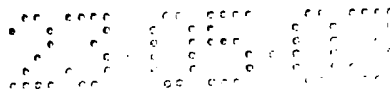
d) ďalší selektívny výber každého z druhých sérií n fágových fondov na zmesi obsahujúcej všetky n pôvodné séra s výnimkou tých, ktoré boli použité pri prvom selektívnom výbere;

e) imunoskríning výsledných druhých sérií n fágových fondov použitím zmesi všetkých n pôvodných sér za vzniku pozitívnych klónov;

f) testovanie jednotlivej reaktivity všetkých pozitívnych klónov s panelom pozitívnych a negatívnych sér použitím usporiadanej rady uvedených klónov ako fágy sekretujúcich kolónií;

g) vytvorenie replikácií uvedených kolónií secernujúcich fágy;

h) skríning každej repliky na reaktivitu s pozitívnymi a negatívnymi sérami, získanie klónov reagujúcich s pozitívnymi sérami;



i) použitie každého z uvedeného špecificky reagujúceho fágu ako ligátu, pre afinitné prečistenie protilátok z pozitívneho séra;

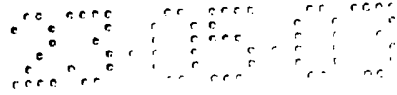
j) testovanie uvedených protilátok na ich reaktivitu s už identifikovanými antigén-špecifickými peptidmi;

k) oddelenie klónov, ktoré detekujú protilátky.

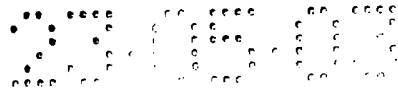
Jednotlivé peptidy pochádzajúce z vyššie uvedeného postupu sú tiež predmetom predkladaného vynálezu.

Predovšetkým, vo výhodnom uskutočnení predkladaného vynálezu v zmysle HCV, ďalším predmetom predkladaného vynálezu sú nasledujúce peptidy:

YSREQLNKLFGIDMT;
YSREQLNKMFGIEIS;
YSREQLSKLFGIEPM;
NSRWLSKAHGIEGM;
YSREQLNKLFGIEVM;
YSREQLSKLFGIDTQ;
KSREQLSKLHGVDTTS;
RSREQLSKLFGIDLT;
MWRTWLMKTHGIESW;
MLRTWLMKYQGIESW;
YSRSWLMKAHGLELG;
MMRSYLMKAHGIESL;
MSRLWLMKAHGISSE;
KHSEWLNKARGIESW;
MSRTFLMKAHGIESW;
MSRTWLMKAHGIESW;
AEGEKKLRRSTNWGDPK;
AEGEFKTRRQTNYQPAK;
AEGEFKTLRNANRLDPAK;
AEGEFKTLRNSNRLDPAK;
AEGEFKKFPGSSTPKDPAKAAFDSL;



AEGEFQDDARFPGGGDPAKAAFDSL;
PQDARFPGGGDPAKAAFDSL;
AEGEFKGAGGAQTVDWALLVDPAK;
AEGEFMQKHFGGAQWIMGDPAK;
AEGEFSLKSGGGQLRALVDPAK;
AEGEFSLKSGGAQLRALVDPAK;
AEGEFYLLKRSSPPDPAKAAFDSL;
AEGEFPILVGPYLLPRRSREEAVDPAK;
AEGEFPILVGYLLPRRSREEAVDPAK;
AEGEFRLGVRAPRKALDPAK;
AEGEFRLGVRALRKALDPAK;
AEGEFRLGVRALRKAPDPAK;
RLGVRALRKAPDPAK;
AEGEFTQPRGHSYQDPAK;
AEGEFLKERAEMSARKTLGADPAK;
AEGEFFYQIPRRMETKYGDPAK;
AEGEFSREQLNKLFIEGDPAK;
AEGEFNSREWLSKAHIEGMDPAK;
AEGEFRSREQLSKLFGIDLTDPAK;
AEGEFYSREQLNKLFIDMTDPAK;
AEGEFYSREQLNKMFIEIETSDPAK;
AEGEFYSREQLNKLFIEVMDPAK;
AEGEFKSREQLRKLHGFDTS DPAK;
AEGEFKMRNYLNKAFGIEGMDPAK;
AEGEFRSREQLSKLFGIELTDPAK;
AEGEFSRREYSNKAFGIETQDPAK;
AEGEFRRREYLNKAFGIEGGDPAK;
AEGEFSRREWLNKRFGIEYLDPAK;
AEGEFMSRTWLMKAHIESWDPAK;
AEGEFYSPEWLNKARGIDRSDPAK;
AEGEFKSREQLSKLHGVDTS DPAK;
AEGEFYSREQLNKMFIEIETSDPAK;



AEGEFYSRSWLMKAHGLELGDPK;
 AEGEFMMRSYLMKAHGIESLDPK;
 AEGEFMSRLWLMKAHGISEDPAK;
 AEGEFQPQEVHVYREQLGLDPAKAAFDSL;
 AEGEFGEVLYRGFDEVGGDPKAAFDSL;
 AGEPPYVIERGMQDPK;
 AEGEFTTASPAHFLVPLDPAKAAFDSL;
 AEGEFTTASPAHFLVPLDPAKAAFDSL;
 AEGEFTTASPSHFLVPLDPAKAAFDSL;
 AEGEFATAPPRHYSWDPK;
 AEGEFATAPP AHYSWDPK;
 AEGEFATAPPSHYSWDPK;
 AEGEFRFWKVPDYDPPAAGGDPK;
 AEGEFTESSVSSTLADLASKTFGSADPAK;
 AEGEFTLADLATMTFGSTDPK;
 AEGEFGLADLATLTFGSPDPK;

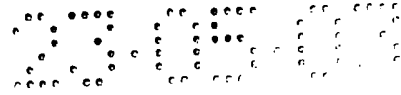
Pre zbierku predkladaného vynálezu je výhodnou fágovou knižnicou z kroku a) pVIII-12aa.

Pre zbierku predkladaného vynálezu inzerty výhodných klónov oddelených v kroku k) majú sekvencie

1. SREQLNKLFGIEG;
2. RATLSNEHGITIG;
3. DQRENWFKYHGFG;
4. EWRRYMSDIHGYG;
5. DSLRYMYVMPGFG.

V zbierke predkladaného vynálezu je výhodne vytvorená fágová knižnica reaktívnych klónov, výhodnejšie najlepšie reagujúcich klónov, ktoré sú čiastočne mutované tak, že každá aminokyselina v sekvencii klónu je nezávisle substituovaná ktoroukoľvek inou aminokyselinou.

V zbierke predkladaného vynálezu majú uvedené výhodné klóny výhodnú sekvenciu inzercie: SREQLNKLFGIEG.



V zbierke predkladaného vynálezu môže byť vo fágovej knižnici náhodná sekvencia lemovaná dvomi cysteínovými zvyškami. Tento aspekt sa môže všeobecne použiť pri šírení predkladaného vynálezu a nemusí sa obmedzovať len na prípad HCV.

Predmetom predkladaného vynálezu je použitie vyššie uvedenej zbierky pre prípravu diagnostických stanovení pre určenie infekčných pôvodcov, ako sú vírusy, predovšetkým HCV u jednotlivcov s podozrením na postihnutie infekčnými pôvodcami, ako sú vírusy, predovšetkým HCV.

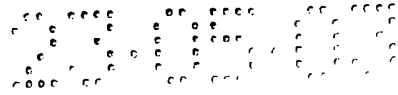
Predmetom predkladaného vynálezu je kit pre diagnostické účely, ktorý obsahuje vyššie uvedenú zbierku.

Predmetom predkladaného vynálezu sú imunogénne peptidy získané, buď vo forme zbierky alebo ako jediný peptid, tu uvedeným spôsobom. Uvedené peptidy sú užitočné ako imunogény, a preto sú vhodné pre prípravu vakcín, predovšetkým voči HCV. Bežne sú peptidy vo forme vyššie uvedeného kitu.

Výhodne, oproti systému na základe antigénu, diagnostické stanovenie, ktoré sme testovali, má zabudovanú stúpajúcu kapacitu: môže sa uskutočniť ad hoc výber tých sér, u ktorých sa nezistila žiadna odpoveď. Podobný postup môže byť použitý pre identifikáciu peptidového panelu, ktorý rozlišuje rôzne HCV genotypy, čo nahrádza drahé a pracné PCR techniky lacnejšími a rýchlejšími EIA.

Predkladaný vynález bude popísaný podrobnejšie pomocou príkladov a obrázkov.

Obrázok 1 zaznamenáva charakterizáciu klónov odvodených zo skríningu. Sekvencie aminokyselín vybratých klónov sú uvedené symbolmi jedného písmena. Horný a dolný panel zaznamenáva sekvencie odvodené od pôvodnej alebo sekundárnej knižnice. pVIII sekvencie lemujúce cudzí epitop sú (NH₂)AEGEF(cudzí epitop)DPAK. Šedé štvorce znamenajú zvyšky, ktoré sú častejšie prítomné v ktorejkoľvek polohe v klónoch



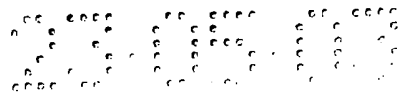
pôvodnej knižnice. Zvyšky, ktoré prispievajú ku konvenčnej sekvencii peptidov zo sekundárnej knižnice sú označené čiernou farbou. Uvedené hodnoty sú priemernými hodnotami dvoch nezávislých stanovení a týkajú sa rozdielu medzi absorbanciou ($A = A_{450\text{nm}} - A_{620\text{nm}}$) daného fágu a wt fágu pC89 (Felici a spol., 1991). * označuje netestované séra.

Obrázok 2 zaznamenáva identifikáciu fágu napodobňujúceho rovnaký determinant antigénu. Afinitne prečistené protilátky z pozitívneho séra C65 pomocou klónov PA1, PA3, PA8, a PA12 alebo PA18 (uvedené v prvom stĺpci) boli testované na ich reaktivitu voči rovnakému fágu (uvedené v prvom riadku).

Uvedené výsledky sú priemernými hodnotami z dvoch nezávislých stanovení a týkajú sa rozdielu medzi absorbanciou ($A = A_{450\text{nm}} - A_{620\text{nm}}$) daného fágu a wt fágu pC89 (Felici a spol., 1991).

Obrázok 3 zaznamenáva ELISA reaktivitu zmesi odvodenej zo sekundárnej knižnice pVIIIA12. Fágová zmes po selektívnom výbere knižnice pVIIIA12 z pozitívneho séra C76 bola testovaná ELISA s pozitívnymi sérami C12, C13, C29, C40, C47, C65, C73, C74, C76, C83 a C85. Biele, šedé a čierne stĺpce znamenajú reaktivitu wt fágu, pVIIIA12 knižnice a zmesi p76^{II}. Výsledky ELISA sú uvedené ako $A = A_{450\text{nm}} - A_{620\text{nm}}$. Uvedené hodnoty sú priemerné hodnoty z dvoch nezávislých stanovení.

Obrázok 4 zaznamenáva A: reaktivitu zmesi ADAM-HCV so sérom. Hraničná hodnota ($CO=0,232$) bola vypočítaná ako $CO = N + 5\sigma$, kde N je priemer a σ je štandardná odchylka hodnôt získaných pri použití negatívneho séra. B: ADAM-HCV EIA sér získaných z talianskeho Červeného kríža. Hraničná hodnota ($CO=0,252$) bola vypočítaná ako $CO = N + 5\sigma$, kde N je priemer a σ je štandardná odchylka hodnôt získaných z piatich negatívnych sér. ELISA, ako je popísané v Materiáloch a Metódach, odhalila väzbu peptidov na protilátky prítomné v ľudskom

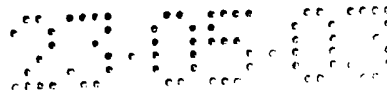


sére. Uvedené sú priemerné hodnoty dvoch nezávislých pokusov. Výsledky sú vyjadrené ako pomer medzi nameraným signálom a hraničnou hodnotou (S/CO). V každej skupine je uvedený počet testovaných sér.

Obrázok 5: ADAM/HCV EIA na paneli neurčitého séra. V ľavom stĺpci sú uvedené označenia testovaných HCV peptidov, zoskupených podľa ich väzobnej kapacity. Ďalšie štyri stĺpce zaznamenávajú reaktivitu uvedených peptidov s pozitívnymi (c25 a r15) a negatívnymi (r6 a r13) kontrolnými sérami. Každý ďalší stĺpec zaznamenáva reaktivitu uvedených peptidov neurčitými sérami. Väzba protilátok na HCV peptidy prítomné v ľudskom sére bola testovaná ELISA tak, ako je uvedené v kapitole Materiál a Metódy. Stanovili sa priemerné hodnoty z dvoch nezávislých pokusov. Pre každý peptid bola vypočítaná hraničná hodnota (CO) ako $CO = N + 5\sigma$, kde N je hodnota priemeru a σ znamená štandardnú chybu priemeru, z 31 negatívnych kontrolných sér. Výsledky sú vyjadrené ako pomer medzi nameraným signálom a hraničnou hodnotou (S/CO).

Obrázok 6: ADAM-HCV/SIA pozitívnych, negatívnych a neurčitých sér. Nasledujúce ADAM-HCV peptidy boli zoskupené podľa ich väzobnej špecificity a boli imobilizované na nylonovú membránu s následným získaním 10 pásov: m1909,2 a m1913,2 (A); m1901,31, m3322,3, m3362,3 (B); m1977,1 (C); m3551,3 (D); m3566,3 (E); m858, mF78 a mH1 (F); mA12,1, mA12,2 a mA12,12 (G); mB11,17 (H); mG21,2 (I); m1929A3,1, m1929C3,4 a m1929,21 (J). Ako vnútorná pozitívna kontrola bol použitý prečistený ľudský IgG (pos. ctrl.). Väzba protilátok na HCV peptidy prítomné v ľudskom sére bola detekovaná tak, ako je uvedené v kapitole Materiál a Metódy.

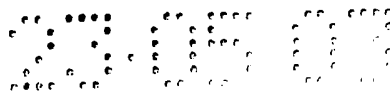
V najvýhodnejšom uskutočnení predkladaného vynálezu boli syntetizované mnohopočetné antigénové peptidy (MAP), v ktorých C-zakončenie ôsmich identických peptidových sekvencií je



pripojených k spoločnému jadru (Tam, J.P.: Synthetic peptide vaccine design: synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system. Proc. Natl. Acad. Sci. 85 (1988), 5409-5413).

Výhodne, panel HCV-špecifických ligandov získaných podľa predkladaného vynálezu, zahŕňa peptidy napodobňujúce HCV NS3, čo je imunodominantný HCV antigén. V prípade výhodného uskutočnenia, podľa našich vedomostí, je po prvýkrát popísaný krátky peptid, ktorý napodobňuje imunodominantný NS3 determinant. Pepsan analýza NS3 proteínu ukázala dlhšiu sekvenciu, ktorá výnimočne reagovala s pozitívnym sérom (Khudyakov Y. a spol., 1995, Virology 206:666-672).

Naproti tomu iné prístupy (Santini C., Brennan D., Mennuni C., Hoess R.H., Nicosia A., Cortese R., Luzzago A.: Efficient display of an HCV cDNA expression library as C-terminal fusion to the capsid protein D of bacteriophage lambda. J. Mol. Biol. 1998, 282(1):125-135; Pereboeva J.: Med. Virol. 1998, 56(2):105-111) izolovali veľké proteínové domény, ktoré si zachovávali antigénne vlastnosti. Prístup, ktorý sme vyvinuli obsahuje preto vnútorné vlastnosti, ktoré nespočívajú na použitie alebo informácie HCV antigénov, môže byť dokonca aplikovaný na systémy s neznámym antigénom, a vytvára tým proces vedúci k odhaleniu antigénu. Fágy náhodných peptidových knižníc (fágové knižnice) predstavujú účinný nástroj pre identifikáciu ligandov, ktoré sú špecificky rozpoznané anti-HCV protilátkami séra. Fágové peptidy majú široký potenciál napodobňovania, nakoľko sú schopné napodobniť lineárne, konformačné a dokonca aj neproteínové epitopy (pozri prehľad Felici F., Luzzago A., Monaci P., Nicosia A., Sollazzo M., Traboni C.: Peptide and protein display on the surface of filamentous bacteriophage. Biotechnol. Annu. Rev.



1995, 1:149-183; Zwick M.B., Shen J., Scott J.K.: Phage-displayed peptide libraries. Curr. Opin. Biotechnol. 1998, 9(4):427-436).

V predkladanom vynáleze je uvedená identifikácia širšej kolekcie účinných HCV-špecifických ligandov a vývoj nového typu diagnostického kitu pre stanovenie anti-HCV protilátok v sére.

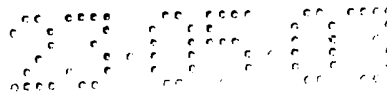
Peptidy podľa predkladaného vynálezu môžu byť použité na diagnostiku alebo ako imunogény, alebo ako vakcíny.

Farmaceutické kompozície obsahujúce imunogény a vakcíny podľa predkladaného vynálezu sú pripravené spôsobmi bežne známymi pre odborníkov. Napríklad, môžu byť pripravené tak, ako je uvedené v EP 0 698 091.

PRÍKAD

Identifikácia HCV-špecifickými ligandami nových väzobných vlastností

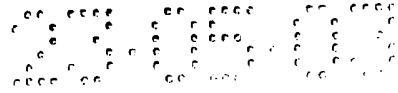
Selektívny výber fágovej knižnice pVIII-12aa sa uskutočnil z 8 pozitívnych sér (C13, C14, C27, C29, C40, C47, C62 a C65). Vytvorilo sa tak 8 fágových fondov (označených ako p13^I, p14^I, p27^I, p29^I, p40^I, p47^I, p62^I a p65^I). Pripravených bolo osem zmesí, každá obsahovala kombináciu siedmich z ôsmich fágových fondov. Každá zmes bola afinitne vyselektovaná použitím séra, ktoré tvorilo výhradný fond fágu: napríklad, zmes mix Δ p65, zložená z fondov p13^I, p14^I, p27^I, p29^I, p40^I, p47^I a p62^I bola selektívne vybratá zo séra C65. Každý zo zvyšných ôsmich fágových fondov (označených ako p13^{II}, p14^{II}, atď.) bol individuálne selektívne vybratý zo zmesi tvorenej všetkými pôvodnými sérami s výnimkou toho, ktoré bolo použité v predchádzajúcej selekcii. Napríklad, fond p13^{II} bol selektívne vybratý zo zmesi sér C14, C27, C29, C40, C47, C62 a C65.



Imunoskríning výsledných ôsmich fágových fondov použitím zmesi všetkých ôsmich pôvodných sér poskytol veľký počet pozitívnych klónov. Testovali sme individuálnu reaktivitu všetkých týchto klónov na paneli pozitívnych a negatívnych sér za vytvorenia usporiadaného zoznamu klónov, ako kolónií sekretujúcich fágy. Podľa ich rastu bola celá sada klónov nanesená na nitrocelulózoý filter. Tento postup bol zopakovaný pre vytvorenie viacerých replík, ktoré boli potom individuálne a simultánne testované na ich reaktivitu s pozitívnymi a negatívnymi sérami. Získalo sa tak veľa klónov, ktoré špecificky reagovali s pozitívnym sérom. Každý z týchto fágov bol použitý ako ligát pre afinitné prečistenie protilátok z pozitívneho séra. Tieto protilátky boli potom testované ELISA na ich reaktivitu s ktoroukoľvek zo 4 už identifikovaných skupín HCV-peptidov (Prezzi C., Nuzzo M., Meola A., Delmastro R., Galfre C., Cortese R., Nicosia A., Monaci P. 1996, 1. *Immunology*, 156:4504-4513; Bartoli a spol. *Nature Biotechnology*, zv. 16, 1998, 1068-1073). Táto analýza oddelila 12 klónov, ktoré detekovali protilátky v sére novou väzobnou špecificitou, čo indikuje ich antigénne vlastnosti, ktoré sú odlišné od tých, ktoré sú už známe.

Sekvenčná analýza identifikovala 5 rôznych sekvencií. Boli pripravené supernatanty kultúr každého z týchto 5 klónov (PA1, PA3, PA8, PA12 a PA18) a ich ELISA reaktivita bola testovaná s 30 rôznymi pozitívnymi a 24 negatívnymi sérami (Obrázok 1). Len klóny PA8 a PA12 vykazovali štatisticky významnú reaktivitu s pozitívnymi sérami ($p < 0,2$).

Fág PA1 bol potom použitý na imunopurifikáciu protilátok zo séra C65. Tieto prečistené protilátky špecificky reagovali s klónmi PA3, PA8, PA12, PA18, rovnako ako so samotným klónom PA1. Znamená to, že tieto fágy môžu byť zoskupené do výnimočnej triedy rozpoznannej protilátkami rovnakej špecificity



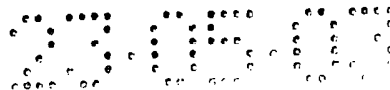
(Obrázok 2). Pri použití ligátu divokého typu, alebo keď protilátky boli afinitne prečistené z negatívneho séra nebola zaznamenaná žiadna reaktivita so žiadnym z vyššie uvedených klónov.

Keď bol na imunopurifikáciu protilátok séra použitý rozdielny klón z tej istej skupiny, alebo keď bolo použité iné pozitívne sérum, získali sme výsledky konzistentné s reaktivitou uvedenou na Obrázku 1. Napríklad, keď fág PA3 bol použitý na imunopurifikáciu protilátok z rovnakého séra, tieto protilátky reagovali s klónmi PA8 a PA12, okrem toho s rovnakým PA3. Tieto výsledky znamenajú, že klóny PA1, PA3, PA8, PA12 a PA18 detekujú protilátky reakciou s rovnakým B-bunkovým epitopom, čo sa predpokladá na základe malej podobnosti sekvencie peptidov (Obrázok 1).

Afinitné dozrievanie HCV peptidu

Bola vytvorená fágová knižnica, v ktorej bola sekvencia klónu PA12 bola čiastočne mutovaná. V tejto „sekundárnej“ knižnici, nazvanej pVIIIA12, boli syntetizované oligonukleotidy tak, že každá aminokyselina SREQLNKLFGIEG sekvencie bola nezávisle substituovaná ktoroukoľvek inou aminokyselinou: teoreticky sa substitúcia v každej polohe môže vyskytnúť vo frekvencii 20 %. Okrem toho, na oboch stranách sekvencie cudzieho peptidu bol zahrnutý náhodný zvyšok. pVIIIA12 knižnica bola dvakrát selektívne vybratá z 12 pozitívnych sér (C8, C10, C12, C13, C22, C58, C60, C76, C83, C85, C141 a C177).

Pri testovaní ELISA sa ukázalo, že fágový fond p76^{II}, p141^{II} a p177^{II} (odvodené pri selekcii C76, C141 a C177) majú najvyššiu a najširšiu reaktivitu s pozitívnymi sérami a boli preto ďalej analyzované (Obrázok 3). Na základe tejto reaktivity boli fágové fondy p76^{II}, p141^{II} a p177^{II} vystavené imunoskríngu použitím sér C40, C141 a C177. Analýza vybrala



z každého fondu niekoľko klónov, ktoré boli potom individuálne testované na ich reaktivitu s mnohými rôzne pozitívnymi a negatívnymi sérami podľa filter-replika protokolu tak, ako je podrobne popísané vyššie. Tento záverečný skrining oddelil 51 klónov špecificky reagujúcich s pozitívnymi sérami.

Sekvenčná analýza odhalila 16 rôznych sekvencií (8, 5 a 3 odvodené z fondu p76^{II}, p141^{II} a p177^{II}). Z kultúr týchto klónov boli pripravené supernatanty a ich ELISA reaktivita bola testovaná s 33 rôznymi pozitívnymi a 24 negatívnymi sérami (Obrázok 1).

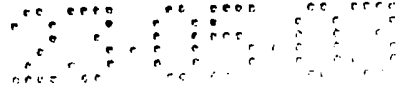
Klóny P40,17 a P40,7 reagovali s pozitívnejšími sérami (42 %). Ich kombinácia s klónmi P141,7 a P177,22 dávala 70 % reakciu s pozitívnymi sérami. Zoradenie vybratých peptidov definuje konvenčnú sekvenciu (M/Y)SRE(W/Q)L(M/N)K(A/L)(H/F)GIES(W/M).

Identifikácia ďalších HCV-špecifických ligandov

Podobná selekčná stratégia bola uskutočnená s cieľom identifikovať ligandy nových väzobných vlastností, ktoré sa líšia od už známych ligandov. Uskutočnil sa skrining fágových knižníc rôznej dĺžky, v ktorých náhodná sekvencia bola buď kompletne alebo náhodne lemovaná dvomi cysteínovými zvyškami, čo vytváralo konformáciu peptidu.

Pre výber fágových knižníc sa použili rôzne kombinácie sér a fágových fondov. Fágové fondy, ktoré vykazovali zaujímavé profily reaktivity s pozitívnymi sérami boli ďalej analyzované. Stanovenie reaktivity veľkého počtu jednotlivých klónov opakovaným skriningom oddelilo fágy vykazujúce špecifickú reaktivitu s pozitívnymi sérami.

Zamerali sme sa na klóny so zaujímavými reaktívnymi vlastnosťami.



Testovanie týchto klónov s protilátkami, ktoré boli afinitne prečistené z HCV peptidov vylúčilo tie klóny, ktoré napodobňovali antigénne vlastnosti už identifikovaných peptidov. Klóny, ktoré zostali po tejto selekcii boli testované ELISA s veľkým počtom pozitívnych a negatívnych sér, čím sa štatisticky definovala ich HCV špecificita.

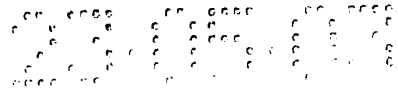
Tieto vyselektované klóny boli ďalej vylepšené vytvorením a skríningom sekundárnych knižníc, kde sekvencia pôvodného klónu alebo populácie klónov bola čiastočne mutovaná a vystavená opätovnému skríningu. Vybrali sa tak varianty so zlepšenými väzobnými vlastnosťami. Tento krok bol uskutočnený prevzatím rôznych stratégií, ktoré už boli popísané (napríklad, článok Urbanelli, Zhu). Toto rozsiahle a opakované úsilie identifikovalo 7 nových skupín ligandov, ktoré špecificky viažu HCV-špecifické sérové protilátky s rôznou väzobnou špecificitou.

Skríning fágového rozsahu HVR1 variantov použitím zo séra izolovaných peptidov špecificky reagujúcich s veľkým množstvom pozitívnych sér (Puntoriero a spol.; Nicosia - nepublikované). Sada HVR1 fágových peptidov odvodených z tohoto skríningu bola analyzovaná na ich reaktivitu s panelom našich sér. Použitím pozitívnych sér mF78, mH1 a m858 boli identifikované tri peptidy s vysokou reaktívnou špecificitou.

Záverom, bolo identifikovaných 12 skupín ligandov, vrátane 4 skupín identifikovaných v minulosti (Bartoli a spol., *Nature Biotechnology*, 1998 zv. 16, 1068-1043; Prezzi C., Nuzzo M., Meola A., Delmastro R., Galfre C., Cortese R., Nicosia A., Monaci P. 1996, 1. *Immunology*, 156:4504-4513). Pozri Obrázok 5, skupiny A až L.

Od fágu k syntetickému peptidu

Bolo syntetizovaných dvadsať dva peptidových sekvencií odvodených z 12 skupín HCV-ligandov ako okta-vetvené mnoho-

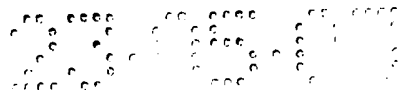


násobné antigénne peptidy (ADAM-HCV peptidy). V tejto molekule je osem identických peptidových sekvencií spojených cez vidlicový lyzín k spoločnému jadrú za vytvorenia členitého zobrazenia podobného pVIII-fúznym peptidom na fágovom kapside. Sekvencie ADAM-HCV peptidov sú nasledovné:

m858	ETYTTGGAAARTTSGLTSLFSPGPSQN
m1901,31	AEGEFKKFPGSSTPKDPAKAAFDSL
m1901,34	AEGEFPEDTFPGSKLILSGDPAKAAFDSL
m1909,2	AEGEFKTRRNTNYQDPAK
m1913,2	AEGEFKTLRNTNRLDPAK
m1929,21	AEGEFATASPTHYTSELDPAK
m1929A3,1	AEGEFTTASPTHFLVPLDPAK
m1929C3,4	AEGEFATAPPSHYSWDPAK
m1977,1	AEGEFPYLLPRRSREEAVDPAK
m3322,3	AEGEFPQDARFPGGGDPAK
m3362,3	AEGEFLSLKSGGGQLRALVDPAK
m3551,3	AEGEFLGVRALRKAPDPAK
m3566,3	AEGEFKTSVRSVPRARPPINGDPAK
mA12,1	AEGEFNSREWLSKAHGIEGMDPAK
mA12,2	AEGEFRSREQLSKLFGIDLTDPAK
mA12,13	AEGEFMSRTWLMKAHGIESWDPAK
mB11,17	AEGEFRELLYEAFDDMEGDPAK
mF78	QTHTTGGQAGHQHSLTGLFSPGAKQN
mG21,2	AGEPYVIEQGMMDPAK
mH1	QTHTTGGVVGHATSGLTSLFSPGPSQN
mN15,3	AEGEFGLADLATLTFGSTDPAK
mS48,5	AEGEFRFWKVPDYDPPAAGGDPAK

ich analytické vlastnosti sú zhrnuté v tabulke 1, ktorá je včlenená medzi obrázky.

V mnohých prípadoch sa ukázalo, že pVIII sekvencie lemujúce cudzí epitop (NH₂AEGEF a/alebo DPAK-COOH) sú relevantné svojou väzobnou špecificitou k príslušnému peptidu.



Zmes obsahujúca tieto 22 ADAM-HCV peptidy (ADAM-HCV zmes) bola použitá na detekciu prítomnosti anti-HCV protilátok pomocou EIA (ADAM/HCV EIA). ADAM-HCV zmes peptidov bola imobilizovaná pasívnym pokrytím na dno viacjamkovej ELISA platni a bola inkubovaná s 1:40 zriedeným sérom po dobu 40 minút. Ľudské protilátky naviazané na peptidy boli detekované 20 minútovou inkubáciou s anti-ľudským konjugátom a merané chromogénnou enzymatickou reakciou.

Ako je uvedené na Obrázku 4A, ADAM-HCV EIA účinne rozlišuje pozitívne a negatívne séra.

ADAM-HCV/EIA

Pomocou ADAM/HCV-EIA boli testované HCV-pozitívne a HCV-negatívne séra na prítomnosť anti-HCV protilátok (Obrázok 4B). Skúška rozpoznala všetky pozitívne séra a tiež ukázala 100 % špecificitu pri identifikácii negatívnych vzoriek.

Neurčité vzorky

Zbierka sér, diagnostikovaných ako neurčité vzorky podľa komerčne dostupného HCV- potvrdzujúceho stanovenia, bola získaná z rôznych zdrojov. 23 ADAM-HCV peptidov bolo samostatne testovaných pomocou ELISA na ich reaktivitu s 31 vzorkami (Obrázok 5). 6 vzoriek nereagovalo so žiadnym testovaným MAP a boli preto posúdené ako negatívne. 8 vzoriek rozpoznalo len jeden antigén, čo potvrdilo neurčitú analýzu. Nakoniec, 17 vzoriek vykázalo dve alebo viac reakcií voči rôznym skupinám peptidov, čo znamená, že sú pozitívne.

ADAM-HCV imunoblot stanovenie (ADAM-HCV/SIA)

ADAM-HCV peptidy boli kovalentne imobilizované na aktivovanú nylonovú membránu, čím sa získal prúžok s desiatimi pásikmi. Každá čiarka znamená rôzne peptidy



s rovnakou väzobnou špecificitou, tak ako podrobne ukazuje Obrázok 6. Ako kontrola bola použitá vzorka prečisteného ľudského IgG a predstavovala vnútornú pozitívnu kontrolu. Vybratý počet vzoriek z neurčitých sér bol testovaný na ich reaktivitu s imobilizovanými antigénmi pomocou inkubácie vzorky séra s prúžkom. Anti-HCV protilátky vychytané jednotlivými antigénmi boli vizualizované inkubáciou prúžkov s anti-ľudským enzýmovým konjugátom, potom nasledovala kolorimetrická enzymatická reakcia. Reaktivita vzoriek s peptidovými pásikmi bola stanovená vizuálne tak, že sa porovnala intenzita každého pasiku s príslušným pásikom internej pozitívnej kontroly.

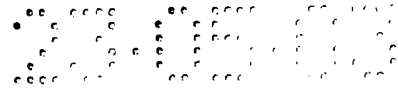
ADAM-HCV/SIA ukázalo reaktivitu všetkých testovaných 8 pozitívnych sér k mnohým rôznym vírusovým determinantom napodobňujúcim ADAM-HCV peptidy. Žiadna reaktivita nebola zistená pri testovaní 8 negatívnych sér (Obrázok 6).

Pomocou ADAM-SIA sme tiež analyzovali vybratý počet neurčitých vzoriek. Ako ukazuje Obrázok 6, analýzy 8 neurčitých sér potvrdili výsledky získané ADAM-HCV/EIA pomocou jednotlivých sér. Znamená to porovnateľnú citlivosť oboch stanovení.

MATERIÁL A METÓDY

Fágové knižnice

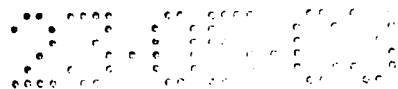
Ako zdroj ligandov sa použili štyri fágové knižnice náhodných peptidov: pVIII9aa, pVIII9aa_cys, pVIII12aa, pVIII15aa a pVIIIA12. pVIII9aa (Felici a spol., 1991), pVIII12aa a pVIII15aa sú tri rôzne knižnice tvorené náhodnými 9-mérmi, 12-mérmi a 15-mérmi, ktoré sa zobrazujú na filamentnom fágu ako fúzia s NH₂ zakončením hlavného proteínu pVIII. pVIII9aa_cys je knižnica, v ktorej náhodný nonapeptid je lemovaný dvomi cysteínovými zvyškami (Luzzago a spol.,



1993). V tejto knižnici cysteíny podmieňujú vytvorenie disulfidového mostíka, ktorý do určitej miery prispieva ku konformácii peptidu. pVIII A12 knižnica bola vytvorená syntézou oligonukleotidu kódujúceho sekvenciu aminokyselín SREQLNKLFGIEG. Úpravou metódy rezín-štiepacej syntézy (Glaser a spol., 1992), bola každá aminokyselina substituovaná NNS tripletom s frekvenciou 20 %. Okrem toho, boli zahrnuté náhodné zvyšky na oba konce cudzej peptidovej sekvencie. Všetkých päť knižníc bolo vytvorených tak, ako bolo popísané (Folgori a spol., 1998). Pre každú z piatich knižníc bola komplexnosť knižnice na základe jednotlivých klónov získaných po transformácii baktérií asi 1×10^8 .

Ludské séra

Ludské séra použité v tejto štúdii boli náhodne zozbierané od zdravých dobrovoľníkov, darcov krvi pre transfúzie a z klinických oddelení. Menovite, mnoho neurčitých vzoriek použitých v tejto štúdii bolo získaných z Virologického laboratória, Istituto Superiore di Sanita, Roma (Taliansko) a z Centro Nazionale Transfusione Sangue della Croce Rossa Italiana, Roma (Taliansko). Séra boli testované na prítomnosť protilátok voči HCV druhou generáciou HCV ELISA kitov (Ortho Diagnostic Systems, Bersee, Belgicko) a boli potvrdené prvou generáciou dot blot imunoanalytickým RIBA HCV testom (Chiron Co., Emeryville, CA). Séra boli tiež testované na neprítomnosť protilátok voči HBsAg a voči HIV-1/HIV-2 vírusom pomocou AUSAB EIA testu (Abbot Labs, Chicago, IL) a treťou generáciou HIV-1/HIV-2 EIA testov (Abbot Labs, South Pasadena, CA). Pozitívne vzorky na prítomnosť anti-HCV protilátok, ale negatívne na anti-HBsAg a anti HIV protilátky, boli zahrnuté do tejto štúdie ako HCV-pozitívne séra. Do štúdie boli zahrnuté séra negatívne na prítomnosť protilátok voči všetkým trom antigénom ako HCV-negatívne séra.

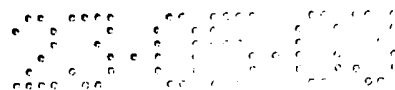


Afinitná selekcia a imunoskríning

HCV-pozitívne séra boli použité na afinitnú selekciu fágových náhodných peptidových knižníc tak, ako popísal Folgori a spol., 1998; Felici a spol., 1996; Prezzi a spol., 1996. Klóny po afinitnej selekcii boli analyzované imunoskríningom pomocou sér tak, ako popísali Prezzi a spol., 1996 a Minenkova a spol.

ELISA používajúca klóny fágov

Postup ELISA stanovenia používajúca klóny fágov a ľudské séra bol nasledovný. Supernatanty fágov boli pripravené z DH5 α -F' infikovaných buniek tak, ako už bolo popísané (Felici a spol., 1991). Viacjamkové platne (Immunoplate Maxisorp, Nunc, Roskilde, Dánsko) boli pokryté počas noci pri teplote 4 °C 200 μ l anti-pIII monoklonálnou protilátkou 57D1 (Dente a spol., 1994) v koncentrácii 1 μ g protilátky/ml v 50 mM NAHCO₃, pH 9,6. Po odstránení roztoku boli platne inkubované pri teplote 37 °C 60 minút ELISA blokovacím pufrom (0,1 % kazeín, 1 % TRITON-X100 v PBS). Platne boli premyté niekoľkokrát PBS/0,05 % Tween-20 (premyvací pufer). Potom sa do každej jamky pridala 1:1 zmes ELISA blokovacieho pufru a číreho fágového supernatantu a reakcia trvala 1 hodinu pri teplote 37 °C. 1:40 zriedené ľudské sérum bolo inkubované 30 minút pri izbovej teplote s 5x10¹⁰ plaky tvoriacimi jednotkami (pfu) fágu f11,1 (Dente a spol., 1996), 25 μ l/ml proteínovým extraktom z DH5-F' buniek infikovaných fágom f11,1 (Dente a spol.,) a s 25 μ l supernatantu z krysích hybridómových buniek v ELISA blokovacom pufri. Po odstránení supernatantu, boli platne premyté premyvacím pufrom a do každej jamky bolo pridaných 200 μ l pre-inkubovaného séra. Nasledovala 60 minútová inkubácia pri teplote 37 °C a platne boli potom premyté premyvacím pufrom. Potom do každej jamky bolo pridané 1:20 000 zriedené kozie anti-ľudské IgG HRP-

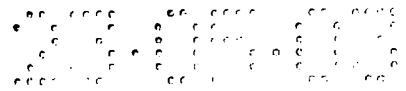


konj. (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA) v blokovacom pufri druhej protilátky (1 % Triton, 1 % kónské sérum, 50 % teľacie sérum v PBS, Mab supernatant 5 μ l/jamka). Po 30 minútovej inkubácii pri teplote 37 °C boli platne premyté a peroxidázová aktivita bola hodnotená po inkubácii s 200 μ l TMB substrátovým systémom (SIGMA, St. Louis, Mo). Po 15 minútach bola reakcia zastavená pridaním 25 μ l 2M H₂SO₄. Platne boli vyhodnotené na automatickom ELISA čítači (Labsystems Multiskan Bichromatic, Helsinki, Fínsko) a výsledky boli vyjadrené ako $A = A_{450\text{nm}} - A_{620\text{nm}}$. ELISA hodnoty sú priemerom hodnôt dvoch nezávislých stanovení. Štatisticky priekazné rozdiely sú vtedy, keď boli namerané viac ako 3σ ($\sigma = \{1/2[\sigma^2_p + \sigma^2_w]\}^{1/2}$) oproti signálu pozadia pre wt fág.

Hodnota p týkajúca sa klónov PA8 a PA12 je pravdepodobnosť, že pozorovaná frekvencia reaktivity pozitívnych a negatívnych sér je štatisticky rovnaká podľa χ^2 testu.

Afinitné prečistenie fagotop-špecifických protilátok zo séra

Petriho misky s priemerom 60 mm (Becton Dickinson Labware, NJ) boli pokryté cez noc pri teplote 4 °C roztokom 1×10^{11} CsCl-prečistených fágových častíc/ml v 50 mM NaHCO₃, pH 9,6. Po premytí roztokom PBS/Tween boli misky inkubované 60 minút pri teplote 37 °C ELISA blokovacím pufrom. Zmes ľudskeho séra (riedenie 1/100 ELISA blokovacím pufrom), 1×10^{12} f11,1 pfu/ml a 25 μ l/ml XL1- blue proteínového extraktu buniek bola inkubovaná 60 minút pri izbovej teplote. Po odstránení blokovacieho pufra bola pridaná na platňu preinkubovaná zmes. Inkubácia sa uskutočnila pri 4 °C a trvala cez noc. Zriedené sérum bolo odstránené a miska bola premytá premývacím pufrom. Naviazané protilátky boli vymyté 0,1 M glycín-HCl pufrom pH 2,7 s 10 μ l BSA na neutralizáciu.



Charakterizácia fágových klónov

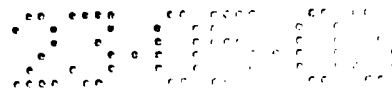
Afinitne prečistené klóny boli testované štandardnou ELISA na ich reaktivitu voči fagotopom. Typicky, viacjamková platňa bola cez noc pri teplote 4 °C pokrytá (100 µl/jamka) roztokom 1×10^{11} TU/ml CsCl-prečisteným fágom v 50 mM NaHCO₃, pH 9,6. Po premytí roztokom PBS/Tween boli platne inkubované 60 minút pri 37 °C blokovacím pufrom. Potom bolo do každej jamky pridaných 100 µl afinitne prečistených protilátok a inkubácia pri teplote 4 °C trvala cez noc. Platne boli potom premyté chladným roztokom PBS/Tween a bolo pridaných 100 µl/jamka kozie anti-ludskej IgG (Fc špecifická) alkalické fosfatázy konjugovanej na protilátky (Sigma, St. Louis, MO), zriedenie 1/5 000 v blokovacom pufri. Po 2 hodinovej inkubácii pri izbovej teplote boli platne premyté a alkalická fosfatáza bola hodnotená tak, ako je popísané vyššie.

Syntetické peptidy

Použili sme syntetické oktavetvené antigénne peptidy (MAPs): (Tam, 199X). Syntéza sa uskutočnila prietokovou polyamidovou metódou (Pessi a spol., 1990). Peptidy boli rozpustené v dimetyl sulfoxide.

ELISA používajúca syntetické peptidy

Viacjamkové platne (Immuno plate Maxisorp, Nunc, Roskilde, Dánsko) boli pokryté cez noc MAP roztokom v koncentrácii 10 µg/ml v 50 mM NaHCO₃, pH 9,6. Po odstránení kvapaliny boli platne inkubované 60 minút pri teplote 37 °C s ELISA blokovacím pufrom (0,1 % kazeín, 1% Triton-X100 v PBS). Platne boli premyté niekoľkokrát roztokom PBS/0,05 % Tween-20 (premyvací pufer). Do každej jamky bolo potom pridané ľudské sérum zriedené 1:40 a inkubácia trvala 40 minút pri teplote 37 °C. Platne boli potom premyté premyvacím pufrom a potom bol do každej pridaný ELISA blokovací pufer s 1:20 000 zriedeným kozím anti-ludským IgG konjugovaným s HRP



(Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA). Po 20 minútovej inkubácii pri teplote 37 °C boli platne premyté a peroxidázová aktivita bola stanovená po pridaní TMB substrátu (SIGMA, St. Louis, MO). Po 15 minútach bola reakcia zastavená pridaním 2M H₂SO₄. Platne boli hodnotené automatickým ELISA prístrojom (Labsystems Multiscan Bichromatic, Helsinki, Fínsko) a výsledky boli vyjadrené ako $A = A_{450\text{nm}} - A_{620\text{nm}}$. Hodnoty ELISA sú výsledkom dvoch nezávislých stanovení.

LITERÁRNE ODKAZY

Smith C.P., Petrenko V.A.: 1997, Phage display. Chem. Rev. 97: 391-410.

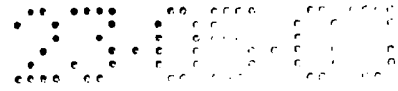
Folgori A., Tafi R., Meola A., Felici F., Galfre G., Cortese R., Monaci P., Nicosia A.: 1994, A general strategy to identify mimotopes of pathological antigens using only random peptide libraries and human sera. EMBO 1. 13:2236-2243.

Prezzi C., Nuzzo M., Meola A., Delmastro R., Galfre C., Cortese R., Nicosia A., Monaci P.: 1996, 1. Immunology. 156:4504-4513.

Alter H.J.,: 1995, To C or not to C: these are the questions. Blood, 85:1681.

Felici F., Castagnoli L., Musacchio A., Jappelli R., Cesareni C.: 1991, Selection of antibodies ligands from a large library of oligopeptides expressed on a multivalent exposition vector. J. Mol. Biol. 222:301-310.

Luzzago A., Felici F., Tramontano A., Pessi A., Cortese R.: 1993, Mimicking of discontinuous epitopes by phage displayed peptides. I. Epitope mapping of human H ferritin using a phage library of constrained peptides. Gene 128:50-57.



Dente L., Cesareni G., Micheli C., Felici F., Folgori A., Luzzago A., Monaci P., Nicosia A., Delmastro P.: 1994, Monoclonal antibodies that recognise filamentous phage. Useful tools for phage display technology. *Gene* 148:7.

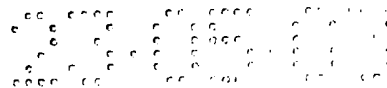
Sambrook J., Fritsch T., Maniatis T.: 1989, *Molecular Cloning; a laboratory manual* (second edition).

Takamizawa A., Mori C., Fuke I., Manabe S., Murakami S., Fujita J., Onoshi E., Andoh T., Yoshida I., Okayama H.: 1991, Structure and organisation of the Hepatitis C virus genome isolated from human carriers. I. *Virology* 65:1105-1113.

Smith D.B.: 1993, Purification of glutathione S-Transferase fusion proteins. *Methods in molecular and cellular biology*. 4:220-229.

Frangioni F.V., Neel B.J.: 1993, Solubilization and purification of enzymatically active glutathione S-transferase (pGex) fusion proteins. *Analyt. Biochem.* 210:179-187.

Komatsu F., Takasaki K.: 1999, Determination of serum hepatitis C virus (HCV) core protein using a novel approach for quantitative evaluation of HCV viraemia in anti-HCV-positive patients. *Liver* 19:375-380.



P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Spôsob diagnózy antigénu, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že identifikuje väzobnú špecificitu molekúl anti-antigénovej protilátky v sére spôsobom detekcie protilátky mimikujúcej antigén (ADAM), ktorá obsahuje skrining fágových knižníc za použitia sér pacientov infikovaných antigénom a neinfikovaných jedincov, identifikáciou väzobných protilátok (ligandov) špecificky asociovaných s uvedeným antigénom.

2. Spôsob podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že lepšie cvlastnosti ligandov sú dosiahnuté maturačnou stratégiou.

3. Spôsob podľa nároku 1 alebo 2, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že uvedené ligandy sú syntetické peptidy.

4. Spôsob podľa nároku 1 alebo 2 alebo 3, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že uvedené ligandy sú pripojené na spoločné jadro.

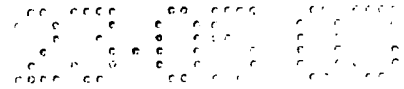
5. Spôsob podľa nároku 4, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že uvedené ligandy spolu s uvedeným spoločným jadrom sú MAP.

6. Kolekcia antigén-špecifických ligandov získaná postupom:

a) prvý selektívny výber fágovej knižnice n pozitívneho séra za vytvorenia prvých sérií n fágových fondov;

b) príprava zmesi n fondov obsahujúcich $n-1$ fondy;

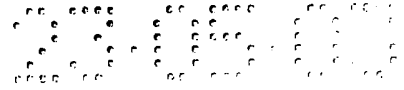
c) výber afinity každej z n zmesi voči séru, ktoré vytvára výlučne fágový fond, za vzniku druhých sérií n fágových fondov, a prípadne



- d) ďalší selektívny výber každého z druhých sérií *n* fágových fondov na zmesi obsahujúcej všetky *n* pôvodné séra s výnimkou tých, ktoré boli použité pri prvom selektívnom výbere;
- e) imunoskríning výsledných druhých sérií *n* fágových fondov použitím zmesi všetkých *n* pôvodných sér za vzniku pozitívnych klónov;
- f) testovanie jednotlivej reaktivity všetkých pozitívnych klónov s panelom pozitívnych a negatívnych sér použitím usporiadanej rady uvedených klónov ako fágy sekretujúcich kolónií;
- g) vytvorenie replikácií uvedených kolónií secernujúcich fágy;
- h) skríning každej repliky na reaktivitu s pozitívnymi a negatívnymi sérami, získanie klónov reagujúcich s pozitívnymi sérami;
- i) použitie každého z uvedeného špecificky reagujúceho fágu ako ligátu, pre afinitné prečistenie protilátok z pozitívneho séra;
- j) testovanie uvedených protilátok na ich reaktivitu s už identifikovanými antigén-špecifickými peptidmi;
- k) oddelenie klónov, ktoré detekujú protilátky.

7. Spôsob diagnózy hepatitídy C obsahuje identifikáciu väzobnej špecificity molekúl anti-HCV protilátky v sére spôsobom detekcie protilátky mimikujúcim antigén (ADAM), obsahuje skríning fágových knižníc použitím sér od HCV pacientov a neinfikovaných jedincov, identifikácia peptidy viažucich protilátok (ligandov) špecificky asociovaných s HCV infekciou.

8. Spôsob podľa nároku 7, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že uvedené ligandy majú lepšie vlastnosti dosiahnuté in vitro maturačným spôsobom.



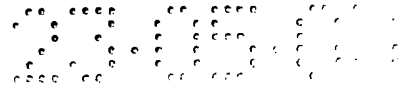
9. Spôsob podľa nároku 7 alebo 8, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že uvedené ligandy sú syntetické peptidy.

10. Spôsob podľa nároku 6 alebo 7 alebo 8, v y z n a č u - j ú c i s a t ý m, že uvedené ligandy sú naviazané na spoločné jadro.

11. Spôsob podľa nároku 8, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že uvedené ligandy spolu so spoločným jadrom tvoria MAP.

12. Kolekcia HCV-špecifických ligandov získaná spôsobom, ktorý obsahuje:

- a) prvý selektívny výber fágovej knižnice n pozitívneho séra za vytvorenia prvých sérií n fágových fondov;
- b) príprava zmesi n fondov obsahujúcich n-1 fondy;
- c) výber afinity každej z n zmesi voči séru, ktoré vytvára výlučne fágový fond za vzniku druhých sérií n fágových fondov, a prípadne
- d) ďalší selektívny výber každého z druhých sérií n fágových fondov na zmesi obsahujúcej všetky n pôvodné séra s výnimkou tých, ktoré boli použité pri prvom selektívnom výbere;
- e) imunokríning výsledných druhých sérií n fágových fondov použitím zmesi všetkých n pôvodných sér za vzniku pozitívnych klónov;
- f) testovanie jednotlivej reaktivity všetkých pozitívnych klónov s panelom pozitívnych a negatívnych sér použitím usporiadanej rady uvedených klónov ako fágy sekretujúcich kolónií;
- g) vytvorenie replikácií uvedených kolónií secernujúcich fágy;



h) skrining každej repliky na reaktivitu s pozitívnymi a negatívnymi sérami, získanie klónov reagujúcich s pozitívnymi sérami;

i) použitie každého z uvedeného špecificky reagujúceho fágu ako ligátu, pre afinitné prečistenie protilátok z pozitívneho séra;

j) testovanie uvedených protilátok na ich reaktivitu s už identifikovanými antigén-špecifickými peptidmi;

k) oddelenie klónov, ktoré detekujú protilátky.

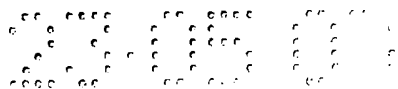
13. Kolekcia podľa nároku 12, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že fágová knižnica z kroku a) je pVIII-12aa.

14. Kolekcia podľa nároku 12 a 13, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že inzerty klónov oddelených v kroku k) v nároku 12, majú nasledovné sekvencie: SREQLNKLFIEG, RATLSNEHGITIG, DQRENWFKYHGFG, EWRRYMSDIHGYG, DSLRYMYVMPGFG.

15. Kolekcia podľa nároku 12, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že je vytvorená fágová knižnica, v ktorej najlepšie reagujúce klóny sú čiastočne mutované tak, že každá aminokyselina sekvencie klónu je nezávisle substituovaná akoukoľvek inou aminokyselinou.

16. Kolekcia podľa nároku 12, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že je vytvorená fágová knižnica, v ktorej reaktívne klóny sú čiastočne mutované tak, že každá aminokyselina sekvencie klónu je nezávisle substituovaná akoukoľvek inou aminokyselinou.

17. Kolekcia podľa nároku 15 alebo 16, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že uvedené klóny majú nasledovnú sekvenciu inzertu: SREQLNKLFIEG.



18. Kolekcia podľa ktoréhokolvek z nárokov 12 až 17, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že v uvedenej fágovej knižnici je náhodná sekvencia lemovaná dvomi cysteínovými zvyškami.

19. Kolekcia podľa ktoréhokolvek z nárokov 12 až 18, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že sekvencia peptidu je pripojená na spoločné jadro.

20. Kolekcia podľa nároku 17, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že uvedený peptid spolu s uvedeným spoločným jadrom je MAP.

21. Použitie kolekcie z ktoréhokolvek nároku 12 až 20 pre prípravu diagnostického stanovenia pre určenie HCV u jedinca s podozrením na infekciu uvedenej HCV.

22. Kit pre diagnostické účely, obsahujúci kolekciu podľa nároku 6.

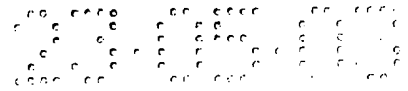
23. Kit pre diagnózu HCV obsahujúci kolekciu ktoréhokolvek z nárokov 12 až 20.

24. Kit podľa nároku 22 alebo 23, obsahujúci prúžky, na ktoré je imobilizovaná uvedená kolekcia.

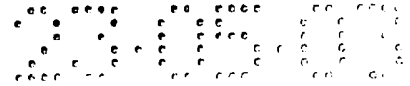
25. Kit podľa nároku 24, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že uvedený prúžok ďalej obsahuje vnútornú štandardu.

26. Peptid je vybraný zo skupiny:

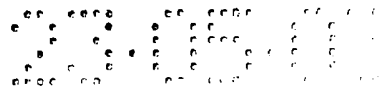
- i) SRQLNKLFGIEG;
- ii) RATLSNEHGITIG;
- iii) DQRENWFKYHGFG;



- iv) EWRRYMSDIHGYG;
- v) DSLRYMYVMPGFG;
- vi) YSREQLNKLFGIDTM;
- vii) YSREQLNKMFGIEIS;
- viii) YSREQLSKLFGIEPM;
- ix) NSRWLSKAHGESGM;
- x) YSREQLNKLFGIEVM;
- xi) YSRWQLSKLFGIDTQ;
- xii) KSREQLSKLHGVDTS;
- xiii) RSREQLSKLFGIDLT;
- xiv) MWRTL MKTHGIESW;
- xv) MLRTWLMKYQGIESW;
- xvi) YSRSWLMKAHGLELG;
- xvii) MMRSYLMKAHGIESL;
- xviii) MSRLWLMKAHGISSE;
- xix) KHSEWLNKARGIESW;
- xx) MSRTFLMKAHGIESW;
- xxi) MSRTWLMKAHGIESW;
- xxii) AEGEKLLRRSTNWGDPK;
- xxiii) AEGRFKTRRQTNYQDPK;
- xxiv) AEGEFKTLRNARLDPK;
- xxv) AEGEFKTLRNSNRLDPK;
- xxvi) AEGEFKKFPGSSTPKDPAKAAFDL;
- xxvii) AEGEFPQDARFPGGGDPKAAFDL;
- xxviii) PQDARFPGGGDPKAAFDL;
- xxix) AEGEFKGAGGAQTVDWALLVDPK;
- xxx) AEGEFMQKHFGGAQWIMGDPK;
- xxxi) AEGEFLSLKSGGGQLRALVDPK;
- xxxii) AEGEFLSLKSGGAQLRALVDPK;
- xxxiii) AEGEFYLLKRSSPPDPKAAFDL;
- xxxiv) AEGEFPILVGPYLLPRRSREEAVDPK;
- xxxv) AEGEFPILVGPYLLPRRSREEAVDPKKGK;

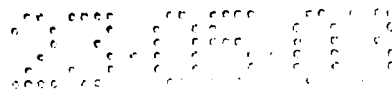


xxxvi) AEGEFRLGVRAPRKALDPAK;
 xxxvii) AEGEFRLGVRALRKALDPAK;
 xxxviii) AEGEFRLGVRALRKAPDPAK;
 xxxix) RLGVRALRKAPDPAK;
 xl) AEGEFTQPRGHSYQDPAK;
 xli) AEGEFLKERAEMSARKTLGADPAK;
 xlii) AEGEFFYQIPRRMETKYGDPAK;
 xliii) AEGEFSREQLNKLFIEGDPAK;
 xliv) AEGEFNSREWLSKAHGIEGMDPAK;
 xlv) AEGEFRSREQLSLFGIDLTDPAK;
 xlvi) AEGEFYSREQLNKLFIDMTDPAK;
 xlvii) AEGEFYSREQLNKMFGIETSDPAK;
 xlviii) AEGEFYSREQLNKLFIEVMDPAK;
 xlix) AEGEFKSREQLRKLHGFDTSDPAK;
 l) AEGEFKMRNYLNKAFGIEGMDPAK;
 li) AEGEFRSREQLSKLFGIELTDPAK;
 lii) AEGEFSRREYSNKAFGIETQDPAK;
 liii) AEGEFRRRWYLNKAFGIEGGDPAK;
 liv) AEGEFSRREWLNKRFGIEYLDPAK;
 lv) AEGEFMSRTWLMKAHGIESWDPAK;
 lvi) AEGEFYSPEWLNKARGIDRSDPAK;
 lvii) AEGEFKSREQLSKLHGVDTS DPAK;
 lviii) AEGEFYSREQLNKMFGIEISDPAK;
 lix) AGEFYSRSWLMKAHGLELGDPAK;
 lx) AEGEFMMRSYLMKAHGIESLDPAK;
 lxi) AEGEFMSRLWLMKAHGISSEDPAK;
 lxii) AEGEFPQPQEVHVYREQLGLDPAKAAFDSL;
 lxiii) AEGEFGEVLYRGFDEVGGDPKAAFDSL;
 lxiv) AGEFYVVIERGMDPAK;
 lxv) AEGEFTTASPRHFLVPLDPAKAAFDSL;
 lxvi) AEGEFTTASPAHFLVPLDPAKAAFDSL;



- lxvii) AEGETTASPSHFLVPLDPAKAAFDL;
- lxviii) AEGETATAPPRHYSWDPK;
- lxix) AEGETATAPPAHYSWDPK;
- lxx) AEGETATAPPSHYSWDPK;
- lxxi) AEGETFRWKVPDYDPPAAGGDPK;
- lxxii) AEGETESSVSSTLADLASKTFGSADPK;
- lxxiii) AEGETLADLATMTFGSTDPK;
- lxxiv) AEGETGLADLATLTFGSPDPK;

27. Použitie peptidov podľa nároku 26 v spôsobe nárokov 7 až 11.
28. Kolekcia podľa ktoréhokolvek z nárokov 12 až 20 obsahujúca aspoň jeden peptid z nároku 26.
29. Kit pre detekciu infekcie obsahujúci kolekciu podľa nároku 6.
30. Kit podľa nároku 29 obsahujúci prúžky, na ktorých je imobilizovaná uvedená kolekcia.
31. Kit podľa nároku 30, kde uvedený prúžok ďalej obsahuje vnútornú štandardu.
32. Kit na detekciu HCV infekcie obsahujúci kolekciu ktoréhokolvek z nárokov 12 až 20.
33. Kit na detekciu HCV infekcie obsahujúci najmenej jeden peptid z kolekcie nároku 25.
34. Kit podľa nároku 32 alebo 33 obsahujúci prúžky, na ktorých je imobilizovaná uvedená kolekcia.

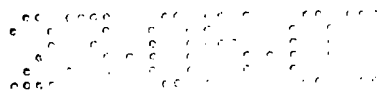


35. Kit podľa nároku 34, kde uvedený prúžok ďalej obsahuje vnútornú štandardu.

36. Použitie kolekcie z nároku 6 pre prípravu vakcín.

37. Použitie kolekcie z ktoréhokoľvek nároku 12 až 20, alebo aspoň jedného peptidu z nároku 26, pre prípravu vakcín voči HCV.

38. Vakcína voči HCV obsahujúca najmenej kolekciu ktoréhokoľvek z nárokov 12 až 20, alebo aspoň peptidu z nároku 26.

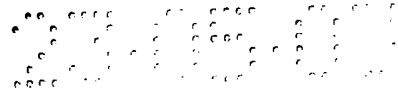


ZOZNAM SEKVENCIÍ

<110> KENTON Srl
 <120> Diagnostické stanovenie
 <130> 015-KT-00-PCT
 <140> PCT/IT00/00442
 <141> 2000-11-07
 <160> 74
 <170> PatentIn Ver. 2.0
 <210> 1
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Umelá sekvencia
 <220>
 <223> Popis umelej sekvencie: fágová knižnica klónu
 <400> 1
 Ser Arg Glu Gln Leu Asn Lys Leu Phe Gly Ile Glu Gly
 1 5 10

 <210> 2
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> umelá sekvencia
 <220>
 <223> Popis umelej sekvencie: fágová knižnica klónu
 <400> 2
 Arg Ala Thr Leu Ser Asn Glu His Gly Ile Thr Ile Gly
 1 5 10

 <210> 3
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> umelá sekvencia
 <220>



<223> Popis umelej sekvencie: fágová knižnica klónu

<400> 3

Asp Gln Arg Glu Asn Trp Phe Lys Tyr His Gly Phe Gly
 1 5 10

<210> 4

<211> 13

<212> PRT

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> Popis umelej sekvencie: fágová knižnica klónu

<400> 4

Glu Trp Arg Arg Tyr Met Ser Asp Ile His Gly Tyr Gly
 1 5 10

<210> 5

<211> 13

<212> PRT

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> Popis umelej sekvencie: fágová knižnica klónu

<400> 5

Asp Ser Leu Arg Tyr Met Tyr Val Met Pro Gly Phe Gly
 1 5 10

<210> 6

<211> 15

<212> PRT

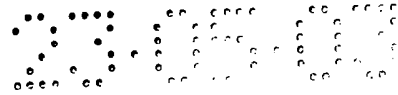
<213> umelá sekvencia

<220>

<223> Popis umelej sekvencie: fágová knižnica klónu

<400> 6

Tyr Ser Arg Glu Gln Leu Asn Lys Leu Phe Gly Ile Asp Met Thr
 1 5 10 15

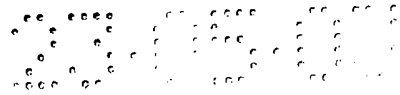


<210> 7
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> umelá sekvencia
 <220>
 <223> Popis umelej sekvencie: fágová knižnica klónu
 <400> 7
 Tyr Ser Arg Glu Gln Leu Asn Lys Met Phe Gly Ile Glu Ile Ser
 1 5 10 15

<210> 8
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> umelá sekvencia
 <220>
 <223> Popis umelej sekvencie: fágová knižnica klónu
 <400> 8
 Tyr Ser Arg Glu Gln Leu Ser Lys Leu Phe Gly Ile Glu Pro Met
 1 5 10 15

<210> 9
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> umelá sekvencia
 <220>
 <223> Popis umelej sekvencie: fágová knižnica klónu
 <400> 9
 Asn Ser Arg Trp Leu Ser Lys Ala His Gly Ile Glu Gly Met
 1 5 10

<210> 10
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> umelá sekvencia
 <220>



<223> Popis umelej sekvencie: fágová knižnica klónu
 <400> 10
 Tyr Ser Arg Glu Gln Leu Asn Lys Leu Phe Gly Ile Glu Val Met
 1 5 10 15

<210> 11
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> umelá sekvencia
 <220>

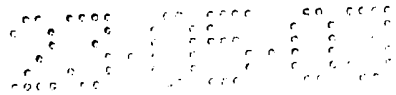
<223> Popis umelej sekvencie: fágová knižnica klónu
 <400> 11
 Tyr Ser Arg Glu Gln Leu Ser Lys Leu Phe Gly Ile Asp Thr Gln
 1 5 10 15

<210> 12
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> umelá sekvencia
 <220>

<223> Popis umelej sekvencie: fágová knižnica klónu
 <400> 12
 Lys Ser Arg Glu Gln Leu Ser Lys Leu His Gly Val Asp Thr Ser
 1 5 10 15

<210> 13
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> umelá sekvencia
 <220>

<223> Popis umelej sekvencie: fágová knižnica klónu
 <400> 13
 Arg Ser Arg Glu Gln Leu Ser Lys Leu Phe Gly Ile Asp Leu Thr
 1 5 10 15



<223> Popis umelej sekvencie: fágová knižnica klónu

<400> 17

Met Met Arg Ser Tyr Leu Met Lys Ala His Gly Ile Glu Ser Leu
 1 5 10 15

<210> 18

<211> 15

<212> PRT

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> Popis umelej sekvencie: fágová knižnica klónu

<400> 18

Met Ser Arg Leu Trp Leu Met Lys Ala His Gly Ile Ser Ser Glu
 1 5 10 15

<210> 19

<211> 15

<212> PRT

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> Popis umelej sekvencie: fágová knižnica klónu

<400> 19

Lys His Ser Glu Trp Leu Asn Lys Ala Arg Gly Ile Glu Ser Trp
 1 5 10 15

<210> 20

<211> 15

<212> PRT

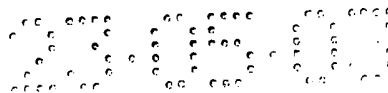
<213> umelá sekvencia

<220>

<223> Popis umelej sekvencie: fágová knižnica klónu

<400> 20

Met Ser Arg Thr Phe Leu Met Lys Ala His Gly Ile Glu Ser Trp
 1 5 10 15

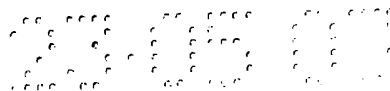


<210> 21
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> umelá sekvencia
 <220>
 <223> Popis umelej sekvencie: fágová knižnica klónu
 <400> 21
 Met Ser Arg Thr Trp Leu Met Lys Ala His Gly Ile Glu Ser Trp
 1 5 10 15

<210> 22
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> umelá sekvencia
 <220>
 <223> Popis umelej sekvencie: fágová knižnica klónu
 <400> 22
 Ala Glu Gly Glu Lys Lys Leu Arg Arg Ser Thr Asn Trp Gly Asp Pro Ala Lys
 1 5 10 15

<210> 23
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> umelá sekvencia
 <220>
 <223> Popis umelej sekvencie: fágová knižnica klónu
 <400> 23
 Ala Glu Gly Glu Phe Lys Thr Arg Arg Gln Thr Asn Tyr Gln Asp Pro Ala Lys
 1 5 10 15

<210> 24
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> umelá sekvencia
 <220>



<223> Popis umelej sekvencie: fágová knižnica klónu

<400> 24

Ala Glu Gly Glu Phe Lys Thr Leu Arg Asn Ala Asn Arg Leu Asp Pro Ala Lys
 1 5 10 15

<210> 25

<211> 18

<212> PRT

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> Popis umelej sekvencie: fágová knižnica klónu

<400> 25

Ala Glu Gly Glu Phe Lys Thr Leu Arg Asn Ser Asn Arg Leu Asp Pro Ala Lys
 1 5 10 15

<210> 26

<211> 25

<212> PRT

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> Popis umelej sekvencie: fágová knižnica klónu

<400> 26

Ala Glu Gly Glu Phe Lys Lys Phe Pro Gly Ser Ser Thr Pro Lys
 1 5 10 15
 Asp Pro Ala Lys Ala Ala Phe Asp Ser Leu
 20 25

<210> 27

<211> 25

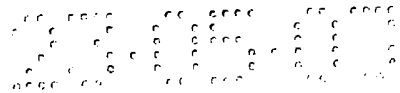
<212> PRT

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> Popis umelej sekvencie: fágová knižnica klónu

<400> 27



Ala Glu Gly Glu Phe Met Gln His Phe Gly Gly Ala Gln Trp Ile
 1 5 10 15
 Met Gly Asp Pro Ala Lys
 20

<210> 31

<211> 24

<212> PRT

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> Popis umelej sekvencie: fágová knižnica klónu

<400> 31

Ala Glu Gly Glu Phe Leu Ser Leu Lys Gly Ser Gly Gly Gly Gln
 1 5 10 15
 Leu Arg Ala Leu Val Asp Pro Ala Lys
 20

<210> 32

<211> 24

<212> PRT

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> Popis umelej sekvencie: fágová knižnica klónu

<400> 32

Ala Glu Gly Glu Phe Leu Ser Leu Lys Gly Ser Gly Gly Ala Gln
 1 5 10 15
 Leu Arg Ala Leu Val Asp Pro Ala Lys
 20

<210> 33

<211> 24

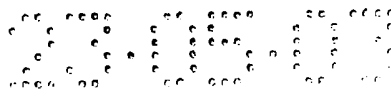
<212> PRT

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> Popis umelej sekvencie: fágová knižnica klónu

<400> 33



Ala Glu Gly Glu Phe Tyr Leu Leu Lys Arg Ser Ser Pro Pro Asp
 1 5 10 15
 Pro Ala Lys Ala Ala Phe Asp Ser Leu
 20

<210> 34

<211> 27

<212> PRT

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> Popis umelej sekvencie: fágová knižnica klónu

<400> 34

Ala Glu Gly Glu Phe Pro Ile Leu Val Gly Pro Tyr Leu Leu Pro
 1 5 10 15
 Arg Arg Ser Arg Glu Glu Ala Val Asp Pro Ala Lys
 20 25

<210> 35

<211> 29

<212> PRT

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> Popis umelej sekvencie: fágová knižnica klónu

<400> 35

Ala Glu Gly Glu Phe Pro Ile Leu Val Gly Pro Tyr Leu Leu Pro
 1 5 10 15
 Arg Arg Ser Arg Glu Glu Ala Val Asp Pro Ala Lys Gly Lys
 20 25

<210> 36

<211> 20

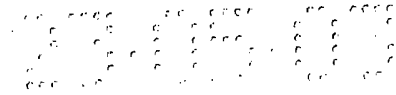
<212> PRT

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> Popis umelej sekvencie: fágová knižnica klónu

<400> 36



Ala Glu Gly Glu Phe Arg Leu Gly Val Arg Ala Pro Arg Lys Ala
 1 5 10 15
 Leu Asp Pro Ala Lys
 20

<210> 37

<211> 20

<212> PRT

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> Popis umelej sekvencie: fágová knižnica klónu

<400> 37

Ala Glu Gly Glu Phe Arg Leu Gly Val Arg Ala Leu Arg Lys Ala
 1 5 10 15
 Leu Asp Pro Ala Lys
 20

<210> 38

<211> 20

<212> PRT

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> Popis umelej sekvencie: fágová knižnica klónu

<400> 38

Ala Glu Gly Glu Phe Arg Leu Gly Val Arg Ala Leu Arg Lys Ala
 1 5 10 15
 Pro Asp Pro Ala Lys
 20

<210> 39

<211> 15

<212> PRT

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> Popis umelej sekvencie: fágová knižnica klónu

<400> 39

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30
 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45
 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60
 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75
 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90
 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100

Arg Leu Gly Val Arg Ala Leu Arg Lys Ala Pro Asp Pro Ala Lys
 1 5 10 15

<210> 40

<211> 18

<212> PRT

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> Popis umelej sekvencie: fágová knižnica klónu

<400> 40

Ala Glu Gly Glu Phe Thr Gln Pro Arg Gly His Ser Tyr Gln Asp
 1 5 10 15
 Pro Ala Lys

<210> 41

<211> 24

<212> PRT

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> Popis umelej sekvencie: fágová knižnica klónu

<400> 41

Ala Glu Gly Glu Phe Leu Lys Glu Arg Ala Glu Met Ser Ala Arg
 1 5 10 15
 Lys Thr Leu Gly Ala Asp Pro Ala Lys
 20

<210> 42

<211> 22

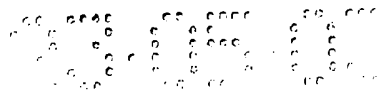
<212> PRT

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> Popis umelej sekvencie: fágová knižnica klónu

<400> 42



Ala Glu Gly Glu Phe Phe Tyr Gln Ile Pro Arg Arg Met Glu Thr
 1 5 10 15
 Lys Tyr Gly Asp Pro Ala Lys
 20

<210> 43

<211> 22

<212> PRT

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> Popis umelej sekvencie: fágová knižnica klónu

<400> 43

Ala Glu Gly Glu Phe Ser Arg Glu Gln Leu Asn Lys Leu Phe Gly
 1 5 10 15
 Ile Glu Gly Asp Pro Ala Lys
 20

<210> 44

<211> 24

<212> PRT

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> Popis umelej sekvencie: fágová knižnica klónu

<400> 44

Ala Glu Gly Glu Phe Asn Ser Arg Glu Trp Leu Ser Lys Ala His
 1 5 10 15
 Gly Ile Glu Gly Met Asp Pro Ala Lys
 20

<210> 45

<211> 24

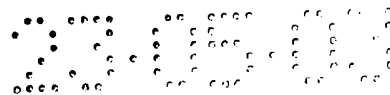
<212> PRT

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> Popis umelej sekvencie: fágová knižnica klónu

<400> 45



Ala Glu Gly Glu Phe Arg Ser Arg Glu Gln Leu Ser Lys Leu Phe
 1 5 10 15
 Gly Ile Asp Leu Thr Asp Pro Ala Lys
 20

<210> 46

<211> 24

<212> PRT

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> Popis umelej sekvencie: fágová knižnica klónu

<400> 46

Ala Glu Gly Glu Phe Tyr Ser Arg Glu Gln Leu Asn Lys Leu Phe
 1 5 10 15
 Gly Ile Asp Met Thr Asp Pro Ala Lys
 20

<210> 47

<211> 24

<212> PRT

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> Popis umelej sekvencie: fágová knižnica klónu

<400> 47

Ala Glu Gly Glu Phe Tyr Ser Arg Glu Gln Leu Asn Lys Met Phe
 1 5 10 15
 Gly Ile Glu Thr Ser Asp Pro Ala Lys
 20

<210> 48

<211> 24

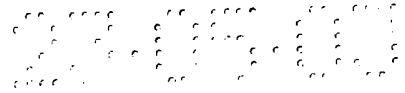
<212> PRT

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> Popis umelej sekvencie: fágová knižnica klónu

<400> 48



Ala Glu Gly Glu Phe Tyr Ser Arg Glu Gln Leu Asn Lys Leu Phe
 1 5 10 15
 Gly Ile Glu Val Met Asp Pro Ala Lys
 20

<210> 49

<211> 23

<212> PRT

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> Popis umelej sekvencie: fágová knižnica klónu

<400> 49

Ala Glu Gly Glu Phe Lys Ser Arg Glu Gln Leu Arg Lys Leu His
 1 5 10 15
 Gly Phe Asp Thr Ser Pro Ala Lys
 20

<210> 50

<211> 24

<212> PRT

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> Popis umelej sekvencie: fágová knižnica klónu

<400> 50

Ala Glu Gly Glu Phe Lys Met Arg Asn Tyr Leu Asn Lys Ala Phe
 1 5 10 15
 Gly Ile Glu Gly Met Asp Pro Ala Lys
 20

<210> 51

<211> 24

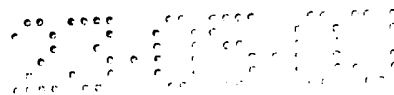
<212> PRT

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> Popis umelej sekvencie: fágová knižnica klónu

<400> 51



Ala Glu Gly Glu Phe Arg Ser Arg Glu Gln Leu Ser Lys Leu Phe
 1 5 10 15
 Gly Ile Glu Leu Thr Asp Pro Ala Lys
 20

<210> 52

<211> 23

<212> PRT

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> Popis umelej sekvencie: fágová knižnica klónu

<400> 52

Ala Glu Gly Glu Phe Se Arg Arg Glu Tyr Ser Asn Lys Ala Phe
 1 5 10 15
 Gly Ile Glu Thr Gln Pro Ala Lys
 20

<210> 53

<211> 24

<212> PRT

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> Popis umelej sekvencie: fágová knižnica klónu

<400> 53

Ala Glu Gly Glu Phe Arg Arg Arg Glu Tyr Leu Asn Lys Ala Phe
 1 5 10 15
 Gly Ile Glu Gly Gly Asp Pro Ala Lys
 20

<210> 54

<211> 24

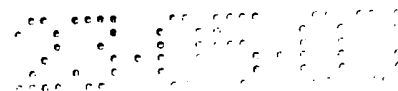
<212> PRT

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> Popis umelej sekvencie: fágová knižnica klónu

<400> 54



Ala Glu Gly Glu Phe Ser Arg Arg Glu Trp Leu Asn Lys Arg Phe
 1 5 10 15
 Gly Ile Glu Tyr Leu Asp Pro Ala Lys
 20

<210> 55

<211> 24

<212> PRT

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> Popis umelej sekvencie: fágová knižnica klónu

<400> 55

Ala Glu Gly Glu Phe Met Ser Arg Thr Trp Leu Met Lys Ala His
 1 5 10 15
 Gly Ile Glu Ser Trp Asp Pro Ala Lys
 20

<210> 56

<211> 24

<212> PRT

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> Popis umelej sekvencie: fágová knižnica klónu

<400> 56

Ala Glu Gly Glu Phe Tyr Ser Pro Glu Trp Leu Asn Lys Ala Arg
 1 5 10 15
 Gly Ile Asp Arg Ser Asp Pro Ala Lys
 20

<210> 57

<211> 24

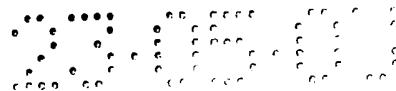
<212> PRT

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> Popis umelej sekvencie: fágová knižnica klónu

<400> 57



Ala Glu Gly Glu Phe Lys Ser Arg Glu Gln Leu Ser Lys Leu His
 1 5 10 15
 Gly Val Asp Thr Ser Asp Pro Ala Lys
 20

<210> 58

<211> 24

<212> PRT

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> Popis umelej sekvencie: fágová knižnica klónu

<400> 58

Ala Glu Gly Glu Phe Tyr Ser Arg Glu Gln Leu Asn Lys Met Phe
 1 5 10 15
 Gly Ile Glu Ile Ser Asp Pro Ala Lys
 20

<210> 59

<211> 24

<212> PRT

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> Popis umelej sekvencie: fágová knižnica klónu

<400> 59

Ala Glu Gly Glu Phe Tyr Ser Arg Ser Trp Leu Met Lys Ala His
 1 5 10 15
 Gly Leu Glu Leu Gly Asp Pro Ala Lys
 20

<210> 60

<211> 24

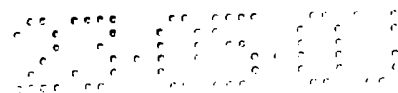
<212> PRT

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> Popis umelej sekvencie: fágová knižnica klónu

<400> 60



Ala Glu Gly Glu Phe Met Met Arg Ser Tyr Leu Met Lys Ala His
 1 5 10 15
 Gly Ile Glu Ser Leu Asp Pro Ala Lys
 20

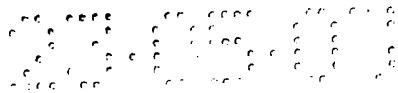
<210> 61
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> umelá sekvencia
 <220>
 <223> Popis umelej sekvencie: fágová knižnica klónu
 <400> 61

Ala Glu Gly Glu Phe Met Ser Arg Leu Trp Leu Met Lys Ala His
 1 5 10 15
 Gly Ile Ser Ser Glu Asp Pro Ala Lys
 20

<210> 62
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> umelá sekvencia
 <220>
 <223> Popis umelej sekvencie: fágová knižnica klónu
 <400> 62

Ala Glu Gly Glu Phe Pro Gln Pro Gln Glu Val His Val Tyr Arg
 1 5 10 15
 Glu Gln Leu Gly Leu Asp Pro Ala Lys Ala Ala Phe Asp Ser Leu
 20 25 30

<210> 63
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> umelá sekvencia
 <220>
 <223> Popis umelej sekvencie: fágová knižnica klónu
 <400> 63



Ala Glu Gly Glu Phe Gly Glu Val Le Tyr Arg Gly Phe Asp Glu
 1 5 10 15
 Val Gly Gly Asp Pro Ala Lys Ala Ala Phe Asp Ser Leu
 20 25

<210> 64

<211> 16

<212> PRT

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> Popis umelej sekvencie: fágová knižnica klónu

<400> 64

Ala Gly Glu Pro Tyr Val Ile Glu Arg Gly Met Gln Asp Pro Ala Lys
 1 5 10 15

<210> 65

<211> 27

<212> PRT

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> Popis umelej sekvencie: fágová knižnica klónu

<400> 65

Ala Glu Gly Glu Phe Thr Thr Ala Ser Pro Arg His Phe Leu Val
 1 5 10 15
 Pro Leu Asp Pro Ala Lys Ala Ala Phe Asp Ser Leu
 20 25

<210> 66

<211> 27

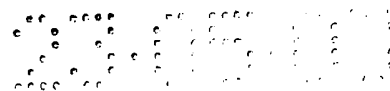
<212> PRT

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> Popis umelej sekvencie: fágová knižnica klónu

<400> 66



Ala Glu Gly Glu Phe Thr Thr Ala Ser Pro Ala His Phe Leu Val
 1 5 10 15
 Pro Leu Asp Pro Ala Lys Ala Ala Phe Asp Ser Leu
 20 25

<210> 67

<211> 27

<212> PRT

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> Popis umelej sekvencie: fágová knižnica klónu

<400> 67

Ala Glu Gly Glu Phe Thr Thr Ala Ser Pro Ser His Phe Leu Val
 1 5 10 15
 Pro Leu Asp Pro Ala Lys Ala Ala Phe Asp Ser Leu
 20 25

<210> 68

<211> 19

<212> PRT

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> Popis umelej sekvencie: fágová knižnica klónu

<400> 68

Ala Glu Gly Glu Phe Ala Thr Ala Pro Pro Arg His Tyr Ser Trp
 1 5 10 15
 Asp Pro Ala Lys

<210> 69

<211> 19

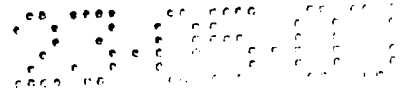
<212> PRT

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> Popis umelej sekvencie: fágová knižnica klónu

<400> 69



Ala Glu Gly Glu Phe Ala Thr Ala Pro Pro Ala His Tyr Ser Trp
 1 5 10 15
 Asp Pro Ala Lys

<210> 70

<211> 19

<212> PRT

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> Popis umelej sekvencie: fágová knižnica klónu

<400> 70

Ala Glu Gly Glu Phe Ala Thr Ala Pro Pro Ser His Tyr Ser Trp
 1 5 10 15
 Asp Pro Ala Lys

<210> 71

<211> 24

<212> PRT

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> Popis umelej sekvencie: fágová knižnica klónu

<400> 71

Ala Glu Gly Glu Phe Arg Phe Trp Lys Val Pro Asp Tyr Asp Pro
 1 5 10 15
 Pro Ala Ala Gly Gly Asp Pro Ala Lys
 20

<210> 72

<211> 29

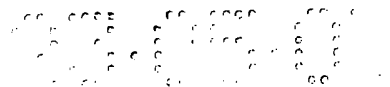
<212> PRT

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> Popis umelej sekvencie: fágová knižnica klónu

<400> 72



Ala Glu Gly Glu Phe Thr Glu Ser Ser Val Ser Ser Thr Leu Ala
 1 5 10 15
 Asp Leu Ala Ser Lys Thr Phe Gly Ser Ala Asp Pro Ala Lys
 20 25

<210> 73

<211> 22

<212> PRT

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> Popis umelej sekvencie: fágová knižnica klónu

<400> 73

Ala Glu Gly Glu Phe Thr Leu Ala Asp Leu Ala Thr Met Thr Phe
 1 5 10 15
 Gly Ser Thr Asp Pro Ala Lys
 20

<210> 74

<211> 21

<212> PRT

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> Popis umelej sekvencie: fágová knižnica klónu

<400> 74

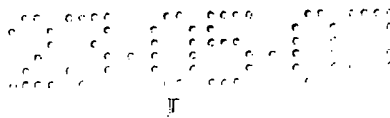
Ala Glu Gly Glu Phe Gly Leu Ala Asp Leu Ala Thr Leu Thr Phe
 1 5 10 15
 Gly Ser Pro Asp Ala Lys
 20

TABULKA 1

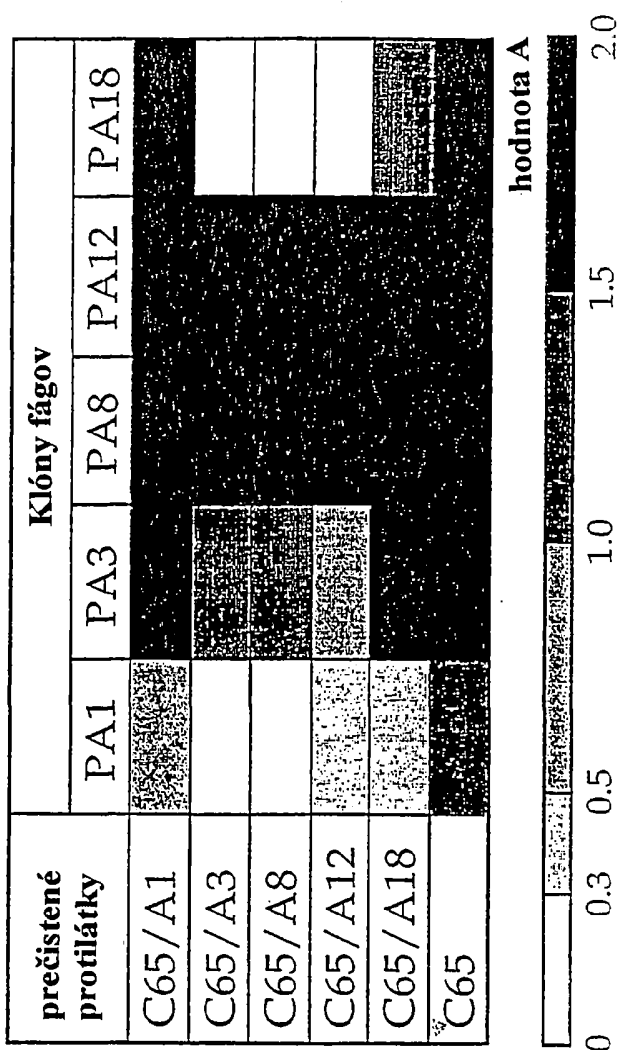
Reaktivita ADAM-HCV peptidov

n = počet testovaných sér, S = meraný signál, CO = hraničná hodnota, (CO = neg + 3 σ , kde neg znamená priemernu hodnotu a σ je štandardná odchyľka hodnôt z negatívnych sér)

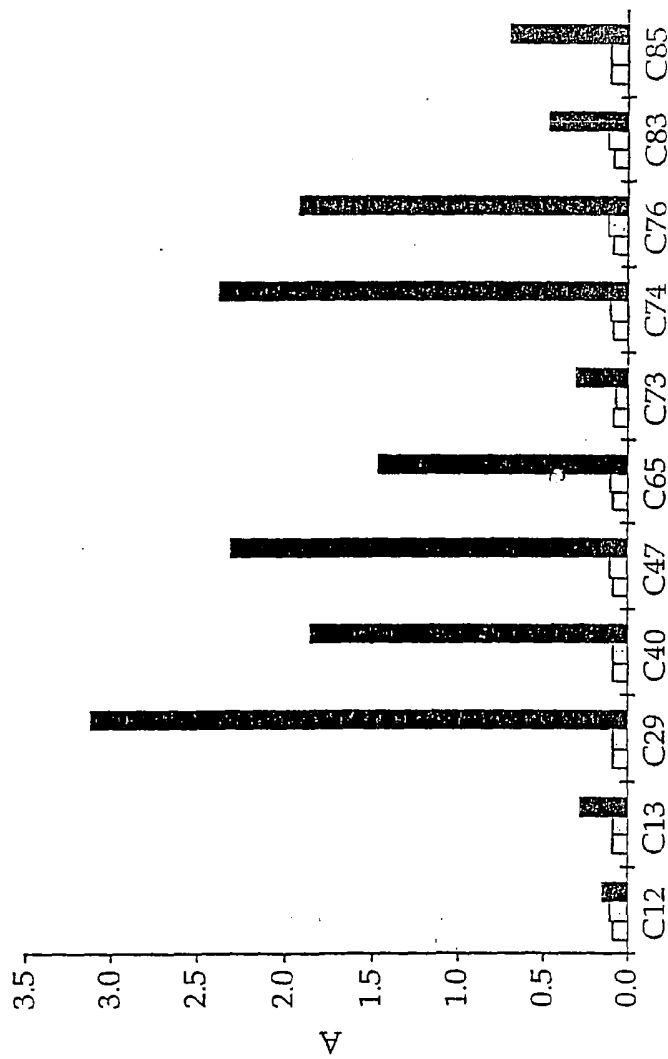
skupina	peptid	negatívne séera (N)	pozitívne séera		
			N	% S/CO>1	priemer S/CO>1
A	m1913.2	33	21	100	45,0
	m1909.2	33	21	100	50,3
B	m1901.31	39	38	61	3,2
	m1901.34	39	38	39	5,4
	m3322.3	30	18	78	10,1
	m3362.3	31	37	84	4,4
	m1977.1	32	28	96	13,6
D	m3551.3	37	26	46	3,0
E	m3566.3	14	12	50	2,1
F	m858	40	41	73	8,9
	mH1	60	60	68	9,8
	mF78	64	51	80	5,8
G	mA12.1	37	45	64	8,4
	mA12.2	37	45	33	8,6
	mA12.13	38	45	31	4,4
H	mB11.17	35	24	46	2,7
I	mG21.2	34	34	26	4,0
J	m1929C3.4	35	33	27	7,1
	m1929A3.1	43	25	40	3,9
	m1929.21	13	18	72	9,7
K	mS48.5	29	9	67	7,0
L	mN15.3	36	21	10	15,2



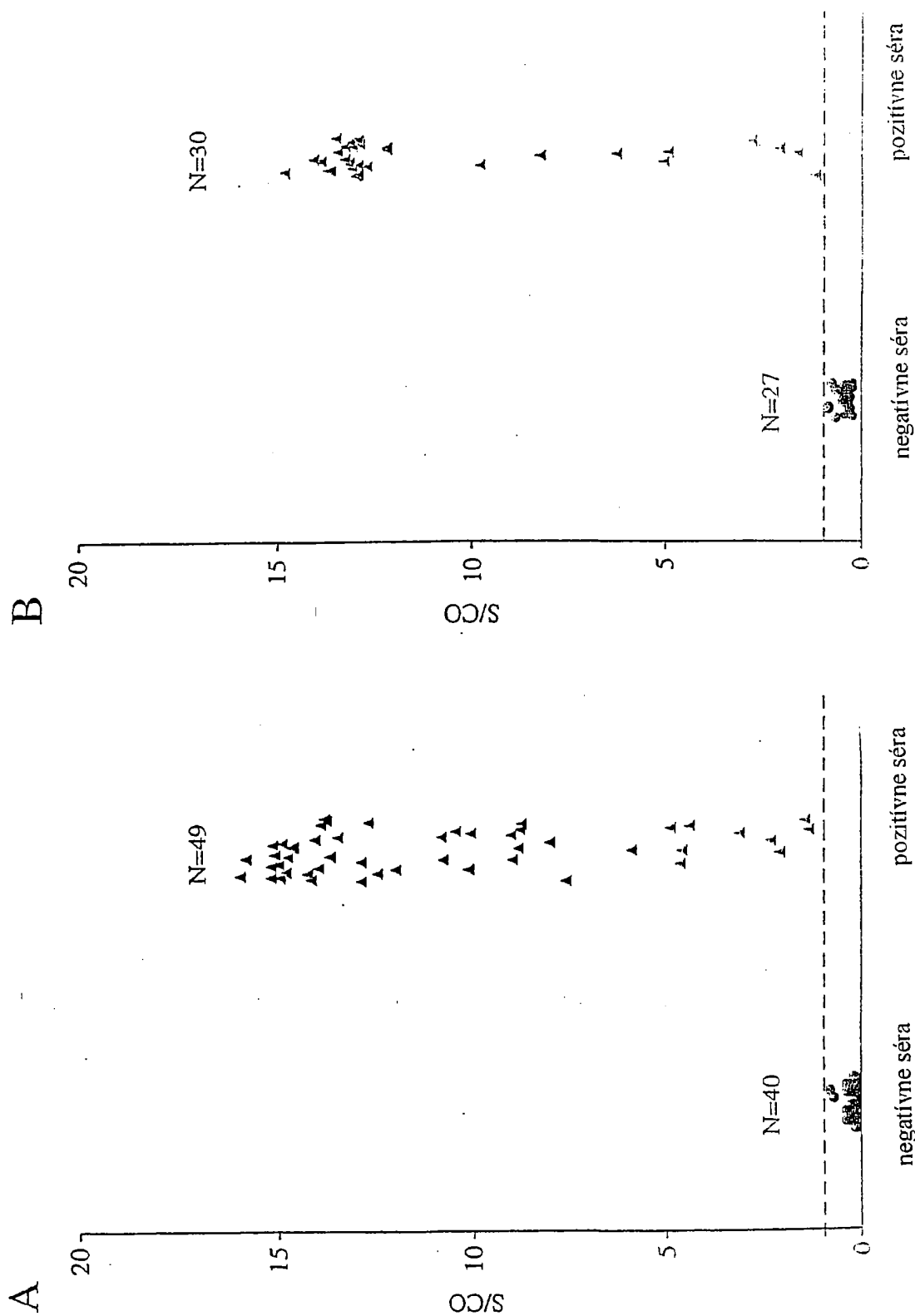
OBRÁZOK 2



OBRÁZOK 3



OBRÁZOK 4



OBRÁZOK 6

