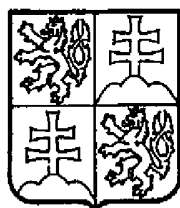


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(21) 02096-91.Y

(13) A3

5(51) C 07 K 7/00

(22) 08.07.91

(32) 09.07.90

(31) 90/549964

(33) US

(40) 18.03.92

(71) IAF BioChem International Inc., Montreal, CA

(72) Lacroix Martial, Brossard, CA

(54) Syntetické peptidy a jejich směsi pro detekci
protilátek HIV

(57) Jsou zde popsány cyklické peptidy obecných vzorců:

a-e-x-CSGKLIC-y-f-b (I)

a-e-x²-CSGKLIC-y-f-b (III)

kde x představuje aminokyselinovou sekvenci od posice 585 do 604 (gp41-HIV-1), takové aminokyselinové sekvence jsou charakterizovány přítomností alespoň jednoho lysinu v posici 586 nebo lysinu v obou místech 585 a 586; x² představuje aminokyselinovou sekvenci od posice 585 do 604 (gp41-HIV-1); y představuje aminokyselinovou sekvenci od posice 612 do 629 (gp41-HIV-1); e a f představují jeden nebo více epitopů, jež jsou obsaženy v aminokyselinové sekvenci s rozsahem posic 578-629 (gp41-HIV-1) nebo 578-613 (gp36-HIV-2); a i b představují amino a karboxy konce, a taktéž substituenty jež jsou účinné pro vytvoření peptidu, použitelnějšího jako diagnostické činidlo. Dále jsou také uvedeny peptidy obecných vzorců:

a-e-x¹-CAFRQVC-y¹-f-b- (II)

a-e-x²-CAFRQVC-y¹-f-b (IV)

kde x² představuje aminokyselinovou sekvenci v rozsahu od posice 577 do 596 (gp36-HIV-2), takové aminokyselinové sekvence jsou charakterizovány přítomností alespoň jednoho lysinu v posici 578 nebo lysinu v obou místech 577 a 578; x³ představuje aminokyselinovou sekvenci od posice 577 do 596 (gp36-HIV-2); y¹ představuje aminokyselinovou sekvenci od posice 604 do posice 613 (gp36-HIV-2); e a f představují jeden nebo více epitopů, jež jsou obsaženy v aminokyselinové sekvenci v rozsahu posic 578-613 (gp36-HIV-2) nebo 586-629 (gp41-HIV-1); a i b jsou definovány stejným způsobem. Peptidy obecného vzorce IV mají buď c, nebo f, nebo oba v sobě obsaženy. Tyto cyklické peptidy, samostatně nebo ve směsi s jinými peptidy, jsou obzvláště použitelné při detekci HIV-1 a HIV-2 protilátek ve stanovených vzorcích a seru.

IL	ÚŘAD RO VYNÁLEZY A OBJEVY	20. VIII 91	38575	64
----	---------------------------------	-------------	-------	----

Inte 507K 7/00
Syntetické peptidy a jejich směsi pro detekci protilátek
k HIV

Podstata vynálezu

Vynález se týká nových cyklických peptidů a jejich samostatné kombinace a současně lineárních peptidů spolu s cyklickými pro detekci protilátek k HIV .

Doseavadní stav techniky

Syndrom imunodeficiency (AIDS) , komplex spojený s AIDS a takzvaný stav pre-AIDS jsou onemocnění, způsobená retrovirem, virem HIV (Human Immunodeficiency Virus). Tento virus způsobující AIDS , HIV-1 , je dobře charakterisován a je také znám pod názvy HTLV-III , LAV-1 a ARV. Jiný lidský patogenní retrovirus HIV-2 (dříve známý jako LAV-2) byl nyní nalezen u pacientů, postižených AIDS a pocházejících ze západní Afriky (viz například WO 87/04459) . Nedávno bylo prokázáno (Guyader a kol. Nature 326 , 662 až 669 , 1987) , že tento virus HIV-2 obsahuje řadu sekvencí společných s HIV-1 a SIV (Simian Immunodeficiency Viruses) .

Přestože jsou při značení aminokyselin používány různé

systemy číslování, v tomto vynálezu jsme pro zjednodušení a z hlediska snadnějšího porovnání, zvolili systém číslování publikovaný Ratnerem. a kol., Nature 313, 277-284, 1985 u HIV-I bílkovin a publikovaný Guyaderem a kol., Nature 326, 662-669 (1987) pro bílkoviny HIV-2. Aminokyseliny jsou v tomto vynálezu značeny jednopísmenným kódem: ala=A, asn=N, asp=D, cys=C, gln=Q, glu=E, gly=G, his=H, ile=I, leu=L, lys=K, met=M, phe=F, pro=P, ser=S, thr=T, trp=W, tyr=Y, val=V.

Na počátku byly v imunodiagnostických testech na stanovení protilátek v seru pacientů nakažených HIV-1, používány jako antigeny celé viry. Druhá generace testů již využívala polypeptidové sekvence získané pomocí genového inženýrství. Cabradilla a kol. Bio/Technology 4, 128-133 (1985) a Chang a kol. Bio/Technology 3, 905-909 (1985) popisují např. použití virální proteinových fragmentů, syntetizovaných bakteriemi, s 82 a 102 aminokyselinovými zbytky. EPA 202314 a 114243 uvádí rekombinantní polypeptidové oblasti gp41 a gp120, které jsou imunoreaktivní buď samostatně nebo ve směsích. Shoeman a kol., Anal.Biochem. 161, 370-379 (1987) uvádí několik polypeptidů z gp41, jež jsou imunoreaktivní s protilátkami přítomnými v seru pacientů nakažených HIV-I. Žádné z výše jmenovaných stanovení však není zcela přijatelné, vzhledem ke své nedostatečné citlivosti. Při užití těchto testů je možné, že virus přítomný v krvi unikne pozornosti, což může potencionálně vést k rozšiřování nákazy mezi příjemci krevních produktů prostřednictvím nositelů, u nichž infekce nebyla rozpoznána. Současně je problémem i nedostatečná specifita těchto testů, což může mít za následek, že někteří

zdraví jedinci mohou být chybně označeni za nositele AIDS. Tyto chyby mohou být způsobeny přítomností nečistot, ale současně svůj podíl mohou na tomto faktu nést i HIV podobné epitopy (antigenní determinanty), které však nejsou původci AIDS, ale jsou přítomny ve vzorcích antigenů. Např. Gallaher, Cell 50, 327-328, 1987 popisuje oblast gp41 viru HIV-1, která má stejnou sekvenci pěti sousedních aminokyselinových zbytků jako dýchací syncitial virus a čtyři stejně rozmístěné aminokyseliny jako F1 glykoprotein spalničkového viru. Potom, dokonce i vysoce purifikovaný rekombinantní polypeptid obsahující takovou oblast, nebo jakékoli další společné oblasti, ještě objevené, by mohly být potencionálně odpovědné za chybné výsledky a průvodní nepřijatelnou specifitu. Konečně tato první stanovení neumožňují detekci velmi nízkých koncentrací HIV protilátek. To způsobuje neschopnost těchto stanovení, aby byla použita ve velmi ranných stádiích po nakažení a je příčinou opožděného ošetření a možnosti rozšíření infekce prostřednictvím krevních vzorků a jiných tělních tekutin, ještě před účinným rozpoznáním infekce AIDS.

V současné době, ve snaze vyřešit výše uvedené problémy, jsou vyvíjeny metody a diagnostické prostředky, které využívají kratší HIV antigeny. Dále jsou k dispozici i empirické metody k identifikaci peptidových sekvencí, odpovídajících jedinečným a vysoce konservativním epitopům HIV virů. Pomocí těchto metod lze například provést selekci krátkých aminokyselinových sekvencí, které jsou pravděpodobně odhaleny na povrchu nativního proteinu a mohou tak sloužit jako detekovatelný prostředek (viz Hopp a Woods, J. Immunol. Met. 88, 1-18, 1986). Tyto metody však nejsou

více než indikační. Nicméně jsou používány k identifikaci epitopů, přítomných na povrchu virů způsobujících AIDS. Různé syntetické peptidy p18, p25, gp41 a gp120 bílkovin jsou popsány v americkém patentu-US Patent 4,629,783; International Patent Appl. PCT/US86/00831 a EPA 303224. Použití těchto peptidů je výhodné z hlediska jejich relativně jednoduché a levné přípravy. Mnohem důležitější je pak fakt, že při použití těchto peptidů je menší riziko stanovení chybných výsledků, způsobených přítomností nečistot nebo existence epitopů, podobných virálním bílkovinám, které však nesouvisí s onemocněním AIDS.

Zatímco tyto malé peptidy jsou výhodnější z hlediska vyšší specifity, než dřívější rekombinantní polypeptid nebo použití celých virálních částic pro určení diagnózy AIDS, jejich využití je méně než uspokojivé při posuzování celkové citlivosti stanovení, pravděpodobně proto, že syntetizovaný epitop není schopen převzít a udržet konformaci, která je rozpoznatelná AIDS protilátkami. Ačkoliv počet vzorků sera, testovaných v každém z těchto případů, je velmi omezen, specifita (několik chybných výsledků, pokud vůbec jsou) byla s malými syntetickými peptidy určena jako velmi vysoká (95%-100%), avšak celková citlivost se pohybovala mezi 80%-90%. Pouze v jednom případě bylo dosaženo 100% citlivosti, a to v případě kdy bylo testováno pouze 10 vzorků. Např. Smith a kol., J.Clin.Microbiol. 25, 1498-1504, 1987 uvádí dva překrývající se peptidy E32 a E34, které jsou vysoce imunoreaktivní. Žádná chybná stanovení nebyla zjištěna při testování 240 seronegativních vzorků, avšak tři z 322 seropozitivních vzorků se nepodařilo určit (tzn. citlivost 99,1%). Wang a kol. (Proc.Natl.Acad.Sci. 83,

6159-6163, 1986) popisuje serii překrývajících se peptidů (včetně aminokyselinových residuí peptidů E32 a E34, popisovaných Smithem), mezi nimiž s jedním 21-merním (21 aminokyselin) peptidem bylo dosaženo 100% specifity a 98% citlivosti (u 228 seropositivních vzorků odebraných pacientům nakažených AIDS bylo 224 stanoveno jako pozitivní. Americký patent č.120,027, přihlášený 13.listopadu 1987 popisuje krátký syntetický peptid v rozsahu 606-620 (SGKLICTTAVPWNAS) bílkoviny gp41 (HIV-1). Tento peptid je imunoreaktivní s protilátkami pacientů, nakažených viry AIDS. Specifita stanovení s tímto peptidem byla též vynikající (63/63), avšak 6 seropositivních vzorků z 57 nemohlo být stanoveno (citlivost 89%).

Gnann a kol. (J.Virol. 61, 2639-2641, 1987 a J.Infec.Dis. 156, 261-267, 1987) také popisuje serie překrývajících se peptidů domnělé imunodominantní oblasti bílkoviny gp41 (HIV-1). Gnann. a kol. došel k závěru, že pro imunoreaktivitu segmentu bílkoviny gp41-(HIV-1) byl nezbytný zbytek cys-605. Autoři uvádějí, že peptid, který obsahuje sekvenci SGKLIC (606-611), nebyl imunoreaktivní z žádným z 22 testovaných vzorků pozitivního sera, zatímco po přidavku cysteinového residua k N-konci byla z části obnovena imunoreaktivita, 21 vzorků sera ze 44 reagovalo s 7-merním peptidem (48% citlivost).

Gnann a kol. (J.Virol) také uvažuje o možnosti, že cysteinové zbytky v pozicích 605 a 611 bílkoviny gp41(HIV-1) by mohly hrát roli u antigenní konformace této oblasti, pravděpodobně utvářením cyklické struktury přes disulfidické vazby. Nikde však nebyla demonstrována existence syntetického peptidu, kde by dvě cysteinové skupiny byly

spojeny disulfidickými vazbami.

Citlivost stanovení s peptidy popisovanými Gnannem a kol., vhodnými pro identifikaci HIV-1 protilátek není 100%. Např. Gnann a kol. (J.Virol.61, 2639-2641, (1987)) uvádí, že zatímco s pomocí jejich 600-611 aminokyselinové sekvence bylo určeno 22 z 22 seropositivních vzorků, při podobných testech prováděných v Centru pro kontrolu chorob (Centers for Disease Control, Atlanta, Ga) se stejnou 12-ti aminokyselinovou sekvencí (600-611), byl 1 ze 79 pozitivních vzorků stanoven chybně. Gnann a kol. dále uvádí v J.Infect.Dis.156, 261-267, 1987, že tatáž 12-ti aminokyselinová sekvence byla reaktivní se 131 ze 132 vzorků sera, odebraného pacientům ze Spojených států, infikovaných HIV-1.

Gnann a kol., Science 237, 1346-1349, 1987 dále popisuje krátký syntetický lineární peptid se sekvencí v rozsahu 592-603 residuí bílkoviny gp42 (HIV-2), která obsahuje dva cys zbytky v oblasti homologní k 605-611 oblasti gp41(HIV-1). Tento peptid reagoval s 5 z 5 seropositivních vzorků pacientů nakažených HIV-2.

V literatuře jsou uváděny i jiné peptidy obsahující aminokyseliny 605-611 bílkoviny gp41 (HIV-1). Patent WO 86/06414 popisuje peptid X(39), který je kódován oblastí od přibližně bp7516 přes bp7593, a peptid XIII(79), který je kódován oblastí v rozsahu od bp 7543 přes bp 7593, oba obsahují sekvenci sedmi aminokyselin 605-611. Tyto peptidy jsou popisovány jako lineární a nepředpokládá se jakákoli cyklická struktura. WO 87/06005 uvádí, že serie syntetických peptidů obklopující sekvenci Cys(605)-Cys(611) residuí obalového proteinu HIV-1 (gp41) prochází po solubilizaci v

neutrálním nebo alkalickém vodném pufru serií spontánních oxidativních transformací. Uvažuje se, že výsledkem jsou, pokud se peptidy užijí v ELISA-testech, náhodná směs lineárního monomeru, cyklického monomeru, lineárních nebo cyklických dimerů a lineárních polymerů různých délek. Patent však ve skutečnosti neukázal přítomnost cyklických komponent a nebyly charakterizovány různé jiné dimery a polymery, které mohly být přítomny. Mimoto se uvažuje, že polymerní formy jsou nejdůležitějšími složkami pro reaktivitu při ELISA-testech.

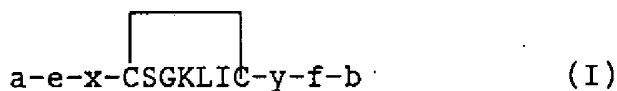
Dále přes možnou existenci komplexních směsí různých oxidativních forem peptidů, peptidy dříve popisované neumožňují včasnou detekci AIDS infekce, tak jak je požadováno. Např. Gnann *et al.* (J. Virol.) uvádí, že pokud jsou vzorky HIV-1 pozitivních ser zředěny 500x, některé z těchto vzorků jsou pak stanoveny jako negativní, což svědčí o nízké citlivosti stanovení s peptidem při detekci HIV.

Tyto problémy se projevíly při použití peptidů, které byly chemicky cyklizovány vytvořením disulfidického můstku mezi důležitými cysteinovými residui. Např. viz M. Lacroix *et al.*, Comparative Performance of Cyclic Versus Linear Peptides In An ELISA For HIV-1 a HIV-2 Specific Antibodies (Provedení srovnání cyklických versus lineárních peptidů pro detekci HIV-1 a HIV-2 specifických protilátek v ELISA-testech), č. 3147, AIDS konference, červen 1989, Montreal, Canada; a WO 89/03344. Tento vynález vede ke zlepšení účinku těchto cyklických peptidů při stanovení HIV-1 a HIV-2 protilátek.

PODSTATA VYNÁLEZU

Podstatou tohoto vynálezu je popis nových serií peptidů, které jsou zejména přizpůsobeny pro 100% detekci HIV-1 a HIV-2 protilátek a které je možné použít při stanoveních, kdy protilátky jsou přítomny v séru i ve velmi nízkých koncentracích.

Jestliže podrobněji specifikujeme nové peptidy tohoto vynálezu, jsou selektovány ze značně čistých peptidů, které mají vzorec I nebo II:



605—611

kde:

x je nezávisle vybráno z jedné z následujících analogových aminokyselinových sekvencí bílkoviny gp41-HIV-1:

KILAVERYLKDQQLGIWG- (586-604)

KKILAVERYLKDQQLGIWG- (585-604),

aminokyselinových sekvencí odpovídajících těm, které jsou odvozeny od homologních oblastí dalších HIV-1 isolátů, a aminokyselinových sekvencí lišících se od výše uvedených konservativními substitucemi, např. takové aminokyselinové sekvence, které jsou charakterizovány přítomností alespoň jednoho lysinového zbytku v pozici 586 nebo současně v pozicích 585 a 586;

y, jestliže je přítomno, je nezávisle vybráno ze

skupiny skládající se z:

- T
- TT
- TTA
- TTAV
- TTAVP
- TTAVPW
- TTAVPWN
- TTAVPWNA
- TTAVPWNAS
- TTAVPWNASW
- TTAVPWNASWS
- TTAVPWNASWSN
- TTAVPWNASWSNK
- TTAVPWNASWSNKS
- TTAVPWNASWSNKSL
- TTAVPWNASWSNKSLE
- TTAVPWNASWSNKSLEQ
- TTAVPWNASWSNKSLEQI,

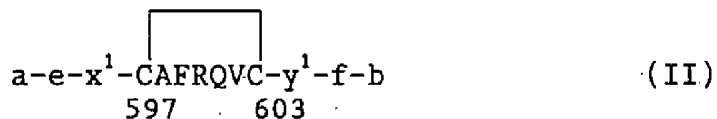
aminokyselinových sekvencí odpovídajících těm sekvencím, které jsou odvozeny od homologních oblastí dalších HIV-1 isolátů a aminokyselinových sekvencí odlišujících se od výše uvedených konservativními substitucemi;

e a f, jestliže jsou přítomny, jsou nezávisle vybrány ze skupiny obsahující aminokyselinové sekvence jakéhokoli z epitopů oblasti, jež zahrnuje posice aminokyselin od posic 586 do 629 bílkoviny gp41 HIV-1 nebo oblasti aminokyselinové sekvence, zahrnující posice od 578 do 613 bílkoviny gp36

HIV-2) aminokyselinové sekvence, které odpovídají těm a jsou odvozené z homologních oblastí dalších HIV-1 a HIV-2 isolátů, aminokyselinové sekvence, které se liší od výše uváděných konservativními substitucemi, nebo jakýchkoli kombinací těchto epitopů;

a představuje aminokyselinový konec nebo substituent účinný jako spojovací činidlo a/nebo může sloužit k tomu, že peptid se stane použitelnějším jako imunodiagnostické činidlo bez změněných antigenních vlastností; a

b představuje karboxylový konec nebo substituent, který je účinný jako spojovací činidlo a/nebo může sloužit k tomu, že se peptid stane použitelnějším jako imunodiagnostické činidlo bez změněných antigenních vlastností; a



kde:

x^1 je nezávisle vybráno z jedné z následujících sekvencí aminokyselinových analogů aminokyselinové sekvence bílkoviny gp36-HIV-2:

KVTAIEKYLDQARLNSWG (578-598)

KKVTAIEKYLDQARLNSWG (577-596),

aminokyselinových sekvencí, které odpovídají těm sekvencím, odvozeným od homologních oblastí jiných HIV-2 isolátů a aminokyselinových sekvencí, které se liší od výše uváděných

konservativními substitucemi, takové sekvence jsou charakterizovány přítomností alespoň jednoho lysinového zbytku v pozici 578 nebo současně v pozicích 577 a 578;

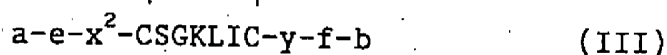
y^1 , jestliže je přítomno, je nezávisle vybráno ze skupiny skládající se z:

H
 -HT
 -HTT
 -HTTV
 -HTTVP
 -HTTVPW
 -HTTVPWV
 -HTTVPWVN
 -HTTVPWVND
 -HTTVPWVNDs,

aminokyselinových sekvencí, které odpovídají těm, jež jsou odvozené od homologních oblastí jiných HIV-2 isolátů, a aminokyselinových sekvencí, které se liší od výše uvedených konservativními substitucemi; a

e, f, a, b, jsou definovány stejným; dříve popsaným způsobem.

V jiném případě, jsou nové peptidy, popisovné v tomto vynálezu selektovány ze značně čistých peptidů, které mají vzorec III a IV:



kde x^2 , pokud je přítomno, je nezávisle vybráno ze skupiny

skládající se z:

G-
WG-
IWG-
GIWG-
LGIWG-
LLGIWG-
QLLGIWG-
QQLGIWG-
DQQLGIWG-
KDQQLGIWG-
LKDQQLGIWG-
YLKDQQLGIWG-
RYLKDQQLGIWG-
ERYLKDQQLGIWG-
VERYLKDQQLGIWG-
AVERYLKDQQLGIWG-
LAVERYLKDQQLGIWG-
ILAVERYLKDQQLGIWG-
RILAVERYLKDQQLGIWG-

aminokyselinových sekvencí, které odpovídají těm, jež byly odvozeny od homologních oblastí jiných HIV-1 isolátů, a aminokyselinových sekvencí lišících se od výše uvedených konservativními substitucemi; a

y, e, f, a, b jsou definovány stejným výše uvedeným způsobem, jsou přítomny buď e, či f nebo obě sekvence; a

$$\begin{array}{c} \boxed{} \\ a-e-x^3-CAFQVC-y^1-f-b \\ 597 \quad 603 \end{array}$$

(IV)

kde x^3 , jestliže je přítomno, je nezávisle vybráno ze skupiny skládající se z:

G-
 WG-
 SWG-
 NSWG-
 LNSWG-
 RLNSWG-
 ARLNSWG-
 QARLNSWG-
 DQARLNSWG-
 QDQARLNSWG-
 LQDQARLNSWG-
 YLQDQARLNSWG-
 KYLQDQARLNSWG-
 EKYLQDQARLNSWG-
 IEKYLQDQARLNSWG-
 AIEKYLQDQARLNSWG-
 TAIEKYLQDQARLNSWG-
 VTAIEKYLQDQARLNSWG-
 RVTAEKYLQDQARLNSWG-

aminokyselinových sekvencí, které odpovídají těm, které jsou odvozeny od homologních oblastí jiných HIV-2 isolátů, a aminokyselinových sekvencí, které se liší od výše popisovaných konservativními substitucemi; a

y¹, e, f, a, b, jsou definovány stejným dříve uvedeným způsobem, jsou přítomny buď e, či f, nebo obě tyto sekvence.

Obzvláště preferovaným peptidem, který má vzorec I je BCH-408 a jeho sekvence má následující strukturu:

a-KILAVERYLKDQQLLGIWGCSGKLICTTAVPWNASGKLI-b
586 605 611 619

V tomto peptidu jsou inkorporovány, v f posici 619 aminokyselinová sekvence epitopu, která je umístěna v posici 606-610 (SGKLI) bílkoviny gp41 HIV-1, a v posici 586 lysin.

Obzvláště preferovaným peptidem, který má vzorec II je BCH-417 a jeho sekvence má následující strukturu:

a-KVTAIEKYLQDQARLNSWGCAFRQVCHTTVPWVNDSAFRQV-b.
578 597 603 613

V tomto peptidu jsou inkorporovány, v f posici 613 aminokyselinová sekvence epitopu, která je umístěna v posici 598-602 (AFRQV) bílkoviny gp36 HIV-2, a v posici 578 je lysin.

PODROBNÝ POPIS VYNÁLEZU

Výběr peptidů pro syntézu

Peptidy tohoto vynálezu byly syntetizovány na základě odvození od publikovaných aminokyselinových sekvencí HIV-1 a

HIV-2. Mělo by být však zřejmé, že sekvence odvozené od homologních oblastí jiných HIV-1 a HIV-2 isolátů mohou též být užity, aniž by došlo k odchýlení z rámce tohoto vynálezu.

Epitopy v těchto nativních sekvencích byly vybrány pro použití jako e a f v peptidech tohoto vynálezu s použitím různých fyzikálně-chemických principů, které slouží jako pomůcka k předpovídání, jaké části polypeptidu jsou nejpravděpodobněji povrchově orientovány a tím pádem mají imunogenní vlastnosti. Ty zahrnují stanovení hydrofilicity podle Hoppa a Woodse (Proc.Natl.Acad.Sci. 78, 3824-3828, 1981), a další způsoby stanovení popisované Kytem a Doolittlem (J.Mol.Biol. 157, 105-132, 1982). Také empirická predikce proteinové konformace (Chou. a Fasman, Ann.Rev.Biochem. 47, 251-276, 1978) je užitečným vodítkem pro předurčení těch částí polypeptidu, které pravděpodobně mají imunogenní vlastnosti.

e a f epitopy peptidů tohoto vynálezu zahrnují, ale nejsou pouze omezeny na, WCAAF (identifikovaný Norrbym a kol., AIDS Research and Human Retroviruses, Vol.5, No.5, 1989); KD, SGKL, a LEDQ (identifikované Norrbym a kol., AIDS, Vol.3, No.1 (1989); LKDQ, CSGKLI, a IWG (identifikované Mathiesenem a kol., Immunology, 67, 1-7, (1989); a ARILAVEYLKD a SGKLICTAVPWNAS (identifikované Dopelem a kol., Jol. of Vir.Meth. 25, 167-178 (1989).

Patent také zahrnuje popis modifikací peptidů tohoto vynálezu, v důsledku kterých jsou peptidy lépe využitelné jako imunodiagnostická činidla, aniž by však došlo ke změně jejich antigenních vlastností. Takové modifikace zahrnují:

- připojení cysteinového zbytku na amino nebo

karboxy konec, aby se usnadnilo spojení peptidu s nosnou bílkovinou a heterobifunkčními cross-linking činidly (činidla způsobující prokřížení), jako je sulfosukcinimidyl-4- (p-maleimidofenyl)butyrát, vhodné činidlo pro usnadnění těchto spojení

- připojení určitých aminokyselin na amino nebo karboxy konec, aby se usnadnilo vzájemné spojování peptidů mezi sebou, umožnilo připojení na nosič nebo větší peptid, nebo aby došlo k modifikaci fyzikálních nebo chemických vlastností peptidu. K takovým změnám dochází např. po přidavku tyrosinu, kyseliny glutamové, nebo kyseliny aspartamové, které mohou být užity jako spojovací články (linkery) připojené esterovou vazbou, lysinu, který je připojen jako Schiffova base nebo přes amino skupinu; a

- derivatizaci amino konce acylací, amidací thioglykolové kyseliny, amidací karboxy konce za použití např. amoniaku, methylaminu. Výsledkem těchto modifikací jsou změny výsledného náboje peptidu, ale mohou také usnadnit tvorbu kovalentní vazby peptidu na pevný nosič, nebo jiný peptid. V důsledku těchto modifikací pravděpodobně nedochází ke změnám imunoreaktivity peptidů.

Peptidy tohoto vynálezu mohou být také modifikovány změnami spočívajícími v insercích, delecích, či substitucích v sekvencích peptidů, a to buď konservativních, nebo nekonservativních, které by mohly vést k uplatnění určitých výhod při jejich použití. Preferované jsou následující konservativní změny, které zahrnují: gly, ala; val, ile, leu; asp, glu; asn, gln; ser, thr; lys, arg; phe, tyr; ala, ser; ala, thr; ala, val; ala, pro; ala, glu; leu, gln; gly, phe; ile, ser; a ile, met. Methionin, aminokyselina, která

má sklon ke spontánní oxidaci, může být také obvykle nahrazena norleucinem, aniž by došlo ke změně antigenicity.

Vhodné může být také připojení "přívěsek" k peptidům tohoto vynálezu, který obsahuje malý počet (1-10) hydrofóbních aminokyselin. Takové přívěsky mohou ulehčit pasivní adsorpci peptidu na pevný nosič. Tato modifikace pak může být provedena buď na karboxy nebo amino konci. Preferovanou naadovanou sekvencí je phe-ala-phe-ala-phe.

Preferovanými cyklickými peptidy tohoto vynálezu, které mají vzorec I, jsou takové, u nichž x, y, e, f jsou definovány následujícím způsobem:

x: KILAVERYLKDQQLGIWG, y: TTAVPWNAS, e a f nejsou přítomny (BCH-87ck);

x: KKILAVERYLKDQQLGIWG, y: TTAVPWNAS, e a f nejsou přítomny (BCH-266); a

x: KILAVERYLKDQQLGIWG, y: TTAVPWNA,

f: SGKLI, e není přítomno (BCH-408), BCH-408 je nejvíce preferován.

Preferovanými cyklickými peptidy tohoto vynálezu, které mají vzorec II, jsou takové, u nichž x^1 , y^1 , e, f, jsou definovány následujícím způsobem:

x^1 : KVTAEKYLQDQARLNSWG, y^1 : HTTVPWVNS a e, f nejsou přítomny (BCH-202ck);

x^1 : KKVTAIEKYLQDQARLNSWG, y^1 : HTTVPWVNS a e, f nejsou přítomny (BCH-265); a

x^1 : KVTAEKYLQDQARLNSWG, y^1 : HTTVPWVNS a

f: AFRQV a e není přítomno (BCH-417), peptid BCH-417 je nejvíce preferován

TABULKA 1 uvádí úplné aminokyselinové sekvence těchto preferovaných peptidů (zanedbány možné a, b)

TABULKA 1 -- Sekvence peptidů

HIV-1:

[]

BCH-87ck: KILAVERYLKDQQLGIWGCSGKLICTTAVPWNAS

[]

BCH-266: KKILAVERYLKDQQLGIWGCSGKLICTTAVPWNAS

[]

BCH-408: KILAVERYLKDQQLGIWGCSGKLICTTAVPWNASGKLI

HIV-2:

[]

BCH-202ck: KVTAEKYLQDQARLNSWGCAFRQVCHTTVPWVNDS

[]

BCH-265: KKVTAEKYLQDQARLNSWGCAFRQVCHTTVPWVNDS

[]

BCH-417: KVTAEKYLQDQARLNSWGCAFRQVCHTTVPWVNDSAFRQV

Příprava lineárních a cyklických peptidů

Při přípravě peptidů tohoto vynálezu se dává přednost obecné synthese peptidů v pevné fázi. Pro syntesu mohou však být použity i jiné, dobře známé metody. Pryskyřičným nosičem je jakákoli vhodná, obecně při synthese peptidů v

pevné fázi používaná, pryskyřice. S výhodou jsou používány p-benzylalkoholpolystyren a p-methylbenzyldrylaminová pryskyřice. Po napojení první chráněné aminokyseliny na nosič na bázi pryskyřice se ochranná aminoskupina odstraní standardními metodami, obecně používanými při syntese peptidů na nerozpustném nosiči. Po odstranění této ochranné aminoskupiny, zbývající chráněná α -amino, a jestliže je to nutné, i chráněné aminokyseliny postranního řetězce jsou postupně spojovány takovým způsobem, aby byl získán požadovaný výsledný produkt. Jiná možnost, při spojování násobných aminokyselinových skupin před napojením aminokyselinové sekvence na nosič, spočívá v použití metodiky uplatňované v roztoku.

Po stanovení techniky následuje výběr příslušného činidla zprostředkující spojení. Např. vhodnými spojovacími činidly jsou N,N'-dicyklohexylkarbodiimid (DCC) a to buď samotný nebo v přítomnosti 1-hydroxybenzotriazolu. Jinou použitelnou metodou při spojování je použití premodifikovaných symetrických anhydridů chráněných aminokyselin. Nezbytnou α -amino chránicí skupinou, použitou pro každou aminokyselinu, která je zavedena do prodlužujícího se polypeptidového řetězce je 9-fluoroenylmethoxykarbonylová skupina (Fmoc). Lze však používat jakoukoli jinou vhodnou chránicí skupinu, avšak pouze tehdy nedojde-li k její degradaci za podmínek reakce a je-li snadno selektivně odstranitelná v přítomnosti jiných, v rostoucí molekule přítomných ochranných skupin.

Kriteria, kterými se řídí výběr ochranných skupin pro aminokyseliny postranního řetězce, jsou následující: (a) stabilita ochranné skupiny vůči různým činidlům za podmínek

reakce, selektivních pro odstranění α -amino ochranné skupiny v každém kroku syntesy, (b) zachování strategických vlastností ochranné skupiny (tj. za podmínek reakce nepodlehnutí štěpení) a (c) možnost odstranění ochranné skupiny na závěr syntesy polypeptidu a za podmínek, které jiným způsobem neovlivní strukturu polypeptidu.

Plně chráněné peptidy navázané na nosiči na basi pryskyřice jsou štěpeny z p-benzyloxyalkoholové pryskyřice 50 - 60 % roztokem kyseliny trifluoroctové v methylenchloridu po dobu 1 až 6 hodin při teplotě místnosti v přítomnosti látek, které mají schopnost zachycovat vznikající vedlejší produkty (čistidla), např. anisolu, thioanisolu, ethylmethylsulfidu, 1,2-ethanedithiolu a podobných činidel. Ochranné skupiny, které jsou odolnější vůči kyselinám jsou odstraněny působením HF.

Cyklické peptidy popisované v tomto vynálezu jsou připraveny přímou oxidativní konverzí chráněných nebo nechráněných SH-skupin na disulfidovou vazbu následujícími dobře známými technikami peptidové syntesy. Preferovaná metoda zahrnuje přímou oxidaci volných SH-skupin hexakynoželezitanem draselným. Předpokládá se, že takové cyklické peptidy zachovávají rigidnější konformaci, která může podporovat vazbu s HIV protilátkami.

Peptidové směsi a polymery

Větší peptidy jsou v rámci tohoto vynálezu tvořeny kovalentním spojováním jednoho nebo více peptidů, které jsou v tomto vynálezu popisovány. Jsou uvažovány i polymery (a to

homopolymery i kopolymery) těchto peptidů.

V rozsahu tohoto vynálezu jsou i jiné cyklické peptidy a směsi cyklických peptidů, popisovaných v tomto vynálezu a další od HIV odvozené cyklické a lineární peptidy. Bylo zjištěno, že tyto směsi jsou zodpovědné za překvapivě vysokou citlivost stanovení HIV-1 a HIV-2 protilátek přítomných ve vzorcích sera, které jsou postupně zředovány a v serokonverzních řadách (HIV-1). Dále bylo zjištěno, že při použití těchto směsí lze dosáhnout vysoké specifity stanovení, čímž dochází k minimálnímu počtu chybných stanovení.

Takové směsi obsahují alespoň jeden cyklický peptid obecného vzorce I nebo III (preferovány jsou BCH-87ck, BCH-266 nebo BCH-408 a přednost se dává více BCH-408) v kombinaci s alespoň jedním cyklickým peptidem obecného vzorce II nebo IV (preferovány jsou BCH-202ck, BCH-265 nebo BCH-417, přednost se dává více BCH-417).

Stanovení HIV protilátek

Peptidy a směsi peptidů popisované v tomto vynálezu jsou použitelné jako diagnostická činidla pro stanovení protilátek spojených s AIDS dobře známými metodami. Tyto metody zahrnují ELISA-test, hemoaglutinaci, single-dot a multi-dot metody a stanovení. Hlavní výhodou při použití je specifita těchto peptidů a vysoká citlivost stanovení protilátek proti AIDS residuům, obzvláště pak jejich schopnost stanovit, ve srovnání s dosud známými antigeny, velmi nízké hladiny AIDS infekce.

Jednou z používaných metod pro stanovení protilátek proti HIV-1 a HIV-2 je tzv. "Western Blotting" analýza (přesávání proteinů) (Towbin H., Staehelin T. a Gordon J., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350-4354 (1979)). Při použití této techniky je peptid nebo peptidy tohoto vynálezu nanесeny na nitrocelulosový papír. Nitrocelulosový papír je nasycen a potom je na něj aplikováno serum, které má být stanoveno. Po promytí se na nitrocelulosový papír aplikuje enzymem značená protilátka proti lidskému IgG. Enzymová aktivita je pak stanovována pomocí vhodného substrátu. Samozřejmě i jiné způsoby značení, např. radioaktivní, nebo fluorescenční mohou být použity.

Preferovanou, obecnou a klasickou technikou pro stanovení protilátek proti HIV-1 nebo HIV-2, využívající peptid nebo peptidovou směs tohoto vynálezu, je ELISA-test. Při tomto stanovení jsou např. peptid, peptidová směs nebo kombinace popisované v tomto vynálezu, adsorbovány nebo kovalentně navázány na jamky mikrotitračních destičky. Do jamky je aplikováno sérum nebo složka, jež má být stanovena. Po promytí je do jamek přidána protilátka proti lidskému IgG nebo IgM značené peroxidasou. Stanovení aktivity peroxidasy se provádí s příslušným substrátem, např. s o-fenyldiaminem. Peroxidasu může být nahrazena jinou značkou např. radioaktivní fluorescenční, chemiluminiscenční nebo značkou emitující infračervené světlo, aniž by došlo ke změně použitelnosti názorného stanovení.

Při ELISA-testu je možné použít individuální peptidy nebo jejich kombinaci. Použití kombinace je výhodnější, protože to při stanovení protilátek dovoluje kombinovat nejúčinnější peptidy a současně vyloučit ty, které by

způsobovaly chybné odezvy. V průběhu těchto studií bylo objeveno, že některé vzorky séra dávají správné pozitivní výsledky s použitím směsí peptidů, zatímco s použitím individuálních peptidů jako antigenů jsou odezvy rozporuplné. Proto v souladu s tímto vynálezem se pro stanovení HIV-1 a HIV-2 protilátek dává nejvíce přednost kombinaci peptidových antigenů.

Jinou metodou pro stanovení protilátek proti HIV-1 a HIV-2 pomocí peptidů nebo směsí peptidů, popisovaných v tomto vynálezu, je enzymově-imunologické stanovení nazvané "Sendvičová metoda s dvěma antigeny" (Double-Antigen-Sandwich-Method". Tato metoda je založena na práci Maioliniho, jak je popsáno v publikaci Immunological Methods 20, 25-34 (1978). Podle této metody je sérum nebo jiná složka, která má být stanovena, uvedena do kontaktu s pevnou fází nosiče, který je potažen peptidem nebo směsí peptidů tohoto vynálezu (záchytná vrstva), a s peptidem nebo směsí peptidů tohoto vynálezu, které jsou značeny peroxidasou (snímací vrstva). Imunologická reakce se provádí v jednom nebo dvou krocích. Jestliže je imunologická reakce prováděna ve dvou krocích, je vhodnější volit promývací krok mezi dvěma inkubacemi, je možné jej provést i po imunologické reakci, či reakcích. Potom je aktivita peroxidasy stanovena pomocí příslušného substrátu, např. o-fenyldiaminu. V tomto stanovení mohou být též použity jiné enzymy a chromogeny, včetně těch jež byly již popsány.

Vhodnými pevnými nosiči jsou organické a anorganické polymery, jako jsou škrob, dextransy, přírodní a modifikované celulosy, polyethyleny, polystyreny, polyakrylamidy, agarosy, magnetity, prášky porézního skla,

polyvinylidenfluorid (kynar) a latex, vnitřní stěna nádob, např. zkumavek, titračních destiček, či kyvet, skleněného i syntetického materiálu stejně dobře i povrch pevných částic, např. skleněné a syntetické tyčinky, tyčinky se zesíleným koncem, tyčinky ukončené lalokem nebo lamelou. Obzvláště vhodnými pevnými nosiči jsou skleněné nebo syntetické kuličky.

Peptidy a směsi peptidů popisované v tomto vynálezu jsou nejen použitelné při stanovení protilátek proti HIV-1 nebo HIV-2, ale také nepřímo pro stanovení samotných HIV-1 a HIV-2, protože tyto peptidy buď samotné, jako polymery nebo navázané na příslušný nosič jsou použitelné při získávání protilátek, obzvláště monoklonálních protilátek proti HIV-1 a HIV-2. Takové protilátky mohou být získány po naočkování savců nebo ptáků dostatečným množstvím peptidu nebo směsi peptidů tohoto vynálezu a izolací zmiňovaných protilátek ze sera těchto zvířat. Ke zvířatům, která jsou vhodná pro získávání protilátek patří savci jako jsou králíci, koně, kozy, guinejská prasata, krysy, myši, krávy ovce atd.

Peptidy nebo směsi peptidů popisované v tomto vynálezu mohou být použity pro kvantitativní stanovení HIV-1 a HIV-2 infekce různými obecně známými metodami. Při jednom z takových postupů jsou smíchány a pak ponechány stát vzorek stanovovaného sera, radioznačený cyklický peptid nebo směsi peptidů tohoto vynálezu a současně neznačený peptid nebo směs peptidů tohoto vynálezu. Komplex protilátka/antigen je separován od nenavázaných činidel známými technikami, tj. působením síranu amonného, polyethylenglykolu, a druhé protilátky buď v přebytku nebo vázané na nerozpustný nosič, dextranem potažené dřevěné uhlí a podobně. Koncentrace

značeného peptidu nebo směsi peptidů tohoto vynálezu je stanovena buď ve vázané nebo v nevázané fázi a obsah HIV-1 a HIV-2 ve vzorku může být potom určen odečtením koncentrace značené složky z kalibrační křivky způsobem známým jako "per se".

Jinou vhodnou kvantitativní metodou je "Sendvičová metoda se dvěma antigeny" (Double-Antibody-Sandwich-Assay). Při stanovení touto metodou je na stanovovaný vzorek působeno dvěma různými protilátkami proti peptidu nebo směsi peptidů tohoto vynálezu, získaných z různých zvířat, např. ovce nebo králíka. Jinou možností je příprava monoklonálních protilátek dobře známou Koehlerovou a Milsteinovou technikou pro výrobu monoklonálních protilátek. Pro rozlišení monoklonálních protilátek proti témuž antigenu, ale různým epitopům se používá metoda popsaná Stahlim a kol. (J. of Immunological Methods 32, 297-304 (1980)). Je též vhodné použít polyklonální antiserum a monoklonální protilátku.

Jedna z těchto protilátek je značená a druhá je nanášena na pevný nosič. Vhodné pevné nosiče jsou ty, které již byly dříve v tomto vynálezu uvedeny. Vhodnými značkami jsou enzymy, např. peroxidasa, radioaktivní nebo fluorescenční značky. Preferovaným pevným nosičem je syntetická kulička, enzymem, určeným pro značení, je křenová peroxidasa.

Vzorek séra je potom inkubován s protilátkou navázanou na pevný nosič a značenou protilátkou. Je možné, vzorek nejdříve uvést do styku s protilátkou navázanou na pevný nosič a po promytí ho nechat reagovat za vytvoření vazby se značenou protilátkou. Je ovšem také možné vzorek nechat reagovat s protilátkou navázanou na pevný nosič a až po

určité době i se značenou protilátkou. Přednost je však dávana postupu, kdy se na vzorek působí společně protilátkou navázanou na pevný nosič i značenou protilátkou.

Po proběhnutí imunologických reakcí se provádí promývací krok. Po promytí je značka stanovena známým postupem. V případě, že použitou značkou je peroxidasa, je její stanovení provedeno se substrátem, např. o-fenyldiaminem nebo s tetramethylbenzidinem. Množství značené složky je pak úměrné množství antigenu(ů) přítomných ve vzorku.

Metody a stanovení pro určení a kvantifikaci HIV-1, HIV-2 nebo protilátek proti HIV-1 nebo HIV-2 jak byly výše popsány, mohou být použity ve formě testovacích setů, které v nádobce obsahují cyklický peptid tohoto vynálezu, peptidové směsi nebo jejich kombinace, nebo protilátky proti HIV-1 nebo HIV-2 elicitované cyklickým peptidem nebo směsí cyklických a lineárních peptidů tohoto vynálezu.

Peptidy, jejich směsi a kombinace, popisované v tomto vynálezu, jsou také použitelné jako aktivní složky vakcín schopných indukovat ochrannou imunitu proti HIV-1 a HIV-2 v hostitelích, citlivých k infekci tímto virem. Předepsané způsoby aplikace, dávky antigenu, počet a frekvence očkování se bude individuálně měnit a bude odpovídat těm, které jsou běžně používány v případě vyvolání imunitní reakce k jiným virovým infekcím. Např. vakcíny jsou farmaceuticky přijatelné látky, které obsahují alespoň jeden peptid, popisovaný v tomto vynálezu, jeho analogy, směsi, nebo kombinace, v množství účinném pro savce, včetně člověka, u nichž působení touto látkou vede ke zvýšené produkci protilátek v množství jež je dostatečné pro ochranu daného

savce před HIV-1 nebo HIV-2 infekcí po určitou dobu.

Vakcíny jsou připravovány podle známých metod. Složení vakcíny popisované v tomto vynálezu je vhodně a podle obecných pravidel kombinováno s nosiči, které jsou přijatelné z fyziologického hlediska. Takovými jsou fyziologický roztok farmaceutického stupně čistoty, tetanový toxoid a ústřicový hemokyanin. Vakcína popisovaná v tomto vynálezu může též obsahovat adjuvans nebo další látky přispívající k posílení imunitní odpovědi, jako jsou preparáty kamence, liposomy nebo imunomodulátory. Dále mohou tyto vakcíny obsahovat další antigeny, které vedle ochranné funkce proti HIV-1 a HIV-2 mohou zajišťovat imunitu vůči jiným virům (např. HTLV-I a HTLV-II, cytomegaloviru) a patogenům. Množství těchto dalších antigenů je opět závislé na savcím individuu a průběhu nemoci. Antigen by však měl být přítomen v množství, které by bylo účinné pro zvýšení hladiny protilátek na koncentraci, jež je dostatečná pro ochranu savce před patogenem či virem po určitou dobu.

Rada testovaných sér

Aby bylo možné dokumentovat překvapivě dobrou citlivost stanovení a specifitu peptidů tohoto vynálezu, byla s peptidy názorně testována řada vzorků sér.

Hodnoty absorbancí (O.D.-optical density) byly získány při vlnové délce 450nm a hodnoty blanku naměřené s puforem, určeným pro zředování vzorku nebyly odečítány.

Vzorky NEIA-2*2, BBI-1-162 až 168, 87B140, 87L139, 87V103 jsou všechny na HIV protilátky negativní. Vzorek

LSPQ-S9-1 je pozitivní (HIV-1). Serie označené CAP-113 až CAP-120 jsou souborem sedmi HIV-1 pozitivních vzorků plasmy, postupně zředovaných HIV-negativní plasmou. CAP-113 je HIV-negativní plasmou zředěn 50x, CAP-114 je zředěn 100x, CAP-115 je zředěn 200x atd. Podobně serie označené CAP-222 až CAP-230 jsou souborem sedmi HIV-2 potvrzených seropositivních vzorků plasmy. CAP-222 je zředěn 50x HIV-negativní plasmou, CAP-223 je zředěn 100x atd. Před provedením stanovení je každý vzorek včetně CAP-serií, dále 50x zředěn zředovacím puřem. V těchto testech je hraniční (mezni) hodnota určující seropositivitu definována jako suma hodnoty absorbance pro vzorek NEIA-2*2 plus 0,100.

Výsledky

Cyklické peptidy tohoto vynálezu byly navázány a testovány dříve popsaným ELISA-testem. TABULKA 2 porovnává citlivost peptidu BCH-87c (586 (arginin)) vzhledem k citlivosti peptidu BCH-87ck (586 (lysín)) a peptidu BCH-265 (586 (lysín)-585 (lysín)) při progresivně se zvyšujícím zředování protilátky ve vzorcích sera. Bylo zjištěno, že substituce argininu lysinem v aminokyselinovém místě označeném číslem 586 zvyšuje citlivost při detekci HIV-1 protilátek. Další zvýšení citlivosti bylo dosaženo přidavkem lysinu v místě 585. TABULKA 3 porovnává aktivitu BCH-87c, BCH-87ck, BCH-266 a BCH-408 při progresivně se zvyšujících zředěních. Z TABULKY 3 je patrné, že peptid BCH-408, kde důležitý epitop přítomný v posici 606-610 (SGKLI) je opakovaně přítomen na jeho c-konci, vykazuje vynikající

citlivost ve srovnání s jinými peptidy.

S HIV-2 peptidy bylo zjištěno, že substituce argininu lysinem v posici 578 zvyšuje citlivost stanovení HIV-2 protilátek. Další zvýšení citlivosti je dosaženo dalším lysinem v posici 577. TABULKA 4 porovnává citlivost peptidu BCH-202c (578(arginin)) vzhledem k citlivosti peptidu BCH-202ck (578(lysin)) a peptidu BCH-266 (598(lysin)-577(lysin)) při progresivně se zvyšujícím zředování protilátky ve vzorku sera.

Byly připraveny peptidové koktejly pro stanovení směsi HIV-1 a HIV-2 protilátek. Z TABULKY 5 je patrná citlivost směsí peptidových koktejlů BCH-87c a BCH-202c (arginin) versus BCH-87ck a BCH-202ck (lysin). Peptidový koktejl, kde je arginin nahrazen lysinem vykazuje vyšší citlivost při detekci HIV-protilátek.

TABULKA 2 - HIV-1

Test 314

absorbance 450nm

<u>Vzorek</u>	<u>BC-87c</u>	<u>BCH-87ck</u>	<u>BCH-266</u>
pufr	0,017	0,016	0,014
NEIA-2*2	0,045	0,050	0,069
BBI-1-162	0,010	0,015	0,028
BBI-1-169	0,095	0,090	0,138
BBI-1-172	0,012	0,019	0,030
CAP-113	>2,8	>2,8	>2,8
CAP-114	>2,8	>2,8	>2,8
CAP-115	1,935	2,593	>2,8
CAP-116	1,275	1,871	2,376
CAP-117	0,739	1,158	1,569
CAP-118	0,433	0,679	0,934
CAP-119	0,231	0,392	0,567
CAP-120	0,137	0,229	0,376
CAP-222	0,059	0,069	0,095
CAP-223	0,053	0,060	0,075
CAP-224	0,051	0,054	0,084
CAP-225	0,049	0,050	0,135
CAP-226	0,046	0,050	0,140
CAP-227	0,041	0,043	0,085
CAP-228	0,038	0,042	0,091
CAP-230	0,043	0,049	0,123

TABULKA 3 - HIV-1

Test 350absorbance 450nm

<u>vzorek</u>	<u>BCH-87c</u>	<u>BCH-87ck</u>	<u>BCH-266</u>	<u>BCH-408</u>
pufr	0,016	0,032	0,013	0,015
NEIA-2*2	0,027	0,034	0,023	0,035
2-87-V-103	0,020	0,015	0,020	0,014
2-87-L-139	0,158	0,409	0,147	0,025
89-D-307	0,026	0,022	0,030	0,029
CAP-10	>2,8	>2,8	>2,8	>2,8
CAP-11	>2,8	>2,8	>2,8	>2,8
CAP-12	2,432	2,735	>2,8	>2,8
CAP-13	1,488	1,676	2,021	2,319
CAP-14	0,866	1,089	1,248	1,433
CAP-15	0,449	0,643	0,680	0,835
CAP-16	0,262	0,274	0,366	0,455
CAP-17	0,141	0,191	0,198	0,244
CAP-18	0,099	0,114	0,116	0,156
CAP-19	0,068	0,053	0,056	0,102

TABULKA 4 - HIV-2

Test 226

absorbance 450 nm

<u>vzorek</u>	<u>BC-202c</u>	<u>BCH202ck</u>	<u>BCH-265</u>
pufr	0,015	0,014	0,015
NEIA-2*2	0,020	0,027	0,022
BBI-1-162	0,018	0,033	0,059
BBI-1-169	0,018	0,028	0,076
BBI-1-172	0,019	0,024	0,050
CAP-113	1,795	>2,8	>2,8
CAP-114	1,070	2,015	2,134
CAP-115	0,611	1,195	1,330
CAP-116	0,325	0,642	0,718
CAP-117	0,174	0,365	0,410
CAP-118	0,089	0,189	0,190
CAP-119	0,057	0,082	0,117
CAP-120	0,041	0,084	0,094
CAP-222	>2,8	>2,8	>2,8
CAP-223	>2,8	>2,8	>2,8
CAP-224	2,313	>2,8	>2,8
CAP-225	1,448	2,418	2,480
CAP-226	0,758	1,436	1,674
CAP-227	0,448	0,745	0,960
CAP-228	0,233	0,409	0,363
CAP-230	0,139	0,279	0,272

TABULKA 5 - HIV-1

Provedení srovnání dvou peptidových koktejlů

Test 310

absorbance 450nm

	BC-87c	BCH-87ck
<u>vzorek</u>	<u>BC-202c</u>	<u>BCH-202ck</u>
pufr	0,015	0,013
NEIA-2*2	0,034	0,062
BBI-1-162	0,044	0,034
BBI-1-163	0,032	0,042
BBI-1-164	0,052	0,077
BBI-1-165	0,038	0,059
BBI-1-166	0,045	0,081
BBI-1-167	0,020	0,064
BBI-1-168	0,031	0,041
87-B-140	0,005	0,015
87-L-139	0,025	0,068
87-V-103	0,022	0,035
CAP-113	>2,8	>2,8
CAP-114	2,634	>2,8
CAP-115	1,720	>2,8
CAP-116	0,965	2,459
CAP-117	0,548	1,685
CAP-118	0,302	1,036
CAP-119	0,158	0,609
CAP-120	0,104	0,341
CAP-222	>2,8	>2,8
CAP-223	2,470	>2,8
CAP-224	1,709	>2,8
CAP-225	1,003	2,441
CAP-226	0,554	1,733
CAP-227	0,289	1,001
CAP-228	0,169	0,611
CAP-230	0,086	0,343
LSPQ-S9-1	0,123	1,273
BBI-A-01	0,067	0,078
BBI-A-02	0,114	0,130
BBI-A-03	0,180	1,069
BBI-A-04	2,401	>2,8

pokračování TABULKY 5

Test 310

absorbance 450nm

<u>vzorek</u>	BC-87c <u>BC-202c</u>	BCH-87ck <u>BCH-202ck</u>
BBI-A-05	>2,8	>2,8
BBI-A-06	>2,8	>2,8
BBI-A-07	>2,8	>2,8
BBI-A-08	>2,8	>2,8
BBI-A-09	>2,8	>2,8
BBI-C-20	>2,8	>2,8
BBI-C-21	0,019	0,050
BBI-C-22	0,017	0,048
BBI-C-24	0,030	0,121
BBI-C-25	0,210	1,748
BBI-C-26	0,372	2,452
	0,374	2,353

Obecné pracovní postupy syntézy a využití peptidů tohoto vynálezu jsou níže popsány.

Pracovní postup 1: Příprava pryskyřic nesoucích aminokyselinový zbytek chráněný N α -Fmoc

K suspenzi p-benzylalkoholové pryskyřice v CH₂Cl₂:DMF (4:1) byl za teploty 0°C přidán daný aminokyselinový zbytek chráněný N α -Fmoc ve směsi methylenchloridu (CH₂Cl₂) a dimethylformamidu. Výsledná směs byla ručně míchána po dobu několika sekund, pak byl přidán N,N'-dicyklohexylkarbodiimid (DCC) a katalytické množství 4-(dimethylamino)pyridinu. Tato směs byla dalších 30 minut míchána při teplotě 0°C a dále přes noc při laboratorní teplotě. Přefiltrovaná pryskyřice byla úspěšně promyta CH₂Cl₂, DMF a isopropanolem (každým činidlem celkem třikrát) a nakonec CH₂Cl₂. Pryskyřice byla suspendována v CH₂Cl₂ a vychlazena v ledové lázni, dále byl do promíchávané suspence přidán redestilovaný pyridin a také benzoylchlorid. Suspenze byla dále míchána 30 minut při teplotě 0°C a dále 60 minut při laboratorní teplotě. Po filtraci byla pryskyřice promyta CH₂Cl₂, DMF a isopropanolem (každým z nich celkem třikrát) a nakonec dvakrát petroletherem. Nakonec byla pryskyřice vakuově vysušena do konstantní hmotnosti.

Metodou podle Meienhofera a kol. (Int.J.Peptide Protein Res., 13, 35, 1979) byl spektrofotometricky stanoven stupeň substituce na pryskyřici.

Pracovní postup 2: Připojování následujících aminokyselin

Pryskyřice nesoucí první aminokyselinový zbytek chráněný $N\alpha$ -FMOC byla umístěna do reakční nádoby peptidového syntetizátoru Biosearch 9600 a následujícím způsobem zpracována:

- 1) Promytí DMF (po dobu 20 sec., 4x)
- 2) Předpromytí 30% piperidinem v DMF (3min)
- 3) Zbavení ochranné skupiny 30% piperidinem v DMF (7 min.)
- 4) Promytí DMF (8x po dobu 20 sec.)
- 5) Kontrola přítomnosti volných aminoskupin Kaiserovým testem (musí být pozitivní)
- ~~6) Mírné třepání peptidové pryskyřice po dobu 1 až 2 hodin s 8 ekvivalenty dané aminokyseliny, chráněné $N\alpha$ -FMOC, s 1-Hydroxybenzotriazolem a benzotriazol-1-yl-oxy-tris(dimethylamino)fosfoniumhexafluorofosfátem, to vše rozpuštěno v suchém redestilovaném DMF, obsahujícím 16 ekvivalentů 4-methylmorfolinu~~
- 7) Promytí DMF (6x po dobu 20 sec.)

Po dokončení 7. kroku byla část odebrána na stanovení ninhydrinovým testem. V případě negativního výsledku při tomto stanovení byl celý postup opakován od kroku 1) s další aminokyselinou. V případě, že výsledek byl pozitivní nebo slabě pozitivní, bylo nutné se vrátit zpět a opakovat kroky 6) a 7).

Výše uvedené schéma je možné použít pro připojení každé aminokyseliny peptidu, popsaného v tomto vynálezu. Ochrana $N\alpha$ -skupiny pomocí FMOC může být také použita v případě každé

zbyvající aminokyseliny po celou dobu syntézy.

Radioaktivně značené peptidy mohou být připraveny inkorporací aminokyselin značených [H^3] s použitím výše uvedeného postupu.

Po připojení poslední aminokyseliny je pomocí kroků 1-7 odstraněn $N\alpha$ -Fmoc z N-koncového zbytku. Peptidová pryskyřice je promyta CH_2Cl_2 a vysušení ve vakuu je získán surový chráněný peptid.

Pracovní postup 3: Zbavení ochrany a odštěpení peptidů z pryskyřice

Chráněná peptidová pryskyřice byla suspendována v 55% roztoku kyseliny trifluoroctové (TFA) v CH_2Cl_2 , obsahujícím 2,5% ethandithiol a 2,5% anisol. Směs byla prosycena N_2 a byla 1,5 hodiny míchána při laboratorní teplotě. Pak byla směs přefiltrována a pryskyřice promyta CH_2Cl_2 . Znovu byl opakován postup s TFA, na pryskyřici bylo působeno 20% TFA v CH_2Cl_2 5 minut při laboratorní teplotě. Směs byla přefiltrována a pryskyřice promyta 20% TFA v CH_2Cl_2 a dále byla promyta CH_2Cl_2 . Oba filtráty byly spojeny a odpařeny ve vakuu při teplotě nižší než $35^{\circ}C$, zbytek byl rozmělněn se suchým dimethyletherem. Pevná fáze byla rozpuštěna v 10% vodném roztoku kyseliny octové a lyofilizována s cílem získat surový produkt.

Ty peptidy, které obsahovaly zbytky arg a cys, jsou dále zbavovány ochrany působením HF při teplotě $0^{\circ}C$ po dobu 1 hodiny v přítomnosti anisolu a dimethylsulfidu. Peptidy byly dále extrahovány působením 10% kyseliny octové, promyty

dimethyletherem a lyofilizovány za vzniku surových peptidů.

Pracovní postup 4: Purifikace peptidů

Surové peptidy byly preparativně purifikovány vysokotlakou kapalinovou chromatografií (HPLC) na koloně Vydac (2,5x25mm) za použití C_{18} nebo C_4 jako reverzní fáze s gradientem mobilní fáze. Absorbance eluátu byla měřena při vlnové délce 220nm, poté byl eluát analyzován HPLC. Důležité frakce byly spojeny, odpařeny a lyofilizovány. Totožnost syntetických peptidů byla ověřena chromatografií s reverzní fází a aminokyselinovou analýzou.

Pracovní postup 5:

Cyklizace peptidů

Roztok hexakynoželezitanu draselného (0,01M, pH 7,0) byl pomalu přidán do roztoku do vodného roztoku s rozpuštěným lineárním peptidem (0,5mM) při pH 7,0. Po 24 hodinách stání při laboratorní teplotě bylo pH sníženo na hodnotu 5,0 a roztok byl ponechán 30 minut v přítomnosti iontoměničové pryskyřice (Bio-Rad Ag-3-X4a, Cl-forma). Suspenze byla zfiltrována a filtrát lyofilizován za vzniku surového cycklického peptidu. Peptid byl preparativně purifikován HPLC s reversní fází a charakterizován aminokyselinovou analýzou. Důkaz toho, že došlo k cyklizaci, byl proveden porovnáním pohyblivosti cycklického peptidu se startovním lineárním peptidem při HPLC redukcí alikvotu cycklického peptidu zpět na lineární peptid a dále potvrzením

zmizení volných sulfhydrylových skupin (Ellmanův test), ke kterému došlo po cyklizaci.

Pracovní postup 6: Vazba peptidů na hovězí sérový albumin (BSA) nebo ústřicový hemokyanin (KLH)

Na BSA nebo KLH byly navázány peptidy předem derivatizované buď sulfosukcinimidyl 4-(p-maleimidofenyl)-butyrátem (Sulfo-SMPB) nebo sulfosukcinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyklohexan-1-karboxylátem (Sulfo-SMCC).

Vodný roztok sulfo-SMPB nebo sulfo-SMCC (Pierce chemikálie) byl přidán do roztoku BSA nebo KLH rozpuštěných v 0,02M pufru fosforečnanu sodného (pH 7,0). Směs byla třepána při laboratorní teplotě 45 minut. Takto aktivovaný nosič byl ihned aplikován na kolonu se Sephadexem G-25, ekvilibrovanou 0,1M pufru fosforečnanu sodného (pH 6,0) při teplotě 4°C.

Frakce prvního vrcholu, měřené při 280nm, odpovídající vzorku aktivovaného nosiče byly spojeny a sebrány do baňky s kulatým dnem, do které byl přidán roztok peptidu v 0,05M pufru fosforečnanu sodného (pH 6,2). Směs byla prosycena dusíkem a přes noc inkubována při laboratorní teplotě. Účinnost vazebného procesu byla určována pomocí peptidu značeného H^3 a aminokyselinovou analýzou konjugátu.

Pracovní postup 7: Detekce protilátek k HIV ELISA-testem

Do všech jamek mikrotitrační destičky bylo aplikováno

100 μ l roztoku obsahujícího peptid nebo směs peptidů v koncentraci (5 μ g/ml) a ty byly ponechány přes noc.

Poté byly jamky vyprázdněny a dvakrát promyty promývacím pufr (Tris, 0,043M; NaCl, 0,5M; thimerosal, 0,01w/v; Tween 20, 0,05% v/v; pH 7,4). Potom byly jamky saturovány 0,35ml promývacího pufru po dobu jedné hodiny při 37°C a dále jednou promyty tímto pufr. Vzorky sera, určené k analýze jsou rozpuštěny v pufru (promývací pufr s kaseinem, 0,05% w/v). Před aplikací naředěných vzorků séra (0,1ml) na destičku byly jamky opláchnuty promývacím pufr. Vše bylo ponecháno inkubovat 1 hodinu při laboratorní teplotě. Jamky byly vyprázdněny, dvakrát rychle promyty a ponechány dvě minuty v promývacím pufru. Do každé jamky bylo přidáno 0,1ml vazebného roztoku (afinitním způsobem přečištěná kozí protilátka proti lidskému IgG značená peroxidasou, 0,5mg v 5ml 50% glycerolu) rozpuštěného v roztoku 1% w/v BSA v promývacím pufru a dále byly destičky inkubovány jednu hodinu při laboratorní teplotě. Jamky byly potom vyprázdněny a dvakrát rychle promyty promývacím pufr, následovalo pětinašobné promývání stejným pufr po dobu 2 minut. Roztok substrátu (3,3',5,5'-tetramethylbenzidin, 8mg/ml DMSO) byl rozpuštěn ve 100 objemech 0,1M citrát-acetátového pufru, pH 5,6 obsahujícího 0,1% v/v 30% peroxidu vodíku a poté přidán do každé jamky (0,1ml). Po 10 minutách bylo do každé jamky přidáno 0,1ml 2N H₂SO₄ a byla měřena absorbance při 450nm. Všechna stanovení byla prováděna duplicitně.

Pracovní postup 8 : Příprava peptidových koktejlů

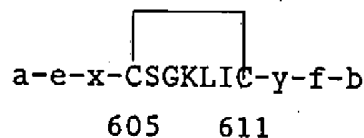
Peptidové koktejly byly připraveny smícháním stejných objemů roztoků dvou peptidů, každého v koncentraci 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Jeden koktejl byl směsí peptidů BCH-87c a BCH-202c a druhý koktejl byl směsí BCH-87ck a BCH-202ck . Každý koktejl byl použit k překrytí dvou sérií destiček, jak bylo dříve popsáno.

J. A. Kocik
MUDr. Jaroslav Kocik

Číslo	038575
datum	20. VIII 91
ÚŘAD PRO VYKÁLEZY A OBJEVY	
Přil.	

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Značně čistý peptid, v y z n a č u j í c í s e
t í m, že má následující vzorec:



kde:

x je nezávisle vybráno z jedné z následující skupiny:

KILAVERYLKDQQLGIWG- (586-604)

KKILAVERYLKDQQLGIWG- (585-604),

aminokyselinových sekvencí odpovídajících těm, které jsou odvozeny od homologních oblastí dalších HIV-1 isolátů, a aminokyselinových sekvencí lišících se od výše uvedených konservativními substitucemi, např. takové aminokyselinové sekvence, které jsou charakterizovány přítomností alespoň

jednoho lysinového zbytku v pozici 586 nebo současně v pozicích 585 a 586;

y, jestliže je přítomno, je nezávisle vybráno ze skupiny skládající se z:

- T
- TT
- TTA
- TTAV
- TTAVP
- TTAVPW
- TTAVPWN
- TTAVPWNA
- TTAVPWNAS
- TTAVPWNASW
- TTAVPWNASWS
- TTAVPWNASWSN
- TTAVPWNASWSNK
- TTAVPWNASWSNKS
- TTAVPWNASWSNKSL
- TTAVPWNASWSNKSLE
- TTAVPWNASWSNKSLEQ
- TTAVPWNASWSNKSLEQI,

aminokyselinových sekvencí odpovídajících těm sekvencím, které jsou odvozeny od homologních oblastí dalších HIV-1 isolátů a aminokyselinových sekvencí odlišujících se od výše uvedených konservativními substitucemi;

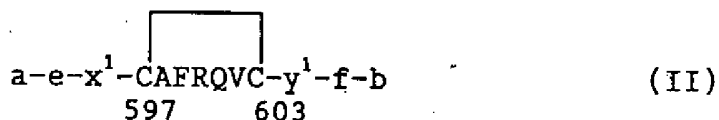
e, a f, jestliže jsou přítomny, jsou nezávisle vybrány ze skupiny obsahující aminokyselinové sekvence jakéhokoli z

epitopů oblasti, jež zahrnuje posice aminokyselin od posic 586 do 629 bílkoviny gp41 HIV-1 nebo oblasti aminokyselinové sekvence, zahrnující posice od 578 do 613 bílkoviny gp36 HIV-2, aminokyselinové sekvence, které odpovídají těm a jsou odvozené z homologních oblastí dalších HIV-1 a HIV-2 isolátů, aminokyselinové sekvence, které se liší od výše uváděných konservativními substitucemi, nebo jakýchkoli kombinací těchto epitopů;

a představuje aminokyselinový konec nebo substituent účinný jako spojovací činidlo a/nebo může sloužit k tomu, že peptid se stane použitelnějším jako imunodiagnostické činidlo bez změněných antigenních vlastností; a

b představuje karboxylový konec nebo substituent, který je účinný jako spojovací činidlo a/nebo může sloužit k tomu, že se peptid stane použitelnějším jako imunodiagnostické činidlo bez změněných antigenních vlastností.

2. Značně čistý peptid v y z n a č u j í c í s e t í m, že má vzorec :



kde:

x^1 je nezávisle vybráno ze skupiny, skládající se z:

KVTAIEKYLDQARLNSWG (578-598)

KKVTAIEKYLDQARLNSWG (577-596),

aminokyselinových sekvencí, které odpovídají těm sekvencím, odvozeným od homologních oblastí jiných HIV-2 isolátů a aminokyselinových sekvencí, které se liší od výše uváděných konservativními substitucemi, takové sekvence jsou charakterizovány přítomností alespoň jednoho lysinového zbytku v posici 578 nebo současně v posicích 577 a 578;

y¹, jestliže je přítomno, je nezávisle vybráno ze skupiny skládající se z:

H
 -HT
 -HTT
 -HTTV
 -HTTVP
 -HTTVPW
 -HTTVPWV
 -HTTVPWVN
 -HTTVPWVND
 -HTTVPWVNS,

aminokyselinových sekvencí, které odpovídají těm, jež jsou odvozené od homologních oblastí jiných HIV-2 isolátů, a aminokyselinových sekvencí, které se liší od výše uvedených konservativními substitucemi; a

e, a f, jestliže jsou přítomny, jsou nezávisle vybrány ze skupiny obsahující aminokyselinovou sekvenci jakéhokoli z epitopů oblasti v rozmezí posic aminokyselinové sekvence 586

do 629 gp41 HIV-1 nebo oblasti v rozsahu aminokyselin od 578 do 613 gp36 HIV-2, aminokyselinových sekvencí jim odpovídajících nebo sekvencí odvozených od homologních oblastí jiných HIV-1 nebo HIV-2 isolátů, aminokyselinových sekvencí odlišujících se od výše uvedených konservativními substitucemi, a jakýchkoli kombinací těchto epitopů.

a představuje aminokyselinový konec nebo substituent účinný jako spojovací činidlo a/nebo může sloužit k tomu, že peptid se stane použitelnějším jako imunodiagnostické činidlo bez změněných antigenních vlastností; a

b představuje karboxylový konec nebo substituent, který je účinný jako spojovací činidlo a/nebo může sloužit k tomu, že se peptid stane použitelnějším jako imunodiagnostické činidlo bez změněných antigenních vlastností.

3. Peptid podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m, že x má sekvenci KILAVERYLKDQQLGIWG a y TTAVPWNAS, e a f nejsou přítomny.

4. Peptid podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m, že x má sekvenci KKILAVERYLKDQQLGIWG a y má sekvenci TTAVPWNAS, e a f nejsou přítomny.

5. Peptid podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m,

že x^1 má sekvenci KILAVERYLKDQQLLGIWG, y má sekvenci TTAVPWNAS, f má sekvenci SGKLI a e není přítomno.

6. Peptid podle nároku 2 v y z n a č u j í c í s e t í m, že x^1 má sekvenci KVTAEKYLQDQARLNSWG a y^1 má sekvenci HTTVPWVNS, e a f nejsou přítomny.

7. Peptid podle nároku 2 v y z n a č u j í c í s e t í m, že x^1 má sekvenci KKVTAIEKYLQDQARLNSWG a y^1 má sekvenci HTTVPWVNS, e a f nejsou přítomny.

8. Peptid podle nároku 2 v y z n a č u j í c í s e t í m, že x^1 má sekvenci KVTAEKYLQDQARLNSWG a y^1 má sekvenci HTTVPWVNS, f má sekvenci AFRQV a e není přítomno.

9. Značně čistý peptid v y z n a č u j í c í s e t í m, že má vzorec:



(III)

kde x^2 , pokud je přítomno, je nezávisle vybráno ze skupiny skládající se z:

G-

WG-

IWG-

GIWG-

LGIWG-

LLGIWG-

QLLGIWG-

QQLLGIWG-

DQQLLGIWG-

KDQQLLGIWG-

LKDQQLLGIWG-

YLKDQQLLGIWG-

RYLKDQQLLGIWG-

~~ERYLKDQQLLGIWG-~~

VERYLKDQQLLGIWG-

AVERYLKDQQLLGIWG-

LAVERYLKDQQLLGIWG-

ILAVERYLKDQQLLGIWG-

RILAVERYLKDQQLLGIWG-

aminokyselinových sekvencí, které odpovídají těm, jež byly odvozeny od homologních oblastí jiných HIV-1 isolátů, a aminokyselinových sekvencí lišících se od výše uvedených konservativními substitucemi;

y, jestliže je přítomno je nezávisle vybráno ze skupiny skládající se z:

-T
-TT
-TTA
-TTAV
-TTAVP
-TTAVPW
-TTAVPWN
-TTAVPWNA
-TTAVPWNAS
-TTAVPWNASW
-TTAVPWNASWS
-TTAVPWNASWSN
-TTAVPWNASWSNK
-TTAVPWNASWSNKS
-TTAVPWNASWSNKSL
-TTAVPWNASWSNKSLE
-TTAVPWNASWSNKSLEQ
-TTAVPWNASWSNKSLEQI,

aminokyselinových sekvencí odpovídajících těm sekvencím, které jsou odvozeny od homologních oblastí dalších HIV-1 isolátů a aminokyselinových sekvencí odlišujících se od výše uvedených konservativními substitucemi;

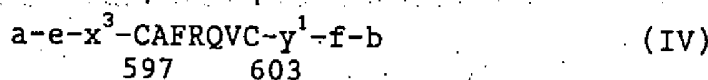
e a f, jestliže jsou přítomny, jsou nezávisle vybrány ze skupiny obsahující aminokyselinovou sekvenci jakéhokoli z epitopů oblasti v rozmezí posic aminokyselinové sekvence 586 do 629 gp41 HIV-1 nebo oblasti v rozsahu aminokyselin od 578 do 613 gp36 HIV-2, aminokyselinových sekvencí jim odpovídajících nebo sekvencí odvozených od homologních

oblastí jiných HIV-1 nebo HIV-2 isolátů, aminokyselinových sekvencí odlišujících se od výše uvedených konservativními substitucemi, a jakýchkoli kombinací těchto epitopů.

a představuje aminokyselinový konec nebo substituent účinný jako spojovací činidlo a/nebo může sloužit k tomu, že peptid se stane použitelnějším jako imunodiagnostické činidlo bez změněných antigenních vlastností; a

b představuje karboxylový konec nebo substituent, který je účinný jako spojovací činidlo a/nebo může sloužit k tomu, že se peptid stane použitelnějším jako imunodiagnostické činidlo bez změněných antigenních vlastností.

10. Značně čistý peptid v y z n a č u j í c í s e t í m, že má vzorec:



kde x^3 , jestliže je přítomno, je nezávisle vybráno ze skupiny skládající se z:

G-

WG-

SWG-

NSWG-

LNSWG-

RLNSWG-

ARLNSWG-

QARLNSWG-

DQARLNSWG-

QDQARLNSWG-

LQDQARLNSWG-

YLQDQARLNSWG-

KYLQDQARLNSWG-

EKYLQDQARLNSWG-

IEKYLQDQARLNSWG-

AIEKYLQDQARLNSWG-

TAIEKYLQDQARLNSWG-

VTAIEKYLQDQARLNSWG-

RVTAIEKYLQDQARLNSWG-

aminokyselinových sekvencí, které odpovídají těm, které jsou odvozeny od homologních oblastí jiných HIV-2 isolátů, a aminokyselinových sekvencí, které se liší od výše popisovaných konservativními substitucemi; a

^{y1}, jestliže je přítomno, je nezávisle vybráno ze skupiny skládající se z:

H

-HT

-HTT

-HTTV

-HTTVP

-HTTVPW

-HTTVPWV

-HTTVPWVN

-HTTVPWVND

-HTTVPWVNDs,

aminokyselinových sekvencí odpovídajícím těm, které jsou odvozené od homologních oblastí HIV-2 isolátů a aminokyselinových sekvencí odlišujících se od výše uvedených konservativními aminokyselinovými substitucemi.

e a f, jestliže jsou přítomny, jsou nezávisle vybrány ze skupiny obsahující aminokyselinovou sekvenci jakéhokoli z epitopů oblasti v rozmezí posic aminokyselinové sekvence 586 do 629 gp41 HIV-1 nebo oblasti v rozsahu aminokyselin od 578 do 613 gp36 HIV-2, aminokyselinových sekvencí jim odpovídajících nebo sekvencí odvozených od homologních oblastí jiných HIV-1 nebo HIV-2 isolátů, aminokyselinových sekvencí odlišujících se od výše uvedených konservativními substitucemi, a jakýchkoli kombinací těchto epitopů.

a představuje aminokyselinový konec nebo substituent účinný jako spojovací činidlo a/nebo může sloužit k tomu, že peptid se stane použitelnějším jako imunodiagnostické činidlo bez změněných antigenních vlastností; a

Sub představuje karboxylový konec nebo substituent, který je účinný jako spojovací činidlo a/nebo může sloužit k tomu, že se peptid stane použitelnějším jako imunodiagnostické činidlo bez změněných antigenních vlastností.

11. Směs v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje dva nebo více peptidů vybraných ze skupiny skládající se z peptidů uvedených v kterémkoli z nároků 1, 2, 9, 10.

12. Směs podle nároku 11 v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje alespoň peptid:



 a-KILAVERYLKDQQLGIWGCSGKLICTTAVPWNASGKLI-b (BCH-408)

 586 605 611 619

aminokyselinové sekvence odpovídající těm, které jsou odvozeny od homologních oblastí jiných HIV-1 isolátů, a aminokyselinové sekvence odlišující se od výše uvedených konservativními aminokyselinovými substitucemi, taková aminokyselinová sekvence je např. charakterizována přítomností lysinu v pozici 586.

13. Směs podle nároku 11 v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje alespoň následující peptid:

a-KVTAIEKYLDQARLNSWCAFRQVCHTTVPWVNDSAQRQV-b (BCH-417)
 578 597 603 613

aminokyselinové sekvence odpovídající těm, které jsou odvozeny od homologních oblastí jiných HIV-2 isolátů a aminokyselinové sekvence odlišující se od výše uvedených konservativními aminokyselinovými substitucemi, taková aminokyselinová sekvence je např. charakterizována přítomností lysinu v pozici 578.

14. Směs podle nároku 11 v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje alespoň následující peptid:

a-KILAVEYLKDDQLLGWGCSSGKLICTTAVPWNAS-b (BCH-87ck),
 586 605 611 620

aminokyselinové sekvence odpovídající těm, které jsou odvozené od homologních oblastí jiných HIV-1 isolátů a aminokyselinových sekvencí odlišujících se od výše uvedených konservativními substitucemi aminokyselin, jako jsou např. aminokyselinové sekvence charakterizované přítomností lysinu v pozici 586.

15. Směs podle nároku 11 v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje alespoň následující peptid:

[]

a-KVTAIEKYLQDQARLNSWGCAFRQVCHTTVPWVND**S**-b (BCH-202ck)
578 597 603 613

aminokyselinové sekvence odpovídající těm, které jsou odvozeny od homologních oblastí jiných HIV-2 isolátů a aminokyselinové sekvence odlišující se od výše uvedených konservativními aminokyselinovými substitucemi, taková aminokyselinová sekvence je např. charakterizována přítomností lysinu v pozici 578.

16. Prostředky pro detekci přítomnosti protilátek, vybraných ze skupiny obsahující HIV-1 protilátky, HIV-2 protilátky, a jejich směsí ve stanovovaném vzorku, v y z n a č u j í c í s e použitím peptidu připraveném podle jakéhokoli z nároků 1 až 10 nebo směsi připravené podle jakéhokoli z nároků 11 až 15.

17. Metoda v y z n a č u j í c í s e t í m, že pomocí ní lze stanovit přítomnost protilátek selektovaných ze skupiny obsahující HIV-1 protilátky, HIV-2 protilátky a jejich směsí ve stanovovaném vzorku, zahrnující krok, kdy alikvot stanovovaného vzorku se uvede do kontaktu s peptidem připraveném podle kteréhokoli z nároků 1 až 10 nebo se směsí, která byla připravena podle kteréhokoli z nároků 11 až 15.

18. Metoda podle nároku 17, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je vybrána ze skupiny metod- ELISA-test, hemoaglutinace, single-dot nebo multi-dot metody.

19. Protilátka v y z n a č u j í c í s e t í m, že je schopná imunologické křížové reakce s peptidem připraveným podle kteréhokoli z nároků 1-10, nebo jeho směsí.

20. Protilátka podle nároku 19, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je protilátkou monoklonální, nebo jde o směs zmíněných monoklonálních protilátek.

21. Prostředky v y z n a č u j í c í s e schopností detekce přítomnosti antigenů vybraných ze skupiny obsahující HIV-1 antigeny, HIV-2 antigeny a jejich směsi ve stanovovaném vzorku, prostředky jsou charakterizovány obsahem protilátek podle nároků 19 nebo 20.

22. Metoda v y z n a č u j í c í s e schopností detekce přítomnosti antigenů, vybraných ze skupiny obsahující HIV-1 antigeny, HIV-2 antigeny a jejich směsi ve stanovovaném vzorku. Tato metoda obsahuje i krok kdy je alikvot stanovovaného vzorku uveden do kontaktu s protilátkou, připravenou podle nároků 19 nebo 20.

23. Farmaceuticky akceptovatelná kompozice v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje peptid připravený podle kteréhokoli z nároků 1-10, nebo směs připravenou podle nároků 11-15, zmíněný peptid nebo směs jsou přítomny v množství, které je účinné pro savce, včetně člověka. Působení této kompozice vede ke zvýšené tvorbě protilátek tak, aby mohlo dojít k dostatečné ochraně savce proti HIV-1 nebo HIV-2 po určitou dobu.

24. Farmaceuticky akceptovatelná kompozice podle nároku 23 v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje fyziologicky přijatelný nosič.

25. Farmaceutická kompozice podle Nároku 23, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje adjuvans nebo látku posilující imunitní odpověď.

26. Farmaceutická kompozice podle nároku 23, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje druhý antigen k pathogenu jinému než jsou HIV-1, nebo HIV-2 viry. Tento druhý antigen je přítomen v množství, jež je dostatečné pro zvýšení hladiny protilátek, účinných pro ochranu savce před infekcí pathogenem po určitou dobu.

27. Způsob v y z n a č u j í c í s e t í m, že pomocí něj lze ochránit savce, včetně lidí před infekcí HIV-1 nebo

HIV-2 nebo jiným pathogenem. Způsob ochrany zahrnuje i krok, kdy savec je podroben působení farmaceutické kompozice podle jakéhokoli z nároků 23 až 26.