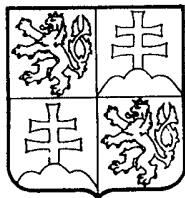


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(21) 00680-91.X

(13) A3

5(51) C 07 K 7/00

(22) 15.03.91

(32) 15.03.90

(31) 90/05829

(33) GB

(40) 17.12.91

(71) Proteus Molecular Design Limited, Marple , GB

(72) Fishleigh Robert V., Macclesfield, GB
Robson Barry, Marple, GB

(54) Syntetické polypeptidy

(57) Syntetický polypeptid s alespoň jednou antigenní vlastností obalové bílkoviny alespoň jednoho kmene viru lidské imunodeficiency HIV. Výhodný řetěz je X-Asp-Gln-Ser-Leu-Lys-Gly-Ile-Trp-Gly-Cys-Ser-Gly-Lys-Leu-Ala-Cys-Y, v němž X a Y mohou nezávisle na sobě chybět nebo znamenat jeden nebo větší počet dalších zbytků aminokyselin a zbytky cysteinu v polohách 10 a 16 mohou být vázány disulfidovými můstky uvnitř molekuly. Tyto polypeptidy jsou vhodné pro diagnózu, léčbu a profylaxi infekce virem HIV. Řešení se rovněž týká protilátek a jejich fragmentů, schopných vázat specificky peptidy podle vynálezu.

hruška 7/00 80-91

Č.j.	011937
Dosled	15. III. 91
ÚŘAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY	PŘÍL. I

Syntetické polypeptidy

Oblast techniky

Vynález se týká syntetických polypeptidů, zejména takových syntetických polypeptidů, které mají trojrozměrnou strukturu a/nebo elektrostatický povrch a/nebo jiné fyzikální, chemické a strukturní vlastnosti specifických obalových virových bílkovin. Zvláštní důraz je kladen na možnost výroby vakcín, imunologicky účinných léčebných látek, diagnostických a dalších léčebných nebo vědeckých prostředků v souvislosti s virem lidské imunodeficiency (HIV), o němž je známo, že vyvolává syndrom získané deficiencie imunologického systému (AIDS).

Dosavadní stav techniky

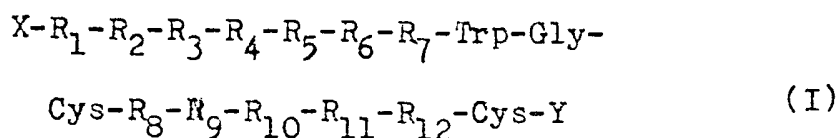
V posledním desetiletí se projevuje AIDS jako závažný lékařský problém na celém světě a je tedy naléhavě nutné nalézt další látky pro studium, diagnosu, léčbu a/nebo prevenci infekce HIV, který je příčinou tohoto onemocnění. V poslední době jsou k dispozici řetězce aminokyselin, které tvoří bílkoviny virů HIV I a HIV II, tak jak bylo popsáno například v publikaci Ratner L. a další, Nature 313, 277 (1985), Neusing M. A. a další, Nature 313, 450 (1985), Wain-Hobson S. a další, Cell 40, 9 (1985). Je tedy možno vyrobit syntetické polypeptidy s antigenními vlastnostmi obalových bílkovin.

Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu je vývoj syntetických polypeptidů, které mohou vyvolat tvorbu protilátek proti viru HIV, s výhodou tvorbu neutralizujících protilátek, to znamená protilátek, které mohou zabránit vzniku infekce a/nebo omezit další nákazu virem HIV pasivní nebo aktivní imunizací. Pasivní imunizace těmito protilátkami může představovat vhodný

prostředek pro léčbu nemocných AIDS, takže bude možno zabránit další nákaze a tím zpomalit šíření této choroby.

Podstatou vynálezu je tedy syntetický polypeptid s alespoň jednou antigenní vlastností obalové bílkoviny alespoň jednoho kmene viru lidské imunodeficiency (HIV), přičemž tento polypeptid je tvořen řetězcem aminokyselin obecného vzorce I



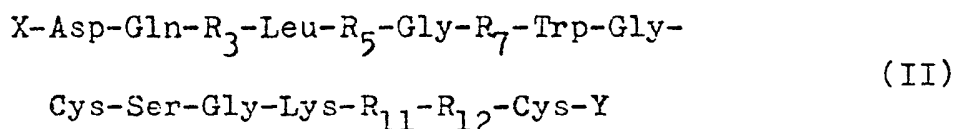
kde

- R_1 znamená Asp nebo Glu,
- R_2 znamená zbytek aminokyseliny ze skupiny Gly, Ala, Pro, Ser, Thr, Asn nebo Gln,
- R_3 znamená zbytek aminokyseliny ze skupiny Gly, Ala, Pro, Ser, Thr, Asp, Glu, Asn, Lys, His, Gln nebo Arg,
- R_4 , R_5 a R_{11} znamenají nezávisle na sobě jakýkoliv zbytek aminokyseliny,
- R_6 a R_8 znamenají nezávisle na sobě zbytek aminokyseliny ze skupiny Gly, Ala, Pro, Ser, Thr nebo Asn,
- R_7 znamená zbytek aminokyseliny ze skupiny Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser, Thr, Asn, Gln, Phe, Tyr, Trp, Cys, Met nebo Pro,
- R_9 a R_{12} znamenají nezávisle na sobě zbytek aminokyseliny ze skupiny Gly, Ala, Leu, Ile, Val, Met, Cys, Phe, Tyr nebo Trp,
- R_{10} znamená zbytek aminokyseliny ze skupiny Lys, His nebo Arg a
- X a Y mohou nezávisle na sobě chybět nebo mohou znamenat 1 nebo větší počet, například tři další zbytky aminokyselin.

Peptidy obecného vzorce I, a to bez obsahu X a Y bude možno využít například pro výrobu protilátek proti HIV. Jsou-li symboly X nebo Y přítomny, může být jejich délka jakákoliv, s výhodou však méně než 20, ještě výhodněji méně než 10, například 3 až 6 zbytků aminokyselin. Je zřejmé, že řetězec obecného vzorce I může tvořit bílkovinu, ve které budou tvořit řetězce X a Y převážnou část molekuly a řetězce, který bude vyvolávat antigenní odpověď, bude například část exponované smyčky na globulární bílkovině.

S výhodou znamená R_2 zbytek ze skupiny Gln nebo Thr, R_3 zbytek ze skupiny Ser, Asn, Gln, Arg, nebo ala, R_4 zbytek ze skupiny Leu, Ile, Gln nebo Arg, R_5 zbytek Leu nebo Lys, R_6 zbytek Gly nebo Asn, R_7 zbytek ze skupiny Gly, Ala, Leu, Ile, Val, Met, Cys, Phe, Tyr, Trp nebo Ser, R_8 zbytek Ser nebo Ala, R_9 zbytek Gly nebo Phe, R_{10} Arg nebo Lys, R_{11} zbytek ze skupiny Leu, His, Ile nebo Gln a R_{12} zbytek ze skupiny Ala, Ile nebo Val. Zbytek cysteinu v polohách 10 a 16 je popřípadě vázán intramolekulárním disulfidovým můstkem.

Výhodná forma polypeptidů podle vynálezu je tvořena řetězcem aminokyselin obecného vzorce II



kde

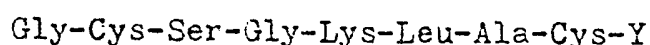
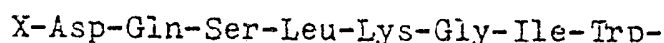
R_3 , R_5 , R_{11} , R_{12} , X a Y mají význam, uvedený v obecném vzorci I a

R_7 znamená zbytek aminokyseliny ze skupiny Gly, Ala, Leu, Ile, Val, Met, Cys, Phe, Tyr nebo Trp.

S výhodou v řetězci obecného vzorce II R_3 znamená Ser, Asn, Gln nebo Arg, R_{11} znamená Leu, His nebo Ile a

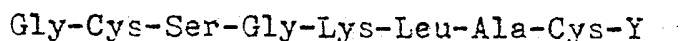
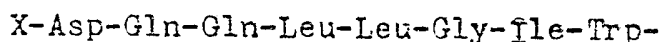
R_{12} znamená Ile nebo Ala. S výhodou znamená R_7 zbytek ze skupiny Ile, Phe, Met, Val nebo Leu. Ještě výhodněji znamená R_3 Ser nebo Asn a R_5 znamená Lys.

Výhodnou formou polypeptidu obecného vzorce II je řetězec vzorce



kde X a Y mají svrchu uvedený význam a zbytky cysteinu v polohách 10 až 18 mohou být vázány disulfidovými můstky uvnitř molekuly.

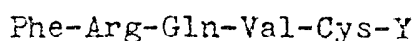
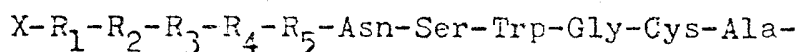
Další výhodnou formou polypeptidu obecného vzorce II je řetězec, v němž R_3 znamená Gln nebo Arg, R_5 je Leu, R_7 znamená Ile, Phe a Met, R_{11} znamená Leu, His nebo Ile a R_{12} znamená Ala. Výhodný řetězec má vzorec



kde X a Y mají svrchu uvedený význam a cysteinové zbytky v polohách 10 a 16 mohou být vázány disulfidovými můstky uvnitř molekuly.

Polypeptidy obecného vzorce II napodobují některé epitopy obalové bílkoviny HIV I.

Další výhodnou formou polypeptidu podle vynálezu je řetězec aminokyselin obecného vzorce III



(III)

kde

R_1 znamená Glu nebo Asp,

R_2 znamená Thr nebo Gln,

R_3 znamená Ser, Asn, Arg, Gln nebo Ala,

R_4 znamená Leu, Ile, Arg nebo Gln,

R_5 znamená Lys nebo Leu a

X a Y mají svrchu uvedený význam a cysteinové zbytky v polohách 10 a 16 mohou být vázány disulfidovými můstky uvnitř molekuly.

Výhodnou formou polypeptidu obecného vzorce III je řetězec aminokyselin obecného vzorce IIIa

X-Glu-Thr- R_3 - R_4 -Lys-Arg-Ser-Trp-Gly-

Cys-Ala-Phe-Arg-Gln-Val-Cys-Y

(IIIa)

kde

R_3 znamená zbytek Ser, Asn, Arg, Gln nebo Ala,

R_4 znamená Leu, Ile, Arg nebo Gln,

X a Y mají svrchu uvedený význam a cysteinové zbytky v polohách 10 a 16 mohou být vázány disulfidovými můstky uvnitř molekuly.

S výhodou znamená R_3 zbytek ser v případě, že R_4 znamená Ile a znamená-li R_3 zbytek Ala, pak R_4 znamená Arg nebo Gln, s výhodou Arg.

Polypeptidy obecného vzorce III jsou příbuzné některým epitopům obalových bílkovin viru HIV II.

Výhodné polypeptidové řetězce podle vynálezu byly voleny na bazi své topografické podobnosti s více než jednou antigenní determinantou obalových bílkovin viru HIV. Například antigenní determinanta, s níž je původně kon-

struován daný polypeptid jako analogický, může také být topograficky podobná s jednou nebo větším počtem dalších oblastí obalové bílkoviny HIV, pravděpodobně následkem duplikace genů nebo z toho důvodu, že polypeptid je analogem diskontinuální determinanty nebo také proto, že polypeptidy byly konstruovány tak, aby byly polyvalentní. Diskontinuální epitop může být složen ze sekvenciálních epitopů, které jsou si velmi blízké, avšak opačného smyslu a mohou mít samy o sobě význam jako antigeny, polyvalentní polypeptid může obsahovat dva nebo větší počet kontinuálních nebo diskontinuálních determinantních analogů v jediném polypeptidovém řetězci, takže je prostředkem k vyvolání tvorby celé řady protilátek, které budou rozpoznávat dvě nebo větší počet determinant v obalové bílkovině viru HIV.

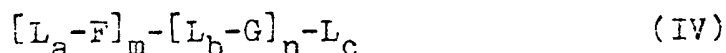
Peptidy podle vynálezu mohou být vyrobeny například při použití standardního postupu pomocí 9-fluorenyl methoxykarbonylové skupiny (F-Moc), například podle publikace Atherton E. a Sheppard R. C. (1985), J. Chem. Soc. Chem. Comm. 165 nebo postupem s použitím butyloxykarbonátu (T-Boc). Správnost struktury a čistota, která je obvykle nad 85 % se pečlivě kontroluje, zvláště je nutno dbát správnosti uspořádání vnitřních disulfidových můstků. K tomuto účelu je možno užít různé chromatografické analýzy včetně vysokotlaké kapalinové chromatografie a také spektrografické analýzy včetně Ramanovy spektroskopie.

Všechny řetězce jsou označovány kódem se třemi písmeny podle I.U.P.A.C. takto: Gly-glycin, Ala-alanin, Val-valin, Leu-leucin, Ile-isoleucin, Ser-serin, Thr-threonin, Asp-kyselina asparagová, Glu-kyselina glutamová, Asn-asparagin, Gln-glutamin, Lys-lysin, His-histidin, Arg-arginin, Phe-fenylalanin, Tyr-tyrosin, Trp-tryptofan, Cys-cystein, Met-methionin a Pro-prolin.

Polypeptidy podle vynálezu nebo protilátky proti těmto polypeptidům je možno podávat jako takové nebo spolu

s dalšími látkami, jako jsou 3'-azido-3'-deoxythymidin (AZT-zidovudin), které působí na různé úrovni tak, že dojde k interferenci při replikaci genetického materiálu viru a/nebo k inhibici proteázy HIV, která blokuje činnost enzymu, který má podstatný význam pro vývoj viru.

Polypeptidy podle vynálezu je možno užít k produkci protilátek, které budou reagovat s bílkovinami obalu viru, které jsou produkovány širokou škálou kmenů viru HIV I a/nebo HIV II. Analýzy prokázaly, že v případě, že topografické, elektrostatické a/nebo strukturní vlastnosti polypeptidů podle vynálezu jsou takové, že je vysoce pravděpodobné, že vyvolají tvorbu protilátek, které budou reagovat zkříženou reakcí s obalovými bílkovinami HIV několika nebo mnoha kmenů, může být dosaženo dalšího pokroku tak, že se několik různých polypeptidů tohoto typu váže za vzniku většího polypeptidu. Takový polypeptid je možno vyjádřit obecným vzorcem IV



kde

F a G znamenají nezávisle na sobě polypeptidy obecných vzorců I až IIIa,

L znamená vazný řetězec,

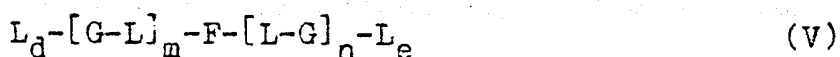
a, b, c znamenají nezávisle na sobě 0 nebo 1 a

m a n jsou kladná čísla, například 1 až 10 včetně.

L znamená s výhodou krátký, flexibilní úsek polypeptidového řetězce, například Gly-Gly-Gly-Gly-Gly, Gly-Pro-Gly-Pro-Gly-Pro nebo Gly-Ser-Ala-Gly-Ser-Gly-Ala. Je zřejmé, že v každém opakování je možno užít odlišnou variantu polypeptidu podle vynálezu.

Polyvalentní analogy determinant obecného vzorce IV jsou vlastně pseudohomopolyvalentní vzhledem k tomu, že varianty v podstatě téhož analogu determinanty se opakují v jediném řetězci polypeptidu. Mimoto je možno očekávat, že také jednoduché imunogenní homopolyvalentní polypeptidy, které obsahují mnohočetné kopie téže varianty téhož analogu determinanty obecného vzorce I až IIIa budou účinné ve svrhu uvedeném smyslu.

Pseudohomopolyvalentní imunogenní polypeptidy budou pravděpodobně zvláště cenné jako vakcíny vzhledem k tomu, že by měly vyvolávat produkci celé řady neutralizujících protilátek s podobnou, avšak nikoliv stejnou specifitostí, které by zkříženě reagovaly s obalovou bílkovinou širší škály kmenů HIV a jejich účinnost by tedy byla zvýšena a zajišťovala ochrannou imunitu. Bude patrně také výhodné konstruovat heteropolyvalentní polypeptidy s obsahem jedné nebo většího počtu kopií polypeptidu podle vynálezu v jakémkoliv pořadí a mimoto budou obsahovat jeden nebo větší počet dalších polypeptidů jako analogů determinant. Tyto polypeptidy je možno vyjádřit obecným vzorcem V

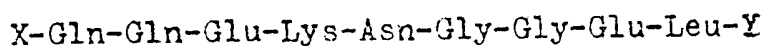


kde

- F znamená polypeptid, kteréhokoliv ze vzorců I až IIIa,
G znamená polypeptid obecného vzorce I až IIIa nebo ještě jiný řetězec,
m a n jsou kladná čísla, například 1 až 10 včetně a
d, e znamenají nezávisle na sobě 0 nebo 1.

S výhodou znamená L krátký flexibilní úsek polypeptidového řetězce, například Gly-Gly-Gly-Gly-Gly,

Gly-Pro-Gly-Pro-Gly-Pro nebo Gly-Ser-Ala-Gly-Ser-Gly-Ala. Ve výhodné formě peptidu obecného vzorce V znamená G polypeptidový řetězec obecného vzorce I až IIIa nebo následující řetězec:



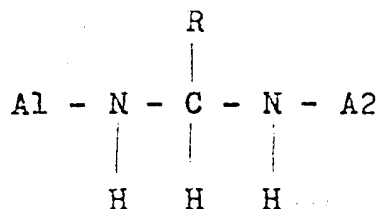
kde každý ze zbytků Gly může být nahrazen jakoukoliv jinou aminokyselinou a/nebo X a Y mohou nezávisle na sobě chybět nebo mohou znamenat jeden nebo větší počet, například tři zbytky aminokyselin nebo může G znamenat ještě jiný polypeptidový řetězec, příbuzný antigenním bílkovinám HIV.

Je zřejmé, že podle vynálezu je možno do peptidu zařadit jakékoliv antigenně významné subfragmenty a/nebo varianty svrchu uvedených polypeptidových řetězců, které si v podstatě udrží strukturu a funkci původního polypeptidu. Zejména je možné nahradit kterýkoliv zbytek zbytkem se srovnatelnými strukturními a/nebo fyzikálními vlastnostmi včetně substituce vzácnými, avšak přirozeně se vyskytujícími zbytky, jako D-stereoisomery nebo je možno zařadit syntetické analogy aminokyselin. Je například možné provést substituci zbytku za jiný zbytek v sestavách, které budou dále definovány a které rovněž tvoří podstatu vynálezu: sestava 1 - Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp a Met, sestava 2 - Ser, Thr, Asn, a Gln, sestava 3 - Asp a Glu, sestava 4 - Lys, His a Arg, sestava 5 - Asn a Asp, sestava 6 - Glu a Gln, sestava 7 - Gly, Ala, Pro, Ser a Thr. D-stereoisomery všech typů aminokyselin je možno nahradit například zbytky D-Phe, D-Tyr a D-Trp.

Ve výhodném provedení vynálezu mohou X a Y nezávisle na sobě obsahovat jeden nebo větší počet segmentů řetězce bílkoviny se schopností účinnosti epitopu pro T-buňky. Například segmenty řetězce aminokyselin obecného vzorce 1-2-3-4, kde 1 znamená Gly nebo aminokyselinu,

která nese náboj, například Lys, His, Arg, Asp nebo Gly, 2 znamená hydrofobní aminokyselinu, jako Ile, Leu, Val, Met, Tyr, Phe, Trp nebo Ala, 3 znamená hydrofobní aminokyselinu ve svrchu uvedeném významu nebo polární aminokyselinu bez náboje, jako Asn, Ser, Thr, Pro, Gln, nebo Gly a 4 znamená polární aminokyselinu, jako Lys, Arg, His, Glu, Asp, Asn, Gln, Ser, Thr nebo Pro se chovají alespoň v některých případech jako epitopy pro T-buňky, jak bylo popsáno v Rothbard J. B. & Taylor W. R. (1988), A sequence pattern in common to T-cell epitopes, v EMBO Journal 7 (1), 93 - 100. Podobné segmenty je možno vyjádřit řetězcem 1'-2'-3'-4'-5', kde 1' má obdobný význam jako 1 svrchu, 2' má význam jako 2, 3' a 4' mají význam jako 3 a 5' má význam jako 4. Obě formy těchto segmentů jsou zahrnuty do oboru vynálezu a mohou obsahovat jeden nebo větší počet epitopů pro T-buňky (s výhodou méně než 5), které mohou být svrchu uvedeného typu nebo mohou mít odlišnou strukturu a mohou být od sebe odděleny dělicími segmenty jakékoliv délky a jakékoliv struktury, s výhodou obsahují tyto dělicí segmenty méně než pět zbytků aminokyselin, například zbytky Gly, Ala, Pro, Asn, Thr nebo Ser, nebo může jít o polyfunkční vazné řetězce, jako aminokyseliny s výjimkou α -aminokyselin. C- nebo N-terminální vazný řetězec může představovat úplnou bílkovinu, takže odpadá nutnost konjugace s nosnou bílkovinou.

Vynález zahrnuje také deriváty polypeptidů obecného vzorce I, v němž X nebo Y jsou nebo znamenají "retro-inverso" aminokyselinu, to znamená bifunkční amin s funkční skupinou, která odpovídá aminokyselině. Například může být vyjádřen analog podle vynálezu s obsahem retro-inverso aminokyseliny obecným vzorcem



kde R znamená jakoukoliv funkční skupinu, například glycinový postranní řetězec a

A1 a A2 znamenají kopie jednoho se svrchu uvedených analogů (avšak nikoliv nezbytně téhož analogu), které jsou připojeny na N- nebo C-terminální zakončení.

Popřípadě může struktura obsahovat epitopy pro T-buňky, jak již bylo uvedeno svrchu.

Retro-inverso modifikace peptidů zahrnuje změnu jedné nebo většího počtu peptidových vazeb za vzniku analogů, které jsou vzhledem k enzymatické degradaci odolnější než původní molekula a jsou vhodnou cestou pro vznik rozvětvených imunogenů s obsahem vysoké koncentrace epitopů. Je možné předpokládat možné využití těchto látek pro syntézu retro-inverso analogů s krátkým řetězcem a s vysokou biologickou aktivitou ve velkém měřítku.

Je nutno uvést, že analogy s obsahem retro-inverso derivátů aminokyselin nelze vyrobit přímo s využitím rekombinantní DNA. Avšak je možno vyrobit základní analogy, které je pak možno čistit a chemicky vázat na retro-inverso aminokyseliny metodami, obvyklými v chemii peptidů. Vhodným novým postupem pro syntézu na pevné fázi je postup s použitím pryskyřice polyamidového typu, který byl pro retro-inverso peptidy poprán v publikaci Gazerro H., Pinori M. a Verdini A. S., (1990), A new general procedure for the solid-phase synthesis of retro-inverso peptides, v Innovation

and Perspectives in Solid Phase Synthesis, Ed. Roger Epton, SPCC (GB), Ltd, Birmingham, Velká Británie.

Polypeptidy je možno vázat na nosné molekuly buď přes chemické skupiny, a to v rámci polypeptidů nebo přes přidané aminokyseliny na C- nebo N-terminálním zakončení, tyto skupiny mohou být obklopeny jednou nebo větším počtem dalších aminokyselin nebo odděleně od polypeptidů tak, aby bylo možno dosáhnout dobré imunologické funkce. Řada vazeb je vhodná pro tento účel, například je možno zařadit postranní řetězce zbytků Tyr, Cys a Lys. Vhodným nosičem je také čištěný bílkovinný derivát tuberkulinu (PPD) toxoid tetanu, choleratoxin a jeho podjednotka B, ovalbumin, albumin ze sera skotu, inhibitor trypsinu ze sojových bobů, muramyl-dipeptidy a jejich analogy a také Braunův lipoprotein, přesto že je možno užít také jiné nosiče, jak bude odborníkům zřejmé. Při použití PPD jako nosiče pro polypeptidy podle vynálezu je možno dosáhnout vyššího titru protilátek v případě, že příjemce konjugátu polypeptidu-PPD je již citlivý na tuberkulin, například protože byla dříve provedena vakcinace BCG. Pro vakcínu v lidském lékařství je nutno uvést, že ve Velké Británii a dalších státech se běžně vakcinace BCG zdarma provádí a populace je proto ve své většině citlivá na PPD. Z tohoto důvodu se považuje PPD v těchto státech za výhodný nosič.

Způsob vazby polypeptidů na nosič bude záviset na povaze materiálů, které jsou na sebe vázány. Například zbytek lysinu v nosiči je možno vázat na C-terminální nebo jiný cysteinový zbytek v polypeptidu působením N-gamma-maleimidobutyryloxysukcinimidu podle publikace Kitagawa T. a Ackawa T. (1976), J. Biochem. 79 233. Další vazné reakce a vhodné reakční složky pro tyto reakce byly rovněž popsány v literatuře.

Polypeptidy jako takové nebo vázané na molekulu nosiče je možno podávat jakýmkoliv způsobem, jako paren-

terálně do nosu, perorálně, rektálně nebo intravaginálně, popřípadě spolu s běžnými pomocnými látkami jako je hydroxid hlinitý jako Freundův úplný nebo neúplný pomocný prostředek, a/nebo jiná látka, která může způsobit potenciaci imunologického účinku. Vynález rovněž zahrnuje prostředky s obsahem polypeptidů podle vynálezu, z nichž se tyto polypeptidy uvolňují pomalu, může jít o podkožní implantát nebo o depotní formu, jako jsou liposomy, popsané v publikaci Allison A. C. a Gregoriadis G., (1974) Nature (Londýn) 252, 252 nebo jde o mikrokapsle, vyrobené z kopolymeru kyseliny mléčné a kyseliny glykolové podle publikace Gresser J. D. a Sanderson J. E. (1984) v Biopolymer Controlled Release Systems, str. 127 - 138, vyd. D.L. Wise.

Polypeptidy podle vynálezu je možno syntetizovat jakýmkoliv běžným způsobem, jako přímo při použití manuální nebo automatizované syntézy peptidů nebo nepřímo přes syntézu RNA nebo DNA postupy, které jsou obvyklé v molekulární biologii a genetickém inženýrství. Tyto techniky je možno užít také k výrobě hybridních bílkovin s obsahem jednoho nebo většího počtu polypeptidů, zařazených do dalšího polypeptidového řetězce.

Vynález tedy zahrnuje také molekulu DNA, která je kódem pro alespoň jeden syntetický polypeptid podle vynálezu, s výhodou je tato molekula zařazena do vhodného vektoru pro expresi, schopného replikace v mikroorganismech nebo v buňkách ssavců. Tato DNA může také tvořit část řetězce DNA pro delší produkt, to znamená, že k expresi polypeptidů podle vynálezu dochází jako části jiných bílkovin, do nichž byly tyto polypeptidy vřazeny genetickým inženýrstvím. Praktickým popisem těchto technik je publikace Molecular cloning: a laboratory manual, Sambrook J., Fritsch E. F. a Maniatis T., 2. vydání, 1989.

Polypeptidy podle vynálezu je možno použít jako takové nebo vázané na vhodný nosič, jako:

- a) peptidové vakcíny k zábraně infekce jedním nebo větším počtem kmenů HIV,
- b) jako vazné látky například při diagnostice ser nemocných, pozitivních na HIV,
- c) ke kontrole kvality v testech, například při vazbě protilátek proti těmto polypeptidům,
- d) jako antigenní látky pro tvorbu monoklonálních nebo polyklonálních protilátek při imunizaci živočichů, tyto protilátky je možno využít například k
 - i) vědeckým studiím viru HIV,
 - ii) jako diagnostický prostředek, například jako část histochemických reakčních činidel,
 - iii) k pasivní imunizaci nemocných virem HIV, buď k léčbě AIDS nebo v kombinaci s dalšími účinnými látkami, jako AZT a/nebo inhibitory proteázy HIV, a
 - iv) jako prostředek k zacílení účinku jiných-látek, jako jsou AZT nebo inhibitor proteázy viru HIV v buňkách, infikovaných virem HIV, u nichž dochází k expresi obalových bílkovin HIV na jejich povrchu, přičemž tyto látky jsou buď kovalentně vázány nebo jinak spojeny, například ve formě liposomů, které tyto látky obsahují, tyto prostředky mohou rovněž obsahovat protilátky, vytvořené proti jakémukoliv polypeptidu s antigenním účinkem. Vynález se rovněž týká forem nebo fragmentů, vzniklých genetickým inženýrstvím, zejména oblastí V_H protilátek proti těmto polypeptidům a humanizovaných forem protilátek, vytvořených proti těmto polypeptidům u jiných živočichů, a
- e) k léčbě infekcí HIV, buď omezením vazby viru HIV na buňky člověka nebo živočichů nebo rozrušením trojrozměrné organizace viru in vivo, jakož i k vědeckým studiím virů HIV in vitro.

Pokud jde o detekci a diagnózu HIV nebo protilátek proti HIV, odborníkům bude zřejmé, že existuje celá řada imunologických zkoušek, které jsou v oboru známy, jako jsou použití laminátových struktur, kompetitivní a nekompetitivní zkoušky a přímé a nepřímé značení.

Vynález zahrnuje rovněž sestavu pro průkaz viru HIV nebo protilátek proti tomuto viru, tato sestava obsahuje alespoň jeden syntetický polypeptid podle vynálezu.

Polyklonální nebo monoklonální protilátky, humanizované formy těchto protilátek, uvedené například v publikaci Thompson K. M. a další, (1986), Immunology 58, 157 až 160, protilátky proti jediné doméně, například podle publikace Ward E. S., Gussow D., Griffiths A. D., Jones P. a Winter G. (1989), Nature 341, 544 až 546 a protilátky, které by mohly procházet bariérou mezi krevním oběhem v mozku a mimo mozek a které jsou schopné se specificky vázat na syntetický polypeptid podle vynálezu je možno syntetizovat obvyklým způsobem, tyto protilátky jsou rovněž předmětem vynálezu. Protilátky podle vynálezu je možno užít mimo jiné k diagnostice infekce HIV u ssavců tak, že se inkubuje vzorek tkáně nebo tělesné tekutiny ssavce s účinným množstvím protilátky a pak se stanoví, zda došlo ke zkřížené reakci mezi vzorkem a protilátkou, a to jakou rychlostí a v jakém rozsahu. Diagnostická sestava s obsahem alespoň jedné takové protilátky rovněž tvoří součást vynálezu.

Vynález se rovněž týká syntetických polypeptidů, určených pro léčbu nebo profylaxi infekce HIV u ssavců a/nebo ke stimulaci imunologického systému ssavců a/nebo k blokování buněčných receptorů pro virus HIV a pro výrobu léků, vhodných k tomuto účelu. Vynález zahrnuje také farmaceutické prostředky, které jako účinnou složku obsahují alespoň jeden polypeptid nebo konjugát polypeptidu a nosiče spolu s jedním nebo větším počtem farmaceutických pomocných látek, a/nebo nosičů. Prostředky mohou být určeny pro per -

orální, rektální, nosní a zejména parenterální podání včetně podání do centrálního nervového systému.

Peptidy podle vynálezu je tedy možno užít k léčbě a profylaxi infekce HIV u člověka a/nebo ke stimulaci imunologického systému ssavců a/nebo k blokování buněčných receptorů pro virus HIV, v těchto případech se podává účinné množství těchto polypeptidů jako takových nebo v kombinaci s jinými látkami, určenými pro léčbu AIDS, jako jsou AZT a/nebo inhibitory proteázy HIV.

Praktické provedení vynálezu bude osvětleno následujícími příklady, které však vynález nemají omezovat.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Byla syntetizována C-terminálně extendovaná forma základního peptidu a) s řetězcem

Asp-Gln-Ser-Leu-Lys-Gly-Ile-Trp-
Gly-Cys-Ser-Gly-Lys-Leu-Ala-Cys

při použití standardního postupu na pevné fázi (F-moc) a pak byl vytvořen intramolekulární disulfidový můstek mezi oběma cysteinovými zbytky. Peptid byl odštěpen od pryskyřice kyselinou trifluoroctovou a pak byl čištěn filtrací na gelu, chromatografií na iontoměniči a vysokotlakou kapalinovou chromatografií v reversní fázi. Čistota výsledného peptidu byla vyšší než 85 %. Do molekuly byl zařazen C-terminální alaninový zbytek, aby bylo možno snáze uskutečnit konjugaci. Peptid byl rozpuštěn ve fyziologickém roztoku chloridu sodného s fosfátovým pufrům (PBS, 5 mg/ml) a pak byl přidán stejný objem ovalbuminu

(5 mg/ml) a pak byl přidán glutaraldehyd v konečné koncentraci 0,1 %. Směs konjugátu byla ponechána 30 minut stát a pak byla emulgována s Freundovým pomocným činidlem. Každá ovce (5 ovcí/skupina) byla imunisována 250 µg peptidu ve Freundově úplném pomocném prostředku (FCA) a po 14 dnech bylo podáno ještě stejné množství ve Freundově neúplném pomocném prostředku (FIA). Další dávky byly podány po 3 až 4 týdnech ve FIA. Vzorky krve byly odebrány 7 až 10 dnů po poslední dávce a byly zkoumány na vazbu na obalovou bílkovinu HIV.

Stanovení protilátek proti syntetickému peptidu, které rozpoznávají obalovou bílkovinu HIV bylo provedeno při použití rekombinantního viru vaccinia (například Mackett M. a Smith G. L. (1986), J. gen. Virol. 67, 2067, obecná metodologie), tento virus byl konstruován tak, aby došlo k expresi obalové bílkoviny HIV na povrchu infikovaných buněk. Tento postup je výhodný vzhledem k tomu, že vazba na antigen je měřena na povrchu buněk, infikovaných virem a z tohoto důvodu může být průkaznější než vazba na antigen v roztoku, protože některé potenciální epitopy obalové bílkoviny mohou být in vivo maskovány v důsledku interakce s fosfolipidy v membráně. Ledvinové buňky opic CV1, pěstované v jedné vrstvě na mikrotitračních plotnách s 96 vyhloubeními byly infikovány rekombinantním virem vaccinia. Tato konstrukce viru obsahovala gen, který je kódem pro obalový glykoprotein HIV a je známo, že k expresi této látky a také ke zpracování této látky dochází na povrchu infikovaných buněk. Byly provedeny zkoušky s antiserem ovcí ve dvojnásobném opakování. Množství 50 µl antisera v různé koncentraci bylo přidáno do vyhloubení a směs byla inkubována 4 hodiny, pak byly buňky dvakrát promyty a bylo přidáno antiserum proti ovčím bílkovinám, značené peroxidázou. Kladná reakce byla stanovena odečtením optické hustoty příslušným zařízením.

Bylo prokázáno, že antisera proti peptidu mají zkříženou reakci a vysokou afinitu k obalové bílkovině

HIV, k jejíž expresi dochází na povrchu infikovaných buněk, jak je zřejmé z tabulek 1 a 1A. Tyto výsledky potvrzují, že uvedené protilátky proti peptidu budou cenné pro výzkum i pro diagnostické účely.

T a b u l k a 1

Zkřížená reakce mezi serem ovcí, imunizovaných konjugátem peptidu (a) a rekombinantní obalovou bílkovinou HIV, k jejíž expresi dochází na povrchu buněk opičích ledvin

zkřížená reakce		
	kontrolní buněčná linie opičích ledvin	linie buněk opičích ledvin s expresí obalové bílkoviny HIV
serum imunizovaných ovcí	-	+++
kontrolní serum	-	-

T a b u l k a 1A

Typické titry pozitivních antiser z ovcí, imunizovaných konjugátem peptidů (a) při reakci s rekombinantní obalovou bílkovinou HIV, k jejíž expresi dochází na povrchu buněk opičích ledvin

vzorek sera (titr)	Střední hodnota optické hustoty (ředění sera)				
	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{250}$	$\frac{1}{1250}$	$\frac{1}{31250}$	$\frac{1}{156250}$
kontrolní serum ovce	0,344	0,288	0,197	0,012	0,016
serum ovčí, jímž bylo předem podáno serum 1 : 5000 a peptid (a)	0,736	0,636	0,432	0,140	0,052

Z uvedené tabulky je zřejmé, že i při velkém zředění sera z pokusných ovčí relativně po kontrole je titr podstatně zvýšen.

Příklad 2

Jednou z úloh neutralizujících protilátek je inhibice přenosu viru z infikovaných buněk na buňky neinfikované. Prevence nebo omezení rychlosti přenosu viru z T-buněk na makrofágy má podstatný význam, protože takto je možno podstatně prodloužit život nemocných s AIDS. Antisera proti peptidu byla zkoumána na svou schopnost způsobit inhibici tvorby syncytií in vitro. Jde o velké buňky s mnoha jádry, které vzniknou v důsledku tvorby "můstků" mezi buňkami, infikovanými HIV.

Byla syntetizována C-terminálně extendovaná forma základního peptidu a) s řetězcem

Asp-Gln-Ser-Leu-Lys-Gly-Ile-Trp-

Gly-Cys-Ser-Gly-Lys-Leu-Ala-Cys

s intramolekulárním disulfidovým můstkem mezi dvěma cysteinovými zbytky. Tato forma byla syntetizována, čištěna, konjugována a užita k imunizaci skupin ovčí stejně jako

v příkladu 1. Antisera proti peptidu byla užita při pokusu na neutralizaci HIV in vitro. Protilátky proti peptidu byly přidány ke kultuře lidských T-lymfocytů in vitro, infikovaných vysoce virulentním kmenem HIV a ke kultuře neinfikovaných lidských makrofágů. Bylo prokázáno, že antisera proti peptidu způsobují inhibici tvorby syncytií v této směsné populaci T-buněk a makrofágů, vystavené účinku virulentního kmene HIV1, což znamená, že došlo k inhibici přenosu infekce z T-buněk na makrofágy.

Bylo prokázáno, že protilátky mohou zabránit infekci makrofágů virem HIV a jsou tedy v tomto pokusu in vitro neutralizační, kdežto v kontrolní kultuře došlo k infekci makrofágů, jak je zřejmé z tabulky 2.

T a b u l k a 2

Neutralizace virulentního kmene HIV v kultuře in vitro lidských T-lymfocytů, infikovaných HIV a neinfikovaných makrofágů. +++ znamená vysokou úroveň infekce, "-" znamená účinnou ochranu proti infekci

buněčná kultura	úroveň infekce makrofágů
T-lymfocyty, infikované virem HIV a neinfikované makrofágy	+++
T-lymfocyty, infikované virem HIV, neinfikované makrofágy a protilátky proti peptidu a)	-

V pokusu na tvorbu syncytií byla rovněž vyhodnocena pozitivní antisera proti peptidu A. Tento pokus určuje schopnost antisera zabránit přenos živého HIV z infikovaných na neinfikované buňky a zabránit fúzi buněk, ke které může docházet reaktivitou mezi glykoproteinem viru (gp160)

a molekulou CD4. Stanovení bylo prováděno detekcí syncitií a stanovením jejich počtu.

Fokus byl proveden takto: známá koncentrace buněčné linie, která produkuje HIV (CD+4) a podporuje aktivní replikaci viru se třikrát promyje a pak se přidá zkoumané antiserum v různém ředění. Směs se inkubuje 30 minut při teplotě 37 °C, pak se buňky smísí v určitém poměru s indikátorovou buněčnou linií CD4+, vysoce infikovatelnou HIV a snadno vytvářející syncytia. Buňky se denně pozorují a sleduje se tvorba těchto velkých buněčných útvarů.

Jak je zřejmé z tabulky 3, mohou protilátky proti peptidu a) zabránit tvorbě syncitií.

T a b u l k a 3

Inhibice tvorby syncitií mezi buňkami, produkujícími HIV a indikátorovou buněčnou linií antiserem

vzorek sera	inhibice tvorby syncitií
antiserum proti peptidu a)	+ (3/5 zvířat)
normální serum ovčí	-

Příklad 3

Různá sera nemocných, infikovaných HIV I v různých stádiích postupu choroby AIDS, od asymptomatických nemocných až k nemocným s plně vyvinutými příznaky byla odebrána tak, aby bylo možno získat reprezentativní obraz reaktivity ser těchto nemocných se syntetickými peptidy při zkoušce ELISA.

Zkouška ELISA může stanovit stupeň reaktivity syntetických peptidů (analogických oblastí gp120 nebo gp41

transmembránové bílkoviny HIV I, s protilátkou proti povrchovému glykoproteínu HIV I v seru nemocných, které jsou pozitivní na tento virus.

100 antiser od pozitivních nemocných bylo uvedeno do reakce se syntetickým peptidem a). Dvě z těchto ser (od asymptomatických nemocných) obsahovala neutralizující protilátky proti HIV a tato sera vykazovala zkříženou reakci s peptidem a), jak je zřejmé z tabulky 4.

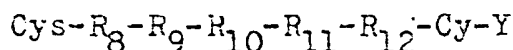
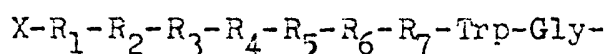
T a b u l k a 4

Zkřížená reakce peptidu a) se dvěma pozitivními antisery na HIV od asymptomatických nemocných

Vzorek	optická hustota (peptid a))	
pufr	0,056	
normální serum 1/100	0,476	
1/1000	0,140	
HIV pozitivní (1) 1/100	>2,0	
1/1000	>2,0	
HIV pozitivní (2) 1/100	>2,0	opakování
	>2,0	
	1,37	

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Syntetický polypeptid s alespoň jednou antigenní vlastností obalové bílkoviny alespoň jednoho kmene viru lidské imunodeficiency HIV, v y z n a č u j í c í s e t í m , že je tvořen řetězcem aminokyselin obecného vzor-
ce I



(I)

kde

R_1 znamená Asp nebo Glu,

R_2 znamená zbytek aminokyseliny ze skupiny Gly, Ala, Pro, Ser, Thr, Asn, nebo Gln,

R_3 znamená zbytek aminokyseliny ze skupiny Gly, Ala, Pro, Ser, Thr, Asp, Glu, Asn, Lys, His, Gln nebo Arg,

R_4, R_5 a R_{11} znamenají nezávisle na sobě jakýkoliv zbytek aminokyseliny,

R_6 a R_8 znamenají nezávisle na sobě zbytek aminokyseliny ze skupiny Gly, Ala, Pro, Ser, Thr nebo Asn,

R_7 znamená zbytek aminokyseliny ze skupiny Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser, Thr, Asn, Gln, Phe, Tyr, Trp, Cys, Met nebo Pro,

R_9 a R_{12} znamenají nezávisle na sobě zbytek aminokyseliny ze skupiny Gly, Ala, Leu, Ile, Val, Met, Cys, Phe, Tyr nebo Trp,

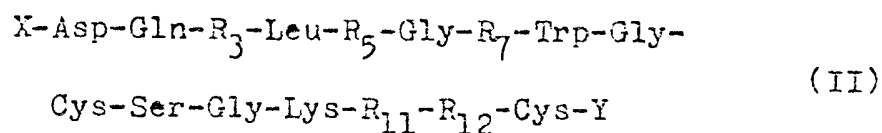
R_{10} znamená zbytek aminokyseliny ze skupiny Lys, His nebo Arg a

X a Y mohou nezávisle na sobě chybět nebo mohou znamenat 1 nebo větší počet, například tři další zbytky aminokyselin.

2. Způsob výroby syntetického polypeptidu podle nároku 1, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že se zbytky aminokyselin váží chemickým nebo biologickým způsobem nebo rekombinantní technikou a polypeptid se izoluje.

3. Způsob podle nároku 2, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že R_2 znamená Gln nebo Thr, R_3 znamená Ser, Asn, Gln, Arg nebo Ala, R_4 znamená Leu, Ile, Gln nebo Arg, R_5 je Leu nebo Lys, R_6 je Gly nebo Asn, R_7 znamená Gly, Ala, Leu, Ile, Val, Met, Cys, Phe, Tyr, Trp nebo Ser, R_8 znamená Ser nebo Ala, R_9 znamená Gly nebo Phe, R_{10} znamená Arg. nebo Lys, R_{11} znamená Leu, His, Ile, Gln a R_{12} znamená Ala, Ile nebo Val.

4. Způsob podle nároku 3, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že polypeptid je tvořen řetězcem aminokyselin obecného vzorce II



kde

R_3 , R_5 , R_{11} a R_{12} mají význam, uvedený v nároku 3,
 R_7 znamená zbytek Gly, Ala, Leu, Ile, Val, Met, Cys, Phe, Tyr nebo Trp a

X a Y mohou nezávisle na sobě chybět nebo znamenat jeden nebo větší počet zbytků aminokyselin.

5. Způsob podle nároku 4, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že R_3 znamená Ser, Asn, Gln, nebo Arg, R_{11} znamená Leu, His nebo Ile a R_{12} znamená Ile nebo Ala.

6. Způsob podle nároku 5, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že R_7 je Ile, Phe, Met, Val nebo Leu.

7. Způsob podle nároku 6, v y z n a č u j í c í s e t í m , že R_3 znamená Ser nebo Asn a R_5 je Lys.

8. Způsob podle nároků 2 až 7, v y z n a č u j í c í s e t í m , že polypeptid je možno vyjádřit vzorcem

X-Asp-Gln-Ser-Leu-Lys-Gly-Ile-Trp-

Gly-Cys-Ser-Gly-Lys-Leu-Ala-Cys-Y

kde X a Y mohou nezávisle na sobě chybět nebo znamenat jeden nebo větší počet dalších zbytků aminokyselin.

9. Způsob podle nároku 4, v y z n a č u j í c í s e t í m , že R_3 znamená Gln nebo Arg, R_5 je Leu, R_7 znamená Ile, Phe a Met, R_{11} znamená Leu, His nebo Ile a R_{12} znamená Ala.

10. Způsob podle nároku 9, v y z n a č u j í c í s e t í m , že polypeptid je možno vyjádřit vzorcem

X-Asp-Gln-Gln-Leu-Leu-Gly-Ile-Trp-

Gly-Cys-Ser-Gly-Lys-Leu-Ala-Cys-Y

kde X a Y mohou nezávisle nebo znamenat jeden nebo větší počet zbytků aminokyselin

11. Způsob podle nároku 3, v y z n a č u j í c í s e t í m , že polypeptid je tvořen řetězcem aminokyselin obecného vzorce III

X- R_1 - R_2 - R_3 - R_4 - R_5 -Asn-Ser-Trp-Gly-Cys-Ala-

Phe-Arg-Gln-Val-Cys-Y

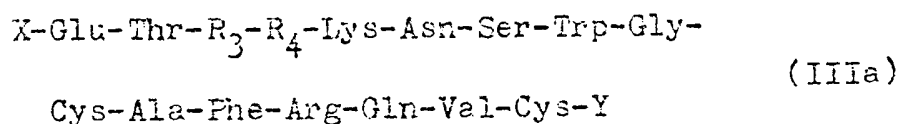
(III)

kde

R_1 znamená Glu nebo Asp,

- R_2 znamená Thr nebo Gln,
 R_3 je Ser, Asn, Arg, Gln nebo Ala,
 R_4 znamená Leu, Ile, Arg nebo Gln,
 R_5 znamená Lys nebo Leu a
X a Y mohou nezávisle na sobě chybět nebo znamenat jeden nebo větší počet zbytků aminokyselin.

12. Způsob podle nároku 3 nebo 11, v y z n a č u -
j í c í s e t í m , že polypeptid je tvořen řetězcem
aminokyselin obecného vzorce IIIa



kde

- R_3 znamená Ser, Asn, Arg, Gln nebo Ala,
 R_4 znamená Leu, Ile, Arg nebo Gln,
X a Y mohou nezávisle na sobě chybět nebo znamenat jeden nebo větší počet zbytků aminokyselin.

13. Způsob podle nároku 12, v y z n a č u j í -
c í s e t í m , že R_3 znamená Ser v případě, že R_4 zna-
mená Ile nebo R_3 znamená Ala v případě, že R_4 znamená Arg
nebo Gln.

14. Způsob podle nároků 2 až 13, v y z n a č u -
j í c í s e t í m , že cysteincové zbytky v polohách 10
a 16 polypeptidu jsou vázány uvnitř molekuly disulfidovými
můstky.

15. Způsob výroby syntetického polypeptidu obecné-
ho vzorce IV



kde

F a G mohou znamenat nezávisle na sobě polypeptid obecného vzorce I až IIIa,

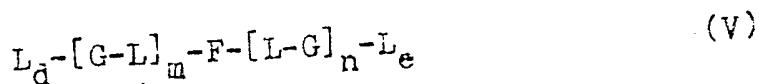
L je vazný řetězec, přičemž různé řetězce L mohou být stejné nebo různé,

a, b, c mohou nezávisle na sobě znamenat číslo 0 nebo 1 a

m a n jsou kladná čísla,

v y z n a č u j í c í s e t í m , že se postupně chemicky nebo biologicky nebo rekombinantní technikou na sebe váží zbytky a polypeptid se izoluje.

16. Způsob výroby syntetického polypeptidu obecného vzorce V



kde

F je polypeptid podle některého ze vzorců I až IIIa,

G je polypeptid podle některého ze vzorců I až IIIa, nebo jiný řetězec,

je vazný řetězec, přičemž jednotlivé řetězce L mohou být stejné nebo různé,

a n jsou kladná čísla

a e mohou nezávisle znamenat 0 nebo 1,

v y z n a č u j í c í s e t í m , že se chemicky, biologicky nebo rekombinantní technikou váží zbytky aminokyselin a výsledný polypeptid se izoluje.

17. Způsob podle nároků 2 až 16, v y z n a č u j í c í s e t í m , že polypeptid obsahuje retro-inverso aminokyseliny.

18. Způsob podle nároků 2 až 14, v y z n a č u j í c í s e t í m , že polypeptid obsahuje antigenně významný

subfragment nebo variantu polypeptidu, tak, jak byl popsán v nárocích 2 až 14.

19. Způsob podle nároků 2 až 18, v y z n a č u j í - c í s e t í m , že polypeptid navíc obsahuje alespoň jeden epitop T-buněk.

20. Způsob podle nároků 2 až 19, v y z n a č u j í - c í s e t í m , že polypeptid je dále vázán na nosič pro vakcinu.

21. Způsob výroby vakciny, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se mísí alespoň jeden syntetický polypeptid podle nároků 2 až 20, který může vyvolat imunitu proti alespoň jednomu kmeni HIV s jedním nebo větším počtem farmaceuticky přijatelných pomocných látek a/nebo nosičů.

22. Sestava pro detekci HIV nebo protilátek proti HIV, v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje alespoň jeden syntetický polypeptid podle nároků 2 až 19.

23. Způsob podle nároků 2 až 19, v y z n a č u j í - c í s e t í m , že se užije postupu s využitím rekombinantní DNA.

24. Způsob výroby farmaceutického prostředku, v y z n a č u j í c í s e t í m , že prostředek obsahuje jako svou účinnou složku alespoň jeden polypeptid podle nároků 2 až 20 a jeden nebo větší počet pomocných látek a/nebo nosičů.

25. Použití syntetického polypeptidu , vyrobeného podle nároků 2 až 20 pro výrobu farmaceutických prostředků pro léčbu a profylaxi infekce HIV u ssavců a/nebo pro stimulaci imunologického systému ssavců a/nebo pro blokování buněčných receptorů pro virus HIV.

26. Způsob výroby protilátek nebo jejich fragmentů, které se mohou vázat na antigen, zejména syntetický polypeptid, vyrobený podle nároků 2 až 14, v y z n a č u j í - c í s e t í m , že se imunizuje ssavec syntetickým polypeptidem, vyrobeným podle nároků 2 až 21 a protilátky se izolují.

27. Diagnostická sestava pro detekci HIV nebo protilátek proti HIV, v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje alespoň jednu protilátku nebo fragment této protilátky, který váže antigen, specificky syntetický polypeptid podle nároků 2 až 14.

28. Způsob výroby farmaceutického prostředku, v y z n a č u j í c í s e t í m , že jako svou účinnou složku obsahuje protilátku nebo fragment této protilátky, který se specificky váže na syntetický polypeptid, vyrobený podle nároků 2 až 14 a jednu nebo větší počet pomocných látek a/nebo nosičů, přijatelných z farmaceutického hlediska.

29. Způsob podle nároku 24 nebo 28, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se dále mísí AZT a/nebo inhibitor proteázy HIV se syntetickým polypeptidem nebo protilátkou nebo fragmentem této protilátky, který se váže na antigen.

30. Způsob diagnostiky infekce virem HIV u ssavců, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se inkubuje vzorek tkáně nebo tělesné tekutiny tohoto ssavce s účinným množstvím protilátky nebo fragmentu této protilátky, který je schopen vazby na antigen a specificky se váže na syntetický polypeptid, vyrobený podle nároků 2 až 14, načež se prokazuje zda a do jaké míry a/nebo jakou rychlostí dochází ke vzniku zkřížené reakce mezi uvedeným vzorkem a protilátkou.

31. Způsob diagnostiky infekce virem HIV nebo přítomnosti protilátek proti HIV nebo fragmentů této protilátky, které jsou schopné se vázat na antigen, vyznačující se tím, že se inkubuje vzorek tělesné tekutiny s alespoň jedním polypeptidem, který byl vyroben způsobem podle nároků 2 až 20.

Zastupuje:


JUDr. Zdenka KOREJZOVÁ
advokátka