



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 287 969**

51 Int. Cl.:

C07K 1/13 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

C07K 14/16 (2006.01)

C07K 14/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **98202777 .3**

86 Fecha de presentación : **08.03.1993**

87 Número de publicación de la solicitud: **0891982**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **20.01.1999**

54 Título: **Péptidos de VIH.**

30 Prioridad: **06.03.1992 EP 92400598**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.12.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.12.2007

73 Titular/es: **Innogenetics N.V.**
Industriepark Zwijnaarde 7, Box 4
9052 Ghent, BE

72 Inventor/es: **De Leys, Robert J.**

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Péptidos de VIH.

5 El problema técnico que subyace en la presente invención es proporcionar péptidos que correspondan a epítomos importantes desde el punto de vista inmunológico en proteínas víricas, así como a la utilización de dichos péptidos en composiciones para diagnóstico o inmunógenas.

10 Diferentes solicitudes de patente han estudiado el problema de descubrir epítomos útiles desde el punto de vista del diagnóstico de virus de inmunodeficiencia humana (VIH). Una zona inmunodominante importante que contiene péptidos cíclicos VIH-1 y VIH-2 se descubrió en la solicitud de patente EP-A-0.326.490. En el documento EP-A-0.379.949, esta zona se afirmó que era aún más reactiva con los anticuerpos específicos para VIH en el caso en que una molécula de biotina se acoplase a los péptidos cíclicos del VIH. El documento SU-A-1612264 describe también la utilización de un péptido biotinilado en un inmunoanálisis en fase sólida para la detección de anticuerpos de VIH.

15 Otras solicitudes han buscado epítomos de VIH útiles en la zona del bucle V3 hipervariable de gp120 (tal como los documentos EP-A-0.448.095 y EP-A-0.438.332).

20 El objetivo de la presente invención consiste en proporcionar composiciones que contengan péptidos determinados que correspondan a epítomos importantes desde el punto de vista inmunológico en proteínas para diagnóstico.

Otro objetivo de la presente invención consiste en proporcionar también composiciones que contengan péptidos determinados que corresponden a epítomos importantes desde el punto de vista inmunológico en proteínas para vacunas.

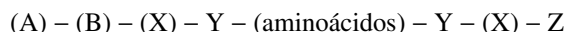
25 Según la presente invención, se han identificado y preparado mediante síntesis peptídica en fase sólida una serie de péptidos que representan zonas inmunológicamente importantes de proteínas víricas. Estos péptidos se han identificado como muy útiles para la detección de anticuerpos contra VIH. En algunas configuraciones preferidas, estos péptidos se encontraron también o se espera que sean, por lo menos, útiles, para estimular la producción de anticuerpos contra VIH en animales sanos tales como ratones BALB/C y en una composición de vacuna para prevenir la infección por VIH.

30 La presente invención se refiere asimismo a fragmentos de cualquiera de las secuencias peptídicas proporcionadas a continuación, manteniendo dichos fragmentos sustancialmente toda la sensibilidad inmunológica de dichas secuencias peptídicas de las que proceden.

35 La síntesis de los péptidos puede obtenerse en solución o en un soporte sólido. Los protocolos de síntesis utilizan generalmente aminoácidos activados protegidos por t-butoloxicarbonilo o 9-fluorenilmetoxycarbonilo. Los procedimientos para llevar a cabo la síntesis, las técnicas de activación de los aminoácidos, los tipos de producción de cadena lateral, y los procedimientos de escisión utilizados se describen ampliamente en, por ejemplo, Stewart y Young, Solid Phase Peptide Synthesis, 2ª edición, Pierce Chemical Company, 1984; y Atherton y Sheppard, Solid Phase Peptide Synthesis, IRL Press, 1989.

40 La presente invención se refiere a péptidos como los mencionados a continuación que están biotinilados.

45 La presente invención se refiere a péptidos de la fórmula siguiente:



50 en la que

- (aminoácidos) designa a Leu-Trp-Gly-Cys-Lys-Gly-Lys-Leu-Val-Cys (SEC. ID. nº: 1, gp41, cepa Ant70)

55 o

60 Gln-Ile-Asp-Ile-Gln-Glu-Met-Arg-Ile-Gly-Pro-Met-Ala-Trp-Tyr-Ser-Met-Gly-Ile-Gly-Gly (SEC. ID. nº: 2, secuencia Ant 70 del bucle V3 parcial), y en la que los aminoácidos se seleccionan selectivamente para que sean epítomos inmunodominantes que son reconocidos por un gran porcentaje del suero positivo auténtico o son capaces de complementar otros antígenos en la prueba para aumentar la velocidad de detección y B interactúan con los aminoácidos seleccionados para producir un compuesto con sensibilidad de diagnóstico mayor.

65 - A, cuando está presente, tal como está indicado por los paréntesis, representa (un) aminoácido(s), un grupo amino, o una modificación química del amino terminal de la cadena peptídica;

- Z representa un(os) aminoácido(s), un grupo OH, un grupo NH₂, o un enlace que comprende cualquiera de estos dos grupos químicos;

- B representa biotina;
- X representa un compuesto biotinilado que es incorporado durante el proceso de síntesis;
- 5 - Y representa un enlace covalente o una o más entidades químicas que forman individualmente o juntas una parte enlazadora que separa los aminoácidos del propio péptido de resto B o X, del biotínulo, cuya función es para minimizar el impedimento estérico que puede interferir con la unión de resto B ó X del biotínulo para la avidina o estreptavidina, en el que Y no es un enlace covalente, ventajosamente es por lo menos una entidad química y puede estar constituido como mucho de 30 entidades químicas pero estará constituido más frecuentemente por 1 a 10 entidades químicas, que pueden ser idénticas o diferentes, más preferentemente restos de glicina, β -alanina, ácido 4-aminobutírico, ácido 5-aminovalérico o ácido 6-aminohexanoico;
- 10 - B y X entre paréntesis indican que la presencia de biotina o de un compuesto biotinilado en estas posiciones es opcional, siendo el único requisito que B o X estén presentes en por lo menos una de las posiciones mostradas.

El procedimiento de la invención permite aumentar la antigenicidad de estos péptidos de VIH, que pueden estar unidos sin embargo a un soporte, aun cuando no estén biotinilados.

La presente invención se refiere asimismo a un procedimiento para la determinación *in vitro* de anticuerpos utilizando los péptidos definidos anteriormente.

La presente invención se refiere asimismo a un procedimiento para la determinación *in vitro* de anticuerpos utilizando los péptidos biotinilados definidos anteriormente, en el que dichos péptidos biotinilados están preferentemente en forma de complejos de estreptavidina-péptido biotinilado o complejos de avidina-péptido biotinilado.

En el complejo de estreptavidina-péptidos biotinilados o de avidina-péptidos biotinilados, los péptidos pueden estar biotinilados en el terminal N, en el terminal C o internamente.

Este procedimiento para la determinación de anticuerpos no está limitado con respecto a la longitud del péptido e impide las dificultades inherentes en los péptidos del recubrimiento directamente en fase sólida para la evaluación inmunológica.

La utilización de péptidos biotinilados, en el procedimiento de la invención, hace que el anclaje de los péptidos a un soporte sólido sea tal que deje sus aminoácidos esenciales libres para ser reconocidos por los anticuerpos.

La expresión anclaje peptídico a un soporte sólido significa la unión del péptido a un soporte mediante enlaces covalentes o interacciones no covalentes, de tal forma que el péptido se inmoviliza.

El soporte sólido puede ser nitrocelulosa, poliestireno, nilón o cualquier otro polímero natural o sintético.

La expresión "sus aminoácidos esenciales se dejan libres para ser reconocidos por anticuerpos" significa que las cadenas laterales de los aminoácidos del péptido apropiado no están modificadas químicamente en modo alguno ni implicadas en la interacción entre el péptido y la fase sólida.

La utilización de péptidos biotinilados en el procedimiento según la invención permite que dichos péptidos biotinilados estén libres para asumir una amplia gama de conformaciones, entre las cuales por lo menos una es la apropiada para la unión de los anticuerpos a dichos péptidos biotinilados.

Cualquiera de los péptidos +biotinilados puede seleccionarse para utilizar en el procedimiento según la invención. Sin embargo, algunos de ellos son capaces de anclarse sobre el soporte sólido y reaccionar con anticuerpos reconociendo específicamente el epítipo en el interior de este péptido, aun sin estar biotinilados y sin estar implicados en un complejo de avidina o estreptavidina. En este caso, la utilización de péptidos biotinilados da lugar a un aumento aparente de la antigenicidad de los péptidos con respecto a la antigenicidad observada cuando los péptidos no están biotinilados. La expresión "aparente" indica un cambio observado obtenido en condiciones similares de ensayo indiferentes a la causa absoluta del cambio observado.

El término "Antigenicidad" significa la propiedad de un péptido de unirse a un anticuerpo.

La expresión "Aumento de antigenicidad" significa que se obtiene una señal positiva para una dilución que es por lo menos el doble de la dilución de los péptidos no biotinilados. Dicha señal positiva es de la misma magnitud que la obtenida para los péptidos no biotinilados.

En otras palabras, obtener una señal positiva puede lograrse para una cantidad más pequeña del péptido biotinilado, comparada con la del péptido no biotinilado.

La presente invención se refiere asimismo a un procedimiento para la determinación *in vitro* de anticuerpos contra VIH o al diagnóstico de la infección por VIH utilizando una composición peptídica como la definida anteriormente

en un procedimiento de inmunoanálisis, en el que los péptidos biotinilados utilizados están en forma de complejos de péptidos biotinilados con estreptavidina o biotinilados con avidina.

Un procedimiento preferido para llevar a cabo la determinación *in vitro* de anticuerpos es mediante un ensayo inmunoenzimático (ELISA). Este ensayo utiliza una fase sólida que es generalmente una placa poliestirénica de microvaloración o una perla. La fase sólida, sin embargo, puede ser cualquier material que sea capaz de unirse a una proteína, químicamente mediante un enlace covalente o mediante adsorción pasiva. A este respecto, las membranas a base de nilón se consideran también que son particularmente ventajosas. La fase sólida se recubre con estreptavidina o avidina y después de un período apropiado, la proteína no unida en exceso se elimina mediante lavado. Cualesquiera de los puntos de unión libres en la fase sólida se bloquean entonces con una proteína irrelevante tal como la albúmina de suero bovino o la caseína.

Una solución que contiene la mezcla o selección de péptidos (biotinilados) se pone a continuación en contacto con la superficie revestida por la estreptavidina o la avidina y se deja que se unan. El péptido no unido se elimina mediante lavado. Alternativamente, se deja que los péptidos biotinilados formen complejos con la avidina o la estreptavidina. Los complejos resultantes se utilizan para revestir la fase sólida. Después de un período de incubación apropiado, el complejo no unido se elimina mediante lavado. Una dilución apropiada de un antisuero o de otro fluido corporal se pone en contacto con la fase sólida a la que se une el péptido. Se lleva a cabo la incubación durante el tiempo necesario para que la reacción de unión tenga lugar. Posteriormente, los componentes no unidos se eliminan mediante lavado de la fase sólida. La detección de complejos inmunes se alcanza utilizando anticuerpos heterólogos que se unen específicamente a los anticuerpos presentes en el suero de ensayo y que se han conjugado con un enzima, preferentemente pero no de forma limitada con peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina o β -galactosidasa, que es capaz de convertir un sustrato o co-sustrato incoloro o casi incoloro en un producto muy coloreado o en un producto capaz de formar un complejo coloreado con un cromógeno que puede detectarse visualmente o medirse por espectrofotometría.

Otros sistemas de detección conocidos en la técnica pueden utilizarse, sin embargo, e incluyen aquéllos en los cuales la cantidad de producto formado se mide electroquímica o luminométricamente. El sistema de detección puede utilizar también anticuerpos marcados con radioactividad, en cuyo caso la cantidad de complejo inmune se cuantifica mediante recuento de centelleo o recuento. En principio, puede utilizarse cualquier tipo de ensayo inmunológico para la detección de anticuerpos, mientras el ensayo utilice el complejo entre la estreptavidina o la avidina y un(os) péptido(s) biotinilado(s) sintetizado(s) tal como se ha descrito.

También se incluyen ensayos de competencia en los que los complejos del péptido estreptavidín- o avidín- biotinilado en solución se deja que compitan con el antígeno unido a la fase sólida para la unión del anticuerpo, o ensayos en los que a los péptidos libres en solución se les deja competir con la estreptavidina unida a la fase sólida o los complejos avidina: péptido biotinilado. A título de ejemplo, se consideran detalladamente muchos tipos de ensayos inmunológicos para la detección y cuantificación de anticuerpos y antígenos (Tijssen, P., Practice and Theory of Enzyme Immunoassays, Elsevier Press, Amsterdam, Oxford, Nueva York, 1985).

Los ensayos inmunológicos pueden restringirse a péptidos biotinilados aislados. Preferentemente, sin embargo, se utiliza una mezcla de péptidos biotinilados que incluye más de un epítipo derivado del agente infeccioso (o agentes infecciosos) para el cual se mide la presencia de anticuerpos específicos.

Otro procedimiento preferido para llevar a cabo la determinación *in vitro* de la detección de anticuerpos es el inmunoanálisis lineal (LIA).

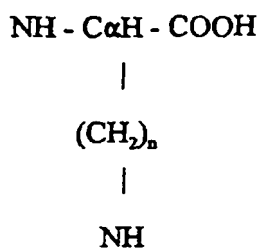
Este procedimiento de detección de anticuerpos consta esencialmente de las siguientes etapas:

- los antígenos, posiblemente en forma de complejos péptido biotinilado: estreptavidina o avidina, que van a ensayarse o utilizarse, se aplican como líneas paralelas sobre una membrana que es capaz de unir, mediante enlace covalente o no covalente, el antígeno que va a ensayarse,
- los sitios de unión no ocupados sobre la membrana son bloqueados con una proteína irrelevante tal como la caseína o la albúmina sérica bovina,
- la membrana se corta en tiras en una dirección perpendicular a la dirección en la que se aplican las líneas del antígeno (péptido biotinilado),
- se pone en contacto una dilución apropiada de un antisuero o de otro fluido corporal (que contiene anticuerpos que deben detectarse) con una tira a la que se unen los antígenos y se deja incubarse durante un período de tiempo suficiente para permitir que tenga lugar la reacción de unión,
- los componentes no unidos se eliminan mediante lavado de la tira,
- la detección de complejos inmunes se consigue incubando la tira con anticuerpos heterólogos que se unen específicamente a los anticuerpos en el suero de ensayo y que se han conjugado a un enzima tal como la peroxidasa de rábano,

- la incubación se lleva a cabo durante un período suficiente para permitir que se produzca la unión,
- la presencia de conjugados unidos se detecta añadiendo los sustratos o co-sustratos requeridos que se convierten a un producto coloreado mediante la acción del enzima,
- las reacciones se detectan visualmente o pueden ser cuantificadas por densitometría.

Como se demostró en el apartado Ejemplos la presente invención se refiere asimismo a la utilización de una composición definida anteriormente, para la inmunización contra la infección por VIH.

La presente invención se refiere asimismo a un procedimiento para preparar péptidos biotinilados utilizados en la invención que implica la utilización del derivado N- α -Fmoc-X (N- γ -biotina) o N- α -Fmoc-X (N- γ -biotina) en el que X representa:



en la que n es por lo menos 1 pero menor que 10 y se encuentra preferentemente entre 2 y 6, estando un grupo amino unido al átomo C α mientras que el otro se une al C γ , que es el carbono más distal en la cadena lateral, o sus ésteres obtenidos con un alcohol ROH y más particularmente el éster pentafluorofenilo,

- γ que representa la posición γ con respecto al átomo de carbono que lleva el grupo COOH en el radical.

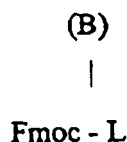
Este derivado de la biotina se denominará producto intermedio, y los productos intermedios definidos anteriormente son nuevos compuestos determinados según el procedimiento de la invención.

En un procedimiento ventajoso para preparar los compuestos de la invención, pudiendo estar representado el producto intermedio por la fórmula siguiente:

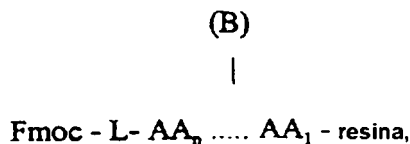
N- α -Fmoc-x (N- γ -biotina) es N- α -Fmoc-lisina(ϵ -biotina) o N- α -Fmoc-ornitina (N- β -biotina)

Los péptidos biotinilados con terminal N pueden prepararse según el procedimiento que comprende las etapas siguientes:

- adición sobre la resina de los aminoácidos sucesivos debidamente protegidos para dar: Fmoc-AA_n AA₁-resina,
- desprotección del terminal NH₂ mediante la piperidina, por ejemplo,
- adición del producto intermedio:



mediante su COOH sobre el terminal NH₂ para obtener:



ES 2 287 969 T3

- desprotección del grupo NH_2 terminal del compuesto obtenido, escisión a partir de la resina, extracción y purificación del péptido obtenido, biotinilado en su amino terminal, pudiendo llevar a cabo simultánea o separadamente las etapas de desprotección de la cadena lateral y escisión y particularmente

- desprotección del grupo NH_2 terminal del grupo intermedio, por ejemplo, mediante la piperidina,
- escisión de la resina, por ejemplo, con un ácido tal como el ácido trifluoroacético, en presencia de sustancias limpiadoras tales como etanoditiol, o tioanisol o anisol,
- extracción del péptido con un disolvente tal como éter dietílico para eliminar la mayoría del ácido y de las sustancias limpiadoras,
- purificación, tal como con HPLC para obtener:

(B)

|



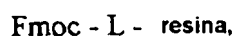
La biotina puede acoplarse convenientemente al terminal amino libre de una cadena peptídica protegida completamente de otro modo utilizando también procedimientos convencionales de activación. Dado que la biotina posee un grupo carboxilo y no grupos amino, la biotina funciona esencialmente como un finalizador de cadena. Los agentes activadores preferidos para la activación *in situ* incluyen pero no se limitan al hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tripirrolidinofosfonio (PyBOP), hexafluorofosfato de O-benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametiluronio (HBTU) y tetrafluoroborato de O-(1H-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TBTU). Los procedimientos de activación que emplean estos compuestos y relacionados, son conocidos por los expertos en la técnica de la síntesis peptídica en fase sólida y el acoplamiento de la biotina no acarrea una desviación significativa de los protocolos habituales de acoplamiento. Puede utilizarse también la biotina en una forma preactivada. Se emplean convenientemente la N-hidroxisuccinimidobiotina o el éster biotinamidocaproato N-hidroxisuccinimida y ambos están comercialmente disponibles. Este procedimiento de acoplamiento ha sido descrito por Lobl, T.J., Deibel, M.R. y Yem, A.W., Anal. Biochem (1988) 170 (2):502-511. Después de la adición de la biotina N-terminal, el péptido se escinde de la resina en presencia de los péptidos y de la naturaleza de los grupos protectores utilizados.

Los péptidos biotinilados con terminal carboxi implicados en el procedimiento de la invención pueden prepararse según el procedimiento que comprende

- acoplamiento de una forma activada por carboxi del producto intermedio tal como se definió anteriormente para un enlazador escindible unido a la resina, por ejemplo para obtener el compuesto siguiente:

(B)

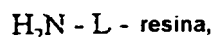
|



- desprotección del grupo α amino del compuesto intermedio, por ejemplo mediante piperidina para obtener:

B

|



- adición sucesiva de los aminoácidos $\text{AA}_1 \dots \text{AA}_n$ posteriores debidamente protegidos en

(B)

|



para obtener:

(B)

|

Fmoc - AA_n ... AA₁ - L - resina,

- desprotección del terminal NH₂, por ejemplo, mediante la piperidina,
- desprotección del compuesto obtenido, escisión a partir de la resina, extracción y purificación del péptido obtenido, biotinilado en su terminal carboxilo, pudiendo llevar a cabo simultánea o separadamente las etapas de desprotección de la cadena lateral y siendo susceptible la escisión del péptido de realizarse simultáneamente o por separado, y particularmente,
- desprotección del terminal NH₂, por ejemplo, mediante la piperidina,
- escisión a partir de la resina por ejemplo, mediante ácido trifluoroacético, en presencia de "sustancias limpiadoras" tales como etanoditiol, o tioanisol, o anisol,
- extracción del péptido con un solvente tal como éter dietílico para eliminar la mayoría de los ácidos y de las "sustancias limpiadoras",
- purificación, tal como con HPLC para obtener:

(B)

|

AA_n.... AA₁ - L

Los péptidos biotinilados internamente pueden prepararse según un procedimiento que comprende las etapas siguientes:

- adición sobre la resina de aminoácidos sucesivos debidamente protegidos para dar:
- Fmoc-AA_n.....AA₁-resina,**
- desprotección del NH₂ terminal,
 - adición del producto intermedio:

(B)

|

Fmoc - L

mediante su COOH sobre el terminal NH₂ para obtener:

(B)

|

Fmoc - L- AA_n AA₁ - resina,

- desprotección del grupo α amino del compuesto intermedio, por ejemplo mediante la piperidina para obtener:

(B)

|

L - AA_n AA₁ - resina,

- adición sobre la resina de los aminoácidos sucesivos debidamente protegidos para dar lugar a:

(B)

|

Fmoc -AA_n AA₁ - L - AA_n AA₁ - resina,

- desprotección del grupo NH₂ terminal del compuesto obtenido, escisión a partir de la resina, extracción y purificación del péptido obtenido, biotinilado en su terminal amino, pudiendo llevar a cabo simultánea o por separado las fases de desprotección de la cadena lateral y escisión y particularmente,
- desprotección del grupo NH₂ terminal del péptido, por ejemplo, mediante la piperidina,
- escisión a partir de la resina, por ejemplo, con un ácido tal como el ácido trifluoroacético, en presencia de sustancias limpiadoras tales como etanoditiol, tioanisol o anisol,
- extracción del péptido con un solvente tal como éter dietílico para eliminar la mayoría del ácido y de las sustancias limpiadoras,
- purificación, tal como con HPLC para obtener:

(B)

|

AA_n AA₁ - L - AA_n AA₁

En determinadas circunstancias, puede demostrarse que es particularmente ventajoso poder biotinar un péptido internamente o en su extremo carboxilo. Tales casos se producen, por ejemplo, cuando la secuencia aminoácida de un péptido corresponde a la secuencia amino terminal de una proteína. La unión de la biotina al terminal amino de dicho péptido da lugar a una estructura que es significativamente distinta de la encontrada en la proteína original y puede afectar, como consecuencia, desfavorablemente a las propiedades de unión de las propiedades bioquímicas del péptido. También es posible que incluso para los péptidos que corresponden a secuencias proteicas internas, su reconocimiento mediante proteínas de unión o inmunoglobulinas puede depender del terminal del péptido que sea y de la manera en la que se presente que se una. La importancia de la orientación peptídica se ha descrito por Dyrberg, T. y Oldstone, M.B.A, J.Exp.Med. (1986) 164:1344-1349.

Para poder incorporar un resto de biotínulo en un péptido, en una posición e independientemente de la secuencia, se realizaron esfuerzos para sintetizar un reactivo apropiado que puede acoplarse utilizando procedimientos convencionales. Un reactivo conveniente para la biotinilización interna o del terminal C es la N- ϵ -biotinil-lisina. Siempre que el grupo α -amino de este compuesto esté protegido de manera adecuada (Fmoc y tBoc), este reactivo puede utilizarse para introducir una biotina en cualquier lugar de la cadena peptídica, incluyendo el terminal amino, mediante los procedimientos convencionales utilizados en la síntesis peptídica en fase sólida. Se ha descrito la síntesis del derivado t-Boc-protegido (Bodansky, M., y Fagan, D.T., J.Am.Chem.Soc. (1977) 99:235-239) y se utilizó en la síntesis de péptidos cortos para su utilización en el estudio de las actividades enzimáticas de determinadas transcarboxilasas.

A diferencia del derivado t-Boc, no se ha descrito la síntesis de N- α -Fmoc-Lys (N- ϵ -biotina) y dado el interés creciente en las estrategias de síntesis basadas en Fmoc, este compuesto se considera particularmente ventajoso.

Existen numerosas vías posibles que pueden tomarse para llegar al compuesto Fmoc-protegido deseado. Estas se muestran en la Figura 1. En una primera aproximación, puede utilizarse N- α -Fmoc-Lys (N- ϵ -tBoc) como material de partida. La protección N- ϵ -tBoc se elimina utilizando ácido trifluoroacético y una sustancia limpiadora tal como

agua. Un ligero exceso molar de la N- α -Fmoc-lisina obtenida de este modo se hace reaccionar entonces con biotina carboxi-activada. El producto resultante puede purificarse mediante extracciones selectivas y técnicas cromatográficas convencionales. En un procedimiento alternativo, la N- α -Fmoc-Lys (N- ϵ -biotina) puede producirse a partir de N- ϵ -biotinil lisina (biocitina) comercialmente disponible por reacción con carbonato de fluorenilmetil-succinimidilo. En

5 Atherton y Sheppard, Solid Phase Peptide Synthesis, ILR Press, 1989, se proporcionan numerosos ejemplos de estas reacciones, que pueden utilizarse como pautas.

La estrategia mostrada en la Figura 1 (procedimiento A) puede también aplicarse para sintetizar N- α -Fmoc-ornitina (N- β -biotina) a partir de N- α -Fmoc-ornitina (N- β -tBoc) disponible comercialmente. El derivado de la ornitina difiere del de la lisina sólo en la longitud de la cadena lateral que, para el derivado de la ornitina, es más corto en un átomo de carbono. La N- α -Fmoc-Lys puede incorporarse convenientemente en la cadena peptídica utilizando los mismos reactivos que para la activación *in situ* descritos para la biotina libre.

Alternativamente, el éster N- α -Fmoc-Lys (N- ϵ -biotina)-O-pentafluorofenílico puede sintetizarse sin inconvenientes a partir de N- α -Fmoc-Lys (N- ϵ -biotina) y del trifluoroacetato de pentafluorofenilo utilizando la reacción de transesterificación catalizada por una base descrita por Green, M. y Berman, J. Tetrahedron Lett (1990) 31:5851-5852, para la preparación de ésteres O-pentafluorofenílicos de aminoácidos. Este éster activo puede utilizarse directamente para incorporar N- α -Fmoc-Lys (N- ϵ -biotina) en la cadena peptídica. El tipo de productos intermedios anteriormente definidos puede prepararse según un procedimiento que comprende las etapas siguientes:

- 20 - reacción de un ácido diamino-, monocarboxílico descrito anteriormente con carbonato de fluorenilmetilsuccinimidilo o cloroformato de fluorenilmetilo en condiciones de pH muy controladas para dar un derivado N- α -Fmoc protegido uno a uno.
- 25 - o alternativamente, utilización de los ácidos diamino-monocarboxílicos protegidos con N- α -Fmoc cuando se proporciona el grupo amino de la cadena lateral con un grupo protector que es diferente del grupo Fmoc utilizado para proteger el grupo α -amino, pudiendo ser eliminado selectivamente el grupo protector amino de la cadena lateral en condiciones que dejan intacto el grupo N- α -Fmoc,
- 30 - purificación del derivado monoprotegido del ácido N- α -Fmoc-diamino-monocarboxílico mediante extracciones selectivas y cromatografía.
- reacción del derivado obtenido con un derivado carboxi-activado de la biotina, tal como la N-hidroxisuccinimidobiotina, para obtener el derivado (N- α -Fmoc)-(N-y-biotina) que es el producto intermedio deseado.
- 35 - purificación del producto intermedio mediante extracciones selectivas, precipitaciones o cromatografía.

Cuando los péptidos biotinilados utilizados en el procedimiento de la invención han de proveerse de partes de enlace, estas entidades químicas pueden unirse sin inconvenientes al terminal N o C de una secuencia peptídica durante la síntesis en fase sólida utilizando protocolos de acoplamiento convencionales, con tal que los grupos amino de dichos compuestos estén provistos de la apropiada protección temporal del grupo amino.

Descripción de las figuras y tablas

45 Todas las muestras y sueros que se mencionan en las figuras y tablas son muestras y sueros que se seleccionan de manera arbitraria que contienen anticuerpos producidos como resultado de la infección natural por un agente vírico.

La Figura 1 representa las estrategias para la síntesis de N- α -Fmoc-lisina (N- ϵ -Biotina).

50 Más específicamente:

El Procedimiento A corresponde a la síntesis de (N- α -Fmoc-Lys (N- ϵ -biotina) a partir de la N- ϵ -Fmoc-Lys(N- ϵ -tBoc) y el Procedimiento B corresponde a la síntesis de (N- α -Fmoc-Lys)N- ϵ -biotina a partir de la N- ϵ -biotinil lisina.

55 La Figura 2 representa el diagrama obtenido en cromatografía en fase inversa de los precursores implicados en la preparación de los productos intermedios definidos anteriormente, y de los compuestos intermedios.

La cromatografía en fase inversa se ha llevado a cabo en las condiciones siguientes:

- 60 - especificaciones de gradiente:
tampón A: TFA al 0,1% en H₂O
tampón B: TFA al 0,1% en acetonitrilo
- 65 columna: C2/C18 fase inversa (Pharmacia, Pep-S)
longitud de onda de detección: 255 nanómetros

- gradiente:

B al 0% de 0 a 1 minuto

5 B al 0% a B al 100%, de 1 minuto a 60 minutos

B al 0% de 60 minutos a 70 minutos.

10 El primer diagrama corresponde al procedimiento A (véase la Figura 1) y el segundo diagrama corresponde al procedimiento B (véase la Figura 1).

La Tabla 1 representa el reconocimiento global de los péptidos no biotinilados del bucle V3 del VIH.

15 La Tabla 2 representa el reconocimiento de los péptidos del VIH según la región geográfica.

Todas las secuencias de aminoácidos se proporcionan con el código de tres letras convencional y universalmente aceptado y donde se indique, con el código de una letra. Las secuencias peptídicas se dan de izquierda a derecha, que es convencionalmente la dirección desde el terminal amino hasta el terminal carboxilo.

20 Se utilizan también numerosos códigos no convencionales para representar grupos químicos o modificaciones y se definen de la manera siguiente:

	Grupo	Código
25	AC	acetilo
	Bio	D-biotinilo
	Fmoc	9-fluorenilmetoxycarbonilo
30	IBoc	butiloxycarbonilo terciario

Ejemplo 1

35 *Síntesis peptídica*

Todos los péptidos descritos se sintetizaron sobre TentaGel S-RAM (Rapp Polymere, Tübingen, Alemania), un injerto poliestirénico-polioxi-etilénico funcionalizado con copolímero con el enlazador lábil ácido 4-(α -Fmoc-amino-2',4'-dimetoxibencil) fenoxiacético (Rink, *Tetrahedron Letters* (1987) 28:3787) con objeto de generar amidas peptídicas con terminal carboxilo en la escisión. Se utilizó la protección de la cadena lateral basada en t-butilo y la Fmoc- α -amino. El grupo guanidino de la arginina se protegió con el resto 2,2,5,7,8-pentametilcromano-6-sulfonilo. El grupo imidazol de la histidina se protegió con t-Boc o tritilo, y el grupo sulfhidrilo de la cisteína se protegió con un grupo tritilo. Se llevaron a cabo los acoplamientos utilizando ésteres de o-pentafluorofenilo preformados excepto en el caso de la arginina, en la que se utilizó TBTU como agente activante en presencia de 1,5 equivalentes de la base N-metilmorfolina. Ocasionamente, la glutamina y la asparagina se acoplaron también utilizando la activación TBTU. En estos casos, se utilizaron los derivados protegidos por tritilo de estos aminoácidos. La biotina se acopló utilizando, bien TBTU o HBTU. Todas las síntesis se llevaron a cabo sobre un sintetizador de péptidos Milligen 9050 (Novato, California) utilizando procedimientos en flujo continuo. Tras la escisión con ácido trifluoroacético en presencia de sustancias limpiadoras y extracción con éter dietílico, se analizaron todos los péptidos por cromatografía en fase inversa C18.

Ejemplo 2

Síntesis de N- α -Fmoc-Lys (N- ϵ -biotina)

55 A. Procedimiento A

Se trató la N- α -Fmoc-L-lisina comercialmente disponible (N- ϵ -tBoc) (1,5 gramos) con 20 mililitros de ácido trifluoroacético al 95% y H₂O al 5% durante 2 horas a temperatura ambiente. La mayor parte del ácido se evaporó entonces bajo corriente de nitrógeno. Se añadieron diez mililitros de agua y la solución se extrajo 3 veces con éter dietílico. La fase acuosa se evaporó entonces a secuencia al vacío sobre pentóxido de fósforo. El polvo resultante (N- α -Fmoc-L-lisina) se analizó por cromatografía de fase inversa y puso de manifiesto un producto homogéneo que era, tal como se esperaba, más hidrófilo que el material de partida.

65 Se disolvió la N- α -Fmoc-lisina (190 mg, 0,49 mmoles) en 8 ml de tampón borato 0,1 M, pH 8,7, la N-hidroxisuccinimidobiotina (162 mg, 0,47 mmoles) se disolvió en 4 mililitros de dimetilformamida y se añadió a la solución de N- α -Fmoc-lisina. El pH se comprobó y se ajustó si era necesario, con NaOH. Tras 2 horas, se acidificó la solución con HCl hasta pH 2,0, obteniéndose entonces un precipitado blanco.

Tras la extracción con acetato de etilo y centrifugación, el precipitado blanco se encontró en la interfase H₂O:acetato de etilo. Ambas fases se eliminaron y el precipitado se extrajo dos veces con HCl 10 mM y una vez con acetato de etilo, seguido de dos extracciones con éter dietílico. Se disolvió el precipitado en DMF y se precipitó añadiendo éter dietílico. El polvo cristalino se secó a continuación al vacío sobre pentóxido de fósforo. El producto resultante se analizó por cromatografía en fase inversa y puso de manifiesto un pico principal que, tal como se esperaba, eluyó después de N- α -Fmoc-Lys. Se observó también un pico muy pequeño de N- α -Fmoc-Lys (Figura 2a).

B. Procedimiento B

N- ϵ -biotinil-lisina (biocitina, Sigma, 249 mg, 0,67 mmoles) comercialmente disponible se disolvió en 8 mililitros de Na₂CO₃ 1 M y se enfrió en hielo. Se disolvió el carbonato de fluorenilmetilsuccinimido (222 mg, 0,66 mmoles) en 2 ml de acetona y se añadió a la solución de biotinil-lisina durante 30 minutos agitando intensamente. Se continuó la agitación durante 5 horas a temperatura ambiente. Se mantuvo el pH entre 8 y 9 añadiendo Na₂CO₃ 1M cuando era necesario. Se evaporó a continuación la acetona al vacío y se añadió HCl 1,0 M hasta que el pH de la solución fue aproximadamente 2. Durante la acidificación de la solución, apareció un precipitado blanco que se lavó dos veces con HCl 10 mM, dos veces con acetato de etilo, y dos veces con éter dietílico. El precipitado se disolvió en DMF y se precipitó mediante la adición de éter dietílico. El polvo cristalino se secó entonces completamente al vacío sobre pentóxido de fósforo. El producto resultante se analizó por cromatografía en fase inversa y puso de manifiesto un pico principal que eluyó con el mismo tiempo de retención (30,5 minutos) que el producto obtenido utilizando el procedimiento 1 (Figura 2b).

Ejemplo 3

Procedimientos para la determinación de péptidos que corresponden a epítomos inmunológicamente importantes en un ensayo inmunoabsorbente con enzima ligada (ELISA), utilizando anticuerpos específicos

Cuando los péptidos debían revestirse directamente, las soluciones de almacenamiento de los péptidos se diluyeron en tampón carbonato sódico, pH 9,6, y se utilizaron para revestir placas de microvaloración de poliestireno a una concentración peptídica de 2 a 5 microgramos por mililitro durante una hora a 37°C.

En los casos en los que debían evaluarse los péptidos biotinilados, se cubrieron en primer lugar las placas con estreptavidina en tampón carbonato sódico, pH 9,6, a una concentración de 3 microgramos por mililitro durante una 1 a 37°C. Las placas se lavaron a continuación para eliminar el exceso de proteínas no unidas. Se añadió entonces una solución de trabajo del péptido biotinilado de 1 microgramo por mililitro en tampón de carbonato sódico, a los pocillos de la placa de microtitulación y se incubó durante 1 hora a 37°C.

Una vez que las placas se han revestido con antígeno, cualquier punto de unión libre que quedara sobre el plástico se bloqueó con caseína. Tras el lavado, se añadió a los pocillos de las placas una dilución de los antiseros apropiados, habitualmente 1:100, incubándose durante 1 hora a 37°C.

Después de lavar para eliminar el material no unido, se detectó la unión del anticuerpo específico incubando las placas con anticuerpos de cabra anti-inmunoglobulina humana conjugados con el enzima peroxidasa de rábano picante. Tras la eliminación del conjugado no unido mediante lavado, se añadió una solución que contenía H₂O₂ y 3,3',5,5'-tetrametilbencidina.

Se interrumpieron las reacciones tras un intervalo apropiado añadiendo ácido sulfúrico. Las reacciones positivas dieron lugar a un color amarillo que se cuantificó utilizando un lector convencional de placa de microvaloración. Las mediciones de la absorbancia se realizaron a una longitud de onda de 450 nanómetros y todos los datos se expresan como un valor de densidad óptica a esta longitud de onda.

Todos estos péptidos se han proporcionado con espaciadores Gly-Gly y una biotina en el terminal amino. Se evaluaron los péptidos en un experimento de inmunoanálisis lineal (LIA) y se compararon con los péptidos nucleares más cortos. Los resultados se muestran en la Figura 9. Los péptidos nucleares más largos se comparan muy favorablemente con los péptidos más cortos y consecuentemente proporcionan una reacción más intensa. Esto podría explicarse si (i) los péptidos más largos incorporan dos o más epítomos que se extendieron previamente sobre dos péptidos por separado y/o (2) existe alguna contribución de la configuración que puede ser más importante en los péptidos más largos.

Ejemplo 4

Utilización de péptidos biotinilados de la zona del bucle V3 DE GP120 de diferentes cepas de VIH-1 en un inmunoanálisis lineal para la detección de anticuerpos contra VIH

Con objeto de determinar el valor de diagnóstico general de la zona del bucle V3 de gp120, se sintetizaron nueve péptidos procedentes de esta zona de nueve cepas diferentes de VIH-1 y se incluyeron en un LIA.

Los nueve péptidos estaban provistos de un espaciador Gly-Gly y una biotina en el terminal N.

ES 2 287 969 T3

Las secuencias de los péptidos alineadas (código para aminoácidos de una letra) son las siguientes:

5	CON	NNTRKSIHI-GPGRAFYTTGEIIG	23 (SEC ID nº3)
	SF2	NNTRKSIYI-GPGRAFHTTGRIIG	23 (SEC ID nº4)
	SC	NNTTRSIHI--GPGRAFYATGDIIG	23 (SEC ID nº5)
	MN	YNIKRKRIHI--GPGRAFYTTIKNIIG	23 (SEC ID nº6)
10	RF	NNTRICSITK--GPGRVIYATGQIIG	23 (SEC ID nº7)
	MAL	NNTRRGIHF-GPGQALYTTG-IVG	22 (SEC ID nº8)
	BH	NNTRKSIRIQRGPGRAFTIGKI-G	24 (SEC ID nº9)
	ELI	QNTRQRTPI--GLGQSLYTT-RSRS	22 (SEC ID nº10)
15	ANT70	QIDIQEMRI-GP-MAWYSMG-IGG	21 (SEC ID nº2)

20 Los péptidos se mezclaron con estreptavidina en un ligero exceso molar sobre los puntos de unión a la biotina y los complejos péptido:estreptavidina se separaron del material no unido a lo largo de Sephadex G-25.

El material que eluye en el volumen vacío se utilizó en la preparación del LIA.

25 Se probaron un total de 332 sueros que se habían extraído de varias zonas geográficas. Dado que se conoce que las cepas de virus aisladas en Europa o América del Norte presentan menos variabilidad cepa a cepa que las cepas africanas, eran de esperar diferencias geográficas en el reconocimiento de la secuencia del bucle V3. Las reacciones de varias líneas se evaluaron como positivas (i) o negativas (o) (datos no mostrados).

30 Una evaluación completa de los sueros de proporciona en la Tabla 1. En total, 307 de los 332 sueros dieron una reacción a por lo menos un péptido en el LIA del bucle V3. Los sueros que no pudieron dar una reacción a ningún péptido en el LIA del bucle V3 se analizaron por transferencia Western para determinar si los sueros eran realmente positivos para los anticuerpos anti-VIH-1. Se observó que 6 sueros eran de hecho negativos. El número total de sueros positivos ensayados fue por consiguiente 326. Existían, sin embargo, 19 sueros que contenían anticuerpos contra gp120 que no pudieron reaccionar con ninguno de los LIA de bucle V3, el porcentaje de los sueros que da 35 una reacción positiva fue, en términos globales, del 94%. Existían, sin embargo, diferencias geográficas significativas. Estas diferencias se presentan en la Tabla 2.

El porcentaje total de sueros de las diferentes regiones geográficas que dan por lo menos una reacción positiva puede resumirse de la forma siguiente:

40	Europea	100%
	Africana	94%
45	Brasileña	92%

Las evaluaciones adicionales con muestras europeas indican que este porcentaje es, de hecho, algo menos del 100% (datos no mostrados). Las muestras africanas que no pudieron proporcionar una reacción en el LIA no habían sido analizadas por transferencia Western para confirmar la presencia de otros anticuerpos contra VIH.

50 Era de esperar que los sueros europeos tuvieran buenas puntuaciones. La puntuación más baja obtenida para los sueros africanos también fue no totalmente inesperada, ya que es conocido que existe más heterogeneidad vírica en África. Dado que las secuencias del bucle V3 de las cepas africanas del VIH no han sido tan extensamente caracterizadas como las cepas europea o norteamericana, es evidente que no se tiene una secuencia representativa, o que 55 intentando caracterizar las cepas africanas desde el punto de vista de una secuencia de consenso no es posible emplear ya que existe demasiada divergencia de la secuencia. Los resultados obtenidos con los sueros brasileños eran de esperar ya que no se ha comunicado nunca nada referente a la variabilidad del VIH en Brasil. A partir de estos resultados, parece que la situación en Brasil recuerda más estrechamente la situación en África y no la situación en América del Norte o Europa.

60

65

ES 2 287 969 T3

TABLA 1

	CON	SC	MN	SF2	BH	RF	MAL	ELI	70
SUMA total	287	261	275	258	108	146	140	24	6
RECuento	326	326	326	326	326	326	326	326	326
positivos a gp120	88	80	84	79	33	45	43	7	2
% reactivos	287	261	275	258	108	146	140	24	6
SUMA total	307	307	307	307	307	307	307	307	307
RECuento									
positivos a VIH-V3	93	85	90	84	35	48	46	8	2
% reactivos									

TABLA 2

EUROPEA	%	AFRICANA	%	BRASILEÑA	%
Consenso	98	Consenso	89	Consenso	82
VIH-1 (SC)	98	VIH-1 (MN)	85	VIH-1 (MN)	78
VIH-1 (SF2)	98	VIH-1 (SF2)	79	VIH-1 (SC)	75
VIH-1 (MN)	97	VIH-1 (SC)	73	VIH-1 (SF2)	72
VIH-1 (RF)	75	VIH-1 (MAL)	60	VIH-1 (RF)	38
VIH-1 (MAL)	68	VIH-1 (RF)	34	VIH-1 (MAL)	30
VIH-1 (IIIB)	61	VIH-1 (IIIB)	27	VIH-1 (IIIB)	26
VIH-1 (ELI)	8	VIH-1 (ELI)	13	VIH-1 (ELI)	5
ANT 70	2	ANT 70	2	ANT 70	2

REIVINDICACIONES

1. Péptido que presenta una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo constituido por:

(A)-(B)-(X)-Y- Leu-Trp-Gly-Cys-Lys-Gly-Lys-Leu-Val-Cys-Y(X)-Z (SEC. ID. nº: 1) y (A)-(B)-(X)-Y-Gln-Ile-Asp-Ile-Gln-Glu-Met-Arg-Ile-Gly-Pro-Met-Ala-Trp-Tyr-Ser-Met-Gly-Ile-Gly-Gly-Y(X)-Z (SEC. ID. nº: 2)

en el que

- A, si está presente, tal como está indicado por los paréntesis, representa (un) aminoácido(s), un grupo amino, o una modificación química del amino terminal de la cadena peptídica;
- Z representa un(os) aminoácido(s), un grupo OH, un grupo NH₂, o un enlace que implica cualquiera de estos dos grupos químicos;
- B representa biotina;
- X representa un compuesto biotinilado que es incorporado durante el proceso sintético;
- Y representa un enlace covalente o una o más entidades químicas que forman individualmente o juntas una parte enlazadora que separa los aminoácidos del propio péptido del resto B o X del biotinilo, cuya función es para minimizar el impedimento estérico que puede interferir con la unión del resto B o X del biotinilo a la avidina o a la estreptavidina, en el que Y no es un enlace covalente, ventajosamente es por lo menos una entidad química y puede estar constituido como mucho de 30 entidades químicas pero estará constituido más frecuentemente por entre 1 y 10 entidades químicas, que pueden ser idénticas o diferentes, más preferentemente restos de glicina, β -alanina, ácido 4-aminobutírico, ácido 5-aminovalérico o ácido 6-aminohexanoico;
- B y X entre paréntesis indican que la presencia de biotina o de un compuesto biotinilado en estas posiciones es opcional, siendo el único requerimiento que B ó X estén presentes por lo menos en una de las posiciones mostradas;

o fragmentos de cualesquiera de los péptidos dados anteriormente, reconociendo dichos fragmentos anticuerpos contra el VIH sustancialmente con la misma sensibilidad que las secuencias de las que proceden.

2. Péptido según la reivindicación 1, que presenta una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo constituido por:

Leu-Trp-Gly-Cys-Lys-Gly-Lys-Leu-Val-Cys (SEC. ID. nº: 1) o

Gln-Ile-Asp-Ile-Gln-Glu-Met-Arg-Ile-Gly-Pro-Met-Ala-Trp-Tyr-Ser-Met-Gly-Ile-Gly-Gly (SEC. ID. nº: 2).

3. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, estando dicho péptido biotinilado, preferentemente durante la síntesis peptídica, estando dicho péptido biotinilado en el terminal N, en el terminal C o internamente.

4. Péptido según la reivindicación 3, que está acoplado a la estreptavidina o a la avidina, estando la estreptavidina o la avidina acopladas posiblemente ellas mismas a una fase sólida.

5. Péptido según la reivindicación 3, en el que dicho péptido está acoplado mediante su grupo biotina a la estreptavidina presente en una membrana de nilón.

6. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, estando anclado dicho péptido a un soporte sólido mediante interacciones covalentes o no covalentes.

7. Procedimiento para detectar anticuerpos contra el VIH presentes en una muestra biológica, que comprende:

- (i) poner en contacto la muestra biológica en la que va a analizarse la presencia de VIH con un(os) péptido(s) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6,
- (ii) detectar el complejo inmune formado entre dichos anticuerpos y dicho(s) péptido(s).

8. Procedimiento para determinar el tipo de VIH presente en una muestra que comprende:

- (i) poner en contacto la muestra biológica en la que va a analizarse la presencia de VIH con un(os) péptido(s) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6,

ES 2 287 969 T3

(ii) detectar el complejo inmune formado entre dichos anticuerpos y dicho(s) péptido(s).

9. Análisis inmunológico para detectar anticuerpos contra VIH que emplea un(os) péptido(s) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

5

10. Análisis inmunológico competitivo para detectar anticuerpos contra VIH que emplea un péptido según las reivindicaciones 1 a 3, siendo capaz dicho péptido de competir con un antígeno o un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 que está unido a una fase sólida.

10

11. Análisis inmunológico para detectar anticuerpos contra VIH según las reivindicaciones 9 a 10, estando unidos dichos péptidos a una membrana en forma de líneas paralelas.

12. Análisis inmunológico para detectar simultáneamente la presencia o ausencia de anticuerpos contra distintos genotipos de VIH en una muestra que emplea un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

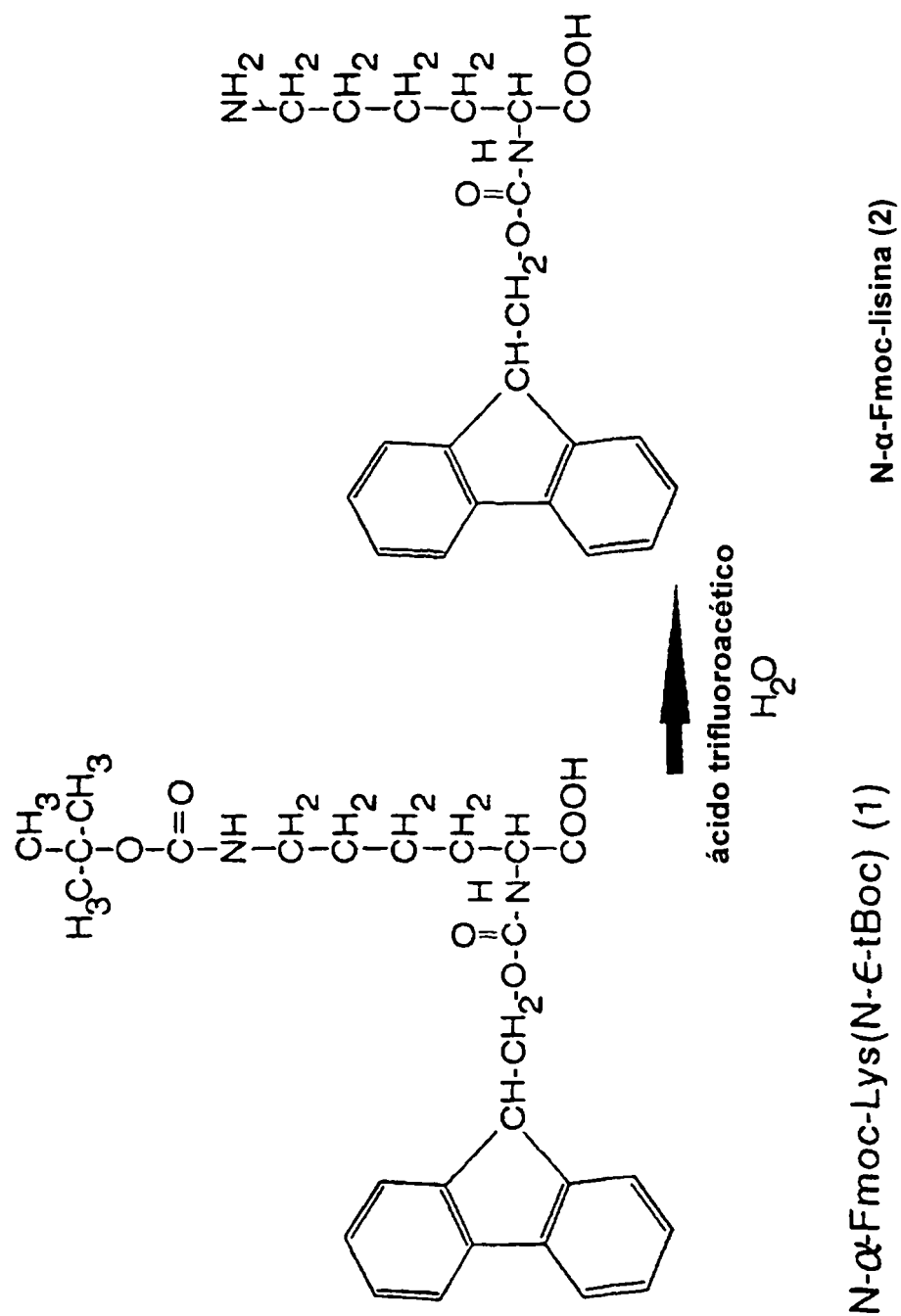


Figura 1a

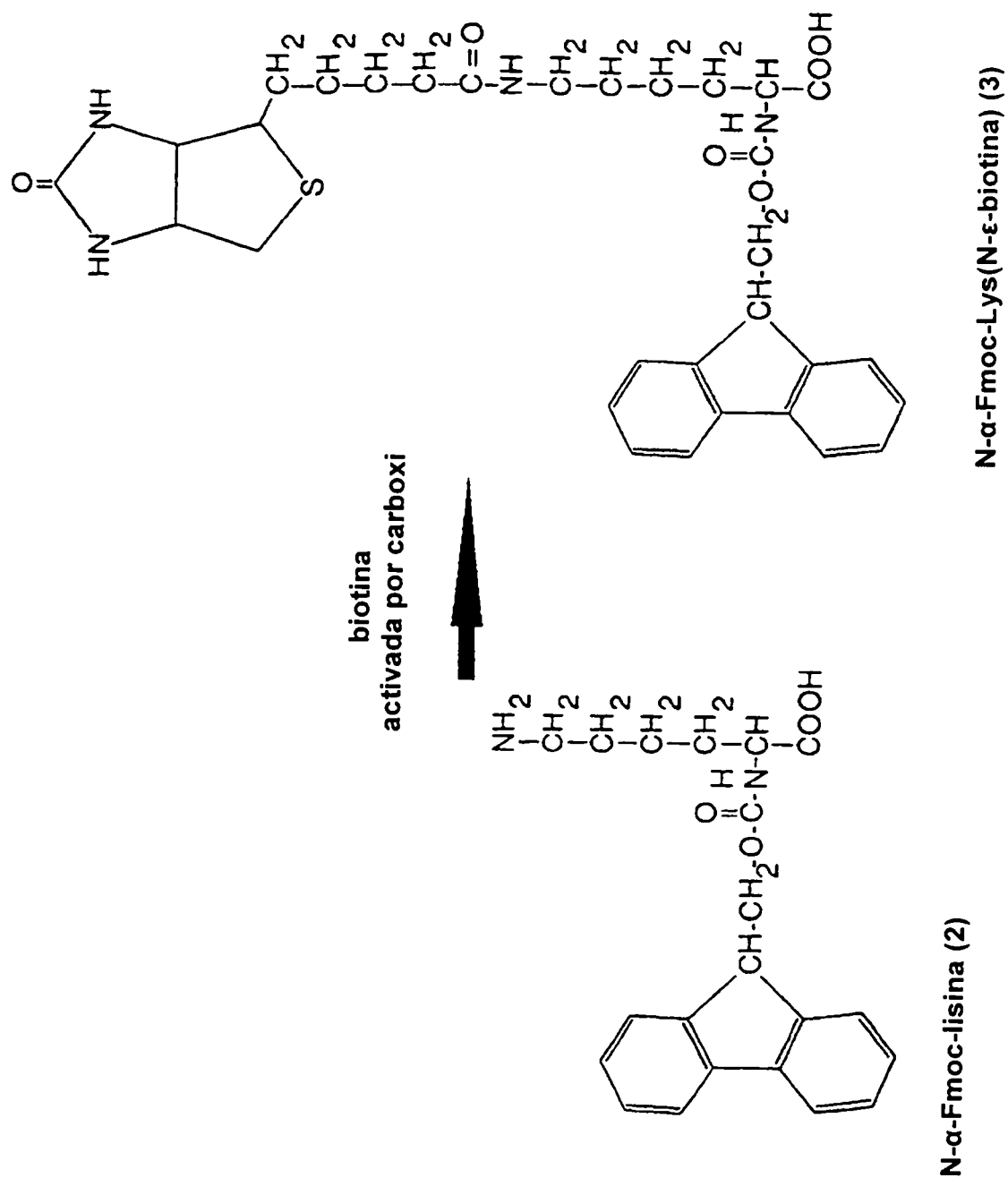


Figura 1b

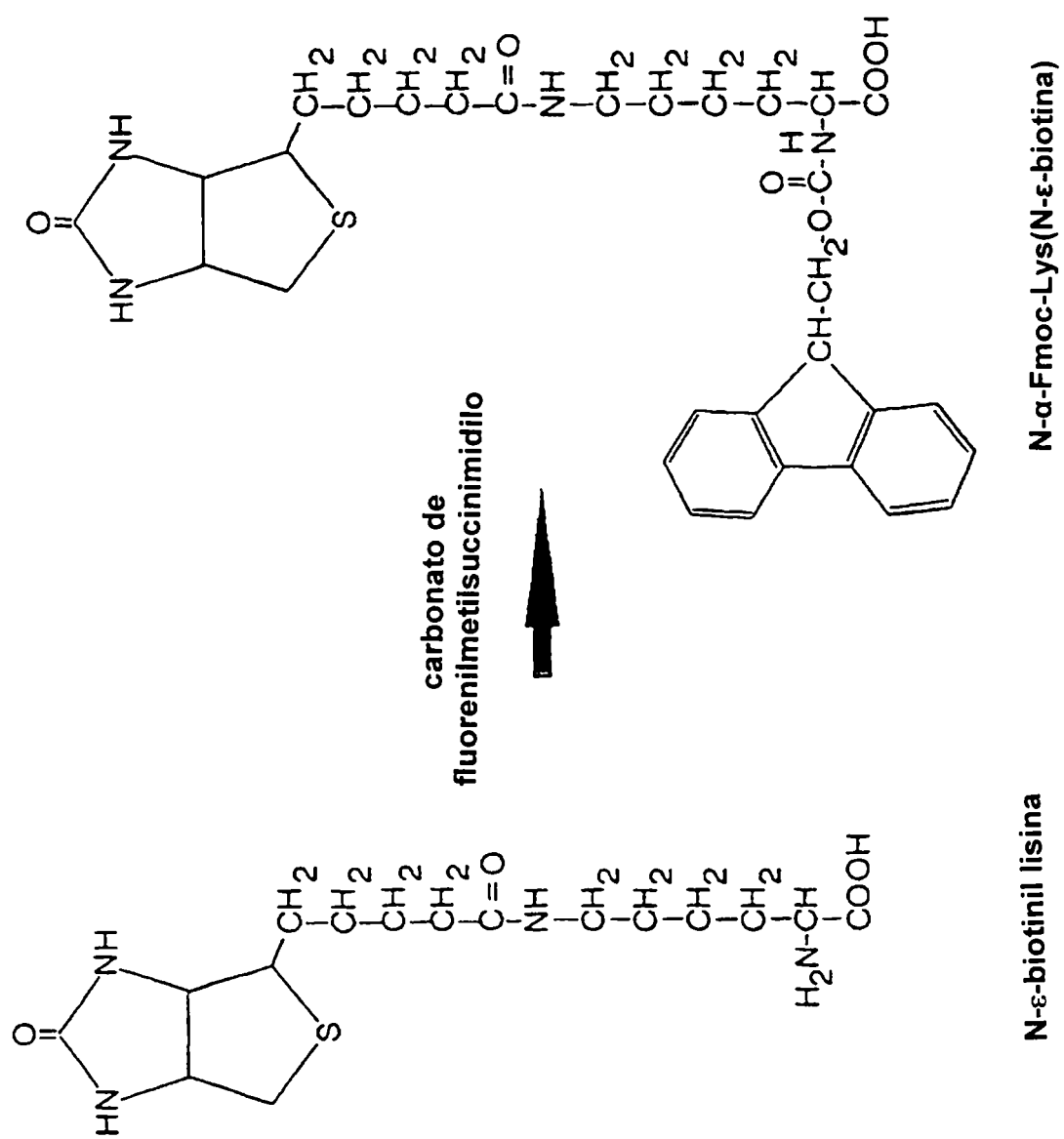
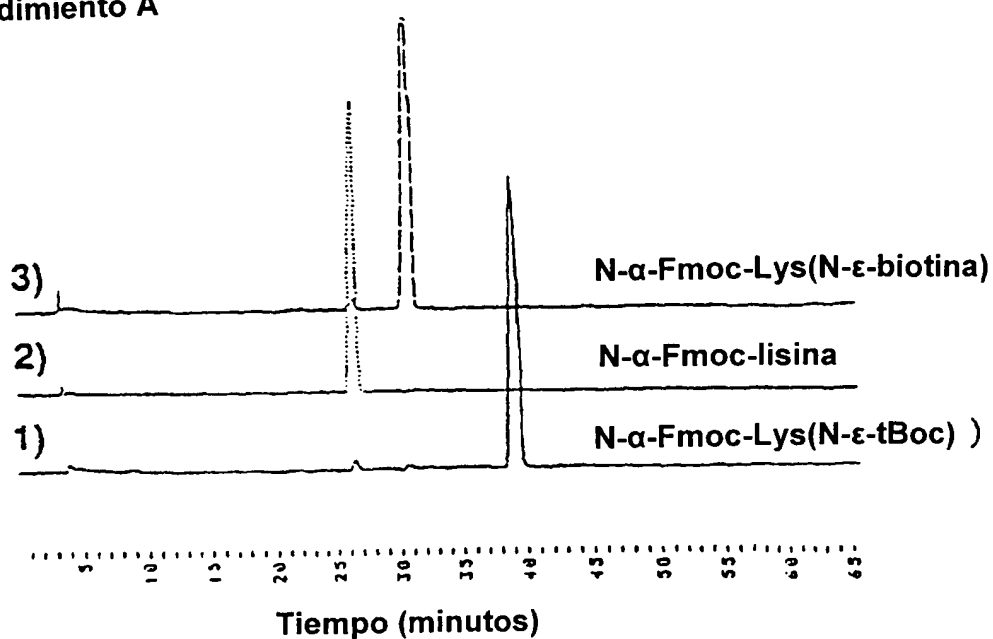
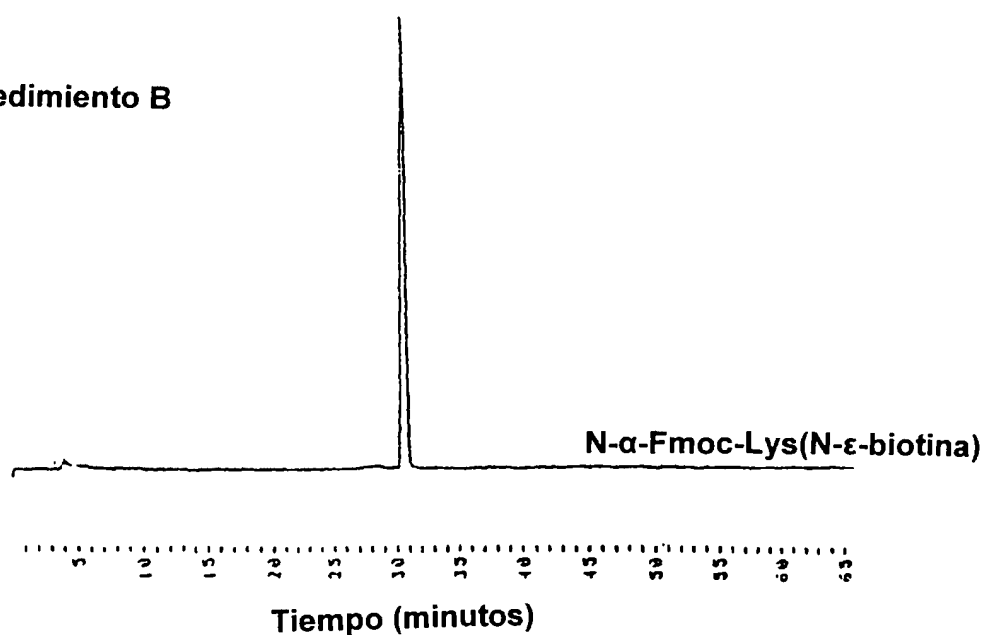


Figura 1c

Procedimiento A



Procedimiento B



Especificaciones del gradiente:

Tampón A: TFA al 0,1% en H₂O

Tampón B: TFA al 0,1% en acetonitrilo

Columna: fase inversa C₂/C₁₈ (Pharmacia, Pep-S)

Longitud de onda de detección: 255 nanómetros

Gradiente:

Figura 2

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

(i) SOLICITANTE:

- (A) NOMBRE: INNOGENETICS NV
- (B) CALLE: INDUSTRIEPARK ZWIJNAARDE NR 7, BOX 7
- (C) CIUDAD: GANTE
- (E) PAÍS: BÉLGICA
- (F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): B9052
- (G) TELÉFONO: 32 9 241 07 11
- (H) TELEFAX: 32 9 241 07 99

(ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: PÉPTIDOS DE VIH

(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 10

(iv) LISTADO DESCIFRABLE POR ORDENADOR:

- (A) TIPO DE MEDIO: Disquete
- (B) ORDENADOR: IBM PC compatible
- (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
- (D) PROGRAMA INFORMÁTICO: PatentIn Release nº 1.0, Versión nº 1.30 (EPO)

(v) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL: NÚMERO DE SOLICITUD: EP 98202777.3

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 1:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 10 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) NÚMERO DE CADENAS:
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

(i) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(ii) HIPOTÉTICA: NO

(iii) COMPLEMENTARIA: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 1:

Leu	Trp	Gly	Cys	Lys	Gly	Lys	Leu	Val	Cys
1				5					10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 21 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) NÚMERO DE CADENAS:
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) COMPLEMENTARIA: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 2:

ES 2 287 969 T3

Gln Ile Asp Ile Gln Glu Met Arg Ile Gly Pro Met Ala Trp Tyr Ser
1 5 10 15
Met Gly Ile Gly Gly
20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 23 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) NÚMERO DE CADENAS:

(D) CONFIGURACIÓN: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) **COMPLEMENTARIA: NO**

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 3:

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

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 23 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) NÚMERO DE CADENAS:

(D) CONFIGURACIÓN: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) COMPLEMENTARIA: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 4:

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

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 23 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) NÚMERO DE CADENAS:

(D) CONFIGURACIÓN: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NO

ES 2 287 969 T3

(iv) COMPLEMENTARIA: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 5:

5 Asn Asn Thr Thr Arg Ser Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr
1 5 10 15
Ala Thr Gly Asp Ile Ile Gly
20

10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

15 (A) LONGITUD: 23 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(C) NÚMERO DE CADENAS:
20 (D) CONFIGURACIÓN: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NO

25 (iv) COMPLEMENTARIA: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 6:

30 Tyr Asn Lys Arg Lys Arg Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr
1 5 10 15
Thr Thr Lys Asn Ile Ile Gly
20

35 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

40 (A) LONGITUD: 23 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(C) NÚMERO DE CADENAS:
(D) CONFIGURACIÓN: lineal

45 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) COMPLEMENTARIA: NO

50 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 7:

55 Asn Asn Thr Arg Lys Ser Ile Thr Lys Gly Pro Gly Arg Val Ile Tyr
1 5 10 15
Ala Thr Gly Gln Ile Ile Gly
20

60 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 8:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

65 (A) LONGITUD: 22 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(C) NÚMERO DE CADENAS:
(D) CONFIGURACIÓN: lineal

ES 2 287 969 T3

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) COMPLEMENTARIA: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 8:

Asn	Asn	Thr	Arg	Arg	Gly	Ile	His	Phe	Gly	Pro	Gly	Gln	Ala	Leu	Tyr
1				5					10					15	
Thr	Thr	Gly	Ile	Val	Gly										
			20												

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 9:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) NÚMERO DE CADENAS:

(D) CONFIGURACIÓN: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) COMPLEMENTARIA: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 9:

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

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 10:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 22 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) NÚMERO DE CADENAS:

(D) CONFIGURACIÓN: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) COMPLEMENTARIA: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 10:

Gln	Asn	Thr	Arg	Gln	Arg	Thr	Pro	Ile	Gly	Leu	Gly	Gln	Ser	Leu	Tyr
1				5					10					15	
Thr	Thr	Arg	Ser	Arg	Ser										
			20												